

Hızlı üreyen belirli anaerop bakteriler için %5 defibrine at kanlı “Fastidious Anaerobe Agar (FAA-HB)” ile EUCAST disk difüzyon yöntemi

* Bu yöntem *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Fusobacterium necrophorum*, *Clostridium perfringens* ve *Cutibacterium acnes* türlerinde, 16-20 saat inkübasyon süresi sonrası için onay almıştır. Diğer anaerop bakteri türlerinde ve 20 saat inkübasyon süresi sonrasında kullanılamaz.

Bir öncek sürümden sonraki (1.0) değişiklikler

Bölüm	Değişiklik
Genel	FAA şeklinde olan besiyeri kısaltması FAA-HB olarak değiştirildi
Besiyeri, 1c	Laboratuvar tarafından yapılan FAA-HB besiyerinin beklenen raf ömrü, 14 günden 21 güne çıkartıldı
İnkübasyon, 1a İnkübasyon, 1b	<i>Clostridium perfringens</i> 'de plaklara yayım öncesi, pamuk uçlu eküvyondan fazla sıvının uzaklaştırılması için yeni yorum eklendi
İnokülasyon, 2a Çözüm önerisi, 1b	FAA-HB'de küçük koloni şeklinde üreyen bazı <i>Prevotella</i> spp. için, plaklara dikkatli bir şekilde yayma işleminin yapılmasının özellikle önemli olduğu bilgisi eklendi.
Çözüm önerisi, 1a	Ticari FAA-HB plaklarının içeriğine ilişkin bilgi eklendi
Çözüm önerisi, 1c	Her plağa yerleştirilebilecek disk sayısına ilişkin ek bilgi eklendi
KK tabloları	Anaerop kalite kontrol suşları için kalite kontrol kriterleri bu belgeden EUCAST KK Tablosu v. 13.0 belgesine taşındı

Besiyeri

1. Mekanik olarak elde edilen %5 defibrine at kanı içeren "Fastidious Anaerob Agar" (FAA-HB) kullanın ve başka bir katkı maddesi kullanmayın.
 - a. Besiyerinin kalınlığı 4 mm \pm 0.5 mm olmalıdır.
 - b. Laboratuvar koşullarında hazırlanan plaklar için, besiyerine kan eklemeyen önce besiyerinin 42-45°C'ye kadar soğumasını bekleyin.
 - c. Laboratuvar koşullarında hazırlanan plaklar, havalandırmalı raflarda 4-8°C'de ve ışıktan korunarak saklanmalıdır. Raf ömrü, laboratuvar kalite güvence programının bir parçası olarak belirlenmelidir; ancak, minimum 21 günlük raf ömrü beklenebilir.
 - d. Ticari olarak sağlanan plaklar, üreticinin önerdiği şekilde saklanmalı, ışıktan korunarak, son kullanma tarihinden önce kullanılmalıdır.
 - e. FAA-HB plakları inokülasyondan önce aşırı nemden kaçınmak için kurutulmalıdır. Plakların nemli kalması belirgin olmayan zon sınırlarına, yayılmaya ve/veya zon içinde puslu görünüme neden olabilir.

Aşağıdaki işlemlerden biri uygulanabilir

- i. Bir gece 20-25°C'de kurutun veya
 - ii. Kapağı çıkarılmış halde 35°C'de 15 dakika kuruttun. Bu işlemden önce plakların oda sıcaklığına ulaşması gerekir.
 - iii. Plastik torbalarda veya kapalı kaplarda saklanan plaklar için, plakların önce (i) ve ardından (ii)'ye göre kurutulması gerekli olabilir.
- f. FAA-HB plaklarını kullanmadan önce anaerob ortamda ön indirgeme yapmayın.

İnokülasyonun hazırlanması

1. Seçici olmayan bir besiyerinde bir gecelik anaerob kültürden, steril öze veya steril pamuk uçlu eküvyon kullanarak, kolonileri toplayın. Morfolojik olarak benzer olan birkaç koloniyi kullanın.
2. Kolonileri %0,85 serum fizyolojikte süspansiyon edin ve eşit bir bulanıklığa kadar karıştırın.
3. İnokülasyon süspansiyonunun yoğunluğunu serum fizyolojik ve daha fazla bakteri ekleyerek McFarland 1.0 (0.9-1.1)'e ayarlayın. Fotometrik cihaz kullanımı önerilir.
4. Süspansiyon hazırlandıktan sonra **15 dakika içerisinde** kullanılmalıdır.

