



EUCAST

EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

**Antimikrobik duyarlılık testine
yönelik
EUCAST disk difüzyon yöntemi**

Sürüm 3.0

Ocak 2014

İçindekiler		Sayfa
	Belge deęişiklikleri	
	Kısaltmalar ve terminoloji	
1	Giriş	4
2	Besiyeri hazırlama	5
3	İnokulum hazırlama	6
4	Ağar plaklarının ekimi	8
5	Antimikrobik disklerinin yerleştirilmesi	9
6	Plakların inkübasyonu	10
7	İnkübasyon sonrası plakların incelenmesi	11
8	Zonların ölçülmesi ve duyarlılık sonuçlarının yorumlanması	12
9	Kalite kontrol	14
	Ek A	17

Belge deęişiklikleri

Sürüm	Değişiklik	Tarih
3.0	Bölüm 2.1 ve 2.4: Besiyeri hazırlanması ve saklanması ile ilgili açıklama.	Nisan 2013
3.0	Tablolar 1 ve 3: <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> ve <i>coli</i> eklendi.	Nisan 2013
3.0	Bölüm 3.2.2: Bulanıklık standardının kullanımı ile ilgili açıklama.	Nisan 2013
3.0	Bölüm 4.1: İnokulum süspansiyonunun kullanımı ile ilgili açıklama.	Nisan 2013
3.0	Bölüm 5.3: Her bir agar plağındaki antibiyotik disk sayısı ile ilgili açıklama.	Nisan 2013
3.0	Bölüm 5.3.1: Yeni bölüm. İndüklenebilir klindamisin direncinin saptanması için disk yerleştirilmesi.	Nisan 2013
3.0	Bölüm 8.8.2: <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> için trimetoprim-sülfametoksazol zonlarının değerlendirilmesi için özel bilgi.	Nisan 2013
3.0	Tablo 4: <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560 eklendi.	Nisan 2013
3.0	Tablo 5: <i>E. faecalis</i> ATCC 51299 için DSM ve CCUG numaraları eklendi.	Nisan 2013
3.0	Ek A: Yeni bölüm. <i>Campylobacter jejuni</i> ve <i>coli</i> için EUCAST disk difüzyon testi yöntemi.	Nisan 2013
2.1	Bölüm 8: Gözden geçirilen numaralandırma. Yeni/gözden geçirilen bölümler: 8.1 ve 8.4.	Şubat 2012
2.0	Bölüm 2.2: Agar derinliği ile ilgili açıklama.	Ocak 2012
2.0	Tablolar 1 & 3: Yeni terminoloji (viridans grup streptokoklar). <i>Listeria monocytogenes</i> eklendi.	Ocak 2012
2.0	Bölüm 8: Gözden geçirilen numaralandırma. Yeni/gözden geçirilen bölümler: 8.1, 8.7, 8.7.3, 8.7.4, 8.7.6, 8.7.9 ve 8.7.10.	Ocak 2012
2.0	Tablo 5: <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 ve <i>E. faecalis</i> ATCC 51299 eklendi.	Ocak 2012
2.0	Tablolar 4 & 5 ve Kısaltmalar: İspanyol Kültür Koleksiyonu numaraları eklendi.	Ocak 2012
1.0	İlk baskı	Aralık 2009

Kısaltmalar ve terminoloji

ATCC	Amerikan Tip Kültürü Koleksiyonu (American Type Culture Collection) http://www.atcc.org
BLNAR	β -Laktamaz Negatif, Ampisiline Dirençli
CCUG	Göteborg Üniversitesi Kültür Koleksiyonu (Culture Collection University of Göteborg) http://www.ccug.se
CECT	İspanyol Tip Kültürü Koleksiyonu (Colección Española de Cultivos Tipo) http://www.cect.org
CIP	Pastör Enstitüsü Koleksiyonu (Collection de l'Institut Pasteur) http://www.cabri.org/CABRI/srs-doc/cip_bact.info.html
DSM	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) kaynaklı bakteri kültürleri DSM numaralarına sahiptir http://www.dsmz.de/index.htm
GSBL	Genişlemiş spektrumlu β -laktamaz (ESBL, Extended spectrum β -lactamase)
EUCAST	Avrupa Antimikrobik Duyarlılık Testleri Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) http://www.eucast.org
MH	Mueller-Hinton agar
MH-F	Mueller-Hinton agar -güç üreyen (fastidious) organizmalar (%5 defibrine at kanı ve 20 mg/L β -NAD eklenmiş MH)
MRSA	Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>mecA</i> veya <i>mecC</i> geni ile)
NCTC	Ulusal Tip Kültürü Koleksiyonları (National Collection of Type Cultures) http://www.hpacultures.org.uk
β -NAD	β -Nikotinamid adenin dinükleotid
Serum fizyolojik	%0.85 NaCl'nin sudaki çözeltisi

Disk difüzyon, en eski antimikrobik duyarlılık testi yöntemlerinden biridir ve rutin klinik laboratuvarlarda kullanılan en yaygın antimikrobik duyarlılık test yöntemi olmaya devam etmektedir. Güç üreyen ancak sık rastlanan bakteriler de dahil olmak üzere, bakteriyel patojenlerin çoğunu test etmeye uygundur. Ayrıca, birçok antimikrobik ajanın test edilmesi için uygundur ve özel bir donanıma ihtiyaç yoktur.

Diğer disk difüzyon teknikleriyle ortak olarak, EUCAST yöntemi de standart bir yöntemdir ve Antimikrobik Duyarlılık Testleri Uluslararası İşbirliği Çalışması (International Collaborative Study of Antimicrobial Susceptibility Testing), 1972 raporunda tanımlanan ilkelere ve dünya çapında uzmanların deneyimlerine dayandırılmıştır.

EUCAST yönteminin zon çapı sınır değerleri, EUCAST tarafından uyumlu hale getirilen sınır değerlere göre belirlenmiştir. Bu değerler EUCAST tarafından yayınlanmıştır ve EUCAST internet sitesinden (<http://www.eucast.org>) ücretsiz olarak erişilebilmektedir.

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

2	Besiyerinin hazırlanması
2.1	MH agarı, üretici firmanın önerileri doğrultusunda, güç üreyen bakteriler için Tablo 1'de belirtilen ek katkıları ile hazırlayınız. Ek katkıların hazırlanması ve eklenmesi, http://www.eucast.org adresinde ayrıntılı olarak tarif edilmektedir.
2.2	Besiyerinin kalınlığı 4 mm ± 0.5 mm olmalıdır (yaklaşık 90 mm'lik dairesel plakta 25 mL, 100 mm dairesel plakta 31 mL, 150 mm dairesel plakta 71 mL, 100 mm kare plakta 40 mL besiyeri).
2.3	Agar yüzeyi kullanılmadan önce kurutulmalıdır. Plakların kurutulmaya ihtiyacının olup olmaması ve agar yüzeyinin kuruması için gereksinim duyulan zaman, saklama ve kurutma koşullarına bağlıdır. Plaklar, fazla kurutulmamalıdır.
2.4	Laboratuvar koşullarında hazırlanan plakları 8-10°C'de saklayın. Eğer plaklar 7 günden uzun saklanacaksa başka bir saklama yöntemi, örneğin 4-8°C'de ağzı kapalı plastik torbalarda saklamak gerekli olabilir.
2.5	Laboratuvar koşullarında hazırlanan plaklar için, plağın kurutulması, saklama koşulları ve raf ömrü laboratuvarın kalite güvencesi programı kapsamında belirlenmelidir.
2.6	Ticari hazır besiyerleri üreticinin önerileri doğrultusunda depolanmalı ve etiketinde belirtilen son kullanım tarihine göre kullanılmalıdır.