Agar plaklarının ekimi

1. McFarland 1.0 süspansiyona steril pamuk uçlu eküvyonu batırın.
 - a. *Bacteroides* spp. ve *Clostridium perfringens*'de, plağa yoğun inokülasyon aktarılmasını engellemek amacıyla eküvyonu tüpün iç duvarında döndürerek fazla sıvıyı uzaklaştırın.
2. Çizgiler arasında boşluk olmadığından emin olarak inokülasyonu agar yüzeyinin tamamına eşit şekilde yayın.
 - a. Bu özellikle FAA-HB üzerinde küçük koloni oluşturarak üreyen *Cutibacterium acnes* ve bazı *Prevotella* spp. gibi türler için önemlidir.

Agar plaklarının doğru bir şekilde ekimi, kolonilerin birbirleriyle birleşerek tabaka oluşturabilmesini ve düzgün dairesel inhibisyon zonlarının elde edilebilmesini sağlar.

Antibiyotik disklerinin yerleştirilmesi

1. EUCAST [Sınır Değer](#) ve [Kalite Kontrol Tabloları](#)'nda belirtilen disk içeriklerini kullanın.
2. Disklerin ambalajlarını/saklama kaplarını açmadan önce, oda sıcaklığına gelmelerini bekleyin.
3. Diskleri inokülasyondan sonra **15 dakika içerisinde** yerleştirin
 - a. Diskleri, agar plağına sıkıca yerleştirin. Diskler bir kez agar plağına yerleştirildikten sonra yerinden oynatılmamalıdır.
 - b. Zonların iç içe girmesini önlemek için. Plakta yer alacak disk sayısı sınırlanmalıdır. En uygunu 90mm lik bir petride 3 diskten fazla kullanılmamasıdır (*Bacteroides* spp. için dört disk kullanılabilir).

Plakların inkübasyonu

1. Plakları ters çevirin ve agar yüzeyinden disklerin düşmediğinden emin olun. Diskleri yerleştirdikten sonra **15 dakika içerisinde** inkübasyonu başlatın.
2. FAA-HB plaklarını anaerob atmosferde 35-37°C'de 16-20 saat inkübe edin.
 - a. Anaerob koşullar, anaerob bir kabinde veya anaerob gaz üreten zarflar kullanarak kavanozlarda veya Anoxomat gibi bir gaz üretme sistemiyle elde edilebilir.
 - b. Zon çaplarını etkileyip yorumlama kriterlerinde hataya yol açacağından, uzun süreli inkübasyona (20 saatten fazla) izin verilmez.

İnhibisyon zonlarının değerlendirilmesi

1. Doğru bir inokulum ile, kolonilerin birbirleriyle birleşerek tabaka oluşturduğu, tüm agar yüzeyine eşit yayılan bir üreme gözlenmelidir. Eğer üreme bu şekilde değil ise, test tekrarlanmalı veya MİK yöntemi kullanılmalıdır.
2. Plakları, kapakları kaldırıldıktan sonra yansıyan ışıkta değerlendirin.
3. Plakları çalışma tezgahından 45 derecelik bir açıyla, gözden yaklaşık 30 cm uzakta tutun ve zon kenarlarını çıplak gözle bakıldığında üremenin tam inhibe olduğu nokta olarak değerlendirin.
4. İnhibisyon zonunun çapını en yakın milimetreye göre, bir cetvel veya çap ölçer (kumpas) ile ölçün.
 - a. Zon içinde puslu bir görünüm var ise, en net olan zon kenarını değerlendirin. Keskin zon kenarlarını görebilmek için plağa kendinize doğru eğim verin.
 - b. Çift zon oluşması durumunda içteki zonu ölçün.
 - c. Zonları değerlendirirken hemoliz ve yayılmayı dikkate almayın.
5. İnhibisyon zonu içindeki kolonileri dikkate alın. **Klindamisin'de, zon içinde üreyen kolonilerin saptanması için zonların dikkatlice değerlendirilmesi özellikle önemlidir.**
6. [FAA-HB'de Anaerob bakteriler Disk difüzyon Değerlendirme Kılavuzunda](#)' değerlendirme örneklerini içeren resimler mevcuttur.