Tablo 1	Antimikrobik duyarlılık testi için besiyeri
Organizma	Besiyeri
Enterobacteriaceae	MH agar
<i>Pseudomonas</i> türleri	MH agar
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	MH agar
<i>Acinetobacter</i> türleri	MH agar
<i>Staphylococcus</i> türleri	MH agar
<i>Enterococcus</i> türleri	MH agar
<i>Streptococcus</i> grup A, B, C ve G	MH-F agar ¹
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	MH-F agar ¹
Viridans grup streptokoklar	MH-F agar ¹
<i>Haemophilus</i> türleri	MH-F agar ¹
<i>Moraxella catarrhalis</i>	MH-F agar ¹
<i>Listeria monocytogenes</i>	MH-F agar ¹
<i>Pasteurella multocida</i>	MH-F agar ¹
<i>Campylobacter jejuni</i> ve <i>coli</i>	MH-F agar ¹ (Bkz. Ek A)
Diğer güç üreyen organizmalar	Karara bağlanmamış

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

3	İnokulumun hazırlanması
3.1	<p>Doğrudan koloni süspansiyonu yöntemini kullanarak organizmanın serum fizyolojik içerisinde 0.5 McFarland bulanıklık standardı (Tablo 2) yoğunluğunda süspansiyonunu hazırlayın, bu değer <i>Escherichia coli</i> için yaklaşık $1-2 \times 10^8$ CFU/mL'ye karşılık gelir.</p> <p>Doğrudan koloni süspansiyonu yöntemi güç üreyen <i>Haemophilus</i> türleri, <i>Moraxella catarrhalis</i>, <i>Streptococcus pneumoniae</i>, β-hemolitik ve diğer streptokoklar gibi organizmalar da dahil tüm organizmalar için uygundur.</p>
3.1.1	<p>Süspansiyonu seçici olmayan bir besiyerinde bir gecelik inkübasyon sonrası üreyen kolonilerden hazırlayın. Atipik varyantları seçmekten kaçınmak için (eğer mümkünse) morfolojik olarak benzer olan pek çok koloniyi kullanın ve steril öze veya pamuk eküvyon çubuğu ile steril serum fizyolojik içerisinde bir süspansiyon hazırlayın.</p>
3.2	<p>İnokulum süspansiyonunu 0.5 McFarland standart yoğunluğuna standardize edin. Daha yoğun inokulum süspansiyonu inhibisyon zonunun küçülmesine yol açarken, daha az inokulum ise tersine bir etkiye sahip olacaktır.</p>
3.2.1	<p>Süspansiyonun yoğunluğunu ayarlamakta fotometrik bir cihaz kullanılması önerilmektedir. Fotometrik cihaz, üretici firmanın önerileri doğrultusunda 0.5 McFarland standardına kalibre edilmelidir.</p>
3.2.2	<p>Alternatif olarak, süspansiyonun yoğunluğu görsel olarak da 0.5 McFarland bulanıklık standardıyla karşılaştırılabilir.</p> <p>Bulanıklık standardını kullanmadan önce bir vorteks karıştırıcısıyla kuvvetlice karıştırın (bazı ticari standartlar jel esaslı olup, karıştırılmamalıdır, dolayısıyla üreticinin önerileri takip edilmelidir).</p> <p>Karşılaştırmaya yardımcı olmak için, test ve standardı üzerinde siyah çizgiler olan beyaz bir kağıt üzerinde karşılaştırın.</p>
3.2.3	<p><i>Streptococcus pneumoniae</i> süspansiyonu hazırlamak için tercihen kanlı agar plağında üreyen bakteriden 0.5 McFarland standardına eş süspansiyon hazırlanır. Eğer <i>Streptococcus pneumoniae</i> süspansiyonu için çikolata agar plağında üreyen bakteri kullanılacaksa, süspansiyon 1.0 McFarland standardına eşdeğer olmalıdır.</p>
3.2.4	<p>Mikroorganizmanın süspansiyonunu, serum fizyolojik veya biraz daha organizma ekleyerek 0.5 McFarland değerine ayarlayın.</p>
3.3	<p>Süspansiyon en uygun olarak 15 dakika içerisinde ve en fazla hazırlandıktan sonra 60 dakika içerisinde kullanılmalıdır.</p>

Tablo 2	0.5 McFarland bulanıklık standardının hazırlanması
1	0.048 mol/L BaCl ₂ (%1.175 w/v BaCl ₂ ·2H ₂ O)'den 0.5 mL'yi, 0.18 mol/L (0.36 N) H ₂ SO ₄ (%1 v/v)'den 99.5 mL'ye ekleyin ve iyice karıştırın.
2	Süspansiyonun yoğunluğunu, uyumlu küvetlerle 1 cm ışık kanalı olan spektrofotometrede kontrol edin. Absorbans, 625 nm'de 0.08-0.13 arasında olmalıdır.
3	Süspansiyonu inokulum ayarlamak için kullanılan tüplerle aynı boyutlardaki tüplere dağıtın. Tüplerin kapağını sıkıca kapatın.
4	Ağız kapatılmış tüpleri karanlık bir yerde ve oda ısısında saklayın.
5	Standartı kullanmadan hemen önce vortekse iyice karıştırın.
6	Standartları 6 ayda bir yenileyin veya absorbansını kontrol edin.
7	Ticari kaynaklardan satın alınan hazır standartların absorbanslarının kabul edilebilir sınırlarda olduğundan emin olmak için kontrol gereklidir.

4	Agar plaklarının ekimi
4.1	İdeal olarak bulanıklığı ayarlanmış inokulum süspansiyonunu, hazırlandıktan sonra 15 dakika içerisinde kullanın. Süspansiyon hazırlandıktan sonra mutlaka 60 dakika içerisinde kullanılmalıdır.
4.2	Steril pamuk uçlu eküvyonu süspansiyona batırın ve fazla sıvıyı uzaklaştırmak için eküvyonu tüpün iç duvarında döndürün. Fazla sıvının uzaklaştırılması, özellikle gram negatif organizmalar için plağa yoğun inokulum aktarılmasının engellemek için önemlidir.
4.3	İnokulumu plağın yüzeyine, üç yönde sürerek veya otomatik plak döndürücü kullanarak eşit dağılacak şekilde yayın.
4.4	Diskleri 15 dakika içerisinde yerleştirin. Eğer plaklar diskler yerleştirilmeden önce, uzun süre oda ısısında bırakılırsa organizma üremeye başlayabilir, bu durum inhibisyon zon ölçülerinde hatalı azalmayla sonuçlanır. Diskler, agarın yüzeyine ekim yapıldıktan sonra 15 dakika içerisinde yerleştirilmelidir.

5	Antimikrobik disklerin yerleştirilmesi
5.1	Gereken disk içerikleri Sınır Değer ve Kalite Kontrol Tabloları'nda belirtilmektedir. http://www.eucast.org .
5.2	Diskleri, ekim yapılmış ve kurutulmuş agar plağına sıkıca yerleştiriniz. Agara temas sıkı ve eşit olmalıdır. Diskler bir kez agar plağına yerleştirildikten sonra yerinden oynatılmamalıdır, çünkü diskten antimikrobik maddenin difüzyonu çok hızlıdır.
5.3	Zonların iç içe girmesini ve maddeler arası etkileşimi önlemek için plakta yer alacak disk sayısı sınırlanmalıdır. Zon çaplarının güvenilir şekilde ölçülmesi önemlidir. Yerleştirilebilecek en fazla disk sayısı organizmaya ve seçilen disklere göre değişir. Normalde en fazla disk sayısı sırasıyla, 90 ve 150 mm'lik dairesel plaklar için 6 ve 12'dir.
5.3.1	Stafilokok ve streptokoklarda indüklenebilir klindamisin direncini saptayabilmek için, eritromisin ve klindamisin diskleri kenardan kenara 12-20 mm uzaklıkta yerleştirilmelidir.
5.4	Diskteki antimikrobik maddenin güç (potens) kaybı sık bir hata kaynağıdır ve zon çapında azalmaya yol açar. Bu durumda aşağıdaki basamakların izlenmesi gereklidir:
5.4.1	Dağıtıcı (dispenser) içindekiler de dahil olmak üzere, diskleri bir nem giderici ile birlikte ağız sıkıca kapatılmış kaplarda ve ışıktan korunacak şekilde saklayın (metronidazol, kloramfenikol ve florokinolonların da içinde yer aldığı bazı antimikrobikler, ışığa uzun süre maruz kaldıklarında etkilerini yitirirler).
5.4.2	Disk stokları, tedarikçi açıklamalarında farklı bir bilgi yazmadıkça, -20°C'de saklanmalıdır. Eğer bu mümkün değilse, diskleri <8°C'de saklayın.
5.4.3	Çalışma sırasında kullanılacak ek malzemeyi <8°C'de saklayın.
5.4.4	Nemlenmeyi önlemek için disklerin ambalajlarını/saklama kaplarını açmadan önce oda ısısına gelmelerini bekleyin.
5.4.5	Üretici firma tarafından kutu üzerinde belirtilen son kullanma tarihi geldiğinde diskleri atın.