Kalite Kontrolü

Her test uygulamasında kalite kontrolü (KK) gerçekleştirin. KK suşunun, bir gecelik kültürünü kullanarak, klinik izolatlarla aynı test sürecini izleyin.

- a. Test performansını değerlendirmek için *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 ve *Clostridium perfringens* suşlarını kullanın. KK aralıkları ve hedefleri için, [EUCAST KK Tabloları](#)'na bakın.
- b. *Clostridium perfringens* DSM 25589 suşu ve 5 µg metronidazol diskini, anaerob atmosfer oluşumunu gözlemlemek için kullanın.
Bu kombinasyonun anaerob atmosferin duyarlı bir göstergesi olduğu gösterilmiştir. Yetersiz anaerob atmosfer, anaerob bakterilerin üremesini ve duyarlılık test sonuçlarını etkileyebilir. Değerlendirme kriterleri için [EUCAST KK Tabloları](#)'na bakınız.
 - i. Anaerob kabinlerde anaerob atmosfer kontrolü özel dikkat gerektirir. Düzenli servis ve teknik kontrol gereklidir.

Çözüm önerisi

1. Kalite Kontrol sonuçlarının aralık dışında olmasının bir veya daha fazla nedeni olabilir. Güvenilir sonuçlar elde etmek için protokole sıkı sıkıya bağlı kalmak gerekir.

Sorun giderme kılavuzu:

- a. Besiyeri
 - i. FAA-HB plakları yukarıdaki talimatlara göre saklanıyor ve kurutuluyor mu?
 - ii. Agar derinliği 4,0 ± 0,5 mm mi? Hedef agar derinliği 4,0 mm'dir ve ± 0,5 mm rastgele sapmaların hesaba katılmasına izin verir, ancak sistematik sapmaları saptayamaz.
 - iii. Ticari FAA-HB plakları EUCAST önerilerine göre tek katkı maddesi olarak %5 mekanik olarak defibrine edilmiş at kanı ile mi hazırlanıyor?
- b. Plakların ekimi
 - i. İnokulumun tüm agar üzerine tamamen yayıldığından ve çizgiler arasında boşluk olmadığından emin olun.
1-Bu özellikle FAA-HB üzerinde küçük koloniler oluşturarak üreyen *Cutibacterium acnes* ve bazı *Prevotella* spp. gibi türler için önemlidir.
- c. *Bacteroides* spp. ve *Clostridium perfringens*'de, plağa yoğun inokulum aktarılmasının engellemek amacı ile eküvyonu tüpün iç duvarında döndürerek fazla sıvıyı uzaklaştırın
- d.
- e. Antibiyotik diskleri
 - i. Kontrolsüz üremeler ve zonların üst üste binmesini önlemek için, plak üzerindeki disk sayısı kısıtlı olmalıdır. Çoğu tür ve antibiyotik için, 90 mm'lik bir petride üç disk kullanılabilir, ancak bazı izolatlar için bu, plak başına iki disk kadar düşük olabilir.
 - ii. Kartuşları açmadan önce disklerin oda sıcaklığına gelmesini bekleyin ve disklerin saklanmasıyla ilgili önerilere uyduğunuzdan emin olun.
- f. İnkübasyon
 - i. Anaerob atmosferi (nasıl oluşturulduğuna bakılmaksızın) düzenli olarak kontrol edin.
 1. Anaerob kabinlerde anaerob atmosfer, düzenli servis ve teknik kontrol gerektirir. Atmosfer ve sıcaklık, kabinin plak yüklenme ve boşaltılma için ne sıklıkta açıldığından ve kabindeki plakların miktarından etkilenebilir.
 2. Anaerob inkübasyon için kavanozları kullanırken sızıntı olmadığından emin olun.

- ii. FAA-HB agarda, anaeroplarn disk difüzyon yöntemine ilişkin EUCAST sınır değerleri ve KK kriterleri yalnızca 16-20 saatlik inkübasyon için onaylıdır.
 - 1. Zon çaplarını önemli ölçüde etkileyebileceği için, uzun süreli inkübasyona izin verilmez.
- g. Zonların değerlendirilmesi
 - i. Yukarıda listelenen anaeroplarn için özel okuma talimatlarını izlediğinizden emin olun. [FAA-HB'de Anaerop bakteriler Disk difüzyon Değerlendirme Kılavuzunda](#)' de değerlendirme örneklerini içeren resimler mevcuttur.