6	Plakların inkübasyonu
6.1	Diskleri yerleştirdikten sonra 15 dakika içerisinde plakları ters çevirin ve inkübasyonu başlatın. Eğer plaklar diskler yerleştirildikten sonra oda ısısında bırakılırsa, ön difüzyon kaynaklı hatalı geniş inhibisyon zonu oluşumu ile sonuçlanabilir.
6.2	Plakları etüvde istiflemek, plakların eşit olmayan ısıya maruz kalmasından dolayı sonuçları etkiler. Etüvlerin verimliliği değişken olabilir, bu yüzden plakların uygun sayıda istiflenmesi dahil inkübasyon kontrolü, laboratuvarın kalite güvencesi programının bir parçası olmalıdır.
6.3	Plakları Tablo 3'de sunulan koşullarda inkübe edin.
6.4	Bazı <i>Enterococcus</i> türlerinde glikopeptid duyarlılığı test edilirken dirençli koloniler tam 24 saat inkübe edilmeden gözle görünür hale gelememektedir. Plaklar 16-20 saat sonra değerlendirilip, her hangi bir direnç saptanırsa rapor edilebilir, ancak duyarlı görünen kökenlerin plakları 24 saate kadar tekrar inkübe edilmeli ve yeniden değerlendirilmelidir.

Tablo 3	Antimikrobik duyarlılık test plakları için inkübasyon koşulları
Organizma	İnkübasyon koşulları
Enterobacteriaceae	35±1°C, normal atmosfer, 16-20 saat
<i>Pseudomonas</i> türleri	35±1°C, normal atmosfer, 16-20 saat
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	35±1°C, normal atmosfer, 16-20 saat
<i>Acinetobacter</i> türleri	35±1°C, normal atmosfer, 16-20 saat
<i>Staphylococcus</i> türleri	35±1°C, normal atmosfer, 16-20 saat
<i>Enterococcus</i> türleri	35±1°C, normal atmosfer, 16-20 saat (glikopeptidler için 35±1°C, normal atmosfer, 24 saat)
<i>Streptococcus</i> grup A, B, C ve G	35±1°C, %4-6 CO ₂ içeren atmosfer, 16-20 saat
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	35±1°C, %4-6 CO ₂ içeren atmosfer, 16-20 saat
Viridans grup streptokoklar	35±1°C, %4-6 CO ₂ içeren atmosfer, 16-20 saat
<i>Haemophilus</i> türleri	35±1°C, %4-6 CO ₂ içeren atmosfer, 16-20 saat
<i>Moraxella catarrhalis</i>	35±1°C, %4-6 CO ₂ içeren atmosfer, 16-20 saat
<i>Listeria monocytogenes</i>	35±1°C, %4-6 CO ₂ içeren atmosfer, 16-20 saat
<i>Pasteurella multocida</i>	35±1°C, %4-6 CO ₂ içeren atmosfer, 16-20 saat
<i>Campylobacter jejuni</i> ve <i>coli</i>	Bakınız Ek A
Diğer güç üreyen organizmalar	Karara bağlanmamış

7	İnkübasyon sonrası plakların incelenmesi
7.1	Doğru bir inokulum ve tatmin edici şekilde ekilmiş plaklarda, kolonilerin birbirleriyle birleşerek tabaka oluşturduğu bir üreme gözlenmelidir.
7.2	Düzgün dairesel (çentikli zon sınırı gözlenmeyen) inhibisyon zonları elde edilebilmesi için üreme plak üzerinde eşit şekilde dağılım sergilemelidir.
7.3	Eğer tek tek koloniler görülebiliyorsa inokulum yoğunluğu çok azdır ve test tekrarlanmalıdır.
7.4	İnhibisyon zonlarının kalite kontrol sınırları içinde olduğu kontrol edilmelidir.

8	Zonların ölçülmesi ve duyarlılığın yorumlanması
8.1	İnhibisyon zonu sınırı tüm ilaçlar için, plak gözden 30 cm uzakta tutularak çıplak gözle bakıldığında, üremenin tam inhibe olduğu nokta olarak değerlendirilmelidir.
8.2	Katkı maddesi içermeyen plakları, yansıyan ışıkla aydınlatılmış koyu renkli bir zemin üzerinde plağın tersinden değerlendirin.
8.3	Katkı maddesi içeren plakları, yansıyan ışıkla aydınlatılmış ve kapağı açık plağın ön yüzüne bakarak değerlendirin.
8.4	Aksi belirtilmedikçe geçirgen ışık (plak ışığa doğru tutularak) veya büyüteç kullanılmamalıdır (aşağıya bakınız).
8.5	İnhibisyon zonunun çapını bir cetvel (en yakın milimetreye göre), çap ölçer (kumpas) veya otomatik zon ölçer ile ölçün.
8.6	Zon çaplarını sınır değer tablosuna göre değerlendirin http://www.eucast.org .
8.7	Zon çaplarını değerlendirmek için şablonlar kullanılacaksa, plak şablonun üzerine yerleştirilir ve zonlar EUCAST sınır değerleri ile hazırlanan şablona göre değerlendirilir. Kullanılan sınır değerlerinin EUCAST sınır değer tablosunun en son sürümü ile uyumlu olduğundan emin olun. Şablon hazırlamak için ücretsiz bir program http://bsac.org.uk/susceptibility/template-program adresinde mevcuttur.
8.8	Özel değerlendirme talimatları:
8.8.1	İnhibisyon zonu içinde tek düşecek şekilde üreyen koloniler pasajlanarak tanımlanmalı, gerekirse test tekrarlanmalıdır.
8.8.2	Besiyerindeki antagonistler, sülfonamid veya trimetoprim zonu içinde diske kadar uzanabilen silik üreme ile sonuçlanabilir. Böyle üremeler dikkate alınmamalı ve zon çapı daha bariz olan zon sınırı kullanılarak belirlenmelidir. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> için trimetoprim-sülfametoksazol ile zon içi üremeler gözlenebilir. Bu tip bir üreme dikkate alınmamalı ve eğer herhangi bir zon sınırı görülebiliyorsa inhibisyon zonu değerlendirilmelidir. Sadece diske kadar üreme olması ve hiç inhibisyon zonu görülememesi durumunda zon yok olarak değerlendirilmelidir.
8.8.3	Enterobacteriaceae için ampisilin ile bazı Mueller-Hinton agar serilerinde gözlenebilen ve iç zon oluşumuna yol açan ince film şeklindeki üremeler dikkate alınmamalıdır.
8.8.4	<i>E.coli</i> için mesilinam ile gözlenebilen inhibisyon zonu içerisindeki izole koloniler dikkate alınmamalıdır.
8.8.5	<i>Proteus</i> spp. için yayılma dikkate alınmamalı, üremenin inhibisyonu değerlendirilmelidir.
8.8.6	Stafilokoklarda benzilpenisilin için plağı ışığa doğru tutarak zon sınırını yakından inceleyin (geçirgen ışık). İnhibisyon zon çapı \geq duyarlılık sınır değeri olan izolatlarda keskin zon sınırı varsa dirençli olarak rapor edilmelidir.

- 8.8.7 *Staphylococcus aureus*'ta metisilin direncini saptamak için sefoksitin kullanıldığında, bariz olan zon ölçülmeli, inhibisyon zonu içerisindeki kolonileri görebilmek için iyi bir ışık ile zon dikkatlice incelenmelidir. Bu koloniler ya kontaminasyondur ya da metisiline heterojen direncin göstergesi olabilirler.
- 8.8.8 Stafilokoklarda linezolid duyarlılık testlerini plağı ışığa doğru tutarak (geçirgen ışık) tersinden değerlendirin.
- 8.8.9 Enterokoklar için vankomisin zon sınırlarının incelenmesi için plağı ışığa doğru tutarak (geçirgen ışık) zon sınırları yakından incelenmelidir. Belirsiz zon sınırları ve zon içi koloniler vankomisin direncine işaret eder ve ileri araştırma gerektirir.
- 8.8.10 MH-F besiyerindeki hemolitik streptokoklar için, hemolize ait zon değil, üremenin inhibisyonuna ait zon değerlendirilmelidir. β -hemolize ait zon üzerinde genellikle üreme bulunmazken, α -hemoliz ve üreme genellikle birlikte bulunur.

9	Kalite kontrol
9.1	<p>Testin performansını izlemek için belirtilen kontrol kökenlerini (Tablo 4) kullanın. Öncelikli olarak önerilen kökenler tipik duyarlı kökenlerdir ama dirençli kökenler de yöntemin bilinen direnç mekanizmalarına bağlı direnci belirleyebileceğini doğrulamak için kullanılabilir (Tablo 5). Bu kökenler kültür koleksiyonlarından veya ticari kaynaklardan satın alınabilir.</p>
9.2	<p>Kontrol kökenlerini canlılığını ve organizma özelliklerini sürdürebileceği koşullar altında saklayın. Gliserol sıvı besiyeri (veya ticari bir eşdeğeri) içindeki cam boncuklarda ve -70°C'de saklamak uygun bir yöntemdir. Kolay üreyen organizmalar -20°C'de saklanabilir. Biri kullanımdaki kökenin kaynağı olarak ve diğeri gereğinde kullanım kökenini tazelemek için olmak üzere her bir kontrol kökeni için iki adet stok besiyeri saklanmalıdır.</p>
9.3	<p>Her hafta, kullanımdaki stok besiyerinden bir boncuk, seçici olmayan uygun bir besiyerine pasajlanmalı ve saflık açısından kontrol edilmelidir. Hafta boyunca her gün bu saf kültürden pasaj alınmalıdır. Plakta beş-altı gün canlı kalamayacak güç üreyen organizmalar için, köken bir haftadan daha fazla pasajlanmamalıdır.</p>
9.4	<p>Kontrol kökenleri için kabul edilebilir sınırlar ... gösterilmiştir.</p>
9.5	<p>Test performansını izlemek için önerilen rutin kalite kontrol kökenlerini kullanın.</p> <p>Kontrol testleri, en azından rutin panellerde yer alan antibiyotikler için, günlük olarak yapılmalı ve kontrol edilmelidir.</p> <p>Testlerin yapıldığı her gün, son 20 ardışık testin sonuçları incelenmelidir. Sonuçlar eğilim ve sürekli beklenenin altında ya da üstünde kalan zonlar açısından incelenmelidir. Eğer 20 testin iki veya daha fazlası sınır dışında kalıyorsa bunun nedeni araştırılmalıdır.</p>
9.6	<p>Kontrol kökenleri ile testin performansının tatminkar olduğu gösterilene dek (20 testte kontrol sınırı dışında çıkan sonucun 1'den fazla olmaması) günlük olarak test edilmelidir. İstenen performanstan sonra test sıklığı haftada bire indirilebilir. Eğer performans standartları karşılanamıyorsa, sebebi araştırılmalıdır.</p>
9.7	<p>Rutin KK testlerine ek olarak, her yeni Mueller-Hinton agar serisi test edilerek, tüm zonların sınırlar içerisinde olduğundan emin olunmalıdır.</p> <p>Aminoglikozid diskleri besiyerindeki iki değerlikli katyonların miktarının kabul edilebilir sınırların dışında değişiklik gösterdiğini, tigesiklin magnezyum değişkenliklerini, trimetoprim-sülfametoksazol timin içeriği ile ilgili sorunları, eritromisin besiyerinin pH değerinin kabul edilebilir sınırların dışında olduğunu gösterebilir.</p>

Tablo 4		Rutin tesler için kalite kontrol organizmaları	
Organizma	Köken	Özellik	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922 NCTC 12241 CIP 7624 DSM 1103 CCUG 17620 CECT 434	Duyarlı, sokak tipi (wild type)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853 NCTC 12934 CIP 76110 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 β-laktamaz üreten köken	
<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	Kromozom aracılı düşük-düzyen penisiline dirençli köken	
<i>Haemophilus influenzae</i>	NCTC 8468 CIP 5494 CCUG 23946	Duyarlı, sokak tipi	
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33560 NCTC 11351 CIP 702 DSM 4688, CCUG 11284	Duyarlı, sokak tipi Test etme koşulları için bakınız Ek A	

Organizma	Köken	Özellik
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218 NCTC 11954 CIP 102181 DSM 5564 CCUG 30600 CECT 943	TEM-1 β -laktamaz, ampisiline dirençli
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603 NCTC 13368 CCUG 45421 CECT 7787	GSBL-üreten köken (SHV-18)
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCTC 12493	<i>mecA</i> pozitif, hetero-dirençli MRSA
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 51299 NCTC 13379 CIP 104676 DSM 12956 CCUG 34289	Yüksek-düzey aminoglikozid dirençli (HLAR) ve vankomisine dirençli (<i>vanB</i> pozitif)
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 49247 NCTC 12699 CIP 104604 DSM 9999 CCUG 26214	β -laktamaz negatif, ampisiline dirençli (BLNAR)

Ek A

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

Campylobacter jejuni ve *coli* için disk difüzyon testini EUCAST'a göre yaparken aşağıdaki yöntemle (Tablo A1) bağlı kalınmalıdır.

Tablo A1	<i>Campylobacter jejuni</i> ve <i>coli</i> için disk difüzyon yöntemi
Besiyeri	%5 defibrine at kanı ve 20 mg/L β -NAD eklenmiş Mueller-Hinton agar (MH-F) Yayılmayı azaltmak için MH-F plakları inokülasyon öncesinde kurutulmalıdır (20-25°C'de bir gece veya 35°C'de plağın kapağı açık olarak 15 dakika).
İnokulum	0.5 McFarland
İnkübasyon	Mikroaerop ortam 41±1°C 24 saat İnkübasyon bitişik üreme ile sonuçlanmalıdır. Bazı <i>C. coli</i> kökenleri 24 saatlik inkübasyonun sonunda yeterli üreme göstermeyebilir. Bunlar hemen tekrar inkübe edilmeli ve inhibisyon zonları toplam 40-48 saatlik inkübasyondan sonra değerlendirilmelidir. <i>Campylobacter</i> türlerinin üremesi için uygun koşulları sağlamak üzere inkübasyon ısısı olarak 41±1°C seçilmiştir.
Değerlendirme	Standart EUCAST değerlendirme ölçütleri kullanılmıştır: MH-F plakları, plağın kapağını açarak ön yüzünden, yansıyan ışık kullanarak değerlendirilmelidir. Zon sınırları, plak gözden 30 cm uzakta tutularak, çıplak gözle bakıldığında üremenin tam olarak inhibe olduğu nokta olarak değerlendirilmelidir.
Kalite kontrol	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560 inhibisyon zonu tanımlanan sınırlar içinde olmalıdır (http://www.eucast.org).



EUCAST

EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases