



Bu Proje Avrupa Birliği ve Türkiye Cumhuriyeti  
tarafından finanse edilmektedir

Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi  
(TR0802.16)

# Ulusal Mikrobiyoloji Standartları **BULAŞICI HASTALIKLAR LABORATUVAR TANI REHBERİ**

## CİLT II

T.C. Sağlık Bakanlığı  
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı  
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı  
Ankara – 2014





Bu Proje Avrupa Birliği ve Türkiye Cumhuriyeti tarafından finanse edilmektedir

Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi  
(TR0802.16)

# Ulusal Mikrobiyoloji Standartları

---

# BULAŞICI HASTALIKLAR

# LABORATUVAR TANI REHBERİ

Sendromik Tanı Yaklaşımı, Örnek Yönetimi, Test Prosedürleri ve Mikrobiyolojik Tanı/Tanımlama

---

## CİLT II

T.C. Sağlık Bakanlığı  
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı  
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı  
Ankara – 2014



© T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,  
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı  
“Ulusal Mikrobiyoloji Standartları: Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi”

Bu doküman; Avrupa Birliği tarafından finanse edilen, Dünya Sağlık Örgütü tarafından yürütülen “Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi (TR0802.16)” kapsamında bastırılmıştır. Sözleşme makamı, Merkezi Finans ve İhaleler Birimi’dir. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, bu Projenin yararlanıcısı olup dokümanın hazırlanmasına liderlik etmiştir ve dokümanın tüm hakları T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu’na aittir. Kaynak gösterilmeksizin alıntı yapılamaz. Kısmen dahi olsa çoğaltılamaz ve yayımlanamaz. Alıntı yapıldığında kaynak gösterimi “Ulusal Mikrobiyoloji Standartları: Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 934, Ankara, 2014” şeklinde olmalıdır. Ücretsizdir. Parayla satılamaz. Dokümanın içeriği hiçbir şekilde Avrupa Birliği’nin görüşlerini yansıtmamaktadır.

ISBN: 978-975-590-489-4

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 934

Yayın tarihi: 15.04.2014

Baskı sayısı: 1000

Basım yeri: Ankara

Basım yılı: 2014

Baskı: Aydoğdu Ofset Matbaacılık Ambalaj San ve Tic Ltd Şti

Kapak fotoğrafı: Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Difteri-Boğmaca Referans Laboratuvarı

Arşivi’nden alınmıştır.



# Ulusal Mikrobiyoloji Standartları

---

# BULAŞICI HASTALIKLAR

# LABORATUVAR TANI REHBERİ

Sendromik Tanı Yaklaşımı, Örnek Yönetimi, Test Prosedürleri ve Mikrobiyolojik Tanı/Tanımlama

---

## CİLT II

T.C. Sağlık Bakanlığı  
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı  
**Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı**  
Ankara – 2014

## EDİTÖR

EFSUN AKBAŞ  
Dünya Sağlık Örgütü, Ulusal Danışman, Aydın

## YARDIMCI EDİTÖRLER

HAKAN ABACIOĞLU  
Dünya Sağlık Örgütü, Ulusal Proje Danışmanı,  
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, İzmir

SELİN NAR ÖTGÜN  
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları  
Daire Başkanlığı, Ankara

## ÖNEMLİ NOT

### Bu Rehber

(Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi)  
Tanı Standartları Çalışma Grupları tarafından hazırlanmış ve ön düzeltmeleri yapılarak yayına hazırlanmış bir

## TASLAK

dokümandır.

Eş zamanlı olarak THSK web sitesinde (bkz. [www.thsk.org.tr](http://www.thsk.org.tr)) de kullanıma sunulmuştur. Bu yayınlar yoluyla Rehber ilgili Uzmanlık derneklerinin, Meslek örgütlerinin ve sahadaki kullanıcıların görüşlerine de açılmış bulunmaktadır. Alınacak geri bildirimlere göre son şeklinin verilmesi ve 2014 yılı sonu itibarıyla onaylanmış "Ulusal Mikrobiyoloji Standartları" belgesi olarak yayınlanması hedeflenmektedir.

Rehber 3 yılda bir güncellenecektir.

## YAZARLAR\*

ALİ KUDRET ADILOĞLU

Ankara Eğitim Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Ankara

EFSUN AKBAŞ

Dünya Sağlık Örgütü, Proje Danışmanı, Aydın

NURHAN ALBAYRAK

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

AYŞE BAŞAK ALTAŞ

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

GÜLAY ARAL AKARŞU

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Bilim Dalı, Ankara

ERDİNÇ ATABEK

Etilik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Ankara

ŞÖHRET AYDEMİR

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, İzmir

ALPAY AZAP

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Ankara

ÖZLEM AZAP

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Ankara

NİHAL BABALIOĞLU

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Erken Uyarı-Cevap ve Saha Epidemiyolojisi Daire Başkanlığı, Ankara

CAHİT BABÜR

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

EMRAH BAŞKAYA

Halk Sağlığı Laboratuvarı, İstanbul

MEHMET BAYSALLAR

Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Ankara

HÜRREM BODUR

Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara

GÜLENDAM BOZDAYI

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Ankara

BEKİR ÇELEBİ

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

GÜLDEN ÇELİK

Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, İstanbul

NEVRESTE ÇELİKBİLEK

Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Ankara

YASEMİN COŞKUN

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

CANDAN ÇİÇEK

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, İzmir

NİLAY ÇÖPLÜ

Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Ankara

GÜLNAZ ÇULHA

Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji AD, Hatay

DERYA DİRİM ERDOĞAN

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji AD, İzmir

FUNDA DOĞRUMAN AL

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Ankara

MERT DÖŞKAYA

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji AD, İzmir

RIZA DURMAZ

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

RAİKA DURUSOY ONMUŞ

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı AD, İzmir

MESTAN EMEK

Halk Sağlığı Laboratuvarı, Antalya

GÜL BAHAR ERDEM

Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Ankara

HAKAN ERDEM

GATA Haydarpaşa Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul

AYNUR EREN TOPKAYA  
Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Tekirdağ

SELDA ERENŞOY  
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, İzmir

ÖNDER ERGÖNÜL  
Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD, İstanbul

UFUK ERGÜN  
Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nöroloji Kliniği, Ankara

ARİFE ERTÜRK  
Etilik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Ankara

BERRİN ESEN  
Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Ankara

ALİ GÖKTEPE  
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Erken Uyarı-Cevap ve Saha Epidemiyolojisi Daire Başkanlığı, Ankara

AYŞEGÜL GÖZALAN  
Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Ankara

ZEYNEP GÜLAY  
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, İzmir

DİLEK GÜLDEMİR  
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

REVAŞİYE GÜLEŞEN  
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

DENİZ GÜR  
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Ankara

GÜL GÜRSEL  
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları AD, Ankara

GÜLŞEN HAŞÇELİK  
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Ankara

UFUK HASDEMİR  
Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, İstanbul

TONAY İNCEBOZ  
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji AD, İzmir

NİLGÜN KARABIÇAK  
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

ÜLKÜ KARAMAN  
Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji AD, Ordu

SELMA KARAAHMETOĞLU  
Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İç Hastalıkları Kliniği, Ankara

ONUR KARATUNA  
Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, İstanbul

ABDULLAH KILIÇ  
Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Ankara

SELÇUK KILIÇ  
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

ÖZGÜR KORU  
Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Ankara

GÜLAY KORUKLUOĞLU  
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

ALİ KÖSEKAHYA  
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Bulaşıcı Hastalıklar Daire Başkanlığı

ÖZGÜR KURT  
Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, İstanbul

BELKIS LEVENT  
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

DİLEK MENEMENLİOĞLU  
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

KENAN MİDİLLİ  
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, İstanbul

ÖZLEM MİMAN  
İzmir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji AD, İzmir

SELİN NAR ÖTGÜN  
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans  
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

MEHMET ALİ ÖKTEM  
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji  
AD, İzmir

CÜNEYT ÖZAKIN  
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD,  
Bursa

BANU SANCAK  
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji  
AD, Ankara

ARZU SAYINER  
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji  
AD, İzmir

NEVGÜN SEPİN ÖZEN  
Halk Sağlığı Laboratuvarı, Antalya

CEMİLE SÖNMEZ  
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans  
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

SERAP SÜZÜK  
Kırıkkale Yüksek İhtisas Hastanesi, Mikrobiyoloji  
Laboratuvarı, Kırıkkale

HÜSNİYE ŞİMŞEK  
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans  
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

MEHMET TANYÜKSEL  
Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD,  
Ankara

ANIL TAPISIZ  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve  
Hastalıkları AD, Ankara

AYŞEGÜL TAYLAN ÖZKAN  
Hitit Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Çorum

MERAL TURAN  
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans  
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

NİLDEN TUYGUN  
Dr Sami Ulus Kadın Doğum, Çocuk Sağlığı ve  
Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Acil,  
Ankara

NİLAY UÇARMAN  
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans  
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

SELMA USLUCA  
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans  
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

YAVUZ UYAR  
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi  
Mikrobiyoloji AD, İstanbul

NURVER ÜLGER  
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji  
AD, İstanbul

ZEHRA ÜNAL  
Halk Sağlığı Laboratuvarı, İzmir

NİL ÜNAL  
Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü  
Müdürlüğü, Ankara

CANDAN ÜSTÜN  
Bayındır Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara

DİLEK YAĞCI ÇAĞLAYIK  
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans  
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

TÜLAY YALÇINKAYA  
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans  
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

FÜGEN YARKIN  
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji  
AD, Adana

MİHRİBAN YÜCEL  
Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi  
Mikrobiyoloji, Ankara

PINAR ZARAKOLU KÖŞKER  
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon  
Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Ankara

AYŞİN ZEYTİNOĞLU  
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD,  
İzmir

(\*) Soyadına göre alfabetik dizin



*Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır*

## ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI ÇEKİRDEK GRUBU\*

NURHAN ALBAYRAK  
Tüberküloz, MRLDB, Türkiye Halk  
Sağlığı Kurumu, Ankara

AYŞE BAŞAK ALTAŞ  
Viral Solunum Yolu Patojenleri,  
MRLDB, Türkiye Halk Sağlığı  
Kurumu, Ankara

DİLEK YAĞCI ÇAĞLAYIK  
Akut Sendromik Yaklaşım,  
MRLDB, Türkiye Halk Sağlığı  
Kurumu, Ankara

REVASİYE GÜLEŞEN  
Bakteriyel Enterik Patojenler,  
MRLDB, Türkiye Halk Sağlığı  
Kurumu, Ankara

NİLGÜN KARABIÇAK  
Test Prosedürleri, MRLDB, Türkiye  
Halk Sağlığı Kurumu, Ankara

SELÇUK KILIÇ  
Bakteriyel Zoonotik  
Enfeksiyonlar, MRLDB, Türkiye  
Halk Sağlığı Kurumu, Ankara

GÜLAY KORUKLUOĞLU  
Viral Enterik patojenler ve  
Döküntülü Hastalıklar,  
MRLDB, Türkiye Halk Sağlığı  
Kurumu, Ankara

BELKIS LEVENT  
Bakteriyel Enterik Patojenler,  
MRLDB, Türkiye Halk Sağlığı  
Kurumu, Ankara

DİLEK MENEMENLİOĞLU  
Viral Hemorajik Ateşler,  
MRLDB, Türkiye Halk Sağlığı  
Kurumu, Ankara

AYŞEGÜL TAYLAN ÖZKAN  
Parazitoloji, Hitit Üniversitesi,  
Tıbbi Mikrobiyoloji AD,  
Çorum

SELİN NAR ÖTGÜN  
Bakteriyel Solunum Yolu  
Patojenleri, MRLDB, Türkiye  
Halk Sağlığı Kurumu, Ankara

CEMİLE SÖNMEZ  
Bakteriyel Cinsel Yolla Bulaşan  
Enfeksiyonlar, MRLDB, Türkiye  
Halk Sağlığı Kurumu, Ankara

MERAL TURAN  
Bakteriyel Solunum Yolu  
Patojenleri, MRLDB, Türkiye Halk  
Sağlığı Kurumu, Ankara

HÜSNİYE ŞİMŞEK  
Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri,  
MRLDB, Türkiye Halk Sağlığı  
Kurumu, Ankara

NİLAY UÇARMAN  
Tüberküloz, MRLDB, Türkiye Halk  
Sağlığı Kurumu, Ankara

SELMA USLUCA  
Parazitoloji, MRLDB, Türkiye Halk  
Sağlığı Kurumu, Ankara

TÜLAY YALÇINKAYA  
Viral Cinsel Yolla Bulaşan  
Enfeksiyonlar, MRLDB, Türkiye  
Halk Sağlığı Kurumu, Ankara

(\*) Soyadına göre alfabetik dizin

## PROJE DANIŞMANLARI

VARALAKSHMI ELANGO  
Dünya Sağlık Örgütü, Uluslararası Proje Danışmanı

HAKAN ABACIOĞLU  
Dünya Sağlık Örgütü, Ulusal Proje Danışmanı

EFSUN AKBAŞ  
Dünya Sağlık Örgütü, Ulusal Danışman

## TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU YAYIN KOMİSYONU

HASAN IRMAK  
Tüketici ve Çalışan Güvenliği Başkan Yardımcısı

MUSTAFA BAHADIR SUCAKLI  
Erken Uyarı-Cevap ve Saha Epidemiyolojisi Daire Başkanı

NAZAN YARDIM  
Obezite, Diyabet ve Metabolik Hastalıklar Daire Başkanı

KANUNİ KEKLİK  
Toplum Sağlığı Hizmetleri Daire Başkanı

## TEŞEKKÜR

*T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu bu Rehberin hazırlanmasında görev alan ve emeği geçen herkese teşekkür eder.*

# İçindekiler

---

## CİLT I

Kısaltmalar

Önsöz

Giriş

BAKTERİYOLOJİ

---

## CİLT II

ENFEKSİYÖZ MADDE TAŞIMA REHBERİ

TEST PROSEDÜRLERİ

ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIK TESTLERİ (UAMDS)

---

## CİLT III

PARAZİTOLOJİ

VİROLOJİ

SENDROMİK TANI YAKLAŞIMI

---

*Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır*

# CİLT I

## BAKTERİYOLOJİ

### Mikrobiyolojik tanı/tanımlama

#### Solunum yolu patojenleri

- B-MT-01 Boğmaca
- B-MT-02 Difteri
- B-MT-03 *Neisseria meningitidis* enfeksiyonları
- B-MT-04 *Haemophilus influenzae* invaziv enfeksiyonları
- B-MT-05 *Streptococcus pneumoniae* invaziv enfeksiyonları
- B-MT-06 Lejyoner hastalığı

#### Enterik patojenler

- B-MT-08 *Salmonella* enfeksiyonları
- B-MT-09 *Shigella* enfeksiyonları
- B-MT-10 *Campylobacter* enfeksiyonları
- B-MT-11 EHEC enfeksiyonları
- B-MT-12 Kolera
- B-MT-13 Yersiniyoz
- B-MT-14 Listeriyoz
- B-MT-15 Botulismus

#### Cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar (CYBE)

- B-MT-16 *Chlamydia trachomatis* enfeksiyonları
- B-MT-17 Gonore
- B-MT-18 Sifiliz

#### Zoonozlar

- B-MT-19 Bruselloz
- B-MT-20 Şarbon
- B-MT-21 Tularemi
- B-MT-22 Q ateşi
- B-MT-23 Leptospiroz
- B-MT-24 Lyme hastalığı
- B-MT-25 Epidemik tifüs
- B-MT-26 Veba

## CİLT II

### ENFEKSİYÖZ MADDE TAŞIMA REHBERİ

GEN-ÖY-01 Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

#### TEST PROSEDÜRLERİ

B-TP-01	Suş saklama prosedürü	B-TP-13	Lizin - Ornitin - Arjinin dekarboksilaz/ dihidrolaz testleri
B-TP-02	Bile-eskülin hidrolizi	B-TP-14	Metilen mavisi (Loeffler's) boyama
B-TP-03	Gram boyama	B-TP-15	Nitrat / Nitrit redüksiyonu testleri
B-TP-04	Hareket testi	B-TP-16	Oksidaz testi
B-TP-05	Hippurat hidrolizi	B-TP-17	ONPG testi
B-TP-06	IMVIC testleri	B-TP-18	Optokin duyarlılığı
B-TP-07	İndoksil asetat testi	B-TP-19	PYR testi
B-TP-08	Karanlık alan mikroskopisi	B-TP-20	Safrada erime testi
B-TP-09	Karbonhidrat fermentasyon/oksidasyonu	B-TP-21	Tuz tolerans testi (%6.5 NaCl'de üreme)
B-TP-10	Katalaz testi	B-TP-22	Üreaz testi
B-TP-11	KIA/TSI testleri	B-TP-23	X, V ve XV faktör gereksinimi
B-TP-12	Koagülaz testi		

#### ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIK TESTLERİ (UAMDS)

AMD-TB-01	AMD testi hangi durumlarda yapılmalı, örnek yönetimi ve kavramlar
AMD-TB-02	Kullanılan standartlar ve farkları (CLSI, EUCAST)
AMD-TB-03	Antibiyoqram yorumlama kriterleri ve kısıtlı bildirim kuralları

#### Mikrobiyolojik tanı/tanımlama

AMD-MT-01	<i>Staphylococcus aureus</i> ve AMD testleri
AMD-MT-02	<i>Enterococcus faecalis/faecium</i> ve AMD testleri
AMD-MT-03	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ve AMD testleri
AMD-MT-04	<i>Escherichia coli</i> ve <i>Klebsiella pneumoniae</i> ve AMD testleri
AMD-MT-05	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ve AMD testleri
AMD-MT-06	<i>Acinetobacter baumannii</i> ve AMD testleri

#### Test Prosedürleri

AMD-TP-01	AMD testlerinde kullanılan besiyerlerinin hazırlanması
AMD-TP-02	McFarland opasite standardı hazırlanması
AMD-TP-03	Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi
AMD-TP-04	MIK saptama yöntemleri

## CİLT III

### PARAZİTOLOJİ

#### Örnek yönetimi

- P-ÖY-01 Dışkı örneklerinin parazitolojik incelemesi  
P-ÖY-02 Diğer intestinal örneklerin parazitolojik incelemesi  
P-ÖY-03 Kan ve kemik iliği örneklerinin parazitolojik incelemesi

#### Mikrobiyolojik tanı/tanımlama

- P-MT-01 Amibiyaz (*Entamoeba histolytica* enfeksiyonları)  
P-MT-02 *Giardia intestinalis*  
P-MT-03 *Cryptosporidium* türleri  
P-MT-04 Kala azar  
P-MT-05 Şark çıbanı  
P-MT-06 Sıtma  
P-MT-07 Ekinokokkoz (kistik, alveolar)  
P-MT-08 Toksoplazmoz  
P-MT-09 Trişinoz  
P-MT-10 Şistozomiyaz (üriner)

#### Test prosedürleri

- P-TP-01 Mikroskop kalibrasyonu (oküler mikrometre)  
P-TP-02 Dışkı örneklerinin direkt mikroskopisi  
P-TP-03 Dışkı örneklerinin çoklaştırma yöntemleri  
P-TP-04 Trikróm boyama  
P-TP-05 Modifiye Kinyoun asit-fast boyama  
P-TP-06 Giemsa boyama  
P-TP-07 Kalın damla ve ince yayma

### VİROLOJİ

- V-MT-01 Viral hepatitler  
V-MT-02 HIV enfeksiyonu  
V-MT-03 Norovirus enfeksiyonu  
V-MT-04 Rotavirus enfeksiyonu  
V-MT-05 Poliomyelit  
V-MT-06 Kabakulak  
V-MT-07 Kızamıkçık ve konjenital kızamıkçık  
V-MT-08 Kızamık ve SSPE  
V-MT-09 Suçiçeği  
V-MT-10 İnfluenza ve avian influenza  
V-MT-11 Viral hemorajik ateşler  
V-MT-12 Kırım-Kongo kanamalı ateşi (KKKA)  
V-MT-13 Hantavirus enfeksiyonları  
V-MT-14 Sarı humma  
V-MT-15 Batı Nil Virusu enfeksiyonu  
V-MT-16 Chikungunya ateşi  
V-MT-17 Kene kaynaklı ensefalitin (TBE)  
V-MT-18 Akut solunum yetmezliği sendromu (SARS)  
V-MT-20 Kuduz

### SENDROMİK TANI YAKLAŞIMI

- SY-01 Akut ishal  
SY-02 Akut hemorajik ateş  
SY-03 Akut nörolojik sendrom  
SY-04 Akut respiratuvar sendrom  
SY-05 Akut sarılıklar



*Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır*

# Kısaltmalar ve Tanımlar

**ABD** / Amerika Birleşik Devletleri

**aerosol** / belirli bir kuvvet etkisi altında sıvıların (veya katıların) ortam atmosferine damlacıklar halinde dağılması veya saçılması. Laboratuvarında pek çok işlem sırasında açığa çıkabilen ve mikroorganizmaları da içeren enfeksiyöz aerosoller laboratuvar kaynaklı enfeksiyonlar için önemli tehlike kaynaklarından biridir. pipetaj, çalkalama, sert yüzeylere düşme, dökülme-saçılma, özeyi alevde yakma, özenin besiyerinde soğutulması, santrifüj, vorteks, liyofilize ampullerin açılması, pipetteki son damlanın üflenmesi aerosol üreten işlemler arasında sayılabilir.

**AIDS** / acquired immune deficiency syndrom

**aliko** / (i) kısım, (ii) bir çözeltinin toplam miktarının bir bölümü, (iii) bir bütünün temsili bir parçası (kütle veya volüm olarak)

**AMD** / antimikrobiyal duyarlılık

**ARB** / aside-rezistan bakteri

**ATCC** / American Type Culture Collections

**BAL** / bronkoalveolar lavaj

**BGD** / biyogüvenlik düzeyi. mikroorganizmaların risk sınıflaması temelinde dört laboratuvar biyogüvenlik düzeyi tanımlanmıştır; ajanların bulaşma, yayılma potansiyeli ve patojenlik arttıkça laboratuvar korunma düzeyi BGD1'den BGD4'e doğru artar. klinik mikrobiyolojide karşılaşılan ajanların büyük kısmı BGD2 laboratuvar şartlarının sağlanmasını gerektirmektedir.

**BGK** / biyogüvenlik kabini

**bildirim** / sağlık otoritesinin resmi iletişim kanalları ile vakalar veya salgınlardan haberdar edilmesi işlemi.

**bildirimi zorunlu hastalık** / yasal bir gereklilik ile uygun yetkide bir mercie (yerel veya merkezi sağlık otoritesi) rapor edilmesi zorunlu olan hastalık.

**BOS** / beyin-omurilik sıvısı

**buffy-coat** / santrifüj edilmiş antikoagülanlı kanın eritrosit tabakası ve plazması arasında kalan ve beyaz kan hücrelerini içeren (bulutsu) katman

**bulaş** / doğrudan veya dolaylı olarak bir enfeksiyöz ajanın herhangi bir mekanizma ile başka bir konağa ulaşması.

**bulaşıcı hastalık** / bir mikroorganizma veya onun toksik ürünlerine bağlı olarak ortaya çıkan hastalıktır. etkenin, bir enfekte kişiden, hayvandan veya rezervuardan; hayvan konak, vektör veya cansız çevre aracılığıyla, doğrudan veya dolaylı olarak bir duyarlı konağa geçişiyle oluşur.

**buyyon** / sıvı besiyeri

**CDC** / Center for Disease Control and Prevention (Atlanta)

**cfu** / colony forming unit

**CYBE** / cinsel yolla bulaşan enfeksiyon

**DFA** / direkt floresan antikör (testi)

**dk** / dakika

**DNA** / deoksiribonükleik asit

**DSÖ** / Dünya Sağlık Örgütü (WHO)

**duyarlı kişi** / bir birey veya hayvanın bir mikroorganizma ile enfeksiyon gelişimine açık olması (*kural değilse de, genellikle mikroorganizmaya karşı spesifik koruyucu antikörlerin olmayışı konağın duyarlılığı için bir göstere olarak değerlendirilir*).

**EDTA** / etilen diamin tetra asetik asit

**EIA** / enzyme immuno assay (ELISA ile aynı anlamda)

**ELISA** / enzyme linked immunosorbent assay

**eliminasyon** / bir enfeksiyon etkeni yeryüzünden yok edilemese bile neden olduğu hastalığın görülmemesinin sağlanması.

**EMB** / Eozine-Methylene-Blue (Agar)

**endemik** / bir enfeksiyon etkeninin veya hastalığın belirli bir coğrafyada veya toplulukta sürekli görülmesi durumu. hastalığın o bölgede veya grupta alışılmış bir prevalansının olması da aynı mesajı verir.

**enfeksiyon** / bir organizmanın bir konakçıda (insan, hayvan, arthropod) yerleşmesi, çoğalması ve genellikle bir immün yanıt oluşturmasını tanımlar. klinik bir hastalık tablosuna neden olabilir veya olmayabilir.

**ENIVD** / European Network for Diagnostics of "Imported" Viral Diseases ([http://www.enivd.de/ENIVD\\_P.HTM](http://www.enivd.de/ENIVD_P.HTM) )

**epidemi (salgın)** / bir hastalığın veya sağlıkla ilişkili spesifik bir durumun belirli bir coğrafyada veya toplulukta beklenenden daha fazla sayıda görülmesi. salgın, bazı kaynaklarda, kısa zamanda hızla yayılan enfeksiyon anlamında da kullanılmaktadır.

**eradikasyon** / hastalığın etkeni ile birlikte yeryüzünden yok edilmesidir.

**ETA** / endotrakeal aspirasyon (sıvısı)

**FITC** / fluorescein isothiocyanate (floresan boya)

**genişletilmiş bağışıklama programı (GBP)** / difteri, boğmaca, tetanos, tüberküloz, kızamık ve çocuk felci standart bağışıklama programının maternal tetanos önleme ve yenidoğan hepatit B aşılama ile birlikte uygulamaya konan son durumu.

**gerçek-zamanlı** / 'real-time' (PCR)

**HAV** / hepatit A virüs

- HBV** / hepatit B virüs
- HCV** / hepatit C virüsü
- HDV** / hepatit D virüs
- HEV** / hepatit E virüs
- HIV** / human immunodeficiency virüs
- IFA** / indirekt floresan antikor (testi)
- IgA** / immünglobulin A
- IgG** / immünglobulin G
- IgM** / immünglobulin M
- IHA** / indirekt hemaglutinasyon (testi)
- IMViC** / indol testi, metil kırmızısı testi, Voges-Proskauer ve sitrat testlerinin oluşturduğu ve bakteri tanımlamasında kullanılan bir biyokimyasal test paketini formüle eder. aradaki küçük "i" harfi ses uyumunu sağlamak üzere kullanılır.
- ihbar** / bazı bildirim zorunlu hastalıklarda vaka veya salgın söz konusu olduğunda tanı koyan sağlık kurumundan yerel sağlık otoritesine durumun en kısa zamanda iletilmesi.
- ilk tanımlama** / mikroorganizmaların kültür vasatlarında üremelerini takiben bir test veya test grubu uygulanarak yapılan tanımlama (primer identifikasyon).
- indeks vaka** / bir toplulukta (aile, okul, bir coğrafi bölgede yaşayanlar gibi..) bir hastalığın topluma yayılmasına yol açan ilk vaka (diğerleri için enfeksiyon kaynağı olabileceğinden dolayı önemlidir).
- insidans** / belirli bir toplulukta belirli bir süre içinde bir hastalığa ait yeni vaka sayısının o toplumda risk altında bulunan nüfusa bölünmesi ile elde edilen hız (salgın incelemelerinde *atak hızı* olarak kullanılır).
- invaziv** / derin doku ve organlara iletleyen ya da iletme yeteneğine sahip olan (mikroorganizma)
- invaziv metot** / örnek almak veya benzeri bir nedenle derin doku ve organlara ulaşmak için bir enstrümanın (enjektör, endoskopi borusu, tüp vb) kullanıldığı metot
- invazyon** / derin doku ve organlara iletme
- in-vitro** / laboratuvar ortamında ya da yapay koşullarda
- in-vivo** / canlı ortamda ya da yaşayan koşullarda
- KKD** / kişisel koruyucu donanım. laboratuvar işlemleri sırasında enfeksiyöz materyale maruziyetten korunmak için personelin giymesi veya takması gereken önlük, eldiven gibi kıyafet/donanım.
- koloni** / bir bakteriden köken alan bakteri topluluğu.
- kuru buz** / kuru buz, karbondioksitin (CO<sub>2</sub>) katı halidir. renksiz, tatsız ve kokusuzdur; -79°C sıcaklığa sahiptir. sıvı CO<sub>2</sub>'den elde edilir, yüksek basınç altında saklanabilir. kuru buz mühürlü taşıyıcı kutularla satılır. kutu açıldıktan sonra, kalıplar 4-7 gün içinde tüketilmelidir. ortam ısı ile temas halinde sıvı faza geçmeden buharlaşır (süblimleşme). kuru buz, tamamen buharlaşana kadar geçen süre boyunca (~5 gün) materyalin donmuş olarak korunması için efektif ortam sağlar. kuru buzda taşınması gereken enfeksiyöz materyalin nasıl paketleneceğine dair yeterli bilgi için ilgili rehberlere bakılmalıdır (UMS, GEN-ÖY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).
- kümelenme** / hastalıkların belirli bir yer veya grupta beklenenden daha yüksek sayıda ortaya çıkması
- laboratuvara dayalı sürveyans** / belirli bir organizmanın laboratuvar ortamında izolasyonu veya tanımlanması verisini başlangıç noktası olarak alan sürveyans (örn. salmonelloz sürveyansı..)
- LP** / lomber ponksiyon
- morbidite hızı** / her yüz bin popülasyonda, bir hastalığın etkilediği birey sayısı
- mortalite hızı** / her yüz bin popülasyonda, bir hastalıktan ölen birey sayısı
- MRDLB** / Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı (THSK'nın)
- NAAT** / nükleik asit amplifikasyon testleri
- nested** / yuvalama (PCR işleminde)
- normal flora** / deri, ağız- burun mukozası gibi vücut bölgelerinde normalde bulunan mikroorganizma topluluğu.
- nozokomiyal enfeksiyon** (hastane-kaynaklı enfeksiyon) / bir hastane ya da tıbbi kuruma başvuru sırasında herhangi bir enfeksiyon belirtisi yokken veya hastalığın inkübasyon süresi içinde olmadığı bilinen bir bireyde hastaneye yatırılan sonra ortaya çıkan enfeksiyon.
- OS** / oda sıcaklığı
- pasaj** / saf kültür elde etmek veya diğer amaçlar için bir mikroorganizma kolonisinin ürettiği besiyerinden alınarak yeni bir besiyerine ekilmesi (subculture)
- patojenite** / bir enfeksiyöz ajanın duyarlı bir konakta hastalık oluşturma yeteneği (*bazı patojen olmayan ajanlar da immün sistemi yetersiz bir konakta patojenik hale gelebilir*)
- PCR** / polimerase chain reaction (polimeraz zincir reaksiyonu)
- PNL** / polimorf nüveli lökosit
- prevalans** / belirli bir popülasyonda, yeni ve eski vaka ayrımı yapmaksızın, bir hastalık için hasta bireylerin tümünün, o toplumda risk altında bulunan nüfusa bölünmesi ile elde edilen hız.
- real time PCR** / gerçek-zamanlı PCR (rPCR)
- referans laboratuvar** / bir enfeksiyon etkeninin araştırılmasında tanıya yardımcı tüm teknikleri kullanabilen, söz konusu etken ile ilgili uzun dönemli bilgi ve deneyime sahip, gerektiğinde aynı çalışmalar yürüten uluslararası laboratuvarlarla işbirliği yapan, gerektiğinde epidemiyolojik araştırmalar için ulusal sağlık otoritesine (sağlık bakanlığı) uygun teknikler ile veri sağlayan, ulusal laboratuvar.
- rezervuar** / bir enfeksiyöz ajanın normal olarak bulunabileceği ve çoğalabileceği (ve diğer konaklar için enfeksiyon kaynağı olabilecek) kişi, hayvan, toprak veya çevredir.
- RNA** / ribonükleik asit
- RT-PCR** / revers transkriptaz PCR
- rutin sürveyans** / bir hastalığı veya sağlık olayını

izlemek için ihtiyaç duyulan bilginin düzenli ve sistematik olarak toplanmasıdır.

**sa** / saat

**sendrom** / her birinin tek başına bulunmasına kıyasla daha çok sıklıkla bir arada bulunması ile tanıya götüren semptomlar ve/veya bulgular kompleksi

**sendromik bildirim** / sürveyans altındaki bir sağlık olayının, spesifik bir hastalık tanımına göre *değil*, sendrom temelinde yapılmış bir vaka tanımına göre bildirilmesi (ör., *akut hemorajik ateş sendromu, Üretral akıntı sendromu, genital ülser sendromu...*)

**sentinel sürveyans** / bir hastalık için olguların erken saptanması veya eğilimler hakkında gösterge sayılabilecek bilgiye ulaşılmada; verilerin - toplumun kalan kısmındaki duruma işaret edecek şekilde- bir temsili nüfustan toplandığı sürveyans tipi (ör., *influenza virüs yapısının takip edilmesi veya aşının doğru antijenleri içerip içermediğinin kontrol edilmesinde influenza için bir kaç ildeki hastanelerin kullanılması ile yapılan sürveyans*)

**SF** / serum fizyolojik

**sn** / saniye

**soğuk zincir** / biyolojik bir maddenin bir yerden başka bir yere gönderilmesi, taşınması ve geçici süre ile saklanması esnasında tüm aşamalarda aksi belirtilmedikçe 2°-8°C (buzdolabı/buzluk ısı koşulları) ısı aralığı içinde tutulması

**SPS** / sodyum polyanetol sülfonat

**SSS** / santral sinir sistemi

**sürvey** / bilginin sistematik olarak toplandığı bir araştırmadır. genellikle belirlenmiş bir toplulukta, belli bir zaman aralığında yürütülür. (*sürveyanstan farklı olarak süreklilik arz etmez; bununla birlikte, eğer düzenli tekrarlanıyorsa, bir sürveyans sisteminin temelini sürveyler oluşturabilir*)

**sürveyans** / verilerin sistematik olarak toplanması, biriktirilmesi ve özellikle elde edilen sonuçlara göre harekete geçecek kişiler başta olmak üzere bu sonuçlara ihtiyacı olan birimlere zamanında geri bildirimini sağlayacak şekilde verilerin değerlendirilmesi sürecidir. *aktif sürveyans*: sürveyans sisteminde bildirim yapmakla yükümlü kişi veya birimlerin kendiliğinden rapor etmesini beklemeksizin, yetkili birimlerce düzenli olarak verilerin toplanması; *pasif sürveyans*: katılımcılardan aktif olarak veri toplanmayan, bildirim kendiliğinden yapılmasının beklendiği sürveyans sistemi.

**temaslı** / enfekte bir kişiyle, hayvanla veya kontamine çevreyle, o enfeksiyonu edinme olasılığı doğuran bir ilişkisi olmuş kişi veya hayvan.

**THSK** / Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (Sağlık Bakanlığının yeniden yapılanması kapsamında, başlıca, eski adı *Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı* olan kurum ile eski adı *Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü* olan birimleri bir çatı altında toplayan yapı)

**TTA** / transtrakeal aspirasyon (sıvısı)

**UAMDS** / Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyansı

**UMS** / Ulusal Mikrobiyoloji Standardı

**UV** / ultraviyole (ışık)

**vaka** / sürveyans amaçları veya salgın için yapılmış bir vaka tanımı ile uyumlu bir hastalığa ya da sağlık sorununa sahip kişi (*sürveyans veya salgın araştırma amacı için yapılmış bir vaka tanımının geleneksel klinik tanımlamalarla aynı olması bir gereklilik değildir*).

**vaka bazlı sürveyans** / her bir vakaya ait spesifik verinin toplanması yoluyla bir hastalığın sürveyansı (örn. *poliomyelit sürveyansında AFP vakalarına ait detaylı bilgi toplanması*)

**vaka sınıflaması** / kriterlerin destekleme derecesine göre "vaka" olma olasılığının derecelendirilmesi (örn., *olası vaka, kesin vaka...*) (*bu, özellikle vakanın çok erken bildirilmesi gerekli durumlarda (ebola hemorajik ateş v.b.) için ve kesin tanısının konulmasında güçlük olan (karmaşık laboratuvar testleri gerektiren v.b.) durumlar için kullanışlıdır*).

**vaka tanımı** / belli bir hastalığın sürveyansı veya salgın araştırma amaçları için bir bireyin bir "vaka" olarak tanımlanabilmesinde bir arada bulunması gereken tanınabilir kriterler seti (*vaka tanımları; kişi, yer ve zaman elemanlarıyla birlikte, klinik kriterler, laboratuvar kriterleri veya bunların bir kombinasyonu şeklinde olabilir*).

**virülans** / konağın dokulana invazyon yeteneğine ve/ veya neden olduğu hastalığın şiddetine göre, bir enfeksiyöz ajanın patojenite derecesinin ölçüm değeri.

**VTM** / viral transport medium

**WHO** / World Health Organization

**zoonoz** / hayvanlardan insanlara doğal koşullar altında geçebilen enfeksiyon hastalığıdır. endemik (enzootik) veya epidemik (epizootik) olabilir.

*Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır*

## ÖNSÖZ

*Bulaşıcı hastalıkların, insanlık tarihi boyunca hem bireyleri hem de toplumları etkileyerek ciddi sağlık tehdidi oluşturdukları bilinmektedir. Bulaşıcı hastalıkların küresel boyutta kontrol altına alınması, ulusal düzeylerde uygulanan kontrol programlarının başarısına bağlıdır. Bu nedenle ‘güvenilir’, ‘doğru’ ve ‘zamanında’ veri toplanması önem kazanmaktadır. Sürveyans ve kontrol programlarına veri sağlayan en önemli kaynaklardan biri ise laboratuvarlardır.*

*Ülkemizde bulaşıcı hastalıkların sürveyansı ve kontrolüne yönelik çalışmalar mevzuat ile düzenlenmiş olup sistemin kanıta dayalı işlemesi esas alınmıştır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarları, kanıta dayalı bilgi üretmeleri nedeniyle ulusal sürveyans sisteminin vazgeçilmezi konumundadır. Ülkelerin laboratuvar tanı kapasitelerinin güçlendirilmesi, Uluslararası Sağlık Tüzüğü (2005)’nün 2007 yılından itibaren Dünya Sağlık Örgütü’ne taraf üye ülkelerde yürürlüğe konması ile birlikte, ayrıca önem kazanmıştır.*

*“Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi” kapsamında Başkanlığımız Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı tarafından ulusal laboratuvar tanı kapasitesinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalar; bildirim zorunlu bulaşıcı hastalıkların mikrobiyolojik tanısında geçerli yöntemlerin kullanımının yaygınlaştırılmasına gereksinim olduğunu göstermektedir. Projenin en önemli faaliyetlerinden biri “Mikrobiyoloji Laboratuvarı Performans Kalitesinde Sürekli İyileştirme Sağlanması ve Kalite Güvence Kılavuzları ile İşlemlerinin Desteklenmesi”dir. Bu çerçevede ülkemizde laboratuvar tanı kapasitesinin geliştirilmesi amacıyla “Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi” oluşturulmuştur.*

*Bu Rehber, bulaşıcı hastalıkların kesin tanısı ve erken uyarı-yanıt sistemini ilgilendiren halk sağlığı tehditlerinin araştırılmasında geçerli tekniklerin, geçerli teknik adımlarla uygulanması için yol gösterecek, ‘güvenilir’, ‘doğru’ ve ‘zamanında’ sonuçlar elde edilmesine hizmet edecektir.*

*“Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi”nin oluşturulmasında görev alan ve emeği geçen herkese teşekkür eder, çalışmalarında başarılar dileriz.*

Prof. Dr. Seçil ÖZKAN  
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanı

*Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır*

# GİRİŞ

Laboratuvardan çıkan sonuç öncelikle 'hasta yararı' nı ilgilendirir. Doğru, güvenilir ve zamanında tanı hasta bireyin en kısa sürede uygun tedaviyi almasının güvencesidir. Laboratuvarın sonuçları 'hastalıklarla mücadele'yi de yakından ilgilendirmektedir. Zira laboratuvarlardan sunulan veriler sayesinde halk sağlığını tehdit eden sorunlara kanıta dayalı çözümler üretilebilir.

Bulaşıcı hastalıkların sürveyansı ve kontrolünde doğru, güvenilir ve zamanında veri toplanması son derece önemlidir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarları sürveyans sistemine veri sağlayan temel yapılardan biridir. Ulusal mevzuatımız ve Uluslararası Sağlık Tüzüğü sistemin kanıta dayalı işlemlerini kaçınılmaz kılmakta, bu da tanı kapasitesinin geliştirilmesi gereğini beraberinde getirmektedir.

Avrupa Birliği fonlarından desteklenen ve Dünya Sağlık Örgütü'nün teknik danışmanlığında yürütülen "Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi" kapsamında ulusal laboratuvar tanı kapasitesinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalar bildirim zorunlu bulaşıcı hastalıkların tanısında geçerli yöntemlerin kullanımının yaygınlaştırılmasına gereksinim olduğunu göstermiştir.

## REHBERİN AMACI

Elinizdeki Rehber (Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi) bu gereklerden doğmuş; doğru ve güvenilir tanı için geçerli yöntemlerin kullanımının yaygınlaştırılması ve ülkemizin mikrobiyolojik tanı kapasitesinin geliştirilmesi amacıyla oluşturulmuştur.

Rehberin bulaşıcı hastalıkların kesin tanısı ve erken uyarı/yanıt sistemini ilgilendiren halk sağlığı tehditlerinin araştırılmasında geçerli tekniklerin geçerli adımlarla uygulanmasına yol göstereceği öngörülmektedir. Rehberden beklenen diğer önemli etki de, tanıda laboratuvarlar arası standardizasyonu sağlamasıdır. Ayrıca hastalık kontrol programlarına doğru ve güvenilir veri sunulması sayesinde, etkin kontrol önlemlerinin geliştirilmesi mümkün olabilecektir. Rehberin kurumlar ve sektörler arası iletişim ve işbirliğinin güçlenmesine de katkı sağlayacağı umut edilmektedir.

## REHBERİN HEDEF KİTLESİ

Rehberin başlıca dört farklı hedef gruba hizmet edeceği düşünülmektedir.

- 1 Öncelikle sahada klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında nihai karar sorumluluğu olan profesyonellere - tanıda standart yaklaşımları sunan bir kaynak olarak (gerektiğinde detaylı uzman görüşüne ayrıca başvurulmalıdır);
- 2 Hekimlere - laboratuvar hizmetlerinin standardı ve uygun testlerin seçimi /



- talep edilmesi hakkında bilgi sağlayan bir kaynak olarak;
- 3 Halk sağlığı otoritelerine – özellikle halk sağlığını yakından ilgilendiren enfeksiyon vakalarının ya da salgınların araştırılmasında, bir yandan olması gereken asgari laboratuvar kapasitesi hakkında bir yandan da 'kesin tanı'ya ulaşılması süreç ve süreleri hakkında bilgi sağlayan bir kaynak olarak;
  - 4 Ödeme kurumlarına – 'kesin tanı'ya ulaşılmasında asgari standart mikrobiyolojik işlem paketleri hakkında bilgi sağlayan ve ücretlendirmelerin rasyonel bir çerçeveye içinde yapılmasına destek verecek bir kaynak olarak.

## REHBERİN KAPSAMI ve OLUŞTURULMA SÜRECİ

Rehber; saydam, katılımcı, kanıta dayalı, sürdürülebilir ve kurumsal olma ilkeleri temel alınarak oluşturulmuştur. Bu çerçevede başlangıç olarak "Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Yönergesi" yazılmış ve "Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi"nin kapsamı belirlenmiştir. Kapsamda iki temel kategori ayırt edilebilir:

Birinci kategoride mikrobiyoloji laboratuvarlarının tanı süreçlerinde yararlanacağı standartlar yer almaktadır. Bu standartlar bildirim zorunlu enfeksiyon hastalıkları için mikrobiyolojinin ana dallarına göre -bakteriyoloji, viroloji ve parazitoloji olmak üzere- bölümlenmiş olup (i) örnek yönetimi ve (ii) mikrobiyolojik tanı/tanımlama, ve (iii) test prosedürleri belgeleridir.

*Örnek yönetimi* belgeleri klinik örneklerin seçimi ve uygun alınmasını; örneğin işlenmesine kadar geçen süre içinde özelliğini kaybetmeden korunmasını; alınması, taşınması ve işlenmesi sırasındaki güvenlik gereklerini ve örneğin işlenmesinde uygulanacak sistematik yaklaşımı açıklayan belgelerdir.

*Mikrobiyoloji tanı/tanımlama* belgeleri bildirim zorunlu hastalığın mikrobiyolojik tanısı veya patojen etkenin tanımlanmasında uygulanan ana işlem basamaklarını anlatan belgelerdir.

*Test prosedürleri* ise başlıca bakteriyolojide kullanılan tanımlama testlerinin yapılışını ayrıntılı olarak açıklayan, testin her seferinde ve farklı kişiler tarafından aynı biçimde yapılmasını sağlayan belgelerdir. Bu noktada belirtmek gerekirse; hem "test prosedürleri" başlığı altında verilenlerden, hem de diğer birçok UMS'nin içinde/ekinde yer alan prosedürlerden bildirim sistemi dışında kalan enfeksiyon hastalıklarının tanısında da laboratuvarların yararlanabilmesi hedeflenmiştir. Laboratuvarlar bunları örnek prosedür olarak diğer çalışmalarına uyarlayabilirler.

İkinci kategoride ise 'sendromik tanı yaklaşımı' belgeleri bulunmaktadır. Bu kategorideki belgeler ulusal sürveyans sisteminde yer alan ve erken uyarı/yanıt sistemini ilgilendiren halk sağlığı acillerine temel tanı yaklaşımının özetlendiği belgelerdir. Burada DSÖ'nün öngördüğü beş ana sendroma (akut gastroenterit, akut respiratuvar sendrom, akut hepatit/sarılık sendromu, akut nörolojik sendrom ve akut hemorajik sendrom) yönelik tanı algoritmaları verilmekte, bu algoritmalar doğrultusunda istenecek mikrobiyolojik incelemeler ve laboratuvara gönderilecek örnekler listelenmektedir. Sendromik Tanı Yaklaşımı belgeleri alanda çalışan hekimlere ve Halk Sağlığı Müdürlüklerine bu sendromlar karşısında olasılıkların hızla göz önüne getirilmesini sağlamak bakımından yol gösterici dokümanlar oldukları kadar, laboratuvarlara da bir sendrom ön tanısı ile gelen

örnekte hangi olasılıkları çalışmaya hazır olmaları gerektiği hakkında fikir vermesi beklenen “hazırlıklılık” dokümanlarıdır.

Rehberin oluşturulmasında bildirim zorunlu bulaşıcı hastalıklar listesi temel alınmıştır. Her etkenin/hastalığın ilişkili olduğu sendromlar, örnek yönetimi ve mikrobiyolojik tanı/tanımlama hususları ile tanıda kullanılan yöntemler ve bu yöntemlerin gerektirdiği biyogüvenlik düzeyleri belirlenmiştir. Takiben Rehberde yer alacak konu başlıkları belirlenmiş ve “Tanı Standartları Çalışma Grupları” oluşturulmuştur.

Çalışma Gruplarının konularında yetkin kişilerden oluşması hedeflendiğinden gruplara katılma kriterleri belirlenmiştir. Şu kriterlerden en az birini karşılayan uzmanlar Çalışma Gruplarına davet edilmişlerdir: (i) son beş yılda Pubmed/Türk Tıp Dizininde yer alan en az üç yayınının olması, (ii) kitap veya kitap bölümü yazmış olmak, (iii) Sağlık Bakanlığı'nın bilimsel komisyonlarında görev almak, (iv) KLİMUD veya TMC komisyonlarında görev almak, (v) Sağlık Bakanlığı, KLİMUD veya TMC'nin organize ettiği eğitimlerde eğitici olarak görev yapmış olmak, (vi) TÜbitak projesi veya uluslararası projelerde yer almak, (vii) önceki yıllarda hazırlanan “Bildirim Zorunlu Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısına Yönelik Standart Uygulama Prosedürleri” veya “Bulaşıcı Hastalıkların Tanısında Sahada Çalışan Hekimler için Laboratuvar Rehberi”nin yazılması ve gözden geçirilmesinde görev almış olmak.

Nihayet, Aralık 2013'te ‘Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Çalıştayı’nda 89 uzman, Rehber kapsamında bulunan 107 konu başlığını hazırlamak üzere 12 Çalışma Grubu halinde bir araya gelmişlerdir. Her bir üye bilimsel ilkeler doğrultusunda, mevcut bilimsel kanıt ve bilgiler ışığında ve kendi deneyimlerinden de yararlanarak üstlendikleri konu ile ilgili güncel ve geçerli dokümanlar geliştirmişlerdir.

Çalıştayı ardından dokümanlarda dil birliği ve bilimsel bütünlüğün sağlanması amacıyla yoğun bir gözden geçirme süreci yaşanmış, “UMS Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi” yayına hazır hale getirilmiştir. Rehber, eş zamanlı olarak THSK web sitesinde (bkz. [www.thsk.org.tr](http://www.thsk.org.tr)) de kullanıma sunulmaktadır.

Rehber bu haliyle bir TASLAK dokümandır. Böylece ilgili uzmanlık derneklerinin, meslek örgütlerinin ve sahadaki kullanıcıların görüşlerine açılmış bulunmaktadır. Alınacak geri bildirimlere göre son şeklinin verilmesi ve 2014 yılı sonu itibariyle de onaylanmış “Ulusal Mikrobiyoloji Standartları” belgesi olarak yayınlanması hedeflenmektedir.

## REHBERİN KULLANIMI

“UMS Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi” 3 ciltten oluşmaktadır.

Birinci ciltte “Bakteriyoloji” başlığı altında solunum yolu patojenleri, enterik patojenler, cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar ve zoonozlara yönelik mikrobiyolojik tanı/tanımlama standartları yer almaktadır.

İkinci cilt enfeksiyöz madde taşıma rehberi, bakteriyolojik test prosedürleri ve antibiyotik duyarlılık test standartlarını içermektedir.

Üçüncü cilt ise “Parazitoloji”, “Viroloji” ve “Sendromik Tanı Yaklaşımı” bölümlerini kapsamaktadır. “Parazitoloji” bölümünde örnek yönetimi, mikrobiyolojik

tanı/tanımlama ve test prosedürleri yer alırken “Viroloji” bölümünde viral etkenlere yönelik mikrobiyolojik tanı/tanımlama standartları bulunmaktadır.

“UMS Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi”ne standartlar bir kodlama sistemi kullanılarak yerleştirilmiştir. Buna göre; bakteriyoloji “B”, viroloji “V”, parazitoloji “P” ile sembolize edilmektedir. Standart kategorisine göre ise sendromik tanı yaklaşımı “SY”, örnek yönetimi “ÖY”, mikrobiyolojik tanı/tanımlama “MT”, test prosedürleri “TP”, antimikrobiyal duyarlılık “AMD” olarak kısaltılmıştır. Kodlama sistemi yapılandırılırken ise önce dokümanın hangi mikrobiyolojik alana ait olduğunu belirtmek üzere “B”, “V”, “P”; ardından standart kategorisi ve numarası gelmektedir. Örneğin, bakteriyoloji grubundaki “Boğmacanın Mikrobiyolojik Tanısı”, “B-MT-01 Boğmaca” olarak kodlanmıştır.

Rehber modüler yapıdadır; bütünlüğü ve dokümanlar arasındaki bağlantı, atıflar yardımıyla sağlanmıştır. Örneğin “B-MT-02 Difteri” dokümanında ilgili diğer UMS dokümanlarına atıfta bulunulmuştur; bu atıflar da her belgenin sonunda “İlgili diğer UMS belgeleri” başlığı altında kod numaraları ve isimleri ile ayrıca listelenmiştir.

Günümüzde bilginin hızla değişen karakteri Rehberin sürekli gelişen “canlı” bir doküman olmasını bir bakıma zorunlu kılmaktadır. Bu nedenle basılı materyalin yanı sıra THSK web sitesinde de yayınlanarak güncellemelerin paylaşılması amaçlanmaktadır. [UMS.LabTaniRehberi@thsk.gov.tr](mailto:UMS.LabTaniRehberi@thsk.gov.tr) adresinden bize ulaşabilir; içerik ve diğer hususlarla ilgili her türlü önerinizi ve eleştirinizi ileterek veya uygulamada karşılaştığınız sorunları paylaşarak Rehberin geliştirilmesine katkı sağlayabilirsiniz.



Basıldığında KONTROLSUZ KOPYA niteliğindedir.



# ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

## Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi

Hazırlayan Birim	Klinik Mikrobiyoloji Tanı Standartları Komisyonu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Genel
Bölüm	Örnek Yönetimi
Standart No	GEN-ÖY-01
Sürüm No	1.0
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

Bu Belge, DSÖ'nün "Guidance on Regulations for the Transport of Infectious Substances, 2013-2014" başlıklı yayını esas alınarak hazırlanmıştır.

## İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR .....	5
KAPSAM VE AMAÇ.....	7
GİRİŞ .....	7
Uluslararası düzenlemeler .....	9
Ulusal düzenlemeler .....	9
Tanımlar .....	11
ENFEKSİYÖZ MADDELERİN SINIFLANDIRILMASI .....	12
Kategori A .....	13
Kategori B .....	13
İstisnalar (Muaf maddeler) .....	13

GÖNDERİLERİN TAŞIMAYA HAZIRLANMASI .....	16
Genel Hususlar.....	16
Temel "Üçlü Paketleme" sistemi .....	17
KATEGORİ A PAKETLEME GEREKLİLİKLERİ .....	18
Paketleme .....	18
İşaretleme.....	19
Etiketleme.....	20
Dokümantasyon .....	21
KATEGORİ B PAKETLEME GEREKLİLİKLERİ .....	22
Paketleme .....	22
İşaretleme.....	23
Dokümantasyon .....	23
DİĞER GEREKLİLİKLER VE HUSUSLAR .....	24
Muaf insan/hayvan örneklerinin paketlenmesi .....	24
Üst ambalaj ('overpack').....	24
Paketleme materyalinin tekrar kullanımı.....	25
Boş paketin geri gönderilmesi.....	25
Soğutucular .....	25
Eğitim.....	26
Taşıma planı .....	27
Posta gereklilikleri .....	28
Dökülme-saçılma ve acil durumlar.....	28
EKLER.....	32
Ek-1 Tehlikeli maddelerin taşınması için Birleşmiş Milletler Sistemi hakkında ek bilgi .....	32
Ek-2 Kategori A "enfeksiyöz madde" listesi .....	33
Ek-3 Tehlikeli Madde Deklarasyon Belgesi .....	34
Ek-4 Enfeksiyöz maddelerin ve hasta örneklerinin paketleme amaçları için sınıflandırılması.....	35
Ek-5 İşaretleme ve etiketler .....	36
Ek-6 Sık sorulan sorular ve yanıtları .....	37
KAYNAKLAR.....	39



## Kısaltmalar

<b>UNCETDG</b>	Committee of Experts on the Transport of Dangerous Goods
<b>ICAO</b>	International Civil Aviation Organization
<b>IATA</b>	International Air Transport Association
<b>DGR</b>	Dangerous Goods Regulations
<b>RID</b>	International Carriage of Dangerous Goods by Rail
<b>ADR</b>	European Agreement concerning the International Carriage of Dangerous Goods by Road
<b>IMO</b>	International Maritime Organization
<b>SOLAS</b>	International Convention for the Safety of Life at Sea
<b>GMMOs</b>	Genetically modified microorganisms
<b>GMOs</b>	Genetically modified organisms
<b>UN</b>	United Nations (Birleşmiş Milletler)
<b>PTT</b>	Posta Telgraf Telefon (Genel Müdürlüğü)
<b>UNCETDG</b>	Committee of Experts on the Transport of Dangerous Goods

(bu sayfa boş bırakılmıştır)

TASLAK

## Kapsam ve Amaç

Maruz kalınması halinde insan ve hayvan sağlığını tehdit edebilecek enfeksiyöz maddelerin ve biyolojik örneklerin taşınması önemli bir konudur; uluslararası ve ulusal düzenlemelere göre yapılması gerekir.

Pek çok ülke kendi ulusal mevzuatında enfeksiyöz maddelerin ve biyolojik örneklerin taşınmasını düzenlemiştir. Ülkemizde de PTT Genel Müdürlüğü'nün Mektup Postası Tüzüğü (1) ve Sağlık Bakanlığının ilgili Yönetmeliği (2) enfeksiyöz maddelerin ve biyolojik örneklerin kargo veya posta olarak hava, kara ve deniz yolu ile taşınmasını düzenler. Düzenlemelerin hemen hepsi, başlıca uluslararası hava taşımacılığı ve Birleşmiş Milletler mevzuatından yararlanılarak geliştirilmiştir.

Öte yandan yeterince düzenleme ve yayın mevcut olmakla birlikte uygulamada sorunlar yaşanabilmektedir. Bunlar kısmen uygun paketleme malzemesinin temini ile ilgili maddi sorunlardır. Ancak mevzuatın anlaşılması ve doğru tatbik edilmesine dair hususlar da önemli bir yer tutmaktadır. Bu nedenle uygulamayı kolaylaştırmak için "pratik" hususlara açıklık getiren bir rehber gereksinim duyulabilmektedir. Taşıma sektörü, özellikle hava yolu, ilgili mevzuat ile sıkı sıkıya bağlıdır ve eğer enfeksiyöz örneği içeren bir paket belirlenmiş normlara (adres, etiketleme, adlandırma, paketin sağlamlık belgesine sahip olup olmaması, vb.) tam manasıyla uygun değilse taşınması ret edilmektedir.

Bu nedenlerle, enfeksiyöz maddelerin başka merkezlere gönderilmesi ile ilgili pratik hususlar hakkında bir Rehberin el altında olmasının sahada laboratuvarlar ve hekimler için yol gösterici olacağı düşünülmüştür. Bu gerekçeler ile hazırlanan bu Rehberde enfeksiyöz maddelerin ve biyolojik örneklerin taşınmasında güncel düzenlemelerde geçen tanımlar ve sınıflandırmalar ile örneklerin gönderilmek üzere paketlenmesi, etiketlenmesi, belgelerinin doldurulması, taşıyıcı ile iletişim gibi hususlar ve kurallar yer almaktadır. Rehberin amacı, kavramsal temelin yaygınlaşmasını sağlamak ve laboratuvarların başka merkezlere\* mikroorganizma kültürlerini veya klinik örnekleri gönderirken uygun bir şekilde paketleme yapabilmeleri için adım adım izleyebilecekleri bir prosedür sunmaktır.

## Giriş

Enfeksiyöz maddeler pek çok nedenle ülke içinde veya ülkeler arasında taşınırlar. Malzemenin bütünlüğü bozulmadan ve zamanında hedefe varışını kolaylaştırmak için yasal gerekleri karşılayacak şekilde paketlenmesini ve nakliye koşullarını sağlamak **göndericilerin görevidir.**

Posta, havayolu veya diğer ulaşım sektöründe çalışan personel uygunsuz paketlenmiş örneklerin kırılıp dökülmesi ya da sızması sonucu enfeksiyöz mikroorganizmalara maruz kalma olasılığından endişe duyabilirler. Bu nedenle enfeksiyöz maddeleri içerecek paket, taşıma sırasında hasar potansiyelini en aza indirmek üzere tasarlanmış olmalıdır. Ek olarak, paket, örneklerin zamanında ve doğru işlenebilmesi için, malzemenin bütünlüğünü de korumalıdır (3).

\* Klinik laboratuvarlar ve referans laboratuvarları arasında ve referans laboratuvarlar ile uluslararası referans merkezler arasında çeşitli amaçlar için (tanı, doğrulama, moleküler epidemiyolojik analizler, eksternal kalite programları vb.) bütün olası örnek göndermeler kastedilmektedir.

Her gün binlerce enfeksiyöz madde ya da hastalıkların araştırılması, klinik deneyler, sürveyans çalışmaları, antidoping testleri, rutin analizler için toplanmış insan ve hayvan örnekleri çeşitli nedenlerle dünya üzerinde sevk edilmektedir. Kimileri gerektikçe kimileri de düzenli olan göndericiler (bunlar sağlık kurumları, tanı ve araştırma laboratuvarları, ilaç endüstrisi, tıp personeli ya da hastanın bizzat kendisi olabilir) her gün enfeksiyöz maddeleri gönderilmek üzere taşıma sektörüne emanet ederler.

Küresel halk sağlığı için, bu örneklerin, toplandığı yerden analiz edilecekleri yere güvenli, zamanında, verimli ve mevzuata uygun bir şekilde taşınması gerekir.

İnsan ve hayvan kaynaklı örnekler -hastanın varsayılan enfeksiyon durumu ne olursa olsun- taşıma ile uğraşanları enfeksiyon riskine karşı korumak için en uygun şekilde paketlenmeli ve taşınmalıdır. Taşıma ile uğraşan personel için enfeksiyon riskleri tamamen ortadan kaldırılamayabilir. Ancak, hiç şüphesiz, asgaride tutulabilir. Öte yandan, paketin zarar görmesi örneğin zamanında yerine ulaşmasını engelleyebilir ve - genellikle analiz için acil bir nedenle gönderilmiş olan örneğe- tanı konamaması anlamına da gelir (4).

Öyleyse, örnek öyle paketlenmelidir ki; (i) nakil sırasında *örneği içeren kaptan* (tüp, şişe vb.) kırılma, delinme, sızdırma olmasın; ancak, (ii) eğer örnek kabında kırılma ya da sızdırma olursa içerik *paketin dışına* çıkmasın.

Göndericiler, gönderinin hazırlanmasında uygun kararları verebilmeleri için, kendi ihtiyaçlarını ve mevzuatın şartlarını bilmek zorundadırlar. Bu nedenle tehlikeli maddeler mevzuatı ('Dangerous Goods

Regulations; DGRs") taşıma sürecine dahil olan tüm çalışanların uygun eğitimden geçmesini gerektirir (4). Gönderenin sorumlulukları ile orantılı uygun bir eğitim, enfeksiyöz maddelerin taşınması için tanımlama, sınıflandırma, ambalajlama, işaretleme, etiketleme, soğutma ve gerekli belgeleri hazırlama hakkında göndericiye gerekli bilgi düzeyini sağlayacaktır.

Uygulamayı iyileştirmenin bir yolu da rehberlerdir ki, bu Rehber de bu gereksinim ile hazırlanmıştır.

Rehberde, enfeksiyöz maddelerin -güvenli paketlenme ve taşıma amaçları için- sınıflandırılmaları verilmektedir. Sınıflandırma yaklaşımı başlıca risk değerlendirmesi temeline dayanmaktadır ve tanımlanan her Kategori için paketlenme gereklerini açık ve anlaşılır kılmayı hedefler (3). Rehber, enfeksiyöz madde taşınması ile ilgili 1 Ocak 2013 tarihinden itibaren geçerli olan değişiklikleri de içermektedir (4).

Rehberde ayrıca, enfeksiyöz madde taşınması sürecine katılanlar (gönderen, taşıyıcı ve alıcı) arasında çalışma ilişkisini geliştirmenin önemi vurgulanmaktadır. Temel sorumluluk **göndericidir**; gönderici gönderilen örneğin doğru sınıflandırılması, paketlenmesi, etiketlenmesi ve dokümantasyonunu sağlamalı; taşıyıcı ile şeffaf ve güvenilir bir ilişki kurmalı; alıcı belli ve bilinçli olmalıdır.

*Enfeksiyöz madde taşınmasında temel sorumluluk göndericidedir! Gönderici, örneğin doğru bir şekilde sınıflandırılmasını, paketlenmesini, etiketlenmesini ve dokümantasyonunu sağlamakla yükümlüdür!*

## Uluslararası düzenlemeler

Enfeksiyöz maddelerin her türlü taşıma yoluyla taşınması için uluslararası düzenlemeler Birleşmiş Milletler Ekonomik ve Sosyal Konseyinin bir komitesi olan **Tehlikeli Maddelerin Taşınması Uzmanlar Komitesi (UNCETDG)** tarafından yapılan 'tavsiyeler'e dayanmaktadır. Öneriler "Model Tüzük" şeklinde sunulur. Dünya Sağlık Örgütü, UNCETDG ve ICAO'ya danışman olarak hizmet verir. Model Tüzük uluslararası modal sözleşmeler ile uluslararası hukukta yansıtılır (ilgili bağlantılar için bkz. Ek-1). Bu sözleşmelerin başlıca tarafları aşağıda verilmiştir:

### Havayolu

Uluslararası Sivil Havacılık Örgütü (ICAO) tarafından yayımlanan *Tehlikeli Maddelerin Havayolu ile Güvenli Taşınması için Teknik Talimatlar* hukuken bağlayıcı uluslararası düzenlemelerdir.

Uluslararası Hava Taşımacılığı Birliği (IATA) de *Tehlikeli Maddeler Tüzüğü*nü (DGR) yayınlamıştır. Bu Tüzük ICAO hükümlerini içerdiği gibi ilave kısıtlamalar da getirmektedir (bu Rehberde de bu kısıtlamalardan yeri geldikçe bahsedilmiştir).

ICAO talimatları tüm uluslararası uçuşlarda geçerlidir. Ülke içi uçuşlar için ulusal sivil havacılık otoriteleri ulusal mevzuatı uygular. Ulusal mevzuatlar normal olarak ICAO hükümlerine dayanır ancak devlete göre farklar içerebilir. Bu yerel farklılıklar da ICAO ve IATA dokümanlarında yayınlanmıştır.

### Demiryolu

*Demiryolu ile Tehlikeli Malların Uluslararası Taşımacılığı Düzenlemesi* (RID) Avrupa, Orta Doğu ve Kuzey Afrika ülkeleri için geçerlidir. RID ayrıca Konsey Direktifi 2008/68/EC ile Avrupa Birliği içi ulaşım için de geçerlidir.

### Karayolu

*Tehlikeli Malların Karayolu ile Uluslararası Taşımacılığı Avrupa Sözleşmesi* (ADR) 46 ülke için geçerlidir. Ayrıca, sözleşmenin değiştirilmiş versiyonları Güney Amerika ve Güney-Doğu Asya ülkeleri tarafından kullanılmaktadır. ADR de 2008/68/EC sayılı Konsey Direktifi ile ülkelerin iç ulaşımını da düzenler.

### Denizyolu

Uluslararası Denizcilik Örgütü (IMO) tarafından yayınlanan *Uluslararası Denizcilik Tehlikeli Maddeler Kodu* uygulamaları "Denizde Can Emniyeti için Uluslararası Sözleşme (SOLAS)"nin bütün tarafları için zorunludur.

### Posta hizmetleri

Dünya Posta Birliği (UPU) tarafından yayımlanan *Mektup Gönderme Kitabı* da temel olarak ICAO hükümlerine ve Birleşmiş Milletler 'tavsiyeleri'ne dayanır.

## Ulusal düzenlemeler

Birçok ülke kendi ulusal tehlikeli maddeler mevzuatında bütünüyle Birleşmiş Milletler Model Tüzüğü'nü benimsemiştir. Bazı ülkeler varyasyonlarını kullanır. Ulusal yetkililer varsa bu varyasyonlar hakkında bilgi vermekle yükümlüdürler.

## ÖZET NOTLAR

### *Enfeksiyöz maddelerin taşınmasını kim düzenler?*

### *Göndericinin sorumlulukları nelerdir?*

### *Enfeksiyöz maddeleri gönderebilmek için eğitim almak şart mıdır?*

### *Neden?*

### *Uygunsuz paketleme ve gönderimin riskleri nelerdir?*

### *Uygun paketleme ve gönderimin faydaları nelerdir?*

### İlgili organizasyonlar ve mevzuat

- Birleşmiş Milletler – Uzman Komitesi (UNCTDG)
- Uluslararası Sivil Havacılık Örgütü (ICAO)
- Uluslararası Hava Taşımacılığı Birliği (IATA)
- Uluslararası Denizcilik Örgütü (IMO)
- Dünya Posta Birliği (UPU)
- Karayolu/Demiryolu taşımacılığı (ADR/RID)
- TC Ulaştırma Bakanlığı Mektup Postası Tüzüğü
- TC Sağlık Bakanlığı Enfeksiyöz Madde Taşıma Yönetmeliği

### Göndericinin sorumlulukları

- Göndereceği enfeksiyöz materyali;
  - sınıflandırmak
  - uygun gönderi adını ve UN numarasını belirlemek
  - paketlemek
- İlgili belgeleri (taşıma, gümrük vb.) hazırlamak
- Taşıyıcıyı ayarlamak
- Alıcıyı bilgilendirmek

### Enfeksiyöz madde taşınmasında eğitim

- Enfeksiyöz maddelerin taşınması eğitim gerektirmektedir ve göndericiler eğitilmelidir.
- Eğitim gereklidir, çünkü;
  - Halk sağlığı ve güvenliği söz konusudur
  - Uluslararası uyum gereklerinin ve mevzuatın iyi anlaşılmasını sağlamak gereklidir
  - Uygunsuz paketleme taşıyıcı tarafından ret edilir
  - Uygun paketleme ve gönderme kazanılması gereken bir yetenektir.
- IATA eğitimi alınması zorunlu değildir. IATA havayolu eğitimine odaklanmaktadır. Ancak küresel bir ortak yol için IATA ve diğer partnerler arasında işbirliği vardır.
- DSÖ de bu çerçevede eğitim programları geliştirmiştir.

### Uygunsuz paketleme ve gönderimin riskleri

- Enfeksiyöz ajanlara maruziyet riski
- Başarısız ya da gecikmeli paket gönderimi - gümrükte durdurulan gönderimler
- Bir kurye/taşıyıcı bulma zorluğu
- Olay ya da kaza durumunda panik yaşanması olasılığı
- Adli takip veya para cezaları

### Uygun paketleme ve gönderimin avantajları

- Çalışanların, halkın ve çevrenin korunması
- Paketin zamanında yerine ulaşması
- Bir kurye/taşıyıcı bulma olasılığının artması
- Mevzuata uyumluluk

## Tanımlar

Tanımlar Birleşmiş Milletlerin *Model Tüzüğü*nden alınmış olup, aşağıda italik karakterlerle verilmektedir.

### Enfeksiyöz maddeler

*Taşıma amaçları için, patojenleri içerdiği bilinen veya patojenleri içerdiği mantıklı nedenlerle öngörülen maddeler enfeksiyöz maddeler olarak tanımlanmaktadır. İnsanda veya hayvanlarda hastalığa yol açabilen mikroorganizmalar (bakteriler, virüsler, riketsiyalar, parazitler, mantarlar) ve prionlar gibi diğer ajanlar da patojenler olarak tanımlanır.*

Tanım açıkça *istisna* kabul edilenler hariç tüm örnekler için uygulanır (istisnalar için aşağıya bakınız). Taşıma güvenliği önlemleri bağlamında "enfeksiyöz maddeler" ile "enfeksiyöz materyal" aynı anlamda olup, bu Rehberde "enfeksiyöz maddeler" terimi tercih edilmiştir.

### Kültürler

*Kültürler patojenleri çoğaltmak için uygulanan işlemin bir sonucudur. Aşağıda verildiği üzere bu tanım hasta insan ya da hayvan örneklerini içermez.*

Enfeksiyöz maddelerin sınıflandırılmasında bu farklar oldukça önemlidir ve paket seçimini belirlemektedir. Aşağıda "Sınıflandırma" başlığı altında verilecektir.

### Hasta örnekleri

*Hasta örnekleri, araştırma, tanı, inceleme aktiviteleri, hastalık tedavisi ve önlenmesi gibi amaçlarla doğrudan insanlardan ya da hayvanlardan alınmış her türlü çıkartılar, sekresyonlar, kan ve kan ürünleri, dokular ve doku sürüntüleri ya da vücut parçalarını içeren insan ya da hayvan materyalleridir.*

### Biyolojik ürünler

*Biyolojik ürünler, canlı organizmalardan elde edilerek, ulusal otoritenin uygunluk gerekleri doğrultusunda üretilmiş ve piyasaya sürülmüş, özel ruhsatlandırma kurallarına tabi ve insanlarda ya da hayvanlarda hastalıkların önlenmesi, tedavisi veya tanısı amacıyla kullanılan ya da bunların araştırılması ve geliştirilmesi için deneysel çalışmalarda kullanılan ürünlerdir.*

*Bunlar arasında örneğin aşılarda gibi geliştirilmiş veya geliştirilmekte olan ürünler bulunur, fakat bunlarla sınırlı değildir.*

### Genetik olarak modifiye mikroorganizmalar ya da organizmalar

*Genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalar enfeksiyöz madde tanımına girmezler ve Sınıf 9 (çevre için tehlikeli maddeleri de içeren "çeşitli tehlikeli maddeler" sınıfı) içinde sınıflandırılırlar. GMMO ve GDO'lar kaynak, transit ve hedef ülkelerin yetkili makamları tarafından kullanımına yetki verildiği sürece Tehlikeli Maddeler Tüzüğüne (DGR) tabi değildir. Genetiği değiştirilmiş canlı hayvanlar da kalkış ve varış ülkelerinin yetkili makamlarının hüküm ve koşulları altında taşınacaktır.*

### Tıbbî veya klinik atıklar

*Tıbbi veya klinik atıklar hayvanların veya insanların tıbbi tedavisinden ya da biyo-araştırmalardan açığa çıkan atıklardır.*

## Enfeksiyöz Maddelerin Sınıflandırılması

Tehlikeli maddelere, ait oldukları tehlike sınıflamasına ve bileşimine göre "UN numarası" ve "uygun gönderi adı" verilir. Uygun gönderi adları tehlikeli maddeyi ya da materyali açıkça tanımlamak için kullanılmaktadır.

Tehlikeli maddeler 9 sınıf halinde sınıflandırılırlar (*bkz.* Kutu 1) (5).

Enfeksiyöz maddeler 'Tehlikeli Maddeler Sınıflaması'nda Bölüm 6.2'de sınıflandırılmışlardır ve duruma göre UN 2814, UN 2900, UN 3291 veya UN 3373 numaralarını alırlar (4).

Enfeksiyöz madde göndericilerini 'Tehlikeli Maddeler Sınıflaması'ndaki Sınıf 6'dan başka ilgilendiren sınıflar; Sınıf 2, Sınıf 3 ve Sınıf 9'dur (*bkz.* Kutu 2).

Enfeksiyöz madde göndericilerini öncelikle ilgilendiren **Bölüm 6.2** kapsamında da 3 madde sınıfı bulunur (4).

Bunlar basitçe aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Kategori A (Enfeksiyöz maddeler)  
*Örneğin;*  
Ebola virüs  
*Bacillus anthracis* (sadece kültür)
- Kategori B (Biyolojik maddeler)  
*Örneğin;*  
*Bacillus anthracis* (hasta numunesi)  
Yüksek patojen kuş gribi virüsü (hasta numunesi)
- İstisnalar (Muaf insan/hayvan numuneleri)  
*Örneğin;*  
Hamilelik testi  
İlaç taraması vb.  
Testlerde kullanılan antiserumlar  
Tıbbi değerlendirmeye göre patojen varlığına dair gerçekten küçük bir ihtimal olması durumu

### Kutu 1. Tehlikeli Maddelerin Sınıfları

- Sınıf 1 Patlayıcılar
- Sınıf 2 Gazlar
- Sınıf 3 Yanıcı sıvılar
- Sınıf 4 Yanıcı katılar; kendiliğinden yanmaya yatkın maddeler; su ile temas ettiğinde yanıcı gazlar çıkaran maddeler
- Sınıf 5 Oksitleyici maddeler ve organik peroksitler
- Sınıf 6 Toksik ve enfeksiyöz maddeler
- Sınıf 7 Radyoaktif maddeler
- Sınıf 8 Yakıcı maddeler
- Sınıf 9 Çeşitli (miscellaneous) tehlikeli maddeler (çevreye zararlı maddeler de dahil)

### Kutu 2. Enfeksiyöz madde göndericilerini ilgilendiren tehlikeli madde sınıfları

- Sınıf 2 Gazlar
- Sınıf 3 Yanıcı sıvılar  
Etanol (saklama amaçlı)
- Sınıf 6 Toksik ve enfeksiyöz maddeler  
Bölüm 6.1 Toksik maddeler  
**Bölüm 6.2 Enfeksiyöz maddeler**
- Sınıf 9 Çeşitli (miscellaneous) tehlikeli maddeler ve ürünler (çevreye zararlı maddeler de dahil)  
Kuru buz (soğutma)  
(6.2 kapsamında sınıflanmayan)  
Genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalar ve organizmalar

Aşağıdaki kısımlarda Bölüm 6.2 kapsamındaki bu kategoriler yakından incelenecektir



## Kategori A

*Transportu esnasında maruz kalındığı takdirde, sağlıklı insanlarda veya hayvanlarda kalıcı sakatlığa ya da hayatı tehdit eden veya öldürücü hastalığa neden olabilecek formdaki bir enfeksiyöz maddedir. Bu kriterleri karşılayan maddelerin belirleyici örnekleri Ek-2'deki tabloda verilmiştir.*

*NOT: Maruziyet, enfeksiyöz madde koruyucu paketin dışına sızdığı takdirde, insanların veya hayvanların fiziksel teması sonucu meydana gelir.*

- (a) bu kriterlere karşılık gelen, insanlarda veya **hem insanlarda hem de hayvanlarda** hastalığa neden olan enfeksiyöz maddeler Birleşmiş Milletler numarası UN 2814 ile işaretlenecektir. **Sadece hayvanlarda** hastalığa neden olan enfeksiyöz maddeler UN 2900 ile işaretlenecektir.
- (b) UN 2814 veya UN 2900 şeklinde işaretleme kaynak insan veya hayvanın bilinen tıbbî öyküsüne ve semptomlarına, yerel endemik duruma ya da kaynak insan veya hayvana özgü durumun profesyonel yorumuna dayalı olacaktır.

*NOT 1: UN 2814 için 'uygun gönderi adı' ENFEKSİYÖZ MADDE, İNSANLARI ETKİLER (INFECTIOUS SUBSTANCE, AFFECTING HUMANS) olacaktır. UN 2900 için 'uygun gönderi adı' ENFEKSİYÖZ MADDE, sadece HAYVANLARI ETKİLER (INFECTIOUS SUBSTANCE, AFFECTING ANIMALS only) olacaktır.*

*NOT 2: Ek-2'de verilen tablo kapsamlı değildir. Tabloda verilmemiş olan, fakat anılan kriterleri karşılayan yeni veya yeniden önem kazanmış patojenleri içeren enfeksiyöz maddeler de Kategori A olarak işlem görecektir. Ek olarak, bu kriterlere karşılık gelip gelmediğine dair eğer bir şüphe varsa madde Kategori A'ya dahil edilecektir.*

## Kategori B

*Kategori A'da olmak için gerekli kriterleri karşılamayan bir enfeksiyöz maddedir. Kategori B'deki bir enfeksiyöz madde UN 3373 ile işaretlenecektir.*

*NOT: UN 3373 için 'uygun gönderi adı' BİYOLOJİK MADDE, KATEGORİ B (BIOLOGICAL SUBSTANCE, CATEGORY B) şeklindedir.*

## İstisnalar (Muaf maddeler)

"İstisnalar (Muaf maddeler)" kategorisi, tehlikeli madde düzenlemeleri ve gerekleri kapsamına girmeyen türden biyolojik maddelerle ilgili hususları düzenler. Bunlar genellikle enfeksiyöz maddeleri içermeyen veya mikroorganizmaları içerseler bile insanlarda ya da hayvanlarda hastalığa neden olma olasılığı bulunmayan maddelerdir (bkz. Tablo 1) (4).

Tablo incelendiğinde 8. sıradaki ifadenin diğerlerinden biraz farklı olduğu dikkati çekecektir. Burada bir 'madde'nin "muaf" olup olmadığını belirlemek için bir profesyonel (tıbbi) karar unsuru da gereklidir. 'Karar'ın özelliği ise, kaynağın (insan veya hayvan) bilinen tıbbi öyküsü, semptomları ve bireysel koşulları ile

yerel endemik duruma dayanmasıdır (4). Anlamını açmak gerekirse; *ifadenin* kapsamına giren maddeler esasen enfeksiyöz hastalık harici (veya enfeksiyöz hastalık olasılığı harici) durumlarda alınmış bütün klinik örneklerdir. Buna dayanarak taşınabilecek maddeler (örnekler) için fikir verecek bir liste ise şu şekilde olabilir:

- kolesterol düzeylerini, kan glikoz düzeylerini, hormon düzeylerini veya prostat spesifik antijeni (PSA) izlemek için kan veya idrar testleri örnekleri;
- insanlar veya hayvanlar için enfeksiyöz olmayan hastalıkların araştırılması veya terapötik ilaç izleme amacıyla kalp, karaciğer veya böbrek fonksiyonları gibi organ işlevlerini izlemeyi gerektiren durumlar için örnekler;
- sigorta veya iş başvurusu amaçları için testler örnekler;
- uyuşturucu ya da alkol varlığını belirlemek için testler;
- gebelik testi;
- kanser araştırmak için biyopsi;
- insanlarda veya hayvanlarda enfeksiyon yokken yapılan antikor aranması testleri (ör., aşya bağlı bağışıklık durumunun araştırılması, otoimmün hastalığın teşhisi vb.)

**Tablo 1.** Tehlikeli madde düzenlemeleri ve gerekleri kapsamına girmeyen türden biyolojik maddelerle ilgili hususları kapsayan "İstisnalar" kategorisi.

İstisnalar (Muaf maddeler)	Yorum
1. Enfeksiyöz madde içermeyen ya da insanlarda ya da hayvanlarda hastalık yapması olası olmayan maddeler	Bu "İstisnalar" için herhangi bir paketleme gerekliliği YOKtur.
2. İnsanlarda ya da hayvanlarda patojenik olmayan mikroorganizmaları içeren maddeler	
3. İçindeki bütün patojenlerin herhangi bir sağlık riski oluşturmayacak şekilde nötralize ya da inaktive edildiği maddeler	
4. Büyük oranda bir enfeksiyon riski oluşturmadığı düşünülen (gıda ve su örnekleri de dahil olmak üzere) çevresel örnekler	
5. Kurutulmuş kan spotları ve dışkıda gizli kan tarama testleri	
6. Transfüzyon amaçlı ya da transfüzyon ya da transplantasyonda kullanılacak kan ürünlerinin hazırlanması amacıyla toplanmış kan ve/veya kan bileşenleri ve transplantasyonda kullanılması amaçlanan her türlü doku ya da organ	
7. Dekontamine edilmiş tıbbi ya da klinik atıklar	
8. Patojenlerin varlığına yönelik küçük de olsa bir olasılık olduğuna dair profesyonel bir görüş*	<b>Üçlü paketleme</b>

\* özelliği itibariyle tehlikeli madde düzenlemelerine girmeyen insan veya hayvan numuneleri (klinik örnekler) minimal de olsa patojen taşıma olasılığı nedeniyle temel sızdırmaz "üçlü paketleme" gerektirir.

## ÖZET NOTLAR

### Kategori A için

**'uygun gönderi adı' ve UN numaraları nelerdir?**

### Kategori A, enfeksiyöz maddeler



NOT: Kategori A zoonotik maddeler (insanları ve hayvanları etkileyen patojenler) UN 2814'e dahildir.

### Kategori B için

**'uygun gönderi adı' ve UN numaraları nelerdir?**

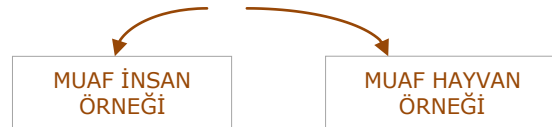
### Kategori B, biyolojik maddeler



**İstisnalar (Muaf) sınıfı için UN numarası ve 'uygun gönderi adı' var mıdır?**

### İstisna (Muaf) sınıfı maddeler

- Tablo-1'de verilen ilk 7 istisna durum için herhangi bir paketleme gerekliliği YOKtur!
- 8. maddeye giren durumlarda ise örnekler 3'lü paketleme ile gönderilir.
  - UN numarası yoktur!
  - Uygun gönderi adı örneğin insana veya hayvana ait olmasına göre:



\* Uygun gönderi adı yazılırken aradaki virgül unutulmamalıdır! Uluslararası gönderilerde uygun gönderi adı İngilizce yazılmalıdır; yine aradaki virgül unutulmamalıdır!

# Gönderilerin Taşımaya Hazırlanması

## Genel Hususlar

Kategori A enfeksiyöz maddelerin (UN 2814 ve UN 2900) ve Kategori B enfeksiyöz maddelerin (BM 3373) yarattığı tehlikeler farklı olduklarından dolayı, bu iki kategori için paketleme, etiketleme ve dokümantasyon gereksinimleri arasında farklılıklar vardır.

Paketleme gereklilikleri UNCETDG tarafından tanımlanır ve Paketleme Talimatları P620 ve P650 olarak yayınlanır (Laboratuvarların örnek gönderimi sırasında ihtiyaç duyabilecekleri ayrıntılar için *bkz.* 4 no.lu Kaynak).

Değişiklik gereksinimleri ve düzenli güncellemeler belirtilen Komite tarafından yapılmaktadır. Güncel paketleme şartları aşağıdaki bölümlerde verilmektedir.

NOT: Enfeksiyöz maddeler içeren iç paketlerin ilgisiz maddeler içeren iç paketlerle bir araya konmasına izin verilmez.

Enfeksiyöz madde gönderenler paketin, taşıma sırasında insanlar veya hayvanlar için hiçbir tehlike yaratmayacak ve hedeflerine iyi durumda varacak şekilde hazırlanmasını sağlayacaklardır.

**ÖNEMLİ UYARI!** *Kategori A ve Kategori B enfeksiyöz maddelerin elde taşınması veya bu materyalin diplomatik bagaj içinde taşınması uluslararası havayolu taşıyıcıları tarafından kesinlikle yasaklanmıştır (4).*

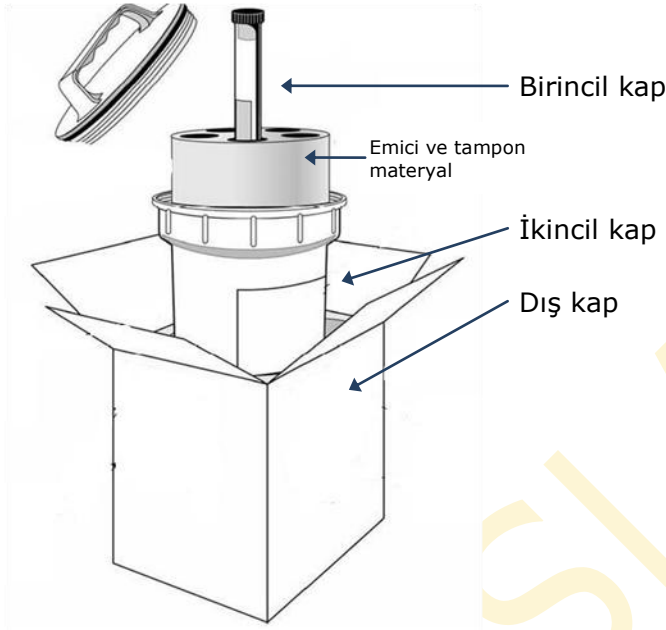
### ÖNEMLİ!

*Enfeksiyöz madde **gönderenler** paketin, taşıma sırasında insanlar veya hayvanlar için hiçbir tehlike yaratmayacak ve hedeflerine iyi durumda varacak şekilde hazırlanmasını sağlamakla yükümlüdürler!*

## Temel "Üçlü Paketleme" sistemi

Bu paketleme sistemi bütün enfeksiyöz maddeler için kullanılacaktır.

Üçlü paketleme gönderilen maddeyi korumak için üç ayrı muhafaza katmanı içerir. Bu katmanlar birincil, ikincil ve dış kaplardan oluşur (bkz. Şekil 1):



**Birincil kap,** örneği içeren birincil su geçirmez, sızdırmaz kaptır. Kap kırılma veya sızıntı durumunda tüm sıvıyı emmek için yeterli emici malzeme ile paketlenir.

**İkincil kap,** birincil kabı içine alan ve koruyan dayanıklı, su geçirmez, sızdırmaz kaptır. Birden fazla birincil kap bir ikincil kap içine yerleştirilebilir. Ancak, kırılma veya sızıntı durumunda tüm sıvıyı emmeye yetecek kadar ek emici malzeme kullanılmalıdır.

**Dış kap.** Nakliye için ikincil kap bir üçüncü (dış) kabın ya da ambalajın içine yerleştirilir. Bu gönderinin en dış katmanıdır ve içeriğini taşıma esnasındaki olası fiziksel hasar gibi dış etkilerden korur. Kabul edilebilir en küçük dış boyutları 10 x 10 cm olacaktır.

**Şekil 1.** Temel üçlü paketleme sistemi.

Her tamamlanmış paket normalde doğru işaretlenmiş, etiketlenmiş ve (geçerliyse) uygun nakliye belgeleri doldurulmuş olmalıdır. Bu özellikler için şartlar, aşağıdaki bölümlerde tarif edilmektedir.

## Kategori A Paketleme Gereklilikleri

### Paketleme

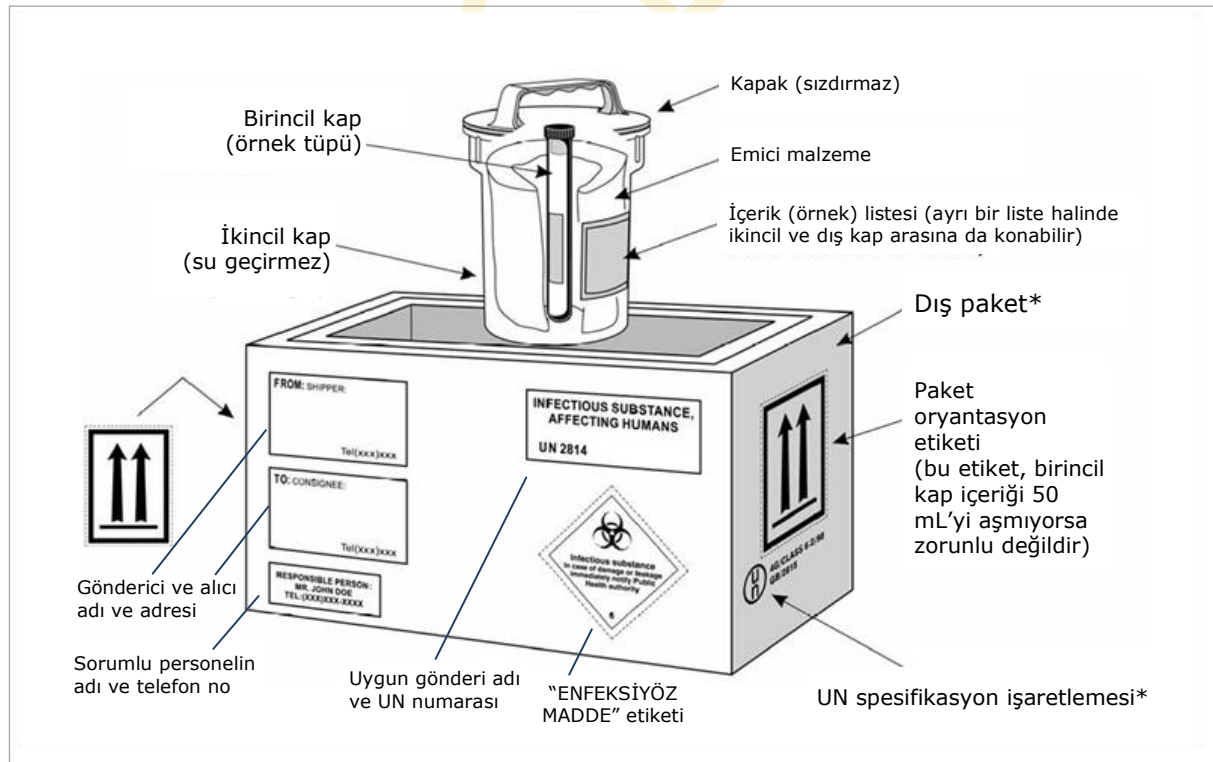
Kategori A'ya giren enfeksiyöz maddeler **sadece** Birleşmiş Milletler sınıf 6.2 spesifikasyonlarını karşılayan ve Paketleme Talimatı P620 ile uyumlu ambalajı içinde sevk edilebilir (Paket Talimatı P620 için *bkz.* Kaynak 4). Bu şart, paket için sıkı **performans kriterlerinin** yerine getirilmesini zorunlu kılar.

#### Performans kriterleri

Paketin performans kriterlerini karşılayıp karşılamadığını ortaya koyan testler testler; 95 kPa'da basınç testi, 9 metreden düşme testi, 7 kg'da delinme testi ve istifleme testini içerir.

Dış paket, paketin yetkili makamı ikna edecek performans testlerini geçtiğini gösteren Birleşmiş Milletlerin (UN) spesifikasyon işaretlemesini (UN specification marking) taşıyacaktır (*bkz.* Şekil 2).

Birincil ya da ikincil kap en az 95 kPa basınç farkına karşı koruyabilecek özellikte olacaktır. Tek başına UN spesifikasyon işaretlemesi, ambalajın bunun için bir testten geçirildiğini olduğunu göstermez; kullanıcılar, tamamlanmış bir paketin bu gereksinimi karşılar özellikte olup olmadığını tedarikçiye sormalıdır.



**Şekil 2.** Kategori A enfeksiyöz maddelerin paketlenmesi ve etiketlenmesi için bir 3'lü paketleme örneği (Şekil, Kaynak 4'ten alınmıştır)

Dünya genelinde "Paket Talimatı P620" ile uyumlu ambalaj üretebilen çok sayıda tedarikçi mevcut değildir. Ancak internet üzerinden uygun bir ulusal veya uluslararası arama motoru ile ve anahtar sözcükler olarak 'UN packaging' ya da 'UN infectious substance packaging' ifadeleri kullanılarak gerekli bilgilere ulaşılabılır (ayrıca bkz. Kutu 3).

### Taşınabilir miktar

Yüzey ulaşımında (kara, demiryolu, deniz) paket başına maksimum miktar sınırlaması yoktur.

Ancak havayolu taşımacılığında paket başına miktar sınırlamaları aşağıdaki gibidir:

- yolcu uçağı için 50 mL veya 50 g
- kargo uçakları için 4 litre veya 4 kg

50 mL'den fazla kapasiteli herhangi bir birinci kabı içeren paketlerin kapaklar yukarı gelecek şekilde taşınması gerektiği dış ambalajın üzerinde gösterilecektir. Oryantasyon etiketleri ("UP" okları) dış ambalajın iki zıt tarafına yapıştırılmış olacaktır.

## İşaretleme

Paketler; paketin içeriği ve tehlikenin doğası hakkında bilgi sağlamak üzere ve uygulanan ambalaj standartlarını ifade etmek için işaretlenir (bkz. Şekil 2).

Paketler veya üst ambalajların (birden fazla paketi içeren ambalaj; 'overpacks') tüm işaretleri açıkça görülebilir olacak; bu işaretler başka herhangi bir etiket veya işaretle üst üste gelmeyecek şekilde yerleştirileceklerdir. Her paket, dış ambalaj veya üst ambalaj ('overpacks') üzerinde aşağıdaki bilgileri göstermelidir:

- Göndericinin adı ve adresi
- Sorumlu kişinin adı ve telefon numarası (sorumlu kişi aynı zamanda gönderi hakkında gerekli bilimsel ve teknik bilgiye sahip olmalıdır)
- Alıcının adı ve adresi
- UN numarası ve bunu takip edecek şekilde 'uygun gönderi adı' (UN 2814 "ENFEKSİYÖZ MADDE, İNSANLARI ETKİLER" veya UN 2900 "ENFEKSİYÖZ MADDE, sadece HAYVANLARI ETKİLER" gibi ve içeriğe uygun olarak). Teknik isimlerin paketin üzerine yazılması gerekmez.
- Depolama için sıcaklık gereksinimleri (isteğe bağlı)
- Kuru buz veya sıvı azot kullanıldığında: soğutucunun teknik adı, uygun UN numarası ve net miktar

### Kutu 3. "Paket Talimatı P620" özelliklerine sahip paketi nasıl temin edebilirsiniz?

- Türkiye'de de oldukça az sayıda oluşu tahmin edilmektedir.
- Son yıllarda Sağlık Bakanlığı THSK, illerin Halk Sağlığı Müdürlüklerine UN spesifikasyon işaretlemesine sahip (UN kriterlerini karşılayan) paketler/kaplar temin etmektedir.
- Laboratuvarların ihtiyaç halinde İl Halk Sağlığı Müdürlüğü ile temasa geçmeleri önerilir.
- Paketler tekrar kullanıma uygundur.

## Etiketleme

İki etiket türü vardır:

- (a) tehlike etiketleri – bunlar tüm sınıflarda en tehlikeli maddeler için gerekli olan etiketlerdir ve 45° açıyla yerleştirilmiş kare şeklindedir ('diamond-shaped')
- (b) kullanım etiketleri - bazı tehlikeli maddeler için gereklidir; çeşitli şekillerde olabilir; tehlike etiketlerine ek olarak ya da tek başına kullanılır.

Özel tehlike etiket(ler)i gönderilecek her türlü tehlikeli madde için (özellikle muaf tutulmadığı sürece) her paketin dış yüzeyine yapıştırılacaktır.

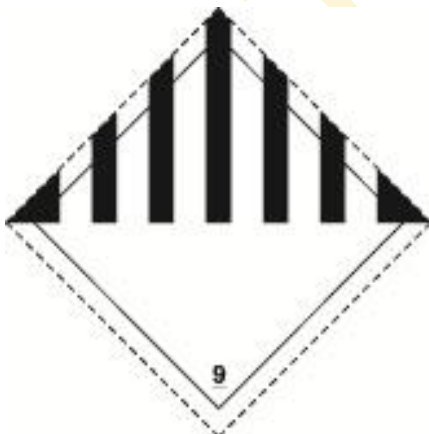
Kategori A enfeksiyöz maddeler için önem taşıyan etiketler aşağıda verilmektedir:



Etiket adı	Enfeksiyöz madde
Asgari boyut	50 × 50 mm
Bir paket üzerindeki etiket sayısı	1
Renk	Siyah ve beyaz

"ENFEKSİYÖZ MADDE" ifadesi yazılı olmalıdır. Bazı ülkelerin mevzuatına göre, "hasar veya sızıntı durumunda derhal bir Halk Sağlığı Kurumuna bildirin" ifadesi de burada yer alır.

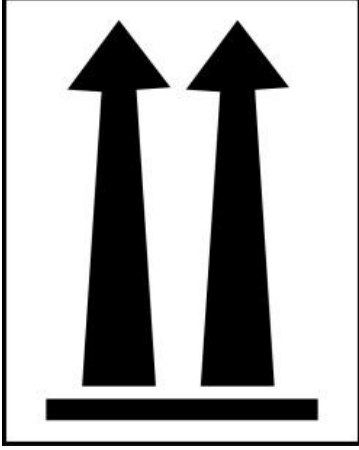
**Şekil 3.** Kategori A enfeksiyöz maddeler için tehlike etiketi (Bir GMMO veya GMO eğer Kategori A tanımını karşılıyorsa o zaman da kullanılır)



Etiket adı	Çeşitli tehlikeli maddeler
Asgari boyut	50 × 50 mm
Bir paket üzerindeki etiket sayısı	1
Renk	Siyah ve beyaz

**Şekil 4.** Bu tehlike etiketi bazı non-enfeksiyöz GMMO/GMO (UN 3245) veya kuru buz (katı CO<sub>2</sub>) (UN 1845) içeren paketler içindir. Maddeler kuru buz ile birlikte paketlenildiğinde primer tehlike için yapıştırılmış etikete (ör., Kategori A enfeksiyöz maddeler için Şekil 3'te gösterilen; Kategori B enfeksiyöz maddeler için Şekil 7'de gösterilen etikete) ilave olarak bu etiketi de göstermek zorundadırlar.





Etiket adı	Oryantasyon etiketi
Asgari boyut	Standart A7: 74 × 105 mm
Bir paket üzerindeki etiket sayısı	2 adet, karşı yüzlere olacak şekilde
Renk	Siyah ve beyaz veya kırmızı ve beyaz

**Şekil 5.** Oryantasyon etiketi birincil kapların kapak konumlarını belirtmek içindir. Havayolu ile taşımada, bir **sıvı** Kategori A enfeksiyöz maddenin birincil kap(lar) içindeki miktarı (toplam) 50 mL'yi aştığı durumda dış paketin üzerine iki karşılıklı yüze bu etiket, oklar doğru yönü gösterecek şekilde -ve Şekil 3'te verilen etikete ek olarak- yapıştırılacaktır

Enfeksiyöz madde sıvı nitrojende gönderilebilir. Bazı durumlarda da birden fazla enfeksiyöz madde paketi bir büyük ambalaj içine konarak gönderilmek istenebilir. Sıvı nitrojen tehlike ve kullanma etiketleri ile üst ambalajların ('overpacks') etiketlenmesi kuralları için Kaynak 4'e başvurulmalıdır.

## Dokümantasyon

Hazırlanan paketi gönderebilmek için nakliye belgeleri gereklidir.

*Gönderici tarafından hazırlanacak ve imzalanacak belgeler:*

- Havayolu için - *Tehlikeli Madde Deklarasyon* belgesi (bkz. Ek-3)
- Bir paket listesi / proforma fatura (alıcının adresi, paket sayısı, içindekilerin detayı, ağırlığı ve değerini<sup>†</sup> içeren)
- Gerekirse, bir ithalat ve/veya ihracat izni ve/veya beyanı

*Gönderici veya göndericinin kurumu tarafından hazırlanacak belgeler:*

- Havayolu taşımacılığı için bir hava irsaliyesi ('airway bill') veya karayolu, demiryolu ve denizyolu ile taşınacak paketler için eşdeğer belgeler.

*UN 2814 ve UN 2900 için, içeriğin ayrıntılı bir listesi ikincil kap ve dış kap arasına kapalı bir zarf ile konmuş olacaktır.*

*Dokümantasyon amaçları için, 'uygun gönderi adının yanı sıra içeriğin teknik adı da -belgelerin ilgili kısımlarına- yazılacaktır. Teknik adın paketin üzerinde gösterilmesine gerek yoktur.*

*Taşınacak enfeksiyöz maddelerin ne olduğu bilinmiyor, ancak Kategori A'ya girme kriterlerini karşıladığı düşünülüyorsa, uygun UN 2814 veya UN 2900 numarası verildikten başka, -dış ambalaj üzerinde değil fakat- taşıma belgesi üzerinde uygun gönderi adını, parantez içinde "şüpheli Kategori A enfeksiyöz madde" kelimeleri takip edecektir.*

<sup>†</sup> Uluslararası taşımacılıkta, eğer paket içindeki ücretsiz temin edilen bir şey ise, gümrük amaçları için minimal bir değer belirtilmesi gerekmektedir.

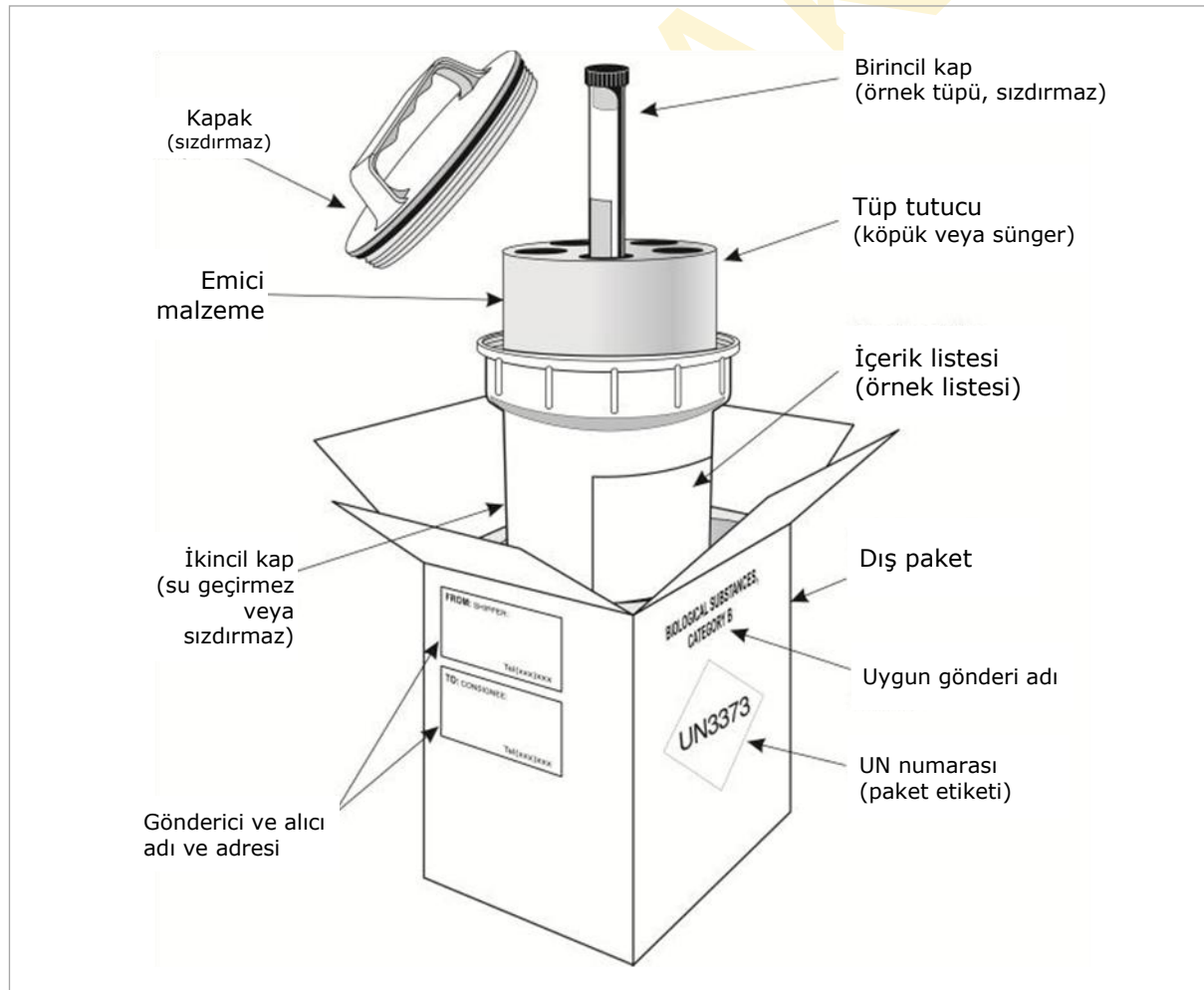
## Kategori B Paketleme Gereklilikleri

### Paketleme

Kategori B enfeksiyöz maddeler, Kategori A'ya girmeyen patojen mikroorganizma kültürlerini ve bir patojen içerdiğinden şüphelenilen tanı ya da araştırma amaçlı klinik örnekleri içerir ve "BİYOLOJİK MADDE" olarak adlandırılır. Burada da, kara ve deniz taşıma yolları dahil, "üçlü paketleme sistemi" kullanılacaktır. Ancak, paket için performans testi belgeleri gerekmemektedir.

Paket, Paket Talimatı P650 gereklerine (bkz. Kaynak 4) tam olarak uymak koşuluyla yerel tedarikçilerce temin edilebilir; başka bir koşul yoktur (Şekil 6).

Paketin (gerektiğinde hastanın kendisi gibi, profesyonel olmayan kişilerce de) doğru bir şekilde hazırlanabilmesi amacıyla üretici veya dağıtıcı firma, paketin nasıl hazırlanacağına dair bir talimatnameyi de paketle birlikte temin etmelidir.



**Şekil 6.** Kategori B enfeksiyöz maddelerin paketlenmesi ve etiketlenmesi için bir 3'lü paketleme örneği (Şekil, Kaynak 4'ten alınmıştır).

### Taşınabilir miktar

Yüzey ulaşımında (kara, demiryolu, deniz) paket başına maksimum miktar sınırlaması yoktur.

Ancak havayolunda paket başına miktar sınırlamaları aşağıdaki gibidir:

- (sıvılar için) birincil kap 1 litreyi geçemez ve bir dış paket fazla 4 litre içerebilir
- (katılar için) vücut parçaları, organlar ya da bütün bedeni içeren paketler dışında, dış paket 4 kg'dan fazla madde içeremez.

### İşaretleme

Her paket aşağıdaki bilgileri içerecektir:

- Havayolu için - Göndericinin adı, adresi ve telefon numarası
- Alıcının adı, adresi ve telefon numarası
- 'uygun gönderi adı' ("BİYOLOJİK MADDE, KATEGORİ B") ve bunun yanına Şekil 7'de gösterilen işaret (UN 3373 numarasını taşıyan işaret)
- Depolama için sıcaklık gereksinimleri (isteğe bağlı)
- Havayolu için - Kuru buz kullanıldığında: soğutucunun teknik adı, uygun UN numarası ve net miktar (bkz. Şekil 4) (NOT: Kuru buz veya sıvı azot kullanımının detayları için ayrıca bkz. Kaynak 4).

Kategori B enfeksiyöz maddelerin taşınmasında Şekil 7'de verilen işaret kullanılır.



Asgari boyut - kareyi oluşturan çizgi en az 2 mm kalınlığında ve harfler ile rakamlar en az 6 mm yüksekliğinde olmalıdır. Havayolu taşımacılığı için, karenin tam boyutu en az 50 × 50 mm olmalıdır

Renk - belirli bir renk belirtilmemiştir, ancak işaret dış paketin yüzeyinde, zemin rengine kontrast, açıkça görünür ve okunaklı olmalıdır.

"BİYOLOJİK MADDE, KATEGORİ B" kelimelerinin harfleri en az 6 mm yüksekliğinde olmalı ve bu işaretin yanında gösterilmelidir.

**Şekil 7.** Kategori B enfeksiyöz maddeler için işaretleme.

### Dokümantasyon

Kategori B enfeksiyöz maddeler için tehlikeli maddeler dokümantasyonu (göndericinin deklarasyonu vb.) gerekli değildir. Aşağıda verilen nakliye belgeleri gereklidir.

Gönderici tarafından hazırlanacak ve imzalanacak belgeler:

- Uluslararası gönderiler için – alıcının ve göndericinin adresleri, paket sayısı, içindekilerin detayı, ağırlığı ve değerini içeren bir paket listesi/proforma fatura (NOT: Eğer taşınan madde ücretsiz ise "hiçbir ticari değeri yoktur" ['no commercial value'] ifadesi görünür olacaktır).
- Gerekliyse, bir ithalat ve/veya ihracat izni ve/veya beyanı

Gönderici veya göndericinin kurumu tarafından hazırlanacak belgeler:

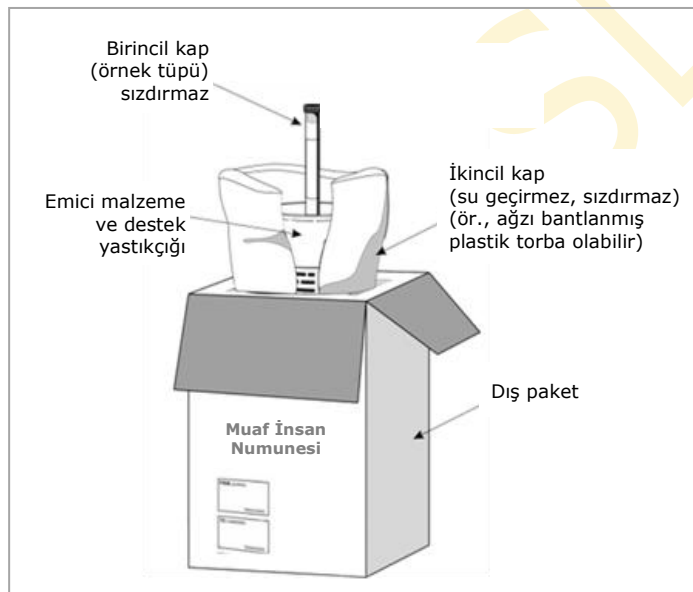
- Havayolu taşımacılığı için bir hava irsaliyesi ('airway bill') veya karayolu, demiryolu ve denizyolu ile taşınacak paketler için eşdeğer belgeler.

Paketleme amaçları için enfeksiyöz maddelerin ve hasta örneklerinin sınıflandırılmasına bir akış şeması Ek-4'de verilmiştir.

Kategori A ve Kategori B ile "muaf" örnek paketlerinde kullanılacak etiket ve işaretlemeler bir arada Ek-5'de verilmiştir

## Diğer Gereklilikler ve Hususlar

### Muaf insan/hayvan örneklerinin paketlenmesi



Muaf insan/hayvan örnekleri de üçlü paketleme ile gönderilir (bkz. Şekil 8)

İkincil kap sızdırmazlık sağlanacak şekilde bantlanmış bir plastik torba olabilir. Dış paket yeterince sağlam olmalı; üzerinde gönderici ve alıcı adı ve adres bilgilerinden başka sadece "Muaf İnsan/Hayvan Örneği" ("Exempt Human/Animal Specimen") yazılı olmalıdır.

**Şekil 8.** "Muaf İnsan/Hayvan Örneği" için üçlü paketleme (yanda).

## Üst ambalaj ('overpack')

Tek bir gönderici tarafından aynı hedefe gönderilmek üzere birkaç paket bir araya getirilerek bir büyük paket oluşturulduğunda "üst ambalaj (overpack)" terimi kullanılır. İçeriği korumak için soğutucu kullanıldığı zaman üst ambalaj yalıtılmış kapları ya da termosları içerebilir.

Bir üst ambalaj kullanıldığı zaman, paketler üzerinde gösterilen gerekli işaretler ve etiketlerin üst ambalajın en dış tabakası üzerinde de tekrarlanması gerekir. Bu gereklilik Kategori A ve B enfeksiyöz maddeler için geçerlidir. Üst ambalajların üzerinin ayrıca 'overpack' kelimesi ile işaretlenmiş olması gerekmektedir.

NOT: Sadece UN spesifikasyon işareti üst ambalaj üzerinde tekrar gösterilmez!

## Paketleme materyalinin tekrar kullanımı

Gönderi paketleri yeniden kullanılabilir. Gönderici bir paketi yeniden kullanmayı planlıyorsa, paket mutlaka uygun şekilde dezenfekte edilmelidir. Gönderici, bir paketi tekrar kullanmadan önce üzerindeki tüm işaret ve etiketlerin şimdi göndermek istediği maddenin gereklerini yansıttığından emin olmalıdır. Eğer gönderici bir boş paket göndermeyi planlıyorsa, üzerindeki tüm -uygulanabilir olmayan- etiket ve işaretlemeler kaldırılmalı veya kapatılmalıdır.

## Boş paketin geri gönderilmesi

Boş bir paket göndericiye veya başka bir yere gönderilmeden önce, olası bir kontaminasyon için uygun şekilde dezenfekte veya sterilize edilmelidir. Enfeksiyöz madde içeriği ile ilgili herhangi bir etiket veya işaretlemeler (varsa) kaldırılmalı veya kaplanmalıdır.

## Soğutucular

Kategori A ve B enfeksiyöz maddeleri taşınma esnasında stabilize etmek için soğutucuların kullanılması gerekebilir. Soğutma gerektiren enfeksiyöz maddeler paketlenirken P620 veya P650 Paket Talimatlarında belirtilen gereksinimleri karşılamak zorundadırlar. Soğutucu kullanılırken dikkat edilecek başlıca hususlar aşağıda sıralanmıştır:

- Buz, buz pedleri veya kuru buz, ikincil kap ve dış kap arasına veya çoklu paket için üst ambalaj yapılmış ise dış paketler ve üst ambalaj arasına konur.
- Islak buz sızdırmaz bir kaptaki konur; dış veya üst paket de sızdırmaz olmalıdır.
- Kuru buz sıvı faza geçmeden çok hızla buharlaşabilen bir maddedir. Eğer çıkan CO<sub>2</sub> gazının salınmasına izin vermeyecek şekilde sızdırmaz bir kaba konmuşsa **patlama riski** vardır. Bu nedenle kuru buz kesinlikle birincil ya da ikincil kap içine konmamalıdır. Kuru buz kullanıldığında paketleme CO<sub>2</sub> gazının serbest kalmasına izin vermelidir. Kuru buz için özel olarak tasarlanmış yalıtılmış paket kullanılabilir. Ambalaj talimatı P003'e (ICAO/IATA PI954) uyulur.
- İkinci kap dış kabın içine, buz veya kuru buz eridiğinde oluşacak boşluğun içinde konumu bozulmayacak şekilde, güvenli yerleştirilmiş olmalıdır.
- Eğer bir Kategori A enfeksiyöz madde gönderisi için kuru buz kullanılacaksa detaylar gönderici *tehlikeli madde deklarasyon formunda* da yazılmış olacaktır. Eğer bir Kategori B enfeksiyöz madde veya "Muaf" örnek gönderisi ile kuru buz kullanılacaksa, bunlarda *tehlikeli madde deklarasyon formu* gerekmez.

- Ancak her durumda en dış paketin üzerinde kuru buz tehlike etiketi (*bkz.* Şekil 4) ile UN numarası ve 'uygun gönderi adı' ve kuru buz ifadesini takip eden "AS COOLANT" ("soğutucu olarak") kelimelerini ve kilogram olarak kuru buzun net miktarını gösteren de dahil olmak üzere uygun işaretler yapıştırılmış olacaktır. Şekil 9'da kuru buz içeren paketlerde kullanılması gereken etiket ve işaretlemeler özetlenmiştir.

NOT: Kuru buz veya sıvı azot kullanımının detayları için ayrıca *bkz.* Kaynak 4.



**Şekil 9.** Katı karbon dioksit (kuru buz) içeren donmuş gönderimlerin işaretlenmesi ve etiketlenmesi  
Gönderim sürecinde paketle teması olabilecek kişiler için kuru buz içeren paketler uygun biçimde işaretlenmeli ve etiketlenmelidir.

## Eğitim

Tehlikeli Maddeler Tüzüğü (DGR) taşıma süreçlerine dahil tüm personelin uygun eğitimleri almasını gerektirir.

Kategori A enfeksiyöz maddeler sadece yetkili yapıların kurslarından (onaylı kurslar; DSÖ vb.) **eğitim almış** ve sınavlarından geçmiş personel tarafından paketlenabilir, gönderilebilir (4).

Kategori B enfeksiyöz maddelerin paketlenmesi ve gönderilmesi için kullanıcıya paketin hazırlanması ile ilgili açıklayıcı talimat dokümanları (kullanma kılavuzu) verilir; bu, bu maddelerin taşınması için yeterli "eğitim" olarak kabul edilir (4). Ancak, bu tür örnekler diğer tehlikeli maddeler (*ör.*, yanıcı sıvılar, radyoaktif maddeler, sıvılaştırılmış gazlar, vb.) ile birlikte gönderilmesi gerekiyorsa, bu durumda personel uygun prosedürler konusunda eğitilmelidir.

Eğitim ve farkındalık Kategori B enfeksiyöz maddelerin taşınmasında görev alan tüm personel için de önemlidir.

Sadece uygun rehberlik ve eğitim yoluyla göndericilerin, sevk edilecek maddeyi doğru sınıflandırması ve uygun paketi seçip hazırlaması sağlanabilir. Taşıma sektörünün işverenleri de personelin enfeksiyöz maddeleri içeren paketleri tanıma ve kullanımı için uygun prosedürler konusunda ve dökülmelerde ne yapacakları ya da kendilerini nasıl koruyacakları konusunda eğitimlerini sağlamalıdır.

## Taşıma planı

Enfeksiyöz maddelerin doğru sınıflandırılması, paketleme, etiketleme ve taşıma için gerekli tüm belgeleri sağlamak göndericinin sorumluluğundadır.

Enfeksiyöz maddelerin düzgün taşınması (paketin güvenli, zamanında ve iyi durumda varması) gönderici, taşıyıcı ve alıcı arasında iyi bir işbirliği gerektirir. Bu işbirliği üç taraf arasında iyi bir çalışma ilişkisine ve etkili iletişime bağlıdır.

Tehlikeli olsun, olmasın, herhangi bir maddenin taşınması, taşıyıcı açısından ticari bir meseledir. Birleşmiş Milletlerce tehlikeli maddeler için tanımlanmış kurallar hükümetlerin mevzuat gereksinimlerini yansıtır. Nitekim UN Model Tüzükleri farklı ülkelerde yerel farklarla uygulanıyor olabilir. Ayrıca, bir malı taşımak istemeyen bir taşıyıcı bunu yapmak için herhangi bir yasal yükümlülük altında değildir.

Birçok taşıyıcı (havayolu, TIR'lar ve deniz nakliyesi) "özel şirket"tirler ve malların taşınmasını reddetme veya ilave gereklilikler ekleme hakkına sahiptirler. Nitekim son yıllarda belirli malları taşımayı reddeden veya yeni koşullar ekleyen bazı firmalar ortaya çıkmıştır. Bu koşullar yasal gerekliliklere çelişmediği gibi bu tür eylemler de yasadışı değildir.

Havayollarında yürürlükte olan ana taşıyıcı kısıtlamaları ICAO ve IATA tarafından listelenir. Bazı havayolları kesinlikle tehlikeli madde taşımazken, diğer bazıları da belli sınırlar içinde taşırlar. Farklı taşıma modları için taşıyıcı kısıtlamaları merkezi olarak yayınlanmadığından paydaşlar arasında uyum esastır. Başarılı bir taşıma sağlanmasında gönderici, taşıyıcı ve alıcının belirli sorumlulukları vardır.

### Göndericinin sorumlulukları

- Alıcı ile önceden görüşüp ayarlama yapmak; ithalat/ihracat iznine gerek olup olmadığı dahil,
- Taşıyıcı ile önceden görüşerek, gönderinin taşıma için kabul edilmesini ve (mümkünse) en kestirme yoldan gitmesini sağlamak
- Gerekli belgeleri hazırlamak (izin, gönderi ve nakliye belgeleri dahil)
- Paketi gönderir göndermez alıcıya tahmini varış zamanını haber vermek.

### Taşıyıcının sorumlulukları

- Göndericiye nakliye belgelerinin doldurulmasına ilişkin tavsiyede bulunmak
- Göndericiye doğru paketleme hakkında tavsiyede bulunmak
- Paketin en kestirme yoldan gitmesini sağlamak için göndericiye yardım etmek ve yolu konfirme etmek
- Gönderi ve nakliye belgelerini korumak ve arşivlemek

### Alıcının sorumlulukları

- Paketin kabulü (ithalatı) için ulusal makamlardan gerekli izin(ler)i almak.
- Göndericiye, ulusal makamlarca gerek duyulan ithalat izni, yetki mektubu ya da gerekli diğer belgeleri sağlamak
- Paketin en verimli ve uygun zamanda kabulünü ayarlamak
- Göndericiye, paketi aldığını haber vermek

## Posta gereklilikleri

Kategori A enfeksiyöz maddeler posta hizmetleri aracılığıyla taşınma için kabul edilmeyecektir. Kategori B enfeksiyöz maddeler ise ulusal posta düzenlemelerine göre taahhütlü hava postası ile sevk edilebilirler. Türkiye’de PTT aracılığı ile gönderilecek bu tür örnekler için PTT Genel Müdürlüğü, Mektup Postası Tüzüğü’ne bakılmalıdır (1,4).

## Dökülme-saçılma ve acil durumlar

Paketleme esnasında bir enfeksiyöz madde dökülme-saçılması söz konusu olduysa "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi"nin dökülme-saçılma dekontaminasyon prosedürleri izlenmelidir.

ABD’de 2001 yılında yaşanan şarbon-mektupları dışında bugüne kadar taşıma-ilişkili maruziyetten kaynaklanan enfeksiyon rapor edilmemiştir. İstatistik verileri P620 ve P650 uyumlu paketler ile enfeksiyöz maddelerin herhangi bir sızdırma ve kayıp olmaksızın taşındıklarını göstermektedir. Örneğin 2003 yılında dünya genelinde taşınan toplam 4.92 milyon birincil kabın sadece 106’sında (%0.002) kırılma olduğu, bunların hepsinde de materyalin emici malzeme tarafından emildiği ve ikincil kabın dışına sızma olmadığı kaydedilmiştir (4).

## ÖZET NOTLAR

### Enfeksiyöz maddelerin hava yoluyla gönderimindeki kısıtlılıklar nelerdir?

### Gönderim kısıtlılıkları

- Ağırlık ve boyut (dış paketler hariç olmak üzere)

#### Kategori A maddeler

Yolcu uçakları için paket başına maks. 50 mL veya 50 g  
Kargo uçakları için paket başına maks. 4 litre veya 4 kg

#### Kategori B maddeler

Yolcu/kargo uçakları için paket başına maks 4L veya 4 kg  
Yolcu/kargo uçakları için birincil kap başına maks. 1 litre

- Birden fazla sayıda örnek

Birden fazla birincil kap teması önlemek amacıyla tek tek sarılarak ya da ayrılarak aynı paket içine yerleştirilebilir

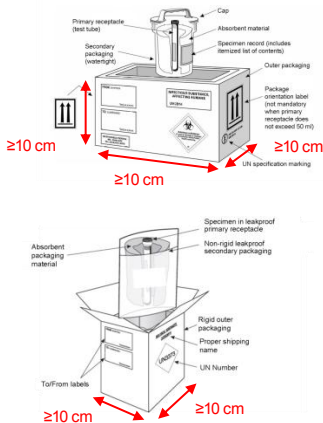
- Paket boyutları

#### P620 paketleri:

En küçük dış boyut 10 cm’den az olmamalıdır.

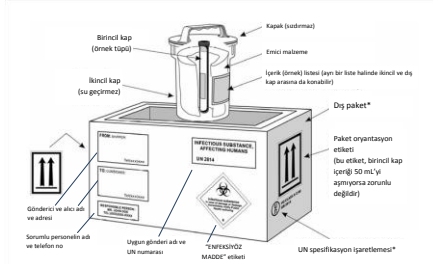
#### P650 paketleri:

Dış paketin en az bir yüzü minimum 10 cm x 10 cm boyutlarında olmalıdır





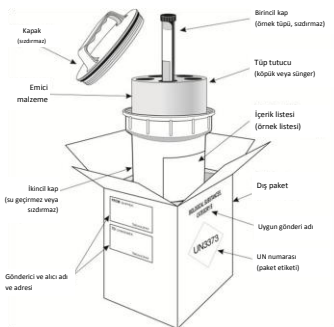
## Kategori A için paketleme gereklilikleri nelerdir?



## Kategori A enfeksiyöz madde paketleme

- Birincil kap sızdırmaz olmalıdır
- İkincil kap sızdırmaz olmalıdır
- Dış kap sert olmalıdır
- 'UN spesifikasyon işaretlemesi'ne haiz olmalıdır (sertifikası bulunmalıdır):
  - 95 kPa'da basınç test edilmiştir
  - 9 m'den düşme test edilmiştir
  - 7 kg'da yırtılma test edilmiştir
  - İstifleme test edilmiştir
- Gönderici eğitilmelidir.
- Dış kap üzerinde gösterilmesi zorunlu işaretlemeler
  - Göndericinin adı ve adresi
  - Alıcının adı ve adresi
  - Sorumlu kişinin adı ve telefon no (gönderi ulaşana kadar 7/24 uygun olan; acil durum iletişim kişisi)
  - Uygun gönderi adı
  - UN numarası
  - UN spesifikasyon işaretlemesi
- Gösterilmesi gereken etiketler (tehlike ve nakliye)
  - Enfeksiyöz madde etiketi
  - Oryantasyon okları (birincil kabın 50 mL'yi aştığı durumlarda zorunludur)
  - Yalnızca Kargo Uçağı (paketin yalnızca kargo uçağıyla taşınabildiği durumlarda kullanılır)

## Kategori B için paketleme gereklilikleri nelerdir?



## Kategori B enfeksiyöz madde paketleme

- Birincil kap sızdırmaz olmalıdır
- İkincil kap sızdırmaz olmalıdır
- Ya birincil ya da ikincil kap 95 kPa'da basınç testine tabi tutulmalıdır.
- Ya ikincil ya da dış kap sert olmalıdır.
  - Gönderim hava yoluyla yapılıyorsa dış kap sert (esnemez, bükülmez) olmalıdır.
- 1.2 m'den düşme testi yapılmış olmalıdır
- Dış kap üzerinde gösterilmesi zorunlu işaretlemeler
  - Göndericinin adı ve adresi
  - Alıcının adı ve adresi
  - Uygun gönderi adı
  - UN numarası
- Etiketler (tehlike ve nakliye)
  - Gerekli değildir (kuru buz kullanılmadığı müddetçe)

### **Muaf insan/hayvan örnekleri paketleme gereklilikleri nelerdir?**

#### **Muaf insan/hayvan örnekleri için paketleme**

- Birincil kap sızdırmaz olmalıdır
- İkincil kap sızdırmaz olmalıdır
- Dış kap yeterli oranda sağlam olmalıdır
- Dış paket üzerinde gereken işaretlemeler
  - Göndericinin adı ve adresi
  - Alıcının adı ve adresi
  - Uygun gönderi adı ("Muaf İnsan/Hayvan Örneği")
- Etiketler (tehlike ve nakliye)
  - Gerekli değildir (kuru buzla gönderilmiyorsa)

### **Aynı noktaya gönderilen paketler birleştirilebilir mi?**

#### **Üst ambalajlar ('overpacks')**

- Üst ambalajlar tek bir gönderici tarafından aynı noktaya gönderilen bir ya da birden fazla paketin teslimat, depolama ya da taşıma esnasında soğutma açısından kolaylık yaratması amacıyla kullanılır.
- Dış paket örnekleri aşağıdaki gibidir:
  - Palet gibi bir yükleme tahtasına yerleştirilen ya da istiflenen ve bağlama, shrink ambalajlama, streç ambalajlama ya da diğer uygun yöntemlerle güvence altına alınan paketler, ya da
  - Kuru ya da tahta kasa gibi koruyucu dış paketlere yerleştirilen paketler, ya da
  - Yalıtımlı ve buz, kuru buz ya da jel pedler gibi soğutucular içeren bir sandığa yerleştirilen paketlerdir

### **Üst ambalajların ('overpacks') işaretlenmesi ve etiketlenmesinde gereklilikler nelerdir?**

#### **Üst ambalajlar için işaretleme ve etiketleme**

- Tehlikeli maddeler mevzuatı (DGR) gereği üst ambalaj içerisine yerleştirilen her bir paketin üzerine paketler ayrı ayrı gönderiliyormuş gibi işaretler, etiketler ve adresler ayrı ayrı yapılandırılmalıdır.
- Üst ambalajın içine yerleştirilecek her bir paket ilgili mevzuatlarla tamamen uyumlu olmalıdır.
- Paket ya da paketler üst ambalaj içine konduktan sonra bu işaretler üst ambalaj içinde görünür değil ise (ör., polimer plastik bir ambalaj kullanılmıyorsa) bu paketlerin üzerindeki işaretler ve etiketlere üst ambalaj üzerinde de yer verilmelidir.  
NOT: UN spesifikasyon işaretlemesine üst ambalaj üzerinde yer verilmesine gerek yoktur.
- Üst ambalajda kuru buz olması halinde miktarına üst ambalaj üzerinde yer verilmelidir.
- "Üst ambalaj ('overpack')" ifadesi daima üst ambalajın üzerinde yazmalıdır

### Üst ambalajlar ('overpacks') için miktar limitleri nasıldır?

### Üst ambalajlar için miktar limitleri

- Tek başına paket miktarı limitini aşan örneklerin gönderiminde dış paketleme oldukça önemlidir
- Örneğin:
  - Göndericinin bir yolcu uçağı yoluyla 100 mL Kategori A madde göndermesi gerekmektedir. Ancak miktar limiti paket başına 50 mL'dir.
  - Örnek 50'şer ml olmak üzere ikiye ayrılarak paketlenilebilir ve bu iki paket sonrasında tek bir üst ambalaj içine yerleştirilebilir.
- Üst ambalajlar için herhangi bir şart ya da test gerekliliği yoktur.
- Ancak üst ambalajın içine yerleştirilen her türlü paket ilgili mevzuatlara uymalıdır.

### Maddelerin hava yolu ile gönderimi için gerekli formlar nelerdir?

### Dokümantasyon

- Havayolu taşıma senedi - hava yoluyla yapılan bütün gönderimler için gereklidir. Form gönderici veya kurye tarafından doldurulmalıdır
- Kategori A için ayrıca **Tehlikeli Maddeler Deklarasyonu (DGD)** formu doldurulur.

- Gönderici tarafından doldurulup imzalanması gerekir
- Gönderici ile operatör arasında yasal bir sözleşme görevi görür
- Kategori B ya da Diğer olarak sınıflandırılan örnekler için (soğutma için kuru buz kullanıldığında bile) bu forma ihtiyaç duyulmamaktadır

- Göndericinin sorumlulukları
  - Form beyaz kağıt üzerine renkli basılmalıdır (sağ ve sol diyagonal çizgiler kırmızı renkte basılmalıdır)
  - Form İngilizce dilinde doldurulmalıdır
  - Form doğru, tam olarak ve okunaklı bir şekilde doldurulmalıdır
  - Modifikasyon ve değişiklikler gönderici tarafından imzalanmalıdır (ancak en doğrusu herhangi bir değişiklik gerektiğinde yeni bir form doldurmaktır)
  - Form imzalanmalıdır (el yazısıyla imzalanmalıdır)
  - Gönderici 3 nüsha doldurmalıdır: Biri gönderici diğer ikisi ise operatör içindir.

## Ekler

### Ek-1 Tehlikeli maddelerin taşınması için Birleşmiş Milletler Sistemi hakkında ek bilgi

Birleşmiş Milletlerin ilgili web sitesi "Tehlikeli Maddeler için Birleşmiş Milletler Önerileri" hakkında kapsamlı bilgi sağlar. Ayrıca ilgili diğer ajanslara da bağlantı verir.

<http://www.unece.org/trans/danger/danger.htm>

Aşağıda verilen siteden Birleşmiş Milletler Önerileri'nin tamamına ulaşılabilir. Bölüm 2, 4 ve 5 enfeksiyöz maddelerin taşınma ile ilgili kısımlardır:

[http://www.unece.org/trans/danger/publi/unrec/rev17/17fword\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/unrec/rev17/17fword_e.html)

Aşağıdaki site de 2011 Tehlikeli Maddelerin Karayolu ile Uluslararası Taşınması için Avrupa Anlaşması'nın (ADR) tamamını ve 2013 yılı başından itibaren yürürlüğe girmiş olan değişiklikleri vermektedir. Enfeksiyöz maddelerin taşınması ile ilgili kısımlar Bölüm 2.2 (2.2.52'den 2.2.7'ye), Bölüm 4 (4.1) ve Bölüm 5'tir:

<http://www.unece.org/trans/danger/publi/adr/adr2011/11contentse.html>

[http://www.unece.org/trans/danger/publi/adr/adr2011\\_amend.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/adr/adr2011_amend.html)

Tehlikeli malların taşınması için çeşitli sözleşmelere taraf olanların web siteleri için örnekler de aşağıda verilmiştir:

Hava yolu (ICAO): <http://www.icao.int/safety/DangerousGoods/Pages/technical-instructions.aspx> (son erişim tarihi: 22.11.2012)

Demir yolu (RID): <http://www.otif.org/> (RID başlıca Avrupa, Kuzey Afrika ve Orta Doğu ülkeleri içindir).

<http://www.otif.org/en/about-otif/addresses-and-useful-links/member-states.html>

Kara yolu (ADR): [http://www.unece.org/trans/danger/publi/adr/country-info\\_e.htm](http://www.unece.org/trans/danger/publi/adr/country-info_e.htm)

Deniz yolu (IMO): <http://www.imo.org>

Posta (UPU): <http://www.upu.int/>

## Ek-2 Kategori A "enfeksiyöz madde" listesi

**Tablo 1.** Kategori A kapsamına giren enfeksiyöz maddeler listesi Birleşmiş Millerler Model Düzenlemeleri'nin 17. baskısından alınmış bir örnek ('indicative') listedir. Bu liste zaman içinde güncellenen bir listedir. Yanında parantez açıklaması olmayanların bütün formları Kategori A kapsamındadır (4).

UN No	Mikroorganizmalar	
<b>UN 2814</b> <b>Infectious substances, affecting humans</b> <b>(Enfeksiyöz materyal, insanları etkiler)</b>	<i>Bacillus anthracis</i> (yalnız kültürleri)	Highly pathogenic avian influenza virus (yalnız kültürleri)
	<i>Brucella abortus</i> (yalnız kültürleri)	Japanese encephalitis virus (yalnız kültürleri)
	<i>Brucella melitensis</i> (yalnız kültürleri)	Junin virus
	<i>Brucella suis</i> (yalnız kültürleri)	Kyasanur Forest disease virus
	<i>Burkholderia mallei</i> – <i>Pseudomonas mallei</i> – <i>glanders</i> (yalnız kültürleri)	Lassa virus
	<i>Burkholderia pseudomallei</i> – <i>Pseudomonas pseudomallei</i> (yalnız kültürleri)	Machupo virus
	<i>Chlamydia psittaci</i> – avian strains (yalnız kültürleri)	Marburg virus
	<i>Clostridium botulinum</i> (yalnız kültürleri)	Monkeypox virus
	<i>Coccidioides immitis</i> (yalnız kültürleri)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (yalnız kültürleri) <sup>1</sup>
	<i>Coxiella burnetii</i> (yalnız kültürleri)	Nipah virus
	Crimean-Congo haemorrhagic fever virus	Omsk haemorrhagic fever virus
	Dengue virus (yalnız kültürleri)	Poliovirus (yalnız kültürleri)
	Eastern equine encephalitis virus (yalnız kültürleri)	Rabies virus (yalnız kültürleri)
	<i>Escherichia coli</i> , verotoxigenic (yalnız kültürleri) <sup>1</sup>	<i>Rickettsia prowazekii</i> (yalnız kültürleri)
	Ebola virus	<i>Rickettsia rickettsii</i> (yalnız kültürleri)
	Flexal virus	Rift Valley fever virus (yalnız kültürleri)
	<i>Francisella tularensis</i> (yalnız kültürleri)	Russian spring-summer encephalitis virus (yalnız kültürleri)
	Guanarito virus	Sabia virus
	Hantaan virus	<i>Shigella dysenteriae</i> type 1 (yalnız kültürleri) <sup>1</sup>
	Hantaviruses causing haemorrhagic fever with renal syndrome	Tick-borne encephalitis virus (yalnız kültürleri)
Hendra virus	Variola virus	
Hepatitis B virus (yalnız kültürleri)	Venezuelan equine encephalitis virus (yalnız kültürleri)	
Herpes B virus (yalnız kültürleri)	West Nile virus (yalnız kültürleri)	
Human immunodeficiency virus (yalnız kültürleri)	Yellow fever virus (yalnız kültürleri)	
	<i>Yersinia pestis</i> (yalnız kültürleri)	
<b>UN 2900</b> <b>Infectious substances, affecting animals only</b> <b>(Enfeksiyöz materyal, yalnız hayvanları etkiler)</b>	African swine fever virus (yalnız kültürleri)	Peste des petits ruminants virus (yalnız kültürleri)
	Avian paramyxovirus Type 1 – Velogenic Newcastle disease virus (yalnız kültürleri)	Rinderpest virus (yalnız kültürleri)
	Classical swine fever virus (yalnız kültürleri)	Sheep-pox virus (yalnız kültürleri)
	Foot and mouth disease virus (yalnız kültürleri)	Goatpox virus (yalnız kültürleri)
	Lumpy skin disease virus (yalnız kültürleri)	Swine vesicular disease virus (yalnız kültürleri)
	<i>Mycoplasma mycoides</i> – contagious bovine pleuropneumonia (yalnız kültürleri)	Vesicular stomatitis virus (yalnız kültürleri)

<sup>1</sup> Karayolu transportu (ADR) kullanılacaksa, bu (işaretsiz) mikroorganizmaların tanısız veya klinik amaçlar için gönderilecek kültürleri, Kategori B enfeksiyöz materyal olarak sınıflandırılabilir.

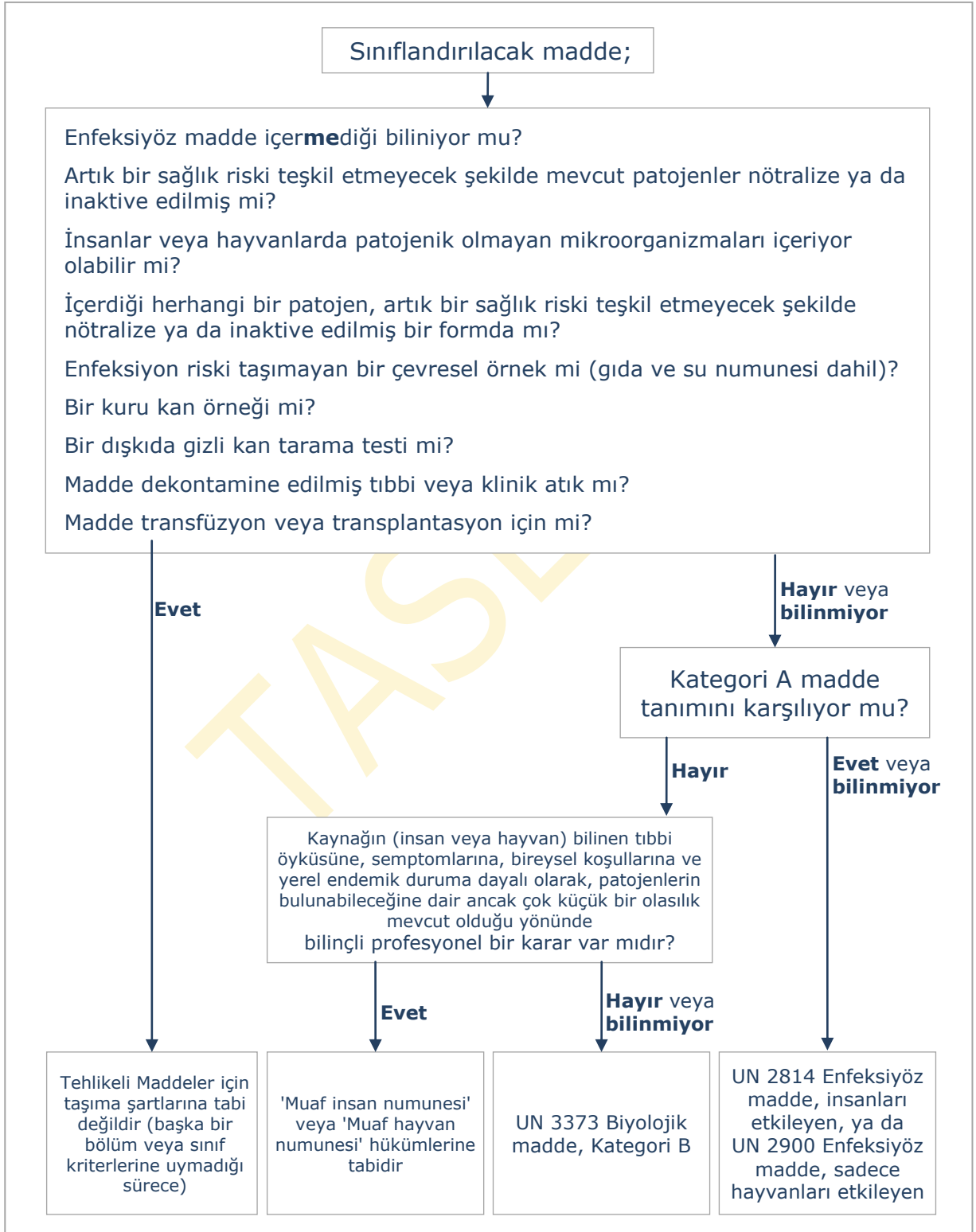
Tabloda, italik ile yazılmış olan mikroorganizmalar; bakteriler, mikoplazmalar, riketsiyalar veya mantarlardır.

## Ek-3 Tehlikeli Madde Deklarasyon Belgesi

Tehlikeli maddeler için doldurulmuş bir "Gönderici Deklarasyonu" örneği (4).

SHIPPER'S DECLARATION FOR DANGEROUS GOODS						
Shipper Dr XY Orange, tel 0789 456 123 Childrens' hospital 4, Splendid Street 12345 Beauticity Nicecountry			Air Waybill No. 543 7654 9876 Page 1 of 1 Pages Shipper's Reference Number (optional)			
Consignee Dr AB Normal, tel 03210 987 4568 Virobactfung Laboratories 6, Many Way 98765 Myplace Hercountry						
<i>Two completed and signed copies of this declaration must be handed to the operator.</i>			<b>WARNING</b>			
<b>TRANSPORT DETAILS</b>			Failure to comply in all aspects with the applicable Dangerous Goods Regulations may be in breach of the applicable law, subject to legal penalties.			
This shipment is within the limitations prescribed for: (Delete non-applicable)		Airport of Departure: Amleaving				
PASSENGER AND CARGO AIRCRAFT		<input checked="" type="checkbox"/> CARGO AIRCRAFT ONLY				
Airport of Destination <b>Willgetthere</b>			Shipment Type (Delete non-applicable) <input checked="" type="checkbox"/> NON-RADIOACTIVE <input type="checkbox"/> RADIOACTIVE			
NATURE AND QUANTITY OF DANGEROUS GOODS						
Dangerous Goods Identification						
UN or ID No.	Proper Shipping Name	Class or Division (Subsidiary Risk)	Packing Group	Quantity and Type of Packing	Packing Inst.	Authorization
UN 2814	Infectious substance, affecting humans (Ebola virus)	6.2		50ml	620	
UN 1845	Dry ice	9		20kg All packed in one fibreboard box	954	
Additional Handling Information Emergency contact: Dr Orange tel 0789 456 123						
I hereby declare that the contents of this consignment are fully and accurately described above by the proper shipping name, and are classified, packaged, marked and labelled/placarded, and are in all respects in proper condition for transport according to applicable international and national governmental regulations.			Name/Title of Signatory Dr XY Orange Goods Dispatch Place and Date: Beauticity 18 June 2010 Signature (see warning above)			

## Ek-4 Enfeksiyöz maddelerin ve hasta örneklerinin paketleme amaçları için sınıflandırılması



## Ek-5 İşaretleme ve etiketler


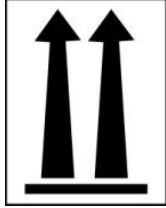

Burada bütün işaretleme ve etiket örnekleri bir arada verilmiştir. Kategori A, Kategori B ve "Muaf insan/hayvan örnekleri"nin paketlenmesinde kullanılacak işaretleme ve etiketleme için bu Rehberdeki ilgili kısımlara bakınız.

### İşaretleme

- Göndericinin adı ve adresi
- Alıcının adı ve adresi
- Sorumlu kişinin (gönderi ulaşana kadar 7/24 uygun olan; acil durum iletişim kişinin) adı ve telefon numarası
- UN spesifikasyon işaretleme
- Uygun gönderi adı
- UN numarası

### Etiketler (tehdike ve nakliye)

- Enfeksiyöz madde etiketi
- Oryantasyon okları (birincil kap 50 mL'yi aştığında paketin her iki tarafına konulması zorunlu siyah ya da kırmızı)
- Sadece Kargo Uçağı (paketin yalnızca kargo uçağında taşınabildiği durumlarda kullanılır)

İŞARETLEMELER	
<p><b>SHIPPER</b></p> <p>PETER PAN ACCURATE RESEARCH INSTITUTE BP 102 , I-0956666 NOLAND</p>	<p><b>RECEIVER</b></p> <p>AB NORMAL FRANKENSTONE LAB RUE DE L'ESSAI F-9867 ADIEU</p>
<p>EMERGENCY CONTACT 24H/24H Dr RED PEPPER: +67 56 45 34 23</p>	
<p><b>u</b> <b>n</b></p>	<p><b>4G/CLASS 6.2/02</b> <b>F/BVT 312103</b></p>
<p>OVERPACK</p>	<p>INFECTIOUS SUBSTANCE, AFFECTING HUMANS</p> <p>UN 2814</p>
<p>UN 3373</p>	<p>BIOLOGICAL SUBSTANCE, CATEGORY B</p>
	<p>EXEMPT HUMAN SPECIMEN</p>
ETİKETLER	
	
	



## Ek-6 Sık sorulan sorular ve yanıtları

### Gönderim paketleri nereden temin edilebilir?

- Paketler kurye hizmeti sağlayan firmadan ya da piyasadan satın alınabilir
- Bir arama motoru kullanılarak internetten yapılacak bir araştırmayla ihtiyaç duyulan bilgiye ulaşılabilir. Arama motoruna 'UN Packaging' ve 'UN Infectious Substance Packaging' kelimelerinin yazılması yeterli olacaktır.
- Taşıyıcılar ve gönderici kurumlar da bu tür bilgileri ve paketleme malzemesi sağlayabilecek yerel firmaların ve şirketlerin detaylı bilgilerini sunabilirler.
- Özellikle "Paket Talimatı P620" ile uyumlu paketlerin bulunması sorun olabilir. Türkiye'de bu özellikte paketleri temin edebilen en az bir firma mevcuttur.
- Son yıllarda Sağlık Bakanlığı THSK, illerin Halk Sağlığı Müdürlüklerine UN spesifikasyon işaretlemesine sahip (UN kriterlerini karşılayan) paketler/kaplar temin etmektedir. Laboratuvarların ihtiyaç halinde İl Halk Sağlığı Müdürlüğü ile temasa geçmeleri önerilir.

### Farklı kategorilerdeki birden fazla örneği aynı pakette gönderebilir miyiz?

- Kategori A, taşıma gereklilikleri karşılandığı müddetçe Kategori B ve muaf örnekler ile aynı paket içerisinde gönderilebilir. Karışık bir paketlemede, paket örnekler arasında en sıkı nakliye şartlarını gerektiren örneğe göre hazırlanır.
- Enfeksiyöz maddenin canlılığının korunması ve yıkımının önlenmesi gerekmedikçe Sınıf 6.2 uyarınca diğer tehlikeli maddeler aynı pakette gönderilmemelidir.
- 3, 8 veya 9. sınıfa ait 30 mL veya daha az miktardaki tehlikeli maddeler birincil kaplarında enfeksiyöz maddeyle birlikte paketlenebilirler. Böylesi az miktarlardaki tehlikeli maddeler enfeksiyöz maddeyle paketlenildiğinde bu sınıflara ait maddelerin diğer gereklilikleri karşılamasına gerek kalmaz.

### Eldiven takmadan bir paket hazırlanabilir mi?

- Örneklerin eldivenle paketlenmesi önerilir.
- Eldiven yoksa aşağıdaki öneriler dikkate alınmalıdır:
  - Birincil kabın yüzeyi dezenfekte edilmelidir
  - Eldiven kullanmadan birincil kapla çalışan bireyler için el yıkamaya yönelik standart çalışma prosedürleri geliştirilmeli ve kullanılması sağlanmalıdır
  - Birincil kapla çalışanların kullanımı için maşalar satın alınmalıdır
  - Çalışanlar maruziyet riskinin en aza indirilmesini amaçlayan prosedürler üzerine eğitilmelidir
- Örnekleri elleyen personelin izlenmesi için tıbbi süreyans programlarının geliştirilmesi ve yürütülmesi önerilmektedir.

## Enfeksiyöz maddelerin gönderim kısıtlılıkları nelerdir?

- Bütün enfeksiyöz maddeler gönderilebilir
- Aksi tıbbi/laboratuvar kanıtlara dayalı olarak belirtilmedikçe bütün insan ve hayvan örnekleri potansiyel enfeksiyöz olduğu kabul edilmelidir
- Enfeksiyöz maddenin başka hiçbir şekilde gönderilemediği durumlar haricinde canlı hayvan gönderimi yapılmamalıdır.
- Enfeksiyöz maddeler uçak yolculuğu esnasında kesinlikle elde ya da el bagajında taşınmamalıdır
- Enfeksiyöz maddeler diplomatik bagajlara konmamalıdır

## Enfeksiyöz maddeleri posta yoluyla gönderebilir miyiz?

- Enfeksiyöz maddenin posta yoluyla gönderilmesine her ülke izin vermez
- Posta servisleri posta yoluyla Kategori A gönderimleri kabul etmezler
- Gönderim yapılan ülkenin ve gönderimin geçiş yolu üzerindeki ülkenin posta yetkilileriyle iletişime geçerek enfeksiyöz maddelerin posta yoluyla gönderimine izin verip vermedikleri kontrol edilmelidir
- Enfeksiyöz maddelerin posta yoluyla gönderiminde göndericiler posta yolu gerekliliklerine uymalıdır

## Ne kadar emici madde gereklidir?

- Emici madde daima ikincil kabın içine (birincil kapla ikincil kabın arasına) yerleştirilmelidir.
- Birincil kaptaki bütün maddeyi emecek kadar emici madde konmalıdır.
- Birincil kaptan sızıntı olması halinde emici madde dolgu maddesini ve dış kabı korumalıdır.
- Birincil kaptaki sıvılar hiçbir suretle ikincil kaptan ya da dış kaptan dışarı sızmamalıdır.

## Tüzüğün uygulanmasında yerel farklılıklar söz konusu mudur?

- Mevcut tüzüğün uygulanmasında devletler (ülkeler) ve operatörler (ör., hava yolları) farklılıklar gösterebilir
- Bu farklılıklar enfeksiyöz maddenin ya da diğer tehlikeli maddelerin gönderiminde bazı kısıtlılıklar ya da ilave gereklilikler ortaya çıkmasına neden olabilir
- Bütün gerekliliklerin karşılandığından emin olmak amacıyla göndericilerin gönderimden önce taşıyıcılarıyla temasa geçmeleri önerilmektedir

## Kaynaklar

- 1 PTT Genel Müdürlüğü, Mektup Postası Tüzüğü.  
[http://uidb.ptt.gov.tr/dosyalar/mektup\\_postasi.pdf](http://uidb.ptt.gov.tr/dosyalar/mektup_postasi.pdf) (son erişim tarihi: 03.03.2014)
- 2 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.
- 3 Transport of Infectious Substances: Background to the amendments adopted in the 13th revision of the United Nations Model Regulations guiding the transport of infectious substances 2004. World Health Organisation. Department of Communicable Disease Surveillance and Response. WHO/CDS/CSR/LYO/2004.9
- 4 WHO. Guidance on Regulations for the Transport of Infectious Substances, 2013–2014. World Health Organisation. WHO/HSE/GCR/2012.12, 2012.
- 5 Guiding Principles for the Development of the UN Model Regulations. 4th version, 2013.  
[http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/GuidingPrinciples/Guiding\\_Principles\\_Rev18.pdf](http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/GuidingPrinciples/Guiding_Principles_Rev18.pdf) (son erişim tarihi: 05.03.2014)

TASLAK

# ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

## Suş Saklama Prosedürü

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Test Prosedürleri
Standart No	B-TP-24
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

## İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	3
GENEL BİLGİ .....	3
TEKNİK BİLGİLER .....	4
1 Saklama teknikleri için asgari laboratuvar koşulları .....	4
2 Dondurarak saklama prosedürü .....	6
3 Saklanan izolatin yeniden canlandırılması .....	6
4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	7
KAYNAKLAR.....	8

## Kapsam ve Amaç

Kültürlerde üreyen mikroorganizmalar zaman içinde canlılıklarını kaybederler. Eğer izolatların gelecekte yine kullanılması düşünülüyorsa, ölüm hızını yavaşlatmak ya da durdurmak ve özelliklerini olduğu gibi koruyarak saklamak gerekir. Bu UMS'de de bakteri izolatlarını saklamak için rutin laboratuvarlarda kolay uygulanabilir olan dondurarak saklama prosedürünün verilmesi hedeflenmiştir. Diğer saklama teknikleri ve diğer organizma türleri (mantar, parazit, virüs) için prosedürler bu kapsama dahil edilmemiştir.

## Kısaltmalar ve Tanımlar

<b>Desikatör</b>	Laboratuvarda içine konulan maddenin kuru halde kalması için kullanılan kap; içinde nem alıcı madde bulunur ve sıkı kapanır.
<b>Saklama</b>	Bir organizmayı fenotipik ve genotipik özelliklerinde herhangi bir değişikliğe meydan vermeden ve kontamine etmeden canlı durumda tutabilmek (yöntemi)
<b>'skim-milk'</b>	Yağsız süt
<b>TSB</b>	Triptik soya buyyon

## Genel Bilgi

Organizma kültürlerinde hücre ölümünün temel nedeni metabolik olayların devam etmesi sonucu ortaya çıkan toksik maddeler ve çevresel etkilerdir. Organizmanın yaşamını sürdürebilmesi için gereken metabolik olaylar yavaşlatılır veya önlenbilirse bakteri uzun süre saklanabilir. Kültürlerdeki toksik olayların yavaşlatılması iki temel yol ile sağlanabilir. Birincisi, ortam ısısının düşürülmesi (dondurma); ikincisi, ortamdaki suyun uzaklaştırılması işlemidir (kurutma). Rutin laboratuvarlarda ortam ısısının düşürülmesi yöntemi kolaylıkla uygulanabilir.

Nitekim, organizmaların gelecekte yapılabilecek çalışmalar için kısa veya uzun bir dönem boyunca saklanması, modern mikrobiyolojinin tarihi kadar eskidir ve çeşitli organizma türleri için çeşitli saklama yöntemleri geliştirilmiştir (Tablo 1) (1,2). Mikroorganizma koleksiyonları eğitim amaçları, standart suşların korunması, epidemiyolojik incelemeler, testlerin tekrarı, hastalığın tedavisi ile ilgili süreçler ya da mikrobiyal evrim ve farklılaşma üzerine bilimsel araştırmalarda kullanılabilecek çok değerli kaynaklardır.

Seçilecek saklama tekniği amaca ve organizmaya göre değişkenlik gösterir. Klinik laboratuvarlar için basit ve yaygın uygulanabilir saklama yöntem(ler)i idealdir. Bunlardan biri **dondurarak saklama** olup, bu teknik ile bakteri izolatlarının birkaç aydan birkaç yıla kadar saklanması mümkündür (1,3). Dondurarak saklama için bakterinin önce bir koruyucu ortam içine alınması gerekir. Koruyucu olarak en sık gliserol buyyon, "skim-milk" veya at, koyun gibi bir hayvanın kanı kullanılır. Bu gibi maddelerin ortak özelliği -su, kristalize olduğunda bakterinin delinmesine ve ölümüne yol açabildiğinden- donma esnasında suyun kristalize olmasını önleyerek bakteriyi korumalarıdır (3).

**Tablo 1.** Klinik mikrobiyolojide mikroorganizmaların saklanması için kullanılan yöntemler (2).

Teknik	Açıklama
Periyodik pasaj	Organizmayı periyodik aralıklarla yeni bir besiyerine pasajlama. Değişkenlere (pasaj sıklığı, kullanılan besiyeri ve saklama sıcaklığı) de bağılı olarak, bu teknikte, mutasyon oranı yüksek olabilir, varyantların üretimine yol açılabilir.
Mineral yağda yatık agar kültürü	Organizmanın yatık agarda üretilmiş ve üzeri steril mineral yağ ile kaplanmış kültürü. Oda ısısında veya buzdolabında saklanabilir.
Minimal ortam (saf su ya da su agar)	Organizmanın sudaki yoğun süspansiyonları. Bazı organizmalara ( <i>Pseudomonas</i> spp, çoğu mantar vb.) uygulanabilir; buzdolabında 3-5 ay veya daha uzun süre canlılık korunabilir.
Koruyucu ortam içinde dondurma	Organizmanın bir koruyucu ortam (%16'lık gliserol buyyon, %10'luk "skim-milk", hayvan kanı) içindeki yoğun süspansiyonu; -20°C ya da -80°C'de birkaç aydan birkaç yıla kadar saklanabilir.
Kurutma	Organizma steril toprak, steril filtre kağıdı diskler ya da jelatin damlaları üzerinde kurutulur; desikatör içinde buzdolabında ya da daha uzun süreler için derin dondurucuda saklanabilir.
Dondurarak kurutma (liyofilizasyon)	Organizmanın "skim-milk" gibi bir koruyucu içindeki süspansiyonunda hızla dondurularak kurutulması işlemi; içinde bulunduğu ampulün hava ile teması tamamen kesilmiştir; canlılık çok uzun süre korunur (30 yıl rapor edilmiştir).
Ultra-dondurma	Sıvı azot (-196°C) kullanılır; narin organizma kültürleri bile 15 yıldan fazla korunur.

## Teknik Bilgiler

### 1 Saklama teknikleri için asgari laboratuvar koşulları

#### 1.1. Laboratuvar güvenliği

Bu UMS'de bahsi geçen organizmalar ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart önlemler uygulanmalı, önlemler risk değerlendirmesi ile de desteklenmelidir. Aerosol oluşturması muhtemel tüm laboratuvar çalışmaları bir biyolojik güvenlik kabininde gerçekleştirilmelidir (ayrıca bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

**Güvenlik uyarısı!** Mikroorganizmaların saklanması, laboratuvarda zaman içinde büyük miktarda ve çeşitlilikte patojen organizmanın yoğun süspansiyonlarını içeren tüplerin/ampullerin birikmesi anlamına gelir. Bu saklanmış (dondurulmuş, liyofilize vb.) organizmaların tutulduğu dolap veya rafların istenmeyen bir şekilde devrilmesi (ör., deprem, hatalı yerleştirme) ve tüplerin/ampullerin saçılması ve kırılması olasılığına karşı ciddi önlemler alınmış olmalıdır! (Varsa) **yüksek riskli** patojen mikroorganizma kültürlerinin de yetkisiz kişilerin eline geçmesini önlemek için gereken önlemler alınmış olmalıdır! Yüksek riskli patojen mikroorganizma kültürlerinin/stoklarının laboratuvarda bulundurulması ile ilgili olarak THSK, Ulusal Kültür Koleksiyonları ile iletişim kurunuz!

## 1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) testten önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşina olmalı, ve; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

## 1.3. Örnek, Besiyeri, Donanım

### Örnek

- Saklanması hedeflenen izolat

### Besiyerleri

- %10'luk skim-milk – 1 g toz 'skim-milk' 10 mL distile su içinde eritilir.\* 110°C'de 10 dk otoklavlanır. *Alternatif olarak* solüsyon kaynar su banyosunda 1 saat tutulur; bu işlem üst üste 2 gün daha tekrarlanır (tindalizasyon). Etiketlenir ve buzdolabında saklanır. Raf ömrü 6 aydır.
- %16'lık gliserollü buyyon – 1 g TSB (glikoz içermeyen), 10 mL gliserol ve 40 mL distile su manyetik karıştırıcıda karıştırılır, eritilir. pH ölçülür ve 7.2'ye ayarlanır. 115°C'de 10 dk otoklavlanır. Etiketlenir ve buzdolabında saklanır. Raf ömrü 6 aydır.
- İzolatın taze pasajını elde etmek için besiyeri plakları –
  - (a) %5 koyun kanlı agar veya çikolata agar
  - (b) Üremek için özel besiyerlerine gereksinim duyan bakteriler için üreyebildikleri özel besiyeri – *ör.*, *Brucella* spp için *Brucella* agar, *Bordetella* spp için Bordet-Gengau agar, *Bordetella* ve *Legionella* spp için BCYE (buffered charcoal yeast extract) agar gibi.

### Diğer gereç, donanım

- Öze, steril tek kullanımlık veya nikrom
- Derin dondurucu tüpleri, plastik, dıştan burgu kapaklı, steril (~2.0 mL)
- Pastör pipeti, steril
- Vorteks

## 1.4. Kalite kontrol

- Saklama besiyerine sterilite kontrolü uygulanır.
- Sterilite kontrol için 3 adet kanlı veya çikolata agar plağı alınır ve saklama besiyerinden (%10'luk skim-milk veya %16'lık gliserol buyyon) her bir plağa 100 µL yayma ekim yapılır. 35°C'de 48-72 saat inkübe edilir.
- Plaklarda hiç mikroorganizma ürememiş olması beklenir. Üreme varsa o saklama besiyeri serisi atılır.

\* Laboratuvar kendi tüketim hızına göre hazırlayacağı miktarı değiştirebilir.



## 2 Dondurarak saklama prosedürü

**ÖNEMLİ:** Zaman içinde saklama işlemi laboratuvarda yer sıkıntısının baş göstermesine neden olur. Bu nedenle laboratuvarlar suş saklama hususunda **öncelikle** bir politika oluşturmalı; bütün izolatları değil ama bu politika çerçevesinde saklanması gereken izolatları saklamalıdır. Saklama sürecinin basit bir algoritması Şekil 1'de verilmiştir.

- Öncelikle saklanacak izolatın yoğun saf kültürü elde edilmiş olmalıdır. Bunun için izolatın rahat üreyebileceği plak besiyerinden iki adet alınır. Üzerine izolatın kimlik bilgileri (adı, laboratuvar no vb.) ve tarih yazılır.
- İzolatın orijinal kültüründen bir koloni (veya saf kültüründen bir öze dolusu) alınarak her iki plağa -azaltma yapmaksızın- yoğun ekim yapılır.
- Plaklar izolatın gereksinimine göre uygun inkübasyon şartlarında (aerob veya mikroaerofil), 35-37°C'de, 24 saat inkübe edilir.

NOT: İnkübasyon süresi sonunda yeterli üreme gözlenmez ise süre uzatılır.

- İki adet derin dondurucu tüpü alınır; tüplere aseptik şartlarda 1'er mL saklama besiyeri (%10'luk 'skim-milk' veya %16'lık gliserol buyyon) konur.

NOT: Saklama besiyeri tüplere alikotlar halinde önceden otoklavlama öncesi veya sonrasında dağıtılabilir. Otoklavlama sonrası dağıtılırken aseptik şartların sağlanmasına büyük özen gösterilmeli, işlem tercihen biyogüvenlik kabini içinde yapılmalıdır.

- Tüplerin üzeri etiketlenir – izolatın bütün kimlik bilgileri ve işlem tarihi yazılır.
- Öze yardımıyla bir plaktaki yoğun üremenin tamamı toplanır; saklama besiyeri içeren tüplerden birine konur. Diğer plaktaki üremenin de tamamı toplanarak diğer tüpe konur. Kapakları sıkıca kapatılır.

NOT: İzolatların saklama tüpleri içine aktarılması işlemi biyogüvenlik kabini içinde yapılmalıdır!

- Tüpler vortekslenerek homojenize edilir.
- Tüplerden biri -20°C'ye (~1 yıl için) diğeri -80°C'ye (8-10 yıl için) kaldırılır. Eğer laboratuvarda -80°C derin dondurucu yoksa her iki tüp de -20°C'ye kaldırılır.
- Koleksiyon kayıt defterine saklamaya alınan suşların kimlik bilgileri ve işlem tarihi kaydedilir. *Laboratuvar bütün suş saklama işlemlerini kayıt altına almalıdır!*

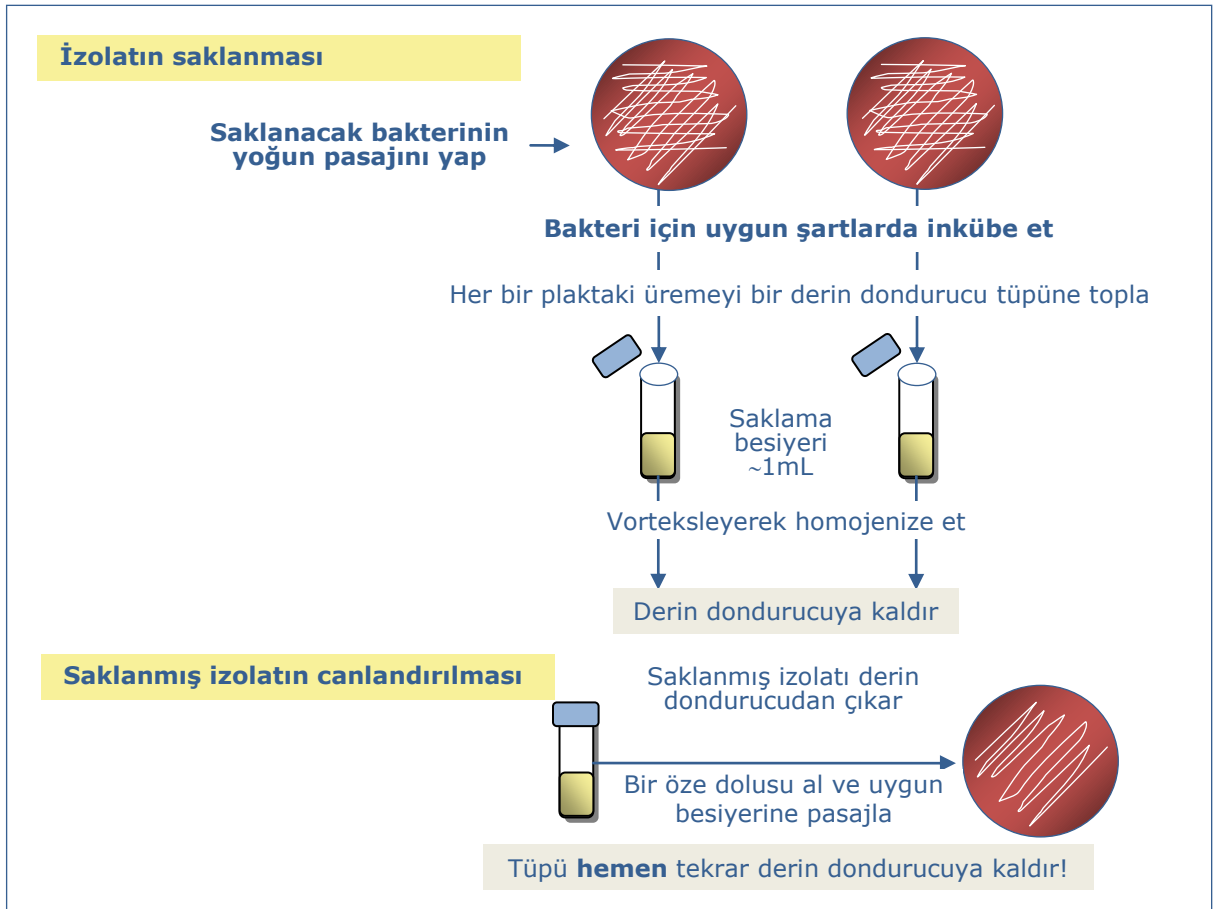
## 3 Saklanan izolatın yeniden canlandırılması

- Pasaj için izolatın rahat üreyeceği seçici olmayan bir besiyeri plağı alınır. Suşun kimlik bilgileri yazılır.

- Saklanmış izolat derin dondurucudan çıkarılır.
- **Hemen** (tüp içeriğinin erimesini beklemeden) tüpün üst kısmından steril öze ile hafif kazıyarak öze dolusu alınır; hazırlanmış besiyeri plağına ekilir.
- Tüp tekrar ve hemen derin dondurucuya, alındığı kutuya kaldırılır.  
NOT: Mümkünse tüp derin dondurucudan bir buz kabının içine konarak çıkarılmalı, çok kısa bir süre için bile olsa oda sıcaklığına maruz kalmaması sağlanmalıdır.
- Ekim yapılmış plak uygun inkübasyon şartlarında inkübasyona kaldırılır.

## 4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Güç üreyen bakteriler için inkübasyon süresini 72 saatte kadar uzatmak gerekebilir.
- Bakteri canlandırılırken derin dondurucudan çıkarılmış tüplerin çözülmemesine azami dikkat edilmeli ve işlem hızlı yapılmalıdır.



**Şekil 1.** Laboratuvarda bir bakteri izolatinin dondurularak saklanması ve saklanmış izolatin yeniden canlandırılması için basit akış şeması. (Kaynak: Akbaş E. Henüz yayınlanmamış doküman, 2012)

## Kaynaklar

---

- 1 Petti CA, Carroll KC. Procedures for the storage of microorganisms. *In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds). Manual of Clinical Microbiology. 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 124-131*
- 2 Prescott LM, Harley JP, Klein DA (eds.). Industrial microbiology and biotechnology. *In: Microbiology. 5th ed., The McGraw-Hill Companies, USA. 2002, p.1000*
- 3 Sewell DL. Quality control. *In: Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. ASM Press, Washington D.C. 1992, p. 13.2.22-23*



T.C. Sağlık Bakanlığı

# ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

## Eskülin ve Safra-Eskülin Testleri

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Test Prosedürleri
Standart No	B-TP-02
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

## İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	3
GENEL BİLGİ .....	3
TEKNİK BİLGİLER .....	4
1 Test için asgari laboratuvar koşulları .....	4
2 Testin uygulanması .....	5
3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması .....	6
4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	6
KAYNAKLAR.....	7

## Kapsam ve Amaç

Bazı organizmalar eskülini hidrolize edebilen enzimlere sahiptir. Enzim aktivitesinin gösterilmesinde ise eskülin ve safra-eskülin testleri kullanılır. Özellikle safra-eskülin testi enterokokların ve *Streptococcus bovis* grubu bakterilerin (ki, hemen hepsi pozitifdir), diğer streptokoklardan ayırıcı tanısında temel bir testtir.

Bu UMS'de de eskülin ve safra-eskülin testlerinin dayandığı prensipler ile kullanım ve yorumlanmalarına dair bir rehber sunulması hedeflenmiştir.

## Kısaltmalar ve Tanımlar

**PYR** L-pirolidonil- $\beta$ -naftilamid

**LAP** Lösin aminopeptidaz

## Genel Bilgi

Eskülin bir 'glikozid'dir ve bazı bakterilerin ürettiği bir yapısal enzim olan eskülinaz ( $\beta$ -glikozidaz) aktivitesi ile **glikoz** ve **eskületine** yıkılır. Eskületin, eğer ortamda demir tuzları varsa, bunlarla bir fenolik demir kompleksi oluşturarak besiyerinin rengini kahverengi veya siyaha çevirir. Eskülin, aynı zamanda floresan bir maddedir ve üreyen mikroorganizma tarafından yıkılmakta olduğu, ortamdaki floresanın azalması ve kaybı ile gösterilebilir (1,2).

Öte yandan, eğer eskülin içeren bir besiyerine safra tuzları da eklenecek olursa, safra varlığında üreyebilen organizmaların eskülini hidrolize edip etmediklerini test etmek mümkün olur. Bu amaç için kullanılan safra-eskülin agar bakteri için besleyici maddeler, eskülin ve ferrik sitrata ilave olarak %40 safra içerir. Söz konusu safra yoğunluğunu elde etmek için ise besiyerinde genellikle 'oxgall' kullanılır (%4 oxgall, %40 safraya eşdeğerdir) (1,3). Safra-eskülin agar seçici ve ayırt ettirici bir besiyeridir. Safra besiyerine seçicilik özelliği kazandırırken ferrik sitrat demir kaynağı olarak işlev görür; eskülinin hidroliz ürünü ile reaksiyona girerek testin pozitif olduğunu gösterir.

Pek çok bakteri asidik şartlar altında eskülini hidrolize eder; bazı bakteriler de, özellikle gram negatif enterikler, safraya tolerans gösterirler. Buna karşın streptokoklar arasında, tipik olarak sadece enterokoklar ve *S. bovis* grup üyeleri (*S. equinus*, *S. gallolyticus*, *S. infantarius* ve *S. alactolyticus*) yüksek oranda safra varlığında ürer ve eskülini hidrolize ederler. Bu özelliklere sahip bir diğer gram pozitif mikroorganizma ise *Listeria monocytogenes*'tir (1).

# Teknik Bilgiler

## 1 Test için asgari laboratuvar koşulları

### 1.1. Laboratuvar güvenliği

Bu UMS'de bahsi geçen organizmalar ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart önlemler uygulanmalı, önlemler risk değerlendirmesi ile de desteklenmelidir. Aerosol oluşturması muhtemel tüm laboratuvar çalışmaları bir biyolojik güvenlik kabininde gerçekleştirilmelidir (ayrıca bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

### 1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) testten önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşına olmalı, ve; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

### 1.3. Örnek, Besiyeri, Donanım

#### Test mikroorganizmaları

- Taze kültürlerinden şüpheli izolatlar (ayırıcı tanısı için eskülin ve/veya safra-eskülin testi gereksinimi duyulan):
  - (a) *S. bovis* grup şüpheli izolat (katalaz negatif, gram pozitif, zincir yapmış kok)
  - (b) Enterokok şüpheli izolat – diğer PYR pozitiflerden ayırıcı tanı için
  - (c) *Listeria* şüpheli izolat (hemolitik, katalaz pozitif, gram pozitif çomaklar)
  - (d) Oksidaz pozitif gram negatif çomaklar (*Aeromonas* spp dahil) ve sarı pigmentli nonfermenterler – (safrasız) eskülin testi
- Pozitif kan kültürü – eğer mikroskopide gram pozitif kok zincirleri veya gram pozitif çomaklar görülmüş ise, enterokok veya *Listeria* olasılığı için hızlı (4 saat) bir ön tanı koyabilmek amacıyla

#### Besiyeri / Reaktif

- Safra-eskülin yatık agar veya plak besiyeri – ferrik ( $Fe^{3+}$ ) sitrat içerir. Piyasadan hazır temin edilebilir. Laboratuvarda hazırlanabilir.

**ÖNEMLİ:** Hazır veya toz besiyeri olarak **satın almadan önce** besiyerinin içerdiği safra oranına (%40 safra veya %4 oxgall olup olmadığı) bakılmalıdır. Bazı formüller daha düşük oranda safra içerir; bunlar amaca uygunluk açısından laboratuvar tarafından değerlendirilmelidir!

- Safra-eskülin azid agar/buyyon – ilave olarak azid (gram negatiflerin çoğu için inhibitör) içerir. Sulardan enterokok izolasyonunda kullanılır.

- 'Peptose-yeast-esculine' buyyon – anaeroblar ve mikroaerofiller için.
- Eskülin agar (kalp-infüzyon baz besiyerine %0.1 eskülin eklenmiş formül) – safra veya azid içermez; ancak ferrik ( $Fe^{3+}$ ) sitrat içerir.
- Hızlı eskülin testleri – Piyasada filtre kağıdına emdirilmiş veya tüpte hızlı test reaktifleri mevcuttur. Bunlardan bazıları PYR, LAP gibi diğer tanımlama parametreleri ile kombine olabilir.  
NOT: Bütün besiyerleri buzdolabında (2-8°C) saklanmalıdır.
- Eğer demir besiyerine katılmamış ise ayrıca reaktif olarak (%1'lik ferrik [ $Fe^{3+}$ ] amonyum sitrat) temin edilir.

#### Diğer gereç, donanım

- Öze, steril tek kullanımlık veya nikrom,
- Test tüpleri,
- Uzun dalga boylu (360 nm) UV lamba (Wood lambası),
- İnkübatör (35°C)

### 1.4. Kalite kontrol

- Her yeni besiyeri ve reaktif lotu kullanıma sokulmadan önce pozitif ve negatif kalite kontrol suşları ile test edilmelidir.
- Agar besiyerleri her kullanımdan önce donma, kuruma, kontaminasyon ve çatlak vb. için kontrol edilmeli, uygunsuz olanlar atılmalıdır.
- Ekim yapılmamış sıvı besiyerinin floresan verme durumu kontrol edilir.
- Kalite kontrol organizmaları (1):

*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 - safra-eskülin ve eskülin pozitif

*Escherichia coli* ATCC 25923 - safra-eskülin ve eskülin negatif

*Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 - safra-eskülin ve eskülin negatif

## 2 Testin uygulanması

### 2.1. Tüp testi

- Öze ile incelenecek bakterinin taze kültüründen tek düşmüş bir koloni alınır. Safra-eskülin (veya eskülin) agar (veya sıvı) besiyerine inoküle edilir.

ÖNEMLİ: Enterokok ve *S. bovis* tanımlaması için sadece %40 safra içeren besiyeri kullanılır ve 10-µL kalibreli öze ile -steril suda 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanmış bakteri süspansiyonundan- bir öze dolusu inoküle edilir (3).

- Tüpün kapağı gevşekçe kapatılır.
- 35°C'de 24 saat (yavaş üreyen gram negatifler ve anaeroblar 7. güne kadar) inkübe edilir; renk değişimi gözlenir. Enterokoklar ve *S. bovis* için sadece 18-24 saat inkübasyon sonrası değerlendirme yapılır.



- Eğer demir içermeyen eskülin buyyon kullanılıyorsa günlük olarak **floresan kaybı** takip edilir.

ÖNEMLİ: Karşılaştırma için paralel olarak inoküle edilmemiş bir kontrol tüpü de kullanılmalıdır. Floresan gözlenmediğinde tüpe 2-3 damla %1'lik ferrik amonyum sitrat ilave edilir ve renk değişimi gözlenir. İstenirse her gün tüpten bir alikot alınıp indikatör ilave ederek de eskülin hidrolizi olup olmadığı takip edilebilir.

### 2.2. Disk testi

- Disk bir damla distile veya deiyonize su ile ıslatılır.
- Steril bir öze ile bakterinin 18-24 saatlik taze kültüründen 2-3 tek düşmüş koloni alınır ve disk üzerine ezerek sürülür.
- Oda ısısında 10 dk bekletilir.
- Diskte koyu kahverengi veya siyah renk değişimi olup olmadığı gözlenir.

## 3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması

### 3.1. Tüp testi

- **Pozitif sonuç** -
    - (a) Demir içeren besiyerinde siyahlaşma görülmesi;
    - (b) Demir içermeyen besiyerinde demirli reagenin damlatılması ile siyah renk oluşması;
    - (c) UV lamba altına tutulduğunda besiyerinin floresan vermemesi
  - **Negatif sonuç** -
    - (a) Demir içeren besiyerinde siyahlaşma görülmemesi;
    - (b) UV lamba altında tutulduğunda besiyerinin floresan vermesi.
- NOT: Safra toleransı olmayan bakteriler, eskülini hidroliz yeteneğine sahip olsalar da, safra-eskülin besiyerinde üreyemezler ve negatif sonuç verirler.

### 3.2. Disk testi

- **Pozitif sonuç** – koyu kahverengi veya siyah renk gelişmesi
- **Negatif sonuç** – diskin renksiz kalması

## 4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Safra-eskülin agar kullanılırken, eğer inokulum fazla veya besiyerinin safra konsantrasyonu %40'dan az ise yanlış pozitif reaksiyonlar görülebilir.

- Birçok mikroorganizmanın metabolizması esnasında meydana getirebildiği H<sub>2</sub>S (hidrojen sülfür) de demir ile reaksiyona girerek siyah renk meydana getirir ve eskülin hidrolizi deneyinde karışıklığa neden olur. Bu durum göz önünde bulundurularak, gram negatif çomakların eskülin hidrolizi testinde reagen katıldıktan sonra meydana gelen siyahlaşmanın ayırımını yapabilmek için tüpler UV lamba altında da bakılmalıdır; yıkılmamış eskülin beyaz-mavi floresan verirken, eğer eskülin yıkılmış ise floresan vermez.
- *Escherichia coli* gibi bazı organizmalar indüklenabilir β-glikozidaz enzimine sahiptirler ve uzamış inkübasyonda eskülin reaksiyonu verebilirler ve yanlış pozitifliğe neden olabilirler.

## Kaynaklar

- 1 York MK, Traylor MM, Hardy J, Henry M. Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. Bile-Esculin and Esculin Tests. *In: Garcia LS (editor in chief). Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 3.17.5.1 - 3
- 2 MacFaddin JF, editor. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 2000, p. 8-26.
- 3 Chuard C, Reller LB. Bile-esculin test for presumptive identification of enterococci and streptococci: effects of bile concentration, inoculation technique, and incubation time. *J Clin Microbiol* 1998;36:1135-1136.



T.C. Sağlık Bakanlığı

# ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

## Gram boyama (Bakteriyel Patojenlerin Mikroskopik İncelemesi)

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Test Prosedürleri
Standart No	B-TP-03
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

## İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	3
GENEL BİLGİ .....	3
TEKNİK BİLGİLER .....	4
1 Test için asgari laboratuvar koşulları .....	4
2 Gram boyama için hazırlık .....	8
3 Gram boyamanın yapılması .....	11
4 Preparatların değerlendirilmesi/yorumlanması .....	12
5 Sonuçların raporlanması .....	15
6 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	17
EKLER.....	18
Ek-1 Stok solüsyonlar (Hucker'ın modifikasyonu) .....	18
Ek-2 Çalışma solüsyonları (Hucker'ın modifikasyonu) .....	19
Ek-3 Karbol fuksin modifikasyonu reaktifleri .....	20
Ek-4 Kopeloff'un modifikasyonu reaktifleri .....	21
KAYNAKLAR.....	22

## Kapsam ve Amaç

Gram boyama modern mikrobiyolojinin gelişmeye başladığı 19. yüzyıl sonlarından bu yana klinik laboratuvarların en temel inceleme aracıdır. Bakteriler Gram boyama özellikleri temelinde sınıflandırılırlar. Ayrıca Gram boyama enfeksiyöz etkene hızla ön tanı koyma imkânı sunan kritik bir testtir.

Bu UMS'nin amacı Gram boyanın dayandığı prensipleri özetlemek; laboratuvarların en yaygın başvurduğu -ancak kalite gerekleri ve sonuçların yorumu bakımından yeterince önem atfetmedikleri- bu değerli primer tanımlama aracının doğru uygulanması ve yorumlanması için bir rehber sunmaktır.

## Kısaltmalar ve Tanımlar

**Renk giderme** Boyama prosedüründe boyanın uzaklaştırılması işlemi

**Renk giderici** Boyama prosedüründe renk giderme için kullanılan alkol, aseton gibi maddelerin genel adı

## Genel Bilgi

Gram boyama mikrobiyoloji laboratuvarlarında en sık kullanılan işlemlerden biridir. Gram boyama ile hem klinik örneklerden direkt ön tanıya varılabilir, hem de kültürlerde üreyen bakterilerin temel morfolojik özelliklerini değerlendirmek mümkün olur. Bakteriler hücre duvarlarının yapı özelliklerine göre "gram pozitif" veya "gram negatif" boyanırlar (1,2).

Gram pozitif türler hücre duvarlarında kalın bir peptidoglikan tabaka ile büyük miktarda teikoik asitlere sahiptir. İşlem için uygulanan ilk madde 'kristal viyole' (gentian viyole) boyasıdır ve bu boya, takiben eklenen zayıf iyot solüsyonunun sabitleştirici etkisiyle bakteri hücre duvarına tutunur; öyle ki, renk giderme işleminden etkilenmez, boya hücrede kalır ve bakteri koyu-menekşe rengi görünür.

Gram negatif türler ise proteinler de içeren bir lipopolisakkarit-fosfolipid dış membrana yapışık ince bir peptidoglikan tabakaya sahiptir. Gram boyama sırasında dış membran renk giderme işleminde alkol etkisi ile hasar görür ve kristal viyole-iyot kompleksini bırakır; hücre renksizleşir. Hücre son işlem adımında kullanılan bir zıt boya (safranin, karbol fuksin vb.) ile boyanır ve zıt boyanın renginde (pembe) görünür.

Gram boyama tekniği ilk olarak 1884'de H. Christian Gram tarafından geliştirilmiştir. O tarihten bu yana, daha yüksek reaktif performansı ve farklı bakteri tiplerinde başarılı sonuç almak için pek çok modifikasyonu üretilmiştir (3).

**Hucker'ın modifikasyonu** rutin çalışmada en yaygın kullanılan tekniktir. Seçilen renk giderici maddeye göre renk giderme süresi değişir. Aseton-alkol iyi sonuç verir, ancak az deneyimli personel veya öğrenci uygulamalarında %95'lik etanol tercih edilmelidir. Aseton en hızlısıdır, ancak tekrarlanabilirlik aralığı dardır ve sadece çok deneyimli personel tarafından kullanılması önerilir. Bu boyama tekniği özellikle kayda değer sayıda konak hücresi içeren örneklerde kullanışlıdır (2).

**Kalbol fuksin modifikasyonu**, zıt boya aşamasına kadar Hucker'ın modifikasyonuna benzer; zıt boya olarak ise safranin yerine karbol fuksin veya bazik fuksin kullanılır. Bu modifikasyon özellikle *Legionella* spp, *Campylobacter* spp, *Brucella* spp gibi zayıf boyanma özelliğindeki bazı gram negatif bakterilerde kullanışlıdır. Zıt boya genellikle daha uzun bir süre boyunca uygulanır.

**Kopeloff'un modifikasyonu**, anaerobların boyanmasında önerilmektedir. Çünkü anaeroblar Hucker'ın yöntemi ile boyandıklarında aşırı renk kaybı olabileceği için soluk görünürler ve iyi ayırt edilemezler. Kopeloff'un tekniği anaerobların iyi boyanmasına ve ayırt edilmesine uygun bir tekniktir. Bakteriyel vajinoz tanısında vajinal örnek yaymalarından Gram boyaması yapılmak isteniyorsa, Kopeloff'un tekniği özellikle önerilir.

**Gram boyalı preparatların değerlendirilmesi** mikroskopik inceleme ile yapılır. Bu değerlendirmede bakterinin boyanma özellikleri ile beraber bakteri hücrelerinin şekli (kok, çomak, kıvrık vb.), büyüklüğü ve bir arada bulunuş özelliklerine de (zincir, kümeler, ikişerli, dörtlü gruplar, Çin harfleri görünümü vb.) bakılır. Bakterilerin Gram boyanma özelliklerinin çeşitli faktörlerden etkilenebileceği akılda tutulması gereken önemli bir husustur. Bunlar kültürün yaşı, besiyerinin niteliği, inkübasyon atmosferi, boyama tekniği ve bakteri hücrelerinin antibiyotiklere ya da diğer inhibitör maddelere maruz kalmış olması gibi faktörlerdir. *Örneğin*, gram pozitif bir bakterinin hücre duvarı benzer faktörlerin etkisi ile hasar görmüş ise gram negatif bir bakteri gibi boyanabilir. Benzer bir değerlendirme yaklaşımı klinik örneklerden yapılmış boyalı preparatlara da uygulanır; ancak burada konak hücre tiplerinin özellikleri ve fagositoz faktörü de göz önüne alınmalıdır (2).

## Teknik Bilgiler

### 1 Test için asgari laboratuvar koşulları

#### 1.1. Laboratuvar güvenliği

Bu UMS'de bahsi geçen organizmalar ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Daima standart önlemler uygulanmalı, önlemler risk değerlendirmesi ile de desteklenmelidir. Aerosol oluşturması muhtemel tüm laboratuvar çalışmaları bir biyolojik güvenlik kabininde gerçekleştirilmelidir (ayrıca bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi")!

**Güvenlik uyarısı!** Gram boyamada renk giderme için kullanılan maddeler (etanol veya aseton) parlayıcıdır! Alevden ve aşırı ısıdan uzak tutulmalıdırlar!

Boyanmış olsun veya olmasın bütün lamalar **kesici-delici atık** kabul edilir ve kesinlikle kesici-delici atık kutusuna atılırlar! Diğer biyolojik kirlilerin bulunduğu torbalara atılmaları halinde torbayı deler ve ciddi infeksiyöz risk doğururlar!

#### 1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) testten önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşına olmalı ve; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

### 1.3. Örnek, Besiyeri, Donanım

#### İnceleme örnekleri

- Katı besiyerlerinde üreyen koloniler – ideal sonuç almak için inhibitör içermeyen besiyerinde ve genç kültürleri (<24 saat) kullanılmalıdır. Eğer morfoloji önemli ise (örn., streptokoklar ve gram-pozitif çomaklarda olduğu gibi) sıvı kültürler tercih edilmelidir.
- Buyyon kültürleri ve kan kültürleri – hem üremenin hem de üreyen bakterinin Gram reaksiyonu ve morfolojisinin değerlendirilmesi için
- Klinik örneklerin direkt preparatları – *özellikle* yara, göz lezyonları, doku ve bazı akıntı örneklerinden preparat yapılması ön tanı açısından kullanışlıdır.

ÖNEMLİ NOT: *Genellikle* boğaz, burun, kistik fibrozlu hastaların balgam örnekleri ve protez materyalinden preparat yapılması önerilmez!

NOT: Gram boyama için preparat genellikle laboratuvarında hazırlanır. Ancak klinik örneğin laboratuvara ulaşması gecikecekse veya örnek bir taşıma besiyerine konacağı için örneğin yapısı değişecekse preparat örneğin alındığı birimde hazırlanmalı, sabitlenmeli ve lamlar laboratuvara iletilmelidir.

RET KRİTERLERİ: Dışkı, kan ve boğaz sürüntüleri Gram boyama ile direkt **incelenmez!** Tanısal değeri yoktur. Kistik fibrozlu hastaların balgam örneklerine de Gram boyama **yapılmaz!** Boyama kateter ucu örneklerinin standart inceleme protokollerinde de yer almaz (2).

#### Reaktifler

- Gram boyama reaktifleri piyasadan hazır temin edilebilir veya toz maddelerinden laboratuvarında hazırlanabilirler (bzk. Ek 1-4).
- Gram boyamada kullanılan reaktiflerin basit bir listesi şu şekildedir:
  1. Metanol, saf – Preparat sabitleme için
  2. Kristal viyole – Hucker'ın modifikasyonu, Kopeloff'un kristal viyolesi
  3. İyot – Gram'ın iyodini, Kopeloff'un iyodini
  4. Renk giderici:
    - (a) Yavaş - etanol, %95
    - (b) Orta hızlı - aseton-alkol (aseton ve %95 etanol 50:50 karıştırılır, koyu renk şişede, oda sıcaklığında saklanır. Raf ömrü 1 yıl).
    - (c) Hızlı - aseton (analitik saflıkta)
  5. Zıt boya:
    - (a) Safranin,
    - (b) Karbol fuksin,
    - (c) Bazik fuksin (%0.8, %0.1 veya %0.2'lik),
    - (d) Kopeloff'un safranini
- Laboratuvar büyük miktarda Gram boya tüketiyorsa, **stok solüsyon** hazırlanması ve **çalışma solüsyonunun** gerektiğiçe yapılması önerilir. Bu verimlilik ve lot içi standart ürün güvencesi sağlar.

- Değişik Gram boyama uygulamalarında kullanılan reaktifler kullanımları ile birlikte Tablo 1'de özetlenmektedir. Genel bakteriyolojide en çok kullanılan Gram boyama tekniğinin stok solüsyonları Ek-1'de, çalışma solüsyonlarının hazırlanması Ek-2'de verilmiştir. Diğer Gram boyama tekniklerinin (Karbollu fuksin ve Kopeloff'un modifikasyonu) çalışma solüsyonlarının hazırlanması sırasıyla Ek-3'de ve Ek-4'de verilmiştir.

### Diğer gereç, donanım

- Önceden temizlenmiş lamalar (25x75 mm) – tercihen kenarı rodajlı,
- Mumlu kalem - lam bölme için,
- Kurşun kalem - lamın rodajlı kenarına örnek no vb. yazmak için,
- SF (%0.85 NaCl) veya su, steril
- Öze, steril tek kullanımlık veya nikrom, veya steril kürdan,
- İmmersiyon yağı
- Mikroskop, binoküler (rutin ışık mikroskobu) – 10x düşük, 40x yüksek kuru, 100x immersiyon objektifleri ve 10x oküleri olan tercih edilir.

NOT: Bazı mikroskopistler 5x oküler tercih etmektedir. Ancak 5x oküler daha az büyütme sağlar ve inceleme duyarlılığını düşürür; bu nedenle 10x oküler kullanılması önerilmektedir (4).

- Vorteks
- Bunzen beki veya mikroinsineratör
- Sitospin santrifüj (gereken durumlar için)
- Biyolojik atık kapları, kesici-delici atık kabı ve toksik boya atıklarını toplamak için kap (kimyasal atık kabı)

## 1.4. Kalite kontrol

### Günlük kontrol

- Boyaların görünümü günlük olarak kontrol edilir. Eğer kristal viyole boyasında çöküntü veya kristaller varsa kullanmadan önce yeniden filtre edilmelidir.
- Buharlaştırma boyaların etkinliğini bozabilir. Çalışma solüsyonu günlük kullanımlar ile tüketilemiyorsa, düzenli aralıklarla değiştirilmelidir.
- Çalışma solüsyonu şişeleri de tekrar kullanılmamalı ve en az ayda bir kez değiştirilmelidir.
- Boyalar kontamine olabilir. Eğer kontaminasyon saptanırsa boya *kesinlikle* değiştirilmelidir.

### Boya reaktiflerinin kalite kontrolü

- Gram boyama reaktiflerinin her yeni lotu kullanıma sokulmadan önce ve ayrıca en az haftada bir kalite kontrol suşları kullanılarak ve *laboratuvarın rutin test prosedürü ile* test edilmelidir (bkz. Kutu-1).
- Kalite kontrol organizmaları:

*Escherichia coli* ATCC 25922 – Gram negatif çomak, pembe

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 – Gram pozitif kok, koyu mor

NOT: Kalite kontrol için bu standart suşlar yoksa eşdeğer veya bilinen diğer gram pozitif ve gram negatif laboratuvar suşları da kullanılabilir.



- Gram boyama tecrübesi olmayan veya az olan personel ile çalışılıyorsa, pozitif ve negatif kontrol suşları ile her gün kontrol boyaması yapılması ya da en azından her hasta örneği boyanırken paralel olarak kontrol preparatlarının da boyanması önerilir. Kontrol preparatlarının hazırlanması için Kutu-1'de özetlenen prosedür kullanılabilir.

### Sorun giderme prosedürleri

- Preparatlar kötü boyanıyor (ör., zayıf boyanmış gram pozitifler, koyu boyanmış gram negatifler, sadece kenarları boya almış yayma, alanda artefaktlar görülmesi vb.) veya değerlendirme sorunları yaşıyor ise laboratuvar *sorun giderme prosedürlerini* uygulamaya koymalıdır.
- Kötü boyanma yaymanın yapılaş şekline, reaktiflere veya boyama işlemine bağlı olabilir. Boyama sorunlarının en sık nedenleri:
  - (a) Önceden temizlenmemiş, yağ kalıntıları olan lam kullanılması,
  - (b) Yaymanın kalın olması,
  - (c) Isı ile sabitleme (fiksasyon) sırasında aşırı ısıtma,
  - (d) Yıkama basamaklarında aşırı yıkama yapılması, özellikle eğer yeterli sabitlenmemiş ise,
  - (e) Reaktiflerde çökelti olması

### KUTU-1

#### Gram boyama için kalite kontrol lamalarının hazırlanması

1. İki adet steril tüp alınır. Her birine ~1mL steril serum fizyolojik konur.
2. Her bir kalite kontrol suşunun taze kültüründen hafif bulanık süspansiyonlar hazırlanır.
3. Temiz bir lama süspansiyonlardan birer damla konur ve damlalar ~1cm çapında olacak şekilde yayılır. Bu şekilde çok sayıda lam hazırlanır.
4. Lamalar havada kurutulur.
5. Metanol ile sabitlenir ve saklamak için -20°C'ye kaldırılır.
6. Kalite kontrol için, bu hazır lamalardan alınır ve laboratuvarın uygulamakta olduğu Gram prosedürü ile boyanır.
7. Beklenen sonuçlar:
  - a) Gram-negatif çomaklar, pembe
  - b) Gram-pozitif koklar, koyu-menekşe

### Değerlendirme doğruluğunu sağlama prosedürleri

- Değerlendirmelerin doğru olmasını sağlamak için, Gram boyama sonuçlarını 'gözden geçirme sistemi' kurulmalıdır. Gözden geçirme sisteminin gerekleri olarak;
    - (a) Her gün laboratuvarın Sorumlusu da bazı preparatlara bakmalıdır. Bu, hem uygulayıcı personelin eğitim ihtiyaçlarını belirlemeye hem de sonuçların klinik bilgi ile ilişkilendirilmesine yardımcı olur.
    - (b) Klinik örneğin kültür sonuçları da Gram boyama sonuçları ile karşılaştırılmalıdır. Böylece; yaymada görülen bakterilerin kültürde üreyip üremediğine bakılır, *ya da*, yaymada görülmeyen bir organizmanın kültürde ürediği saptanır ki bu durum karşısında preparat ve kültürün yeniden değerlendirilmeleri gerekir.
- NOT: Yaymada gözlenen bütün organizmalar kültürde üremeyebilirler.
- Laboratuvarın bir referans yayma seti bulundurması hem eğitim hem de karşılaştırmalar için idealdir.

## 2 Gram boyama için hazırlık

### 2.1. Preparat hazırlanmasında genel hususlar

- Preparatın düzgün hazırlanması önemlidir. Düzgün hazırlanmış preparatta yayma uygun kalınlıkta, tek bir tabaka oluşturacak şekilde, organizmalar yeterince yoğun fakat karakteristik düzenlenişlerini gözlemleyebilmek için de yeterince seyrek dağılımda olabilmelidir.
- Lamlar tercihen bir kenarı rodajlı (buzlu) tipte olmalıdır.
- Daima iyi temizlenmiş bir yeni lam kullanılır. En iyi sonuç alkolde (%95'lik) tutulan lamlar ile elde edilir; lam bir penset ile tutularak alkolden çıkarılır; fazla alkol süzdürülür, alevden geçirilir.

### 2.2. Klinik örneklerden preparat hazırlanması

#### Eküvyon ile alınıp gönderilmiş örnekler

- Eküvyon lam üzerine, hücresel elemanları tahrip etmekten ve bakterilerin konumlanışını bozmaktan çekinerek, nazıkçe sürülür.
- Eğer aynı eküvyon kullanılacaksa, *daima* önce kültür vasatları inoküle edilmeli, sonra preparat hazırlanmalıdır.

NOT: İyi bir yayma yapabilmek için -biri kültüre, biri preparata kullanılmak üzere- iki eküvyon ile örnek alınmış olması tercih edilir.

- *Alternatif olarak* (tek eküvyon varsa) eküvyon az miktarda steril SF içeren bir tüpe konur, kapağı kapatılır ve vortekslenir. Eküvyon tüpün kenarında sıkıştırılarak süzülür ve yayma hazırlamak için lamın üzerine sürülür. Tüpte kalan süspansiyon da kültür ekimi için kullanılır.

**Güvenlik uyarısı!** Asla bir tüp ağzı kapaksız iken vortekslenmez!

#### Aspirat, eksuda, balgam örnekleri

- Eğer örnek bir enjektör içinde gelmiş ise önce bütün kültür plaklarına birer damla aktarılır, en son olarak da bir lam üzerine bir damla örnek konur. Steril bir öze ile ince bir tabaka oluşturacak şekilde yayılır.

**Güvenlik uyarısı!** İğnesi takılı enjektör ile gönderilmiş örneklerde iğne yaralanması (kesici-delici maruziyeti) riski çok yüksektir. İğne takılı enjektör kabul edilmez! Laboratuvar "ret politikası"nı bu yönde oluşturmalı, ilgili tüm tıbbi personel de laboratuvara gönderilmeden önce enjektör iğnesinin çıkarılması konusunda eğitilmelidir.

- Balgam veya cerahat örneğinin pürülan veya kanlı kısımları belirlenir ve bu kısımlardan steril bir öze ile bir parça alınır. Lam üzerine ince bir tabaka oluşturacak şekilde yayılır. Eğer örnek aşırı kalın veya pürülan ise yaymanın rahat yapılabilmesi için lam üzerine bir damla steril SF konur. *Alternatif olarak* **ince-yayma** yapılabilir. Bunun için örnek lam üzerine konur; üzerine ikinci bir lam kapatılır ve bastırılır, sonra lam diğerinin üzerinden kaydırarak çekilir. Lamın kenarları dezenfektanlı kâğıt havlu ile -taşmış örnek kısımlarını uzaklaştıracak şekilde- silinir.

### Vücut sıvıları, BAL, BOS

- Örnek önce santrifüj edilir (2000 rpm, 20 dk). Steril bir Pastör pipeti ile -tüpün dibinde 0.5 mL sediment kalacak şekilde- süpernatant steril bir tüpe aktarılır. Sediment vortekslenir. Kesinlikle pipet ile karıştırılmaz! Bir damla sediment lam üzerine aktarılır. Yayılmaz. Kurumaya bırakılır.  
ÖNEMLİ: Eğer örnek yoğunluğunun artırılması gerektiği düşünülüyorsa ikinci bir damla kurumuş olanın üzerine konur ve kurumaya beklenir.
- *Alternatif olarak* santrifüj işlemi sitospin ile yapılır. Bunun için bir sitospin kamarasına 5-6 damla örnek ve 1 damla %37'lik formalin konur. İşlem için cihazın önerdiği prosedür izlenir.  
NOT: Vücut sıvılarını yoğunlaştırmak için sitospin lam santrifüjü kullanılması Gram boyamanın duyarlılığını artırır, standart santrifüj işlemi ve inceleme için gereken zamanı kısaltır, daha hızlı sonuçlanır.
- Eğer örnek çok bulanık veya kıvamlı ise ya da yoğunlaştırma işlemi için miktarı çok az ise bir-iki damla örnek doğrudan lam üzerine, mumlu kalem ile işaretlenmiş alana konur. Yayılmaz. Kurumaya bırakılır.

### İdrar

NOT: İdrardan genellikle Gram boyama yapılmaz. Ancak yapılmasının gerekli olduğu durumda aşağıdaki adımlar izlenmelidir.

- Lam üzerinde mumlu kalem ile bir alan çizilir.
- Santrifüj edilmemiş, iyice karıştırılmış idrar örneğinden 10 µL bu alana konur, havada kurutulur.

### Biyopsi örnekleri, doku parçaları

- Biyopsi materyali steril bir Petri kabına konur. Steril makas veya bisturi ile küçük parçalar halinde kesilir.
- Steril bir penset ile bir parçanın bütün yüzleri steril bir lam yüzeyinin bir veya birden fazla yerine -bastırılarak- dokundurulur (dokunma preparatı; 'impression smears'). Birden fazla parça bu şekilde kullanılabilir. İnceleme kolaylığı için dokunmuş grupları yapılabilir.  
NOT: Preparat hazırlama öncesi dokuların homojenizasyonu veya öğütme hücre yapılarına ve bakterilerin düzenlenişine zarar verebilir. Bu nedenle dokunma preparatı tercih edilir. Ancak başka seçenek yoksa lam üzerine homojenatın bir damlası konur ve ince bir tabaka elde edecek şekilde yayılır.
- Eğer örnek yumuşak bir doku parçası veya kalın bir eksuda ise yukarıda tarif edildiği gibi bir **ince-yayma** preparatı hazırlanabilir (bkz. "Aspirat, eksuda, balgam örnekleri").

### Kurumuş veya çok az miktarda olan klinik örnekler

- Örnek 0.5 mL buyyon içine konur. Vorteklenir.
- Steril bir Pastör pipeti ile temiz lam üzerine 1 damla konur.
- Damla steril bir öze veya kürdan ile ince bir tabaka elde edilecek şekilde lama yayılır.

## 2.3. İzolatlardan preparat hazırlanması

### Sıvı kültür

- Steril bir Pastör pipeti ile sıvı kültürden bir damla lam üzerine aktarılır.

ÖNEMLİ: Kan kültürü şişelerinden örnek almada -iğne ve enjektör işlemlerinden kaçınmak için- havalandırma iğnesi veya enjektör adaptörü kullanılmalıdır.

NOT: Boyama sırasında "kurumuş" sıvının bir alandan öbür alana sürüklenmesinden kaçınmak için lam başına bir yayma hazırlanır.

- Damla düzgün bir ince tabaka elde edilecek şekilde yayılır.

NOT: Besiyeri kömür içeriyorsa kan kültürü yayması hematolojinin kan sayımı yaymaları gibi yapılır; bunun için ikinci bir lam, ince bir tabaka halinde yaymak üzere örnek üzerine 45° açı ile konur ve çekilir.

### Agar plakta kültür

- Lam üzerine bir damla steril su veya serum fizyolojik konur. Distile su fragil organizmaların hücre morfolojisini bozabilir.
- Steril öze ile koloniden küçük bir kısım alınarak yumuşak bir şekilde damlaya karıştırılır. Hafif bulanık, homojen bir görünüm elde edilmelidir.

NOT: İyi bir sonuç için damla büyüklüğü, yayma alanı büyüklüğü ve inokulum miktarı iyi ayarlanmalıdır. Eğer yayma kurduğunda karıştırma çizgileri belirgin görünüyorsa inokulum fazla, damla küçük veya yayma alanı çok küçük demektir.

## 2.4. Preparatların sabitlemesi

- Sabitleme işlemi lamlar tam olarak kurduktan sonra yapılır.
- Lamlar, biyolojik güvenlik kabininin içinde düz bir zemin üzerinde kurumaya bırakılabileceği gibi özel lam kurutma ısıtıcıları üzerinde de 55-60°C'de ısıtılarak kurutulabilir.

### Isı ile sabitleme

- Daha çok izolatlardan hazırlanmış preparatlara uygulanır.
- Kurumuş lam bir pensetle rodajlı kısımdan tutulur ve Bunzen beki alevi üzerinden iki-üç kez geçirilir *ya da* mikroinsineratör önünde 5-10 sn tutulur. Her iki işlemde de lamı aşırı ısıtmaktan kaçınılmalıdır.
- Boyamaya geçmeden önce lamın soğuması beklenmelidir!

### Metanol ile sabitleme

- *Alternatif* yöntemdir; özellikle klinik örneklerden yapılmış preparatlarda kullanılır. Metanol ile sabitleme eritrosit lizisini önler, daha temiz bir zemin sağlar ve sıvı örneklerde lamdan kopma/kayma olasılığını önler.
- Uygulama için; kurumuş lam üzerine birkaç damla metanol damlatılır. 1 dk beklenir ve sonra lam eğilerek -herhangi bir yıkama yapmaksızın- metanol lamın üzerinden uzaklaştırılır, havada kurumaya bırakılır.

**Tablo 1.** Gram boyama modifikasyonları - reaktifler, zamanlama ve kullanımları (2).

Boya, kullanımı	Hucker		Karbolfuksin		Kopeloff	
	Reaktif	Süre	Reaktif	Süre	Reaktif	Süre
İlk boya	Kristal viyole	30 sn	Kristal viyole	30 sn	Alkali kristal viyole: solüsyon A ile kaplanır; 5 damla solüsyon B eklenir.	2-3 dk
İyot	Gram'ın iyodini	30 sn	Gram'ın iyodini	30 sn	Kopeloff'un iyodini	≥ 2 dk
Renk giderici	Aseton-alkol	1-5 sn	%95'lik etanol	30 sn	3:7 aseton-alkol: Uygulanır ve hemen döküp yıkanır.	
Zıt boya	Safranin*	30 sn	Karbolfuksin veya %0.8'lik bazik fuksin	≥ 1 dk	Kopeloff'un safranini	10-30 sn
Önerilen kullanım	Genel bakteriyoloji		<i>Campylobacter</i> spp <i>Legionella</i> spp, <i>Brucella</i> spp, <i>Bacteroides</i> spp, <i>Fusobacterium</i> spp ve diğer zayıf boyanan gram negatif bakteriler		Anaeroblar, bakteriyel vajinoz tanısı	

\* Bazı laboratuvarlar zıt boya olarak %0.1 - %0.2'lik bazik fuksin tercih ederler. sn, saniye; dk, dakika

### 3 Gram boyamanın yapılması

**ÖNEMLİ:** Boya, su ya da renk giderici doğrudan örnek alanının üzerine uygulanmamalıdır. Reaktif önce lamın rodajlı kısmına yakın konmalı, buradan yaymanın üzerine doğru yavaşça akması sağlanmalıdır.

**NOT:** Çalışma solüsyonlarının yapılışı için Ek-2, Ek-3 veya Ek-4'e bakınız

#### 3.1. Hucker'ın modifikasyonu

- Boyanmaya hazır, sabitlenmiş lam(lar) bir boya standına yerleştirilir.
- **Kristal viyole** solüsyonu lam üzerine konur; 30 sn beklenir.
- Kristal viyole akıtılır ve lam çok yumuşak akan çeşme suyu ile yıkanır.

**ÖNEMLİ:** Fazla yıkama gram pozitiflerin kristal viyoleyi bırakmasına neden olabilir. Yıkama sırasında suyun akıp gitmesi için lam hafif açılı tutulmalıdır. *Alternatif bir yol;* akan çeşme suyunun altına konmuş bir behere lamı 5 sn daldırarak yıkama yapmak olabilir (3).

- **İyodin** solüsyonuyla lam kaplanır; 30 sn beklenir ve çok yumuşak akan çeşme suyu ile yıkanır.
- **Renk giderme** işlemi lam açılı bir şekilde tutulurken uygulanır. Renk giderici hafifçe yayma üzerine akıtılır; rengin açıldığı görülür görülmez uygulama durdurulur. Süre, kullanılan renk gidericinin tipine (alkol, aseton, karışım vb.) ve yaymanın kalınlığına göre ayarlanmalıdır.
- Renk gidericinin fazlası da yumuşak bir şekilde çeşme suyu ile yıkanır.
- **Safranin** (zıt boya) ile lamın üzeri kaplanır; 30 sn beklenir.

**NOT:** Zıt boya olarak %0.1 veya %0.2'lik bazik fuksin de kullanılabilir.

- Safranin de çok yumuşak akan çeşme suyu ile yıkanır.
- Lam üzerindeki su iyice süzdürülür ve dik konumda havada kurutulur. Mikroskopta incelenir.

### 3.2. Karbol fuksin modifikasyonu

- Bu prosedür özellikle zayıf boyanma özelliğine sahip gram negatifler için önerilir.
- Prosedür Hucker'ın modifikasyonu ile benzerdir. Farklılıkları (Tablo 1):
  - (a) Renk giderici olarak %95'lik etanol tercih edilir;
  - (b) Zıt boya olarak karbol fuksin veya %0.8'lik bazik fuksin kullanılır;
  - (c) Zıt boya uygulama süresi 1 dakikadan uzun olup organizmaya göre değişebilir (bkz. Tablo 1)

### 3.3. Kopeloff'un modifikasyonu

- Lam solüsyon A (kristal viyole) ile kaplanır. Üzerine 5 damla solüsyon B (%5'lik sodyum bikarbonat) konur. Karıştırmak için lamın kenarına hafifçe vurulur. 15-30 sn beklenir. Süre 2 dakikaya kadar uzatılabilir fakat boyanın kurummasına kesinlikle izin verilmemelidir.
- Lam yumuşak bir şekilde Kopeloff'un iyodini ile yıkanır. Ardından lamın üzeri Kopeloff'un iyodini ile kaplanır ve en az 2 dk beklenir.
- Lam yatık pozisyonda iken renk giderici uygulanır ve hemen yıkanır.
- Kopeloff'un safranini ile en az 30 sn zıt boyama yapılır. Çok yumuşak akan su ile safranin yıkanır.  
NOT: %0.8'lik bazik fuksin de zıt boya olarak kullanılabilir.
- Lamın suyu iyice süzdürülür ve dik konumda havada kurutulur.

## 4 Preparatların değerlendirilmesi/yorumlanması

### 4.1. Klinik örnek preparatlarının incelenmesi

#### **Mikroskopta 10× objektif ile inceleme (ön değerlendirme)**

- Preparat önce mikroskobun düşük büyütmesinde (10× objektif, 10× oküler = ×100 büyütme) incelenir; boyamanın kalitesine, kristaller olup olmadığına, hücrelerin düzgün dağılım gösterip göstermediğine bakılır.
- Eğer aşırı kristal görülüyorsa yeni bir preparat hazırlanmalı ve taze filtre edilmiş kristal viyole ve zıt boya ile boyanmalıdır. *Alternatif olarak* yaymaya renk giderme işlemi uygulanır ve yeniden boyanır.
- Renk giderme işleminin uygun yapıp yapılmadığı değerlendirilir. Örnek cinsine de bağlı olarak zemin genellikle temiz veya gram negatiftir. Beyaz kan hücreleri (varsa) tamamen gram negatif görünüyor olmalıdırlar. Eğer lam aşırı soluk görünüyorsa, renk giderme işlemi tekrarlanır ve lam yeniden boyanır!

- Yayma kalınlığı değerlendirilir. Yeterli bir inceleme yapılabilmesi için alanlar bir hücre kalınlığından daha kalın olmamalı, üst üste binmiş hücreler bulunmamalıdır. Eğer yayma okunamayacak kadar kalın ise yeni preparat hazırlanmalıdır!
- Alanlar özellikle inflamasyon (yangı) bulguları açısından değerlendirilmelidir. Bu amaçla küçük büyütmede çok sayıda alana (idrara için 10, diğerleri için 20-40 alan) bakılır; pürülan kısımlar, inflamasyon hücreleri veya nekroz, hücre debris, mukus içeren kısımlar olup olmadığı, düz epitel hücrelerinin ve normal mikrofloranın varlığı (kontaminasyon) incelenir. Organizmaların dağılımına bakılır. Özellikle diğer mikrobiyal formlar (parazit elemanları, mantar hif yapıları vb.) en kolay küçük büyütmede yakalanabilir.
- Eğer hücreler varsa, beyaz kan hücreleri ve epitel hücreleri 20-40 alanda sayılmalı ve ortalama sayı not edilmelidir.

### Mikroskopta 100× (immersiyon) objektif ile inceleme

- Gram yaymaların nihai incelemesi yüksek büyütmede, mikroskopun 100× immersiyon objektifi (×1000 büyütme) altında yapılır.
- İnflamasyonun belirgin olduğu pürülan alanlar yakından incelenir. Böyle 20 ila 40 alan taranmalıdır.
- Hem hücre morfolojilerine hem de Gram reaksiyonlarına bakılır.
- Normalde steril vücut bölgesi örneği incelenirken, eğer preparatta organizma görülüyor veya çok nadir rastlanıyor fakat örnek pürülan görünüyor ise preparat daha detaylı incelenmelidir.

### Preparatların saklanması

- Preparatlar en azından kültür sonuçları çıkana kadar -tekrar değerlendirme vb. için- saklanmalıdır.
- Kısa süreli saklama için preparat üzerindeki yağ hif bırakmayan bir kâğıt mendil ile silinir.
- Eğer tekrar boyamak isteniyorsa veya Gram boyama ile elde edilen bulguların başka bir boya ile doğrulanması düşünülüyorsa immersiyon yağı ksilen ile temizlenir ve renk giderme işlemi uygulanır, sonra yeniden boyanır.
- Preparat arşivi oluşturmak veya eğitim amaçlarına yönelik daha uzun süreli saklamalarda immersiyon yağı ksilen ile silindikten sonra boyanın renginin solmaması için lam bir koruyucu ile kaplanır; ışıktan korunarak saklanır.

## 4.2. Kültürlerden yapılan preparatlarının incelenmesi

- Organizmaların morfolojileri tanımlanır (ör., gram pozitif kok kümeleri vb.)
- Gram boyanma morfolojisi temelinde, diğer özellikleri de (koloni görünümü; aerob-anaerob vb. üreme şartları; yapılmış ise hızlı biyokimyasal test sonucu vb.) göz önünde bulundurularak organizmanın ön tanısı konur.

### 4.3. Bakteriyel morfoloji bulgularının yorumlanması

#### Gram reaksiyonu

Gram reaksiyonunun yorumlanmasında aşağıdaki olasılıklar söz konusudur:

- Gram pozitif – koyu mor/menekşe rengi.
- Gram negatif – pembe veya kırmızı.  
*Zıt boya olarak karbol fuksin daha yoğun bir renk verir.*
- Gram değişken – gram negatiflikle birlikte kısmi gram pozitiflik.  
*Bu durum yayma kalınlığının düzensiz olması, aşırı veya tamamlanmamış renk giderme, hücre duvarı hasarı ya da yapısal olarak gram değişken organizmaların varlığında gözlenebilir.*
- Gram nötral – boyaların hiç birinin alınmamış olması durumu.  
*Gram negatif zeminde ve belki hücre-içi konumda renksiz hücrelerin gözlenmesi. Bu durum klinik örnek yaymalarında Mycobacterium spp, Legionella spp veya fungal elemanlar, bulunması halinde gözlenebilir.*
- Boyanma özelliği – eşit, bipolar, boncuklu, kesikli, çubuklu, düzensiz olabilir.

#### Hücre şekilleri

Hücre şekillerinin yorumlanmasında aşağıdaki olasılıklar söz konusudur:

- Hücre – kok, kokkoid, kokobasil, çomak, filament, maya benzeri olabilir.
- Uçların görünümü – yuvarlak, konik, basık, şiş veya konkav olabilir.  
*Uçların şişliği spor varlığına bağlı olabileceği gibi vakuollerle de ilişkili olabilir.*
- Yanların görünümü – paralel, ovoid, konkav veya düzensiz olabilir.
- Eksen yapısı – düz, kıvrık, spiral vb. olabilir.
- Pleomorfizm – şekilleri değişken olabilir (ör., difteroidler)  
*Çin harfleri gibi ya da açısız düzenlenmeler gösteren (V, L gibi), pleomorfik, düzensiz boyanmış, gram pozitif bakterileri tanımlayıcı olarak 'difteroid' veya 'korineform' terimleri kullanılır.*
- Diğer - Dallanmalar yapmış veya hücresel uzantıları olan

#### Görelî büyüklükleri

Bir eritrositin ortalama büyüklüğü 7 µm, nötrofiller içindeki sitoplazmik granüllerin büyüklüğü 0.2-0.3 µm'dir. Bu büyüklükler yakın konumdaki mikroorganizmaların büyüklüklerini değerlendirmek için referans alınabilir.

- Hücre – minik (<0.3 µm), küçük (0.3-0.5 µm), orta veya büyük olabilir.
- Uzunluk – kısa (0.5-1.0 µm), orta, uzun, filamentöz (10-30 µm) olabilir.
- Genişlik – ince, orta, kalın olabilir.
- Pleomorfik – boyutları değişken olabilir.



### Karakteristik konumlanış

- Tek tek, çiftler halinde, zincir, tetradlar, kümeler, parmaklık gibi, Çin harfleri gibi, paketler, açılabilir formlar vb. halinde olabilirler.

#### 4.4. Diğer bulguların yorumlanması

- Normalde steril vücut bölgelerinden örneklerde organizma görülmesi enfeksiyon bulgusudur.
- Santrifüj edilmemiş idrarın Gram boyalı mikroskopisinde organizmaların görülmesi bakteri sayısının muhtemelen  $\geq 10^5$  cfu/mL olduğunu gösterir.
- İnvaziv olmayan teknikle alınmış bir örnekte tek tip bir organizmanın çok sayıda görülmüş olması, eğer beyaz kan hücreleri ile birlikte ise, muhtemel bir enfeksiyona işaret eder.
- Alanlarda çok az organizma görülmesi ve birlikte inflamasyon bulgusunun yokluğu veya organizmaların eşitsiz dağılmış olması durumunda dikkatli olunmalıdır. Örnek kapları, lam veya besiyerlerinden kontaminasyon olmuş olabilir. Özellikle BOS gibi kritik örneklerde benzer şüpheli durumlarda doğrulama için –sonuç enfeksiyon tanısı ile ilgili olduğundan dolayı- yeniden preparat hazırlanmalı ve incelenmelidir.
- Gram boyamanın duyarlılığı  $10^5$  hücre/mL, eğer örneğe sitospin yapılmış ise  $10^4$  hücre/mL'dir. Bu aşağı yukarı 20 alan tarandığı varsayıldığında alan başına ortalama bir bakteri hücresi anlamına gelir.
- Sitospin yapılmış BAL örneklerinin Gram boyamasında, her yüksek büyütme alanında  $\geq 1$  bakteri görülmesi aktif bakteriyel pnömoni ile uyumludur.

## 5 Sonuçların raporlanması

Klinik örneklerin Gram boyama sonuçları **ön rapor** olarak klinisyene iletilmelidir.

- Eğer hiçbir organizma / hücre gözlenmediyse, "herhangi bir organizma görülmedi" veya "herhangi bir hücre görülmedi" şeklinde rapor edilir.
- Varsa hücrelerin ve organizmaların sayımı yapılmalıdır. Sayım sadece, eğer varsa, inflamasyon ve nekroz bulgusu olan alanlardan yapılmalıdır.

Aslında klinik örneklerin boyalı preparatlarının mikroskopisinde organizma veya hücrelerin sayımı ile ilgili politikaların bir bilimsel dayanağı yoktur. Alt solunum yolu örnekleri için hücreleri esas alan ve kadın genital sistem örnekleri için de bakteri sayımlarını esas alan, yayınlara dayalı bazı raporlama prosedürleri mevcuttur. Bunların dışında, aşağıdaki standartlar bütün örnekler için uygulanabilir olanlardır ve laboratuvarların bulguları arasında bir tutarlılık sağlayacağı varsayıldığı için kullanılmalı önerilir (2).

- Yaymanın 20-40 alanında (sadece hücre ve/veya bakteri bulunan alanlarda) bakteri ve hücreler sayılır; ortalaması alınır. Hiç hücre veya bakteri olmayan alanlar atlanır ve ortalamaya katılmazlar.

- Düşük büyütmede hücreler sayılır ve göreceli sayılar rapor edilir.
  - (a) 1+ (nadir) – her alanda 1'den az hücre
  - (b) 2+ (az) – her alanda 1-9 hücre
  - (c) 3+ (orta) – her alanda 10-25 hücre
  - (d) 4+ (çok, bol) – her alanda >25 hücre

NOT: Gram boyamada, 40 alanda 10'dan az hücre görülmesi halinde bunun rapor edilmesi için klinik açıdan anlamlı bir neden yoktur. Kaldı ki, Gram boyama primer olarak konak hücre boyamaya yönelik değildir.
- Yüksek büyütmede ( $\times 1000$ ) bakteriler, maya hücreleri sayılır ve hücrelerle ilişkili alanlardan göreceli sayılar rapor edilir.
  - (a) 1+ (nadir) – her immersiyon alanında 1'den az organizma
  - (b) 2+ (az) – her immersiyon alanında 1-5 organizma
  - (c) 3+ (orta) – her immersiyon alanında 6-30 organizma
  - (d) 4+ (çok, bol) – her immersiyon alanında >30 organizma

NOT: Bütün yaymada 1-2 organizma görülmüş ise -ve eğer bu sonuç ikinci bir yayma yapıldığında da gözlenmiyorsa veya örnek invaziv bir yöntemle alınmış bir örnek değilse- göz ardı edilir.
- Hücre sayımı ile beraber hücrelerin tipinin de tarif edilmesi gerekir.
  - (a) Yassı epitel hücresi
  - (b) Beyaz kan hücresi (lökosit)
  - (c) Kırmızı kan hücresi (eritrosit)
  - (d) Konak hücre materyali
- Sayım ile beraber organizmanın şekil özellikleri de tanımlanmalıdır. Verilebilecek en fazla bilgi verilmelidir. Tanımlamalar şunlar gibi olabilir:
  - (a) Gram pozitif, koklar, kümeler halinde
  - (b) Gram pozitif, koklar, zincir yapmış
  - (c) Gram pozitif, diplokoklar
  - (d) Gram pozitif, büyük basiller
  - (e) Gram pozitif, küçük basiller
  - (f) Gram pozitif, dallanmış basiller
  - (g) Gram pozitif, korineform basiller
  - (h) Gram negatif, diplokoklar
  - (i) Gram negatif, basiller
  - (j) Gram negatif, filamentöz (veya pleomorfik) basiller
  - (k) Gram değişken, kokobasiller
  - (l) Tomurcuklanmış maya hücreleri
  - (m) Psödohif yapıları
- Tipik durumlarda Mikrobiyolog, elde ettiği Gram boyama morfolojisi ile birlikte bunun uyumlu olabileceği organizma grubunu -aşağıdaki örneklerde görüldüğü gibi- bir 'olasılık' olarak rapor edebilir:
  - "gram pozitif diplokoklar, *Streptococcus pneumoniae* ile uyumlu"
  - "küçük gram negatif kokobasiller, *Haemophilus* ile uyumlu"
  - "narin gram pozitif basiller, *Listeria* ile uyumlu"
  - "gram negatif diplokoklar, *Neisseria* ile uyumlu"

Ancak diğer türlerin de bu tipik durumları taklit edebileceği ihtimaline karşı dikkatli olunmalıdır.

## 6 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Gram boyamada doğru sonuç elde edilmesi için işleme ve yorumlama ölçütlerine dikkatli bir şekilde uyulması gerekir. Doğruluk, mikroskopta değerlendiren kişinin eğitimi ve becerisine yüksek ölçüde bağlıdır.
- Yanlış Gram boyama sonuçları klinik örneğin yetersiz alınmasına veya taşıma esnasında gecikmeye bağlı olabilir.
- Gram boyama pozitif, kültür negatif örnekler reaktif veya materyalin kontaminasyonuna, antimikrobiyallerin varlığına veya organizmanın o kültür şartlarında (besiyeri, aerob atmosfer vb.) üreme özelliğinde olmayışına bağlı olabilir.
- Örnek pürülan olmasına rağmen Gram boyamada eğer hiç organizma görülmemiş ise başka bir boyama yöntemi (akridin oranj vb.) önerilir.
- Gram boyama sonuçları başka incelemelerle desteklenmelidir.
- Gram boyama sonuçları klinik bulgular ve diğer laboratuvar bulguları ile birlikte kullanılmalıdır.

## Ekler

### Ek-1 Stok solüsyonlar (Hucker'ın modifikasyonu)

#### Kristal viyole

##### Kristal viyole stok solüsyonu

Kristal viyole (%90-95 boya içeren)*	40 g
Etanol, %95	400 mL

Bir cam şişede karıştırılır ve eritilir. Etiketlenir ve oda ısısında saklanır. Raf ömrü 1 yıldır.

##### Amonyum okzalit solüsyonu (%1'lik)

Amonyum okzalit (analitik saflıkta)	16 g
Distile su	1600 mL

Bir kahverengi cam şişede karıştırılır ve eritilir. Etiketlenir ve oda sıcaklığında saklanır. Raf ömrü 1 yıldır.

#### Gram'ın iyodini

##### Lugol'un iyodini stok solüsyonu

Iyot kristalleri (analitik saflıkta)	25 g
Potasyum iyodid (analitik saflıkta)	50 g
Distile su	500 mL

Bir kahverengi cam şişede karıştırılır ve eritilir. Etiketlenir ve oda sıcaklığında saklanır. Raf ömrü 6 aydır.

##### Sodyum bikarbonat, %5

NaHCO <sub>3</sub> (analitik saflıkta)	50 g
Distile su	1000 mL

Bir cam şişede karıştırılır ve eritilir. Etiketlenir ve oda sıcaklığında saklanır. Raf ömrü 1 yıldır.

#### Zıt boya Safranin

##### Safranin stok solüsyonu

Safranin O	5 g
Etanol, 95%	200 mL

Bir cam şişede karıştırılır ve eritilir. Etiketlenir ve oda sıcaklığında saklanır. Raf ömrü 1 yıldır.

#### **Güvenlik uyarısı!**

Etanol parlayıcıdır!  
Alevden uzak tutulmalıdır.

\* Tartılacak miktar ambalaj üzerinde yazan yüzde boya miktarına göre ayarlanır.

## Ek-2 Çalışma solüsyonları (Hucker'ın modifikasyonu)

### Kristal viyole

Kristal viyole stok solüsyonu	40 mL
Amonyum okzalat solüsyonu (%1'lik)	160 mL

Bir cam şişeye kristal viyole filtre edilerek aktarılır; filtrasyon için Whatman No.2 filtre kâğıdı kullanılır. Filtrasyonun tamamlanması beklenir.

Takiben amonyum okzalat solüsyonu filtre edilir. Etiketlenerek kullanıma sokulur.

### Gram'ın iyodini

Lugol'un iyodini stok solüsyonu	25 g
Distile su	220 mL
Sodyum bikarbonat, %5'lik	60 mL

Bir kahverengi cam şişede karıştırılır ve eritilir. Etiketlenir ve kullanıma sokulur. Raf ömrü 6 aydır.

### Zıt boya Safranin

Safranin stok solüsyonu	20 mL
Distile su	180 mL

Bir cam şişede karıştırılır. Etiketlenir kullanıma sokulur. Raf ömrü 1 yıldır.

### Zıt boya (alternatif)

#### Bazik fuksin %0.1 veya 0.2'lik

Bazik fuksin (analitik saflıkta)	0.1 veya 0.2 g
Distile su	100 mL

Bir kahverengi cam şişeye bazik fuksin konur. Yavaşça su eklenir ve bir yandan karıştırılarak eritilir. Etiketlenir ve oda ısısında saklanır. Raf ömrü 1 yıldır.

### Güvenlik uyarısı!

İyot ve potasyum iyodür tahriş edicidir. Solunmasından, yutulmasından ve deriye temasından kaçınılmalıdır!

## Ek-3 Karbol fuksin modifikasyonu reaktifleri

Karbol fuksin modifikasyonunda kristal viyole ve iyot uygulama basamaklarında Hucker'ın modifikasyonu ile aynı reaktifler kullanılır.

Renk giderici %95'lik etanoldür.

Farklı olarak son basamakta zıt boya karbol fuksin veya %0.8'lik bazik fuksin kullanılır.

Aşağıda zıt boyaların hazırlanması verilmiştir.

### Karbol fuksin

#### Reaktif 1

Bazik fuksin (analitik saflıkta)	0.3 g
Etanol, %95	10 mL

Bir kahverengi şişede bazik fuksin etanol içinde eritilir.

#### Reaktif 2

Eritilmiş fenol kristalleri	5 mL
Distile su	95 mL

Başka bir şişede fenol distile su içinde eritilir.

Reaktif 2, Reaktif 1'e eklenir. Etiketlenir ve oda sıcaklığında saklanır. Raf ömrü 1 yıldır.

#### Bazik fuksin, %0.8'lik

Bazik fuksin (analitik saflıkta)	0.8 g
Distile su	100 mL

Bir kahverengi cam şişeye bazik fuksin konur. Yavaşça su eklenir ve bir yandan karıştırılarak eritilir. Etiketlenir ve oda sıcaklığında saklanır. Raf ömrü 1 yıldır.

#### **Güvenlik uyarısı!**

Fenol tahriş edicidir. Solunmasından, yutulmasından ve deriye temasından kaçınılmalıdır!

## Ek-4 Kopeloff'un modifikasyonu reaktifleri

### Alkali Kristal viyole

#### Solüsyon A

Kristal viyole (90-95% boya içeren)	10 g
Etanol, %95	1000 mL

Bir cam şişede karıştırılır ve eritilir. Etiketlenir ve oda sıcaklığında saklanır. Raf ömrü 1 yıldır.

#### Solüsyon B (Sodyum bikarbonat, %5)

NaHCO <sub>3</sub> (analitik saflıkta)	50 g
Distile su	1000 mL

Bir cam şişede karıştırılır ve eritilir. Etiketlenir ve oda sıcaklığında saklanır. Raf ömrü 1 yıldır.

### Iyodin (Kopeloff'un)

Sodyum hidroksit (NaOH)	4 g
İyot kristalleri (analitik saflıkta)	20 g
Potasyum iyodid (analitik saflıkta)	1 g
Distile su	1000 mL

Bir kahverengi cam şişede NaOH 25 mL suya karıştırılır, eritilir. İyot ve potasyum iyodid eklenir; iyice eritilir. Kalan 975 mL su her eklemede karıştırılarak, yavaş yavaş eklenir. Etiketlenir ve oda sıcaklığında saklanır. Raf ömrü 6 aydır.

### Renk giderici

#### 3:7 asetone-alkol

Etanol, %95	700 mL
Aseton (analitik saflıkta)	300 mL

Bir kahverengi cam şişede karıştırılır. Etiketlenir ve oda sıcaklığında saklanır. Raf ömrü 1 yıldır.

### Zıt boya Safranin (Kopeloff'un)

Safranin O, sertifikeliye	20 g
Etanol, %95	100 mL
Distile su	1000 mL

1 litrelik bir cam şişede safranin üzerine sadece eritmeye yetecek bir miktar (~50 mL) etanol eklenir ve safranin eritilir. Üzerine distile su eklenir. Etiketlenir ve oda sıcaklığında saklanır. Raf ömrü 1 yıldır.

#### **Güvenlik uyarısı!**

Etanol ve aseton parlayıcıdır! Alevden uzak tutulmalıdır.

## Kaynaklar

---

- 1 Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, Jr. (eds). Introduction to microbiology Part I: guidelines to practice and management: Microscopic examination. *In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 4th ed., J.B. Lippincott Company, Philadelphia. 1992, p. 15-26.
- 2 York MK. Staining procedures: Gram stain. *In: Garcia LS (editor in chief). Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 3.2.1.1 - 3.2.1.22
- 3 Kruczak-Filipov P, Shively RG. Gram stain procedure. *In: Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook*. ASM Press, Washington D.C. 1992, p. 1.5.1-1.5.18.
- 4 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1-4.





T.C. Sağlık Bakanlığı

# ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

## Hareket Testi

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Test Prosedürleri
Standart No	B-TP-04
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

## İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	3
GENEL BİLGİ .....	3
TEKNİK BİLGİLER .....	4
1 Test için asgari laboratuvar koşulları .....	4
2 Testin uygulanması .....	5
3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması <sup>1</sup> .....	7
4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	8
EKLER.....	9
Ek-1 Hareket testi besiyerinin (HTB) hazırlanması <sup>1</sup> .....	9
KAYNAKLAR .....	10

## Kapsam ve Amaç

Bakterilerin hareket yeteneklerinin gösterilmesi değerli bir mikrobiyolojik tanımlama parametresidir. Bazı organizmalar (ör., *Escherichia coli*'nin laktoz negatif kökenleri ve *Shigella* sp.) farklı türlere ait olmalarına rağmen benzer veya aynı biyokimyasal reaksiyonları gösterdiklerinde, onları **hareket testi** ile ayırt etmek mümkün olabilir. Çeşitli hareket testleri vardır. Bu UMS'nin amacı hareket testlerinin uygulanması ve yorumlanması için bir rehber sunmaktır.

## Kısaltmalar ve Tanımlar

<b>BHI</b>	Brain Heart Infusion (beyin kalp infüzyonu)
<b>HTB</b>	Hareket Testi Besiyeri. Bir yarı-katı agar besiyeridir. Yabancı kaynaklarda 'Motility Test Medium (MTM)' şeklinde aranır.
<b>KIA/TSI</b>	Kligler iron agar / Triple sugar iron agar; aynı amaçla kullanılabilecekleri için (metinde) biri veya diğeri anlamında.
<b>TSB</b>	Triptik soya buyyonu
<b>TTC</b>	Trifenil tetrazolyum klorid

## Genel Bilgi

Bazı bakteriler hücre duvarına ait 'kamçı' olarak adlandırılan hareket organellerine sahiptir. Hareket yeteneği genellikle çomak formundaki bakterilere özgüdür, ancak az sayıda kok türünde de görülür (1). Kamçı üretimi kültür şartlarına göre değişebilir; örneğin, *Listeria monocytogenes* oda sıcaklığında hareketli iken 30°C'nin üzerinde inkübe edildiğinde hareket yeteneğini kaybeder (2).

Bakterinin hareketinin gösterilmesi amacıyla hareket testleri kullanılır. Bir bakteriye uygulanan hareket testi kesin tür tanımlaması için karar verdirici olabildiğinden, laboratuvarın tanı kapasitesi için önemlidir. Hareket yeteneği, bir mikroskop alanında veya tüpte ya da plaktaki yarı-katı agarda bakterinin bir noktadan başka bir noktaya hareketinin gözlenmesi yoluyla test edilebilir. **Tüp testinde** bir yarı-katı agara (HTB) batırma ekimi yapılır. Hareketli bakterilerin agar boyunca bulanıklık oluşturarak ekim çizgisinin dışına çıktıkları gözlenirken, hareketsiz olanlar sadece ekim çizgisinde ürerler (1,3). **Mikroskopi** yönteminde ise bakteri süspansiyonu çukur lamda asılı-damla tekniği ile incelenir. Bu yöntem daha ziyade HTB'de iyi üreyemeyen bakteriler için kullanışlıdır (2,4).

HTB %0.4-0.5 agar içerir ve genellikle gram negatif enterik bakteriler için kullanılır. Diğer bazı maddelerin ilavesi ile, bakterinin başka özellikleri de paralel olarak test edilebilir (ör., Motilite-indol-ornitin besiyeri).

Besiyerine istenirse tetrazolyum tuzları da (ör., TTC) eklenebilir. Besiyerinde çözülmüş halde ve renksiz bir vital boya olan TTC bakteri tarafından alındığında indirgenerek çözünmez kırmızı renkli bir maddeye (asit formazan) dönüşmektedir ve bakterinin hareketini daha iyi gözlenir hale getirir. Ancak bu madde bazı nazlı bakterilerin üremesini baskılayabildiği için, her durumda kullanılamaz (1,4).

# Teknik Bilgiler

## 1 Test için asgari laboratuvar koşulları

### 1.1. Laboratuvar güvenliği

Bu UMS'de bahsi geçen organizmalar ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart önlemler uygulanmalı, önlemler risk değerlendirmesi ile de desteklenmelidir. Aerosol oluşturması muhtemel tüm laboratuvar çalışmaları bir biyolojik güvenlik kabininde gerçekleştirilmelidir (ayrıca *bkz.* "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

### 1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) testten önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşına olmalı, ve; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

### 1.3. Örnek, Besiyeri, Donanım

#### Test mikroorganizmaları

- Hareket incelemesi gerekli görülen her klinik izolat

#### Asılı damla preparatı hazırlamak için besiyeri

- Sıvı besiyeri, karbonhidrat içermeyen (*ör.*, Nitrat buyyonu, TSB, BHI)
- Herhangi bir yatık agar; zor üreyenler için TSB veya BHI eklenmiş
- SF veya distile su

#### Yarı-katı agarda hareket testi için besiyeri / reaktif

- Hareket testi besiyeri (HTB) – piyasadan hazır temin edilebilir veya laboratuvarında hazırlanabilir (*bkz.* Ek-1). TTC içermesi isteğe bağlıdır.
- Sülfid, indol, hareket (SIM) besiyeri - H<sub>2</sub>S'i saptamak için sülfid içerir; indol reaksiyonunu da değerlendirmek mümkündür.
- Hareket-nitrat besiyeri
- İndol ve lizin içeren hareket besiyeri (motilite-indol-lizin; MIL)
- İndol ve ornitin içeren hareket besiyeri (motilite-indol-ornitin; MIO)
- TTC, %1'lik çözelti, steril

#### Diğer gereç, donanım

- Çukur lam, asılı damla preparatı hazırlamak için (normal lam da lam üzerinde Vazelin ile halkadan çukur oluşturularak kullanılabilir).
- Lameller (22×22 mm)
- Mikroskop (ışık veya faz kontrast)
- İğne öze, steril tek kullanımlık veya nikrom,

## 1.4. Kalite kontrol

- Her yeni besiyeri lotu kullanıma sokulmadan önce pozitif ve negatif kalite kontrol suşları ile test edilmeli, sterilite kontrolü yapılmalıdır. Tüpler kullanım öncesi kontaminasyon yönünden incelenmelidir.
- Laboratuvar personelinin asılı-damla testi uygulama becerisi, bilinen hareketli suşların sıvı kültürlerinden yapılan egzersizlerle valide edilmelidir.
- Kontrol organizmaları- aşağıdaki tabloda listelenmiştir (1).

Organizmalar / ATCC	Besiyeri	Hareket	Testler			
			I	H <sub>2</sub> S	L	O
<i>Escherichia coli</i> 25922	Hepsi	+	+	-	-	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 13883, 27736	Hepsi	-	-	-	+	-
<i>Proteus vulgaris</i> 33420	SIM	+	+	+		

\* Kısaltmalar: I, indol; L, lizin; O, ornitin; SIM, sülfid-indol-motilite medium

## 2 Testin uygulanması

### 2.1. Asılı-damla tekniği

#### 2.1.1. İnokulumun hazırlanması

- Bakterinin taze agar kültüründen tek düşmüş bir koloniden sıvı kültür yapılır. İnokulum hafif olmalı; bulanıklık görülmemelidir.
- Besiyerinin seçimi etkene göre ve aşağıdaki ölçütler dikkate alınarak yapılır:
  - Organizmanın üremesini destekleyecek, karbonhidrat içermeyen bir besiyeri (BHI, nitrat buyyon vb.) seçilir.
  - Gram-negatif çomaklar için serum fizyolojik kullanılabilir.
  - Legionella* için ılık, steril çeşme suyu kullanılır.
  - Bacillus* spp için daima bir sıvı besiyeri kullanılmalıdır.
  - Enterokoklar için 0.5 mL BHI veya TSB kullanılır.
  - Zor üreyen mikroorganizmalar için bir yatık agar ekimi yapılır ve dikkatlice yatık kısmın dibine, ekim çizgisini bir miktar kaplayacak şekilde birkaç damla BHI veya besleyici buyyon eklenir. Asılı damla, bir gecelik inkübasyon sonrasında sıvı kısımdan bir damla kullanarak hazırlanır. Bu teknik özellikle nonfermentatif gram negatif çomaklar için idealdir.
  - Su kullanılabilir; ancak bazı hareketli organizmaların distile suda hareketsiz hale geldiklerine dair raporlar vardır.

### 2.1.2. Asılı-damla preparatın hazırlanması ve inceleme

- Bakteri süspansiyonundan küçük bir damla bir lamelin ortasına konur. Lamelin her bir köşesine çok küçük birer damla su konur.
- Çukur lam, çukur kısmı alta gelecek şekilde çevrilir ve lamelin üzerine getirilir; dikkatlice lamelin üzerine bırakılır (çukur kısım bakteri damlasının üzerine gelecek şekilde).  
NOT: Eğer çukur lam yoksa normal bir lam üzerine Vazelinden bir halka yapılarak çukur oluşturulur ve aynı amaçla kullanılır.
- Lamel lama yapışacaktır. Lam dikkatlice çevrilip düzeltildiğinde bakteri içeren damla çukurun üstünde asılı durumda olacaktır.
- Preparat mikroskopta  $\times 400$  büyütmede bakteri hareketi yönünden incelenir. Preparat ışık mikroskopunda ışık şiddeti azaltılarak -diyafram kısılarak- veya faz kontrast mikroskopunda incelenmelidir.
- İncelemede hareket gözlenmez ise sıvı kültür inkübe edilir:
  - (a) Nonfermenter gram negatif çomaklar  $30^{\circ}\text{C}$ 'de, 24 saat,
  - (b) Enterokoklar ve *Listeria*  $30^{\circ}\text{C}$ 'de, 2 saat,
  - (c) Diğer organizmalar için kendi optimal üreme şartlarında (genellikle  $35^{\circ}\text{C}$ 'de) inkübe edilirler.
- İnkübasyon sonrası sıvı kültürden tekrar preparat hazırlanır, incelenir.

### 2.2. Tüp besiyerinde hareket testi

- İnkübasyon öncesi tüp besiyeri oda ısısına getirilir.
- Besiyeri yüzeyi kuru olmalıdır. Yüzey ıslak ise hareketsiz bakteriler bu sıvı ile agar kenarından yayılarak üreyebilir ve bulanıklığa neden olabilirler. Bu nedenle eğer sıvı varsa ekimden önce tüp eğilerek dikkatlice dökülmelidir.
- Bakterinin taze agar kültüründen tek düşmüş bir koloniden veya yatık agar pasajından iğne öze ile inokulum alınır.
- Tüpteki yarı-katı agarın merkezinden daldırılarak yaklaşık 2 cm ilerlenir. Tek bir hareketle ekim yapılmalıdır.
- Hareket tüplerinin okunması bazen zordur. Bu nedenle eş zamanlı olarak pozitif ve negatif kontrol organizmaları için de tüpler inoküle edilmelidir. Testin değerlendirilmesi böylece daha kolay ve güvenilir olur.
- Tüp kapakları gevşek kapatılır ve bir gece inkübe edilirler. İnkübasyon şartları aşağıdaki gibidir:
  - (a) *Enterobacteriaceae*;  $35^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat,
  - (b) Nonfermenter gram negatifler ve enterokoklar;  $30^{\circ}\text{C}$ 'de, 24 saat,
  - (c) Negatif sonuç ile ilgili bir soru işareti varsa,  $25^{\circ}\text{C}$  de inkübe edilir,
  - (d) *Listeria* ve *Yersinia*'lar için iki tüpe ekim yapılır; biri  $35^{\circ}\text{C}$ 'de, diğeri  $25^{\circ}\text{C}$  de 24 saat inkübe edilir.

### 2.3. Plak besiyerinde hareket testi

- Yarı-katı agar besiyeri içeren bir tüp alınır ve kaynar su banyosunda eritilir ve steril bir Petri kabına dökülür; katılaşması beklenir.  
NOT: Yarı-katı agar besiyeri önceden tüplere 18-20 mL dağıtılarak hazırda bulunduruluyor olmalıdır (*bkz.* Ek-1).
- Bir iğne öze ile incelenecek bakterinin taze kültüründen, tek düşmüş koloninin üzerine veya KIA/TSI pasajına dokunarak inokulum alınır.
- Plaktaki besiyerinin ortasına dokunarak nokta ekim yapılır. Yukarıda 2.2'de belirtildiği gibi inkübe edilir.

## 3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması<sup>1</sup>

### 3.1. Asılı-damla preparatında hareketin değerlendirilmesi

- **Pozitif sonuç** – aceleci, zikzak, yuvarlanma veya diğer anlamlı yer değiştirme şeklinde hareketlerin gözlenmesi.
- **Negatif sonuç** – hareket görülmemesi veya sadece Brownian hareket

NOT 1: Brownian hareket, bir sıvıda asılı haldeki partiküllerin (bakterilerin) moleküler bombardımana bağlı olarak titreşip salınmasıdır ve *gerçek hareketlilik* ile karıştırılmamalıdır. Brownian harekette organizmaların diğerlerine göre bağıl konumu değişmez. Gerçek hareketlilik durumunda ise, organizmaların **birbirlerine göre** yer değiştirdikleri ayırt edilir.

NOT 2: *Campylobacter*'lerde çok aktif bir hareketlilik gözlenir; alanın içine giren, alandan çıkan, koşuşturan minik noktalar gibi görünürler.

### 3.2. Tüp besiyerinde hareket testinin değerlendirilmesi

- **Pozitif sonuç** – tüp besiyerinde ekim çizgisinden uzaklaşarak, yaygın üreme veya besiyerinde bulanıklık görülmesi: **bakteri hareketli**.
- **Negatif sonuç** – tüp besiyerinde temiz/berrak bir görünüm ve sadece inokülasyon çizgisinde sınırlı üreme görülmesi: **bakteri hareketsiz**.

NOT: TTC içeren besiyerinde bakterinin ürediği yerde kırmızı renk meydana gelir. Hareketli organizmalar -ekim çizgisinden yayılan- pembe bir renk üretirler. Hareketsiz organizmalar ise ekim çizgisinde sınırlı bir pembe-kırmızı renk oluştururlar.

- Negatif tüpler, eğer gerek görülüyorsa 25°C'de 5. güne kadar tutulur.

### 3.3. Plak besiyerinde hareket testinin değerlendirilmesi

- **Pozitif sonuç** – agar plakta inokülasyon noktasından uzağa doğru (agar TTC'li ise, pembe) difüzyon gözlenmesi: **bakteri hareketli**.
- **Negatif sonuç** – sadece ekim noktasında üreme; dışa doğru bir yayılma olmaması: **bakteri hareketsiz**.

## 4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Asılı damla testinde, özellikle zayıf hareket yeteneği olan bakterilerde, bakteri hareketi ile Brownian hareket karıştırılabilmektedir. Her bir hücre daha uzun süre izlenerek hareketin niteliği ayırt edilmeye çalışılmalıdır.
- Mikroskop lamının aşırı ısınması gözlem sonuçlarını etkileyebilir.
- Eğer bakteriyel kamçılar ısıtma, çalkalama vb. bir travma ile hasar görmüş ise yanlış negatif sonuç alınabilir. Böyle çevresel etkiler bakterinin hareket yeteneğini kaybetmesine yol açabilmektedir.
- Bazı organizmalar (ör., *Yersinia* spp, *Listeria* spp) 35-37°C'de kamçı proteinlerini sentezleyemezler, fakat 22-25°C'de sentezleyebilirler.
- TTC bazı zor üreyen bakteri türleri için inhibitör olabilir.
- Bazı bakteriler kan kültürlerinden ilk izolasyonda hareket özelliği göstermezler.
- Bazı bakterilerin eski kültürlerinde hareket özellikleri azalır. Hareket testi taze kültürlerden tekrarlanmalıdır.
- *Bacillus* türleri en iyi taze plaklarından direkt test edilir. Eğer taze plak mevcut değilse bir plağa ekim yapılır ve 4 saat inkübe edilir; asılı-damla preparatı bu inkübasyondan sonra yapılır.
- Anaeroblar için hareketlilik sonuçlarını belirlemek zordur. Yalnızca pozitif sonuçlar anlamlı kabul edilir.
- *Pseudomonas aeruginosa* gibi üremek için oksijen gereksinimi yüksek olan organizmalar tüp besiyerinin yüzeyine yayılan bir film katman oluştururlar. Bu tür bakterilerin hareket testinde -özellikle oksijenin giderek azaldığı düzeylerde üremeyecekleri için- ekim çizgisinden yayılma gözlenmeyecektir.
- Pek çok organizma tüpte yarı-katı agarın derin kısımlarında üreyemez; bunlar için plak besiyerine nokta ekim daha uygun olabilir.
- Hareketsiz, mukoid *Klebsiella* kökenleri tüp besiyerinde yanlış pozitif hareket reaksiyonu verebilir; bu mukoid suşların tüp ile besiyeri arasına yayılması yüzünden olabilmektedir ve bulanık görünüm hareket reaksiyonu ile karıştırılabilmektedir.



## Ekler

### Ek-1 Hareket testi besiyerinin (HTB) hazırlanması<sup>1</sup>

#### Tüpte hareket testi için besiyerinin hazırlanması

Sığır eti özütü	3.0 g
Pankreatik kazein	10.0 g
Sodyum klorür	5.0 g
Agar	4.0 g
Distile/deiyonize su	1000 mL

1. Maddeler bir erlene konur; bir manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak ısıtılır (kaynama derecesinde), eritilir.
2. pH ölçülür ve gerekli ise 7.3'e ayarlanır. 121°C'de 15 dakika otoklavlanır.
3. 50°C'ye soğutulur.  
NOT: TTC eğer isteniyorsa bu aşamada eklenir. Steril, %1'lik TTC'den 5 mL 1000 mL besiyerine eklenir.
4. Besiyeri aseptik şartlarda, steril, burgu kapaklı tüplere (13x100-mm) ~5 mL tevzi edilir. Kapakları gevşek kapatılır.
5. Tüpler dik pozisyonda donmaya bırakılır. Donduktan sonra da kapaklar bir süre daha gevşek bırakılarak besiyeri yüzeylerinin kuruması beklenir.
6. Besiyerinin adı ve son kullanma tarihi yazılarak tüplerin üzeri etiketlenir. Kapaklar sıkılaştırılır ve buzdolabında saklanırlar; saklama koşullarına uyulduğunda raf ömrü 6 aydır.

#### Plakta hareket testi için tüplerin hazırlanması

1. Agar oranı hayli düşük (%0.4) olan HTB'nin plaklara dökülmüş halde, bütünlüğü bozulmadan saklanması güçtür ve dolayısı ile **plakta hareket testi** için besiyerinin test yapılacağı zaman plağa dökülmesi tercih edilir.
2. Bu amaçla, besiyeri önce yukarıda tarif edildiği gibi hazırlanır. Tüplere dağıtma aşamasında (4. adım) büyük tüplere (25x150 mm) ~20 mL dağıtılır ve dik konumda dondurulduktan sonra saklanır.
3. Bu şekilde hazırlanmış her bir tüp daha sonra test yapılacağı zaman kaynar su banyosunda eritilecek ve bir Petri plağına dökülecektir.

## Kaynaklar

---

- 1 York MK, Traylor MM, Hardy J, Henry M. Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. Motility Test. *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 3.17.31.1 - 3.17.31.4
- 2 Pratt-Rippin K, Pezzlo M. Identification of commonly isolated aerobic gram-positive bacteria: Broth motility test: Hanging drop. *In: Isenberg HD (ed in chief). Clinical Microbiology Procedures Handbook*. ASM Press, Washington D.C. 1992, p. 1.20.37
- 3 Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Pathogens of Public Health Importance in the Developing World. Center for Diseases Control and World Health Organisation. 2003.
- 4 Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, Jr. (Eds). The *Enterobacteriaceae*. *In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 4th ed., J.B. Lippincott Company, Philadelphia. 1992, p.125.



T.C. Sağlık Bakanlığı

# ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

## Hippurat Hidrolizi Testi

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Test Prosedürleri
Standart No	B-TP-05
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

## İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	3
GENEL BİLGİ .....	3
TEKNİK BİLGİLER .....	3
1 Test için asgari laboratuvar koşulları .....	3
2 Testin uygulanması .....	5
3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması .....	5
4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	5
KAYNAKLAR.....	6

## Kapsam ve Amaç

Bakterilerin hippuratu hidrolize etme yeteneklerinin gösterilmesi tür düzeyinde tanı için önemli bir tanımlama parametresidir. Klasik olarak hippurat hidrolizi 48 saatte sonuç veren bir test ile saptanabilmekte idi. Günümüzde 2 saatte sonuç veren hızlı hippurat testi kullanılmaktadır (1). Bu UMS'de de hızlı hippurat testinin uygulanması ve yorumlanmasına dair bir rehber sunulması hedeflenmiştir.

## Kısaltmalar ve Tanımlar

**PYR** L-pirolidonil- $\beta$ -naftilamid

## Genel Bilgi

Bazı bakteriler sodyum hippuratu benzoik asit ve glisine yıkan hippurikaz enzimine sahiptirler. Hippurat testi, ortama indikatör olarak ninhidrin ilave edildiğinde glisin ile verdiği reaksiyonun gözlenmesine dayanır (2,3).

*Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus agalactiae* ve diğer bazı bakteriler %1'lik sodyum hippurat ile inkübe edildiklerinde hippuratu hidrolize ederler. Oksitleyici bir ajan olan ninhidrin ilavesi ile glisin deamine olarak indirgenir ve ortam rengi mavi-mora döner.

Ninhidrin her tür serbest aminoasit ile reaksiyona girebildiği için ortamda glisinden başka aminoasit bulunması yanlış pozitif sonuç alınmasına yol açabilir. Bu olasılığı önlemek için test süspansiyonu sadece hippurat içermelidir (2,3).

## Teknik Bilgiler

### 1 Test için asgari laboratuvar koşulları

#### 1.1. Laboratuvar güvenliği

Bu UMS'de bahsi geçen organizmalar ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart önlemler uygulanmalı, önlemler risk değerlendirmesi ile de desteklenmelidir. Aerosol oluşturması muhtemel tüm laboratuvar çalışmaları bir biyolojik güvenlik kabininde gerçekleştirilmelidir (ayrıca bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

#### 1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) testten önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşina olmalı, ve; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

### 1.3. Örnek, Besiyeri, Donanım

#### Test mikroorganizmaları

- Hippurat testi gerekli görülen mikroorganizmanın taze kültürü.
- Tür düzeyinde tanımlanmak üzere şüpheli bakteri izolatları;
  - (a) *L. monocytogenes* şüpheli izolat (eğer katalaz pozitif,  $\beta$ -hemolitik, 25°C'de hareketli, narin, gram pozitif çomaklar tanımlanmış ise),
  - (b) *S. agalactiae* şüpheli izolat (eğer katalaz negatif, dar  $\beta$ -hemoliz zonlu şeffaf koloniler gram pozitif koklar olarak tanımlanmış ise),
  - (c) *C. jejuni* şüpheli izolat (eğer oksidaz ve katalaz pozitif, aerob üreyemeyen, kıvrık gram negatif çomaklar tanımlanmış ise),
  - (d) *G. vaginalis* şüpheli izolat (eğer katalaz-negatif, narin, gram değişken çomaklar tanımlanmış ise).

#### %1'lik sodyum hippurat

- Hippurat test solüsyonu - piyasadan temin edilebilir (tüplerde liyofilize halde veya diskler ya da tabletler halinde); üretici firmanın talimatına göre kullanılır. Hippurat test solüsyonu laboratuvarında da hazırlanabilir.
- Hazırlamak için; 1 g sodyum hippurat 100 mL distile suya karıştırılır ve erimesi sağlanır. Test tüplerine 0.4 mL alikotlar halinde dağıtılır, etiketlenir ve derin dondurucuya (-20°C) kaldırılır. Raf ömrü 6 aydır.  
NOT: *G. vaginalis* için pozitif reaksiyonun saptanmasında pH'ın 6.4'e ayarlanmış olması önemlidir (3).

#### Ninhidrin solüsyonu

- Ninhidrin piyasadan liyofilize halde temin edilebilir. Üretici firmanın talimatına göre kullanılır.
- Laboratuvarında hazırlamak için; bir kahverengi cam şişeye 50 mL aseton ve 50 mL butanol konur. Üzerine 3.5 g ninhidrin ilave edilir, karıştırılır, etiketlenir. Oda ısısında saklanır. Raf ömrü 6 aydır.  
NOT: Ninhidrin ile çalışırken cilde veya giysilere dökülmemesine dikkat edilmelidir. Mavi bir renk meydana getirir. Yıkamakla geçmez, ciltten 24-48 saatte temizlenir.

#### Diğer gereç, donanım

- Öze, steril tek kullanımlık veya nikrom
- İnkübatör

### 1.4. Kalite kontrol

- Her yeni reaktif serisi kullanıma sokulmadan önce ve kullanılırken en az ayda bir kalite kontrol organizmaları ile test edilmelidir. Reaktifler kalite kontrolü geçemezlerse kalanlar atılmalı ve yeni seri yapılmalıdır.
- Kalite kontrol organizmaları (3).

*Streptococcus agalactiae* ATCC 12386 - hippurat pozitif  
*Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 - hippurat negatif

## 2 Testin uygulanması

NOT: Test prosedürü laboratuvarında hazırlanan hippurat solüsyonu içindir!

- Hippurat solüsyonu içeren tüp derin dondurucudan çıkarılır, erimesi ve oda sıcaklığına gelmesi beklenir.
- İncelenecek bakterinin *taze* agar kültüründen tek düşmüş bir koloniden öze ile alınarak hippurat tüpünün içinde homojenize edilir. Yoğun ( $\geq$ McFarland standart No 3) bir süspansiyon elde edilmelidir.

ÖNEMLİ: Koloniden alınırken agar besiyeri parçası almamaya büyük özen gösterilmelidir. Çünkü besiyerinden protein içerik taşınabilir ve ninhidrin ile reaksiyona girerek yanlış pozitif sonuca neden olabilir.

- Tüp 2 saat 35-37°C'de inkübasyona kaldırılır.
- İnkübasyon sonunda hippurat-bakteri tüpüne 4 damla ninhidrin solüsyonu damlatılır.
- Tüp 30 dakika daha 35-37°C'de inkübe edilir. Ancak 10 dakikada bir tüp renk değişimi yönünden incelenmelidir. Renk değişimi genellikle, ninhidrin ilavesinden sonra 10-15 dakika içinde meydana gelir.

## 3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması

**Pozitif sonuç** - 30 dk içinde koyu mavi bir renk oluşumu

**Negatif sonuç** - Renk değişimi olmayışı veya hafif mor renk oluşumu

## 4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Eğer ninhidrinin inkübasyonu 30 dakikayı geçerse yanlış pozitif sonuç alınabilir.
- *S. agalactiae*'nin bütün kökenleri  $\beta$ -hemolitik değildir. Öte yandan viridans grup streptokoklar da hippurat pozitif olabilirler. Bu nedenle non-hemolitik kolonilerin *S. agalactiae* olup olmadığının belirlenmesinde başka testlere de başvurulmalıdır.
- Enterokokların nadir kökenleri  $\beta$ -hemolitik olabilir ve hippurata hidrolize edebilirler. Ancak bunlar PYR pozitif olmaları ile ayırt edilirler.
- *C. jejuni*'nin küçük bir yüzdesi hippurat negatif olabilir; diğer metotlarla tanımlanmalıdır.
- Bakteriyel vajinoza neden olan biyotipler hippurat negatif olabileceklerinden, negatif test *G. vaginalis* tanısını dışlamamalıdır.

## Kaynaklar

---

- 1 Hwang MN, Ederer GM. Rapid hippurate hydrolysis method for presumptive identification of group B streptococci. *J Clin Microbiol* 1975;1:114–115.
- 2 Pratt-Rippin K, Pezzlo M. Identification of commonly isolated aerobic gram-positive bacteria. Rapid hippurate hydrolysis test. *In: Isenberg HD (ed. in chief). Clinical Microbiology Procedures Handbook*. ASM Press, Washington D.C. 1992, p. 1.20.21-22
- 3 York MK, Traylor MM, Hardy J, Henry M. Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. Hippurate Hydrolysis Rapid Test. *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 3.17.21.1 - 3.17.21.3





T.C. Sağlık Bakanlığı

# ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

## IMViC Testleri

İndol, Metil kırmızısı, Voges-Proskauer, Sitrat

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Test Prosedürleri
Standart No	B-TP-06
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

## İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	3
GENEL BİLGİ .....	3
İndol testi .....	3
Metil kırmızısı ve Voges-Proskauer (MR-VP) testleri.....	4
Sitrat kullanım testi .....	4
TEKNİK BİLGİLER .....	5
1 Test için asgari laboratuvar koşulları .....	5
2 Testlerin uygulanması .....	8
3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması .....	10
4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	10
EKLER.....	12
Ek-1 İndol besiyeri <sup>2,3</sup> .....	12
Ek-2 Kovacs'ın ve Erlich'in indol reagenleri <sup>2,3</sup> .....	12
Ek-3 Spot indol test reagenleri <sup>2,3</sup> .....	13
Ek-4 MR ve VP test besiyeri ve reagenleri <sup>4,5,6</sup> .....	14
KAYNAKLAR.....	15

## Kapsam ve Amaç

IMViC testleri, özellikle *Enterobacteriaceae* üyelerinin ilk tanımlama basamağında klinik mikrobiyoloji laboratuvarları için vazgeçilmez testlerdir. Bu UMS'nin amacı IMViC test paketinde yer alan testlerin doğru uygulanmaları ve yorumlanmaları için bir rehber sunmaktır.

## Kısaltmalar ve Tanımlar

<b>BGB</b>	Buffered Glucose Broth (Tamponlanmış Glikoz Buyyon)
<b>Çeker-ocak</b>	Kimyasal çözelti hazırlanırken ortaya çıkabilecek toksik ya da tahriş edici gazların güvenli tahliyesini sağlayan çekiş kabini.
<b>HCl</b>	Hidroklorik asit
<b>IMViC</b>	Indol, metil kırmızısı, Voges-Proskauer ve sitrat (Simmon's citrate) testlerini içeren test paketini ifade eden bir kısaltma olup, aradaki "i" harfi okuma kolaylığı içindir (1).
<b>KIA/TSI</b>	Kligler iron agar / Triple sugar iron (agar)
<b>KOH</b>	Potasyum hidroksit
<b>MR</b>	Metil kırmızısı (Methyl red)
<b>VP</b>	Voges-Proskauer

## Genel Bilgi

Bakteri tanımlamasında kullanılan biyokimyasal test sistemleri arasında IMViC test seti en yaygın başvuru testlerden oluşmaktadır. Bu set özellikle enterik patojenlerin tanımlanmasında KIA/TSI ile başlayan tanı algoritmasının önemli bir parçasıdır; bazı bakteriler için tanımlama şemasının ek testlerle tamamlanması gerekse de diğerleri için IMViC test sonuçları kesin tanı koydurucu olabilmektedir.

## İndol testi

İndol testi, triptofanaz enziminin varlığını tespit eder. Bu enzime sahip bakteriler triptofandan zengin besiyerlerinde ürerken triptofanı hidrolize eder ve yıkım ürünlerinden biri olan indolün açığa çıkmasına neden olurlar. İndol testi, açığa çıkan indolün bazı aldehitlerle birleştiğinde renkli bir bileşik meydana getirmesi prensibine dayanır (2). İndol oluşmuşsa, ortama katılan reaktifin içindeki aldehit ile birleşerek pembe/kırmızı (benzaldehit reaktifi) veya mavi-yeşil (sinnamaldehit reaktifi) renkli maddeler meydana getirir (3).

İndol testi için iki metot vardır. Biri **spot (hızlı) test** olup bu testte indol doğrudan triptofandan zengin besiyerinde üreyen koloniden saptanır. Diğer geleneksel **tüp testidir**; bir gece inkübasyon gerektirse de indol üretimi zayıf olan bakterilerin tanımlanmasına bile olanak verir (2,3).

## Metil kırmızısı ve Voges-Proskauer (MR-VP) testleri

Bütün *Enterobacteriaceae* üyeleri **Embden-Meyerhof yolunu** kullanarak glikozu pirüvik aside çevirirler (inkübasyonun ilk 24 saati içinde). Bazıları pirüvik asidi daha da ileri metabolize ederek formik, laktik, asetik asit gibi güçlü asit ürünler meydana getirirler. Öyle ki, inkübasyonun 2-5 günü boyunca ortam pH'ı 4.4'ün altında kalır (5).

**MR testi** bir bakterinin glikoz fermentasyonu sonucu asit son ürünler meydana getirip getirmediğini saptamak için kullanılır. Testin indikatörü metil kırmızısıdır. Glikozlu bir buyyonda belli bir inkübasyon süresinin sonunda oluşan pH değişimini değerlendirmek için kullanılır (pH<5.0, kırmızı; pH>5.8, sarı) (4,5).

**VP testi** ise bir bakterinin glikoz fermentasyonu ile nötral son ürünler meydana getirip getirmediğini saptamak için kullanılır. Pirüvik asidin ileri yıkımında organizmalar **butilen-glikol yolunu** kullandıklarında asetoin (asetil metil karbinol) ve butandiol oluştururlar; bu nötral son ürünler ortam pH'ını yükseltirler (pH>6). Eğer ortamda asetoin varsa, güçlü bir alkali (%40'luk KOH),  $\alpha$ -naftol ve atmosferik oksijen varlığında oksitlenerek 'diasetil'e dönüşür ve kırmızı bir kompleks oluşur. VP testinde  $\alpha$ -naftol duyarlılığı (renk yoğunluğunu) yükselten bir madde olup ortama KOH'den önce ilave edilmelidir (5,6).

MR-VP testleri, glikoz metabolizması temelinde testler olduğundan aynı besiyeri (tamponlanmış glikoz buyyon; BGB) kullanılarak gerçekleştirilirler.

*Enterobacteriaceae* üyelerinin çoğunda anılan metabolik süreçlerden biri gözlemlenir; fakat nadiren ikisini de kullanıyor olabilirler.

## Sitrat kullanım testi

Bazı organizmalar sitratı tek karbon (enerji) kaynağı olarak kullanırlar. Sitrat testi bakterilerin sitratı kullanma yeteneklerinin değerlendirilmesi amacıyla yapılır.

Test için sitrat agar (Simmon's citrate agar) kullanılır. Tüpte yatık hazırlanan bu besiyeri karbon kaynağı olarak sadece sitrat içerir; nitrojen kaynağı olarak da amonyum tuzları bulunur.

Sitratı kullanan organizmalar inorganik amonyum tuzlarını da tek nitrojen kaynağı olarak kullanabildiklerinden, metabolizma alkali ürünlerin (amonyak) artışı ile sonuçlanır (pH>7.6). Ortamda bulunan indikatör madde bromtimol mavisini olup, pH'ın yükselmesine paralel olarak besiyerinin rengi yeşilden koyu-maviye döner (7,8).

Bakterilerin sitratı kullanma yeteneğinin test edilmesi özellikle *Enterobacteriaceae* üyelerinin ve diğer bazı gram negatif bakterilerin tanımlanmasında anlamlıdır.

Çok az köken hariç *Salmonella*, *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* ve *Providencia* türleri sitrat pozitif iken *Escherichia*, *Shigella*, *Morganella* ve *Yersinia* sitrat negatiftirler. *Proteus*'larda ise sitrat değişkendir (7).

# Teknik Bilgiler

## 1 Test için asgari laboratuvar koşulları

### 1.1. Laboratuvar güvenliği

Bu UMS'de bahsi geçen organizmalar ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart önlemler uygulanmalı, önlemler risk değerlendirmesi ile de desteklenmelidir. Aerosol oluşturması muhtemel tüm laboratuvar çalışmaları bir biyolojik güvenlik kabininde gerçekleştirilmelidir (ayrıca *bkz.* "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

**Güvenlik uyarısı!** - IMViC testlerinin hazırlığı ve yapılması sürecinde reaktiflerin güvenli kullanımı için ayrıca Ek-2, -3 ve -4'de dikkat çekilen konulara uyulmalıdır.

### 1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) testten önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşina olmalı, ve; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

### 1.3. Örnek, Besiyeri, Donanım

#### 1.3.1. Test mikroorganizmaları

- Dışkı kültürlerinden enterik patojenlerin tanımlanması amacıyla her şüpheli gram negatif çomak bakteri KIA/TSI pasajını takiben IMViC testine alınır (*bkz.* Şekil 1).
- Steril vücut sıvılarından (idrara, kan, BOS vb.) izole edilmiş gram negatif çomak bakteriler KIA/TSI pasajını takiben IMViC testine alınır (*bkz.* Şekil 1).
- KIA/TSI pasajının 4-6 saat inkübasyonunu takiben yatık kısımdaki üreme IMViC test tüplerinin inokülasyonu için kullanılır (*bkz.* Şekil 1).
- *Alternatif olarak* incelenecek bakterinin taze saf kültür pasajı kullanılır (*bkz.* Şekil 1).
- Spot indol testi için, boya içermeyen, triptofan içeren bir besiyerinde (kanlı agar, çikolata agar vb.) üremiş bakteri kolonileri kullanılmalıdır.
- İndol testi anaerob gram pozitif ve gram negatif çomak bakterilerin tanımlanmasında da kullanılır.
- VP testi *Aeromonas* ve *Vibrio* cinsi organizmaların, viridians streptokokların ve stafilokokların tür düzeyinde tanımlanmasında da kullanılır.

#### 1.3.2. Besiyeri/reaktifler

- IMViC testleri için besiyeri ve reaktifler hazır ürünler olarak piyasadan temin edilebileceği gibi laboratuvarda da hazırlanabilir.

**Tüp indol testi için;**

- Aerob üreyebilen bakteriler için Kovács metodu kullanılır. Bu amaçla;
  - (a) Besiyeri olarak triptofan içeren herhangi bir **sıvı besiyeri** seçilebilir. Örnek bir besiyerinin hazırlanması Ek-1'de verilmiştir.
  - (b) Eğer laboratuvar triptofan yerine pepton içeren bir besiyeri kullanacaksa pepton kalitesi mutlaka pozitif kontrol suşu ile test edilmelidir.
  - (c) İçinde glikoz bulunan bir besiyeri kullanılmamalıdır. Asit üretimi indol üretimini baskılayabilir.
  - (d) Besiyeri olarak motilite-indol-ornithin agar veya sulfid-indol-motilite agar gibi bir **yarı-katı besiyeri** de kullanılabilir.
  - (e) Reaktif olarak da Kovács'ın indol ayırıcı seçilir (*bkz.* Ek-2).
- Anaerob üreyebilen bakteriler için ve zayıf indol reaksiyonu olanlar için Ehrlich'in metodu kullanılmalıdır. Bu amaçla;
  - (a) Besiyeri olarak kalp infüzyon buyyonu ya da triptofan içeren bir anaerobik besiyeri tercih edilir.
  - (b) Gerekli reagenler - Ehrlich'in indol reaktifi (*bkz.* Ek-2) ve ksilen

**Spot indol testi için;**

- Besiyeri olarak triptofan içeren bir agar plakta (triptik soya agar; kan eklenmiş veya eklenmemiş) üremiş koloniler kullanılır.
- Reagen olarak %10'luk HCl içinde %5'lik *p*-dimetil-amino-benzaldehit veya %1'lik *p*-dimetil-amino-sinnamaldehit kullanılır (*bkz.* Ek-3).

**MR-VP testleri için;**

- %1'lik glikoz sıvı besiyeri (Andrade'nin buyyonu) – sadece VP testi için kullanılır! MR testinde kullanılmaz.
- BGB (Clark-Lubs veya MRVP sıvı besiyeri) (pH 6.9) – MR ve VP testleri için kullanılır. Hazırlanışı için *bkz.* Ek-4.
- %40'luk potasyum hidroksit (*bkz.* Ek-4).
- %5'lik  $\alpha$ -naftol (*bkz.* Ek-4).

**Sitrat testi için;**

- 'Simmon's citrate' agar kullanılır. Ticari olarak tüplerde hazır temin edilebilir.
- Laboratuvarda hazırlanacak ise içerik tartılıp eritildikten sonra pH 6.9'a ayarlanmalı ve tüplere 4-5 mL dağıtıldıktan sonra otoklavlanmalıdır. Otoklava konurken kapaklar hafif gevşek olmalıdır. Otoklavdan sonra tüpler yatık agar elde edilecek şekilde soğutulur. 3 ay raf ömrü verilerek etiketlenir ve buzdolabında saklanırlar.

**1.3.3. Diğer gereç, donanım**

- Öze (tercihen iğne öze), tek kullanımlık veya nikrom
- Cam şişeler, kahverengi, burgu kapaklı
- Cam tüpler, burgu kapaklı, 12×75 mm

- Eküvyon
- Filtre kâğıdı (Whatman No 1) – spot indol testi için, şerit halinde
- Manyetik karıştırıcı (hot-plate) ve manyetik balıklar
- Petri kabı, tek kullanımlık – spot indol testi için
- pH metre
- Pipet veya ölçülü damlalıklar, tek kullanımlık – KOH ve  $\alpha$ -naftol için

#### 1.4. Kalite kontrol

- Her yeni besiyeri ve reajen lotu kullanıma sokulmadan önce kalite kontrol suşları ile test edilmelidir.
- Lotlar arasında haftada bir; laboratuvar testi daha uzun aralıklarla yapıyorsa her testte kalite kontrol yapılmalıdır.
- Saklamaya kaldırmadan önce tüpler incelenmeli; agar bazlı olanlarda hava kabarcığı, yarık vb. gözleniyorsa o tüpler atılmalıdır.
- Her kullanım öncesi besiyeri tüpleri kontaminasyon, donma, kuruma, renk değişimi vb. yönünden incelenmeli; sorun gözlenen tüpler atılmalıdır.
- Reaktiflerde (özellikle Ehrlich'in ve Kovacs'ın) eğer renk değişimi gözleniyorsa testte kullanılmazlar.
- Kontrol organizmalar – aşağıdaki tabloda listelenmiştir.

Organizma / ATCC	Sonuç
<b>İndol testi için;</b>	
Aeroblar için Kovács reaktifi kullanımında <i>Escherichia coli</i> / 25922 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> / 27853	İndol pozitif İndol negatif
Anaeroblar için Ehrlich reaktifi kullanımında <i>Porphyromonas asaccharolytica</i> / 25260 <i>Bacteroides fragilis</i> / 25285	İndol pozitif İndol negatif
<b>MR-VP testi için;</b>	
<i>Escherichia coli</i> / 25922	MR pozitif (kırmızı); VP negatif (renk değişimi yok)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> / 13883	MR negatif (sarı); VP pozitif (kırmızı)
<b>Sitrat testi için;</b>	
<i>Escherichia coli</i> / 25922 <i>Klebsiella pneumoniae</i> / 13883	Sitrat negatif (üreme yok veya eser) Sitrat pozitif (üreme var; renk koyu mavi)

## 2 Testlerin uygulanması

### 2.1. Spot indol test

Aşağıdaki yöntemlerden biri kullanılır:

- Ticari spot indol test – üretici firmanın talimatına göre uygulanır.
- Filtre kâğıdı yöntemi – Bir parça filtre kâğıdı Petri kabına yerleştirilir. Üzerine 1-2 damla spot indol reaktifi damlatılır (*bkz.* Ek 3). Öze veya kürdan ile test edilecek koloniden alınır ve reaktifin üzerine sürülür.
- Eküvyon yöntemi - Test edilecek koloni eküvyon ile sıyrılır. Spot indol reajeni eküvyona damlatılır.
- Plak yöntemi – Plak besiyerindeki test edilecek koloninin üzerine bir damla spot indol reaktifi damlatılır. İndol üreme ortamına kolay yayılabilen bir maddedir; testin doğru değerlendirilebilmesi için, tek düşmüş, yakınında başka koloni olmayan kolonilere uygulanmalıdır!  
ÖNEMLİ: Eğer koloniden pasaj yapılması planlanıyorsa direkt plak tekniği kullanılmamalıdır!

### 2.2. IMViC tüp seti testi (geleneksel metot)

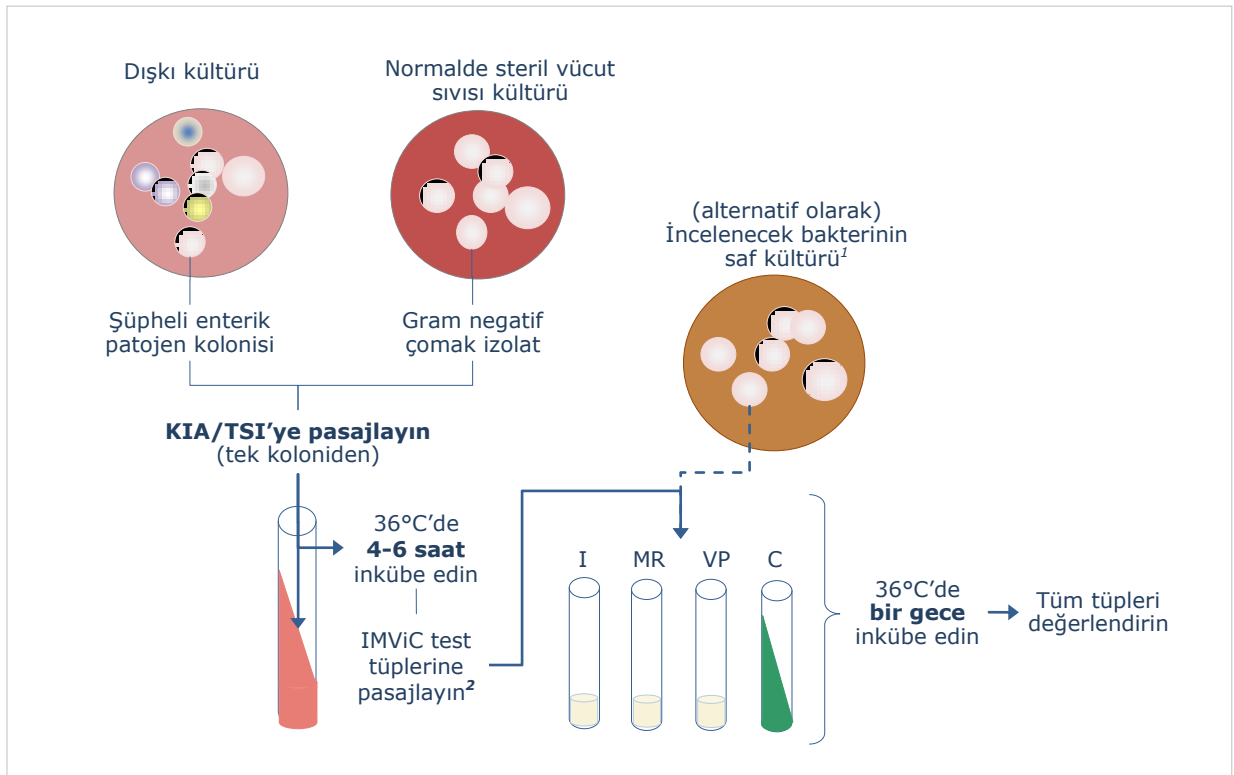
- IMViC testi için basit bir uygulama şeması Şekil 1’de verilmiştir.
- Test besiyerlerini içeren tüpler (indol besiyeri tüpü, iki adet BGB tüpü ve sitrat agar tüpü) bir spora dizilir ve oda ısısına getirilir.  
ÖNEMLİ: Tüm besiyerleri burgu kapaklı tüplerde hazırlanmış olmalıdır. Pamuk tıkaçlı tüpler laboratuvar güvenliği kuralları gereği kullanılmaz!
- Bakterinin KIA/TSI agar pasajının 4-6 saatlik kültüründen iğne öze ile alınan inokulum önce indol besiyerine ekilir.
- Sonraki inokulum iki ayrı BGB tüpüne ekilir. Son inokulum ile de sitrat agar yatık yüzeyine çizgi ekim yapılır; kapağı gevşekçe kapatılır.
- Tüpler KIA/TSI pasajı ile birlikte inkübatöre kaldırılır; aerobik ortamda 35°C’de bir gece inkübe edilirler.
- İnkübasyon süresinin sonunda indol, MR ve VP tüplerine reaktifleri damlatılır ve reaksiyonların değerlendirmesi yapılır:  
ÖNEMLİ: MR ve VP testlerinde 24 saat inkübasyonda -beklendiği halde- pozitif reaksiyon gelişmeyebilir. İnkübasyon süresinin uzatılmasına gerek olabileceği için, önce MR ve VP test tüplerinden temiz tüplere birer alikot (~1 mL) ayrılır; reaktifler bu alikotların üzerine damlatılır; ana tüpler ilave inkübasyon süresi için (1-3 gün) inkübatöre kaldırılır.
- **İndol** tüpüne 2-3 damla Kovacs’ın indol reaktifi tüp kenarından sızdırılarak konur; tüp yüzeyinde oluşan diskte renk değişimi gözlenir. Ehrlich’in metodu (anaeroblar) için tüpe önce 0.5 mL ksilen konur ve tüp alt-üst edilir; dinlenmeye bırakılır. Tüpün kenarından 6 damla Ehrlich’in indol reaktifi ilave edilir ve ksilen tabakasının altında renk değişimi gözlenir.



- **MR testi için** BGB içeren tüplerden birine 2-3 damla metil kırmızısı indikatörü damlatılır ve renk değişimi gözlenir.
- **VP testi için** BGB içeren tüplerden diğerine önce 6 damla  $\alpha$ -naftol, ardından 2 damla %40 KOH damlatılır ve oksijen temasını artırmak için iyice çalkalanır/karıştırılır; 30 dk içinde renk değişimi gözlemlenmelidir.

**ÖNEMLİ:**

- VP reaktifleri tanımlanmış sıra ile eklenmelidir: önce  $\alpha$ -naftol, sonra KOH. Sıranın değiştirilmesi durumunda VP test sonucu zayıf pozitif veya yanlış negatif olabilir!
- Her 2 mL besiyerine 2 damladan (~1 mL) daha fazla KOH konmamalıdır. Fazla KOH zayıf pozitif reaksiyona neden olabilir ve KOH'ın  $\alpha$ -naftol ile etkileşimi sonucu oluşan bakır-benzeri renk tarafından maskelenebilir.
- VP reagentleri ilave edilmiş test en geç 1 saat içinde okunmalıdır. Daha sonra okunmaz; çünkü bakır-benzeri renk meydana gelebilir ve yanlışlıkla pozitif olarak değerlendirilebilir.



**Şekil 1.** IMViC testinin yapılışı ile ilgili basit şema. Kısaltmalar: I, indol; MR, metil kırmızısı; VP, Voges-Proskauer; C, sitrat (Kaynak: Akbaş E. Henüz yayınlanmamış doküman. 2012)

<sup>1</sup> IMViC testi bir plak besiyerinde üremiş koloniden yapılacaksa -tek koloni bütün tüplerin inokülasyonuna yeterli olamayacağı için- önce incelenecek koloninin taze saf kültürü elde edilmiş olmalıdır.

<sup>2</sup> IMViC testi bazı durumlarda üreaz aktivitesi ve aminoasit kullanım testlerini de içerecek şekilde genişletilmelidir. O durumlarda KIA/TSI'den ilave test tüplerine de inokulum aktarılır.

## 3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması

### 3.1. İndol

- Pozitif indol testi – Reajen damlatılmasından sonra 20 saniye içinde renk değişimi (benzaldehit reajen ile kırmızı; sinnalaldehit reajen ile mavi)
- Negatif indol testi – hafif sarı renk oluşması veya renk değişimi olmaması

### 3.2. MR testi

- Pozitif MR testi – belirgin kırmızı renk oluşumu
- Negatif MR testi – sarı renk
- Zayıf MR pozitifliği – kırmızı-turuncu arası renk meydana gelmesi. Turuncu renk görülmüş ise, ayrılmış alikotun 4. güne kadar inkübasyonu ve takiben reaktif damlatılarak yeniden gözlenmesi önerilir. Bu durumda, besiyerinin ikiye bölünerek birinin de 25°C'de inkübe edilmesi daha iyi sonuç verebilir.

### 3.3. VP testi

- Pozitif VP testi – yüzeyde pembe-kırmızı renk değişikliği
- Negatif VP testi – renk değişikliğinin olmaması. Bakır rengi görünümü de "negatif" olarak yorumlanmalıdır.
- Pas rengi zayıf pozitiflik şeklinde değerlendirilir. Ayrılmış alikot 48 saat daha inkübe edildikten sonra reaktifler katılarak yeniden gözlenmesi önerilir.

### 3.4. Sitrat testi

- Pozitif sitrat testi – ekim çizgisi boyunca üreme ve belirgin mavi renk oluştuğunun görülmesi
- Negatif sitrat testi – besiyerinde üreme ve renk değişikliği olmaması; besiyeri yeşil kalır.

## 4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

### 4.1. İndol

- Tüp metodu, indol üretiminin saptanmasında spot testten daha duyarlıdır.
- Serbest indol plak besiyerinde ortama yayılabilir; komşu koloniler yayılmış indol dolayısı ile yanlış pozitif sonuç verebilirler. Bu nedenle

indol testi için koloni seçiminde saf kültürler tercih edilmelidir.

- İndol testi için kültürler olabildiğince aerobik şartlar sağlanarak inkübe edilmelidir; çünkü oksijen azaldıkça indol üretimi düşer.
- Glikoz ve/veya boyalar içeren besiyerleri (MacConkey, EMB, CIN, TCBS vb.) spot indol testi için kullanılmazlar; çünkü bu ortamlardaki pH indikatörleri yanlış pozitif sonuçlara neden olabilirler.
- Kazeinin asit hidrolizi sırasında triptofan yıkılmış olduğundan dolayı spot indol test için Mueller-Hinton agarda üremiş koloniler de kullanılmaz.
- Bazı *Proteus vulgaris*, *Providencia* ve *Aeromonas* suşları spot indol test ile yanlış negatif sonuç verebilirler.

#### 4.2. MR-VP

- İnokulum miktarının büyük olmasından kaçınılmalıdır; çünkü canlı organizma sayısı  $10^9$  cfu/mL'yi geçerse bakteriyel üreme inhibe olabilir.
- Eğer MR indikatörü yeterli inkübasyon süresinden daha önce damlatılacak olursa MR-negatif organizmalar için yanlış-*pozitif* sonuç alınabilir.
- BGB besiyeri içinde bulunan pepton özelliğinde/miktarında değişiklik farklı sonuçlara neden olabilir. Ürün değiştirirken bu bilgi hatırlanmalıdır.
- Uzamış inkübasyonda (>3 gün) bazı VP pozitif organizmalar ortam pH'ını düşürebilirler (asit ortam) ve VP reaksiyonunun zayıf-*pozitif* veya negatif olmasına neden olabilir.

#### 4.3. Sitrat

- Sitrat agarın yatık yüzeyinde renk değişimi meydana gelmemiş ancak rahat bir üreme gözleniyor ise, test yine pozitifdir. Ancak bir süre daha inkübe edildiği halde agar rengi maviye dönmüyorsa test, inokulum miktarı azaltılarak tekrarlanmalıdır.
- Arada kalmış durumlarda test tekrarlanmalıdır.
- Besiyeri taşımamak için sıvı kültürlerden inokülasyon yapılmamalıdır.
- Plak besiyerinden yapılacak inokülasyonlarda, yanlış pozitif reaksiyonları önlemek için, besiyeri materyali taşımaktan kaçınacak şekilde küçük inokulum kullanılmalıdır.
- Sitrat besiyerinden elde edilen sonuç tek başına tür düzeyinde tanımlama için yeterli değildir.

## Ekler

### Ek-1 İndol besiyeri<sup>2,3</sup>

100 mL indol besiyeri hazırlamak için şu örnek kullanılabilir:

Tripton (veya pankreatik kazein hidrolizat veya Pepton)	2 g
NaCl	0.5 g
Distile/deiyonize su	100 mL

1. Karıştırılır; pH 7.2'ye ayarlanır. Burgu kapaklı tüplere 1-2 mL alikotlar halinde dağıtılır. 121°C'de 15 dakika otoklavlanır.
2. Raf ömrü 1 yıldır. Tüpler; besiyerinin adı ile hazırlama ve son kullanma tarihleri de yazılarak etiketlenir ve buzdolabında (2-8°C) saklanır.

### Ek-2 Kovacs'ın ve Erlich'in indol reajenleri<sup>2,3</sup>

#### Kovacs'ın indol reajeni

<i>p</i> -dimetil-amino-benzaldehit	10 g
İzobutil veya izoamil alkol (saf)	150 mL
Hidroklorik asit, konsantre (%36'lık)	50 mL

1. Aldehit alkolün içinde eritilir; bu işlem hafif ısıtma gerektirebilir.
2. Çeker-ocak içinde çalışarak **asit** yavaşça karışıma eklenir – **asla** alkollü çözelti asidin üzerine eklenmemelidir! Devamlı karıştırılır.
3. Reaktif uçuk-sarı renktedir ve 1 yıl raf ömrü vardır. Kahverengi, burgu kapaklı şişede -reajenin adı ve hazırlama, son kullanma tarihleri yazılarak etiketlenir- buzdolabında (2-8°C) saklanır.

#### Ehrlich'in indol reajeni

<i>p</i> -dimetil-amino-benzaldehit	1 g
Etil alkol, %95	95 mL
Hidroklorik asit, konsantre (%36'lık)	20 mL

Hazırlama ve saklama koşulları "Kovacs'ın indol reajeni" ile aynıdır; üstte verilen hazırlama talimatı kullanılır.

**Güvenlik uyarısı!**

**HCl** tahriş edici (koroziv) ve yakıcıdır. Direkt temas ciddi yanıklara neden olur! Akut inhalasyon maruziyeti gözleri ve mukoz membranları tahriş eder. Solunum yolları ve akciğerlerde inflamasyon ve ödeme yol açabilir.

İndol reajenleri gibi çözeltileri **çeker-ocak** içinde hazırlanmalıdır! Su veya alkol **asla** asit üzerine **eklenmez!** Asitler sulandırılmak istendiğinde önce su ölçülmeli, asit yavaş bir şekilde üzerine eklenmelidir!

**Ek-3 Spot indol test reajenleri<sup>2,3</sup>****%5'lik p-Dimetil amino-benzaldehit**

p-dimetil-amino-benzaldehit	5 g
Hidroklorik asit, konsantre (%36'lık)	10 mL
Distile su	100 mL

1. Önce 10 mL konsantre HCl 90 mL suya eklenir.
2. Takiben aldehit eklenir ve eritilir (çeker ocak içinde).
3. Raf ömrü 4 aydır. Etiketlenir; kahverengi şişede, buzdolabında saklanır.

**%1'lik p-Dimetil amino-sinnamaldehyit**

p-dimetil-amino-sinnamaldehyit	1 g
Hidroklorik asit, konsantre (%36'lık)	10 mL
Distile su	100 mL

1. Önce 10 mL konsantre HCl 90 mL suya eklenir.
2. Takiben aldehit eklenir ve eritilir (çeker ocak içinde).
3. Raf ömrü 2 aydır. Etiketlenir; kahverengi şişede, buzdolabında saklanır.

**Güvenlik uyarısı!**

İndol reajenleri tahriş edicidir!

## Ek-4 MR ve VP test besiyeri ve reajenleri<sup>4,5,6</sup>

### BGB besiyeri (Clark-Lubs)

MR-VP testleri için kullanılır. Besiyerinin **pH**'ı önemlidir ve besiyeri hazırlanırken ayarlanmış olmalıdır!

Tamponlu pepton	1.4 g
Glikoz	1.0 g
Dipotasyum fosfat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1.0 g
Distile/deiyonize su	200 mL

- Maddeler suya eklenir, karıştırılarak eritilir. pH 6.9'a ayarlanır. Burgu kapaklı tüplere 1-2 mL alikotlar halinde dağıtılır. 121°C'de 15 dk otoklavlanır.
- Raf ömrü 1 yıldır. Tüpler; besiyerinin adı ile hazırlama ve son kullanma tarihleri de yazılarak etiketlenir ve buzdolabında (2-8°C) saklanır.

### Metil kırmızısı reaktifi

- Metil kırmızısı maddesi (0.1 g) etil alkol (%95'likten 300 mL) içinde çözünür. Üzerine 200 mL distile su ilave edilir. Raf ömrü 1 yıldır. Etiketlenir; kahverengi şişede, buzdolabında saklanır.

### %40'lık KOH

KOH (Potasyum hidroksit)	40 g
Distile/deiyonize su	100 mL

- Bir polietilen beher alınır; darası ölçülür. KOH bu kabın içinde tartılır; beher soğuk su/buz banyosunun içine konur. KOH üzerine suyun bir kısmı (~80 mL) ilave edilir; taneler tamamen eridikten sonra çözelti bir mezür içine aktarılır. Üzeri su ile 100 mL'ye tamamlanır.
- Çözelti bir polietilen şişeye veya parafin kaplı cam şişeye aktarılır. Üzeri etiketlenir, oda sıcaklığında saklanır. Raf ömrü 1 yıldır.

### %5'lik $\alpha$ -Naftol

- $\alpha$ -Naftol (5 g) bir miktar (10-15 mL) saf etil alkol içinde eritilir. Ardından bir mezürde yine saf etil alkol ile 100 mL'ye tamamlanır.
- Reajen neredeyse tamamen renksiz olmalıdır. Raf ömrü 2-3 haftadır. Etiketlenir; kahverengi şişede, buzdolabında saklanır.

#### Güvenlik uyarısı!

**KOH** yüksek higroskopik (nem çekici) bir kimyasaldır ve kuru granülleri nemlendiğinde (ıslandığında) **kostik** (yüksek düzeyde koroziv, tahriş edici) hale gelir. Darası alınmış bir kaptan hızla tartılmalıdır. Asitlerden uzak tutulmalıdır! Deriye temas etmesinden kaçınılmalıdır!

## Kaynaklar

---

- 1 Engelkirk PG, Duben-Engelkirk JL (eds). Gram negative bacilli: the family *Enterobacteriaceae*. In: *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Essentials of Diagnostic Microbiology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. 2008, p.302
- 2 Shigei J. Test methods used in the identification of commonly isolated aerobic gram-negative bacteria: Indole test. In: Isenberg HD (editor in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. ASM Press, Washington D.C. 1992, p. 1.19.13 - 1.19.16
- 3 York MK, Traylor MM, Hardy J, Henry M. Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. Indole test. In: Garcia LS (editor in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 3.17.23.1 - 3.17.23.3
- 4 Shigei J. Test methods used in the identification of commonly isolated aerobic gram-negative bacteria: Methylred test. In: Isenberg HD (editor in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. ASM Press, Washington D.C. 1992, p. 1.19.48 - 1.19.50
- 5 York MK, Traylor MM, Hardy J, Henry M. Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. MR-VP (Methyl Red-Voges-Proskauer) Tests. In: Garcia LS (editor in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 3.17.33.1 - 3.17.33.4
- 6 Shigei J. Test methods used in the identification of commonly isolated aerobic gram-negative bacteria: Voges-Proskauer test. In: Isenberg HD (editor in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. ASM Press, Washington D.C. 1992, p. 1.19.58 - 1.19.60
- 7 York MK, Traylor MM, Hardy J, Henry M. Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. Citrate Utilization Test (Simmons). In: Garcia LS (editor in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 3.17.12.1 - 3.17.12.2
- 8 Shigei J. Test methods used in the identification of commonly isolated aerobic gram-negative bacteria: Citrate utilisation test. In: Isenberg HD (editor in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. ASM Press, Washington D.C. 1992, p. 1.19.34 - 1.19.36



T.C. Sağlık Bakanlığı

# ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

## İndoksil Asetat Testi

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Test Prosedürleri
Standart No	B-TP-07
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik



## İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
GENEL BİLGİ .....	3
TEKNİK BİLGİLER .....	3
1 Test için asgari laboratuvar koşulları .....	3
2 Testin uygulanması .....	4
3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması .....	5
4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	5
KAYNAKLAR.....	5

## Kapsam ve Amaç

İndoksil asetat hidrolizi *Campylobacter* türlerinin ayırıcı tanısında kullanılan bir testtir. Bu UMS'de de testin uygulanması ve yorumlanmasına dair bir rehber sunulması hedeflenmiştir.

## Genel Bilgi

İndoksil bir triptofan yıkım ürünüdür; insan bağırsağında triptofanın bakteriyel esterazlar tarafından yıkıma uğratılması sonucu ortaya çıkar. Esterazların varlığı *in-vitro* olarak incelenen organizmanın ortama konan indoksil asetatı hidrolize ederek indoksil açığa çıkarması ile gösterilebilir. İndoksil sonraki aşamada kendiliğinden oksijen ile reaksiyona girerek 'indigo' (mavi-mor renk) oluşturur. Bakteriyel esterazların indoksil asetat üzerine etkisi disk testi ile gösterilmektedir.

İlk olarak 80'lerin ortalarında bazı *Campylobacter* türlerinin indoksil asetatı hidrolize uğrattığı gözlenmiştir. Günümüzde bu test yaygın olarak *Campylobacter* tür ayrımında kullanılır. *Campylobacter jejuni* ve *Campylobacter coli* pozitif iken, *Campylobacter lari* ve *Campylobacter fetus* indoksil asetat negatiftir (1,2).

## Teknik Bilgiler

### 1 Test için asgari laboratuvar koşulları

#### 1.1. Laboratuvar güvenliği

Bu UMS'de bahsi geçen organizmalar ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart önlemler uygulanmalı, önlemler risk değerlendirmesi ile de desteklenmelidir. Aerosol oluşturması muhtemel tüm laboratuvar çalışmaları bir biyolojik güvenlik kabininde gerçekleştirilmelidir (ayrıca bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

#### 1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) testten önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşina olmalı, ve; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

#### 1.3. Örnek, Reaktif, Donanım

##### Test mikroorganizmaları

- *Campylobacter* spp ve benzeri (*Helicobacter*, *Arcobacter*) şüpheli izolatlar (oksidaz pozitif, hareketli, kıvrık, gram negatif çomaklar)
- *Moraxella catarrhalis* şüpheli izolat (kanlı agarda beyaz koloniler oluşturmuş, gram negatif, oksidaz pozitif diplokoklar)

### İndoksil asetat diskleri

- Piyasadan hazır temin edilebilir.
- Laboratuvarda hazırlanabilir. Bunun için:
  - (a) %10'luk indoksil asetat çözeltisi hazırlanır (1 g indoksil asetat 10 mL aseton içinde eritilerek)
  - (b) 6-mm çaplı kağıt diskler bu çözelti ile ıslatılır - bir diske 25 µL çözelti hesabı ile.
  - (c) Oda ısısında kurutulur.
  - (d) Disklere tekrar 25 µL çözelti damlatılır ve tekrar kurutulurlar.
  - (e) Kurutulmuş diskler kahverengi şişede, buzdolabında saklanır.
  - (f) Şişe içine nem alıcı kalsiyum oksit veya silika jel granül paketi konmalıdır.

### Diğer gereç, donanım

- Öze, steril, tek kullanımlık veya nikrom, veya steril kürdan
- Petri kabı
- Distile su veya SF, steril

## 1.4. Kalite kontrol

- Her yeni disk lotu kullanıma sokulmadan önce pozitif ve negatif kalite kontrol suşları ile test edilmelidir.
- Her kullanımdan önce diskler renk değişimi yönünden kontrol edilmeli, beyaz olmayan diskler kullanılmamalıdır.
- Kalite kontrol organizmaları (1):
  - C. jejuni* ATCC 33560 veya *M. catarrhalis* ATCC 25240 – pozitif (mavi renk)
  - C. fetus* ATCC 27374 – negatif (renk değişimi yok)

## 2 Testin uygulanması

- İndoksil asetat diski bir Petri kabına yerleştirilir.
- Şüpheli bakteri *Moraxella* ise, inokulum konmadan önce disk steril SF ile nemlendirilmelidir.
- Organizmanın 24-48 saatlik kültüründen bir öze dolusu inokulum diskin üzerine sürülür.
- Şüpheli bakteri *Campylobacter* ise, inokulum konduktan sonra diskin üzerine bir damla steril distile su damlatılır.
- Disk oda ısısında inkübe edilir: *Campylobacter* için 30 dk; *Moraxella* için 3 dk.
- Daha sonra renk değişimi değerlendirilir.

## 3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması

### 3.1. Yorum

- **Pozitif sonuç** – diskin üzerinde koyu mavi renk gelişmesi (*Moraxella* için 3 dk, *Campylobacter* için 5-10 dk içinde)
- **Negatif sonuç** – herhangi bir renk değişikliği olmaması
- **Zayıf pozitif reaksiyon** – 10-30 dk içinde soluk mavi bir renk oluşması

### 3.2. Raporlama

- *C. jejuni*, *C. coli*, *Campylobacter upsaliensis*, *Arcobacter cryaerophilus* ve *Helicobacter fennelliae* indoksil asetat pozitifdir.
- *M. catarrhalis* de indoksil asetat pozitifdir. Kanlı agarda üremiş oksidaz pozitif, gram negatif diplokoklar eğer indoksil asetat pozitif bulunursa *Moraxella catarrhalis* olarak rapor edilir.
- *C. lari*, *Helicobacter pylori*, *Helicobacter cinaedi* ve *Helicobacter pullorum* indoksil asetat negatifdir.

## 4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Test bakterinin ürediği besiyerinden etkilenmez, güvenilir bir testtir.
- Disk testi tüp testine göre daha hızlı ve güvenilir sonuç verir. Bu nedenle artık tüp testi tercih edilmemektedir (1).

## Kaynaklar

- 1 York MK, Traylor MM, Hardy J, Henry M. Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. Indoxyl Acetate Disk Test. In: Garcia LS (ed. in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 3.17.24.1-3.17.24.2
- 2 Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, Jr. (eds). Curved gram-negative bacilli and oxidase-positive fermenters: Campylobacters and Vibrionaceae. In: *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 4th ed., J.B. Lippincott Company, Philadelphia. 1992, p. 255.



T.C. Sağlık Bakanlığı

# ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

## **Karanlık Alan Mikroskopisi** (Bakteriyel Patojenlerin Mikroskopik İncelemesi)

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Test Prosedürleri
Standart No	B-TP-08
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

## İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
GENEL BİLGİ .....	3
TEKNİK BİLGİLER .....	4
1 Test için asgari laboratuvar koşulları .....	4
2 Karanlık alan mikroskopisi.....	5
3 Preparatların değerlendirilmesi/yorumlanması .....	6
4 Sonuçların raporlanması .....	6
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	6
KAYNAKLAR.....	7

## Kapsam ve Amaç

Karanlık alan mikroskopisi sifilizin erken döneminde şankr lezyonlarında hareketli *Treponema pallidum*'un varlığını göstermek için kullanılan bir yöntemdir.

Bu UMS'de de karanlık alan mikroskopisinin dayandığı prensip ile doğru kullanımı ve yorumlanmasına dair bir rehber sunulması hedeflenmiştir

## Genel Bilgi

Sıradan bir ışık mikroskopunda kullanılan kondansatör ışığı yoğunlaştırır ve doğrudan incelenen örneğin içinden geçirir. Bu aydınlık-alan aydınlatması sağlar. Ancak, aydınlık-alanda kendi zemini ile kontrast yapamayan ışık-duyarlı organizmalar (spiroketler gibi), ışık mikroskopunda görülemezler. Karanlık-alan için uyarlanmış bir mikroskop, örneğin içinden ışığın geçişini önleyen, bunun yerine de örneğin belirli bir açıyla ışığı yansıtmasına neden olan bir kondansatöre sahiptir. Bu ışınlar toplandığı ve bir görüntü içine odaklandığı zaman, ince bir nesne karanlık bir arka plan üzerinde görünür hale gelmektedir (1).

Sifiliz spiroket *T. pallidum*'un neden olduğu bir enfeksiyondur. Laboratuvarında kültürü yapılamadığından hastalığın tanısı büyük oranda serolojik incelemelere dayanır. *T. pallidum*'un bir diğer özelliği de çok ince bir hücre yapısına sahip olmasıdır; öyle ki, normal ışık mikroskopunda rutin boyama yöntemleri ile görülemez. Ancak sifilizin erken döneminde, "şankr" adı verilen, çoğunlukla tek ve genital organlarda ortaya çıkan lezyonlarından etkenin karanlık alan veya DFA gibi diğer mikroskopik yöntemlerle gösterilmesi mümkündür (2). Bunlardan en yaygını karanlık alan mikroskopisidir; özel ekipman gerektirmez; laboratuvarın, karanlık alan kondansatörü olan bir ışık mikroskopuna sahip olması yeterlidir. Özetle, karanlık alan incelemesi lezyon eksudalarında canlı, hareketli treponemaların görülmesine imkân verir ve pozitif bulgu "kesin tanı" koydurucudur (3,4).

Tekniğin en önemli özelliği ve aynı zamanda dezavantajı lezyondan örnek alınır alınmaz -hareketli treponemaları görebilmek için- preparatı incelemek zorunluluğudur. Her ne kadar karanlık alan incelemesinde başarı uygulayıcının tecrübesi ve lezyondaki organizma sayısı ile yakından ilişkili ise de teknik genital lezyonlara uygulandığında sonuç özgüldür. Ağız içi ve rektal bölge lezyonlarında ise -bu bölgelerin normal florasında da spiroketler bulunabildiği için- yanlış pozitiflik olasılığı nedeniyle karanlık alan mikroskopisi önerilmez (2). Karanlık alan mikroskopisi *Vibrio spp*, *Campylobacter spp* gibi bakterilerin hareketlerinin incelenmesinde de kullanışlı bir yöntemdir.

# Teknik Bilgiler

## 1 Test için asgari laboratuvar koşulları

### 1.1. Laboratuvar güvenliği

Bu UMS'de bahsi geçen organizmalar ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Klinik örnekler enfeksiyöz kabul edilmeli, örnekleri alırken ve preparat hazırlarken daima standart önlemler uygulanmalıdır.

**Güvenlik uyarısı!** *T. pallidum* ciltteki herhangi bir açıklıktan girebilir ve enfeksiyona neden olabilir. Bu prosedür uygulanırken **daima** eldiven giyilmelidir.

Boyanmış olsun veya olmasın bütün lamlar **kesici-delici atık** kabul edilir ve kesinlikle kesici-delici atık kutusuna atılırlar! Diğer biyolojik kirlilerin bulunduğu torbalara atılmaları halinde torbayı deler ve ciddi enfeksiyöz risk doğururlar!

Eğer örneği alırken enjektör kullanılıyorsa, enjektör iğnelerinin kapakları asla yeniden kapatılmaz! İğneler ve kullanılmış lamlar **kesici-delici atık** kabul edilir ve kesinlikle kesici-delici atık kutusuna atılırlar! Diğer biyolojik kirlilerin bulunduğu torbalara atılmaları halinde torbayı deler ve ciddi enfeksiyöz risk doğururlar!

### 1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Sifiliz şüpheli lezyondan eksuda örneğinin alınması işlemi *kesinlikle* deneyimli bir Mikrobiyoloji Uzmanı veya klinisyen tarafından gerçekleştirilmelidir.

### 1.3. Örnek, Donanım

#### İnceleme örneği

- Sifiliz şüpheli lezyondan eksuda örneği – örnek alınır alınmaz preparat hazırlanması ve incelenmesi gerekir. Bu nedenle **örnek alma yöntemi** de bu UMS'de, aşağıda verilmektedir (*bkz.2.2*).
- Primer şankr, makülopapüler lezyonlardan epidermal ve mukozal örnekler, lenf nodu aspirasyon sıvısı – Karanlık alan mikroskopisi veya DFA testi için kullanılabilirler.
- Hastaya antibiyotik başlanmadan önce alınması önem taşır. Aktif lezyonlar primer, sekonder ve erken konjenital sifilizde yüksek miktarda treponema içerdiğinden uygun örneklerdir.

#### Diğer gereç, donanım

- Karanlık alan mikroskobu - 10×, 40× ve 100× objektifleri ve 10× oküler; karanlık-alan kondansatörü (tek veya çift yansıtıcılı)
- Lamlar (önceden temizlenmiş; 25×75 mm) ve lameller (22×22mm)
- Pastör pipeti, steril (opsiyonel olarak enjektör ve iğne)
- SF, steril, izotonik
- Eldiven
- Kesici-delici atık kabı



## 1.4. Kalite kontrol

- Mikroskop son 12 ay içinde kalibre edilmiş olmalıdır.
- Hasta örnekleri ile çalışmadan önce karanlık alanın ayarlanması ve pratiğin geliştirilmesi amacıyla preparat hazırlanıp incelenmelidir. Örnek preparatın hazırlanmasında aşağıda verilen yol izlenir:
  - (a) Temiz bir lam üzerine bir damla SF konur. Laboratuvardan bir kişinin yanak iç yüzünden kazıntı örneği alınarak lam üzerinde homojenize edilir,
  - (b) Preparat karanlık alan kondansatörü takılı mikroskopta  $\times 400$  ve  $\times 1000$  büyütme ile ayrı ayrı değerlendirilir.

## 2. Karanlık alan mikroskopisi

### 2.1. Örnek alınması ile ilgili önemli hususlar

- Karanlık-alanda mikroskopik inceleme için lezyondan seröz sıvı örneği alınır; örnek antibiyotik tedavisi öncesinde alınmalıdır.
- Örnek, alınır alınmaz incelenmesi gerektiği için, **laboratuvarda** alınmalıdır. Eğer klinik laboratuvara çok yakın ise ve 10 dk içinde laboratuvara ulaşım incelenebilecekse, örnek klinikte alınabilir.
- Ağız lezyonlarından karanlık alan mikroskopisi için örnek alınmaz; çünkü patojen olmayan spiroketler oral mikrobiyal floranın bir parçası oldukları için yanlış pozitif sonuçlara neden olurlar.  
NOT: Ağız ve rektal bölge lezyonlarından örnekler, eğer spesifik antikolar ile DFA testi yapılabiliriyorsa, alınmalıdır (*bkz.* "5. Olası sorunlar/kısıtlılıklar").

### 2.2. Şankr örneğinin alınması ve preparatın hazırlanması

- Önce lezyon yüzeyi steril gazlı bez ve SF ile temizlenir; kurutmak için tamponlanır. Nazik bir şekilde, varsa, kabuklar vb. uzaklaştırılır.
- Lezyon yüzeyi kuru gaz tampon ile biraz tahriş edilerek hafifçe kanatılır. Steril SF ile yıkama yapılır ve silinerek, gelen kan temizlenir.
- Lezyon tabanı kenarlardan parmaklar arasında tutularak nazikçe sıkıştırılır; ülser zemininden seröz, temiz bir eksuda çıkar çıkmaz temiz bir lam eksudaya dokundurulur.
- Eğer eksuda yoksa lezyona bir damla steril SF damlatılır veya bir şırıngaya takılı steril iğne ile lezyon tabanına girilir, aspire edilir ve sonra iğneye bir damla da SF çekilir.  
NOT: Sekonder enfeksiyon dönemi lezyonlarından örnek almak isteniyorsa nazikçe SF ile temizlendikten sonra örnek alınmalıdır.
- Alınan materyal lam üzerine bırakılır. Üzerine hemen lamel ile kapatılır.
- Karanlık alan mikroskobunda incelenir.

### 2.3. Preparatların karanlık alan mikroskobunda incelenmesi

- Preparat hazırlanır hazırlanmaz incelenmelidir. Önce bütün alanlar  $\times 400$  büyütmede taranır; hareketli spiral organizmaların varlığı araştırılır.
- Şüpheli bir obje görülürse objektif değiştirilir ve  $\times 1000$  büyütmede (lamel üzerine immersiyon yağı konularak) daha yakından değerlendirilir (4).
- İnceleme tamamlanır tamamlanmaz lam kesici-delici atık kutusuna atılmalıdır.

## 3 Preparatların değerlendirilmesi/yorumlanması

- *T. pallidum* genellikle eritrosit çapından daha büyük, oldukça uzun (6-14  $\mu\text{m}$ ) organizmalardır.
- Organizmalar karanlık alanda narin, tirbuşon şeklinde, sert, düzgün, spiraller gibi görünürler; aktif hareketli iken bile sarmal görünüm korunur.
- Uzunlamasına rotasyonel hareketler, ileri-geri hareketler; bükülme, eğilme, ya da iki yana kıvrılma hareketleri gözlenir.

## 4 Sonuçların raporlanması

- Yalnızca genital organ lezyonuna ait örnek sonuçları rapor edilir.
- Eğer karakteristik morfoloji ve hareket özelliklerine sahip organizmalar görüldüyse "*Treponema pallidum* benzeri treponemalar gözlendi" şeklinde rapor edilir.
- Eğer hiçbir organizma gözlenmediyse "*Treponema*-benzeri herhangi bir organizma görülmedi" şeklinde rapor edilir.

## 5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Hareketli organizmaları görmek için örnek en kısa sürede (20 dk içinde) incelenmelidir. Eğer bu mümkün değilse lam üzerine alınan damla havada kurutulur ve metanol ile sabitlenir. Böylece hazırlanmış olan lam *T. pallidum* DFA testi yapabilen bir laboratuvara gönderilmelidir.

## Kaynaklar

---

- 1 Black JG. Microscopy and Staining: dark-field microscopy. *In: Microbiology: Principles and Explorations*. 7th ed., John Wiley & Sons, Inc, U.S. 2008, p. 60-61
- 2 Finegold SM, Baron EJ (eds). Spirochetes. *In: Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. 7th ed., The C.V. Mosby Company, USA. 1986, p. 469-474.
- 3 Pope V. Laboratory Diagnosis of Syphilis. *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 11.5.1 - 4
- 4 York MK. Wet mount for detection of leukocytes and microorganisms: Demonstration of *Treponema pallidum* in specimens using dark-field microscopy. Appendix 3.2.3-1. *In: Garcia LS, Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 3.2.3.5 - 3.2.3.6



T.C. Sağlık Bakanlığı

# ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

## Karbonhidrat Oksidasyon-Fermentasyon (OF) Testleri

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Test prosedürleri
Standart No	B-TP-09
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik
----------	-------	------------

## İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	3
GENEL BİLGİ .....	3
TEKNİK BİLGİLER .....	4
1 Test için asgari laboratuvar koşulları .....	4
2 Testin uygulanması .....	5
3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması .....	5
4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	6
EKLER.....	7
Ek-1 OF besiyeri (Hugh-Leifson'un formülü).....	7
Ek-2 Steril mineral yağ hazırlanması .....	8
KAYNAKLAR.....	9

## Kapsam ve Amaç

Oksidasyon-fermentasyon (OF) testleri bakterilerin karbonhidratları hangi yolla kullandığını saptayarak bakterilerin tanımlanmasında kullanılan testlerdir. Bu UMS'de OF testlerinin dayandığı prensipler ile gram-negatif bakterilerin tanımlanmasında kullanımı ve yorumlanmalarına dair bir rehber sunulması hedeflenmiştir.

## Kısaltmalar ve Tanımlar

**KIA/TSI** Kligler Iron Agar / Triple Sugar Iron Agar

**OF** Oksidatif-fermentatif (besiyeri)

## Genel Bilgi

Bakteriler karbonhidratları aerob (oksidatif) ve anaerob (fermentatif) yollardan biri veya her ikisi ile yıkma özelliklerine göre ayrılabilirler. Oksidasyon aerob koşullarda gerçekleşir; bazı organizmalar glikozu oksidatif yoldan metabolize ederler ve **oksijen** son hidrojen alıcısı olarak işlev görür. Bazı organizmalar da glikozu fermentatif yoldan metabolize ederler. Fermentasyon, oksijenden ziyade bir **organik madde**nin son hidrojen alıcısı olarak işlev gördüğü metabolik bir süreçtir; anaerob (oksijenin olmadığı) şartlarda gerçekleşir (1,2).

Karbonhidratlar bakteriler tarafından aerob veya anaerob yollardan metabolize edildiklerinde çeşitli ürünler meydana gelir. Bunlar, asetik asit, bütirik asit, formik asit, laktik asit, propionik asit gibi organik asitler; asetilmetilkarbinol, aseton, etil alkol, bütül alkol gibi nötral ürünler ve oksijen, hidrojen, metan, karbondioksit gibi gazlardır. Ayrışma sonucu oluşan organik asitler besiyerinin pH'ını düşürdükleri için ortamdaki pH indikatörünün rengini değiştirir ve böylece gözlenebilirler. Fermentatif metabolizma ile daha fazla asit ürün üretilmektedir (2,3).

Bir gram negatif bakterinin oksidatif ya da fermentatif olup olmadığının tespitinde kullanılan en iyi besiyeri KIA ya da TSI'dir. Bu agar bazlı tüp besiyerlerinde üst kısımda oksidatif reaksiyonu, dipte de fermentasyon reaksiyonunu gözlemlemek mümkün olur (1). Eğer bakteri bu besiyerinde glikozu fermente edememiş (nonfermentatif) ise bakterinin glikozu veya diğer şekerleri oksidatif yoldan kullanıp kullanmadığına karar vermek için OF testleri yapılır (1,3,4).

OF testleri özellikle gram negatif bakterilerin tanımlanmasında kullanılırlar. OF testleri için OF besiyerleri geliştirilmiştir; en önemli özellikleri asit üretimi zayıf olsa bile bunun gözlenmesine uygun olmalarıdır (1,3). Rutin çalışmada en yaygın kullanılan OF besiyeri ilk Hugh ve Leifson tarafından önerilmiş olan formüldür; indikatör olarak bromtimol mavisi içerir ve asit üretimi ile sarıya döner (5). Daha sonra King tarafından da bir besiyeri geliştirmiş olup pH indikatörü olarak fenol kırmızısı içermektedir. Zayıf asit üretiminin gösterilmesinde King'in besiyerinin daha duyarlı olduğu kabul edilir (6). Stafilokoklar ve mikrokoklar için OF testi yapılacaksa Baird-Parker'ın OF besiyeri modifikasyonu kullanılır.

# Teknik Bilgiler

## 1 Test için asgari laboratuvar koşulları

### 1.1. Laboratuvar güvenliği

Bu UMS'de bahsi geçen organizmalar ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart önlemler uygulanmalı, önlemler risk değerlendirmesi ile de desteklenmelidir. Aerosol oluşturması muhtemel tüm laboratuvar çalışmaları bir biyolojik güvenlik kabininde gerçekleştirilmelidir (ayrıca bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

### 1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) testten önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşına olmalı, ve; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

### 1.3. Örnek, Reaktif, Kit, Donanım

#### İnceleme örneği

- Bakteri izolatu - plak besiyerinde tek düşmüş koloniler.

#### Besiyeri / Reaktif

- OF besiyeri - Gram-negatif bakteriler için (Hugh-Leifson'un formülü). Piyasadan hazır temin edilebileceği gibi laboratuvar da hazırlanabilir (bkz. Ek-1).
- Mineral yağ veya sıvı parafin, steril (bkz. Ek-2)

#### Diğer gereç, donanım

- Test tüpleri, burgu kapaklı, cam
- Öze, steril tek kullanımlık veya nikrom
- Damlalık veya tek kullanımlık Pastör pipeti

### 1.4. Kalite kontrol

- Her yeni besiyeri serisi kullanıma sokulmadan önce pozitif ve negatif kalite kontrol suşları ile test edilmelidir.
- Her kullanımdan önce besiyeri bulanıklık ve renk değişimi olup olmadığı yönünden kontrol edilmeli; bulanık veya renk değişikliği olmuş tüpler atılmalıdır.
- Kalite kontrol organizmaları:

Oksidatif pozitif kontrol - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Fermentatif pozitif kontrol - *Escherichia coli* ATCC 25922

Negatif kontrol (nonsakkarolitik) - *Acinetobacter lwoffii* ATCC 15309  
veya *Moraxella osloensis* ATCC 10973

## 2 Testin uygulanması

- Test edilecek her karbonhidrat için o karbonhidratı içeren OF besiyerinden 2 test tüpü alınır. Kaynamakta olan suda 10 dakika bekletilir; bu işlem ile besiyerindeki oksijenin dışarı çıkması amaçlanır.
- Bir öze ile plak besiyerindeki test edilecek koloniden alınarak her iki tüpe dikine daldırılmak suretiyle ekim yapılır.
- Tüplerden biri anaerob (hava ile teması kesilerek) diğeri aerob (hava ile temas eder şekilde) inkübe edileceklerdir. Bu nedenle inkübasyona kaldırmadan önce tüplerden birindeki besiyerinin üzeri yaklaşık 1 cm kalınlığında steril mineral yağ veya sıvı parafin ile kaplanır (anaerob ortam sağlamak için).

NOT: Kaplama işlemi dikkatlice yapılmalıdır. Yağ steril Pastör pipeti ile tüpün kenarından yavaşça sızdırılmalı, besiyerinin hava ile teması tam olarak kesilmeli, kesinlikle hava kabarcığı oluşturulmamalıdır.

- Kapaklar sıkıca kapatılır.
- Tüpler 35-37°C'de 72 saat inkübasyona bırakılır. Yavaş üreyen organizmalar için inkübasyon süresi 7 güne kadar uzatılabilir.
- Tüpler renk değişikliği açısından her gün kontrol edilir.

## 3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması

- **Bakteri oksidatif** – Aerob tüpte besiyerinin rengi orijinal mavi-yeşilden sarıya döner. Anaerob tüpte renk değişikliği gözlenmez.
- **Bakteri fermentatif** - Her iki tüpte de besiyeri rengi sarıya döner.
- **Bakteri nonsakkarolitik (OF negatif)** – Asit oluşumu gözlenmez. Tüplerde renk değişimi olmaz (yeşil).

NOT: Bazen nonsakkarolitik organizma aerob tüpte hafif alkali reaksiyon oluşturabilir ve bu tüp mavi-yeşil görünebilir.

- Tablo 1'de OF test tüplerinin değerlendirilmesinde, oksidatif ve fermentatif reaksiyonlar ile gözlenebilecek renk değişimleri ve yorumu özetlenmektedir.

**Tablo 1.** OF testinde olası reaksiyon sonuçları (6).

Sonuçlar		Metabolizma (karar)	Kontrol organizması
Açık tüpte	Yağ kaplı tüpte		
Asit (sarı)	Alkali (yeşil)	Oksidatif	<i>P. aeruginosa</i>
Asit (sarı)	Asit (sarı)	Fermentatif	<i>E. coli</i>
Alkali (yeşil, mavi-yeşil)	Alkali (yeşil)	Nonsakkarolitik (nonoksidatif)	<i>A. lwoffii</i>



## 4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Oksidatif organizmaların meydana getirdiği renk değişimi yüzeyden başlar ve reaksiyonun görünür hal alması bir-iki gün sürebilir. Bu gibi izolatlarda yanlış negatif sonuçlara karşı dikkatli olunmalıdır.
- Yavaş üreyen organizmalarda sonuç alınması günler sürebilir.
- Bazı organizmalar Hugh ve Leifson'un besiyerinde üreyemez. Bu durumda her tüpe besleyici ortamı zenginleştirmek amacıyla %2 oranında olacak şekilde serum ve %0.1 oranında olacak şekilde maya özütü eklenerek test tekrarlanır (6).

## Ekler

### Ek-1 OF besiyeri (Hugh-Leifson'un formülü)

#### Karbonhidrat çözeltisi, %10'luk

1. Kullanılacak karbonhidrat 2 g tartılır ve 20 mL distile suda eritilir.
2. Enjektör yardımıyla 0.2 µm por çaplı filtreden geçirilerek steril edilir.
3. Birden fazla tür karbonhidratın test edilmesi hedefleniyorsa her biri için ayrı ayrı %10'luk çözelti hazırlanır.

#### Baz besiyeri

Pepton	2.0 g
Sodyum klorid	5.0 g
Bromtimol mavisi	0.03 g
Agar	3.0 g
Dipotasyum fosfat	0.30 g
Distile su	1000 mL

1. Maddeler manyetik karıştırıcıda ısıtılarak karıştırılır, eritilir. Otoklavlanmadan önce pH 7.1 olarak ayarlanmalıdır.
2. Besiyeri 5 erlene (200 mL) bölünür ve erlenler 121°C'de 15 dk otoklavlanır.

#### OF besiyerinin hazırlanması<sup>6</sup>

1. Otoklavdan çıkmış erlenler önceden 55°C'ye ayarlanmış su banyosuna konarak 55°C'ye soğutulur.
2. Aseptik olarak, her 200 mL baz besiyerine bir karbonhidrat çözeltisi (20 mL steril %10'luk çözelti) eklenir (final konsantrasyon %1 olacak şekilde).
3. Aseptik şartlarda steril test tüplerine 2-3 mL alikotlar halinde dağıtılır. Dik konumda agarın donması için beklenir.
4. Tüplerin üzeri besiyerinin adı, içerdiği karbonhidrat, hazırlama ve son kullanma tarihleri yazılarak etiketlenir, buzdolabında (2-8°C) saklanır. Raf ömrü 6 aydır.

NOT: Bazı prosedürlerde karbonhidrat baz besiyerine sterilizasyondan önce eklenir (1 g /100 mL olacak şekilde). Bu durumda besiyeri bir ısıtıcı üzerinde (hot-plate) kaynatılarak eritilir; pH'ı 7.1'e ayarlanır ve test tüplerine 2-3 mL dağıtılır. Daha sonra tüpler -şekerlerin yıkılmasını önlemek için- 20 dk basınçsız kaynar suda/buharda ya da 115°C'de 10 dk tutulur (<sup>7</sup>).

## Ek-2 Steril mineral yağ hazırlanması

Laboratuvarda çeşitli nedenlerle anaerob ortam sağlamak istendiğinde besiyeri üzerinin yağ veya benzeri maddelerle kaplanması gerekir. Mineral yağ, vaspar, petrol jeli ya da sıvı parafin bu amaç için kullanılabilir. Ancak bu maddelerin sterilizasyonunu sağlamak güçtür. Belli başlı öneriler aşağıda verilmiştir:

### Otoklavda sterilizasyon

Mineral yağın 100 mL'sine 1 mL distile su ilave edilir.  
121°C'de en az **45 dakika** otoklavlanır (6).

### Pastör fırınında sterilizasyon

Bazı kaynaklar otoklavdan ziyade Pastör fırınında sterilizasyon önermektedir. Özellikle vaspar ve petrol jeli sterilizasyonu söz konusu ise, 180°C'de >2 saat tutulmalıdır (8,9).

### Filtrasyon ile sterilizasyon

Isı uygulamaları mineral yağın bulanıklaşmasına neden olabildiğinden ve bulanıklık bazı amaçlar için dezavantaj oluşturabildiğinden mineral yağın filtrasyon ile steril edilmesi önerilir. Filtrasyon için por çapı 0.4 µm olan polikarbonat filtre kullanılmalı ve işlem dikkatli bir şekilde yapılmalıdır (10,11).

Steril mineral yağ oda ısısında saklanır.

## Kaynaklar

---

- 1 York MK, Traylor MM, Hardy J, Henry M. Biochemical Tests for the Identification of Aerobic Bacteria. Carbohydrate Utilization Tests. In: Garcia LS (ed. in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 3.17.9.1 - 3.17.9.6
- 2 Blair J, Lennette E, Truant J. *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington D.C. 1970
- 3 Winn WC, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. 2006, p. 196
- 4 Tille PM, ed. Overview of bacterial identification methods and strategies. In: *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. 13th ed., 2014, p. 224
- 5 Hugh R, Leifson E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative rods. *J Bacteriol* 1953;66:24-26.
- 6 Shigei J. Test methods used in the identification of commonly isolated aerobic gram-negative bacteria: Oxidation-fermentation test. In: Isenberg HD (ed. in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. ASM Press, Washington D.C. 1992, p. 1.19.50 - 1.19.53
- 7 Hansen A. Oxidative-Fermentative Test Protocol. ASM Microbe Library. <http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3151-oxidative-fermentative-test-protocol> (son erişim tarihi: 12.01.2014)
- 8 Petti CA, Carroll KC. Procedures for the storage of microorganisms. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 124-131
- 9 Sulfite Agar. [http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco\\_BBL/297210.pdf](http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/297210.pdf) (son erişim: 29.12.2013)
- 10 Mineral oil. [http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/1/m8410pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/m8410pis.pdf) (son erişim tarihi: 29.12.2013)
- 11 BioSampler: How can you sterilize the mineral oil used in the BioSampler? <http://www.skinc.com/FAQ/skcfqs.php?action=showEntry&data=345> (son erişim tarihi: 29.12.2013)



T.C. Sağlık Bakanlığı

# ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

## Katalaz Testi

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Test Prosedürleri
Standart No	B-TP-10
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

## İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
GENEL BİLGİ .....	3
TEKNİK BİLGİLER .....	3
1 Test için asgari laboratuvar koşulları .....	3
2 Testin uygulanması .....	4
3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması .....	5
4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	5
KAYNAKLAR .....	5

## Kapsam ve Amaç

Katalaz testi bir mikroorganizmanın katalaz enzimi taşıyıp taşımadığının gösterilmesi amacıyla kullanılır. Bu enzimi taşıyan organizmalar "katalaz-pozitif" olarak adlandırılır. Katalaz testi ilk tanımlama basamağında değerli bir test olup doğru uygulanması kritik önem taşır. Bu UMS'de de katalaz testinin doğru kullanım ve yorumlanmasına dair bir rehber sunulması hedeflenmiştir.

## Genel Bilgi

Aerob ve fakültatif anaerob bakterilerin çoğu aerobik solunumun bir son ürünü olarak hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) oluştururlar. Üreme ortamında birikmesi halinde  $H_2O_2$  organizmalar için toksik etki gösterir. Bunu önlemek için bazı organizmalar  $H_2O_2$ 'yi oksijen ve suya indirgeyen ( $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ ) bir enzim (katalaz) üretirler (1,2,3).

Katalaz, bakteri süspansiyonu üzerine %3'lük  $H_2O_2$  eklenmesi ile tespit edilir. Enzim mevcut ise, 10 saniyede güçlü köpük ya da hava kabarcıkları gözlenir.

Katalaz testi en sık streptokok (katalaz-negatif) ve stafilokokların (katalaz-pozitif) ayırt edilmesinde kullanılmaktadır. Bu test *Listeria monocytogenes* (katalaz-pozitif) ile Grup B streptokokların (katalaz-negatif) ayrımının yapılmasında da yararlıdır. Tüm *Enterobacteriaceae* üyeleri katalaz-pozitiflerdir. Bazı bakteriler (*Aerococcus* türlerinin bazı kökenleri ve bazı enterokoklar)  $H_2O_2$ 'yi yıkan başka tür enzimlere sahip olabilirler ve bunlar hemen her zaman geç reaksiyon verirler; bu nedenle 20-30 saniyeden sonra oluşan küçük kabarcıklar pozitif test olarak kabul edilmez (2,3).

Bazı anaerob bakteriler de katalaz enzimi içerirler. Eğer anaerobik bakterinin katalaz reaksiyonu test edilecekse, test öncesinde bakteri 30 dakika kadar havaya maruz bırakılmalıdır. Anaerob bakteriler için katalaz testi yapılırken  $H_2O_2$ 'nin %15'lik çözeltisi tercih edilir. *Neisseria* türlerinin katalaz reaksiyonu için ise %30'luk  $H_2O_2$  uygulanır. %30'luk reaktif bütün testlerde kullanılabilirse de laboratuvar güvenliği gerekleri nedeniyle önerilmez (1).

## Teknik Bilgiler

### 1 Test için asgari laboratuvar koşulları

#### 1.1. Laboratuvar güvenliği

Bu UMS'de bahsi geçen organizmalar ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart önlemler uygulanmalı, önlemler risk değerlendirmesi ile de desteklenmelidir. Aerosol oluşturması muhtemel tüm laboratuvar çalışmalarını bir biyolojik güvenlik kabininde gerçekleştirilmelidir (ayrıca bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi")

**Güvenlik uyarısı!** Katalaz testi yüksek oranda enfeksiyöz aerosol üretimine yol açan laboratuvar işlemlerinden biridir! Enfeksiyöz aerosole maruz kalma riski nedeniyle lamda katalaz testi *mümkünse* biyogüvenlik kabiniinde yapılmalıdır.

**Güvenlik uyarısı!** %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cilt için ileri derecede tahriş edicidir! Eğer temas olursa, maruz kalan bölge **su ile değil** %70'lik alkol ile yıkanmalıdır (1).

### 1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) testten önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşına olmalı, ve; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

### 1.3. Örnek, Reaktif, Donanım

#### İnceleme örneği

- Bakteri izolatı – plak besiyerinde tek düşmüş koloni  
ÖNEMLİ: Eritrositler katalaz içerir. Hatalı pozitif sonuçları önlemek için kanlı agarda üreyen bir koloniyi alırken besiyerine edilmemelidir. Koloni kolay alınamıyorsa test çikolata agarda üreyen kolonilerle tekrarlanır.

#### Reaktif

- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, %3-6'luk – piyasadan temin edilir veya laboratuvarında %30'luk yoğun çözeltilisinden 1/10 sulandırılarak hazırlanır.  
NOT: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kararsız bir maddedir; çabuk yıkılabilir. Bu nedenle ışığa maruz bırakılmamalı; kahverengi şişede buzdolabında saklanmalıdır. Test güvenliği açısından da kontrol suşları ile günlük test edilmelidir.

#### Diğer materyal

- Test tüpleri, plastik veya cam, kapaklı, temiz
- Lamlar, temizlenmiş
- Öze, halka ya da iğne tipi, tek kullanımlık veya platin
- Damlalık veya Pastör pipeti, tek kullanımlık

### 1.4. Kalite kontrol organizmaları

- Pozitif kontrol: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- Negatif kontrol: *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

## 2 Testin uygulanması

### 2.1. Tüp tekniği

- Bir test tüpüne 2 damla (~0.1 ml) %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonu koyulur.
- Bir öze ile plak besiyerindeki test edilecek kolonilerden biri alınır. Tüpün iç duvarında solüsyonun üzerindeki bir yere koloni sürülür.
- Tüpün kapağı kapatılır ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonu koloninin üzerine gelecek şekilde tüp eğilir. Hava kabarcığı gelişip gelişmediği gözlemlenir.



## 2.2. Lam tekniği

- Test edilecek koloni lam üzerine aktarılır.
- Koloni üzerine bir damla %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damlatılır.
- Hava kabarcığı gelişip gelişmediği gözlemlenir.

## 3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması

- **Pozitif sonuç** – Hava kabarcıkları oluşması "pozitif" olarak yorumlanır.
- **Negatif sonuç** – Hava kabarcıklarının oluşmaması veya 20 saniyeden sonra oluşması halinde sonuç "negatif" olarak yorumlanır.

## 4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Platin hariç, bazı metal özelerin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile reaksiyona girebileceği ve yanlış pozitif sonuç alınmasına neden olabilecekleri hatırlanmalıdır (1).
- Eritrositler de katalaz enzimine sahiptirler. Örnek alınırken kanlı agar ile temas edilirse yanlış pozitif sonuca neden olabilir.
- Mueller-Hinton agar katalaz testi için kullanılmamalıdır (3).
- Enzim canlı organizmada bulunduğu için katalaz testinin taze kültürden (18-24 saatlik) yapılması önerilir. Yanlış negatiflik olasılığı nedeniyle eski kültürler kullanılmamalıdır.
- Koloniye reaktif ekleme sırası tersine çevrilmemelidir. Yalancı negatif sonuca neden olabilir (1).

## Kaynaklar

- 
- 1 York MK, Traylor MM, Hardy J, Henry M. Biochemical Tests for the Identification of Aerobic Bacteria. Catalase Test. *In: Garcia LS (ed. in chief). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 3rd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2010, p. 3.17.11.*
  - 2 Tille PM, ed. Overview of bacterial identification methods and strategies *in Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 13th ed., 2014, p. 193-231*
  - 3 MacFaddin JF, ed. *Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3rd ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. 2000, p. 363-7.*



T.C. Sağlık Bakanlığı

# ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

## **KIA / TSI**

Kligler's Iron Agar ve Triple Sugar Iron Agar Testleri

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Test Prosedürleri
Standart No	B-TP-11
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

## İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	3
GENEL BİLGİ .....	3
TEKNİK BİLGİLER .....	4
1 Test için asgari laboratuvar koşulları .....	4
2 Testin uygulanması .....	6
3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması .....	6
4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	7
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	8
KAYNAKLAR.....	8

## Kapsam ve Amaç

KIA ve TSI başta *Enterobacteriaceae* olmak üzere gram negatif bakterilerin ilk tanımlama basamağında bazı temel biyokimyasal özelliklerinin gözlemlendiği besiyerleridir. Bu UMS'de KIA/TSI testlerinin dayandığı prensipler, kullanımları ve doğru yorumlanmaları için bir rehber sunulması hedeflenmiştir.

## Kısaltmalar ve Tanımlar

<b>H<sub>2</sub>S</b>	Hidrojen sülfür
<b>KIA</b>	Kligler Iron Agar
<b>Oksidatif ve fermentatif metabolizma</b>	Bakteriler karbonhidratları aerob (oksidatif) ve anaerob (fermentatif) yollardan biri veya her ikisi ile yıkma yeteneklerine göre ayrılabilirler. Fermentasyon, oksijenden ziyade bir organik maddenin son hidrojen alıcısı olarak işlev gördüğü metabolik bir süreçtir. Agar bazlı tüp besiyerlerinde oksidatif reaksiyon üst kısımda izlenebilirken, dipte de fermentasyon reaksiyonunun gözlenmesi mümkün olur (1).
<b>TSI</b>	Triple Sugar Iron (agar)

## Genel Bilgi

KIA ve TSI gram negatif bakterilerin ilk tanımlanmasında kullanılan besiyerleridir. Bu besiyerlerinde bakteriler şekerleri kullanma özelliklerinin yanı sıra, gaz ve H<sub>2</sub>S oluşturma yetenekleri temelinde de ayırt edilirler (2).

TSI besiyerinin formülü büyük ölçüde KIA ile ortak özelliklere sahiptir. KIA besiyerinde bir kısım glikoz (%0.1) ve 10 kısım laktoz (%1.0) bulunur. TSI ise bu şekerlere ilave olarak 10 kısım da (%1.0) sukroz içeren üç şekerli bir besiyeridir. Bunların dışında her iki besiyeri kazein ve et peptonların yanı sıra, H<sub>2</sub>S üretimini görünür kılan ferrik ve ferröz iyonlar ile sodyum tiyosülfat ve pH indikatörü olarak fenol kırmızısı içerirler. Bakterinin H<sub>2</sub>S üretimi besiyerinin siyah bir renk alması ile kendini gösterir (2,3).

Bu besiyerleri, biyokimyasal reaksiyonları açığa çıkarabilmek amacıyla tüpte, yatık kısım (~3 cm) ve dip kısmı (~3 cm) olacak şekilde- hazırlanma aşamasında agara özel bir eğim verilerek elde edilirler. İnokülasyon, test edilecek organizmanın saf kültüründen bir iğne öze ile yatık kısma yayma, dip kısma batırma kültürü şeklinde yapılır. Uygun bir inkübasyon süresinin sonunda inoküle edilmiş tüp incelenir.

Laktoz negatif (laktozu fermente edemeyen) bakteriler, üremeye başladıklarında, glikozdan asit üretimine bağlı olarak besiyerinde sarı renk oluştururlar. Glikoz ortamda az miktarda bulunduğundan hızla tükenir. Dolayısı ile besiyerinin yatık kısmında oksidatif metabolizma devreye girer ve peptonların aerobik yoldan yıkımı ile meydana gelen ürünler pH'ı alkali yapar; yatık kısmın rengi kırmızıya döner. Dip kısımda oksijen olmadığından oksidatif metabolizma kullanılamaz ve dip asit reaksiyonda sarı kalır.

Sonuç olarak; KIA ya da TSI tüpünde yatık kısımda alkali (K) ve dip kısımda asit (A) reaksiyon (K/A; kırmızı yatık / sarı dip) ile karakterli organizma bir "laktoz negatif bakteri" olarak ayırt edilir.

Laktoz pozitif (laktozu fermente eden; ve/veya -TSI söz konusu ise- sukrozu fermente eden) bakteriler -ortamda glikoz tükendikten sonra da kullanabilecekleri şekerler bulunduğundan- besiyerinin yatık ve dip kısımlarında büyük miktarda asit üretmeye devam ederler; böylece tüpün her iki kısmında da reaksiyon asit kalır (A/A; sarı yatık / sarı dip). Eğer besiyerinde hiç renk değişimi gözlenmiyorsa, bu, bakterinin glikozu da diğer şekerleri de fermente etme yeteneğine sahip olmadığını gösterir (K/K; kırmızı yatık / kırmızı dip).

Şeker fermentasyonu sonucu gaz üretimi dip kısımda kimi zaman besiyerini yırtmış hava kabarcıkları halinde gözlenir. Bakterinin sodyum tiyosülfat ile etkileşimi sonucu ise H<sub>2</sub>S üretilir. H<sub>2</sub>S oluşumu, ferrik iyonların indirgenmesine bağlı olarak besiyerinde siyah çökelti meydana gelmesi ile ayırt edilir.

Bu besiyerleri yaygın bir şekilde enterik patojenlerin tanımlanmasında kullanılsa da diğer bazı bakterilerin bazı biyokimyasal özelliklerinin gözlenmesi (ör., *Erysipelothrix* ve *Campylobacter*'de H<sub>2</sub>S üretiminin gösterilmesi; oksidasyon-fermentasyon besiyerinde üreyemeyen narin bakterilerin glikozu fermente etme yeteneğinin saptanması vb.) için de yararlıdır (2).

## Teknik Bilgiler

### 1 Test için asgari laboratuvar koşulları

#### 1.1. Laboratuvar güvenliği

Bu UMS'de bahsi geçen organizmalar ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart önlemler uygulanmalı, önlemler risk değerlendirmesi ile de desteklenmelidir. Aerosol oluşturması muhtemel tüm laboratuvar çalışmaları bir biyolojik güvenlik kabininde gerçekleştirilmelidir (ayrıca bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

#### 1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) testten önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşina olmalı, ve; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

#### 1.3. Örnek, Besiyeri, Reaktif ve Donanım

##### Test mikroorganizmaları

- Enterik patojen bakterilerin tanımlanması amacıyla – Gram negatif bakteri izolatının taze kültürü,
- Glikozu fermente edip etmediğinin gösterilmesi amaçlanan gram negatif çomaklar - güç üreyenler dahil,

- H<sub>2</sub>S üretiminin gösterilmesi için - *Campylobacter*,
- Laktobasilleri *Erysipelothrix*'ten ayırt etmek ve H<sub>2</sub>S üretiminin gösterilmesi için - katalaz negatif, gram pozitif çomaklar,
- *Acinetobacter* spp'yi tanımlamak için - oksidaz pozitif, katalaz negatif, hareketsiz, MacConkey agarda üremiş gram negatif kokobasiller.

### Besiyeri

- Laboratuvar KIA veya TSI'den hangisini tercih edeceğine karar vermelidir.
- KIA veya TSI tüpte *yarı-yatık* agar - piyasadan temin edilebilir veya toz besiyerinden laboratuvarında hazırlanır. Hazırlamak için;
  - (a) Besiyeri tozu uygun miktarda tartılıp, sulandırılır, ısıtılarak eritilir; pH'si kontrol edilmeli, gerekiyorsa pH 7.3-7.4'e ayarlanmalıdır.
  - (b) Erimiş besiyeri 16×125mm **burgu kapaklı** tüplere 5-7 mL alikotlar halinde dağıtılır; 121°C'de 15 dk otoklavlanır ve oda ısısında *yarı-yatık* pozisyonda (yatık kısım ~3 cm, dip kısım ~3 cm) dondurulur. Raf ömrü 3 aydır; tüpler etiketlenir ve buzdolabında saklanır.

ÖNEMLİ: (i) Laboratuvar güvenliği kuralları gereği pamuk tıkaçlı tüp kullanılmaz! Burgu kapaklı tüpler kullanılmalıdır. (ii) *Campylobacter* spp test edilmesinde en iyi sonuç için KIA/TSI taze olmalı, en fazla bir hafta içinde kullanılmalıdır.

### Diğer gereç, donanım

- Öze, iğne uçlu, tek kullanımlık veya nikrom
- İnkübatör, 35-37°C
- Kurşun asetat kağıdı (H<sub>2</sub>S üretimini saptamak için, opsiyonel)

## 1.4. Kalite kontrol

- Her besiyeri lotuna kullanıma sokulmadan önce kalite kontrol uygulanmalıdır. Lotlar arasında haftada bir; laboratuvar testi daha uzun aralıklarla yapıyorsa her testte kalite kontrol yapılır.
- Saklamaya kaldırmadan önce besiyerleri incelenmeli; hava kabarcıklı, yarık, vb. olan ve yeterince derin dip kısmı olmayan tüpler atılmalıdır. Yatık ve dik kısımların aşağı yukarı eşit uzunlukta olması gerekir.
- Her kullanım öncesi tüpler kontaminasyon, donma, kuruma, renk değişimi vb. yönünden incelenmeli; sorunlu tüpler atılmalıdır.
- Kalite kontrol organizmaları – aşağıdaki tabloda verilmektedir.

Organizma / ATCC no	TSI	KIA	H <sub>2</sub> S
<i>Escherichia coli</i> / 25922	A/A, gaz	A/A, gaz	-
<i>Salmonella enterica</i> ser Typhimurium / 14028	K/A, gaz±	K/A, gaz±	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> / 27853	K/K, gaz yok	K/K, gaz yok	-
<i>Campylobacter hyointestinalis</i> / 35217(opsiyonel)	K/K, gaz yok	K/K, gaz yok	+

## 2 Testin uygulanması

- KIA/TSI tüpü oda sıcaklığına getirilir.
- Steril bir iğne öze ile teste alınacak koloninin merkezine dokunulur.
- Öze, tüpün tabanına 3-5 mm kalana dek KIA/TSI agarın dip kısmına batırılır. Ardından öze geri çekilir ve yatık kısım yüzeyine zikzak çizerek ekim yapılır.
- Tüpün kapağı hava geçişine izin verecek şekilde gevşek kapatılır. Sıkılmaz!

NOT: Güç üreyen organizmalar için *alternatif olarak*, şerit şeklindeki kurşun asetat kağıt tüpün ağız kısmına yerleştirilir. Tüp kapağı, kağıt şeridi burada asılı pozisyonda tutacak şekilde, fazla sıkmadan kapatılır.

- Tüpler aerobik ortamda, 35-37°C'de 18-24 saat inkübe edilir.
- Süre sonunda tüpün yatık ve dip kısımlarındaki reaksiyonlar (renk değişikliği, gaz ve H<sub>2</sub>S oluşumu yönünden) incelenir.

ÖNEMLİ: Şeker fermentasyonlarının yorumu 18-24 saatte yapılmalıdır! Eğer okunmaları gecikecekse tüpler buzdolabına kaldırılmalıdır. İnkübasyonun uzatılması sadece H<sub>2</sub>S üretiminin beklenmesi amacıyla yapılabilir. *Campylobacter*'lerde bu süre 3 güne kadar uzayabilir.

## 3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması

### 3.1. KIA/TSI tüpünde olası reaksiyonlar

- Asit (A) reaksiyon – sarı
- Alkali (K) reaksiyon – kırmızı
- H<sub>2</sub>S üretimi – besiyerinde siyah renk değişimi; yatık ve dip kısım arasında halka şeklinde olabilir, sadece dip kısımda olabilir veya bütün besiyerini kaplamış olabilir. H<sub>2</sub>S üretimi düşük düzeyde olduğunda agarda siyahlaşma gözlenmezken, *kullanılmışsa* kurşun asetat kağıt siyahlaşır.
- Gaz üretimi – hava kabarcıkları, agarda yarılma veya besiyerinin yukarı itilmesi şeklinde gözlenebilir.

### 3.2. Reaksiyonların yorumu ve raporlanması

- A/A: glikoz ve laktoz (ve/veya TSI için sukroz) fermente edilmiş
- K/A: sadece glikoz fermente edilmiş (laktoz negatif bakteri)
- K/K: hiçbir şeker fermente edilmemiş (nonfermentatif).

### 3.3. Sonuçların raporlanması

KIA/TSI testi ile elde edilen sonuçlar ön tanımlama niteliğindedir, kesin tanımlama için ilave testlerle desteklenmeleri gerekir.

Aşağıda sıralanan hususlar dikkate alınmalıdır:

- *Enterobacteriaceae* üyeleri ve diğer enterik patojenlerin (*Salmonella* spp, *Shigella* spp, *E. coli*, *Yersinia* spp, *Vibrio* spp, *Aeromonas* spp...) tanımlanmasında KIA/TSI testleri **mutlaka** diğer tanımlama testleri ile tamamlanmalıdır.

NOT: Bu belgenin sonunda listelenen "İlgili UMS belgeleri"ne bakınız!

- Eğer bir *Campylobacter* sp şüpheli organizma H<sub>2</sub>S pozitif ise ön rapor "olası *Campylobacter hyointestinalis*" şeklinde verilir ve diğer testler ile teyit edildikten sonra kesin rapor gönderilir (2).
- Eğer bir katalaz negatif, gram pozitif çomak bakteri vankomisine dirençli ve H<sub>2</sub>S pozitif ise "olası *Erysipelothrix rhusiopathiae*" şeklinde rapor edilir (2).

## 4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Yatık kısımda asit oluşumu yanlış okunup raporlanabileceğinden test 18 saatten önce değerlendirilmemelidir.
- Aşırı H<sub>2</sub>S üretimi glikoz reaksiyonunu maskeleyebilir. Eğer bu durum gözlenirse glikoz fermentasyonu vardır ve öyle kaydedilmelidir. Gaz üretimi de kontrol edilmelidir.
- KIA kullanıldığında laktoz negatif ancak sukroz pozitif olan bakteriler (ör., *Providencia* sp) tanımlanamaz. Bu durum özellikle dışkı kültürlerinin incelenmesi sırasında önem kazanır; laktoz ve sukroz negatif olan fekal patojenlerle (*Salmonella* sp, *Shigella* sp), laktoz negatif, sukroz pozitif bakterilerin aynı KIA reaksiyonunu vereceği akılda tutulmalıdır. Karışma olasılığı TSI kullanımı ile bertaraf edilebilir. Ancak her durumda yanlış yorumlardan kaçınmak için KIA/TSI testi sonuçları sonraki biyokimyasal testler ile doğrulanmalıdır.
- TSI kullanıldığında ise, laktoz negatif olan fakat sukrozu fermente edebilen *Yersinia enterocolitica* ve *Edwardsiella tarda* A/A reaksiyonu vereceğinden değerlendirme esnasında "enterik patojen değil" denerek, atlanabilirler (4). TSI kullanan laboratuvarların da bu olasılığı akılda tutmaları gerekir. Bu durum KIA kullanımı ile bertaraf edilebilir.
- Gaz üretimi TSI'de daha iyi değerlendirilir. Ancak TSI'de H<sub>2</sub>S üretimi, özellikle sukroz pozitif bakterilerde -enzim mekanizması etkilendiğinden dolayı- baskılanabilir. Sülfid-indol-motilite (SIM) agar H<sub>2</sub>S üretiminin saptanmasında KIA veya TSI'den daha duyarlıdır.



## İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesinde (KIA / TSI ) geçen bazı hususlar için daha ayrıntılı veya ilave bilgi için aşağıda listelenen UMS belgelerine başvurunuz:

- UMS, B-TP-04 Hareket testi
- UMS, B-TP-06 IMVIC testleri (sitrat utilizasyonu için)
- UMS, B-TP-13 Lizin-Ornitin-Arjinin dihidrolaz/dekarboksilaz testleri
- UMS, B-TP-15 Nitrat redüksiyonu
- UMS, B-TP-16 Oksidaz testi
- UMS, B-TP-17 ONPG testi
- UMS, B-TP-22 Üreaz testi

## Kaynaklar

- 1 York MK, Traylor MM, Hardy J, Henry M. Biochemical Tests for the Identification of Aerobic Bacteria. Carbohydrate Utilization Tests. *In: Garcia LS (editor in chief). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 3.17.9.1 - 3.17.9.6*
- 2 York MK, Traylor MM, Hardy J, Henry M. Biochemical Tests for the Identification of Aerobic Bacteria. Kligler's Iron Agar Test and Triple Sugar Iron Agar Test. *In: Garcia LS (ed in chief). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 3.17.25.1 - 3.17.25.3*
- 3 Shigei J. Test methods used in the identification of commonly isolated aerobic gram-negative bacteria: Kligler Iron Agar Test and Triple Sugar Iron Agar Test. *In: Isenberg HD (ed in chief). Clinical Microbiology Procedures Handbook. ASM Press, Washington D.C. 1992, p. 1.19.46 and 1.19.55*
- 4 MacFaddin JF. *Biochemical tests for the identification of medical bacteria. 3rd ed., The Lippincott, Williams & Wilkins Co., Philadelphia, PA. 2000, p. 239-253.*



T.C. Sağlık Bakanlığı

# ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

## Koagülaz Testi

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Test Prosedürleri
Standart No	B-TP-12
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

## İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	3
GENEL BİLGİ .....	3
TEKNİK BİLGİLER .....	3
1 Test için asgari laboratuvar koşulları .....	3
2 Testin uygulanması .....	5
3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması .....	6
4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	6
KAYNAKLAR.....	8

## Kapsam ve Amaç

Stafilokok türlerinin en patojeni olan *Staphylococcus aureus* diğerlerinden koagülaz üretimi ile ayrılır. Bu UMS'de koagülaz testinin dayandığı prensipler ile kullanım ve yorumlanmasına dair bir rehber sunulması hedeflenmiştir

## Kısaltmalar ve Tanımlar

**EDTA** etilen diamin tetra-asetik asit

**PYR** L-pirolidonil- $\beta$ -naftilamid

## Genel Bilgi

Koagülaz, fibrinojeni fibrin oluşturmak üzere aktive ederek pıhtı gelişimine neden olan termostabil trombin-benzeri bir maddedir ve üretimi bir test tüpünde stafilokok inoküle edilmiş plazmanın pıhtılaşması ile gösterilebilir. Bu madde hücre tarafından ortama salındığı için "serbest koagülaz" olarak da bilinmektedir (1,2). *S. aureus*'un hücre duvarında ayrıca "bağlı koagülaz" veya "kümelenme (clumping) faktörü" olarak adlandırılan bir fibrinojen bağlayıcı yüzey reseptörü de bulunur. Bu faktörü taşıyan organizmalar doğrudan plazmanın fibrinojeni ile etkileşerek küme oluşturabildiğinden, lam testi ile gözlenebilir (1). Özetle; bağlı koagülaz **lam testinde** bakterinin aglütinasyonu şeklinde, serbest koagülaz ise **tüp testinde** pıhtı oluşumu şeklinde tespit edilebilir.

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında en yaygın tercih edilen koagülaz testi lam testidir. Uygulanması kolay olmakla birlikte, bu faktör *S. aureus*'un bazı kökenlerinde olmayabileceğinden lam testi ile negatif sonuç elde edilebilir. Bazen de kümelenme faktörü kapsül polisakaritleri tarafından maskelenebilmektedir. Bu nedenlerle lam testinin negatif sonuç vermesi halinde doğrulama için tüp testine başvurulması gerekir. Yine de, laboratuvarlar için algoritması oldukça basit olduğundan, *S. aureus* tanısında koagülaz testleri hızlı bir şekilde ve yüksek bir doğruluk derecesi ile kullanılmaktadır (1).

## Teknik Bilgiler

### 1 Test için asgari laboratuvar koşulları

#### 1.1. Laboratuvar güvenliği

Bu UMS'de bahsi geçen organizmalar ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart önlemler uygulanmalı, önlemler risk değerlendirmesi ile de desteklenmelidir. Aerosol oluşturması muhtemel tüm laboratuvar çalışmaları bir biyolojik güvenlik kabininde gerçekleştirilmelidir (ayrıca bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

### 1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) testten önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşına olmalı, ve; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

### 1.3. Örnek, Reaktif, Donanım

#### Test mikroorganizmaları

- *S. aureus* olabileceği düşünülen bakteri izolatu - plak besiyerinde tek düşmüş koloni halinde

ÖNEMLİ: Yanlış tanımlamayı önlemek için, koagülaz testi sadece katalaz pozitif, gram pozitif kok kümeleri şeklinde ön tanımlaması yapılmış olan klasik görünümlü beyaz-sarı, opak, hemolitik kolonilere uygulanmalıdır. Hemolizin taze (~18 saatlik) kültürlerde gözlenebileceği hatırlanmalıdır (1).

#### Reaktif

- Tavşan plazması, EDTA'lı – ticari olarak temin edilir. Liyofilize veya donmuş preparat şeklinde olabilir; üretici firmanın önerisi doğrultusunda sulandırılmalı ve saklanmalıdır.

NOT: Tüp testi için, vida kapaklı küçük tüplere plazmanın 0.5 mL alikotlar halinde ayrılması ve saklanması önerilir.

ÖNEMLİ: Koagülaz testi için insan plazması **kullanılmaz!** Duyarlılığı düşüktür. Ayrıca HIV ve diğer patojen virüslerin bulaşması potansiyeli taşır.

- %5'lik kalsiyum klorür ( $\text{CaCl}_2$ ) çözeltisi – isteğe bağlı

#### Diğer gereç, donanım

- Lam veya siyah aglütinasyon kartı (serolojik testler için olan tipte)
- Test tüpleri – vida kapaklı, steril, küçük (ör., 12x75mm)
- Öze – halka ya da iğne tipi; tek kullanımlık veya nikrom
- Damlalık veya tek kullanımlık Pastör pipeti
- Kesici delici atık kabı, enfeksiyöz atık kabı, eldiven

### 1.4. Kalite kontrol

- Her yeni açılan plazma lotu mutlaka kalite kontrol suşları ile test edilmelidir!
- Derin dondurucu ya da buzdolabında saklanmamış veya bulanık görünümlü plazma kesinlikle testte kullanılmaz!
- Kalite kontrol organizmaları (1):

*S. aureus* ATCC 25923 – koagülaz pozitif (pozitif kontrol)

*S. epidermidis* ATCC 12228 veya 14990 – koagülaz negatif (negatif kontrol)

## 2 Testin uygulanması

### 2.1. Lam koagülaz testi

- Bir lam üzerine küçük bir damla (10-15 µL) distile su konur.
- Bir öze ile test edilecek koloniden alınır; lamın üzerindeki su ile homojen, koyu, süt-benzeri bir süspansiyon elde edecek şekilde karıştırılır.

NOT: Yeterince koyu bir süspansiyon elde edilemez ise yanlış-negatif sonuç alma olasılığı vardır.

- Süspansiyon 'otoaglutinasyon' olup olmadığı bakımından incelenir.

NOT: Eğer suda süspansiyon oluşturulamıyor, kümelenmeler meydana geliyor ise, lam testi gerçekleştirilemez. Organizmanın kendiliğinden kümelenme (otoaglutinasyon) eğiliminde olduğundan bahsedilir. Bu durumda serbest koagülazı göstermek amacıyla tüp testi yapılmalıdır!

- 10-15 µL plazma eklenir, nazikçe karıştırılır.
- Hemen 10 saniye içinde gözle görülür bir kümelenme olup olmadığı incelenir.
- Test sonrası lam bir *kesici-delici atık* kabına, kart kullanıldıysa *enfeksiyöz-atık* kabına atılır.

### 2.2. Tüp koagülaz testi

- 0.5 mL plazma içeren tüp oda ısısına getirilir.
- İncelenecek stafilokok kolonisi öze ile alınır; plazma içinde homojenize edilir.

NOT: Kan kültüründe üreme bulgusu ve mikroskopide gram pozitif küme yapmış kokların görülmesi halinde *S.aureus*'un hızlı tanısı için plazma içeren tüpe 2 damla kan kültürü de inoküle edilebilir (1).

- Tüp 35-37°C'de saat başı incelenerek 4 saate kadar inkübe edilir. Tüp içinde gevşek bir fibrin ağı oluşumu ya da tam bir pıhtılaşma olup olmadığı gözlenir. İnceleme yaparken tüp **çalkalanmamalıdır!** Pıhtı oluşumunu anlamak için tüp hafifçe eğilip sallanabilir.
- Eğer plazmada bir değişiklik yoksa gecikmiş koagülaz aktivitesi olasılığı için 22-25°C'de 24 saat inkübasyonun ardından tekrar değerlendirme yapılır (3).

ÖNEMLİ: *S.aureus*'un fibrinolizinleri oluşan pıhtıyı eritebileceğinden dolayı, test tüpü 35°C'de 4 saatten daha uzun tutulmamalıdır. Eğer mesai sonu vb. nedenlerle 4 saat uygun değilse, 22-25°C'de 24 saat inkübasyon önerilir ki bu aynı zamanda sonuç almak bakımından daha duyarlı bir yöntem olarak kabul edilmektedir (4).

Alternatif olarak; tüp 35°C'de 24 saat inkübe edilir ve 1-2 damla %5 CaCl<sub>2</sub> ilave edilir. Eğer pıhtı oluşursa izolat "koagülaz negatif"tir; eğer pıhtı gözlenmez ise fibrinolizinin oluşmuş pıhtıyı erittiği kabul edilir ki bu sonuç izolatin "koagülaz pozitif" olduğunu doğrular (1).

## 3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması

### 3.1. Lam koagülaz testi

- **Pozitif test** – Plazma ilavesi ile 10 sn içinde aglütinasyon gözlenmesi
- **Negatif test** – 10 sn.de gözle görülür bir aglütinasyon **olmaması**

### 3.2. Tüp koagülaz testi

- **Pozitif test** – Aşağıdakilerden biri ile uyumlu sonuç:
  - (a) Tüp içinde 24 saatten önce tam veya kısmi pıhtı oluşumu
  - (b) 35°C'de 24 saat inkübasyon sonunda tüpe 1-2 damla %5 CaCl<sub>2</sub> ilave edildiğinde pıhtı **oluşmaması**
- **Negatif test** – Aşağıdakilerden biri ile uyumlu sonuç:
  - (a) Tüp içinde 24 saatte 22-25°C'de pıhtı **oluşmaması**
  - (b) 35°C'de 24 saat inkübasyon sonunda tüpe 1-2 damla %5 CaCl<sub>2</sub> ilave edildiğinde pıhtı oluşması

### 3.3. Sonuçların raporlanması

Koagülaz testi stafilokok tanımlamasında bazı durumlarda karar verdirici bir testtir. Buna göre elde edilen sonuçlar aşağıdaki şartlarda raporlanabilir:

- Katalaz pozitif, gram pozitif kok kümeleri izlenen organizma için eğer **tüp testi pozitif** ise izolat "*Staphylococcus aureus*" olarak rapor edilir.
- Mikroskopik olarak gram pozitif kok kümeleri izlenmiş kan kültüründen yapılan tüp koagülaz testi pozitif ise rapor -koloni elde edilip katalaz testi yapıncaya kadar geçici olarak- "olası *Staphylococcus aureus*; doğrulama için inceleme devam ediyor" şeklinde düzenlenir.
- Krem-beyaz tipik koloni görünümü ile birlikte katalaz pozitif, gram pozitif kok kümeleri izlenen organizma için eğer **tüp testi negatif** ise izolat "koagülaz negatif stafilokok" olarak rapor edilir.
- Pozitif lam testi *S. aureus* olarak rapor edilir. Bununla birlikte test sonucu, (*S.aureus*'u *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi*'den ayırt etmek gerektiğinden dolayı), kan gibi steril vücut bölgelerinden izole edilmiş hafif hemolitik veya hemolitik olmayan koloniler için tüp koagülaz testi ile de doğrulanmalıdır.
- Negatif lam testi kesin negatif sonuç rapor edilebilmesi için geçerli/yeterli değildir. Tüp testi ile doğrulanmalıdır!

## 4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Lam koagülaz testinde otoaglütinasyon olabilir.
- Aşırı karıştırma kümelenmenin çözülmesine neden olabilir.

- Koagülaz testleri 'mannitol salt agar'da üremiş kolonilerden yapılmamalıdır.
- Sitratlı plazma sitratı kullanan organizmalar tarafından pıhtılaştırılabilir (yanlış pozitiflik). Bu nedenle EDTA, okzalit veya heparin içeren plazma kullanılmalıdır.
- Tüp testinde 35°C'de inkübasyon süresinin uzamasının pıhtının çözülmesine neden olabileceği hatırlanmalıdır.
- Metisilin-rezistan *S.aureus* (MRSA) kökenlerinde bağlı koagülaz olmayabilir ve lam testi negatif çıkabilir (5). Bazı MRSA'lar da zayıf pozitif olabilir. Lateks kitleri aynı zamanda Protein A'yı da saptayabildiği için böyle suşların tanımlanmasında koagülaz testinden daha duyarlıdır.
- *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi* lam koagülaz pozitifdir (özellikle insan plazması ile). Bunlar *S. aureus*'tan güçlü PYR pozitifliği ve *S. intermedius*'dan tüp koagülaz testlerinin negatif olması ile ayırt edilirler (Tablo 1) (1).
- Tüp testinde *S. intermedius* ve *S. hyicus* pozitif olabilir. Bunlar (sırasıyla) köpek ve domuz izolatlarıdır ancak nadiren insanda enfeksiyona yol açtıklarında *S.aureus* kadar ciddi hastalığa neden olabilirler. Ayırıcı tanı için bkz Tablo 1 (1).

**Tablo 1.** Önemli ve/veya yaygın görülen, büyük beyaz-sarı koloniler oluşturabilen, katalaz pozitif, gram pozitif kokların temel biyokimyasal reaksiyonları\* (1 no.lu kaynaktan uyarlanmıştır)

Tür	Bazı tipik özellikler	Lam koag	Tüp koag	Basit (0.04U)	Poli B (300U)	PYR <sup>§</sup>
<i>S. aureus ssp aureus</i>	VP+	V	+	R	R	-
<i>S. intermedius</i> (köpek) <sup>#</sup>	VP-	V	+	R	S	+
<i>S. delphini</i> (yunus) <sup>#</sup>	VP-	-	+	R	NA	NA
<i>S. hyicus</i> (domuz) <sup>#</sup>	VP-	-	V	R	R	-
<i>S. lugdunensis</i>	Ornithin +	V	-	R	R	+
<i>S. schleiferi</i>	Ornithin -	+	- <sup>+</sup>	R	S	+
<i>S. saprophyticus</i>	İdrar; novo R; nonhemolitik	-	-	R	S	-
<i>S. epidermidis</i>	Nonhemolitik	-	-	R	R	-
<i>S. haemolyticus</i>	Üreaz -, VP+, DNase -	-	-	R	S	+
<i>S. caprae</i>	Üreaz +, DNase +,	-	-	R	S	+
Diğer koagülaz negatif stafilokoklar	Nonhemolitik veya gecikmiş hemoliz; novo V; üreaz V	-	-	R	S	V

\* +, izolatların %90'dan fazlası 48 saat içinde pozitif; -, izolatların %90'dan fazlası negatif; V, değişken (*variable*) ya da %10-90 arasında pozitif; -<sup>+</sup>, çoğu negatif ama nadiren pozitif izolatlar olabilir; koag, koagülaz; Basit, basitrasin; Poli, polimiksin B; PYR, L-pirolidonil-β-naftilamid; VP, Voges-Proskauer; Novo, novobiyosin; NA, uygulanamaz ya da mevcut değil; R, rezistan; S, sensitif (duyarlı).

<sup>§</sup> PYR verisi sıvı test içindir (disk test ile *S. aureus* standart suşlarının zayıf reaksiyon verdiği gözlemlendiği ve *S. intermedius*'dan ayırımının mümkün olamayabileceği nedeniyle)

<sup>#</sup> klinik örneklerden nadiren izole edilebilirler.



## Kaynaklar

---

- 1 York MK, Traylor MM, Hardy J, Henry M. Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. Coagulase test - rabbit plasma method. *In: Garcia LS (ed in chief). Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 3.17.14.1 - 3.17.14.3
- 2 MacFaddin JF, ed. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 3rd ed., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 2000, p. 105-119.
- 3 Cowan ST. The classification of staphylococci by precipitation and biological reactions. *J Pathol Bacteriol*1938;46:31-45.
- 4 Baker JS, Bormann MA, Boudreau DH. Evaluation of various rapid agglutination methods for the identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1985;21:726-729
- 5 Lally R, Woolfrey B. Clumping factor defective MRSA. *Eur J Clin Microbiol* 1984;3:151-152



T.C. Sağlık Bakanlığı

# ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

## Lizin-Ornitin-Arjinin Aminoasit Dekarboksilaz-Dihidrolaz Testleri

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Test Prosedürleri
Standart No	B-TP-13
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

## İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	3
GENEL BİLGİ .....	3
TEKNİK BİLGİLER .....	4
1 Test için asgari laboratuvar koşulları .....	4
2 Testin uygulanması .....	5
3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması .....	6
4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	6
EKLER.....	7
Ek-1 Aminoasit besiyerinin hazırlanması <sup>3,5</sup> .....	7
Ek-2 Steril mineral yağ hazırlanması .....	9
KAYNAKLAR.....	10

## Kapsam ve Amaç

Bu UMS'nin amacı bakteri tanımlamasında rutin test edilen aminoasitler olan lizin, ornitin ve arjinin için dekarboksilaz/dihidrolaz testlerinin doğru uygulanması ve yorumlanmasına yönelik bir rehber sunmaktır.

## Kısaltmalar ve Tanımlar

**LIA** Lysine iron agar

**MIO** Motility-indole-ornithine (Hareket-İndol-Ornitin) besiyeri

**NH<sub>2</sub>** Amino grubu. Aminoasitler karakteristik iki fonksiyonel grup içerirler; bu gruplardan biri amino (-NH<sub>2</sub>) grubudur, diğeri de karboksil (-COOH) grubudur.

## Genel Bilgi

Dekarboksilazlar, aminoasitlerin karboksil (COOH) kökünü ayırarak aminler (alkali son ürünler) meydana getiren bir grup enzimlerdir. Olay dekarboksilasyon olarak bilinir. Her dekarboksilaz bir aminoaside özgüdür.

Aminoasit dekarboksilasyon testleri yaygın olarak *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri ile *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Vibrio* spp ve nonfermentatif gram negatif bakterilerin tanımlanmasında tercih edilir. Özellikle enterik patojenlerin tanı algoritmasında IMViC test paketini tamamlayıcı işlev görürler (1,2).

Laboratuvarlarda rutin olarak test edilen amino asitler **lizin, ornitin ve arjinin** olup reaksiyon sonunda sırasıyla kadaverin, putressin ve sitrulin ortaya çıkar. Aslında sitruline yıkım arjininden bir NH<sub>2</sub> grubunun ayrılması ile gerçekleşir ki bu bir dihidrolaz aktivitesidir; sitrulin de bir sonraki adımda ornitine ve son olarak dekarboksilasyon ile putresine dönüşür (3).

Test için baz besiyeri 'Moeller dekarboksilaz' besiyeri olup temel bakteriyel üreme için pepton, maya-özütü, %0.05 glikoz, dekarboksilaz aktivitesini destekleyen pridoksal ve pH indikatörü (brom krezol moru ve krezol kırmızısı) içerir (4). Baz besiyerine -ayrı ayrı- lizin, ornitin ve arjinin eklenmesi ile aminoasitli Moeller tüpleri hazırlanır. Bir organizma test edilirken aminoasit içeren tüplerin yanına gerekirse baz besiyeri tüpü (kontrol) de konarak bir set oluşturulur.

Dekarboksilasyon anaerob şartlarda oluşan bir reaksiyondur; bu nedenle, bakteri ekimi yapıldıktan sonra, hava ile teması kesmek için besiyerinin üzeri mineral yağ ile kaplanır.

Fermentatif bakteriler inkübasyonun ilk evresinde, ortamdaki glikozu fermente ettiklerinden, renk sarıya döner. Üremenin ilerleyen evrelerinde eğer aminoasit dekarboksile edilirse alkali aminler açığa çıkacağından aminoasit içeren tüp(ler)de renk mora dönerken kontrol tüpü sarı kalır (3,5).

Nonfermentatif organizma söz konusu ise kontrol tüpünde üreme varlığına rağmen hiç renk değişikliği olmaz.

# Teknik Bilgiler

## 1 Test için asgari laboratuvar koşulları

### 1.1. Laboratuvar güvenliği

Bu UMS'de bahsi geçen organizmalar ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart önlemler uygulanmalı, önlemler risk değerlendirmesi ile de desteklenmelidir. Aerosol oluşturması muhtemel tüm laboratuvar çalışmaları bir biyolojik güvenlik kabininde gerçekleştirilmelidir (ayrıca bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

### 1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) testten önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşına olmalı, ve; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

### 1.3. Örnek, Besiyeri, Donanım

#### Test mikroorganizmaları

- Enterik gram negatif çomaklar ve *Vibrio*, *Plesiomonas* ve *Aeromonas* spp şüpheli izolatlar – tür düzeyinde tanımlama için
- Koagülaz negatif stafilkoklar (ornitin)
- Viridans grup streptokoklar (arjinin)
- Çeşitli nonfermentatif, gram negatif çomaklar (arjinin)
- *Stenotrophomonas* ve *Burkholderia* şüpheli izolatlar (lizin ve arjinin)

#### Besiyerleri

- Dekarboksilaz testleri için aşağıda listelenen Moeller besiyerleri (sıvı) kullanılır. Piyasadan hazır temin edilebileceği gibi laboratuvarda da hazırlanabilirler. Laboratuvarda hazırlamak için bkz. Ek-1.  
Moeller baz besiyeri (aminoasit içermeyen)  
Moeller arjinin dekarboksilaz (%1 arjinin)  
Moeller lizin dekarboksilaz (%1 lizin)  
Moeller ornitin dekarboksilaz (%1 ornitin)
- MIO besiyeri – ornitin dekarboksilaz test edilebilir; yarı-katı agardır.
- LIA – enterik patojenlerin özellikle *Salmonella*'ların (lizin-dekarboksilaz pozitif; dip kısım mor) tanımlanmasında kullanışlıdır.

#### Diğer gereç, donanım

- Öze, steril tek kullanımlık veya nikrom
- Mineral yağ veya vaspar (1 kısım mineral yağ + 2 kısım petrol jeli) veya sıvı parafin ya da 56°C'de eritilmiş petrol jeli, steril (bkz. Ek-2)

## 1.4. Kalite kontrol

- Her yeni besiyeri lotu kullanıma sokulmadan önce pozitif ve negatif kalite kontrol suşları ile test edilmelidir. Lotlar arasında haftada bir ya da, laboratuvar testi daha uzun aralıklarla yapıyorsa her testte, kalite kontrol uygulanmalıdır.
- Her kullanım öncesi Moeller besiyeri tüpleri incelenmeli; renk mor olmalı; bulanıklık gözlenmemelidir. Eğer bulanık ise veya mor değilse tüp atılmalıdır.
- Kalite kontrol organizmaları – aşağıdaki tabloda listelenmiştir.

Organizma / ATCC	Kontrol tüpü	Sonuç*		
		Lizin	Ornitin	Arjinin
<i>Klebsiella pneumoniae</i> / 13883	Sarı	+	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> /23355	Sarı	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> / 25923	Sarı	NA	-	NA
<i>Staphylococcus lugdunensis</i> / 700328	Sarı	NA	+	NA

\* +, mor; -, sarı; NA, uygulanmaz

## 2 Testin uygulanması

- Test edilmek istenen aminoasit tüpü/tüpleri ve kontrol tüpü olacak şekilde dekarboksilaz test seti hazırlanır.
- Her tüp organizmanın 18-24 saatlik saf kültüründen öze ile bir-iki koloni alınarak inoküle edilir.

**ÖNEMLİ:** Kontrol tüpü her sete konmayabilir. Ancak şüpheli test sonuçları elde edilmesi halinde sette kontrol tüpü bulunması değerlendirmeyi kolaylaştırıcı özelliktedir. Karar için yardımcı bir liste aşağıda verilmiştir; laboratuvarlara, -eğer tecrübe kazanma sürecinde iseler- her durumda kontrol tüpü kullanmaları tavsiye edilir.

- Enterobacteriaceae* için kontrol tüpü gerekli değildir (bütün türler glikozu fermente ettiklerinden dolayı).
  - Gram pozitif koklar için kontrol tüpü genellikle gerekli değildir.
  - Nonfermentatif gram negatif bakteriler için kontrol tüpü eklenir. Tüplere yoğun ekim (McFarland standardı  $\geq$  No.8) yapılmalıdır.
- İnoküle edilmiş tüplerde anaerob ortam sağlamak için besiyerlerinin üzeri ~0.5 mm kalınlıkta mineral yağ ile kaplanır. Kaplama dikkatli bir şekilde yapılmalı, besiyerinin hava ile teması tam olarak kesilmeli, kesinlikle hava kabarcığı oluşturulmamalıdır.

**ÖNEMLİ:** Besiyeri yüzeyinin mineral yağ veya benzeri madde ile kaplanması zorunludur. Eğer kaplanmadıysa sonuç değerlendirilemez! Kalın bir yağ tabakasına gerek yoktur. Besiyeri yüzeyinin hava ile teması kesecek ancak gaz çıkışına da izin verecek kalınlıkta kaplanması

gerekir; yağ ile kaplama oksijen girişine izin vermediğinden dolayı fermentasyonu teşvik eder, hem de besiyeri yüzeyinde kendiliğinden alkalileşmeyi önler.

- Kapaklar sıkıca kapatılır.
- Tüpler 35-37°C'de en az 18 saat, gerekiyorsa 4-7 güne kadar -her gün incelenerek- inkübe edilir.

NOT: MIO besiyeri kullanılıyorsa inokülasyon iğne öze ile batırma kültürü şeklinde yapılır. 18 saate kadarki inkübasyonlar için yağ kaplamak gerekli değildir. İnkübasyon şartları ve süresi sıvı besiyeri için önerildiği gibidir.

### 3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması

- **Pozitif test sonucu** – mor (alkali) renk değişimi;

NOT: Nonfermentatifler yeterli düzeyde aminler üretmişlerse, baz besiyeri ile kıyaslandığında daha koyu görünen bir mor renk meydana getirirler.

- **Negatif test sonucu** – kontrol tüpü ile aynı

(a) parlak temiz bir sarı renk (asit), veya  
(b) renk değişikliği olmaması (nonfermentatifler)

NOT: Kontrol tüpü sarıya dönmüş olmalıdır (fermentatiflerde) ya da **orijinal** renginde kalmış olmalıdır (nonfermentatiflerde). Bulanıklık mutlaka görülmelidir. Kontrol tüpünde alkali reaksiyon veya koyu mor renk oluşumu gözlenmesi halinde test geçersiz olur. Şüpheli sonuçlar kontrol tüpü ile karşılaştırılarak yorumlanmalıdır.

### 4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Testin değerlendirmesi 18-24 saatten önce yapılmamalıdır. Erken değerlendirmeler hatalı yorumlara neden olabilir. Glikoz fermentasyonu ilk 10-12 saatte olur ve ortaya çıkan asit ürünler sarı renk oluşumu ile sonuçlanır. Dekarboksilaz enzimleri asidik evre tamamlanıncaya kadar indüklenmeyecektir.
- Bazı nonfermentatifler zayıf dekarboksilaz aktivitesine sahip olabilirler ve dolayısı ile aminlerin yetersiz üretimi pH indikatör sistemini dönüştürmeye yeterli olmayabilir.
- Gri renk oluşumu alkali reaksiyondan ziyade indikatörün indirgenmesine işaret eder. İlave brom krezol moru konarak yeniden değerlendirilmelidir.
- Eğer iki farklı renk tabakası oluşmuş ise tüp nazikçe çalkalandıktan sonra değerlendirme yapılmalıdır (6).
- Nonfermentatif bakteriler, eğer arjinin pozitif iseler, lizin ve ornitin negatif olmalıdırlar (6).

## Ekler

### Ek-1 Aminoasit besiyerinin hazırlanması<sup>3,5</sup>

#### Moeller Baz Besiyeri karışımı (sıvı)

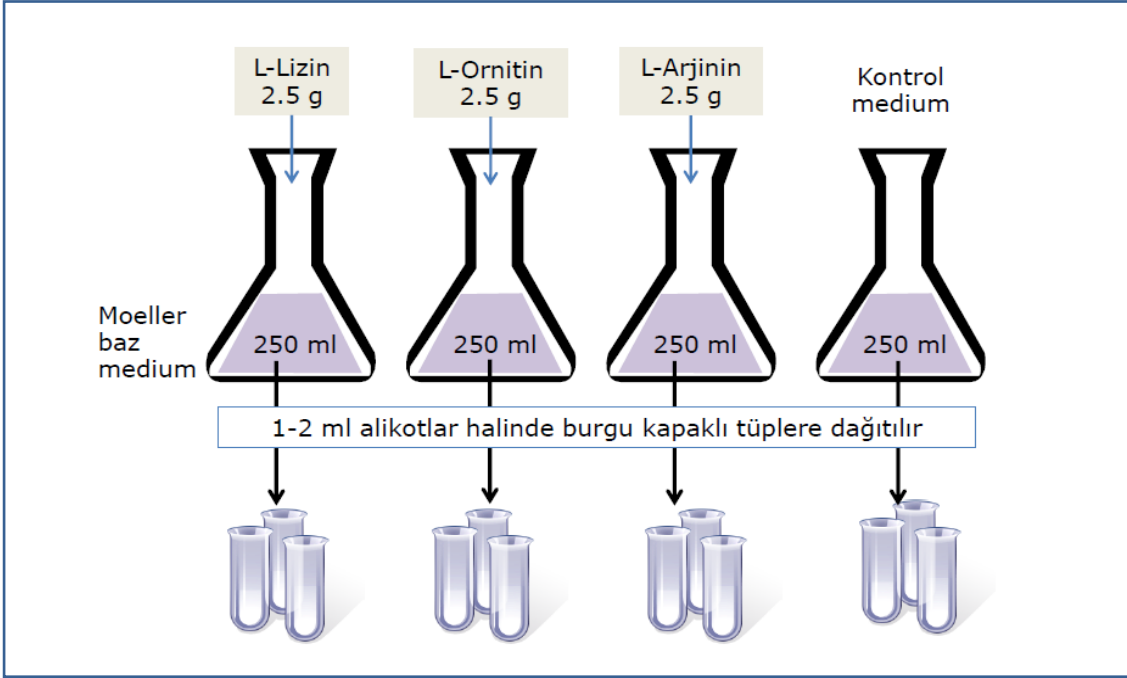
Pepton	5 g
Et özütü	5 g
Glikoz	0.5 g
Brom krezol moru	0.01 g
Krezol kırmızısı	0.005 g
Pridoksal	0.005 g
Distile/deiyonize su	1000 mL*

\* NOT: Laboratuvar kendi tüketim hızına göre hazırlayacağı besiyeri miktarına karar vermelidir. Burada formül 1000 mL'lik baz besiyeri için verilmiştir.

#### Moeller Aminoasit Besiyerlerinin hazırlanması

1. Yukarıda listelenen maddeler suda eritilir; 'baz besiyeri' karışımı elde edilir. Dört ayrı erlen alınır ve baz besiyeri bunların içine 250'şer ml. olacak şekilde bölünür (*bkz.* Şekil 1)
2. Aminoasitler tartılır. Tartım son konsantrasyonda %1 aminoasit olacak miktarda (250 mL besiyerine 2.5 g aminoasit olacak şekilde) yapılır.  
ÖNEMLİ: L- form aminoasitler (L-lizin, L-ornitin, L-arjinin) kullanılmalıdır. Eğer DL- aminoasitler kullanılacaksa son konsantrasyon %2 olacak şekilde tartım yapılır.
3. Her bir aminoasit bir erlene olmak üzere üç erlendeki baz besiyerlerine eklenir. Dördüncü erlen aminoasit içermeyen 'baz besiyeri kontrol' olarak bırakılır (*bkz.* Şekil 1).
4. Besiyerlerinin pH'ları ölçülür; 1N NaOH kullanılarak pH 6.0'ya ayarlanır.  
**Güvenlik uyarısı!** NaOH koroziv (tahriş edici) etkilidir! Deri ve mukozalara temasından kaçınılmalıdır.
5. 1-2 mL alikotlar halinde burgu kapaklı küçük tüplere (12x75mm) dağıtılırlar.  
ÖNEMLİ: (i) Hem laboratuvar güvenliği gerekleri hem de metot güvenliği nedeniyle kesinlikle pamuk tıkaçlı tüpler kullanılmaz! (ii) Tüpler aynı renkte olduklarından asla gözle ayırt edilemezler; **mutlaka** içlerindeki besiyerini niteleyecek şekilde (lizin tüpü, ornitin tüpü, arjinin tüpü veya baz Moeller tüpü şeklinde) **etiketlenmelidir**. Etiketli olmayan tüpler kullanılmaz!
6. Tüpler 121°C'de 15 dk otoklavlanır. Raf ömrü 3 aydır. Buzdolabında saklanır.





**Şekil 1.** Moeller baz besiyeri ve Moeller aminoasit dekarboksilaz besiyerlerinin hazırlanması için şematik diyagram (Kaynak: Akbas E. *Standard Operating Procedures (SOPs) for Laboratory Diagnosis of Communicable Diseases in the Azerbaijan Surveillance System*. Azerbaijan Ministry of Health. 2013)

## Ek-2 Steril mineral yağ hazırlanması

Laboratuvarda çeşitli nedenlerle anaerob ortam sağlamak istendiğinde besiyeri üzerinin yağ veya benzeri maddelerle kaplanması gerekir. Mineral yağ, vaspar, petrol jeli ya da sıvı parafin bu amaç için kullanılabilir. Ancak bu maddelerin sterilizasyonunu sağlamak güçtür. Belli başlı öneriler aşağıda verilmiştir:

### Otoklavda sterilizasyon

Mineral yağın 100 mL'sine 1 mL distile su ilave edilir.  
121°C'de en az **45 dakika** otoklavlanır (1).

### Pastör fırınında sterilizasyon

Bazı kaynaklar otoklavdan ziyade Pastör fırınında sterilizasyon önermektedir. Özellikle vaspar ve petrol jeli sterilizasyonu söz konusu ise, 180°C'de >2 saat tutulmalıdır (7,8).

### Filtrasyon ile sterilizasyon

Isı uygulamaları mineral yağın bulanıklaşmasına neden olabildiğinden ve bulanıklık bazı amaçlar için dezavantaj oluşturabildiğinden mineral yağın filtrasyon ile steril edilmesi önerilir. Filtrasyon için por çapı 0.4 µm olan polikarbonat filtre kullanılmalı ve işlem dikkatli bir şekilde yapılmalıdır (9,10).

Steril mineral yağ oda ısısında saklanır.

## Kaynaklar

- 1 Shigei J. Test methods used in the identification of commonly isolated aerobic gram-negative bacteria: Decarboxylase-Dihydrolase Tests. *In: Isenberg HD (editor in chief). Clinical Microbiology Procedures Handbook*. ASM Press, Washington D.C. 1992, p. 1.19.36
- 2 Bilgehan H. Arginine-lysine-ornithine dekarboksilaz besiyeri (Moeller). *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. 5. Baskı, Barış Yayınları, İzmir. 2009, p. 650
- 3 York MK, Traylor MM, Hardy J, Henry M. Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. Decarboxylase-Dihydrolase Tests. *In: Garcia LS (editor in chief). Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 3.17.15.1 - 3.17.15.4
- 4 Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, Jr. (Eds). Conventional and rapid microbiological methods for identification of bacteria and fungi: amino acid degradation. *In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 4th ed., J.B. Lippincott Company, Philadelphia. 1992, p. 117
- 5 Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, Jr. (Eds). The *Enterobacteriaceae*. Chart 3-9: Decarboxylases. *In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 4th ed., J.B. Lippincott Company, Philadelphia. 1992, p. 179.
- 6 MacFaddin JF. *Biochemical Tests for the Identification of Medical Bacteria*, 3rd ed. The Lippincott, Williams & Wilkins Co., Philadelphia, PA. 2000, p. 120-135.
- 7 Petti CA, Carroll KC. Procedures for the storage of microorganisms. *In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds). Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 124-131
- 8 Sulfite Agar. [http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco\\_BBL/297210.pdf](http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/297210.pdf) (son erişim: 29.12.2013)
- 9 Mineral oil. [http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/1/m8410pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/m8410pis.pdf) (son erişim: 29.12.2013)
- 10 BioSampler: How can you sterilize the mineral oil used in the BioSampler? <http://www.skinc.com/FAQ/skcfags.php?action=showEntry&data=345> (son erişim: 29.12.2013)



T.C. Sağlık Bakanlığı

# ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

## Metilen Mavis Boyama (Klinik Örneklerin Mikroskopik İncelemesi)

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Test Prosedürleri
Standart No	B-TP-14
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

## İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	3
GENEL BİLGİ .....	3
TEKNİK BİLGİLER .....	4
1 Test için asgari laboratuvar koşulları .....	4
2 Metilen mavisi boyama prosedürü .....	6
3 Preparatların değerlendirilmesi/yorumlanması .....	6
4 Sonuçların raporlanması .....	7
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	8
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	8
KAYNAKLAR.....	8

## Kapsam ve Amaç

Loeffler'in metilen mavisi boyama rutin klinik mikrobiyolojide pek çok amaç için kullanılabilen basit ancak tanıya çok yardımcı bir tekniktir. Bu UMS'nin amacı metilen mavisi boyamanın kullanım alanlarını özetlemek ve rutin uygulama için bir prosedür vermektir.

## Kısaltmalar ve Tanımlar

<b>Buffy-coat</b>	Santrifüj edilmiş antikoagülanlı kanın eritrosit tabakası ve plazması arasında kalan ve beyaz kan hücrelerini içeren (bulutsu) katmanı.
<b>Kanıt hücreleri</b>	Orijinal karşılığı 'clue cells' olup, bakteriyel vajinozda görülen ve tipik olarak üzerine yoğun bir şekilde bakterilerin yapıştığı düz epitel hücrelerini tanımlamak için kullanılan bir ifadedir. Sınırları belli olmayan granüler hücreler gibi görünürler.
<b>Kapsül şişme reaksiyonu</b>	Kapsüllü bir bakterinin süspansiyonuna anti-kapsül antikorlar eklendiğinde ve ardından mikroskopta incelendiğinde kapsülün daha belirgin, şişmiş gibi görünmesine neden olan reaksiyon (Quellung test). Bilhassa <i>Streptococcus pneumoniae</i> için uygulanan bir testtir.
<b>LMMB</b>	Loeffler'in metilen mavisi boyama
<b>Metakromatik granüller</b>	Bakteri hücrelerindeki bazı boyaların rengini değiştiren (ör., metilen mavisi ile -mavi değil- pembe boyanan) cisimciklerdir. <i>Corynebacterium</i> 'larda metakromatik granüller polifosfatlardan oluşmuştur ve enerji depoları gibi işlev görürler.

## Genel Bilgi

Loeffler'in metilen mavisi, klinik laboratuvarlarda -bakteri ya da parazit morfolojilerinin tanımlanması, kapsül şişme testinin değerlendirilmesi, vb.- çok çeşitli amaçlar için kullanılabilen basit bir boyadır. *Corynebacterium diphtheriae* tanısında özel bir öneme sahiptir. Bu boya ile boyandığında *C. diphtheriae*, açık mavi sitoplazmaya belirgin kontrast oluşturan koyu boyanmış metakromatik granüllerin neden olduğu boncuklu ya da bantlı bir hücre görünümü ile karakterizedir (1).

Metilen mavisi boyama, Gram boyasına yardımcı olarak da kullanılır. Özellikle menenjit şüphesinde BOS sedimentinden Gram boya ile birlikte mutlaka metilen mavisi boyama da yapılmalıdır. Gram boyama ile pembe-kırmızı boyanan ve genellikle pembe bir zeminde ayırt edilmesinde güçlük olabilen *Haemophilus influenzae* ve *Neisseria meningitidis* gibi gram negatif organizmalar, metilen mavisi kullanılması halinde açık gri zeminde koyu mavi boyanmış hücreler şeklinde görüleceklerinden kolayca ayırt edilebilirler (2).

Metilen mavisi *Mycobacterium* spp'nin boyanmasında veya benzeri asit-fast boyamalarda da zıt boya olarak kullanılır. Bir diğer kullanım alanı dışkının direkt mikroskopisinde lökositleri göstermektir ki, lökositlerin varlığı invaziv enfeksiyon bulgusudur. Bu boya ayrıca Gram boyama ile görülmeleri zor olabilen fuziform bakterilerin ve spiroketlerin (ör., Vincent anjini gibi ağız enfeksiyonlarında) morfolojisini de ortaya çıkarabilir (3).

## Teknik Bilgiler

### 1 Test için asgari laboratuvar koşulları

#### 1.1. Laboratuvar güvenliği

Bu UMS'de bahsi geçen organizmalar ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart önlemler uygulanmalı, önlemler risk değerlendirmesi ile de desteklenmelidir. Aerosol oluşturması muhtemel tüm laboratuvar çalışmaları bir biyolojik güvenlik kabininde gerçekleştirilmelidir (ayrıca bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

**Güvenlik uyarısı!** Etanol parlayıcıdır! Alevden ve aşırı ısıdan uzak tutulmalıdır!

Boyanmış olsun veya olmasın bütün lamlar **kesici-delici atık** kabul edilir ve kesinlikle kesici-delici atık kutusuna atılırlar! Diğer biyolojik kirlilerin bulunduğu torbalara atılmaları halinde torbayı deler ve ciddi enfeksiyöz risk doğururlar!

#### 1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) testten önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşina olmalı, ve; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

#### 1.3. Örnek, Reaktif, Donanım

##### İnceleme örnekleri

- Katı besiyerlerinde üreyen koloniler – özellikle *C. diphtheriae* ve diğer korineformların değerlendirilmesi için. İdeal sonuç almak için inhibitör içermeyen besiyerindeki genç kültürler (<24 saat) kullanılmalıdır.
- Buyyon kültürleri ve kan kültürleri – hem üremenin hem de üreyen bakterinin morfolojisinin değerlendirilmesi için.
- Klinik örnek preparatları – özellikle BOS ve üretral akıntı örneklerinin sabitlenmiş preparatları ve invaziv enfeksiyon olasılığında lökosit varlığını değerlendirmek için dışkı örneklerinin ıslak preparatları

NOT: BOS ve üretral akıntı örnekleri için preparatların laboratuvarında hazırlanması idealdir. Ancak örneğin laboratuvara ulaşması gecikecekse veya örnek bir taşıma besiyerine konacağı için örneğin yapısı değişecekse preparat örneğin alındığı birimde hazırlanmalı, sabitlenmeli ve lamlar laboratuvara iletilmelidir.

**Loeffler'in metilen mavisi boya çözeltisi**

- Piyasadan hazır temin edilebileceği gibi laboratuvarında da hazırlanabilir.
- Hazırlamak için: 0.3 g metilen mavisi, 30 mL etanol (%95'lik) içinde eritilir; 100 mL distile/deiyonize su eklenir. Boya bir gece bekletildikten sonra kullanılacağı şişeye filtre edilerek (Whatman No.2 filtre kağıdı) aktarılır. Etiketlenir ve oda ısısında saklanır. Raf ömrü 1 yıldır.

NOT: *Corynebacterium* ve *Cryptosporidium* türlerini boyamak için önerilen formül 'alkali LMMB' olarak da geçmektedir. Üstte verilen formüldeki 100 mL distile su yerine 100 mL %0.01'lik potasyum hidroksit eklenerek hazırlanır (4,5).

Ancak bazı kaynaklarda *Corynebacterium* spp için bunun geçmişte kullanılan, bugün ise gerek duyulmayan bir modifikasyon olduğu belirtiliyor (6). Laboratuvarın bu formüllerden hangisini kullanacağına *Corynebacterium* spp kontrol suşları ile yapacağı değerlendirme sonucunda kararı vermesi önerilir.

**Diğer gereç, donanım**

- Mikroskop, binoküler (rutin ışık mikroskobu) – 10× düşük, 40× yüksek kuru, 100× immersiyon objektifleri ve 10× oküleri olan tercih edilir.
- NOT: Bazı mikroskopistler 5× oküler tercih etmektedir. Ancak 5× oküler daha az büyütme sağlar ve inceleme duyarlılığını düşürür; bu nedenle 10× oküler kullanılması önerilmektedir (7).
- Önceden temizlenmiş lamlar (25x75 mm) – tercih kenarı rodajlı
- Mumlu kalem, lamı bölmek için
- Kurşun kalem, lamın rodajlı kenarına örnek numarası vb. yazmak için
- Öze, steril tek kullanımlık veya nikrom, veya steril kürdan
- SF (%0.85 NaCl) veya su, steril
- İmmersiyon yağı
- Kesici-delici atık kabı, toksik boya atıklarını toplamak için kap

**1.4. Kalite kontrol**

- Boyanın her yeni serisi kullanıma sokulmadan önce kontrol suşları / hücreleri ile test edilmelidir.
- Boya ayrıca kullanım sıklığına göre en az ayda bir veya her kullanımda klinik örneğe paralel olarak kontrol suşları / hücreleri ile test edilmelidir.
- Kalite kontrol organizmaları / hücreleri:

*Escherichia coli* ATCC 25922 – mavi çomaklar

*Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 – mavi koklar

*C. diphtheriae* biyotip gravis ATCC 8028 – koyu mavi granüller

Antikoagülanlı kanın 'buffy-coat' tabakasından bir damla – parçalı çekirdek yapıları iyi ayırt edilen mavi boyanmış lökositler

NOT: Pozitif kontrolün ıslak preparattan yapılması şart değildir; uygunluk, önceden hazırlanmış, sabitlenmiş, derin dondurucuda saklanmakta olan ve lökositler, 'kanıt' hücreleri ya da trikomonas içeren yaymaların boyanması ile test edilebilir.



## 2 Metilen mavisi boyama prosedürü

### 2.1. Preparat hazırlanması

- Klinik örneklerden veya sıvı ya da agar kültürlerden yayma preparat hazırlanması ile ilgili ayrıntılı bilgi **Gram boyama** prosedüründe verilmiştir (bkz. UMS, B-TP-03).

NOT: Gram boyalı preparatların mikroskopta okunması ve saklanması ile ilgili hususlar LMMB ile boyalı preparatlara da uygulanabilir.

- Islak preparat hazırlanır hazırlanmaz incelenmelidir (bkz. '2.3. Islak preparatların boyanması').

### 2.2. Yayma preparatların boyanması

- Boyanmaya hazır, sabitlenmiş lam(lar) bir boyama standına yerleştirilir.
- LMMB çözeltisinden lamın üzerine yayma alanını kapatacak miktarda konur.
- Boya yaymanın üzerinde 1-3 dk tutulur ve sonra lam çok hafif akan çeşme suyu ile yıkanır.
- Lam üzerindeki su iyice süzdürülür ve dik konumda havada kurutulur.
- Mikroskopta 40× kuru objektif ve 100× immersiyon objektifi ile incelenir.

### 2.3. Islak preparatların boyanması

- LMMB preparatı ideal olarak SF preparatı ile yan yana hazırlanmalıdır  
ÖNEMLİ: Dışkı ve vajinal örneklerin SF ile hazırlanmış preparatlarında varsa *Trichomonas* ve *Giardia* trophozoitleri gibi hareketli organizmaları görmek mümkün olabilir.
- Lam mumlu kalem ile ikiye bölünür.
- Örnek sıvı ise (vajinal akıntı, idrar vb.) her iki bölüme birer damla örnek konur. Örneklerden birinin üzerine bir damla LMMB ilave edilir.
- Örnek katı ise (dışkı örnekleri vb.) bir bölüme bir damla SF, diğer bölüme bir damla LMMB konur. Steril bir öze veya kürdan ile alınan örnek parçası SF'te ve LMMB'de homojenize edilir.
- Damlaların üzeri lamel ile kapatılır.
- Mikroskopta 40× kuru objektif ile incelenir.

## 3 Preparatların değerlendirilmesi/yorumlanması

- Doğru bir değerlendirme için en az 10-20 mikroskop sahasında lökositler, eritrositler, monositler ve epitel hücrelerinin (vajinal örneklerde 'kanıt' hücrelerinin) varlığı ve sayıları saptanmaya çalışılır.

- Islak preparatlar parazit elemanlarının varlığı yönünden de değerlendirilir; SF ile yapılan preparatta hareketli yapılar (trikomonas vb.) görülebilir. *Trichomonas vaginalis* enfeksiyonunda genellikle yoğun lökosit de gözlenir (>30 lökosit / mikroskop sahası)
- Tomurcuklanmış maya hücreleri ve psödohif yapıları gözlenebilir; vajinal akıntı ve idrarda enfeksiyon ile ilişkili iken dışkı örneklerinde bu yapıların görülmesi normal floraya ait olabileceklerinden dolayı enfeksiyon ile ilişkili kabul edilmez (1).
- Vajinal örneklerde; tomurcuklanmış maya hücrelerinin ve/veya psödohiflerin varlığı vajinal kandidiyaz ile ilişkilidir; 'kanıt' hücrelerinin varlığı bakteriyel vajinoz göstergesidir.
- Üretral akıntı örneklerinden yayma preparatta -sadece erkek hastalarda- lökositler içinde mavi boyanmış diplokokların gözlenmesi gonokok (*Neisseria gonorrhoeae*) enfeksiyonu ile ilişkilidir.
- BOS örneğinde benzer görünüm *Neisseria meningitidis* enfeksiyonu için çok güçlü bir bulgudur.
- Dışkı örneklerinin incelemesinde lökositlerin görülmesi invaziv enfeksiyona (*Shigella* sp, *Campylobacter* sp vb.) işaret eder. Kültür için gelmiş bir dışkı örneğinin mikroskopisinde eğer lökositler görülüyor, ancak eritrositler mevcut ise, örnek mutlaka *Escherichia coli* O157:H7 (enterohemorajik köken) için de kültüre alınmalı veya Shiga toksin testi yapılmalıdır (1).
- Normalde steril vücut bölgelerinden örneklerde metilen mavisi ile boyanmış organizmalar görülmesi enfeksiyon bulgusudur.
- Santrifüj edilmemiş idrarın LMMB mikroskopisinde (10 µL standart öze ile alınmış damlanın lam üzerine sabitlenerek boyanması ile) organizmaların görülmesi bakteri sayısının muhtemelen  $\geq 10^5$ cfu/ml olduğunu gösterir.
- LMMB asla *C. diphtheriae* tanısı amacıyla direkt klinik örneklerle uygulanmaz. Çünkü metakromatik granüller diğer bazı bakterilerde de bulunabilir. Bu nedenle boğaz sürüntülerinden LMMB boyamanın difteri tanısında değeri yoktur (4,5).

## 4 Sonuçların raporlanması

- Klinik örneklerin LMMB sonuçları ön rapor olarak klinisyene iletilmelidir.
- Eğer hiçbir organizma/hücre gözlenmediyse, "herhangi bir organizma görülmedi" veya "herhangi bir hücre görülmedi" şeklinde rapor edilir.
- Varsa hücrelerin ve organizmaların sayımı yapılmalıdır. Sayım sadece, eğer varsa, inflamasyon veya nekroz bulgusu olan alanlardan yapılmalıdır (bkz. UMS, B-TP-03).
- Dışkı örneklerinde lökositler, eritrositler; vajinal örneklerde lökositler, *Trichomonas*, mantar elemanları ve 'kanıt' hücreleri, üretral akıntı ve BOS örneklerinde lökositler ve diplokoklar, görülüyorsa diğer organizma formları... rapor edilmelidir.

## 5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Örnek pürülan olmasına rağmen LMMB'de eğer hiç organizma görülmemiş ise başka bir boyama yöntemi (akridin oranj vb.) önerilir.
- Boyama sonuçları başka incelemelerle desteklenmelidir.

## İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesinde (Metilen Mavisi Boyama) geçen bazı hususlar (preparat hazırlanması ve sonuçların raporlanması gibi) ile ilgili daha ayrıntılı veya ilave bilgi için aşağıda verilen UMS belgesine başvurunuz:

UMS, B-TP-03 Gram boyama

## Kaynaklar

- 1 York MK. Wet mount for detection of leukocytes and microorganisms. *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 3.2.3.1 - 3.2.3.4*
- 2 Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, Jr. (eds). Introduction to microbiology Part I: guidelines to practice and management: **MICROSCOPIC** examination. *In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 4th ed., J.B. Lippincott Company, Philadelphia. 1992, p. 15-26.*
- 3 Grasmick A. Processing and interpretation of bacterial faecal cultures. Loeffler's methylene blue. *In: Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. ASM Press, Washington D.C. 1992, p.1.10.3*
- 4 Synder JW. *Corynebacterium diphtheria* cultures. *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 3.11.7.1-3.11.7.8*
- 5 Efstratiou A, Maple PAC. *Manual for the Laboratory Diagnosis of Diphtheria*. Copenhagen: Expanded Programme on Immunization in the European Region of World Health Organization, ICP/EPI 038(C). 1994.
- 6 Finegold SM, Baron EJ (eds). Formulas for commonly used stains: Methylene blue stain (Loeffler's). *In: Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 7th ed., The C. V. Mosby Company, USA. 1986, p. 909.*
- 7 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1-4.*



T.C. Sağlık Bakanlığı

# ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

## Nitrat/Nitrit Redüksiyonu Testi

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Test Prosedürleri
Standart No	B-TP-15
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik
----------	-------	------------

## İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	3
GENEL BİLGİ .....	3
TEKNİK BİLGİLER .....	4
1 Test için asgari laboratuvar koşulları.....	4
2 Testin uygulanması.....	5
3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması <sup>4</sup> .....	6
4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar .....	8
EKLER.....	9
Ek-1 Test besiyerleri ve reaktiflerinin hazırlanması <sup>4</sup> .....	9
Ek-2 Nitrat/Nitrit redüksiyonu değerlendirme algoritması .....	10
KAYNAKLAR.....	11

## Kapsam ve Amaç

Bakterilerin nitratı ( $\text{NO}_3^-$ ) nitrite ( $\text{NO}_2$ ) indirgeyebilmeleri önemli bir özelliktir ve bu özellikten klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın bir şekilde yararlanır. Test başlıca nonfermentatif bakterilerin, *Moraxella*, *Neisseria*, *Haemophilus* türleri örneğinde olduğu gibi güç üreyen gram negatiflerin ayırımında tercih edilir (1,2). *Corynebacterium* türlerinin tanımlanmasında ve *Corynebacterium diphtheriae*'nin biyotiplendirmesinde de nitrat redüksiyonu biyokimyasal tanı setinin önemli bir parçasıdır. Bu UMS'de nitrat/nitrit redüksiyon testlerinin doğru uygulanması ve yorumlanması için bir prosedür verilmesi hedeflenmiştir.

## Kısaltmalar ve Tanımlar

<b>Durham tüpü</b>	Küçük özel tüpler; ters pozisyonda sıvı besiyeri tüpleri içine konarak gaz üretiminin değerlendirilmesinde kullanılır.
<b>Karsinojen</b>	Kansere neden olabilen etken ya da madde, kanserojen

## Genel Bilgi

Bakteriler nitratları nitritlere veya daha ileri yıkım ile amonyak, nitrojen gazı ( $\text{N}_2$ ), hidroksilamin gibi maddelere dönüştürebilirler. Nitrat redüksiyonu organizmanın oksijenini nitratlardan temin etmek durumunda kaldığını (anaerob solunum) gösterir. Bir organizmanın nitrat redüksiyon yeteneğini saptamak için nitrat buyyon kullanılır.

Nitrat redüksiyonuna ortamda nitriti tespit ederek karar verilebileceği gibi, *-tam yıkım gerçekleştiğinde-* nitrat veya nitritin ortamda **gösterilememesi** ile de karar verilebilir.

**Nitritlerin varlığı**, ortama sülfanilik asit ve  $\alpha$ -naftilamin eklendiğinde kırmızı diazonyum bileşiğinin oluşumu ile anlaşılır. **Gaz üretimi**, eğer besiyeri içinde Durham tüpü mevcut ise gözlenebilir (3,4).

Kırmızı renk oluşmadığı durumda iki olasılıktan söz edilebilir: i) nitrat indirgenmemiştir veya ii) bu reaktiflerin gösteremeyeceği ileri son ürünler meydana gelmiş, yani nitrat tam indirgenmiştir.

Olasılıklardan hangisinin geçerli olduğunu anlamak için tüpe **çinko tozu** eklenir ve indirgenmemiş nitrat ile reaksiyona girmesi beklenir; çinko tozu kalan nitratı nitrite indirgeyecek ve kırmızı renk gelişecektir ki, bu durumda organizma için nitrat testi negatif demektir. Eğer ortamda nitrat kalmamışsa (daha önce bakteri tarafından tamamen yıkılmış olması nedeniyle) çinko tozu eklenmesi ile kırmızı renk oluşmaz; bu da testin nitrat ve nitrit redüksiyonu için pozitif olduğunu gösterir (4).

Özetle testin değerlendirilmesi iki safhalıdır: birinci safhada nitrat buyyon içeren bakteri üremiş tüpe katılan reaktiflerle kırmızı renk oluşursa pozitif; oluşmaz ise, çinko tozu katıldıktan sonra kırmızı renk oluşması negatif, oluşmaması pozitif olarak değerlendirilir.

# Teknik Bilgiler

## 1 Test için asgari laboratuvar koşulları

### 1.1. Laboratuvar güvenliği

Bu UMS'de bahsi geçen organizmalar ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart önlemler uygulanmalı, önlemler risk değerlendirmesi ile desteklenmelidir. Aerosol oluşturması muhtemel tüm laboratuvar çalışmaları bir biyolojik güvenlik kabininde gerçekleştirilmelidir (ayrıca bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

### 1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) testten önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşına olmalı, ve; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

### 1.3. Örnek, Besiyeri, Reaktif, Donanım

#### Test mikroorganizmaları

- Gram negatif çomaklar ve gram negatif koklar, kokobasiller (*Neisseria* spp, *Haemophilus* spp, *Bordetella* spp gibi)
- Sporsuz, gram pozitif çomak bakteriler – *Corynebacterium* sp
- Anaerob mikroorganizmalar

#### Besiyeri, Reaktif

- Nitrat ve nitrit buyyonlar – Laboratuvarda hazırlamak için bkz. Ek-1.
- Nitrat diskleri – anaerob mikroorganizmalar için (ticari olarak mevcut).
- Nitrat tabletleri – besiyerleri ve reaktifler için (ticari olarak mevcut)
- %0.8'lik sülfanilik asit (Nit-1) - hazırlamak için bkz. Ek-1.
- %0.5'lik  $\alpha$ -naftilamin (Nit-2) - hazırlamak için bkz. Ek-1.
- Çinko metal tozu

#### Diğer gereç, donanım

- Cam tüpler, burgu kapaklı; besiyeri için (16x125 mm)
- Durham tüpleri
- Öze, tek kullanımlık veya nikrom

### 1.4. Kalite kontrol

- Her yeni besiyeri lotu kullanıma sokulmadan önce pozitif ve negatif kalite kontrol suşları ile test edilmelidir.
- Reaktiflerin yeni lotları besiyeri inoküle edilmeden doğrudan reaktiflerin ilave edilmesi ile test edilir (önce sülfanilik asit ve  $\alpha$ -naftilamin, sonra çinko tozu). Kırmızı renk elde ediliyorsa kullanıma sokulabilir.

- Besiyeri tüpleri kullanım öncesi kontaminasyon yönünden incelenir. Bulanıklık görülen tüpler atılır.
- Kalite kontrol organizmaları (4):  
*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 – nitratı nitrojen gazına kadar indirger; nitrat-pozitif, nitrit pozitif; gaz-pozitif  
*Escherichia coli* ATCC 25922 – nitratı nitrite kadar indirger; nitrat pozitif; gaz negatif  
*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 – nitratı indirgemez; nitrat negatif  
*Campylobacter jejuni* ATCC 33560 (alternatif pozitif kontrol) – nitrat pozitif

## 2 Testin uygulanması

### 2.1. Tüp metodu

Uygulama ve değerlendirme basamakları için Ek-2'yi de inceleyiniz!

**ÖNEMLİ:** İnokülasyondan önce buyyon incelenir; Durham tüpleri içinde gaz kabarcığı varsa tüp altüst edilerek çıkarılmalıdır.

- Bir nitrat buyyon tüpü alınır; test edilecek bakterinin tek düşmüş kolonisinden veya saf kültür pasajından öze ile alınan inokulum ya da bir gecelik buyyon kültüründen 1-2 damla inokulum besiyeri tüpüne ekilir.

NOT 1: Güç üreyen organizmalar (*Neisseria* spp, *Bordetella* spp gibi) test edilmek isteniyorsa önce yoğun süspansiyon (McFarland No.6-8) hazırlanır; nitrat buyyona inokülasyon bu süspansiyondan (1-2 damla) yapılır.

NOT 2: Eğer inkübasyon süresinin sonunda nitrat redüksiyonu gözlenmez ise bakterinin nitrit redüksiyonunu test etmek amacıyla aynı şekilde nitrit buyyona ekimi yapılmalıdır. Eğer nitrat pozitif ise nitrit buyyon kültürüne gerek yoktur!

- İnokülasyon yapılmış tüpler inkübasyona kaldırılır. Nonfermenter gram negatif çomaklar 25-30°C'de; diğer organizmalar 35°C'de inkübe edilmelidir. Bazı organizmalar için 2-5 gün inkübasyon gerekebilir. *Campylobacter* 35°C'de, mikroaerofil ortamda ve 72 saat inkübe edilmelidir.
- Yeterli inkübasyon süresi geçtiğinde tüpler incelenir; üremenin varlığına ve Durham tüpü içinde gaz olup olmadığına bakılır; not edilir.  
*Tüpte görünür bir üreme yoksa reaktifler ilave edilmez! İnkübasyon uzatılır.*
- Eğer gaz mevcut, fakat organizma KIA ya da TSI'de glikozu fermente etmemiş ise reaktifler katılmaz; çünkü test nitrat ve nitrit redüksiyonu ve gaz oluşumu bakımından pozitif olarak kabul edilir.



- Eğer gaz mevcut değilse veya organizma glikoz fermenter, gram negatif bir çomak ise (ör., *Enterobacteriaceae*) buyyondan ~1 mL alınıp küçük bir tüpe aktarılır; üzerine 2-3 damla Nit-1 damlatılır. Çalkalayarak iyice karıştırılır.
- Sonra 2-3 damla Nit-2 ilave edilip tekrar karıştırılır. 1-2 dakika içinde kırmızı renk oluşup oluşmadığı gözlenir.
- Eğer kırmızı renk gözlenmiyorsa, **nitrat tüpüne**, ince bir spatül ucu ile küçük bir miktar çinko tozu ilave edilir.  
NOT: Çinko tozu nitrit tüpüne konmaz!
- Yaklaşık 10 dakika içinde kırmızı renk gelişip gelişmediği değerlendirilir.
- Eğer nitrat veya nitrit **indirgenmemiş** ise veya gaz üretimi yoksa kalan buyyon yeniden inkübasyona kaldırılır ve 48 saat sonra yeniden test edilir. Nitrit buyyondaki kültürler ise 5. güne kadar izlenmelidir.

### 2.2. Disk metodu (sadece anaeroblar için kullanılır)

- Bakterinin üremesini iyi destekleyen bir agar besiyerine test edilecek organizma pasajlanır ve yoğun ekim alanına bir nitrat diski yerleştirilir. Anaerob şartlarda 24-48 saat inkübe edilir.
- İnkübasyon sonunda disk plak yüzeyinden alınır ve temiz bir Petri kabına konur. Üzerine sırasıyla birer damla Nit-1 ve Nit-2 eklenir. Eğer bir kaç dakika içinde renk değişimi olmaz ise üzerine küçük bir miktar çinko tozu ilave edilir ve 5 dakikaya kadar izlenir.

### 2.3. Hızlı metot

- Bir tüpe 0.5 mL buyyon konur. Organizma yoğun bir şekilde inoküle edilir.
- 2 saat 35°C'de inkübe edilir.
- Nit-1 ve Nit-2 ilave edilir; kırmızı renk gelişimi açısından izlenir. Standart test gibi yorumlanır.

## 3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması<sup>4</sup>

Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumu karmaşık gelebilir. Aşağıda açıklanarak verilmiş olup, ayrıca Tablo-1 ve Ek-2'den yararlanılabilir:

### Gaz pozitif durum

Durham tüpünde gaz kabarcıkları varsa, tek bir kabarcık bile olsa (fermentatif, gram negatif çomak bakteriler hariç), reaktif eklenmesine gerek yoktur ve sonuç aşağıdaki gibi yorumlanır:

- Nitrat tüpü – nitrat redüksiyon pozitif, nitrit redüksiyon pozitif, gaz pozitif
- Nitrit tüpü – nitrit redüksiyon pozitif, gaz pozitif

### Gaz negatif durum

Gaz kabarcığı yok ise redüksiyonun değerlendirilmesi için Nit-1, Nit-2 eklenir. Gaz-negatif olan fermentatif ve nonfermentatif gram negatif çomaklar için reaksiyonlar aşağıdaki gibi yorumlanır:

- Nitrat tüpünde;
  - (a) Nit-1, Nit-2 sonrası kırmızı renk gelişmesi: nitrat redüksiyon pozitif, nitrit redüksiyon negatif
  - (b) Nit-1, Nit-2 sonrası kırmızı renk **gelişmemesi ve** çinko tozu eklenmesi ile de kırmızı renk **gelişmemesi**: nitrat redüksiyon pozitif, nitrit redüksiyon pozitif
- Nitrit tüpünde; Nit-1, Nit-2 eklenmesinden sonra rengin **değişmemesi**: nitrit redüksiyon pozitif

### Negatif sonuçlar (son okuma $\geq 48$ saat)

- Nitrat tüpünde – Nit-1, Nit-2 eklendikten sonra renk değişimi **olmaması** ve çinko tozu ile kırmızı renk gelişmesi: nitrat redüksiyon negatif
- Nitrit tüpünde – Nit-1, Nit-2 eklendikten sonra kırmızı renk oluşması: nitrit redüksiyon negatif

**Tablo 1.** Nitrat ve nitrit redüksiyon testlerinin yorumu için özet tablo.

Reaktif	Reaks.	Besi-yeri	Anlamı
Nit-1 ve Nit-2 ilavesi sonrası	Kırmızı	Nitrat	Nitratin nitrite indirgenmediğini gösterir (bakteri nitrat- <i>pozitif</i> )
		Nitrit	Nitritin <b>indirgenmediğini</b> gösterir (bakteri nitrit- <i>negatif</i> )
Çinko ilavesi sonrası*	Kırmızı	Nitrat	Nitratin <b>indirgenmediğini</b> gösterir (bakteri nitrat- <i>negatif</i> )
Çinko ilavesi sonrası	Renk yok	Nitrat	Nitratin nitrojen gazına kadar indirgenmediğini gösterir. Durham tüpünde de gaz gözlenmelidir. (bakterinin nitrat ve nitrit redüksiyon testleri <i>pozitif</i> )
Nit-1 ve Nit-2 ilavesi sonrası	Kırmızı, (Durham tüpünde gaz ile birlikte)	Nitrat	a) nonfermentatifler için gazın varlığı (reaktif eklenmesine bile gerek olmadan); nitratin nitrite ve nitrojen gazına indirgenmediğini gösterir (bakteri nitrat- ve nitrit- <i>pozitif</i> )
			b) fermentatifler için; gaz nitrojene bağlı değildir - sadece nitrat indirgenmiştir (bakteri nitrat- <i>pozitif</i> , nitrit- <i>negatif</i> )

\* Nitrit buyyona çinko eklenmez!

## 4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- *Enterobacteriaceae*'de gaz üretimi gözlenir; ancak bu nitrat-redüksiyonuna değil hidrojen gazı üretimine bağlıdır.
- Besiyerinde üreyemeyen organizmalar hatalı negatif sonuç elde edilmesine neden olabilirler.
- Pozitif bir testte elde edilen renk çabuk solabileceğinden renk reaksiyonları hızla değerlendirilmelidir.
- Tüplerin ekiminden önce gaz kabarcıkları tam uzaklaştırılmamış ise gaz oluşumu yönünden yanlış pozitif olarak hatalı yoruma neden olur.
- Nit-1 ve Nit-2 eklendiğinde soluk pembe bir renk oluşabilir; bu bir pozitif sonuç **değildir**.
- Negatif nitrit reaksiyonu ile birlikte negatif çinko redüksiyonu (renk değişimi olmaması), nitratın nitrit seviyesinin ötesinde indirgenmiş olduğunu muhtemel işaretidir. Nitrit indirgenmesinin son ürünü genellikle azot gazıdır, ancak diğer son ürünler de oluşabilir.
- Aşırı çinko tozu yanlış pozitif nitrit indirgenmesi reaksiyonu verebilir.
- Pozitif reaksiyonların çoğu 12-24 saat içinde gözlenir, ancak, 5 güne kadar uzayabilen durumlar vardır.

## Ekler

### Ek-1 Test besiyeleri ve reaktiflerinin hazırlanması<sup>4</sup>

#### Nitrat Besiyeri\* (sıvı)

Pepton	2.0 g
<i>veya güç üreyen bakteriler için</i>	
<i>Kalp infüzyon buyyonu</i>	2.5 g
Potasyum nitrat	0.2 g
Distile/deiyonize su	100 mL

#### Nitrit Besiyeri (sıvı)

Kalp infüzyon buyyonu	2.5 g
Potasyum nitrit	0.01 - 0.1 g
Distile/deiyonize su	100 mL

Her iki besiyerinin de hazırlanması aynıdır. Maddeler karıştırılır. İçlerine Durham tüpleri konmuş burgu kapaklı tüplere 3-4 mL alikotlar halinde dağıtılır.

121°C'de 15 dk otoklavlanır. Raf ömürleri 6 aydır. Tüpler besiyeri adı ve son kullanma tarihleri yazılarak etiketlenir; 2-8°C'de saklanır.

#### Nit-1 Reaktif ( %0.8'lik Sülfanilik asit)

Sülfanilik asit	0.8 g
Distile su	70 mL
Glasiyal asetik asit	30 mL

Sülfanilik asit suya eklenir, karıştırılır; eritmek için ısıtılır. Soğutulduktan sonra asetik asit eklenir. Raf ömrü 3 aydır. Etiketlenir ve 2-8°C'de saklanır.

#### Nit-2 Reaktif ( %0.5'lik N,N-Dimetil- $\alpha$ -naftilamin)

N,N dimetil- $\alpha$ -naftilamin	0.5 g
Distile su	70 mL
Glasiyal asetik asit	30 mL

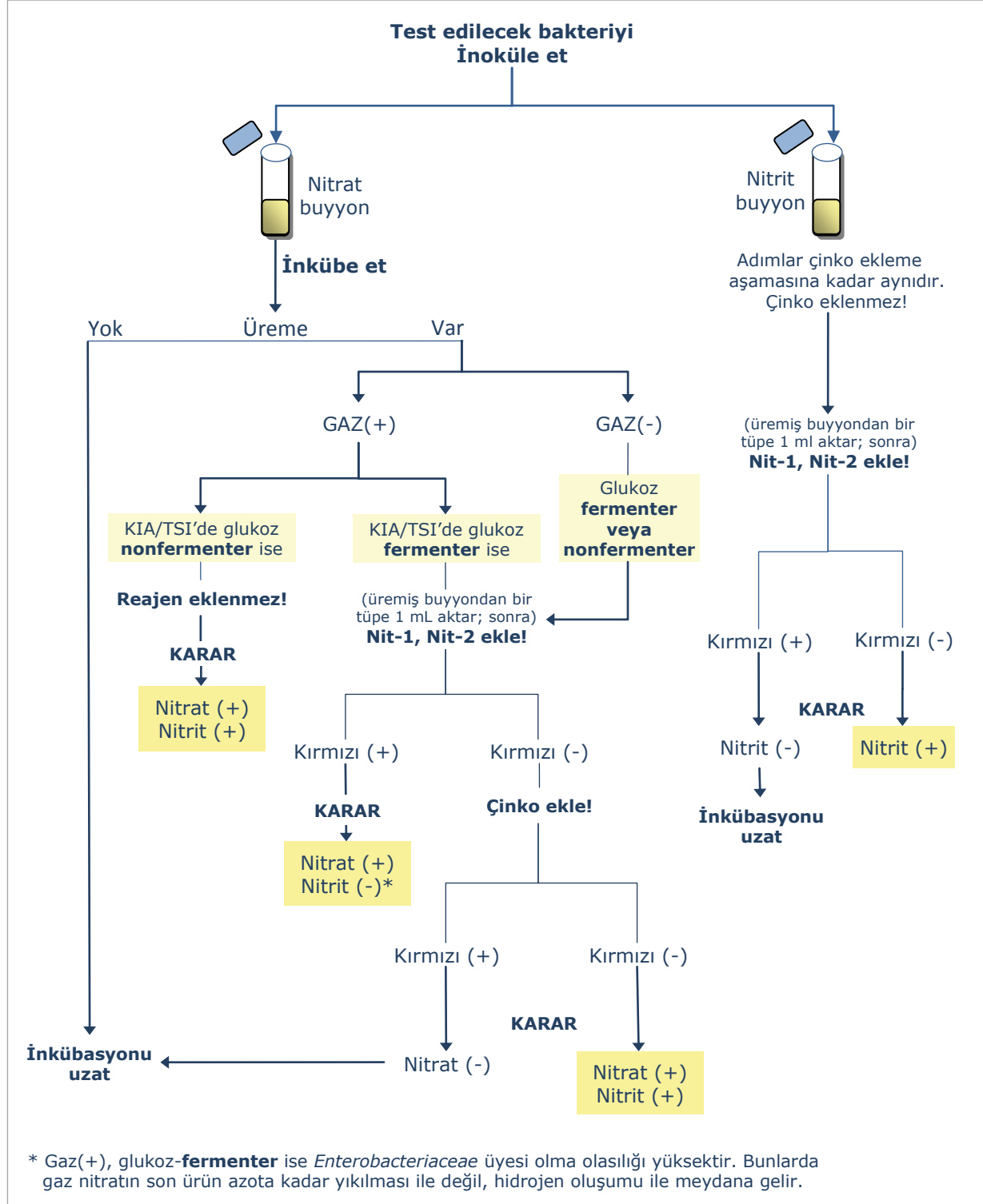
Asit suya eklenir;  $\alpha$ -naftilamin katılır. Raf ömrü 3 aydır. 2-8°C'de saklanır.

#### **Güvenlik uyarısı!**

$\alpha$ -naftilamin potansiyel karsinojendir. Laboratuvarda hazırlamak yerine piyasadan *hazır reaktif* olarak temin edilmesi önerilir.

\* Burada formüller 100 mL besiyeri/reaktif için verilmiştir. Laboratuvar kendi tüketim hızına göre hazırlayacağı besiyeri/reaktif miktarına karar vermelidir.

## Ek-2 Nitrat/Nitrit redüksiyonu değerlendirme algoritması



**Şekil 1.** Nitrat ve nitrit redüksiyon testlerinin uygulanması ve sonuçların yorumu için şematik diyagram (Kaynak: Akbaş E. Henüz yayınlanmamış doküman. 2012)

## Kaynaklar

---

- 1 Janda WM, Knapp JS. *Neisseria* and *Moraxella catarrhalis*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed., ASM Press, Washington D.C. 2003, p. 585–608.
- 2 Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, Jr. (eds). The *Enterobacteriaceae*. Chart 3-2: Nitrate reduction. In: *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 4th ed., J.B. Lippincott Company, Philadelphia, PA. 1992, p. 172-3.
- 3 MacFaddin JF. Biochemical Tests for the Identification of Medical Bacteria. 3rd ed., The Lippincott, Williams & Wilkins Co., Philadelphia, PA. 2000, p. 348–358.
- 4 York MK, Traylor MM, Hardy J, Henry M. Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. Nitrate/Nitrite Reduction Test. In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 3.17.35.1 - 3.17.35.4



T.C. Sağlık Bakanlığı

# ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

## Oksidaz Testi

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Test Prosedürleri
Standart No	B-TP-16
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik
----------	-------	------------

## İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	3
GENEL BİLGİ .....	3
TEKNİK BİLGİLER .....	3
1 Test için asgari laboratuvar koşulları .....	3
2 Testin uygulanması .....	4
3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması .....	5
4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	5
KAYNAKLAR.....	6



## Kapsam ve Amaç

Oksidaz testi sitokrom oksidaz enziminin gösterilmesi amacıyla kullanılır. Oksidaz pozitif ve negatif organizmaların ayrımı ilk tanımlamada önemli bir basamak olduğu için oksidaz testinin doğru bir şekilde yapılması da kritik önemdedir. Bu UMS'nin amacı, testin doğru uygulanması için bir rehber sunmaktır.

## Kısaltmalar ve Tanımlar

- NADH** Nikotin amid adenin dinükleotid (NAD<sup>+</sup>)'in indirgenmiş halidir. NAD<sup>+</sup> oksitleyicidir; diğer moleküllerden elektron alır ve indirgenir.
- TMpPD** N, N, N', N'-tetra-metil-*p*-fenilen diamin dihidroklorid

## Genel Bilgi

Oksidaz testi, sitokrom oksidaz enzimi üretiminin gösterilmesine dayanır. Bazı bakteriler, demir içeren bir hemoprotein olan sitokrom oksidaz veya indofenol oksidaza sahiptirler. Bu enzimler NADH gibi verici bileşiklerden bir elektron alıcısına (genellikle oksijene) elektron taşınmasını katalize ederler (1,2).

Sitokrom sistemi sadece, nihai hidrojen alıcısı olarak oksijeni kullanma yetisine sahip olan aerob organizmalarda mevcuttur. Bu metabolizmanın son ürünü su veya katalaz ile yıkılmış hidrojen peroksittir (3). Atmosferik oksijenin varlığında oksidaz testi yapılırken örneğin *p*-fenilen diamin dihidroklorid gibi renksiz bir boya enzim için yapay bir elektron alıcısı olarak hizmet vermektedir. Böylece boya okside edilir ve koyu mor bir bileşik olan indofenol mavisi oluşur (1,2).

Oksidaz testi özellikle gram negatif bakterilerin ilk tanımlanma basamağında yararlıdır. Oksidaz pozitif gram negatiflerin hatalı tanımlanmasını önlemek için tüm gram negatif çomaklara oksidaz testi yapılmalıdır. Bütün *Enterobacteriaceae* üyeleri oksidaz negatiftir. *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Campylobacter*, *Pasteurella* ve *Vibrio* kökenleri ise oksidaz pozitifdir (1,2).

## Teknik Bilgiler

### 1 Test için asgari laboratuvar koşulları

#### 1.1. Laboratuvar güvenliği

Bu UMS'de bahsi geçen organizmalar ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart önlemler uygulanmalı, önlemler risk değerlendirmesi ile de desteklenmelidir. Aerosol oluşturması muhtemel tüm laboratuvar çalışmalarını bir biyolojik güvenlik kabininde gerçekleştirilmelidir (ayrıca bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

### 1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) testten önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşına olmalı, ve; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

### 1.3. Örnek, Reaktif, Donanım

#### Test mikroorganizmaları

- Agar plakta tek düşmüş koloniler (taze kültür) - besiyeri glikoz, inhibitör veya boya içermeyen bir besiyeri olmalıdır.

#### Kovacs ayırıcı, %1'lik

- TM<sub>p</sub>PD'nin distile/deiyonize sudaki %1'lik çözeltisi doğrudan veya test şeritlerine emdirilmiş olarak kullanılır. Piyasada hazır ürünler mevcuttur.
- Taze çözelti, 5mL steril su içine 50mg TM<sub>p</sub>PD karıştırılarak hazırlanır.

**ÖNEMLİ:** Oksidaz solüsyonu hızla kendiliğinden okside olabilir! Bu nedenle daima kullanılacağı gün **taze** hazırlanmalıdır ya da oksidasyonu geciktirmek için askorbik asit (%1 oranında) ilavesi yapılmalıdır. Solüsyon oda ısısında gün ışığından korunarak saklanır ve kullanılmamış kısım gün sonunda atılır.

#### Diğer gereç, donanım

- Öze, steril tek kullanımlık veya platin, veya steril kürdan
- Eküvyon (steril)
- Filtre kağıdı (ör., Whatman No1) – küçük kesilmiş (ör., 10×50 mm).
- Petri kabı, tek kullanımlık

### 1.4. Kalite kontrol

- Ayırıcın veya test şeridinin rengi mavi / mor ise kullanılmamalıdır! Her yeni ayıraç / test şeridi lotu kalite kontrol suşları ile test edilmelidir.
- Kalite kontrol organizmaları:

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 – oksidaz pozitif (pozitif kontrol)  
*Escherichiacoli* ATCC 25922 – oksidaz negatif (negatif kontrol)

## 2 Testin uygulanması

### 2.1. Direkt plak tekniği

- Plak besiyerindeki test edilecek kolonilerin üzerine 1-2 damla Kovacs ayırıcı damlatılır. Plak hareket ettirilmemelidir.  
**ÖNEMLİ:** Eğer kolonilerden pasaj yapılması planlanıyorsa direkt plak tekniğini uygulamayın! Çünkü üstü reaktif kaplı koloniler -organizmalar öldüğü için- pasaja uygun olamazlar.
- Koloni renginin 10 sn içinde mavi-mora dönüp dönmediği gözlemlenir.

## 2.2. Filtre kağıdı tekniği

- Bir parça filtre kağıdı Petri kabına konur; 1-2 damla Kovacs ayırıcı damlatılır.  
NOT: Eğer ticari oksidaz şeridi kullanılıyor ve ürünün kullanma talimatı aksini belirtmiyorsa, Petri kabına konan şerit 1-2 damla steril su ile ıslatılır.
- Taze kültürden incelenecek koloni öze veya kürdan ile alınır; şeridin ayraç damlatılmış (ıslatılmış) kısmına sürülür.
- Rengin 10 sn içinde mavi-mora dönüp dönmediği gözlemlenir.

## 2.3. Eküvyon metodu

- Eküvyon Kovacs ayırıcına daldırılır ve fazlası şişenin kenarından süzdürülür. Ardından eküvyon ile koloniye dokunulur.
- Rengin 10 sn içinde mavi-mora dönüp dönmediği gözlemlenir.  
ÖNEMLİ: Eğer koloniden pasaj planlanıyorsa bu tekniği uygulamayın!

## 2.4. Modifiye oksidaz

- Sitokrom c'yi saptayan modifiye oksidaz testi mikrobokların (pozitif) stafilkoklardan (negatif) ayırımında kullanılabilen testlerden birisidir.
- Test için dimetil sulfoksit içinde (suda değil) %6'lık TMpPD ayırıcı kullanılır. Test, oksidaz testi ile aynı şekilde gerçekleştirilir (4).

## 3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması

- **Pozitif sonuç** – 10-30 sn içinde mavi-mor bir renk oluşması halinde sonuç "pozitif" olarak yorumlanır.
- **Zayıf pozitif sonuç** – 30-60 sn içinde renk gelişimi olursa "zayıf pozitif" reaksiyon olarak değerlendirilir; çoğu *Pasteurella* spp için tipiktir.
- **Negatif sonuç** – Renk oluşmaması veya renk değişiminin 60 saniyeden sonra gelişmesi halinde sonuç "negatif" olarak yorumlanır.

## 4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Nikel-krom tel özeler kullanılmaz! Çünkü alevde yakma sırasında oluşan yüzey oksidasyon ürünleri yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmektedir (1).
- Mukoid koloniler, reaktifin organizmaya zayıf penetrasyonu nedeniyle yanlış negatif sonuç verebilir. Eski kültürlerden elde edilen oksidaz sonuçları güvenilir değildir (5).
- Bazı *Pseudomonas* türleri oksidaz negatif olabilir.

- Glikoz veya diğ er Şekerler, tellürit ya da boyalar içeren besiyerlerinde (EMB, MacConkey, TCBS vb.)  remiŐ kolonilere oksidaz testi yapılmaz; yanlış pozitif ya da yanlış negatif sonuçlara neden olabilirler (6).

## Kaynaklar

- 1 York MK, Traylor MM, Hardy J, Henry M. Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. Oxidase test. In: Garcia LS (editor in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 3rd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2010, p. 3.17.39.1 - 3.17.39.3
- 2 Bilgehan H. Besiyerleri, ayıraçlar ve deneyler: Oksidaz deneyleri. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. 5. Baskı, Barış Yayınları, İzmir. 2009, p. 688
- 3 MacFaddin JF, ed. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. 3rd ed., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 2000, p. 363-7.
- 4 Faller A, Scheifer KH. Modified oxidase and benzidine tests for seperation of staphylococci from micrococci. *J Clin Microbiol* 1981;13:1031-1035.
- 5 Barrow GI, Feltham RKA, eds. *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*. 3rd ed. Cambridge University Press. Cambridge. 1993, p. 214-8.
- 6 Collins CH, Lyne PM, Grange JM, Falkinham JO, eds. *Collins and Lyne's Microbiological Methods*. 8th ed. Vol 97. Arnold Publishers, UK. 2004, p. 98.



T.C. Sağlık Bakanlığı

# ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

## ONPG Testi

(*o*-Nitrofenil- $\beta$ -D-Galaktopiranozid)

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Test Prosedürleri
Standart No	B-TP-17
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

## İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	3
GENEL BİLGİ .....	3
TEKNİK BİLGİLER .....	3
1 Test için asgari laboratuvar koşulları .....	3
2 Testin uygulanması .....	4
3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması .....	5
4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	5
EKLER.....	6
Ek-1 ONPG testi için besiyerinin hazırlanması.....	6
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	6
KAYNAKLAR.....	6

## Kapsam ve Amaç

ONPG testi, özellikle *Enterobacteriaceae* ailesinden bakterilerin laktozu fermente etme yeteneğine göre ayırt edilmesinde kullanılır. Buna ek olarak, *Neisseria lactamica*'nın diğer güç üreyen *Neisseria* türlerinden ayrılması amacıyla da uygulanmaktadır (1).

Bu UMS'nin amacı ONPG testinin yapılışı ve yorumlanmasına dair bir rehber sunmaktır.

## Kısaltmalar ve Tanımlar

**ONPG** o-Nitrofenil- $\beta$ -D-Galaktopiranozid

**Substrat** Enzimin etki ettiği madde

## Genel Bilgi

Laktozun fermentasyonu için organizmada permeaz ve  $\beta$ -galaktozidaz enzimi bulunmalıdır. Permeaz laktozun hücre duvarını aşmasını, hücre içine girmesini sağlar;  $\beta$ -galaktozidaz da hücre içine girmiş laktozu galaktoz ve glikoza yıkar. Laktozu fermente etmeyen bakterilerde bu iki enzim de yoktur. Bazı organizmalarda ise permeaz enzimi bulunmaz ve bunlar geç laktoz pozitif reaksiyon verirler ya da laktoz negatif olarak değerlendirilirler (1,2).

ONPG testi organizmalardaki  $\beta$ -galaktozidaz enzimini tespit ederek bu enzimi taşıyan organizmaların gerçek laktoz negatif bakterilerden ayırt edilmesini sağlar. ONPG yapısal olarak laktoza benzeyen renksiz bir maddedir ve testte  $\beta$ -galaktozidazın substratı olarak kullanılır. ONPG hücre içine laktozdan daha kolay geçebilir; permeazın etkin olmadığı hallerde dahi bakteri hücresi içine alınır; eğer hücrede  $\beta$ -galaktozidaz mevcutsa hidrolize edilir; galaktoza ve sarı renkli bir madde olan o-nitrofenol'e ayrılır (3).

## Teknik Bilgiler

### 1 Test için asgari laboratuvar koşulları

#### 1.1. Laboratuvar güvenliği

Bu UMS'de bahsi geçen organizmalar ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart önlemler uygulanmalı, önlemler risk değerlendirmesi ile de desteklenmelidir. Aerosol oluşturması muhtemel tüm laboratuvar çalışmaları bir biyolojik güvenlik kabininde gerçekleştirilmelidir (ayrıca bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

## 1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) testten önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşina olmalı, ve; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

## 1.3. Örnek, Reaktif, Donanım

### İnceleme örneği

- $\beta$ -galaktozidaz enzim aktivitesi test edilmek istenen izolat – Laktoz içeren besiyerinde üremiş olması tercih edilir. KIA ve TSI agarda üreyen izolatlar bu testte optimum performansla test edilir.

### Besiyeri, Reaktif

- ONPG sıvı besiyeri – piyasadan hazır temin edilebilir veya tamponlanmış Peptonlu su besiyerine ONPG eklenerek hazırlanabilir (bkz. Ek-1).
- ONPG disk veya tablet – besiyerine alternatif olarak tercih edilebilir; piyasadan temin edilir ve üreticinin talimatı doğrultusunda kullanılır.

### Diğer gereç, donanım

- Öze, steril tek kullanımlık veya nikrom,
- Eküvyon, steril
- Vorteks

## 1.4. Kalite kontrol

- Her yeni besiyeri ve ONPG disk lotu kullanıma sokulmadan önce pozitif ve negatif kalite kontrol suşları ile test edilmelidir.
- Kullanmadan önce besiyeri tüpleri kontaminasyon ve renk değişikliği bakımından incelenir. Bulanık ve/veya renk değişimi görülen tüpler atılmalıdır.
- Kalite kontrol organizmaları (2):  
*Escherichia coli* ATCC 25922 - pozitif kontrol  
*Proteus mirabilis* ATCC 12453 - negatif kontrol

## 2 Testin uygulanması

- Test edilecek izolatın saf kültüründen (ör., KIA/TSI tüpündeki üremeden) öze ile alınır.
- ONPG içeren besiyeri tüpüne yoğun bir süspansiyon (McFarland No2) elde edecek şekilde inoküle edilir.
- Tüp 35-37°C'de 24 saate kadar inkübe edilir.
- Sarı renk oluşumu açısından 4. saatte ve 24 saate kadar değerlendirilir.



### 3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması

- **Pozitif sonuç** – Tüpteki sıvıda sarı renk (laktoz fermente eden bakteri)
- **Negatif sonuç** – Renksiz veya hafif sarı renk (laktozu fermente etmeyen bakteri)

### 4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Substrat (besiyeri) inokülasyon öncesi sarı renkteyse kullanılmamalıdır.
- Glikoz  $\beta$ -galaktozidaz aktivitesini inhibe ettiği için, glikoz içeren besiyerinde üreyen bakteriler laktoz içeren besiyerinde üreyenlere göre düşük reaktivite gösterir.
- Bu test, sarı pigment üreten organizmaların ayırımında kullanılamaz.
- Yanlış pozitif ve negatif sonuçları engellemek için ONPG solüsyonu uygun şekilde tamponlanmış olmalıdır.
- ONPG ışığa duyarlıdır, bu nedenle direkt ışıktan uzak tutulmalıdır.

## Ekler

### Ek-1 ONPG testi için besiyerinin hazırlanması

#### ONPG solüsyonunun hazırlanması

ONPG	0.15 g
Sodyum fosfat tamponu (0.01M, pH 7.5)	25 mL

ONPG sodyum fosfat tamponuna eklenir, karıştırılır. Solüsyon filtre ile steril edilir.

#### ONPG sıvı besiyeri\*

Peptonlu su (steril)	75 mL
ONPG solüsyonu	25 mL

ONPG solüsyonu aseptik olarak Peptonlu su ile karıştırılır. 2-3 mL'lik alikotlar halinde burgu kapaklı tüplere dağıtılır. Besiyerinin raf ömrü 2-8°C'de 30 gündür.

## İlgili diğer UMS belgeleri

Bu UMS belgesi (ONPG Testi) enterik bakterilerin tanımlanma şemasında yer alan diğer testlerle de ilgilidir ve daha detaylı bilgi için aşağıda listelenmiş bu belgelere başvurulabilir.

UMS, B-TP-11 KIA/TSI  
UMS, B-TP-06 IMViC testleri

## Kaynaklar

- 1 Weyant RS, Moss CW, Weaver RE et al. Identification of unusual pathogenic gram-negative aerobic and facultatively anaerobic bacteria. 2nd ed., Williams & Wilkins, Baltimore. 1995, p.16.
- 2 York MK, Traylor MM, Hardy J, Henry M. Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. ONPG (*o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranoside) Test. *In*: Garcia LS (editor in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 3rd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2010, p. 3.17.37.1 - 3.17.37.2
- 3 Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, Jr. (eds). The *Enterobacteriaceae*. Chapter 6. *In*: *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th ed., J.B. Lippincott Company, Philadelphia. 2006, p. 215.

\* Burada 100 mL besiyerinin hazırlanışı verilmiştir. Laboratuvar kendi tüketim hızına göre miktarı değiştirebilir.



T.C. Sağlık Bakanlığı

# ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

## Optokin Duyarlılığı Testi

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Test Prosedürleri
Standart No	B-TP-18
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

## İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	3
GENEL BİLGİ .....	3
TEKNİK BİLGİLER .....	3
1 Test için asgari laboratuvar koşulları .....	3
2 Testin uygulanması .....	4
3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması .....	5
4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	6
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	7
KAYNAKLAR.....	7

## Kapsam ve Amaç

Optokin, bir kinin derivativesidir. Pnömonokoklar optokine duyarlıdır ve optokinin çok düşük konsantrasyonlarında bile üreyemezler. Bu özellik tipik olup pnömonokokların viridans streptokoklardan ayırıcı tanısında kullanılır.

Bu UMS'de optokin testinin uygulanmasına ve doğru yorumlanmasına dair bir rehber sunulmaktadır.

## Kısaltmalar ve Tanımlar

**Optokin** Etil hidrokuprein hidroklorid (optochine)

## Genel Bilgi

*Streptococcus pneumoniae* dünyada, çocuklarda ve erişkinlerde pnömoni, menenjit, akut orta kulak iltihabı gibi alt ve üst solunum yolları enfeksiyonlarının en yaygın nedenlerinden biridir (1).

Öte yandan, *S. pneumoniae*, diğer streptokoklar gibi, normal insan solunum yolu florasında da yaygın olarak bulunur ve  $\alpha$ -hemoliz yapmış karakteristik bir koloni görünümüne sahip olsalar da koloni görünümü ile viridans streptokoklardan ayırt edilemeyebilirler (2).

*S. pneumoniae*'nin üremesi optokinin çok düşük miktarlarında ( $\leq 5\mu\text{g/mL}$ ) baskılanır. Optokin viridans grubu streptokokların üremesini de baskılayabilir, ancak bu çok yüksek konsantrasyonlarda gerçekleştiğinden, pratik olarak optokin duyarlılığı *S. pneumoniae* için neredeyse tek başına tanı koydurucu kabul edilmektedir.

Optokin duyarlılığı **optokin testi** ile saptanır. *S. pneumoniae*, agar plakta optokin emdirilmiş diskin etrafında sınırları belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmasına karşın viridans streptokoklarda böyle bir inhibisyon zonu gözlenmez (1,2,3).

## Teknik Bilgiler

### 1 Test için asgari laboratuvar koşulları

#### 1.1. Laboratuvar güvenliği

Bu UMS'de bahsi geçen organizmalar ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart önlemler uygulanmalı, önlemler risk değerlendirmesi ile de desteklenmelidir. Aerosol oluşturması muhtemel tüm laboratuvar çalışmaları bir biyolojik güvenlik kabininde gerçekleştirilmelidir (ayrıca bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

### 1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) testten önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşina olmalı, ve; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

### 1.3. Örnek, Reaktif, Donanım

#### Test mikroorganizmaları

- *S. pneumoniae* şüpheli izolatin taze kanlı agar kültürü (ortası çökmüş veya mukoid,  $\alpha$ -hemolitik koloni yapmış katalaz negatif, gram pozitif diplokok)

#### Besiyeri/Reaktif

- Kanlı agar plağı – bu testte **sadece** %5 **koyun kanlı** agar kullanılır!
- Optokin diskleri – piyasadan temin edilir ve her bir disk 5 $\mu$ g optokin içermelidir. Buzdolabında (2-8°C'de) saklanmalı, ışık, aşırı ısı ve nemden korunmalıdır. Raf ömrü disk kartuşu üzerinde yer almaktadır.

#### Diğer gereç, donanım

- Öze, steril tek kullanımlık veya nikrom,
- Eküvyon (alternatif ekim için)
- İnkübatör (CO<sub>2</sub> inkübatör veya mumlu jarda inkübasyon),
- Penset, steril

### 1.4. Kalite kontrol

- Her yeni reaktif serisi kullanıma sokulmadan önce ve kullanım sürecinde en az haftada bir, pozitif ve negatif kalite kontrol suşları ile test edilmelidir.
- Kontrol organizmaları (2):

*Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619,  $\geq 14$  mm inhibisyon zonu  
*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, zon yok

NOT 1: Eğer çapı 10 mm olan 5  $\mu$ g'lık disk kullanılıyorsa inhibisyon zon çapı  $\geq 16$  mm olmalıdır.

NOT 2: Zon çapı sonuçları kayıt altına alınmalı ve haftalık sonuçlar karşılaştırılmalıdır. Eğer zon çapı ölçümünde bir küçülme izleniyorsa o seri kullanılmamalıdır ve yeni bir seri kullanıma sokulmalıdır. Çünkü kullanımdaki disklerin son kullanma tarihinden önce bozulma ihtimali vardır.

## 2 Testin uygulanması

- İncelenecek tek düşmüş  $\alpha$ -hemolitik koloni öze yardımıyla alınır. Alternatif olarak, incelenecek bakterinin bulanıklığı 0.5 McFarland standardına uygun bir buyyon kültürü de kullanılabilir.

- Bir öze dolusu koloni veya buyyon kültürüne daldırılmış eküvyon kanlı agar plak yüzeyine en az 2 yönde sürülerek yoğun ekimi yapılır.  
NOT: Plak dörde bölünebilir ve her birine farklı bir izolatin ekimi yapılmak suretiyle birden fazla izolat aynı plakta test edilebilir.  
ÖNEMLİ: %5'lik koyun kanlı agar dışında bir besiyerinin kullanılması kesinlikle **önerilmez**; çünkü diğer besiyerleri daha küçük zon çapı oluşmasına ve tanıdan uzaklaşılmasına neden olabilir. Bununla birlikte, bilinen bir *S.pneumoniae* kökeninden antimikrobiyal duyarlılık testi yapılıyorken Mueller-Hinton kanlı agara optokin diski konulabilir; amaç inokulumun saflığını değerlendirmek olduğu için burada zon çapı ölçümünün fazla önemi yoktur.
- Steril bir penset kullanarak, inoküle edilmiş kanlı agar yüzeyine bir optokin diski yerleştirilir; diskin üzerine hafifçe penset ile bastırılır.
- Agar plağı 35-37°C'de, %5-10 CO<sub>2</sub>'li atmosferde, 18-24 saat inkübasyona kaldırılır.  
NOT: CO<sub>2</sub>'li inkübatör mevcut değilse mumlu jar kullanılabilir.
- İnkübasyon sonunda eğer inhibisyon zonu oluşmuş ise, zon çapı milimetre bölmeli bir cetvel ile ölçülür.

### 3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması

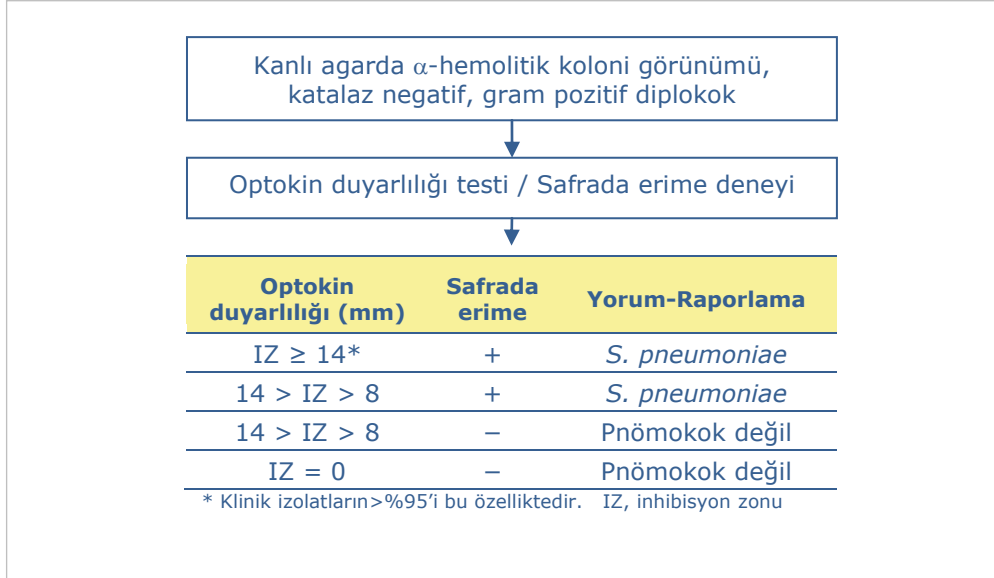
#### 3.1. Zon çaplarının yorumu

- **Duyarlı** – Diskin çevresinde çapı  $\geq 14$  mm (15-30 mm) olan bir inhibisyon alanı varsa incelenen izolat **optokine duyarlı** kabul edilir.  
NOT: Çapı 10 mm olan 5  $\mu\text{g}$ 'lık disk kullanılmışsa, diskin çevresinde  $\geq 16$  mm inhibisyon zonu olması halinde incelenen izolat optokine duyarlı kabul edilir.
- **Orta duyarlı** – Diskin çevresinde çapı  $< 14$  mm olan bir inhibisyon alanı varsa incelenen izolat **optokine orta duyarlı** kabul edilir.
- **Dirençli** – Diskin çevresinde zon yok ise incelenen izolat **optokine dirençli** kabul edilir.  
NOT: Zon içinde *S.pneumoniae*'ye ait koloniler olabilir; ancak bu fenomen zaman zaman *S.pneumoniae*'de gözlenebilen bir özelliktir (2).

#### 3.2. Raporlama (2,3)

- *S. pneumoniae* için optokin zon çapı ölçümleri dahil raporlama kriterleri Şekil-1'de özetlenmektedir.
- Bir  $\alpha$ -hemolitik, gram pozitif diplokok kolonisi katalaz negatif ise **ve**;
  - (a) **optokine duyarlı** bulunmuş ise *S. pneumoniae* olarak rapor edilir.
  - (b) **optokine orta duyarlı** bulunmuş ise, spot safrada erime testi yapılır; bu test pozitif bulunursa, *S. pneumoniae* olarak rapor edilir.
  - (c) **optokine dirençli** bulunmuş ise, *S. pneumoniae* değildir.

- Antimikrobiyal duyarlılık testinde kontaminasyonun belirlenmesi amacıyla kullanılan optokin diskinin etrafında  $\geq 10$  mm inhibisyon zonu çapı ölçümü kontaminasyon olmadığını gösterir.



**Şekil 1.** *S.pneumoniae*'nin tanımlanmasında karar ve raporlama için basit akış şeması (3 no.lu kaynaktan uyarlanmıştır).

## 4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- İnkübasyon CO<sub>2</sub> oranı yüksek atmosferde yapılmaz ise bazı izolatlar ya çok zayıf üreyebilir ya da üreyemez.
- Eğer izolat optokine dirençli ise çok büyük olasılıkla pnömokoktan başka bir  $\alpha$ -hemolitik streptokoktur. Ancak nadiren optokine dirençli *S.pneumoniae* suşları olabileceği hatırlanmalıdır.
- Optokin duyarlılığı *S.pneumoniae*'yi kapsüllü suşlarda %99 duyarlılık ve %98-99 özgüllük ile saptayan ideal bir testtir. Bununla birlikte bu oranların kapsülsüz kökenlerde hayli düşebileceği; %10-33'ünün optokine duyarlı, diğerlerinin ise orta duyarlı oldukları gösterilmiştir (4).
- İnhibisyon zonu içinde koloniler varsa bunlar pnömokok olabileceklerinden dolayı incelenmesi gerekir. Dolayısı ile sonucu rapor etmeden önce, böyle kolonilerin pasajından Gram boyama, katalaz testi ve safrada erime deneyleri yapılarak kontaminant ya da pnömokok olup olmadıkları belirlenmelidir.



## İlgili diğer UMS belgeleri

Bu UMS belgesi (Optokin Duyarlılığı Testi) pnömokok tanımlanma şemasında yer alan diğer testlerle de ilgilidir ve daha detaylı bilgi için aşağıda listelenmiş bu belgelere başvurulabilir.

UMS, B-TP-20 Safrada erime testi

UMS, B-MT-05 *Streptococcus pneumoniae* invaziv enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı

## Kaynaklar

- 1 Perilla MJ, Ajello G, Bopp C, Elliott J, Facklam R, Knapp JS, Popovic T, Wells J, Dowell SF. *Streptococcus pneumoniae*. In: *Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Pathogens of Public Health Importance in the Developing World*. Chapter V. CDC and WHO. 2003, p. 45-62
- 2 York MK, Traylor MM, Hardy J, Henry M. Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. Optochin Susceptibility Test. In: Garcia LS (ed in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 3rd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2010, p. 3.17.38.1 - 3.17.38.3
- 3 Popovic T, Ajello GW, Facklam RR. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, GA, USA. 1998.
- 4 Mundy LS, Janoff EN, Schwebke KE, Shanholtzer CJ, Willard KE. Ambiguity in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. Optochin, bile solubility, quellung, and the AccuProbe DNA probe tests. *Am J ClinPathol* 1998;109:55-61.



T.C. Sağlık Bakanlığı

# ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

## **PYR Testi** (L-Pirolidonil- $\beta$ -Naftilamid)

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Test Prosedürleri
Standart No	B-TP-19
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

## İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	3
GENEL BİLGİ .....	3
TEKNİK BİLGİLER .....	3
1 Test için asgari laboratuvar koşulları .....	3
2 Testin uygulanması .....	4
3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması .....	5
4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	5
KAYNAKLAR.....	6

## Kapsam ve Amaç

PYR testi başta bazı gram pozitif koklar olmak üzere pek çok bakterinin ayırıcı tanısı için yaygın kullanılan bir testtir. Bu UMS'nin amacı PYR testinin yapılışına ve yorumlanmasına dair bir rehber sunmaktır.

## Kısaltmalar ve Tanımlar

**Karsinojen** Kansere neden olabilen etken ya da madde, kanserojen

**PYR** L-pirolidonil- $\beta$ -naftilamid

**Substrat** Enzimin etki ettiği madde

## Genel Bilgi

Bazı bakteriler pirolidonil peptidaz enzimi üretirler ve bu enzimin saptanmasında PYR maddesi substrat olarak işlev görür. Peptidazın aktivitesine bağlı olarak substratın yıkılması ile  $\beta$ -naftilamid oluşur ki, bu ürün ortama %0.01'lik sinnalaldehit reaktifinin katılması ile kırmızı renk meydana getirir (1).

PYR maddesi potansiyel karsinojen olduğundan substratın laboratuvarda hazırlanması artık tercih edilmemektedir. Bugün artık yaygın bir şekilde PYR testi için piyasadan temin edilebilen kitler kullanılmaktadır; bu kitler substrat emdirilmiş PYR diskleri içerir. Sıvı substrat içeren bazı PYR kitleri de vardır; bunların stafilokokların tanısında daha uygun olduğu kabul edilmektedir (1).

PYR hidrolizi ilk *Streptococcus pyogenes* ve enterokokların tanımlanmasında yararlı bir test olarak kullanıma girmiştir. Bütün *S. pyogenes* ve enterokok izolatlarının %99'u PYR pozitifdir (2). Sonraları testin diğer bazı bakterilerin tanısında da yararlı olabileceği keşfedilmiştir; örneğin, *Escherichia coli*'nin diğer oksidaz negatif, indol pozitif, laktoz pozitif, gram negatif çomaklardan ayırımında da PYR testi yüksek bir doğruluk oranı ile kullanılmaktadır. Ayrıca, koagülaz negatif stafilokokların kendi aralarındaki ayırımında PYR önemli bir testtir (1,2).

## Teknik Bilgiler

### 1 Test için asgari laboratuvar koşulları

#### 1.1. Laboratuvar güvenliği

Bu UMS'de bahsi geçen tüm organizmalar ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart önlemler uygulanmalı, önlemler risk değerlendirmesi ile de desteklenmelidir. Aerosol oluşturması muhtemel tüm laboratuvar çalışmaları bir biyolojik güvenlik kabininde gerçekleştirilmelidir (ayrıca bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

## 1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) testten önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşina olmalı, ve; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

## 1.3. Örnek, Reaktif, Donanım

### Test mikroorganizmaları

- A grubu  $\beta$ -hemolitik streptokok şüpheli izolatlar
- Enterokok şüpheli izolatlar
- Koagülaz negatif stafilokoklar
- *E. coli* şüpheli izolatlar
- PYR testi gerekli görülen diğer herhangi bir laboratuvar izolatı

### Reaktifler

- PYR diskleri – PYR maddesi emdirilmiş diskler piyasadan temin edilir. Çok sayıda üretici vardır. Diskler karanlıkta, 2-8°C'de saklanır.
- Bazı kitler streptokokların tanımlanmasında PYR de dahil, çeşitli spot testleri bir arada yapma imkanı sağlar.
- Bazı kitler sıvı PYR reaktifi içerir. Bunlar stafilokokların tanımlanması için tercih edilmektedir.
- %0.01'lik *p*-dimetil amino sinnamaldehit

### Diğer gereç, donanım

- Öze, steril tek kullanımlık veya platin, ya da steril test çubukları
- Steril su
- Petri kabı
- Penset

## 1.4. Kalite kontrol

- Her yeni PYR kiti ve reaktifi kullanıma sokulmadan önce pozitif ve negatif kalite kontrol suşları ile test edilmelidir.
- Kontrol organizmaları (1):

*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 - PYR pozitif  
*Escherichia coli* ATCC 25923 - PYR negatif

## 2 Testin uygulanması

- Bir penset yardımı ile PYR diski Petri kabına konur. Steril su ile hafif nemlendirilir. Aşırı ıslatılmamalıdır!
- Steril çubuk veya öze kullanılarak, bakterinin kanlı agar plağındaki 24-48 saatlik üremesinden bir-iki öze dolusu kadar alınır (eski kültürler kullanılıyorsa daha fazla bakteri alınmalıdır!).

- İnokulum PYR diski üzerine ezerek sürülür. 2 dk kadar beklenir.  
NOT: Bu süre bakterinin PYR diskindeki madde ile reaksiyona girmesi içindir. Süre yavaş üreme özelliğindeki bakteriler için 10 dakikaya kadar uzatılabilir.
- Süre sonunda 1 damla sinnamealdehit reaktifi damlatılır ve kırmızı renk oluşup oluşmadığı izlenir.

### 3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması

#### 3.1. Testin yorumu

- **Pozitif sonuç** – Parlak pembe veya kiraz kırmızısı renk oluşması
- **Negatif sonuç** – Renk değişikliği olmaması veya pozitif indol reaksiyonuna bağlı mavi renk oluşumu.  
NOT: Soluk pembe (zayıf) reaksiyon negatif olarak değerlendirilir.

#### 3.2. Raporlama

- Boğaz kültürlerinden tipik grup A morfolojisinde  $\beta$ -hemolitik, katalaz negatif, gram pozitif kok kolonileri – PYR pozitif ise *S. pyogenes* olarak tanımlanır.
- (a) Solunum yolu kökenli  $\beta$ -hemolitik streptokoklarda negatif PYR testi, inokulumun az gelmiş olması ihtimali nedeniyle taze pasajlarından tekrarlanmalıdır ya da ileri incelemelerle teyit edilmelidir.
- (b) Solunum yolu harici izolatlarda pozitif PYR testi, negatif safraskülin, negatif eskülin veya grup A antijenler için serolojik tiplendirme ile teyit edilmelidir.
- Tipik enterokok koloni morfolojisi ile katalaz negatif, gram pozitif koklar (kısa zincirler yapmış veya diplokoklar şeklinde; fakat tetratlar veya kümeler halinde değil) PYR pozitif ise *Enterococcus* olarak tanımlanır.
- PYR pozitif, koagülaz negatif stafilokok *Staphylococcus lugdunensis* olarak tanımlanır. Konfirmasyon için ornitin ve diğer testler kullanılır.
- Oksidaz negatif, indol pozitif, laktoz pozitif ve gram negatif çomak bakteri kolonileri, eğer PYR negatif ise *E. coli* olarak tanımlanır.
- $H_2S$  pozitifliği nedeniyle *Salmonella* ile *Citrobacter* arasında ayırıcı tanı gerektiğinde PYR testi yardımcıdır; *Citrobacter* PYR pozitif iken *Salmonella* PYR negatiftir.

### 4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Eğer inokulum seçici besiyerlerinden veya bir biyokimyasal test tüp-  
agardan alınmış ise yanlış negatif sonuç elde edilebilir.
- Eğer disk fazla ıslatılmış ise yanlış negatif sonuç elde edilebilir.

- *Staphylococcus aureus*'a disk testi uygulandığında soluk renk değişimi gözlenebilir. Böyle durumlarda başka testlerle doğrulama yapılmalı veya PYR testi tüpte uygulanmalıdır.
- Enterokoklar harici nadir bazı gram pozitif koklar da PYR pozitif olabilirler. Böyle durumlarda ayırıcı tanı için Gram boyama kullanışlı bir yoldur; genellikle tetratlar veya kümeler halinde görünürler. Kolonileri çok küçüktür ve kayda değer patojenler değildirler.

## Kaynaklar

- 1 York MK, Traylor MM, Hardy J, Henry M. Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. PYR (L-Pyrrolidonyl- $\beta$ -Naphthylamide) Test. *In: Garcia LS (editor in chief). Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 3rd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2010, p. 3.17.41.1 - 3.17.41.3
- 2 McPherson RA, Pincus MR (eds). Medically Important Bacteria: Gram-positive cocci. *In: Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 22nd ed., Elsevier Inc., Philadelphia, PA. 2011, p. 1082-7

# ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

## Safrada Erime Testi

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Test Prosedürleri
Standart No	B-TP-20
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik



## İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
GENEL BİLGİ .....	3
TEKNİK BİLGİLER .....	3
1 Test için asgari laboratuvar koşulları .....	3
2 Testin uygulanması .....	4
3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması .....	5
4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	6
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	8
KAYNAKLAR.....	8

## Kapsam ve Amaç

Safrada erime testi, *Streptococcus pneumoniae* tanısında kullanılan tamamlayıcı bir testtir ve kesin tanı konmasını destekler. Bu UMS'nin amacı safrada erime testinin yapılışına ve yorumlanmasına dair bir rehber sunmaktır.

## Genel Bilgi

Alfa hemoliz yapmış karakteristik bir koloni görünümü olsa da *S. pneumoniae* bu özelliği ile diğer  $\alpha$ -hemolitik viridans streptokoklardan ayırt edilemez. Safrada erime *S. pneumoniae*'nin ayırıcı tanısı için önemli bir özelliktir ve **safrada erime testi** ile saptanır.

Test, belirli bir süre, uygun sıcaklıkta safra tuzlarına (sodyum deoksikolat) maruz bırakılan kolonilerde erime görülmesi esasına dayanır. Bu testten diğer streptokoklar etkilenmezken, pnömokokların eridiği gözlenir (1,2). Safra tuzlarının pnömokok hücrelerinde bulunan otolitik enzimleri (amidaz) aktive ettiği, böylece hücrelerin lizisini tetiklediği düşünülmektedir.

Safrada erime testi tüpte yapılabileceği gibi, lam üzerindeki hücre süspansiyonuna ya da doğrudan plaktaki koloninin üzerine reaktifin eklenmesi ile de uygulanabilir.

Test,  $\alpha$ -hemolitik streptokokların ayırıcı tanısında, özellikle optokine orta duyarlı (çapı 5-mm olan disk ile inhibisyon zon çapı 8-13 mm; çapı 10-mm olan disk ile zon çapı <16 mm ölçülmüş) izolatların *S. pneumoniae* olup olmadıklarının teyit edilmelerinde çok kullanışlıdır (1,2,3).

## Teknik Bilgiler

### 1 Test için asgari laboratuvar koşulları

#### 1.1. Laboratuvar güvenliği

Bu UMS'de bahsi geçen organizmalar ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart önlemler uygulanmalı, önlemler risk değerlendirmesi ile de desteklenmelidir. Aerosol oluşturması muhtemel tüm laboratuvar çalışmaları bir biyolojik güvenlik kabininde gerçekleştirilmelidir (ayrıca bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

#### 1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) testten önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşina olmalı, ve; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

### 1.3. Örnek, Reaktif, Donanım

#### İnceleme örneği

- *S. pneumoniae* şüpheli izolatın taze kanlı-agar kültürü (ortası çökmüş veya mukoid koloni,  $\alpha$ -hemolitik, katalaz negatif, gram pozitif diplokok)  
NOT: Daha önce optokin testi yapılmış ise optokin test plağındaki üremeden alınarak test için hücre süspansiyonu hazırlanabilir (1).
- Lanset şeklinde gram pozitif diplokoklar görülmüş pozitif kan kültürü

#### Reaktifler (1)

- SF, steril (%0.85'lik sodyum klorür) (pH 7.0)
- Safra tuzu reaktifleri (%2'lik tüp testi için; %10'luk direkt plak testi için) piyasadan hazır temin edilebilir. Laboratuvarda hazırlamak için:
  - (a) %2'lik safra tuzu çözeltisi: 0.2 g sodyum deoksikolat 10 mL SF içinde eritilir. Etiketlenir, 15-30°C'de saklanır. Daha düşük sıcaklıkta koyulaşabilir. Raf ömrü 9 aydır.
  - (b) %10'luk safra tuzu çözeltisi: 1 g sodyum deoksikolat 10 mL SF içinde eritilir. Saklama koşulları %2'lik çözeltisindeki gibidir.

#### Diğer gereç, donanım

- Öze, steril tek kullanımlık veya nikrom,
- Test tüpleri,
- Pastör pipeti veya damlalık
- Lam (direkt lam testi yapılacaksa)
- Gram boya veya metilen mavisi boya (direkt lam testi yapılacaksa)
- Vorteks
- İnkübatör (35°C)

### 1.4. Kalite kontrol

- Her yeni reaktif lotu kullanıma sokulmadan önce pozitif ve negatif kalite kontrol suşları ile test edilmelidir.
- Safra çözeltisi eğer berrak ve çok açık sarı renkte değilse kullanılmaz!
- Kalite kontrol organizmaları (2):  
*Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, pozitif (safrada erir)  
*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, negatif (safrada erimez)

## 2 Testin uygulanması

### 2.1. Tüp testi

- Bir tüpe 0.5 mL steril SF konur. İncelenecek organizmadan bir öze ile alınarak yeterince koyu (McFarland No 1) bir süspansiyon hazırlanır. Homojen bir süspansiyon elde etmek için çalkalanır veya vortekslenir.
- İki temiz tüp alınır; birinin üzerine "test", diğerinin üzerine "kontrol" yazılır. Her bir tüpe 0.25 mL bakteri süspansiyonu konur.

- **Test tüpüne** 5 damla %2'lik safra çözeltisi, **kontrol tüpüne** 5 damla SF eklenir. Tüpler hafifçe karıştırılır.
- Tüpler 35°C'de 2 saat kadar inkübe edilir. 15-20 dakikada bir, safra tuzları içeren tüpteki bulanıklık kontrol edilir. Berraklaşma ya da bulanıklığın kaybolması erimenin olduğunu gösterir (pozitif sonuç).

## 2.2. Direkt plak testi (Spot test)

- Safrada erime testi tüp yerine plakta da yapılabilir. Bunun için incelenen organizmanın %5 koyun kanlı agar plağında 18-24 saatlik taze pasajı kullanılır.
- Bir damla %10'luk safra solüsyonu besiyeri plağındaki kuşkulu kolonilerin üzerine damlatılır. Kolonilerin yerinden oynatılmamasına dikkat edilmelidir.  
NOT: Damlatılırken, damlalığın ucu agara değdirilmemelidir!
- Agar-yüzü yukarı bakacak şekilde plak, 35°C normal atmosferde 15-30 dk veya damla kuruyuncaya dek bekletilir.
- Plak erime bulgusu açısından incelenir.

## 2.3. Direkt lam testi (kan kültüründeki şüpheli üremeden)

- Bir test, bir de kontrol lamı hazırlanır.
- **Test lamına** şüpheli üremenin olduğu kan kültüründen 1 damla damlatılır. Üzerine 1 damla %10'luk safra reaktifi eklenir. Kurumaya bırakılır.
- **Kontrol lamına** 1 damla şüpheli üremenin olduğu kan kültüründen damlatılır. Üzerine 1 damla SF eklenir. Kurumaya bırakılır.
- Her iki lam da Gram veya metilen mavisi ile boyanır ve kokların varlığı yönünden incelenir.

# 3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması

## 3.1. Tüp testi

- **Test tüpünde** – 2 saatlik inkübasyon süresi sonunda kontrol tüpüne göre, bulanıklığının kaybolması (berraklaşma) safrada erime bulgusudur (safrada erime pozitif) (*bkz.* Şekil 1).
- **Kontrol tüpünde** – 2 saat inkübasyon sonunda bulanıklığın devam etmesi

## 3.2. Direkt plak testi (Spot test)

- 30 dk içinde plaktaki kolonilerin düzleşmiş veya zeminde  $\alpha$ -hemolitik alan bırakarak kaybolmuş olması – safrada erime pozitif.
- Koloni bütünlüğünün değişmemiş olması – safrada erime negatif.

### 3.3. Direkt lam testi (kan kültüründeki şüpheli üremeden)

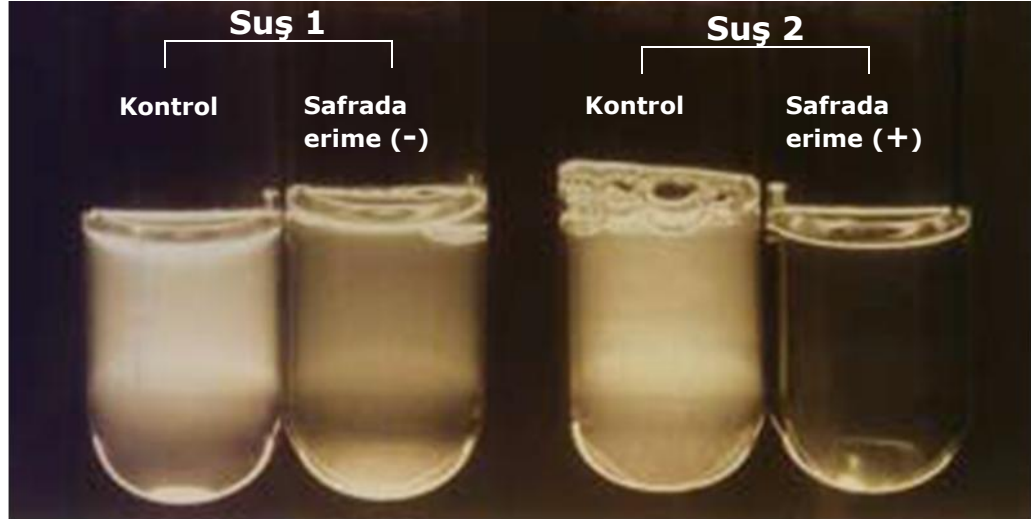
- Mikroskopik incelemede kontrol lamında diplokoklar gözlenirken test lamında organizmanın görülmemesi - safrada erime testi pozitif

### 3.4. Raporlama (2,3)

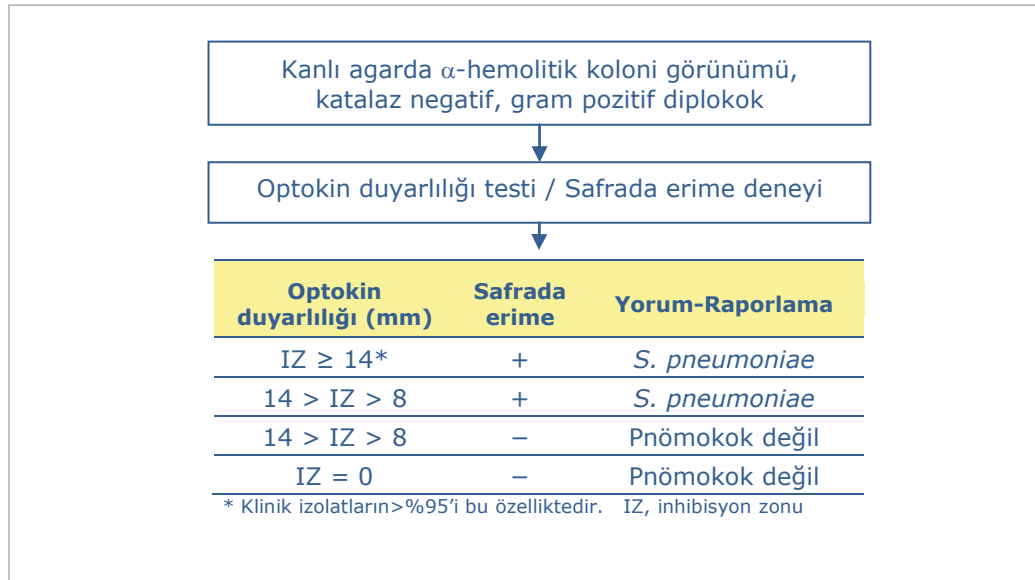
- *S. pneumoniae* için raporlama kriterleri Şekil-2'de özetlenmiştir.
- Eğer bir  $\alpha$ -hemolitik, gram pozitif diplokok kolonisi katalaz negatif ise **ve** tüp test veya spot test ile safrada erime bulgusu pozitif ise kesinlikle *S. pneumoniae* olarak rapor edilir.
- Eğer organizma için safrada erime bulgusu negatif ise muhtemelen viridans streptokoktur. Ancak küçük bir yüzde ile safra-dirençli *S. pneumoniae* olabilir. Eğer koloniler tipik ise (halen pnömokok olabileceği düşünülüyorsa) ileri inceleme yapılmalıdır.

## 4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Safrada erime deneyi **sadece** *S. pneumoniae*'yi diğer  $\alpha$ -hemolitik streptokoklardan ayırt etmek için kullanılır.
- Safra tuzlarının yüksek konsantrasyonunda *S. pneumoniae*'nin normal otolizisi inhibe olabilir. Özellikle spot testte safra tuzu reaktifi buharlaşmış kurduğunda konsantrasyonu yükseldiği için sonuca etki edebilir.
- Eski kültürlerin kendiliğinden erime olasılığı söz konusu olduğundan safrada erime deneyinde eski kültürler kullanılmamalıdır.
- Yanlış negatif sonuç olasılığından kaçınmak için tüp testi yaparken kullanılan serum fizyolojinin pH'ı 7.0'ye ayarlanmış olmalıdır.
- Spot (direkt plak) test yapılırken koloninin yer değiştirmesi olasılığına karşı dikkatli olunmalıdır; hatalı bir şekilde pozitif olarak yorumlanabilir. Plakın değerlendirilmesinde güçlük yaşıyorsa test, tüp testi veya lam testi ile tekrarlanmalıdır.
- Safra reaktifi soğukta saklandığında kalınlaşır. Böyle bir durumda, reaktif şişesi 37°C'de bekletilmeli, sıvılaşmasını sağlandıktan sonra kullanılmalıdır.
- Bazı *S. pneumoniae* izolatları safra varlığında erimezler. Bunun virülans faktörünün (veya kapsülün) kaybına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Diğer bir ifade ile erime gözlenmediği halde izolat *S. pneumoniae* olabilir. Böyle bir durumda halen izolatın pnömokok olabileceği düşünülüyorsa, başka bir test ile (DNA probu vb.) bakteri identifiye edilmelidir (4).
- Çeşitli tanımlama yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada tüp testin duyarlılığı %96, spot testin duyarlılığı ise %99.4 bulunmuştur. Daha ileri bir duyarlılık için spot veya tüp test negatif kökenlere DNA prob (veya henüz yapılmamış ise önce optokin disk testi) uygulanması önerilir (4).



**Şekil 1.** *S. pneumoniae* tanımlamasında safrada erime için tüp testi. Resimde iki farklı bakteri suşu için testin sonuçları görülmektedir. Suş 1’de hem de kontrol tüpünde bulanıklık görülmektedir; suş *S. pneumoniae* değildir. Suş 2 test tüpünde (en sağdaki tüp) bulanıklık tümü ile kaybolmuş gözükmemektedir; bu durum bakteri hücreleri erimiş olmasının bir sonucudur; tanı *S. pneumoniae*’dir (3 no.lu kaynaktan uyarlanmıştır).



**Şekil 2.** *S.pneumoniae*’nin tanımlanmasında karar ve raporlama için basit akış şeması (3 no.lu kaynaktan uyarlanmıştır).

## İlgili diğer UMS belgeleri

Bu UMS belgesi (Safrada Erime Testi) pnömokok tanımlanma şemasında yer alan diğer testlerle de ilgilidir ve daha detaylı bilgi için aşağıda listelenmiş bu belgelere başvurulabilir.

UMS, B-TP-18 Optokin duyarlılığı testi

UMS, B-MT-05 *Streptococcus pneumoniae* invaziv enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı

## Kaynaklar

- 1 Perilla MJ, Ajello G, Bopp C, Elliott J, Facklam R, Knapp JS, Popovic T, Wells J, Dowell SF. *Streptococcus pneumoniae*. In: *Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Pathogens of Public Health Importance in the Developing World*. Chapter V. CDC, and WHO, 2003, p. 45-62
- 2 York MK, Traylor MM, Hardy J, Henry M. Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. Bile Solubility Test. In: Garcia LS (editor in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 3rd ed. update, ASM, Washington D.C. 2010, p. 3.17.6.1 - 3.17.6.3
- 3 Popovic T, Ajello GW, Facklam RR. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA. 1998.
- 4 Mundy LS, Janoff EN, Schwebke KE, Shanholtzer CJ, Willard KE. Ambiguity in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. Optochin, bile solubility, quellung, and the AccuProbe DNA probe tests. *Am J ClinPathol* 1998;109:55-61.



T.C. Sağlık Bakanlığı

# ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

## Tuz Tolerans Testi %6.5'luk Sodyum Klorürde Üreme

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Test Prosedürleri
Standart No	B-TP-21
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik



## İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	3
GENEL BİLGİ .....	3
TEKNİK BİLGİLER .....	4
1 Test için asgari laboratuvar koşulları .....	4
2 Testin uygulanması .....	5
3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması .....	5
4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	5
EKLER.....	6
Ek-1 %6.5 NaCl buyyon (Tuz Tolerans Besiyeri) hazırlanması <sup>2</sup>	6
KAYNAKLAR .....	6

## Kapsam ve Amaç

Organizmaların sodyum klorürün (NaCl) değişik konsantrasyonlarında üreyebilme yetenekleri pek çok bakterinin (enterokoklar, halofilik vibriolar vb.) tanımlanmasında kullanılan bir özelliktir.

Gram pozitif, katalaz negatif kokların tanımlanmasında da %6.5 tuz içeren ortamda üreme özelliğinden yararlanır ve bu onların ayırıcı tanısında önemli parametrelerden biridir.

Bu UMS'de enterokokların tanımlanmasında tuz toleransı testinin uygulanması ve yorumlanması ile ilgili prosedür verilmektedir. Prosedür diğer organizmaların test edilmesinde kullanılan besiyeri ve tuz oranlarını kapsamaz; bununla birlikte, besleyici buyyonun ve içindeki tuz konsantrasyonunun amaca uygun olarak değiştirilmesi ile diğerlerine de uyarlanabilir.

## Kısaltmalar ve Tanımlar

<b>Halofilik</b>	Tuzu seven (organizma)
<b>NaCl</b>	Sodyum klorür
<b>PYR</b>	L-pirolidonil- $\beta$ -naftilamid

## Genel Bilgi

Enterokokları diğer streptokoklardan ayıran önemli özelliklerden biri de %6.5NaCl içeren ortamda üreme özelliğidir ve PYR testinin alternatifi olarak kullanılabilir.

Bu özelliğin test edilmesinde kullanılan tuz tolerans besiyeri kalp infüzyonu, glikoz ve %6.5 NaCl içerir; indikatör olarak da bromkrezol moru bulunur. Konsantrasyonu hayli yüksek olan tuz, besiyerinde seçici etken olarak işlev görmektedir; çoğu bakterinin ozmotik dengesini ve membran geçirgenliğini olumsuz yönde etkiler ve bu bakteriler canlılıklarını sürdüremezler. Buna karşın tuza toleranslı organizmalar 48 saatte rahatlıkla ürerler.

Bulanıklık bir üreme göstergesi olsa da "pozitif tuz tolerans testi" daha ziyade glikozun organizma tarafından kullanılması sonucu oluşan asit yıkım ürünlerinin indikatör ile etkileşerek ortam rengini sarıya çevirmesi ile tanımlanır (1).

Pek çok laboratuvarında tuz tolerans testi, eskülin testi ile birlikte enterokokların, grup D streptokok türleri olan *Streptococcus bovis* ve *Streptococcus equinus*'dan ayırt edilmesinde kullanılmaktadır (2).

# Teknik Bilgiler

## 1 Test için asgari laboratuvar koşulları

### 1.1. Laboratuvar güvenliği

Bu UMS'de bahsi geçen organizmalar ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart önlemler uygulanmalı, önlemler risk değerlendirmesi ile desteklenmelidir. Aerosol oluşturması muhtemel tüm laboratuvar çalışmaları bir biyolojik güvenlik kabininde gerçekleştirilmelidir (ayrıca bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

### 1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) testten önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşına olmalı, ve; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

### 1.3. Örnek, Reaktif, Donanım

#### Test mikroorganizmaları

- Ayırıcı tanısı için tuz toleransı testine gereksinim duyulan şüpheli izolatların taze kültürleri (agar plakta veya buyyonda).

#### Besiyeri

- %6.5 NaCl buyyon (tuz tolerans buyyon) – Ticari olarak piyasadan hazır temin edilebilir. Laboratuvarda hazırlanabilir (bkz. Ek-1).
- %6.5 NaCl yatık agar besiyeri – indikatörün renk değişiminin gözlenmesi daha kolay olabilir (bkz. Ek-1).

#### Diğer gereç, donanım

- Öze, steril tek kullanımlık veya nikrom,
- Test tüpleri,
- İnkübatör (35°C)

### 1.4. Kalite kontrol

- Her yeni besiyeri serisi kullanıma sokulmadan önce pozitif ve negatif kalite kontrol suşları ile test edilmelidir.
- Her kullanımdan önce besiyeri bulanıklık ve renk değişimi yönünden kontrol edilmelidir.
- Kalite kontrol organizmaları (1):  
*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 – tuzlu besiyerinde ürer (pozitif)  
*Streptococcus bovis* ATCC 33317 – üremez (negatif)

## 2 Testin uygulanması

- %6.5 NaCl buyyon içeren tüpe öze ile taze kültür plağından tek düşmüş bir-iki koloni ya da steril Pastör pipeti ile bir gecelik buyyon kültüründen bir-iki damla inoküle edilir.  
NOT: İnokülasyon %6.5 NaCl içeren yatık agar besiyerine de yapılabilir.
- Tüpün kapağı sıkıştırılır.
- Aerobik olarak 35°C'de bir gece inkübe edilir ve üreme bulguları (bulanıklık ve renk değişimi) değerlendirilir. İnübasyon 14. güne kadar uzatılabilir.

## 3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması

- **Pozitif sonuç** – Belirgin bir bulanıklık ve/veya renk değişimi (menekşe renginden sarıya) olması. Genellikle 24 saat içinde gözlenir; ancak testin inkübasyon süresi gerekiyorsa 14. güne kadar uzatılır (1).
- **Negatif sonuç** – herhangi bir bulanıklık veya sarı renk gelişmemesi.  
NOT: Eğer eskülin pozitif ve %6.5 NaCl buyyonda üremiş ise organizma bir *Enterococcus* türüdür. Eğer organizma eskülin pozitif ancak %6.5 NaCl buyyonda ürememiş ise bir grup D streptokoktur.

## 4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Eğer buyyona yoğun bir ekim yapılmış ise inokulumun kendisi üreme sanılabilir ve hatalı bir şekilde pozitif olarak yorumlanabilir.
- İnübasyon sırasında üreme dibe çökmüş olabilir; testin yanlış negatif yorumlanmasını önlemek için değerlendirme öncesi tüp hafifçe çalkalanır.
- Bazı grup B streptokoklar (hatta izolatların %80 kadarı) ve grup A streptokoklar tuza-toleranslı olabilirler. Bazı aerokok türleri de hem eskülin pozitif olabilir hem de %6.5 NaCl'de üreyebilirler.
- Test için yatık agar kullanılması -renk değişimi erken dönemde ve özellikle yatık kısmın tepesinde başlayacağı için- zayıf reaksiyonların gözlenmesinde kolaylık sağlar.

## Ekler

### Ek-1 %6.5 NaCl buyyon (Tuz Tolerans Besiyeri) hazırlanması<sup>2</sup>

#### İndikatör (%1.6'lık Bromkrezol moru)

Brom krezol moru	1.6 g
Etanol, %95'lik	100 mL

Karıştırılıp eritilir. Koyu renkli şişede oda sıcaklığında saklanır. Raf ömrü 1 yıldır.

#### %6.5'luk NaCl buyyon

Besiyerinin temel besleyici maddesi kalp infüzyonu olup normal olarak %0.5 NaCl içerir. Bu nedenle %6.5'luk NaCl buyyon hazırlanırken tuz konsantrasyonunu artırmak için litreye 60 g hesabı ile tuz eklenir.

100 mL besiyeri için şu örnek kullanılabilir:

Kalp infüzyon buyyonu	2.5 g
Sodyum klorür	6 g
İndikatör (%1.6'lık bromkrezol moru)	0.1 mL
Glikoz	0.5 g
Distile/deiyonize su	100 mL

1. Maddeler su içinde karıştırılarak eritilir.

NOT: Eğer besiyeri *yatık agar* olarak hazırlanmak isteniyorsa 100 mL besiyeri için 1.5 g agar eklenir ve kaynar su banyosunda eritilir.

2. Burgu kapaklı tüplere 3-5 mL alikotlar halinde dağıtılır. 121°C'de 15 dakika otoklavlanır.

NOT: Agar katılmış ise tüpler otoklav sonrasında yatık halde dondurulur.

3. Raf ömrü 6 aydır. Tüplerin üzeri besiyerinin adı, hazırlama ve son kullanma tarihleri yazılarak etiketlenir, buzdolabında (2-8°C) saklanır.

## Kaynaklar

1 York MK, Traylor MM, Hardy J, Henry M. Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria: 6.5% salt and temperature tolerance test. *In: Garcia LS (editor in chief). Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 3.17.43.1 - 3

2 Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, Jr. (eds). The Gram-positive cocci Part II: Streptococci and *Streptococcus*-like bacteria. Chart 11-4: Salt tolerance test. *In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 4th ed., J.B. Lippincott Company, Philadelphia. 1992, p. 460.



T.C. Sağlık Bakanlığı

# ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

## Üreaz Testi

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Test Prosedürleri
Standart No	B-TP-22
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

## İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
GENEL BİLGİ .....	3
TEKNİK BİLGİLER .....	3
1 Test için asgari laboratuvar koşulları .....	3
2 Testin uygulanması .....	5
3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması .....	5
4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	5
EKLER.....	7
Ek-1 Üre besiyerlerinin hazırlanması <sup>1,5</sup> .....	7
KAYNAKLAR .....	8

## Kapsam ve Amaç

Üreaz testi mikroorganizmaların üreyi hidroliz etme yeteneğinin test edilmesi amacıyla kullanılır. Üreaz testi özellikle *Enterobacteriaceae* üyelerinin tanımlanmasında IMViC test paketini tamamlayıcıdır. Ayrıca diğer birçok bakteri ve mantar türünün tanımlanmasında da üreaz testi kullanılır. Bu UMS'de de rutin laboratuvarlarda üreaz testinin uygulanması ve yorumlanmasına dair bir rehber sunulması hedeflenmiştir. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu tanısı için gastrik biyopsi örneklerine uygulanan üreaz testi bu UMS'nin kapsamında değildir.

## Genel Bilgi

Pek çok organizma sahip oldukları üreaz enzimlerinin aktivitesi ile üreyi kullanma yeteneğine sahiptirler. Üreaz enzimi ürenin amonyak ve karbondioksite yıkılmasını sağlar; amonyak bir ile reaksiyon ile amonyum karbonata dönüşür ve ortam pH'ı alkali olur. Alkali ürünler, pH indikatörü fenol kırmızısının varlığında ortam renginin sarıdan pembe-kırmızıya dönüşmesi ile saptanır (1,2).

Bu yetenek üreaz pozitif türlerin diğerlerinden ayırt edilmesinde, özellikle *Enterobacteriaceae* ailesi içinde, çok kullanışlıdır. *Proteus*'lar ve bazı *Enterobacter*, *Citrobacter* ve *Klebsiella* türleri üreaz pozitiflerdir. Üreaz negatif olan *Salmonella* ve *Shigella* türleri de çoğu üreaz pozitif olan *Yersinia* türlerinden üreaz testi ile ayırt edilirler (1,3).

Üreaz aktivitesinin gösterilmesi ayrıca üreaz negatif olan *Corynebacterium diphtheriae*'nin bazı üreaz pozitif patojen türlerden (*Corynebacterium ulcerans* ve *Corynebacterium pseudotuberculosis*) ayırımında önemlidir. Üreaz testi *Brucella* türlerinin, *Helicobacter pylori*'nin ve *Cryptococcus*, *Trichosporon* gibi pek çok maya cinsinin tanımlanmasında da kullanışlı bir araçtır (1,4).

Test için kullanılan **üre besiyeri** üre ve fenol kırmızısı içerir. Fenol kırmızısı pH indikatörüdür ve pH>8.4 ise besiyeri pembe-kırmızı, pH<6.8 ise sarı-açık turuncu görünür. Besiyeri protein içermez ya da çok az içerir. Bu da üre dışında protein deaminasyonuna bağlı pH yükselmesini ve yanlış pozitifliği önler (1,5).

## Teknik Bilgiler

### 1 Test için asgari laboratuvar koşulları

#### 1.1. Laboratuvar güvenliği

Bu UMS'de bahsi geçen organizmalar ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart önlemler uygulanmalı, önlemler risk değerlendirmesi ile de desteklenmelidir. Aerosol oluşturması muhtemel tüm laboratuvar çalışmaları bir biyolojik güvenlik kabininde gerçekleştirilmelidir (ayrıca bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").



### 1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) testten önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşına olmalı, ve;(iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

### 1.3. Örnek, Reaktif, Donanım

#### 1.3.1. Test mikroorganizmaları

- Dışkı kültürlerinden enterik patojen şüpheli izolatlar - enterik patojenlerin tanımlanması amacıyla her şüpheli gram negatif çomak bakteriye KIA/TSI pasajını takiben IMViC test paketi ile birlikte üreaz testi de uygulanır.
- Güç üreyen gram negatif çomaklar (*Brucella spp*, *H. pylori*, ve *Pasteurella spp* şüpheli izolatlar)
- Gram pozitif çomaklar (*Corynebacterium spp* ve *Rhodococcus spp* şüpheli izolatlar) – özellikle difteri şüphesinde klinik örneklerden izole edilmiş *Corynebacterium* izolatlarının üreaz pozitif patojen kökenlerden biri olup olmadığının ayrımı için
- Mayalar (*Cryptococcus spp*, *Trichosporon spp*, *Candida spp* izolatları)

#### 1.3.2. Üre besiyerleri

Besiyerleri piyasadan hazır temin edilebileceği gibi laboratuvar da hazırlanabilir. Üre besiyeri olarak aşağıdakilerden biri kullanılır:

- Christensen'in üre agarı – Üre, pepton, dekstroz, tampon madde, fenol kırmızısı ve agar içerir. Yatık agar şeklinde tüplerde hazırlanır. İçeriği güç üreyen pek çok bakterinin üremesini destekler. Laboratuvar da hazırlamak için bkz. Ek-1.  
ÖNEMLİ: Besiyerine katılacak üre çözeltisi otoklavlanmaz! Filtrasyon ile steril edildikten sonra otoklavlanmış agar baza eklenir. Piyasada, agar baza eklemek üzere hazır 10 kat yoğun (10×) üre çözeltileri mevcuttur.
- Christensen'in üre buyyonu – Sıvı besiyeri olarak hazırlanır (bkz. Ek-1)
- Hızlı üre besiyeri – Piyasadan hazır temin edilir. Agar ve buyyon formları vardır. Üretici firmanın talimatı doğrultusunda kullanılır. Hızlı üre testi laboratuvar da izole edilmiş organizmalardan başka gastrik biyopsi örneklerinin incelenmesinde de tercih edilir.
- Üre diskleri veya tabletleri – uygulama kolaylığı nedeniyle tercih edilebilirler. Üretici firmanın talimatına göre kullanılırlar.

#### 1.3.3. Diğer materyal

- Bakteriyolojik öze, tek kullanımlık veya nikrom
- Cam tüpler, burgu kapaklı, 12×75 mm
- Filtre, enjektör tipi, selüloz asetat veya naylon, por çapı 0.22µm
- Enjektör, 50 mL'lik, filtre ile sterilizasyon için
- İnkübatör, 35-37°C

## 1.4. Kalite kontrol

- Her yeni besiyeri lotu kullanıma sokulmadan önce kalite kontrol suşları ile test edilmelidir. Lotlar arasında haftada bir; laboratuvar testi daha uzun aralıklarla yapıyorsa her testte kalite kontrol yapılmalıdır.
- Saklamaya kaldırmadan önce tüpler incelenmeli; agar bazlı olanlarda hava kabarcığı, yarık vb. gözleniyorsa o tüpler atılmalıdır.
- Her kullanım öncesi besiyeri tüpleri kontaminasyon, donma, kuruma, renk değişimi vb. yönünden incelenmeli; sorun gözlenen tüpler atılmalıdır.
- Kalite kontrol organizmaları:

*Escherichia coli* ATCC 25922 – negatif (renk değişikliği yok)

*Proteus mirabilis* ATCC 12453 – pozitif (koyu pembe-kırmızı)

## 2 Testin uygulanması

- Steril öze kullanılarak, tek düşmüş koloniden (ya da enterik patojen söz konusu ise - bakterinin KIA/TSI agar pasajının 4-6 saatlik kültüründen) hafif bir inokulum alınır.
- Üre agarın yatık yüzeyine sürülerek ekim yapılır. Üre buyyon kullanılıyorsa öze ile inokulum buyyon içinde homojenize edilir.  
ÖNEMLİ: Besiyerleri burgu kapaklı tüplerde hazırlanmış olmalıdır. Pamuk tıkaçlı tüpler laboratuvar güvenliği kuralları gereği kullanılmaz!
- Kapak gevşek olacak şekilde aerobik şartlarda 35-37°C'de inkübe edilir. Nonfermentatif bakteriler 30°C'de inkübe edilmelidir.
- Tüplerde renk değişimi (pembe-kırmızı) olup olmadığı 2., 4., 6. ve 24. saatlerde incelenir. Gerektiğinde tüpler 7 güne kadar izlenir.

NOT: Eğer organizma yatık kısımda üreme göstermiyorsa saf kültüründen yoğun miktarda alınması ve üre agara pasajlanması önerilir; önceden oluşmuş üreazı bu yolla saptamak mümkün olabilmektedir.

## 3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması

- **Pozitif üreaz testi** – tüpte yoğun pembe renk meydana gelmesi; etkene göre değişen sürede (15 dakika ile 24 saat içinde)
- **Negatif üreaz testi** – renk değişimi olmaması

## 4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Bazı organizmalar (*Brucella* spp ve *H. pylori*) üreye çok hızlı bir şekilde etki ederlerken diğerleri yavaş reaksiyon gösterirler.

- Üreaz test tipinin seçilmesinde (agar, buyyon, disk vb.) organizmaya göre karar verilmelidir.
- Uygun olmayan besiyeri, yetersiz inokulum veya eski kültürlerin kullanılması halinde yanlış negatif sonuçlar alınabilir.
- Pepton içeren besiyerlerinde gecelik inkübasyonlarda, üreme ile birlikte ürenin hidrolizine değil, peptonun yıkımına bağlı olarak alkali reaksiyon gelişebileceği akılda tutulmalıdır.
- Eğer besiyeri tamponlu değilse testin duyarlılığı düşer.
- Üre ışığa duyarlı bir maddedir ve kendiliğinden hidrolize uğrayabilir. Buzdolabında, karanlıkta saklanmalıdır.

## Ekler

### Ek-1 Üre besiyerlerinin hazırlanması<sup>1,5</sup>

#### %1'lik Fenol kırmızısı (Stok indikatör)

Fenol kırmızısı, toz	0.1 g
Distile/deiyonize su	10 mL

1. Fenol kırmızısı maddesi su içinde eritilir ve burgu kapaklı bir tüpe aktarılır.
2. Raf ömrü 1 yıldır. Tüpün üzeri içeriğin adı, konsantrasyonu, hazırlama ve son kullanma tarihleri yazılarak etiketlenir, buzdolabında (2-8°C) saklanır.

#### Üre Baz 10× çözeltisi

Pepton	1 g
Sodyum klorür (NaCl)	5 g
Monopotasyum fosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2 g
Glikoz	1 g
Üre	20 g
Fenol kırmızısı, %1'lik	1.2 mL
Distile/deiyonize su	100 mL

1. Maddeler su içinde eritilir. pH 6.8'e ayarlanır. Steril bir şişe alınır ve **aseptik şartlarda** çözelti bu şişeye filtrasyon ile sterilize edilerek aktarılır. Takiben burgu kapaklı tüplere 10 mL alikotlar<sup>1,2</sup> halinde dağıtılır.
2. Raf ömrü 3 aydır. Tüplerin üzeri, içeriğin adı, konsantrasyonu, hazırlama ve son kullanma tarihleri yazılarak etiketlenir, buzdolabında (2-8°C) saklanır.

#### Agar Baz

Agar	1.5 g
Distile/deiyonize su	90 mL

1. Agar su ile karıştırılır. 121°C'de 15 dk otoklavlanır.

<sup>1</sup> Bu alikotların her biri 100 mL üre agar veya buyyon içindir. Laboratuvar tüketim hızına göre (raf ömrü içinde tüketip tüketemeyeceğini değerlendirerek) hazırlayacağı *üre baz 10×* solüsyon miktarını gerekiyorsa değiştirmelidir.

<sup>2</sup> 10× (konsantre) solüsyonda kristaller oluşursa, genellikle oda sıcaklığında veya 40°C su banyosunda birkaç dakika içerisinde çözünürler.

### Christensen'in Üre Agarı

1. Otoklavlandıktan sonra **agar baz** bir 55°C'ye ayarlı bir su banyosu içinde soğutulur.
2. Bir adet 10 mL **üre baz 10x** içeren tüp de su banyosu içinde 50-55°C'ye ısıtılır.
3. Üre baz 10x aseptik olarak agar baza eklenir; karışması sağlanır. Burgu kapaklı tüplere 3-4 mL dağıtılır. Yatık pozisyonda katılaşmaya bırakılır.
4. Raf ömrü 3 aydır. Tüplerin üzeri, içeriğin adı, hazırlama ve son kullanma tarihleri yazılarak etiketlenir, buzdolabında (2-8°C) saklanır. Renk değişikliği (olursa) ürün özelliğinin değiştiğini gösterir. Böyle tüpler kullanılmaz!

### Christensen'in Üre Buyyonu

Üre baz 10x	10 mL
<b>Steril</b> distile/deiyonize su	90 mL

1. Aseptik şartlarda karıştırılır ve burgu kapaklı tüplere ~1 mL dağıtılır.
2. Raf ömrü 1 aydır. Tüplerin üzeri, içeriğin adı, hazırlama ve son kullanma tarihleri yazılarak etiketlenir, buzdolabında (2-8°C) saklanır. Renk değişikliği (olursa) ürün özelliğinin değiştiğini gösterir. Böyle tüpler kullanılmaz!

## Kaynaklar

- 1 York MK, Traylor MM, Hardy J, Henry M. Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. Urea test. In: Garcia LS (editor in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 3.17.48.1 - 3
- 2 Bilgehan H. Besiyerleri, ayraçlar ve deneyler: Üre agar (Christensen's). *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. 5. Baskı, Barış Yayınları, İzmir. 2009, p. 707
- 3 Barryl AL, Bernsohn KL, Thrupp LD. Four-hour urease test for distinguishing between *Klebsiella* and *Enterobacter*. *Appl Environ Microbiol* 1969;18(2):156-158
- 4 Goldie J, Veldhuyzen van Zanten SJO, Jalali S, Hollingsworth J, Riddell RH, Richardson H, Hunt RH. Optimization of medium for rapid urease test for detection of *Campylobacter pylori* in gastric antral biopsies. *J Clin Microbiol* 1989;27:2080-2082.
- 5 Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC Jr. (eds). The *Enterobacteriaceae*. Chart 3-8: Urease. In: *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 4th ed., J.B. Lippincott Company, Philadelphia, PA. 1992, p.178.



T.C. Sağlık Bakanlığı

# ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

## X,V ve XV faktör gereksinimi

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Test Prosedürleri
Standart No	B-TP-23
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

## İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	3
GENEL BİLGİ .....	3
TEKNİK BİLGİLER .....	4
1 Test için asgari laboratuvar koşulları .....	4
2 Testin uygulanması .....	6
3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması .....	7
4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	7
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	9
KAYNAKLAR .....	9

## Kapsam ve Amaç

*Haemophilus* türleri üremek için kan hücrelerinde bulunan bazı maddelere ihtiyaç duyarlar. Bunlar X faktör olarak adlandırılan hemin, hematin ve V faktör olarak adlandırılan NAD olup, üreme faktörleri olarak da bilinirler. Faktör gereksinimi türlere göre değişmektedir ve laboratuvarında *Haemophilus* üyelerinin bu özellikleri temelinde ayrımlarını yapmak mümkündür. Bu UMS'nin amacı X, V ve XV faktör gereksinimi testlerinin yapılışı ve yorumlanmasına dair bir rehber sunmaktır.

## Kısaltmalar ve Tanımlar

<b>BHI</b>	Brain heart infusion (beyin kalp infüzyonu)
<b>NAD, NADP</b>	Nikotinamid-adenin-dinükleotid, (NAD-fosfat)
<b>TSA</b>	Triptik soya agar
<b>TSB</b>	Triptik soya buyyonu

## Genel Bilgi

*Hemophilus* türleri üremek için kanda bulunan bazı maddelere (X ve V faktörler) gereksinim duyan bakterilerdir. Bazı türler sadece X faktöre gereksinim duyar ki, X faktör tek bir maddeden ziyade pek çok demirli pigment (hemin, hematin) tarafından sağlanabilen ısıya-dirençli tetrapirrol bileşikleridir. Bu bileşikler bakterinin katalaz, peroksidaz ve elektron transport sistemi sitokromlarının sentezinde kullanılırlar. Bazı *Haemophilus* türleri de ayrıca V faktöre (NAD; koenzim I veya NADP; koenzim II) gereksinim duyarlar. Her iki faktör de kan hücreleri içinde bulunur ve üreme faktörleri olarak da adlandırılırlar (1,2).

Kanlı agar içeriğindeki koyun eritrositleri de bu faktörleri taşırlar. Ancak eritrositler hücre bütünlüğü bozulmamış halde olduklarından üremeleri bu faktörlere bağlı olan *Haemophilus*'lar koyun kanlı agarda üreyemezler.\* Eğer besiyeri, yapılışı esnasında kan eklendikten sonra hücrelerin parçalanacağı bir sıcaklığa ısıtılırsa hem X, V faktörleri ortama salınır, hem de koyun kanında normalde bulunan ve V faktörünü hidrolize edebilen enzimlerin aktivitesi engellenmiş olur. Nitekim bu şekilde elde edilen çikolata agar, *Haemophilus*'ların üremesine elverişli bir besiyeridir ve klinik örneklerden bakterinin izolasyonunda laboratuvarların çoğunun ilk tercihidir (1).

*Haemophilus*'ların X ve V faktör gereksinimleri onların hem izolasyonlarında hem de tür düzeyinde tanımlanmalarında kullanılan temel karakteristikleridir. Örneğin, her ne kadar koyun kanlı agara saf inokulum pasajı yapıldığında üremezlerse de solunum yolu örnekleri vb. karışık kültürlerinde diğer bakterilere ait kolonilere komşu küçük koloniler yaparak üredikleri gözlenmiştir. Bu tür üremenin özellikle stafilkok kolonilerinin hemoliz zonları içinde gözlenmesi "satellit fenomeni" olarak adlandırılmış ve **satellit testine** temel teşkil etmiştir (1,2).

\* *Haemophilus* türleri, farklı olarak, %5 at kanlı ve tavşan kanlı agarlarda ürerler. Bu besiyerlerinde hemoliz karakterini (bazı türler  $\beta$ -hemolitikdir) görmek mümkün olduğundan dolayı, tanımlamada tercih edilirler.



Satellit testi için *Staphylococcus aureus*, kanlı agarda şüpheli örneğin (sürüntü veya koloni) ekiminin yapıldığı bölgeye "çizgi ekimi" tekniği ile inoküle edilir. *S. aureus* hemoliz aktivitesi ile eritrositlerden X faktörünü serbestleştirirken kendisi de üremesi esnasında NAD üretilip ortama salınan bir bakteridir. İnkübasyon sonunda hemoliz zonu içinde -örnekte varsa- *Haemophilus* kolonilerinin üremesi beklenir. Bugün teknik sadece *S. aureus* ile değil -bazı ek avantajlar sağladıkları için- diğer stafilokok türleri ile de uygulanabilmektedir (2).

**X ve V faktörlerine gereksinim** laboratuvarında, filtre kâğıdına (disk/şerit) emdirilmiş ürünlerin kullanılması ile de araştırılabilir. Piyasada X faktör, V faktör ve XV faktör diskleri/şeritleri şeklinde kullanıma hazır ürünler vardır.

Testi uygulamak için öncelikle bu faktörleri kesinlikle içermeyen bir besiyerine (TSA, BHI agar) şüpheli organizmanın yoğun yüzey ekimi yapıldıktan sonra diskler/şeritler yerleştirilir. X ve V faktörleri suda eriyebilir özellikte maddeler olduklarından kolayca besiyerine yayılır. Yeterli bir inkübasyon süresinin sonunda plak incelendiğinde, disklerin/şeritlerin etrafındaki üreme paternine göre yorum yapılır. Örneğin, *Haemophilus parainfluenzae* V faktör varlığında ürerken, *Haemophilus influenzae* ancak her iki faktörün varlığında üreyebilir (1,3,4).

## Teknik Bilgiler

### 1 Test için asgari laboratuvar koşulları

#### 1.1. Laboratuvar güvenliği

Bu UMS'de bahsi geçen organizmalar ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart önlemler uygulanmalı, önlemler risk değerlendirmesi ile de desteklenmelidir. Aerosol oluşturması muhtemel tüm laboratuvar çalışmaları bir biyolojik güvenlik kabininde gerçekleştirilmelidir (ayrıca bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

#### 1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) testten önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşina olmalı, ve; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

#### 1.3. Örnek, Besiyeri, Reaktif, Donanım

##### İnceleme örneği

- *Haemophilus* şüpheli izolatın çikolata agardaki taze kültürü – X ve V faktör gereksinimi veya satellit fenomeni testleri için.
- Alt solunum yolu örneği – satellit fenomeni testi için (primer izolasyon amacıyla kanlı agara bilinen stafilokok suşu ile birlikte inokülasyon için)

### Besiyeri, Reaktif, Test organizması

- TSA, BHI, TSB (5) – X ve V faktör disk testi için. Besiyerleri piyasadan hazır temin edilebilir veya toz maddesinden laboratuvarında hazırlanabilir. Laboratuvarında hazırlama ve saklama koşulları için üretici firmanın talimatları izlenmelidir.

ÖNEMLİ: Her ne kadar bu prosedürün dayandığı değişik kaynaklar faktör içermeyen herhangi bir besiyerinin test için kullanılabilirliğini belirtiyor olsalar da araştırmacılar Doern ve Chapin (5) 187 *H.influenza* suşunun X-V faktör gereksinimini test ettikleri çalışmalarında dört besiyerini (TSA, BHI agar, nutrient agar ve Mueller-Hinton agar) incelemişler ve bunların doğru tanımlama performansını sırasıyla %95.7, %92.5, %56.1 ve %71.1 bulmuşlardır. TSA, X-V faktör gereksinimi testleri için en ideal besiyeri olarak önerilmiştir (5).

- X, V ve XV faktör diskleri (ya da şeritleri) - piyasadan temin edilir; üretici firmanın talimatına göre saklanır.
  - Kanlı agar – satellit fenomeni testi için
  - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 veya bir *Staphylococcus epidermidis* suşu ( $\beta$ -laktamaz negatif) - satellit fenomeni testi için
- NOT: Herhangi bir stafilocok testte kullanılabilir. Ancak eğer test kanlı agar plağa yapılan bir primer kültüre uygulanacaksa koagülaz negatif,  $\beta$ -laktamaz negatif, nonhemolitik bir stafilocokun seçilmesi *Haemophilus* türlerinin hemoliz karakterinin de gözlenebilmesi için kullanışlıdır.

### Diğer gereç, donanım

- Öze, steril tek kullanımlık veya nikrom,
- Eküvyon, steril
- Vorteks
- İnkübatör, CO<sub>2</sub>'li ya da mumlu jar

## 1.4. Kalite kontrol

- Her yeni besiyeri ve reaktif lotu kullanıma sokulmadan önce pozitif ve negatif kalite kontrol suşları ile test edilmelidir.
- Periyodik olarak (özellikle balgam kültürlerinde doğrudan örneğin ekildiği plaklara inoküle edilecek ise), satellit testinde kullanılacak stafilocok suşunun kontamine olup olmadığı test edilmelidir.
- *Alternatif olarak* derin dondurucuda saklanan stafilocok stokundan ayda bir yeni pasaj yapılmalıdır.
- Kalite kontrol organizmaları:  
*Haemophilus influenzae* ATCC 43065, XV faktör varlığında ürer  
*Haemophilus parainfluenzae* ATCC 7901, V faktör varlığında ürer

## 2 Testin uygulanması

### 2.1. X ve V faktör gereksinimi için disk testi

- Steril bir tüpe 2-3 mL uygun bir sıvı besiyeri (faktör içermeyen; BHI, TSB gibi) konur. Sıvı besiyeri yerine SF de kullanılabilir.
- İncelenecek izolatın kolonisi bir öze ile alınarak sıvı besiyerinde yeterince koyu (McFarland No 1) bir süspansiyon hazırlanır. Homojen bir süspansiyon elde etmek için vortekslenir. Eğer primer izolasyon plağında yeterli üreme yoksa ya da plak kontamine ise önce çikolata agara pasaj yapılmalıdır.  
ÖNEMLİ: Sıvı besiyerine inokulum transfer ederken agar besiyerinden parça taşınmamasına özen gösterilmelidir. Çünkü primer izolasyon plağı X ve V faktörleri içerir ve bunların çok küçük miktarları bile testi etkileyerek hatalı tanımlamaya neden olabilir.
- Bir TSA (veya benzeri, kesinlikle X ve V faktör içermeyen bir besiyeri) plağı alınır. Steril bir eküvyon süspansiyona daldırılır. Tüpün kenarında süzdürüldükten sonra eküvyon plak yüzeyine en az iki yönde sürülerek ekim yapılır.
- Plak yüzeyi kuruduktan sonra X, V ve XV faktörlerini içeren kâğıt şerit/diskler ekim alanının üzerine yerleştirilir (bkz. Şekil 1). Disklerin arasında en az 3.5 cm (veya üretici firmanın önerdiği kadar) mesafe olmalıdır. Eğer iki izolat test edilecekse diskler Şekil-1'de görüldüğü gibi yerleştirilir!
- Plağın kapağı kapatılır, ters çevrilir ve mumlu jara (veya varsa doğrudan CO<sub>2</sub> inkübatöre) yerleştirilir.
- Nemli ve %3-5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 18-24 saat 35°C'de inkübe edilir.  
NOT: Yeterli nem oranı için (i) inkübatör tabanına düz cam bir tepside distile su, veya (ii) jar tabanına ıslatılmış filtre kağıdı, konmalıdır
- İnkübasyonu takiben plak iyi bir aydınlatma altında disklerin etrafında üreme varlığı açısından incelenir ve yorumlanır.

### 2.2. Satelit fenomeni testi

- Şüpheli izolat kanlı agara pasajlanır. Eğer klinik örnek söz konusu ise hem kanlı agara hem de çikolata agara ekim yapılır.
- Stafilokok kolonisinden bir steril öze ile alınır ve kanlı agarda ekim yapılmış bölgeyi çaprazlayan bir çizgi ekim (veya birden fazla kısa çizgi ekimler) yapılır.
- Her iki plak da %3-5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 18-24 saat 35°C'de inkübe edilir.
- Kanlı agar plağı stafilokok ekim çizgisinin etrafında satelit kolonilerin varlığı yönünden incelenir (bkz. Şekil 2).
- Çikolata agar plağı *Haemophilus* şüpheli üreme yönünden değerlendirilir ve tanımlama testleri uygulanır.

## 3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması

### 3.1. X ve V faktör gereksinimi için disk testi

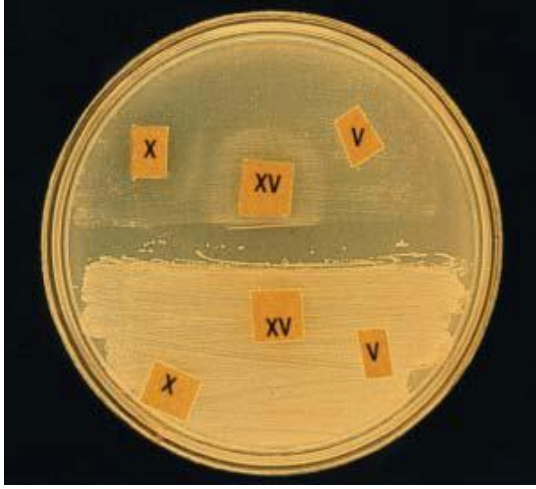
- Sadece XV diski (X ve V faktörlerinin ikisini bir arada içeren disk) etrafında üreme olması (Şekil 1'deki plağın üst yarısında olduğu gibi) – *H. influenzae* veya *Haemophilus haemolyticus* olabilir. *H. haemolyticus* tavşan veya at kanlı besiyerinde hemoliz yapma özelliği ile *H.influenzae*'dan ayrılabilir (Tablo 1).
- X veya V faktörlerinden yalnız birinin etrafında üreme olması - organizma diğer *Haemophilus* türlerinden biri olabilir.

### 3.2. Satellit fenomeni testi

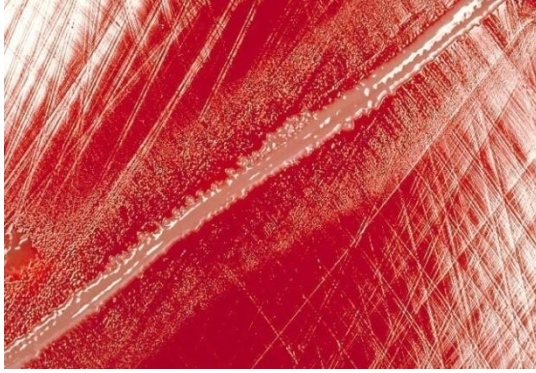
- **Pozitif sonuç** – stafilokok ekim çizgisi etrafında üremiş narin koloniler görülmesi (bkz. Şekil 2).
- **Negatif sonuç** – kanlı agarda kolonilerin sadece stafilokok ekim çizgisine yakın değil her yerde üremiş olması veya hiç üreme olmaması.
- *H. haemolyticus* ve *H. parahaemolyticus* V faktöre gereksinim duyan bakterilerdir; ancak stafilokok ekimi olmadan da kanlı agarda üreyebilir ve satellit fenomeni göstermezler. Çünkü bu bakteriler hemolitik ve besiyerine NAD salınmasını sağlayabilirler.

## 4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Disk testinde, primer izolasyon plağından koloni alınırken besiyeri parçası alınması X faktör (hemin) taşınmasına ve dolayısı ile hatalı sonuca neden olabilir.
- Disk testinde kullanılan baz besiyerinde eser miktarda hemin bulunması bile hatalı test sonucuna neden olabilmektedir. Ancak hiç X faktörü içermeyen bir besiyeri mevcut değildir.
- Disk test daha çok *H. parainfluenzae* ve *H. influenzae* tiplendirmesinde olmak üzere, hatalı sonuçlar verebilmektedir ki bu oran %20'ye kadar çıkabilir. Özellikle bazı *H. parainfluenzae* suşlarının güç üreme özelliği bu suşlar için disk testlerinin okunmasını güçleştirebilir. Daha doğru sonuç almak için "porfirin sentezi testi" önerilir.
- V faktör, X faktörden daha hızlı bir şekilde besiyerine yayılma özelliğindedir. Diskler birbirine çok yakın yerleştirilirse V faktör X faktör diskinin yayılma alanına girebilir ve hatalı sonuçlar elde edilebilir.
- Üretici firmalar X, V disklerindeki faktör konsantrasyonunu vermezler. Bu nedenle satın alınacak disklerin kabulü, ambalaj içeriğinin kontrolünden ziyade, bir dizi *Haemophilus* suşu ile laboratuvarında test edilerek ürünün performansının değerlendirilmesine dayanmalıdır.
- Satellit testi ile elde edilen bulgular ön tanı niteliğindedir. Mutlaka diğer testlerle tanımlama işlemi tamamlanmalıdır.



**Şekil 1.** Üreme faktörleri gereksinimi: agar plakta bakteri ekim alanlarının üzerine yerleştirilmiş X, V ve XV faktör diskleri. Üstteki izolat sadece XV diskinin etrafında üremiş olup *H. influenzae* ön tanısı konabilir (3 no.lu kaynaktan alınmıştır)



**Şekil 2.** Satellit fenomeni. Kanlı agar plağında stafilokok ekim çizgisi yakınında küçük *Haemophilus* sp kolonileri gözlenirken ekim çizgisinin uzağında üreme olmadığı dikkati çekmektedir. (Kaynak: <http://infectionnet.org/notes/microorganisms/bacterial-pathogens-of-the-respiratory-tract-and-cns/attachment/satellite2/> )

**Tablo 1.** Üreme gereksinimlerine göre *Haemophilus* türlerinin tanımlanması (3).

Tür	X ve V Faktör gereksinimi		At veya tavşan kanlı agarda $\beta$ -hemoliz
	X	V	
<i>H. influenzae</i>	+	+	-
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+
<i>H. parahaemolyticus</i>	-	+	+
<i>H. aphrophilus</i>	+	-	-
<i>H. parainfluenzae</i> *	-	+	-
<i>H. paraphrophilus</i> *	-	+	-

\**H. paraphrophilus* ve *H. parainfluenzae* ornitin testi ile ayrılır; ilki negatif iken ikincisi pozitifdir.

## İlgili diğer UMS belgeleri

Bu UMS belgesi (X,V ve XV Faktör Gereksinimi) *Haemophilus* spp tanımlanma şeması ile ilgilidir ve kullanımı ile ilgili bu belgeye de başvurulabilir:

UMS, B-MT-05 *Haemophilus influenzae* invaziv enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı

## Kaynaklar

- 1 Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, Jr. (eds). *Haemophilus*. Chapter 6. In: *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 4th ed., J.B. Lippincott Company, Philadelphia, PA. 1992, p. 279-301.
- 2 York MK, Traylor MM, Hardy J, Henry M. Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. Satellite Test. In: Garcia LS (editor in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 3.17.44.1 - 3.17.44.3
- 3 Perilla MJ, Ajello G, Bopp C, Elliott J, Facklam R, Knapp JS, Popovic T, Wells J, Dowell SF. *Streptococcus pneumoniae*. In: Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Pathogens of Public Health Importance in the Developing World. Chapter V. CDC, and WHO. 2003, p. 45-62
- 4 Popovic T, Ajello GW, Facklam RR. Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis Caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA. 1998.
- 5 Doern GV, Chapin KC. Laboratory identification of *Haemophilus influenzae*. Effects of basal media on the results of the satellitism test and evaluation of the RapID NH system. *J Clin Microbiol* 1984;20:599-601.

## ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

# Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Hangi Durumlarda Yapılmalı? Genel kavramlar

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu-11
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri (AMD)
Bölüm	Temel Bilgiler
Standart No	AMD-TB-01
Sürüm No	1.0
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

# İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	3
GENEL BİLGİLER .....	4
1. Antimikrobiyal Duyarlılık Testlerinin Gerektiği Durumlar.....	5
2. Örnek Ne Zaman Alınmalıdır? .....	6
3. Antimikrobiyal duyarlılık testlerinde önemli basamaklar .....	6
4. Antimikrobiyal duyarlılık test yöntemleri.....	7
5. Rutin olarak test edilecek ve bildirilecek antimikrobiyal ilaçların seçimi .....	7
6. Kısıtlı Bildirim ve Raporlama .....	7
7. Kalite kontrol .....	8
8. Antimikrobiyal Direnç Sürveyansı .....	8
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	10
KAYNAKLAR.....	10



## Kapsam ve Amaç

Bu belgenin kapsamı, bakterilerin in vitro duyarlılığını belirlemek amacıyla uygulanan antimikrobiyal duyarlılık (AMD) testleri ile ilgili genel kavramları ve AMD testlerinin yapılması gereken durumları içerir.

## Kısaltmalar ve Tanımlar

<b>AMD</b>	Antimikrobiyal duyarlılık
<b>AMDT</b>	Antimikrobiyal duyarlılık testi
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection (Amerikan Tür Kültürü Koleksiyonu)
<b>BOS</b>	Beyin Omurilik Sıvısı
<b>CAESAR</b>	Central Asian and Eastern European Surveillance on Antimicrobial Resistance (Orta Asya ve Doğu Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyansı)
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute (Klinik ve Laboratuvar Standartları Kurumu)
<b>DSÖ</b>	Dünya Sağlık Örgütü
<b>EUCAST</b>	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi)
<b>GSBL</b>	Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz
<b>I</b>	Orta duyarlı (intermediate)
<b>MBK</b>	Minimum bakterisidal konsantrasyon
<b>MİK</b>	Minimum inhibitör konsantrasyon
<b>PBP</b>	Penisilin bağlayan protein
<b>R</b>	Dirençli (resistance)
<b>S</b>	Duyarlı (susceptible)
<b>SUP</b>	Standart uygulama prosedürleri
<b>UAMDSS</b>	Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi

## Genel Bilgiler

Antimikrobiyal duyarlılık testleri, bir antimikrobiyal ajanın belli bir bakteri türüne karşı in-vitro etkinliğini saptamak amacıyla uygulanan testlerdir. Antimikrobiyal tedavi gerektiren bir enfeksiyonda etken olan her bakteri için, eğer o bakterinin türünden duyarlılığı tahmin edilemiyorsa, duyarlılık testi gerekmektedir. Duyarlılık testi yapılmasının en sık gerektiği durum, etken bakterinin yaygın kullanılan antimikrobiyal ilaçlara direnç geliştirme özelliği olan bir tür olduğu düşünüldüğündedir<sup>(1)</sup>.

Enfeksiyondan sorumlu bakterilerin antimikrobiyal duyarlılık testlerinin yapılma amaçları, hastanın tedavisinde doğru seçeneklerin saptanması ve direnç gelişimine karşı uygun politikaların belirlenmesidir. Enfeksiyon etkeni izole edilmişse, hasta tedavisi, antimikrobiyal direnç testlerinin sonuçlarına göre planlanır. Bununla birlikte, kültür alınamayan durumlarda ve acil olgularda kültür sonucu beklenirken uygulanacak olan ampirik tedavi için, öngörülen etkenin o bölge veya hastanede antimikrobiyallere direnç durumunun bilinmesi gereklidir. Bu noktada daha önceki antibiyotik duyarlılık testlerinin sonuçları ve bu sonuçların epidemiyolojik analizi önem kazanır<sup>(1)</sup>.

Direnç nedeniyle tedavi başarısızlıklarının azaltılması, ancak duyarlılık testlerinin standart bir yöntem ile uygulanması ve sonuçlarının doğru yorumlanması ile mümkündür. Ayrıca, direnç gelişimi ile mücadelede, bölgesel ve ulusal düzeyde direnç durumunu saptamak, zamana karşı gelişmeleri izlemek ve gereken önlemlere karar verirken bu verilerden yararlanmak gibi amaçlarla yürütülen sörveyans sistemleri için de duyarlılık testlerinin standardizasyonu önem taşımaktadır.

Antimikrobiyal duyarlılık testlerinin ülkede ve tüm dünyada standardizasyonu amaçlayan birçok ulusal ve uluslar arası komite/ kuruluş bulunmaktadır. Bunlar arasında en yaygın kullanılanlar: EUCAST (Antimikrobiyal Duyarlılık Testi ile ilgili Avrupa Komitesi -European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) ve CLSI (Klinik ve Laboratuvar Standartları Kurumu -Clinical Laboratory Standards Institute) dir <sup>(2,3)</sup> Ülkemizde şu ana kadar en sık CLSI standartları kullanılsa da, uygulamaların çok benzer olması, dokümanlarına kolay ve ücretsiz ulaşılması gibi nedenlerle EUCAST standartlarına geçilmesi görüşü hem ülkemizdeki mikrobiyoloji uzmanlık dernekleri hem de Sağlık Bakanlığı tarafından benimsenmektedir ve bu konuda çalışmalar başlatılmıştır.

# 1. Antimikrobiyal Duyarlılık Testlerinin Gerektiği Durumlar

- Antimikrobiyal tedavi gerektiren bir enfeksiyonda etken olan her bakteri için, eğer o bakterinin türünden duyarlılığı tahmin edilemiyorsa, duyarlılık testi gerekmektedir.
- Bazı mikroorganizmaların antimikrobiyal ilaçlara karşı duyarlılığı öngörülebilmekte ve bunlara karşı ampirik tedavi uygulanabilmektedir. Örneğin *Streptococcus pyogenes* susularının tümü penisiline duyarlı olduğu için, bu antibiyotiğe karşı duyarlılığın in vitro testlerle değerlendirilmesine gerek yoktur. Ancak, aşırı duyarlılık gibi bir nedenle penisilin kullanılamıyorsa, direnç bulunabilmesi nedeniyle ikinci seçenek olan eritromisin veya başka bir makrolid test edilebilir (<sup>1</sup>).
- Sadece enfeksiyon etkeni olan bakteriler için AMD testi uygulanmalıdır. Normal flora bakterilerine veya kolonizasyon etkenlerine duyarlılık testi yapılmaz. Bu nedenle enfeksiyon bölgesinde yer alan normal flora üyeleri ile enfeksiyonun gerçek etkeni arasında ayırım yapılması gereklidir. Klinik örnekten izole edilen hangi bakterilere duyarlılık testi uygulanacağı kararı verilirken bakterinin izole edildiği vücut bölgesi, klinik örnekte diğer bakterilerin varlığı ve örneğin kalitesi, konağın durumu, örneğin alındığı vücut bölgesinde bakterinin enfeksiyona neden olma kabiliyeti gibi önemli faktörler göz önünde bulundurulmalıdır.
- Normalde steril olan vücut bölgelerinin (kan, BOS, idrar, kemik iliği, plevra sıvısı, doku vb.) enfeksiyonu varlığında; bu bölgelerden izole edilen bakteriler için AMD testi yapılmalıdır.
- İlk kültür plaklarından enfeksiyon etkeni olduğu düşünülen bakterilerin kolonileri seçilerek duyarlılık testine alınmalıdır. Farklı türlerden mikroorganizmaların karışımı aynı plakta test edilmemelidir.
- Materyalin doğrudan Gram yaymasında tek tür bakteri görülen acil durumlar dışında, klinik örneklerden (örn. normalde steril olan vücut sıvıları ve idrar gibi) doğrudan duyarlılık testi yapılmasından kaçınılmalıdır. Klinik örneklerden doğrudan duyarlılık testi yapılan durumlarda sonuçlar ön rapor olarak bildirilmeli ve duyarlılık testi standart yöntemle tekrarlanarak doğrulanmalıdır.
- Enfeksiyonun şekli açıklık kazanmamışsa ve kültürde karışık üreme veya normal flora varsa duyarlılık testleri çoğunlukla gereksizdir ve sonuçlar yanlış yönlendirmeye yol açabilir. Böyle bir durumda kültür tekrarı önerilmelidir (<sup>1</sup>).
- Beklenmeyen klinik yanıtızsızlık durumunu araştırmak için ve tedaviye bağlı sekonder direnç gelişimi riski nedeniyle izlem için de gerektiğinde AMD testi yapılmalıdır.
- Duyarlılık test sonuçları mutlaka identifikasyon sonuçları ile birlikte değerlendirilmelidir. Bazı bakteri türleri genetik özellikleri açısından bir antibiyotiğin hedefi olan yapıyı hiç içermediği ya da antibiyotiğin hedefe ulaşmasını engelleyecek bir yapıyı veya antibiyotiği inaktive edecek enzimleri taşıdığı için o antibiyotiğe dirençlidir. Buna *doğal direnç* adı verilmektedir. Örneğin Gram negatif bakteriler hücre duvarındaki dış membran yapıları nedeniyle vankomisin gibi glikopeptidlere doğal olarak dirençlidir. Benzer şekilde, stafilokokların hücre duvar sentezinde görevli enzimleri (PBP) aztreonamı bağlamadığı için, stafilokoklar bu antibiyotiğe

doğal olarak dirençlidir. Bakterileri doğal dirençli oldukları antibiyotikler için test etmek gereksizdir. Ancak test edilen bakterinin doğal direnç olduğu bilinen bir antibiyotik test panelinde yer alıyorsa ve sonuç olarak duyarlı saptanıyorsa, muhtemelen bakterinin tanımlamasında veya AMD testinde hata olduğu düşünülmelidir <sup>(4)</sup> . Detaylı bilgi için *Bkz. AMD-TB-03 (3.1.1.)*

- Bazı direnç mekanizmaları ise rutin duyarlılık testleri ile saptanamayabilir. Bunlar için özel ölçütler ve testler uygulanması gerekir. Örneğin, Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamaz (GSBL) varlığının saptanması, karbapenemaz varlığının saptanması gibi. *Bkz. AMD-MT-04*
- Rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarının birincil görevi enfeksiyon hastalıklarının tedavisini yönlendirmek için zamanında ve doğru AMD testleri sonuçlarını klinisyene ulaştırmaktır. Buna ek olarak AMDT sonuçları ampirik tedavi seçeneklerinin belirlenmesinde, kurumsal veya ulusal ölçekte antibiyotik kullanımı politikalarının belirlenmesinde, epidemiyolojik çalışmalar veya direnç sürveyansı yürütmek için ve yeni geliştirilen antibiyotiklerin etkinliklerini değerlendirmek için kullanılabilir.

## 2. Örnek Ne Zaman Alınmalıdır?

- Her türlü kültür için örnekler antibiyotik kullanmaya başlamadan önce ve/veya antibiyotik kullanımı sonlandırıldıktan 48 saat sonra alınmalıdır.
- İdeal olarak ampirik tedaviye başlamadan önce örnek alınmalı ve laboratuvar sonuçları geldiğinde, AMD test sonucu ve klinik gidişata bakılarak, gerekirse tedavide değişiklik yapılmalıdır.
- Eğer antibiyotik tedavisi başlanmış ise klinik örnek, bir sonraki antibiyotik dozu verilmeden hemen önce alınmalıdır ve laboratuvar bu durumdan haberdar edilmelidir.
- Hastada bir enfeksiyon varlığı düşünüldüğünde, öncelikle tanıya yönelik olarak, enfeksiyonu temsil eden klinik örneğin (boğaz, idrar, dışkı, balgam, konjonktiva, BOS, kan, normalde steril diğer vücut sıvıları...) uygun şekilde alınarak, uygun sürede laboratuvara gönderilmesi gerekir.

## 3. Antimikrobiyal duyarlılık testlerinde önemli basamaklar

- Etken doğru tanımlanmalı ve saf kültür olmasına dikkat edilmeli
- İzole edilen mikroorganizmanın klinik önemi belirlenmeli, enfeksiyon etkeni olup olmadığına karar verilmeli
- Uygun ve güvenilir bir yöntem seçilmeli
- Rutin olarak test edilecek ve bildirilecek ilaçlar dikkatle seçilmeli
- Uygulama ve değerlendirme standartlara uygun olmalı
- Kısıtlı bildirim ve raporlandırma ilkelerine uyulmalı
- Klinisyene belirtilmesi gereken açıklamalar raporda yazılmalıdır.

## 4. Antimikrobiyal duyarlılık test yöntemleri

Bakterilerin antimikrobiyal ilaçlara *in vitro* duyarlılığını ölçmek için çeşitli yöntemler kullanılabilir. Bunlar;

a) **Kalitatif yöntemler:** *Duyarlı (S), dirençli (R), orta dirençli (I) olarak sonuç verilir.*

Disk difüzyon yöntemi

b) **Kantitatif yöntemler:** *Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değeri ile birlikte Duyarlı (S), dirençli (R), orta dirençli (I) olarak sonuç verilir.*

Agar dilüsyon yöntemi

Sıvı dilüsyon yöntemleri

Gradyent yöntemler

Otomatize yöntemler'dir.

Birçok klinik mikrobiyoloji laboratuvarında sık karşılaşılan, kolay üreyen bakteriler ve bazı güç üreyen bakteriler için hem kolay uygulanabilir hem de ucuz olması nedeniyle rutinde sıklıkla disk difüzyon yöntemi kullanılmaktadır. Kantitatif sonuç veren yöntemler ise farmakodinamik yorumlama bakımından daha güvenilirdir. Dilüsyon ve gradient yöntemleri, antimikrobiyal ilacın bir bakterinin üremesini inhibe etmesi (MİK) veya öldürmesi için gerekli olan minimum konsantrasyonu (MBK) belirlemek için uygulanır. (5)

**MİK (Minimum İnhibitör Konsantrasyon):** Bir mikroorganizmanın üremesini inhibe eden en düşük ilaç konsantrasyonudur. (mg/L veya µg/ml)

**MBK (Minimum Bakterisidal Konsantrasyon):** Bir mikroorganizmanın %99.9'unu öldüren en düşük antibiyotik konsantrasyonudur. (mg/L veya µg/ml)

## 5. Rutin olarak test edilecek ve bildirilecek antimikrobiyal ilaçların seçimi

Duyarlılık testi yapılacak ve bildirilecek olan en uygun antimikrobiyal ilaçların seçimi, klinik mikrobiyoloji laboratuvarının, hastanenin enfeksiyon kontrol komitesi, enfeksiyon hastalıkları uzmanları, hastane eczanesi ve varsa antibiyotik komitesine danışarak alacağı bir karardır. Seçilecek ilaçlarda klinik etkinlik, direnç sıklığı, direnç gelişimini en aza indirme, maliyet, ülkemizde ve hastane eczanesinde mevcut olup olmaması, ilk seçenek ve alternatif ilaçlardaki güncel önerilerle ilgili fikir birliği gibi konular göz önünde bulundurulmalıdır. Her yıl güncellenen CLSI M100 dokümanlarında Tablo 1A, 1B ve 1C'de rutin test ve bildirimlerde önerilen antimikrobik ilaç gruplamaları yer almaktadır. (6)

## 6. Kısıtlı Bildirim ve Raporlama

Direnç gelişimi ile mücadelede hastaya sonuç verirken duyarlı bulunan antimikrobiyallerin tümü rapor edilmez; daha dar spektrumlu, daha az yan etkili

ve ucuz olan ilaçlar tercih edilir. *Birinci seçenek* olan ilaçlara duyarlılık mevcutsa, *ikinci seçenek* ilaçların duyarlılığı hekime bildirilmez. Bu amaçla uluslararası rehberler takip edilmektedir ve laboratuvarlar da bu rehberlerin ışığında "kısıtlı bildirim" yapmalıdır.

Kısıtlı bildirim, AMD test sonuçlarının klinikteki önemini arttıracak ve geniş spektrumlu antimikrobik ilaçların aşırı kullanımının yol açtığı çoğul dirençli suşların seleksiyonunu azaltmaya yardımcı bir uygulamadır (6). Detaylı bilgi için bakınız AMD-TB-03

## 7. Kalite kontrol

Antimikrobiyal duyarlılık testi sonuçlarının tekrarlanabilir olması, yani aynı koşullarda tekrarlandığında sonuçların aynı veya birbirine yakın olması gereklidir.

AMDT' de kalite kontrol, test sisteminin güvenilir sonuç vermesini sağlamak için, performansını denetleyen işlemleri içermektedir. Antimikrobiyal duyarlılık testi sonuçları birçok faktörden etkilenebilmektedir. Bu nedenle testlerin uygun koşullarda yapılıp yapılmadığı kalite kontrol suşları (ATCC vb.) ile denetlenir. Kalite kontrol suşları, sonuçlarının tekrarlanabilirliği %95'in üzerinde olan suşlardır. Bu suşlarla beklenen sonuçlar elde edilemezse antibiyotik duyarlılık testlerinin tekrarlanması gerekir (1).

Kalite kontrol uygulamaları için gerekli tüm tablolar CLSI M100 dokümanında ve EUCAST dokümanlarında yer almaktadır (2,6). Kalite Kontrol uygulamaları için bkz. AMD-TP-03 Ek-1

## 8. Antimikrobiyal Direnç Sürveyansı

Antimikrobiyal direnç sürveyansının amacı dirençli patojenlerin ortaya çıkışını ve paralelinde bulaşıcı hastalıkların morbidite ve mortalitesini en aza indirmek için gerekli bilgiyi sağlamaktır. Sürveyanstan elde edilecek bilginin başlıca kullanım amaçları; yerel, bölgesel ve ulusal düzeyde antimikrobiklerin akılcı kullanımı, antimikrobiyal direncinin önlenmesi ve kontrolü için gerekli programları geliştirmek ve yürütmektir. Bu amaçla, Ülkemizde THSK koordinasyonunda Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (UAMDSS) oluşturulmuş; bu sistemi izleyip değerlendirmek üzere ayrıca "Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyansı - Bilimsel Komisyonu" kurulmuştur. Bu Bilimsel Komisyon tarafından Üniversite Hastaneleri, Eğitim Araştırma Hastaneleri ve Devlet Hastanelerini içerecek şekilde Ülkemizde Türkiye İstatistik Kurumu'nun belirlediği "Türkiye İstatistik Bölge Birimleri Sınıflandırması (NUTS)" bölgelerinden eşit ağırlıklı olacak şekilde 77 adet katılımcı laboratuvar belirlenerek sisteme dahil edilmiştir. Laboratuvar testleri ve kalite kontrol uygulamaları SUP'leri hazırlanarak, katılımcı laboratuvar uzmanlarına gruplar halinde eğitimler düzenlenmiştir. Sürveyans kapsamındaki klinik örnekler; kan ve BOS olup, AMD sonuçları izlenen mikroorganizmalar; *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* ve *E. faecium*'dur. Veriler 2011 yılından itibaren toplanmaya ve analiz edilmeye başlanmıştır. Veri analizi DSÖ'nün "WHO-NET" yazılım programı ile sağlanmaktadır (7).

UAMDSS, 2013 yılı Kasım ayından itibaren Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Avrupa Ofisi tarafından yürütülmekte olan Uluslararası CAESAR- (Orta Asya ve Doğu Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyansı) Ağına dahil olmuştur. CAESAR ağı, Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Bulaşıcı Hastalıklar Derneği (ESCMID) ile Hollanda Ulusal Halk Sağlığı ve Çevre Enstitüsü (RIVM) ve Avrupa Hastalık Kontrol Merkezi (ECDC) ile yakın işbirliği içinde çalışmaktadır. CAESAR ağı halk sağlığının korunması amacı ile kıyaslanabilir ve güvenilir antibiyotik direnç verisini toplamayı ve bir araya getirmeyi hedeflemektedir.

## İlgili diğer UMS belgeleri

AMD-TB (Antimikrobiyal Duyarlılık Temel Bilgiler)-03

AMD-MT(Antimikrobiyal Duyarlılık Mikrobiyolojik Tanı)-04

AMD-TP (Antimikrobiyal Duyarlılık Test Prosedürleri)-03 Ek-1

## Kaynaklar

<sup>1</sup> Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Antimikrobik Disk Duyarlılık Testleri için Uygulama Standartları;Onaylanmış Standart-Onuncu Baskı, Ocak 2009 M02-A10. Cilt 29 Sayı 1.ISBN:978-605-4488-08-7.ISSN:1302-5414.

<sup>2</sup> <http://www.eucast.org>

<sup>3</sup> <http://www.clsi.org>

<sup>4</sup> Gülay Z: Antibiyotik duyarlılık testlerinin yorumu, Toraks Derg 2002;3(1):75-88.

<sup>5</sup> J.D. Turnidge, M.J.Ferraro, J.H.Jorgensen. Susceptibility Test Methods: General Considerations In: Manuel of Clinical Microbiology, Eds: J Versalovic, KC Carroll, G Funke. Volume 1 Eds: JH Jorgensen, ML Landry, DW Warnock. ASM Press, American Society for Microbiology, Washington DC, 2011.

<sup>6</sup> Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; M100-S23; Vol. 33 No.1, January 2013.

<sup>7</sup> "Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi Laboratuvar Testleri, Kalite Kontrolü ve Kalite Güvencesi Standart Uygulama Prosedürleri ve WHONET Yazılım Programı" Kitabı, ISBN: 978-975-590-347-7, Şubat 2011.





T.C. Sağlık Bakanlığı

## ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

# Kullanılan Standartlar ve Farkları (CLSI, EUCAST)

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu 11
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri (AMD)
Bölüm	Temel bilgiler
Standart No	AMD-TB-02
Sürüm No	1.0
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

## İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	3
GENEL BİLGİ .....	5
TEKNİK BİLGİLER .....	6
1 CLSI ve EUCAST Standartları Arasındaki Farklar .....	6
2 EUCAST Standartları Kullanımına Geçiş Süreci.....	16
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	20
KAYNAKLAR.....	20

## Kapsam ve Amaç

Türkiye’de antimikrobiyal duyarlılık testlerinin (AMDT) uygulanışında ve sonuçlarının değerlendirilmesinde uzun yıllardır Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standartları kullanılmaktadır. ESCMID (Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Derneği) tarafından 2000 yılında kurulan EUCAST (Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi) Avrupa’nın resmi AMDT komitesi görevini üstlenmiştir. EUCAST’ın tüm dokümanlarına serbest erişim sağlaması gibi yararlar ve Türkiye’nin Avrupa çapında uluslararası sürveyans çalışmalarına katılabilmesi için EUCAST’ı kullanması gerekliliği gibi etmenler nedeniyle Türkiye’de EUCAST standartlarının kullanılması kararı alınmıştır. Bu belge kapsamında CLSI ve EUCAST standartları hakkında bilgi verilmesi ve aralarındaki farkların belirtilmesi amaçlanmıştır.

## Kısaltmalar ve Tanımlar

<b>ADTS</b>	Antimikrobiyal Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu Çalışma Grubu
<b>AMDT</b>	Antimikrobiyal Duyarlılık Testi
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection (Amerikan Tür Kültürü Koleksiyonu)
<b>β-NAD</b>	Beta-nikotinamid adenin dinükleotid
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute (Klinik ve Laboratuvar Standartları Kurumu) ( <a href="http://www.clsi.org">http://www.clsi.org</a> )
<b>ECOFF</b>	Epidemiological Cut-off (Epidemiyolojik Eşik Değer)
<b>ESCMID</b>	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Derneği) ( <a href="https://www.escmid.org">https://www.escmid.org</a> )
<b>EUCAST</b>	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi) ( <a href="http://www.eucast.org">http://www.eucast.org</a> )
<b>FDA</b>	U.S. Food and Drug Administration (Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi) ( <a href="http://www.fda.gov">http://www.fda.gov</a> )
<b>ISO</b>	International Organization for Standardization (Uluslararası Standardizasyon Kuruluşu) ( <a href="http://www.iso.org">http://www.iso.org</a> )
<b>MHA</b>	Mueller-Hinton Agar
<b>MHB</b>	Mueller-Hinton Sıvı Besiyeri
<b>MH-F</b>	Mueller-Hinton Fastidious Besiyeri (EUCAST’ın güç üreyen bakterilerin antimikrobiyal duyarlılık testleri için kullandığı besiyeri)

<b>MİK</b>	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
<b>NAC</b>	National Antimicrobial Susceptibility Testing Committee (Ulusal Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi)
<b>NCTC</b>	National Collection of Type Cultures (Ulusal Tür Kültürü Koleksiyonu)
<b>ST</b>	Sokak tipi (wild type)

## Genel Bilgi

Tüm dünyada en sık kullanılan AMDT yöntemi halen Bauer-Kirby disk difüzyon yöntemidir. AMDT testlerinin yaygın kullanıma girmesi, kullanılan AMDT testlerinin standardizasyonunu gerektirmiş, bu amaçla Amerika Birleşik Devletleri'nde ve Hollanda, Fransa, İsveç, Almanya, Norveç ve İngiltere gibi Avrupa ülkelerinde ulusal standartlar yayımlanmıştır. Yakın zamanda ESCMID (Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Derneği) tarafından kurulan EUCAST (Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi) Avrupa merkezli bu altı ülkenin çalışma grupları ile beraber çalışarak, Avrupa'nın yetkili AMDT testleri komitesi olarak görev yapmaya başlamıştır.

Tüm dokümanlarını ücret karşılığında satan CLSI'nin dokümanları, ülkemizde uzun yıllar boyunca Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'nin bir çalışma grubu olan Antimikrobiyal Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu (ADTS) Çalışma Grubu tarafından Türkçe'ye çevrilmişse de, çeviri için talep edilen yüksek telif hakkı ücreti ve gerekli izinlerin alınması için gerekli süre gibi etmenler yüzünden güncel standarda erişim sağlıklı bir şekilde sağlanamamış, laboratuvarlar arasında kullanılan standart sürümü arasında farklılıklar oluşmuştur. EUCAST'ın tüm dokümanlarını web sitesinde serbest erişime açması, sınır değer tablolarını yılda bir yenilemesi, değişiklik olan bölümlerin kolayca belirlenebilmesi gibi yararları sayesinde geçtiğimiz birkaç yıl içerisinde birçok Avrupa ülkesi CLSI'yi terk edip, EUCAST standartlarını benimsemiştir. Ayrıca uluslararası çapta sürveyans çalışmalarında tüm katılımcılar tarafından aynı yöntemin kullanılması gerekliliği sebebiyle, CLSI'yi takip eden Türkiye Avrupa merkezli çalışmalara veri sağlayamaz olmuştur. CLSI'ye göre üstünlükleri ve Türkiye'nin yakın çevresi ile ortak çalışmalar yapabilmesi için bir gereksinim haline gelmesi sebebiyle 2013 yılı içerisinde Türkiye'de EUCAST standartlarının kullanılması kararı alınmıştır.

EUCAST yöntemine geçmeye karar veren ülkeler için EUCAST, her ülkenin kendi ulusal antimikrobiyal duyarlılık testleri komitesininin (National Antimicrobial Susceptibility Testing Committee, NAC) geçiş sürecinde gerekli hazırlıkları yürütmesini istemektedir. Türkiye'de ulusal antimikrobiyal duyarlılık testleri komitesi Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'nin ADTS Çalışma Grubu'dur. EUCAST'a geçiş sürecinde ADTS bu görevi S.B. Türk Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı ile beraber yürütmektedir. Hazırlıklar kapsamında EUCAST'ın dokümanları Türkçe'ye çevrilmekte, konu hakkında çeşitli eğitimler ve toplantılar düzenlenmektedir.

Standartlar genel anlamıyla benzer olsalar da, aralarında dikkat edilmesi gereken farklılıklar bulunmaktadır.

# Teknik Bilgiler

## 1 CLSI ve EUCAST Standartları Arasındaki Farklar

### 1.1. Disk difüzyon yöntemi

CLSI disk difüzyon yöntemi ile çeşitli bakterilerin antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenebilmesi için gerekli esasları her 3 senede bir güncellenen M02 kodlu "Antimikrobik Disk Duyarlılık Testleri için Uygulama Standartları" dokümanında belirtmektedir. Güncel sürüm 2012 yılında yayımlanan M02-A11 Antimikrobik Disk Duyarlılık Testleri için Uygulama Standartları; Onaylanmış Standart-Onbirinci Baskı'dır (1). Bakteriler için gerekli test koşulları, disk difüzyon sınır değerleri, disk difüzyon yöntemi ile belirlenebilen direnç fenotiplerinin taranması ve doğrulanması gibi konular her yıl güncellenen M100 kodlu Antimikrobik Duyarlılık Testleri için Uygulama Standartları adlı dokümanda belirtilmektedir. Güncel doküman Ocak 2013'te yayımlanan M100-S23 Antimikrobik Duyarlılık Testleri için Uygulama Standartları-Yirmiüçüncü Bilgi Eki'dir (2). CLSI'nin ayrıca nadir izole edilen ve güç üreyen bakterilerin AMDT bilgilerini belirttiği M45-A2 dokümanı (Nadir İzole Edilen veya Güç Üreyen Bakterilerin Antimikrobik Dilüsyon ve Disk Duyarlılık Testleri için Yöntemler; Onaylanmış Kılavuz-İkinci Baskı) bulunmaktadır (3).

EUCAST ise disk difüzyon yöntemi ile ilgili bilgileri web sitesinde ([http://www.eucast.org/antimicrobial\\_susceptibility\\_testing/disk\\_diffusion\\_methodology/](http://www.eucast.org/antimicrobial_susceptibility_testing/disk_diffusion_methodology/)) paylaşmaktadır. Bu sayfada yer alan dokümanlar Türkçe'ye çevrilmektedir.

CLSI ve EUCAST standartları arasında disk difüzyon yöntemindeki farklar aşağıdaki başlıklarda incelenebilir:

- test edilen bakteri türleri
- test koşulları
  - besiyeri
  - inokulum
  - inkübasyon ısısı
  - inkübasyon süresi
  - atmosfer koşulları
- antibiyotik disk içerikleri
- sınır değerler
- sonuçların değerlendirilmesi
- kalite kontrol kökenleri

### 1.1.1. Test edilen bakteri türleri

CLSI ve EUCAST standartları uyarınca disk difüzyon yöntemi ile test edilebilen bakteriler Tablo 1'de belirtilmektedir.

**Tablo 1.** CLSI ve EUCAST standartları uyarınca disk difüzyon yöntemi ile test edilebilen bakteriler.

CLSI (M100-S23, M45-A2)	EUCAST (Klinik sınır değer tablosu sürüm 4.0)
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.
<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Acinetobacter</i> spp.
<i>Burkholderia cepacia</i>	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus</i> spp.
<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.
<i>Haemophilus influenzae</i> ve <i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> ve <i>Haemophilus parainfluenzae</i>
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Grup A, B, C ve G streptokoklar	Grup A, B, C ve G streptokoklar
Viridans grup streptokoklar	Viridans grup streptokoklar
<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
-	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Pasteurella</i> spp.	<i>Pasteurella multocida</i>
<i>Campylobacter jejuni</i> ve <i>Campylobacter coli</i>	<i>Campylobacter jejuni</i> ve <i>Campylobacter coli</i>
-	<i>Corynebacterium</i> spp. ( <i>Corynebacterium diphtheriae</i> hariç)
<i>Aeromonas</i> spp. ve <i>Plesiomonas shigelloides</i>	-
<i>Vibrio</i> spp. ( <i>Vibrio cholerae</i> dahil)	-

### 1.1.2. Test koşulları

CLSI ve EUCAST standartlarında çeşitli bakteri türlerinin disk difüzyon yöntemi ile duyarlılıklarının saptanmasında kullanılan test koşulları (besiyeri, inokulum, inkübasyon ısısı, süresi ve atmosfer koşulları) Tablo

2'de belirtilmektedir.

Önemli bir farklılık EUCAST'ın güç üreyen bakterilerin (*Streptococcus* grup A, B, C ve G, *Streptococcus pneumoniae*, viridans grup streptokoklar, *H. influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Pasteurella multocida*, *Campylobacter jejuni* ve *coli* ve *Corynebacterium* spp.) disk difüzyon yöntemi ile test edilmesinde Mueller-Hinton Fastidious (MH-F) agarı kullanmasıdır (4). Mueller-Hinton agar + %5 defibrine at kanı ve 20 mg/L  $\beta$ -NAD'den oluşan MH-F agar, laboratuvarlar tarafından hazırlanabileceği gibi, ülkemizde ticari olarak da temin edilebilmektedir.

**Tablo 2.** CLSI ve EUCAST standartları uyarınca disk difüzyon yöntemi ile test edilebilen bakteriler için test koşulları (besiyeri, inokulum, inkübasyon ısısı, süresi ve atmosfer koşulları)

Bakteri	CLSI	EUCAST
<i>Enterobacteriaceae</i>	MHA, 0.5 McFarland, 35±2°C, normal atmosfer, 16-18 saat	MHA, 0.5 McFarland, 35±1°C, normal atmosfer, 18±2 saat
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CLSI)	MHA, 0.5 McFarland, 35±2°C, normal atmosfer, 16-18 saat	
<i>Pseudomonas</i> spp. (EUCAST)		MHA, 0.5 McFarland, 35±1°C, normal atmosfer, 18±2 saat
<i>Acinetobacter</i> spp.	MHA, 0.5 McFarland, 35±2°C, normal atmosfer, 20-24 saat	MHA, 0.5 McFarland, 35±1°C, normal atmosfer, 18±2 saat
<i>Burkholderia cepacia</i>	MHA, 0.5 McFarland, 35±2°C, normal atmosfer, 20-24 saat	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	MHA, 0.5 McFarland, 35±2°C, normal atmosfer, 20-24 saat	MHA, 0.5 McFarland, 35±1°C, normal atmosfer, 18±2 saat
<i>Staphylococcus</i> spp.	MHA, 0.5 McFarland, 35±2°C, normal atmosfer, 16-18 saat Koagülaz-negatif stafilokoklar ve sefoksitin: 20 saat Oksasilin, metisilin, nafsilin: 24 saat	MHA, 0.5 McFarland, 35±1°C, normal atmosfer, 18±2 saat
<i>Enterococcus</i> spp.	MHA, 0.5 McFarland, 35±2°C, normal atmosfer, 20-24 saat Vankomisin: 24 saat	MHA, 0.5 McFarland, 35±1°C, normal atmosfer, 18±2 saat Glikopeptidler: 24 saat
<i>Haemophilus influenzae</i> ve <i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Haemophilus</i> Test Besiyeri, 0.5 McFarland (çikolata agarda üreyen 20-24 saatlik kolonilerden), 35±2°C, %5 CO <sub>2</sub> , 16-18 saat	MH-F, 0.5 McFarland, 35±1°C, %5 CO <sub>2</sub> , 18±2 saat
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	GC agar bazı ve %1 tanımlanmış üreme katkısı, 0.5 McFarland (%5 CO <sub>2</sub> 'de inkübe edilmiş çikolata agarda üreyen 20-24 saatlik kolonilerden MHB veya %0.9 fosfat tamponlu serum fizyolojik içerisinde hazırlanan doğrudan koloni süspansiyonu), 36±1°C, %5 CO <sub>2</sub> , 20-24 saat	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	%5 koyun kanlı MHA, 0.5 McFarland (%5 CO <sub>2</sub> 'de inkübe edilmiş çikolata agarda üreyen 20-24 saatlik kolonilerden), 35±2°C, %5 CO <sub>2</sub> , 20-24 saat	-



Bakteri	CLSI	EUCAST
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	%5 koyun kanlı MHA, 0.5 McFarland (koyun kanlı agarda üreyen 18-20 saatlik kolonilerden), 35±2°C, %5 CO <sub>2</sub> , 20-24 saat	MH-F agar, 0.5 McFarland (koyun kanlı agarda üreyen kolonilerden), 1.0 McFarland (çikolata agarda üreyen kolonilerden), 35±1°C, %5 CO <sub>2</sub> , 18±2 saat
<b>Grup A, B, C ve G streptokoklar</b>	%5 koyun kanlı MHA, 0.5 McFarland (koyun kanlı agarda üreyen 18-20 saatlik kolonilerden), 35±2°C, %5 CO <sub>2</sub> , 20-24 saat	MH-F agar, 0.5 McFarland, 35±1°C, %5 CO <sub>2</sub> , 18±2 saat
<b>Viridans grup streptokoklar</b>	%5 koyun kanlı MHA, 0.5 McFarland (koyun kanlı agarda üreyen 18-20 saatlik kolonilerden), 35±2°C, %5 CO <sub>2</sub> , 20-24 saat	MH-F agar, 0.5 McFarland, 35±1°C, %5 CO <sub>2</sub> , 18±2 saat
<i>Moraxella catarrhalis</i>	MHA, 0.5 McFarland, 35°C, %5 CO <sub>2</sub> , 20-24 saat	MH-F agar, 0.5 McFarland, 35±1°C, %5 CO <sub>2</sub> , 18±2 saat
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	MH-F agar, 0.5 McFarland, 35±1°C, %5 CO <sub>2</sub> , 18±2 saat
<i>Pasteurella</i> spp. (CLSI)	%5 koyun kanlı MHA, 0.5 McFarland, 35°C, normal atmosfer, 16-18 saat	
<i>Pasteurella multocida</i> (EUCAST)		MH-F agar, 0.5 McFarland, 35±1°C, %5 CO <sub>2</sub> , 18±2 saat
<i>Campylobacter jejuni</i> ve <i>Campylobacter coli</i>	%5 koyun kanlı MHA, 0.5 McFarland, mikroaerop ortam (%10 CO <sub>2</sub> , %5 O <sub>2</sub> , %85 N <sub>2</sub> ) 36-37°C'de 48 saat, 42°C'de 24 saat	MH-F, 0.5 McFarland, mikroaerop ortam, 41±1°C, 24 saat. 24 saatlik inkübasyon sonunda yetersiz üreme gösteren kökenler hemen tekrar inkübe edilir ve inhibisyon zonları toplam 40-48 saatlik inkübasyonun ardından değerlendirilir.
<i>Corynebacterium</i> spp. ( <i>Corynebacterium diphtheriae</i> hariç)	-	MH-F, 0.5 McFarland, %5 CO <sub>2</sub> , 35±1°C, 18±2 saat. 16-20 saatlik inkübasyon sonunda yetersiz üreme gösteren kökenler hemen tekrar inkübe edilir ve inhibisyon zonları toplam 40-48 saatlik inkübasyonun ardından değerlendirilir.
<i>Aeromonas</i> spp. ve <i>Plesiomonas shigelloides</i>	MHA, 0.5 McFarland, 35°C, normal atmosfer, 16-18 saat	-
<i>Vibrio</i> spp. ( <i>Vibrio cholerae</i> dahil)	MHA, 0.5 McFarland (serum fizyolojik içerisinde hazırlanmalı), 35±2°C, normal atmosfer, 16-18 saat	-

### 1.1.3. Disk içerikleri farklılıkları

CLSI ve EUCAST standartlarında kullanılan disklerin içerikleri bazı diskler için farklılıklar göstermektedir, farklılık gösteren diskler Tablo 3'de belirtilmiştir.

**Tablo 3.** CLSI ve EUCAST standartları arasında disk içeriği açısından farklılık olan antibiyotikler

Antibiyotik	CLSI	EUCAST	Yorum
Ampisilin	10 µg	10 µg	Gram-negatif basiller için
		2 µg	Gram-pozitif koklar ve <i>Haemophilus influenzae</i> için
Amoksisilin-klavulanat	20/10 µg	20/10 µg	Gram-negatif basiller için
		2/1 µg	<i>Haemophilus influenzae</i> için
Sefotaksim	30 µg	5 µg	
Seftazidim	30 µg	10 µg	
Gentamisin (yüksek-düzyey)	120 µg	30 µg	
Netilmisin	30 µg	10 µg	
Linezolid	30 µg	10 µg	
Nitrofurantoin	300 µg	100 µg	
Penisilin	10 ünite	1 ünite	
Piperasilin	100 µg	30 µg	
Piperasilin-tazobaktam	100/10 µg	30/6 µg	
Vankomisin	30 µg	5 µg	

#### 1.1.4. Sınır değerler

Disk difüzyon yöntemi ile elde edilen inhibisyon zon sınırlarının duyarlı, orta-duyarlı ve dirençli olarak kategorize edilmesi için kullanılan sınır değerler CLSI ve EUCAST dokümanlarında çoğu antibiyotik için farklılık göstermektedir. Bunun bir sebebi yukarıda da belirtildiği gibi bazı antibiyotik disklerinin içeriklerinin farklı olmasıdır, ancak bir mikroorganizma için aynı içeriğe sahip diskler kullanılsa dahi sınır değer farklılıkları olabilmektedir. Bu iki duruma örnek olarak güncel CLSI ve EUCAST dokümanlarına göre *Enterobacteriaceae* için bazı sefalosporinlerin sınır değerleri aşağıda gösterilmektedir (Tablo 4).

**Tablo 4.** CLSI ve EUCAST dokümanlarına göre *Enterobacteriaceae* için bazı sefalosporinlerin sınır değerleri

Antibiyotik	CLSI				EUCAST		
	Disk içeriği	Zon çapı sınır değerleri (mm)			Disk içeriği	Zon çapı sınır değerleri (mm)	
		S	I	R		S ≥	R <
Sefuroksim (parenteral)	30 µg	≥ 18	15-17	≤ 14	30 µg	18	18

Antibiyotik	Disk içeriği	CLSI			EUCAST		
		Zon çapı sınır değerleri (mm)			Disk içeriği	Zon çapı sınır değerleri (mm)	
		S	I	R		S ≥	R <
<b>Sefuroksim (oral)</b>	30 µg	≥ 23	15-22	≤ 14	30 µg	18	18
<b>Seftriakson</b>	30 µg	≥ 23	20-22	≤ 19	30 µg	23	20
<b>Sefotaksim</b>	30 µg	≥ 26	23-25	≤ 22	5 µg	20	17
<b>Seftazidim</b>	30 µg	≥ 21	18-20	≤ 17	10 µg	22	19
<b>Sefepim</b>	30 µg	≥ 18	15-17	≤ 14	30 µg	24	21

Tablo 4'te gözlenebileceği üzere, CLSI ve EUCAST arasında disk içeriği ve sınır değer farklılıkları olduğu gibi, sınır değer tablolarının tasarımında da farklılıklar bulunmaktadır. Duyarlılık sınır değerini belirten değerler her iki standartta da S ≥ biçiminde sunulurken, direnç sınırı CLSI'de R ≤, EUCAST'ta R < biçiminde sunulmaktadır. Ayrıca CLSI'de orta-duyarlı (I) kategorisinin sınırları duyarlı (S) ve dirençli (R) arasında ayrı bir sütunda belirtilirken, EUCAST tabloları basitleştirmek amacıyla orta-duyarlı (I) kategorisine tablolarında yer vermemektedir. EUCAST'a göre orta duyarlı (I) kategorisi S ve R sınır değerleri arasında kalan değerlerdir. Örneğin, S ≥ 22 mm ve R < 19 mm olan seftazidim için orta-duyarlı (I) kategorisi 19-21 mm'dir.

EUCAST sınır değer tablolarının kullanılmasına ilişkin bilgiler aşağıdaki şekilde verilmektedir (Şekil 1).

Antimikrobiyal madde	MİK sınır değeri (mg/L)		Disk içeriği (µg)	Zon çapı sınır değeri (mm)		Notlar
	S ≤	R >		S ≥	R <	
Antimikrobiyal madde A	1 <sup>1</sup>	1 <sup>1</sup>	X	20 <sup>A</sup>	20 <sup>A</sup>	1. MİK sınır değeri ile ilişkili yorum A. Disk difüzyon ile ilişkili yorum
Antimikrobiyal madde B, <i>S. aureus</i>	2	4	Y	26	23	
Antimikrobiyal madde C	YK	YK		YK	YK	
Antimikrobiyal madde D	-	-		-	-	
Antimikrobiyal madde E	HA	HA		HA	HA	
Antimikrobiyal madde F (tarama)	UD	UD		25	25	
Antimikrobiyal madde G	0.5	2	Z	30	24	

Orta-duyarlı kategorisi listelenmemektedir ama S ve R sınır değerleri arasındaki değerler olarak kabul edilir. Eğer S ve R sınır değerleri aynı değerler ise orta-duyarlı kategorisi yoktur.

Madde A: Orta-duyarlı kategorisi yok  
Madde B: Orta-duyarlı kategorisi: 4 mg/L, 23-25 mm  
Madde G: Orta-duyarlı kategorisi: 1-2 mg/L, 24-29 mm

Disk difüzyon (EUCAST standart disk difüzyon yöntemi)  
Besiyeri:  
Inokulum:  
İnkübasyon:  
Değerlendirme:  
Kalite kontrol:

Disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal duyarlılık testi için EUCAST yöntemi ve kalite kontrol önerileri

Tür adı içeren sınır değerler sadece belirtilen tür için kullanılır (bu örnekte *S. aureus*)

Direnç mekanizmasına sahip olan ve olmayan kökenleri birbirinden ayırmak için tarama sınır değerleri

Eğer mavi renk ile belirtilmişse MİK dağılımına bağlantı içerir

Eğer mavi renk ile belirtilmişse gerekçe dokümanına bağlantı içerir

Söz konusu türün bu antibiyotik ile tedavi için iyi bir hedef olduğu hakkında yetersiz kanıt varlığı

Uygun değil

Hazırlık aşamasında

Bir önceki sürümden farklılıklar sarı renk ile belirtilir

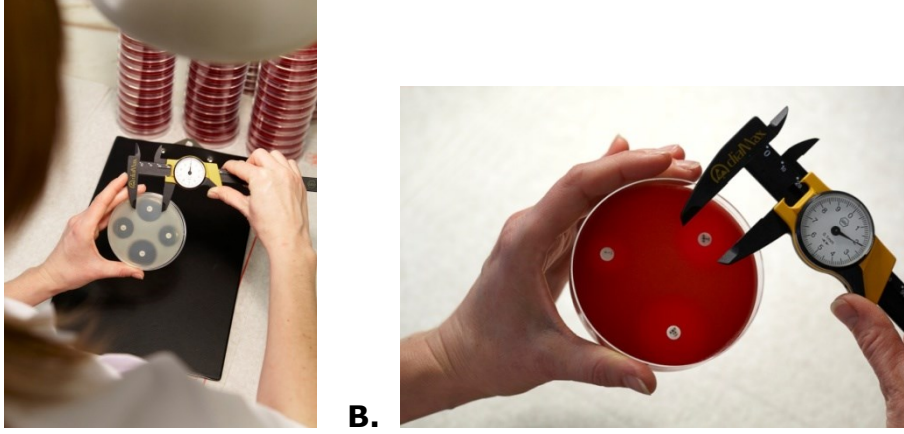
Sınır değer yok. Duyarlılığın test edilmesi önerilmemektedir

Eğer mavi renk ile belirtilmişse zon çapı dağılımına bağlantı içerir

**Şekil 1.** EUCAST sınır değer tablolarının kullanılmasına ilişkin bilgileri içeren kılavuz

### 1.1.5. Sonuçların değerlendirilmesi

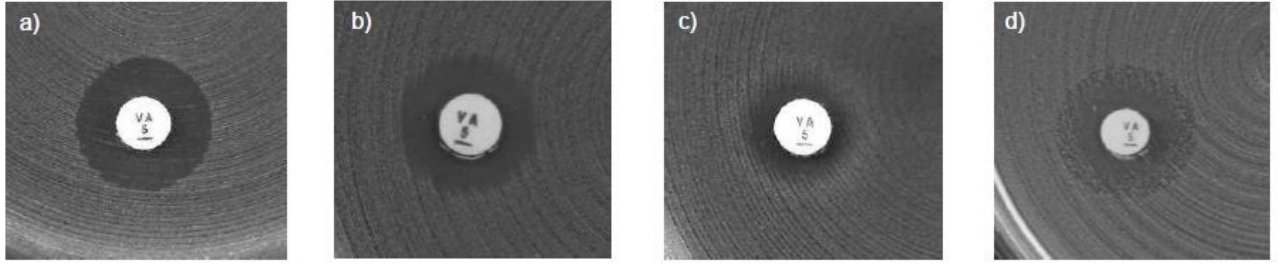
İnkübasyon süresinin sonunda inhibisyon zon çaplarının ölçümü CLSI ve EUCAST için genel olarak aynı esaslara dayansa da, özel bazı organizma-antibiyotik eşleşmeleri için farklılıklar bulunmaktadır. Ana hatlarıyla CLSI ve EUCAST MHA'da uygulanan disk difüzyon testleri için inhibisyon zonu sınırları, yansıyan ışıkla aydınlatılmış siyah bir zemin üzerinde plağa tersinden bakıldığında, çıplak gözle görülebilir üremenin bittiği çizgi olarak kabul edilmektedir (Şekil 2-A). Kan içeren agar plaklarının kullanıldığı durumlarda (CLSI'de %5 koyun kanlı MHA plakları, EUCAST'ta %5 defibrine at kanı ve 20 mg/L  $\beta$ -NAD içeren MH-F plakları) inhibisyon zonu sınırları, yansıyan ışıkla aydınlatılmış ve kapağı açık plağa ön yüzünden bakıldığında, çıplak gözle görülebilir üremenin bittiği çizgi olarak kabul edilmektedir (Şekil 2-B). Ölçüm için plağın ışık kaynağına doğru tutularak, arkadan gelen ışık ile değerlendirilmesini gerektiren durumlar CLSI'de ve EUCAST'ta *Staphylococcus* spp. için linezolid ve *Enterococcus* spp. için vankomisin zon çapı sınırlarının ölçümüdür.



**Şekil 2.** Disk difüzyon testlerinde inhibisyon zon çaplarının ölçümü. (Kaynak: [www.eucast.org](http://www.eucast.org))

**A)** MHA **B)** Kan içeren besiyeri (%5 koyun kanlı MHA veya MH-F).

EUCAST sınır değer tablolarında yer alan ve özel ölçüm/değerlendirme gerektiren durumlara *Enterococcus* spp.'de vankomisin ve *Stenotrophomonas maltophilia*'da trimetoprim-sülfametoksazol inhibisyon zon çaplarının ölçümü örnek gösterilebilir (Şekil 3 ve 4). Sınır değer tablolarında yer verilmeyen diğer özel ölçme/değerlendirme uygulamaları için Türkçe'ye çevrilmiş olan EUCAST Değerlendirme Kılavuzu'na başvurulmalıdır.

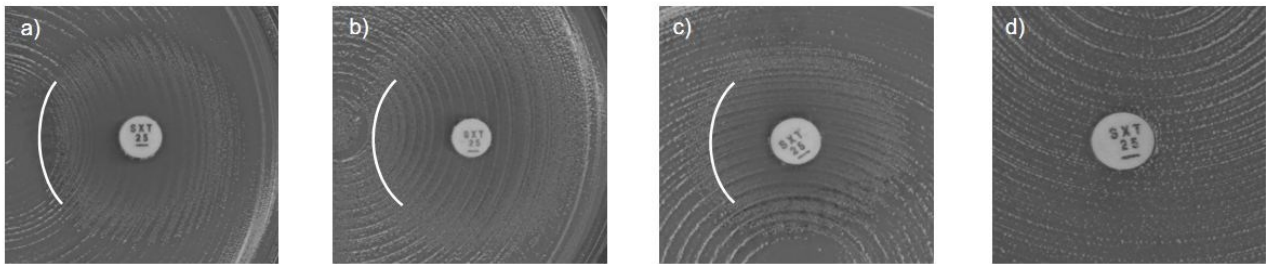


*Enterococcus spp.* ve vankomisin için inhibisyon zonu örnekleri.

a) Keskin zon sınırı ve zon çapı  $\geq 12$  mm. Duyarlı olarak bildirilir.

b-d) Belirsiz zon sınırı veya zon içinde koloniler. Zon çapı  $\geq 12$  mm olsa dahi dirençli olarak bildirilir.

**Şekil 3.** *Enterococcus spp.* ve vankomisin için inhibisyon zon çaplarının değerlendirilmesi. (Kaynak: www.eucast.org)



*Stenotrophomonas maltophilia* ve trimetoprim-sülfametoksazol için inhibisyon zonu örnekleri.

a-c) Dış zon görülebilmektedir. Zon çapı  $\geq 16$  mm ise duyarlı olarak bildirilir.

d) Diske kadar üreme var ve inhibisyon zonu görülüyor. Dirençli olarak bildirilir.

**Şekil 4.** *Stenotrophomonas maltophilia* ve trimetoprim-sülfametoksazol için inhibisyon zon çaplarının değerlendirilmesi. (Kaynak: www.eucast.org)

### 1.1.6. Kalite kontrol kökenleri

Disk difüzyon testlerinin rutin iç kalite kontrolü için EUCAST tarafından önerilen kökenler aşağıda belirtilmektedir:

<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC® 27853
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC® 29213
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC® 29212
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC® 49619
<i>Haemophilus influenzae</i>	NCTC 8468
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC® 33560

Bu liste CLSI'nin aynı amaçla önerdiği kökenlerle benzerlik gösterse de, CLSI'de kullanılan ek kalite kontrol kökenleri olabildiği gibi, bazı kökenler farklı bakterilerin kalite kontrolü için kullanılabilmektedir. CLSI ve EUCAST'a göre disk difüzyon testlerinin rutin kalite kontrolünde kullanılacak kalite kontrol kökenleri Tablo 5'te belirtilmiştir.

**Tablo 5.** CLSI ve EUCAST'a göre disk difüzyon testlerinin rutin kalite kontrolünde kullanılacak kalite kontrol kökenleri

Kalite Kontrol Kökeni		
Bakteri	CLSI	EUCAST
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922 <i>Escherichia coli</i> ATCC® 35218 (β-laktam/β-laktamaz inhibitör kombinasyonları için)	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CLSI)	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922 <i>Escherichia coli</i> ATCC® 35218 (β-laktam/β-laktamaz inhibitör kombinasyonları için) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	
<i>Pseudomonas spp.</i> (EUCAST)		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853
<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853 <i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922 <i>Escherichia coli</i> ATCC® 35218 (β-laktam/β-laktamaz inhibitör kombinasyonları için)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922 <i>Escherichia coli</i> ATCC® 35218 (β-laktam/β-laktamaz inhibitör kombinasyonları için) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922 <i>Escherichia coli</i> ATCC® 35218 (β-laktam/β-laktamaz inhibitör kombinasyonları için) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922
<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923 <i>Escherichia coli</i> ATCC® 35218 (β-laktam/β-laktamaz inhibitör kombinasyonları için)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 29213
<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212
<i>Haemophilus influenzae ve Haemophilus parainfluenzae</i> (CLSI)	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 49247 <i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 49766 <i>Escherichia coli</i> ATCC® 35218 (amoksisilin-klavulanat için)	
<i>Haemophilus influenzae</i> (EUCAST)		<i>Haemophilus influenzae</i> NCTC 8468
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC®	-

	49226	
<b><i>Neisseria meningitidis</i></b>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619	-
	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	
<b><i>Streptococcus pneumoniae</i></b>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619
<b>Grup A, B, C ve G streptokoklar</b>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619
<b>Viridans grup streptokoklar</b>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619
<b><i>Moraxella catarrhalis</i></b>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	<i>Haemophilus influenzae</i> NCTC 8468
	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 35218 (β-laktam/β-laktamaz inhibitör kombinasyonları için)	
<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619
<b><i>Pasteurella</i> spp. (CLSI)</b>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619	
	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 35218 (β-laktam/β-laktamaz inhibitör kombinasyonları için)	
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923 (amoksisilin-klavulanat ve doksisisiklin için)	
<b><i>Pasteurella multocida</i> (EUCAST)</b>		<i>Haemophilus influenzae</i> NCTC 8468
<b><i>Campylobacter jejuni</i> ve <i>Campylobacter coli</i></b>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC® 33560
<b><i>Corynebacterium</i> spp. (<i>Corynebacterium diphtheriae</i> hariç)</b>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619
<b><i>Aeromonas</i> spp. ve <i>Plesiomonas shigelloides</i></b>	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	-
	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 35218 (β-laktam/β-laktamaz inhibitör)	
<b><i>Vibrio</i> spp. (<i>Vibrio cholerae</i> dahil)</b>	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	-
	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 35218 (β-laktam/β-laktamaz inhibitör kombinasyonları için)	

## 1.2. Kolay ve güç üreyen mikroorganizmalar için MİK belirlenmesi

CLSI üç yılda bir yayımladığı M07 dokümanlarında aerop üreyen bakterilerde sıvı makrodilüsyon, sıvı mikrodilüsyon ve agar dilüsyon yöntemleri ile MİK saptamak üzere referans yöntemleri tanımlanmaktadır. Bu dokümanların sonucusu Ocak 2012'de yayımlanan "Aerop Üreyen Bakteriler İçin Dilüsyon Yöntemi ile Antimikrobik Duyarlılık Testleri; Onaylanmış Standart-Dokuzuncu Baskı. CLSI dokümanı M07-A9"dur (5). Bu dokümanda yöntemler ayrıntılarıyla açıklanmaktadır.

EUCAST ise MİK saptanması üzere ayrı bir doküman sunmamakta ve kolay üreyen organizmalarda MİK saptanması için EUCAST önerilerinin

Uluslararası Standartlar Organizasyonu (International Standards Organization, ISO) ile tamamen uyduğunu belirtmekte ve kullanıcılarını ISO dokümanlarına yönlendirmektedir. İlgili ISO dokümanı olan Uluslararası Standart ISO 20776-1 "Enfeksiyon hastalıkları ile ilişkili hızlı üreyen aerop bakterilerin antimikrobik maddelere karşı in vitro etkinliklerinin test edilmesi için referans yöntem" dahilinde genel olarak sıvı mikrodilüsyon yöntemi tarif edilmektedir (6). EUCAST'ın güç üreyen organizmalarda MİK saptanması için önerdiği MH-F sıvı besiyeri bu dokümanda yer almamaktadır. EUCAST internet sitesinde kolay üreyen (Mueller-Hinton sıvı besiyeri) ve güç üreyen (defibrine at kanı ve beta-NAD içeren Mueller-Hinton fastidious sıvı besiyeri) organizmalar (*S. pneumoniae* dahil streptokoklar, *H. influenzae*, *Pasteurella* spp. ve diğerleri) için EUCAST yöntemini özetleyen bir dokümanın hazırlık aşamasında olduğu belirtilmektedir.

## 2 EUCAST Standartları Kullanımına Geçiş Süreci

EUCAST ile disk difüzyon yöntemini ilk kez uygulayacak laboratuvarlar için EUCAST'ın internet sitesinde ([www.eucast.org](http://www.eucast.org)) bu geçişe yardımcı olacak dokümanlar bulunmaktadır.

EUCAST standartlarını kullanacak ülkeler için yapılması gerekenler aşağıda özetlenmektedir:

- Ulusal Antimikrobik Duyarlılık Test Komitesi (NAC) ile iletişime geçin. (Türkiye'de EUCAST tarafından kabul edilmiş Ulusal Antimikrobik Duyarlılık Test Komitesi Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'nin ADTS çalışma grubudur.)
- Laboratuvarında kullanılan tüm yöntemleri tanımlayın (disk difüzyon, otomatize sistemler, antibiyotik gradyan testleri ve diğerleri).
- Tüm yöntemlerin EUCAST standartlarına geçiş için hazır olduklarından emin olun.
- Etkilenebilecek destek sistemlerini (laboratuvar akreditasyonu, kılavuzlar, laboratuvar bilgi sistemi, zorunlu bildirim sistemleri, vb.) belirleyin.
- Laboratuvar çalışanları arasından bir "lider" belirleyin, bu kişi geçiş sürecinde tüm sorumluluğu alacak ve öncülük yapacaktır.
- EUCAST standartlarına geçmiş olan bir laboratuvar ile iletişime geçin.
- Çalışanlarınızın bu laboratuvarı ziyaret etmesini sağlayın.
- Tüm paydaşları (laboratuvar çalışanları, müşteri/kullanıcılar, antimikrobik direnç sürveysi programları ve AMDT gereç ve cihazlarının dağıtıcıları) belirleyip, bilgilendirin.



- Gerekli AMDT malzemelerinin hazır olduğundan emin olun (bunun için EUCAST internet sitesinde yer alan ve düzenli aralıklarla güncellenen "AMDT malzeme ve cihaz üreticilerinin EUCAST kılavuzları ile uyumu (Compliance of manufacturers of AST materials and devices with EUCAST guidelines)" dokümanından faydalanılabilir).
- Geçiş için bir tarih belirleyerek laboratuvarında 3-6 aylık bir eğitim programı uygulayın.
- Dış kalite kontrol değerlendirme programı organizatörlerini bilgilendirin.

### 2.1. Otomatize AMDT Sistemleri

Kullanılan sistemin tüm gerekli antibiyotikler için EUCAST sınır değerlerini uygulayabileceğinden emin olunmalı ve sistemin EUCAST ile uyum durumunun firmadan talep edilmesi gereklidir. EUCAST sınır değerlerinde bulunan "YK" (yetersiz kanıt) ifadesi ve "-" işareti sınır değer anlamı içerir, bunları içeren antibiyotik-organizma eşleşmeleri için başka standartların sınır değerleri kullanılmamalıdır. Otomatize AMDT sistemlerinin EUCAST yöntemleri ile uyumu yukarıdaki başlıkta da belirtilen AMDT malzeme ve cihaz üreticilerinin EUCAST kılavuzları ile uyumu dokümanından takip edilebilir. Ulusal konularda ADTS'ye başvurulmalıdır, ADTS Türkiye'de yaygın olarak kullanılan otomatize AMDT sistemi üreticisi firmaların yetkilileri ile işbirliği yaparak, Türkiye'de mevcut antibiyotikleri içeren ve EUCAST ile uyumlu AMDT panellerinin üretilmesi için çalışmalarını sürdürmektedir.

### 2.2. EUCAST Standartlarının Sağlayacağı Katkı

#### 2.2.1. Yeni belirlenmiş sınır değerler

EUCAST sınır değerlerin belirlenmesinde ve düzenli aralıklarla gözden geçirilmesinde oldukça dinamik bir yaklaşım sergilemektedir. Kullanılmakta olan tüm EUCAST sınır değerleri 10 yaştan daha gençtir. Bu birçok açıdan EUCAST'a önemli avantaj sağlamaktadır, çünkü;

- Doz uygulama yöntemleri (dozaj) değişebilmekte,
- İlacın verilmiş yolu değişebilmekte,
- Tedavi endikasyonları değişebilmekte,
- Yeni direnç mekanizmaları çıkabilmekte,
- Sınır değerleri belirleyecek yeni yöntemler geliştirilebilmektedir.

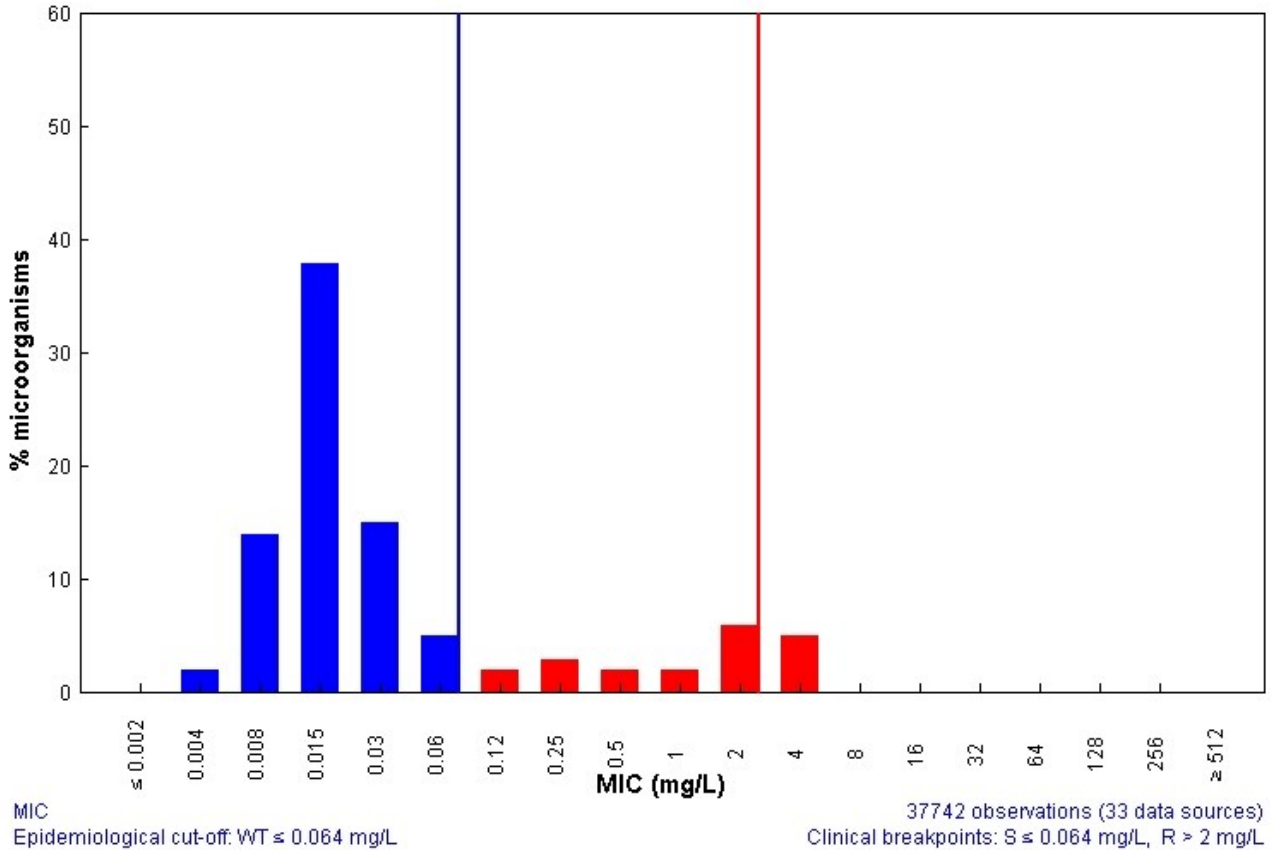
#### 2.2.2. Epidemiyolojik eşik değer kavramı

EUCAST'ın vurguladığı önemli bir kavram epidemiyolojik eşik değer (epidemiological cut-off - ECOFF) kavramıdır. Söz konusu ilaca karşı kazanılmış veya mutasyona bağlı direnç göstermeyen tür üyeleri sokak tipi (ST) olarak kabul edilir. Kazanılmış veya mutasyona bağlı direnç gösteren

ve ST olmayan kökenleri ST kökenlerden ayıran, zaman içerisinde değişiklik göstermeyen uygun sınır değerler epidemiyolojik eşik değer olarak adlandırılır. Epidemiyolojik eşik değerler tedavi ile ilişkili olan klinik sınır değerlerden farklıdır (Şekil 5).

**Benzilpenicillin / *Streptococcus pneumoniae***  
**EUCAST MIC Distribution - Reference Database 2014-01-02**

MIC distributions include collated data from multiple sources, geographical areas and time periods and can never be used to infer rates of resistance



**Şekil 5.** *Streptococcus pneumoniae*'de benzilpenisilin için MİK dağılımı. Benzilpenisilin için kazanılmış ve mutasyonel direnç içermeyen (mavi) ve içeren (kırmızı) kökenler epidemiyolojik eşik değer olan ≤ 0.064 mg/L ile ayrılmaktadır. ECOFF değeri altında kalan kökenler sokak tipi (wild type, WT) kabul edilmektedir.

ECOFF kullanımı ile;

ST kökenler, ST olmayan kökenlerden ayrılabilir

Antimikrobiyal direnç süreyansında güvenilir bir değer olarak kullanılabilir

- Klinik sınır değerler zamanla değişiyor
- Klinik sınır değerler yeterince duyarlı değil
- Klinik sınır değerlerin henüz belirlenmediği antibiyotikler mevcut
- Klinik sınır değerler standartlar arasında değişiklik gösterebiliyor (CLSI, FDA, EUCAST)
- Klinik sınır değerler insan ve hayvan kaynaklı kökenler arasında farklılık

gösteriyor

Direnç özgül ve duyarlı olarak saptanabilir (taranabilir)

- *S. pneumoniae*'de penisilin direncinin saptanması için oksasilin kullanımı
- *S. aureus*'ta metisilin direncinin saptanması için sefoksitin kullanımı
- *H. influenzae*'de tüm beta-laktamlara karşı direncin saptanması için benzilpenisilin kullanımı
- *Enterobacteriaceae*'de KPC enziminin taranması için meropenem kullanımı
- *Salmonella* spp.'de siprofloksasin duyarlılığının taranması için pefloksasin kullanımı
- Bazı Gram-pozitif bakterilerde florokinolon duyarlılığının taranması için norfloksasin kullanımı

### 2.2.3. EUCAST dokümanlarına internet üzerinden ücretsiz erişim

EUCAST'ın tüm dokümanlarına internet üzerinden ücretsiz erişilebilmesi, dokümanların herhangi bir telif hakkı ödenmeden Türkçe'ye çevrilebilmesi sayesinde her zaman güncel bilgilere erişim olası olacaktır.

## İlgili diğer UMS belgeleri

<http://uamdss.thsk.gov.tr> adresinde yer alan EUCAST Türkçe Çevirilerinden yararlanılabilir.

## Kaynaklar

1. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
2. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
3. CLSI. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline—Second Edition. CLSI document M45-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
4. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, 2014. <http://www.eucast.org>.
5. CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
6. ISO. Clinical laboratory testing and *in vitro* diagnostic test systems — Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices — Part 1: Reference method for testing the *in vitro* activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. ISO Standard 20776-1. Switzerland: International Organization for Standardization; 2006.



T.C. Sağlık Bakanlığı

## ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

# ANTİBİYOGRAM YORUMLAMA KRİTERLERİ VE KISITLI BİLDİRİM KURALLARI

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu 11
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri (AMDT)
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	AMD-TB-03
Sürüm No	1.0
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

## İÇİNDEKİLER

<b>ANTİBİYOGRAF YORUMLAMA KRİTERLERİ VE KISITLI BİLDİRİM KURALLARI</b> .....	1
KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	3
GENEL BİLGİ .....	4
TEKNİK BİLGİLER .....	5
1 ANTİBİYOGRAF YORUMLAMA KRİTERLERİ VE KISITLI BİLDİRİM KURALLARI.....	5
1.1.Antibiyogram Yorumlama Kriterleri.....	5
1.2.Kısıtlı Bildirim.....	14
KAYNAKLAR.....	22

## Kapsam ve Amaç

Bu doküman, enfeksiyon etkeni mikroorganizmalar için gerçekleştirilen antimikrobiyal duyarlılık testlerinin sonuçları uyarınca oluşturulan antibiyoqramlar için antibiyoqram yorumlama kriterleri ve kısıtlı bildirim kurallarını kapsamaktadır. Enfeksiyon hastalıklarında etkene yönelik en uygun antimikrobiyalleri test etmek, test sonuçlarını kısıtlı olarak bildirmek ve bu sayede hastanın tedavisi için en uygun seçenekleri klinisyene sunmak ve direnç gelişimini mümkün olduğunca engelleyecek esasların belirtilmesi amaçlanmaktadır.

## Kısaltmalar ve Tanımlar

<b>AMDT</b>	Antimikrobiyal duyarlılık testi
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection (Amerikan Tür Kültürü Koleksiyonu)
<b>BOS</b>	Beyin omurilik sıvısı
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute (Klinik ve Laboratuvar Standartları Kurumu) ( <a href="http://www.clsi.org">http://www.clsi.org</a> )
<b>EUCAST</b>	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi) ( <a href="http://www.eucast.org">http://www.eucast.org</a> )
<b>GSBL</b>	Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz
<b>MİK</b>	Minimum inhibitör konsantrasyon
<b>MLSB</b>	Makrolid-linkozamid-streptogramin B
<b>MRSA</b>	Metisilin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>PBP</b>	Penisilin bağlayan protein

## Genel Bilgi

Antibiyotiklere direnç gelişimini önlemek için geliştirilen politikaların en önemli komponenti kanıta dayalı tıp uygulamalarına ağırlık vermek ve bu anlamda kültür antibiyogram sonuçlarına göre hareket etmektir. Antibiyogram yapılırken etkene göre öncelikli antibiyotikler seçilip test edilmelidir. Bilindiği gibi her antibiyotik her etkene uygun değildir. Ayrıca geniş spektrumlu antibiyotikler hedeflenen bakterinin üremesini durdururken veya öldürürken, diğer bakterilere de etki edebilmekte ve diğer bakterilerin direnç geliştirmesine yol açmaktadır. Bu nedenle antibiyogram yaparken etkene yönelik antibiyotiklerin çalışması yeterli değildir, rapor ederken de çalışılan her antibiyotik bildirilmemeli, direnç gelişimini önleyici önlemler doğrultusunda seçici davranılmalı ve kısıtlı bildirim uygulanmalıdır.

Antimikrobiyal duyarlılık testlerinin (AMDT) uygulanması ve değerlendirilmesi her klinik mikrobiyoloji laboratuvarının günlük faaliyetleri arasında yer almaktadır. Antimikrobiyal direnç mekanizmalarının çeşitliliğinde gözlenen sürekli artış ve bu mekanizmaların klinik yansımaları, AMDT sonuçlarını değerlendirmek üzere ileri bir bilgi düzeyini gerekli kılmaktadır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarları AMDT uygularken ve sonuçları değerlendirirken, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (1) veya European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2) gibi kuruluşların yayınladığı kılavuzlardan faydalanmaktadırlar. Bu kılavuzlar duyarlılık sonuçlarını duyarlı, orta-duyarlı ve dirençli olarak kategorize edecek sınır değerler yayınlamaktadır. Böylelikle test edilen antibiyotikler için AMDT sonuçlarının klinisyene kategorize edilerek bildirilmesi mümkün olabilmektedir.



## Teknik Bilgiler

# 1 ANTİBİYOGRAM YORUMLAMA KRİTERLERİ VE KISITLI BİLDİRİM KURALLARI

## 1.1 Antibiyoqram Yorumlama Kriterleri

Fenotipe yansıyan direnç mekanizmasının genetik temelini dikkate alınmasıyla ve antimikrobialların tek tek değil, sınıflar halinde değerlendirilmesiyle klinisyene sunulan sonucu ileri bir düzeye taşımak mümkündür. Bu uygulama ile duyarlı olarak bulunan bir antimikrobiyal dirençli olarak bildirilebilir veya test edilmediği halde bir antimikrobiyalın duyarlılığı sonuç raporunda belirtilebilir. Söz konusu değerlendirme sürecinde kullanılan bilgilere "uzman kurallar", uzman kurallar eşliğinde AMDT sonuçlarının tedaviyi yönlendirecek şekilde değerlendirilmesine ise "yorumlayarak değerlendirme" denilmektedir (3).

Günlük kullanımda oldukça fazla sayıda antimikrobiyal kullanılıyor olsa da, esas olarak antimikrobiallar birkaç antimikrobiyal sınıfına üyedir. Aynı sınıfta yer alan antimikrobiallar yapısal olarak benzerlik gösterirler ve sıklıkla etki mekanizmaları da benzerdir. Dolayısıyla, aynı sınıfta yer alan antimikrobiallar sıklıkla (bazen değişen oranlarda) aynı direnç mekanizmasından etkilenirler (çapraz direnç). Makrolid, linkozamid ve streptogramin sınıfı antimikrobiallar ise yapısal olarak çok farklılık göstermelerine rağmen, hücre içerisinde aynı hedef bölgeyi paylaştıkları için AMDT sonuçlarının değerlendirilmesinde işlevsel olarak aynı grupta ele alınırlar. Bu sebeplere bağlı olarak AMDT sonuçlarını yorumlayarak değerlendirme, test edilen tüm antimikrobialların eş zamanlı olarak değerlendirilmesini gerektirir. Altta yatan direnç mekanizması ile ilgili gereken bilgiyi sağlamak üzere, aynı antimikrobiyal sınıftan mümkün olan en az sayıda antimikrobiyal kullanılmalıdır. Bir sınıfı temsilen seçilecek antimikrobiyal direnç mekanizmasından en fazla etkilenecek, yani direnci en iyi saptayacak antimikrobiyal olmalıdır (4).

Yorumlayarak değerlendirme sürecinde mikroorganizmaların doğal dirençli oldukları bilinen antibiyotiklerden, beklenmeyen direnç fenotiplerinden ve yorumlama kurallarından faydalanılmaktadır (5).

### Doğal Direnç

Bir bakteri türünün tüm veya hemen hemen tüm kökenlerinde gözlenen, kazanılmış ve/veya mutasyona bağlı olmayan direnç türüdür. Bakterileri doğal dirençli oldukları antimikrobiallar için test etmek gereksizdir. Ancak test edilen bakterinin doğal dirençli olduğu bilinen bir antimikrobiyal test panelinde yer alıyorsa ve sonuç olarak duyarlı saptanıyorsa, muhtemelen bakterinin tanımlamasında veya AMDT'de hata olduğu belirlenebilir. Tekrarlayan testlerle köken duyarlı bulunuyorsa da, tedavide bakterinin doğal dirençli olduğu bilinen antimikrobialların kullanımından kaçınılmalıdır. Doğal dirence örnek olarak Enterobacteriaceae üyelerinin benzil penisilin, glikopeptidler, fusidik asit, linkozamid, streptogramin, rifampin, daptomisin ve linezolide, Proteus mirabilis'in nitrofurantoin ve kolistine, Serratia marcescens'in kolistine, Stenotrophomonas maltophilia'nın karbapenemlere, Gram pozitif bakterilerin aztreonama ve enterokokların fusidik asite dirençli olmaları gösterilebilir (5).

Tipik örnekler ve doğal direnç mekanizmaları:

Anaerob bakterilerde aminoglikozid direnci

- Aminoglikozidin alımını sağlayan oksidatif mekanizma yokluğu

Aerobik bakterilerde metronidazol direnci

- İlacın aktif formuna indirgenmesinin anaerob ortama ihtiyaç göstermesi

Gram pozitif bakterilerde aztreonam direnci

- Bu beta-laktamı bağlayan PBP'nin (penisilin bağlayan protein) yokluğu

Gram negatif bakterilerde vankomisin direnci

- Dış membrana nüfuz edememesi

*Klebsiella* spp.'de ampisilin direnci

- İlacın hedefi olan PBP'ye erişmeden beta-laktamazlar tarafından parçalanması

*Pseudomonas aeruginosa*'da sülfonamid, trimetoprim, tetrasiklin, kloramfenikol direnci

- İlacın etkin konsantrasyona ulaşacak şekilde hücre içine alınamaması

Enterokoklarda aminoglikozid direnci

- Aminoglikozidin hücre içine alımını sağlayacak oksidatif mekanizmanın yetersizliği

Enterokoklarda sefalosporin direnci

- Sefalosporinleri bağlayan PBP'nin yokluğu

*Stenotrophomonas maltophilia*'da imipenem direnci

- İlacın hedefi olan PBP'ye erişmeden beta-laktamazlar tarafından parçalanması

*Lactobacillus* ve *Leuconostoc*'da vankomisin direnci

- Hücre duvarında vankomisinin bağlanacağı hedefin olmaması

### a) Gram Negatif Bakteriler

Gram-negatif bakterilerde doğal direnç Tablo 1 (Enterobacteriaceae), Tablo 2 (Nonfermentatif Gram-negatif bakteriler) ve Tablo 3'te (Enterobacteriaceae ve nonfermentatif Gram-negatif bakteriler dışındaki Gram-negatif bakteriler) özetlenmektedir (5).

**Tablo 1.** Enterobacteriaceae'de doğal direnç. Enterobacteriaceae ayrıca benzilpenisilin, glikopeptidler, fusidik asit, (bazı istisnalara ile) makrolidler, linkozamidler, streptograminler, rifampisin, daptomisin ve linezolidde de doğal dirençlidir.

Organizma	AMP	AMC	TIC	PRL	CFZ	FOX	CFM	CXM	AG	TE/TGC	PB/CL	NIT
<i>Citrobacter koseri</i>	R	-	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	-	-	R	R	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	-	-	R	R	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	R	-	-	R	R	-	-	-	-	-	-

## Antibiyogram Yorumlama Kriterleri ve Kısıtlı Bildirim Kuralları

Organizma	AMP	AMC	TIC	PRL	CFZ	FOX	CFM	CXM	AG	TE/TGC	PB/CL	NIT
<i>Escherichia hermannii</i>	R	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hafnia alvei</i>	R	R	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella spp.</i>	R	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Morganella morganii</i>	R	R	-	-	R	-	-	R	-	R	R	R
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	R
<i>Proteus vulgaris</i>	R	-	-	-	R	-	R	R	-	R	R	R
<i>Proteus penneri</i>	R	-	-	-	R	-	R	R	-	R	R	R
<i>Providencia rettgeri</i>	R	R	-	-	R	-	-	-	-	R	R	R
<i>Providencia stuartii</i>	R	R	-	-	R	-	-	-	Not <sup>b</sup>	R	R	R
<i>Serratia marcescens</i>	R	R	-	-	R	-	R	R	Not <sup>c</sup>	-	R	R
<i>Yersinia enterocolitica</i>	R	R	R	-	R	R	R	-	-	-	-	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-

**Antibiyotik kısaltmaları:** AMP, ampisilin; AMC, amoksisilin-klavulanat; TIC, tikarsilin; PRL, piperasilin; CFZ, sefazolin; FOX, sefoksitin; CFM, sefamandol; CXM, sefuroksim; AG, aminoglikozidler; TE/TGC, tetrasiklin-tigesiklin; PB/CL, polimiksin B/kolistin; NIT, nitrofurantoin.

R, dirençli.

<sup>a</sup>Azitromisin tifoid ateşin tedavisinde *in vivo* etkinliğe sahiptir ve eritromisin turist ishali tedavisinde kullanılabilir.

<sup>b</sup>*Providencia stuartii* kromozomal AAC(2')-Ia enzimi üretir ve amikasin, arbekasin ve streptomisin dışındaki klinik kullanımı olan aminoglikozidlere dirençli kabul edilmelidir.

Bazı izolatlar bu enzimi zayıf üretirler ve *in vitro* netilmisine duyarlı bulunabilirler ama mutasyon enzimin aşırı üretimine neden olabileceğinden dirençli olarak bildirilmelidir.

<sup>c</sup>Tüm *Serratia marcescens* kökenleri streptomisin, gentamisin ve arbekasin dışındaki klinik kullanımı olan aminoglikozidleri etkileyen kromozomal AAC(6')-Ic enzimi üretirler.

**Tablo 2.** Nonfermentatif Gram-negatif bakterilerde doğal direnç. Nonfermentatif Gram-negatif bakteriler ayrıca benzilpenisilin, sefoksitin, sefamandol, sefuroksim, glikopeptidler, fusidik asit, makrolidler, linkozamidler, streptograminler, rifampisin, daptomisin ve linezolidde de doğal dirençlidir.

Organizma	AMP	AMC	TIC	TIC/CLA	PRL	TZP	CFZ	CTX	CRO	CAZ
<i>Acinetobacter baumannii</i>	R <sup>a</sup>	R <sup>a</sup>	-	-	-	-	R	R	R	-
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>										
<i>Achromobacter xylooxidans</i>	R	-	-	-	-	-	R	R	R	-
<i>Burkholderia cepacia</i> kompleks <sup>b</sup>	R	R	R	R	-	-	R	-	-	-
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	R	-	R	R	-	-	R	R	R	R
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	-	-	-	-	R	R	R	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	R	R	R	-	R	R	R	R	R	R <sup>f</sup>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	-	-	-	-	-	R	-	R	-
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>										
<i>Achromobacter xylooxidans</i>	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Burkholderia cepacia</i> kompleks <sup>b</sup>	R	R	-	R	R	R <sup>c</sup>	R	-	R	-
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	R	R	R	-	-	-	-	-	-	R
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-

## Antibiyogram Yorumlama Kriterleri ve Kısıtlı Bildirim Kuralları

Organizma	AMP	AMC	TIC	TIC/CLA	PRL	TZP	CFZ	CTX	CRO	CAZ	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	-	-	-	R	Not <sup>d</sup>	R <sup>e</sup>	R <sup>e</sup>	-	R	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	R	R	R	-	-	Rc	R <sup>g</sup>	-	R	-	-

Antibiyotik kısaltmaları: AMP, ampisilin; AMC, amoksisilin-klavulanat; TIC, tikarsilin; TIC/CLA, tikarsilin-klavulanat; PRL, piperasilin; TZP, piperasilin-tazobaktam; CFZ, sefazolin; CTX, sefotaksim; CRO, seftriakson; CAZ, seftazidim; ETP, ertapenem; IMP, imipenem; MEM, meropenem; CIP, siprofloksasin; CHL, kloramfenikol; AG, aminoglikozidler; TMP, trimetoprim; SXT, trimetoprim-sülfametoksazol; FOS, fosfomisin; TE/TGC, tetrasiklin-tigesiklin; PB/CL, polimiksin B/kolistin.

R, dirençli.

aAcinetobacter baumannii sulbaktamın bu türe üzerindeki etkinliği sayesinde ampisilin-sulbaktama duyarlı bulunabilir.

<sup>b</sup>*Burkholderia cepacia* kompleks içerisinde farklı türler bulunmaktadır. Bazı türler, bazı beta-laktamlara *in vitro* duyarlı bulunabilir ama klinik olarak dirençlidirler ve tabloda R olarak gösterilmektedirler.

<sup>c</sup>*Burkholderia cepacia* ve *Stenotrophomonas maltophilia* tüm aminoglikozidlere doğal dirençlidirler. Doğal direnç zayıf geçirgenliğe ve putatif dışı atım pompasına bağlıdır. Ek olarak, çoğu *Stenotrophomonas maltophilia* kökeni AAC(6')Iz enzimi üretir.

<sup>d</sup>*Pseudomonas aeruginosa* düşük-düzye APH(3')-IIb aktivitesine bağlı olarak kanamisin ve neomisine doğal dirençlidir.

<sup>e</sup>*Pseudomonas aeruginosa* tipik olarak trimetoprime dirençli, sülfonamidlere orta seviyede duyarlıdır. Trimetoprim-sülfametoksazol *in vitro* duyarlı bulunabilir ancak dirençli kabul edilmelidir.

<sup>f</sup>*Stenotrophomonas maltophilia*'da seftazidim için düşük MİK değerleri gözlenebilir ancak dirençli kabul edilmelidir.

<sup>g</sup>*Stenotrophomonas maltophilia*'da tipik olarak trimetoprim-sülfametoksazole duyarlıdır ama tek başına trimetoprime dirençlidir.

**Tablo 3.** *Enterobacteriaceae* ve non-fermenter Gram-negatif bakteriler dışındaki Gram-negatif bakterilerde doğal direnç. Tabloda listelenen bakteriler ayrıca glikopeptidler, linkozamidler, daptomisin ve linezolidde de doğal dirençlidir.

Organizma	Makrolidler	Fusidik asit	Streptograminler	Trimetoprim	Nalidiksik asit
<i>Haemophilus influenzae</i>	I	R	-	-	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	-	-	R	-
<i>Neisseria spp.</i>	-	-	-	R	-
<i>Campylobacter fetus</i>	-	R	R	R	R
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	R	R	R	-
<i>Campylobacter coli</i>					

R, dirençli; I, orta-duyarlı.

### b) Gram Pozitif Bakteriler

Gram pozitif bakterilerde doğal direnç Tablo 4'te özetlenmektedir (5).

**Tablo 4.** Gram-pozitif bakterilerde doğal direnç. Gram-pozitif bakteriler ayrıca aztreonam, temosilin, polimiksin B/kolistin ve nalidiksik asite de doğal dirençlidir

Organizma	Sefalosporinler (CAZ hariç)											
	FA	CAZ	AG	E	DA	QD	VA	TEI	FOS	NOV	SSS	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	R	R	-	-	-	-	-	-	R	R	-	
<i>Staphylococcus cohnii</i> <i>Staphylococcus xylosus</i>	-	R	-	-	-	-	-	-	-	R	-	
<i>Staphylococcus capitis</i>	-	R	-	-	-	-	-	-	R	-	-	
<b>Diğer koagülaz-negatif stafilokoklar ve <i>Staphylococcus aureus</i></b>												
<i>Streptococcus spp.</i>	R	-	-	R <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Enterococcus faecalis</i>	R	R	R	R <sup>a</sup>	R	R	R	-	-	-	R	
<i>Enterococcus gallinarum</i>	R	R	R	R <sup>a</sup>	R	R	R	R	-	-	R	
<i>Enterococcus casseliflavus</i>												

Organizma	FA	CAZ	Sefalo- sporinler (CAZ hariç)	AG	E	DA	QD	VA	TEI	FOS	NOV	SSS
<i>Enterococcus faecium</i>	R	R	R	R <sup>a,b</sup>	R	-	-	-	-	-	-	R
<i>Corynebacterium spp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leuconostoc spp., Pediococcus spp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	R	R	-	-	-
<i>Lactobacillus spp. (bazı türler)</i>	-	-	-	-	-	-	-	R	R	-	-	-
<i>Clostridium ramosum</i>	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-
<i>Clostridium innocuum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Antibiyotik kısaltmaları:** FA, fusidik asit; CAZ, seftazidim; AG, aminoglikozidler; E, eritromisin; DA, klindamisin; QD, kinupristin-dalfopristin; VA, vankomisin; TEI, teikoplanin; FOS, fosfomisin; NOV, novobiyosin; SSS, sülfonamidler.  
R, dirençli.

<sup>a</sup>Aminoglikozidlere düşük-düzye direnç. Hücre duvarı inhibitörlerine duyarlı olan ve aminoglikozidlere yüksek-düzye direnç göstermeyen kökenler için aminoglikozidlerin hücre duvarı inhibitörleri (penisilinler ve glikopeptidler) ile kombinasyonu sinerjistik ve bakterisidal etkilidir.

<sup>b</sup>Aminoglikozidlere düşük-düzye dirence ek olarak, *Enterococcus faecium* aminoglikozidlerle (gentamisin, amikasin, arbekasin ve streptomisin hariç) penisilinler veya glikopeptidler arasında sinerjinin kaybına yol açan kromozomal AAC(6') enzimi üretir.

## Beklenmeyen Direnç Fenotipleri

Bir bakteri türü için belirli antibiyotiklere karşı henüz hiç gözlenmemiş veya sadece çok az sayıda olguda saptanmış direnç fenotiplerini tanımlamak için kullanılır. Bu sonuçlar tanımlamada veya AMDT'de bir hataya bağlı olarak da gözlenebileceğinden doğrulanmaları şarttır. Tekrarlayan testlerde de aynı sonuçlara ulaşıyorsa izolat bir referans laboratuvarına veya direnç mekanizmalarının saptanmasında uzmanlaşmış bir dış laboratuvara doğrulama için gönderilmelidir. Beklenmeyen direnç fenotipleri bölgesel, ulusal farklılıklar gösterebileceği gibi zaman içerisinde değişime de uğrayabilirler. Örneğin, yakın bir zamana kadar Enterobacteriaceae'de karbapenemlere direnç neredeyse beklenmeyen bir bulgu iken, son yıllarda karbapenemaz üreten kökenlerin küresel yayılımı sonucu salgınlar gözlenmektedir. Günümüz için beklenmeyen direnç fenotipine örnek olarak *Streptococcus pyogenes*'te penisiline direnç, *Staphylococcus aureus*'ta vankomisine direnç, *Enterococcus faecium*'da ampisiline duyarlılık, anaerob bakterilerde metronidazol direnci gösterilebilir (5).

AMDT yöntemleri için belirtilen kalite kontrol uygulamalarına ek olarak en yaygın şekilde kullanılan ek kalite kontrol ölçütü, hastalar için oluşturulan sonuçların değerlendirilmesidir. "Karakteristik" antibiyoqrama sahip türler tanımlamanın ve duyarlılık sonuçlarının doğrulanmasında kullanışlıdır. CLSI ve EUCAST bazı AMDT sonuçlarının doğrulanmadan bildirilmemesini önermektedir, CLSI "nadir direnç fenotipi" (1), EUCAST "beklenmeyen fenotip" (2) terimlerini kullanmaktadır. CLSI'de nadir direnç fenotipleri üç kategoriye ayrılmıştır, Kategori I; çok nadir veya henüz hiç bildirilmemiş direnci tanımlamak için, Kategori II; çoğu kurumda sık karşılaşılmayan ve Kategori III; sıklıkla karşılaşılabilen ama epidemiyolojik açıdan önemli direnç fenotiplerini belirtir. Kategori I en az karşılaşılan ve en önemli sonuçları içerdiğinden sonuçlar bildirilmeden bu fenotipteki sonuçların fark edilmesi çok önemlidir. Doğrulanması gereken nadir (beklenmeyen) direnç fenotipleri Tablo 5'te belirtilmektedir (1 no'lu kaynaktan uyarlanmıştır).

**Tablo 5.** Doğrulanması gereken nadir (beklenmeyen) direnç fenotipleri

Kategori	Gözlenen duyarlılık sonucu
<b>I</b>	<p><i>H. influenzae</i>'de karbapenemler, genişlemiş-spektrumlu sefalosporinler veya florokinolonlar NS</p> <p><i>N. meningitidis</i>'de genişlemiş-spektrumlu sefalosporinler, meropenem veya minosiklin NS, ampisilin veya penisilin R</p> <p><i>S. pneumoniae</i>'de linezolid veya vankomisin NS</p> <p>Grup A, B, C ve G beta-hemolitik streptokoklarda ampisilin, penisilin, genişlemiş-spektrumlu sefalosporinler, daptomisin, ertapenem, meropenem, linezolid veya vankomisin NS</p> <p>Viridans grup streptokoklarda daptomisin, ertapenem, meropenem, linezolid veya vankomisin NS, kinupristin-dalfopristin R</p>
<b>II</b>	<p><i>Enterobacteriaceae</i>'de karbapenemler I veya R</p> <p><i>Salmonella</i> ve <i>Shigella</i> spp.'de 3. kuşak sefalosporinler veya florokinolonlar I veya R</p> <p><i>A. baumannii</i>'de kolistin/polimiksin R</p> <p><i>P. aeruginosa</i>'da kolistin/polimiksin I veya R</p> <p><i>S. maltophilia</i>'da trimetoprim-sülfametoksazol I veya R</p> <p><i>H. influenzae</i>'de <math>\beta</math>-laktamaz üretimi olmayan kökenlerde ampisilin R</p> <p><i>N. gonorrhoeae</i>'de genişlemiş-spektrumlu sefalosporinler NS</p> <p><i>N. meningitidis</i>'de ampisilin veya penisilin I, kloramfenikol, florokinolon, rifampin I veya R, azitromisin, minosiklin NS</p> <p><i>Enterococcus</i> spp.'de linezolid R, daptomisin NS</p> <p><i>S. aureus</i>'ta daptomisin NS, linezolid R, kinupristin-dalfopristin I veya R, vankomisin MİK &gt; 1 <math>\mu</math>g/mL</p> <p>Koagülaz-negatif <i>Staphylococcus</i> spp.'de daptomisin NS, kinupristin-dalfopristin veya vankomisin I veya R, linezolid R</p> <p><i>S. pneumoniae</i>'de florokinolonlar, imipenem, meropenem, kinupristin-dalfopristin, rifampin I veya R,</p> <p>Grup A, B, C ve G beta- hemolitik streptokoklarda kinupristin-dalfopristin I or R</p>
<b>III</b>	<p><i>N. gonorrhoeae</i>'de florokinolon I veya R</p> <p><i>N. meningitidis</i>'de kloramfenikol veya florokinolon I veya R</p> <p><i>Enterococcus</i> spp.'de vankomisin R</p> <p><i>S. aureus</i>'ta oksasilin R</p> <p><i>S. pneumoniae</i>'de menenjit dışı sınır değerler kullanıldığında penisilin (&gt;=4 mg/L), sefotaksim (&gt;=4 mg/L), seftriakson (&gt;=4 mg/L), sefepim (&gt;=4 mg/L)</p>

NS; duyarlı değil, I; orta-duyarlı, R; dirençli

Her üç kategori için izlenecek ortak yol öncelikle tanımlama ve AMDT sonucunun doğrulanmasıdır. Eğer sonuçlar doğrulanırsa enfeksiyon kontrol komitesi olgu hakkında bilgilendirilmelidir.

### Sonuçların raporlanmadan önce gözden geçirilmesi:

Duyarlılık test sonuçlarının doğruluğu sürekli izlenmelidir. Bu büyük oranda günlük AMDT sonuçlarının gözden geçirilmesi ile sağlanır. Olası, bir dereceye kadar olası, olasılığı şüpheli, neredeyse imkânsız AMDT sonuç profillerin laboratuvar tarafından tanımlanması gerekmektedir. Sonuçların kişisel olarak incelenmesiyle veya bir bilgisayar programı yazılımı yardımıyla bu profillerin de denetlenmesi gerekmektedir. Beklenmeyen direnç fenotipinin veya tutarlı olmayan duyarlılık sonucunun anında tespiti ile duyarlılık sonuçlarının doğrulanması için gereken zaman kazanılabilir.

Sonuçların doğrulanmasında yapılacak işlemler sırasıyla;

- yazım veya okuma hatalarının ekarte edilmesi
- testte kullanılan inokulumun saflığının kontrolü
- organizmanın tanımlanması doğrulanmalı
- duyarlılık testinin, mümkünse farklı bir yöntemle, tekrar edilmesidir.

Herhangi bir hata saptanmazsa ve beklenmeyen direnç doğrulanırsa klinisyen uyarılmalı ve bu direnç mekanizmasının yayılımının önlenmesi sağlanmalıdır.

### Yorumlama Kuralları

Yorumlama kuralları AMDT sonuçlarının değerlendirilerek direnç mekanizmasının belirlenmesi için gerekli olan ve belirlenen direnç mekanizması uyarınca raporda yapılacak değişiklikleri tanımlayan kurallar dizisidir (3). Saptanabilecek direnç mekanizmaları test edilen antimikrobiallere bağlı olduğundan, laboratuvarlar test edecekleri antimikrobialleri dikkatle seçmelidir. Bu konuda verilebilecek en iyi örneklerden biri stafilokok kökenlerinde tüm beta-laktam grubu antimikrobiallere karşı duyarlılığın sadece penisilin ve sefoksitin test edilmesiyle belirlenebilmesidir: penisiline duyarlı stafilokok kökenleri tüm beta-laktamlara duyarlıdır, penisiline dirençli ancak sefoksitine duyarlı kökenlerde beta-laktamaz üretimi mevcuttur, bu kökenler penisilina dayanıksız penisilinlere dirençli (penisilin, ampisilin, amoksisilin, piperasilin, tikarsilin gibi), penisilina dayanıklı penisilinlere (oksasilin, nafsilin, kloksasilin gibi), beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonlarına, sefemlere ve karbapenemlere duyarlıdır, penisilin ve sefoksitine dirençli kökenler ise metisiline dirençli olarak adlandırılır ve bu kökenler tüm beta-laktamlara (metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'a etkili seftarolin ve seftobiprol gibi yeni sefalosporinler hariç) ve beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonlarına dirençli kabul edilirler.

Yorumlama kuralları kullanılarak;

- test edilmeyen antibiyotiklerin duyarlılıkları, test edilen başka bir antibiyotiğin duyarlılığı kullanılarak belirlenebilir (örneğin tetrasikline duyarlı bakterilerin, minosiklin ve doksisisikline de duyarlı olduklarının kabul edilmesi)
- uygun olmayan duyarlılık sonuçları saptanarak bildirim kısıtlanabilir (örneğin birinci ve ikinci kuşak sefalosporinlere duyarlı *E. coli* kökeninde üçüncü kuşak sefalosporinlerden birine direnç gözlenmesi)
- belirlenen direnç mekanizmasına göre sonuçlar duyarlıdan orta-duyarlı/dirençliye veya orta-duyarlıdan dirençliye çevrilebilir (örneğin indüklenebilir klindamisin direnci saptandığı durumlarda klindamisin duyarlılık sonucunun duyarlıdan dirençliye çevrilmesi)

Yorumlama kurallarını gerektiği gibi kullanabilmek için bazen klinik kullanımı olmayan antibiyotikleri test etmek gerekebilir.

Beta-laktam antibiyotikler için yorumlama kuralları: Peptidoglikan sentezinde görevli enzimler olan penisilin bağlayan proteinlerle (PBP) etkileşerek etki gösteren beta-laktam antibiyotikler için en sık rastlanan direnç mekanizması beta-laktamaz üretimidir. Ayrıca, antibiyotiğin hedef bölgesinde (PBP) meydana gelen değişiklikler, porin değişiklikleri ve dışa atım pompaları da dirence neden olabilir.

Stafilokoklar: Stafilokoklarda penisilina dayanıksız penisilin türevlerine karşı dirence yol açan beta-laktamaz (penisilinaz) üretimi çok sıktır (> %90). Stafilokoklar *mecA* geni tarafından kodlanan PBP2a ile penisilina dayanıklı penisilinlere ve diğer beta-

laktamlara da direnç geliştirebilirler. Bu sebeple, metisilin, oksasilin ve/veya sefoksitine dirençli bulunan kökenler ile *mecA* veya PBP2a için pozitif olduğu saptanan kökenler - anti-MRSA etkili ilaçlar hariç - tüm beta-laktam antibiyotikler ve beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları için dirençli olarak bildirilirler. Nadiren penisilinazın aşırı üretimi oksasiline sınırdan dirence yol açabilir, *mecA* geni negatif olan bu kökenlerde sefoksitine duyarlılık korunmaktadır.

- Streptokoklar: Beta-hemolitik streptokokların beta-laktam antibiyotiklere duyarlılıklarını korudukları kabul edilse de, B grubu beta-hemolitik streptokoklarda penisiline azalmış duyarlılık bildirilmiştir. *Streptococcus pneumoniae*'de ise değişik PBP üretimine bağlı olarak penisilin direnci yaygındır. *S. pneumoniae* kökenlerinde oksasilin diski benzil penisiline duyarlılığı taramak için kullanılmaktadır ancak oksasiline dirençli kökenler penisiline duyarlı olabileceğinden yararı sınırlıdır.
- Enterokoklar: Tüm enterokoklar sefalosporinlere karşı doğal dirençlidir. Enterokoklarda enzimatik direnç (beta-laktamaz üretimi) oldukça nadirdir, baskın mekanizma değişik PBP üretimidir. PBP5'teki değişikliklere bağlı olarak *Enterococcus faecium* kökenlerinin çoğu ampisiline dirençlidir.
- Enterobacteriaceae: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten kökenler için tanımlanan "GSBL üreten kökenler tüm penisilinler, sefalosporinler ve aztreonama dirençlidir" kuralı, 2010 yılında CLSI tarafından sefalosporin sınır değerlerinin değiştirilmesi (düşürülmesi) ve gerçekleştirilen farmakokinetik/farmakodinamik çalışmalar sayesinde terk edilmiştir. EUCAST da aynı görüşte hareket etmiştir. GSBL üreten kökenlerin uzun bir süre sefalosporinlere dirençli bildirilmelerinin aşırı karbapenem ve florokinolon tüketimine, dolayısıyla artan karbapenem direncine yol açtığı belirtilmektedir. Sefalosporinlere benzer şekilde karbapenemler için de sınır değerleri, CLSI tarafından 2010 yılında aşağı çekilmiş, bu sayede karbapenemaz üreten kökenler de dâhil olmak üzere, duyarlılık sonuçlarında herhangi bir değişiklik yapmadan bildirmek mümkün olmuştur. Kromozomal *AmpC* geni taşıyan *Enterobacter* spp, *Citrobacter freundii*, *Serratia* spp. ve *Morganella morganii* kökenlerinde 3. kuşak sefalosporinlerin (sefotaksim, seftriakson, seftazidim gibi) tedavide tek başlarına kullanılmaları *AmpC* enziminin üretimini indükleyerek, enzimi aşırı üreten dereprese kökenlerin oluşumuna yol açacağından kısıtlanmalıdır. Eğer tedavide 3. kuşak sefalosporin kullanılacaksa, direnç gelişme ihtimalini düşüreceğinden tedaviye bir florokinolonun da eklenmesi önerilmelidir. Sefepim ve sefpirom ise *AmpC* enziminden etkilenmediğinden, dirençli kökenlerin seçilmesine neden olmazlar.
- Diğer Gram negatif bakteriler: *Haemophilus influenzae*'de ampisilin direnci sıklıkla TEM-1 beta-laktamaz üretimine bağlıdır ve bu kökenler ampisilin ve amoksisiline dirençli kabul edilmelidir. Beta-laktamaz üretmeyen kökenlerde ampisilin direnci beta-laktamlara düşük afiniteli PBP üretimine neden olan *ftsI* genindeki mutasyonlara bağlıdır. Bu kökenler aminopenisilin/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonlarına (amoksisilin/klavulanik asit, ampisilin/sulbaktam ve piperasilin/tazobaktam), birinci ve ikinci kuşak sefalosporinlere dirençli kabul edilir. *Neisseria gonorrhoeae* kökenlerinde beta-laktamaz üreten kökenler benzil penisilin, ampisilin ve amoksisiline dirençli kabul edilir.

Makrolid, linkozamid ve streptograminler için yorumlama kuralları: Her ne kadar bu antibiyotikler farklı moleküler yapıya sahip olsalar da, etki mekanizmaları benzer



olduğundan ortak direnç mekanizmalarından etkilenirler. Eritromisin, 14 üyeli (klaritromisin) ve 15 üyeli (azitromisin) makrolidler için sınıf temsilcisidir. Direnç genellikle erm genleri tarafından kodlanan ve yapısal veya indüklenebilir makrolid-linkozamid-streptogramin B (MLSB) fenotipine yol açan ribozomal metilaz enzimleri veya dışa atım pompası (eritromisin direncine sebep olan ama klindamisin ve/veya streptogramin direncine yol açmayan M fenotipi) kaynaklıdır. Eritromisine dirençli, klindamisine duyarlı stafilokok ve streptokok kökenleri indüklenebilir MLSB direnci açısından incelenmelidir. Bu amaçla kullanılan D zon testinde pozitif sonuç (klindamisin diskinin eritromisin diskine bakan tarafında zon çapında düzleşme) erm genine bağlı indüklenebilir MLSB direncini gösterir, negatif sonuç (klindamisin diski çevresindeki zon çapının daireselliğini koruması) eritromisin direncinin mef geni ile ilişkili dışa atım pompasına bağlı olduğunu gösterir. İndüklenebilir MLSB direnci saptanan kökenlerin tedavisinde klindamisin veya linkomisin kullanımından kaçınılmalıdır, bu bir not ile klinisyene bildirilebilir veya sonuçlar dirençliye çevrilebilir. Eritromisin ve klindamisine dirençli stafilokok kökenlerinin kinupristin-dalfopristin kombinasyonuna da duyarlılığının azaldığı kabul edilir.

Aminoglikozidler için yorumlama kuralları: Aminoglikozidler 30S bakteri ribozomunda yer alan 16S rRNA alt birimine bağlanarak protein sentezini engellerler. Aminoglikozidlere dirence yol açan birçok farklı mekanizma bulunmaktadır; 1) azalmış geçirgenlik ve/veya pasif difüzyonu veya aktif transportu etkileyecek mutasyonlara bağlı olarak aminoglikozidlerin hücre dışında birikmesi, porin ve/veya lipopolisakkarid değişiklikleri; 2) ribozomal proteinlerde mutasyonlara ve üretilen yeni metilazların etkisine bağlı olarak hedef bölgede (ribozom) değişiklikler; 3) asetiltransferazlar (AAC grubu), fosfotransferazlar (APH grubu) ve nükleotidiltransferazlar (veya adeniltransferazlar) (ANT grubu) gibi aminoglikozidleri değiştiren enzimlerin üretimi. Azalmış geçirgenlik ve/veya dışa atım pompaları genellikle tüm aminoglikozidleri etkileyen düşük düzey dirence neden olur. Ribozomal mutasyonlar son derece nadirdir ve yüksek düzey dirence yol açmazlar. Aksine 16S rRNA metilasyonu yüksek düzey dirence yol açar ve genel olarak kanamisin, gentamisin, tobramisin, amikasin ve netilmisini etkiler. Aminoglikozidleri değiştiren enzimler direncin en sık rastlanan sebepleridir. Aminoglikozid değiştiren enzimlerin özelliklerine dayanılarak oluşturulan yorumlama kuralları arasında; gentamisine dirençli bulunan stafilokok kökenlerinin tüm aminoglikozidlere dirençli kabul edilmesi, gentamisine yüksek düzey dirençli (minimal inhibitör konsantrasyon > 128 mg/L) bulunan enterokokların streptomisin dışında tüm aminoglikozidlere dirençli kabul edilmesi gösterilebilir. Gram negatif bakteriler için kullanılan kurallar ise oldukça karışıktır ve güvenilirlik seviyeleri düşüktür (klinik kanıt yoktur ancak mikrobiyolojik veriler antibiyotiğin klinik kullanımını engellemeyi önermektedir). Örneğin EUCAST tüm Enterobacteriaceae kökenlerinde gentamisin orta derecede duyarlı, test edilen diğer aminoglikozidlerin duyarlı bulunduğu durumlarda gentamisin dirençli bildirilmesini önermektedir. Bu kuralın temeli olarak, kökenin AAC(3)-I enzimi üretiliyor olabileceği ve bu kökenlerin gentamisine azalmış duyarlılık gösterdiği belirtilmektedir.

Florokinolonlar için yorumlama kuralları: Florokinolonlar gyrA ve gyrB tarafından kodlanan DNA giraz (tip II topoizomeraz) ve parC ve parE (stafilokoklarda grIA ve grIB) tarafından kodlanan topoizomeraz IV ile etkileşirler. Topoizomeraz mutasyonları (gyrA ve parC'de), porin değişikliği ve dışa atım pompası florokinolonlara direnç gelişmesine neden olan kromozomal direnç mekanizmalarıdır. Topoizomeraz mutasyonları basamak şeklinde birbirine eklenen mutasyonlar sonucu yüksek düzey dirence neden olmaktadır. Ek olarak, plazmid geçişli kinolon direncine Gram negatif

bakterilerde sıklıkla rastlanmaya başlanmış ve mutasyona uğrayan bir aminoglikozid değiştiren enzimin kinolonlara karşı da dirence yol açtığı belirlenmiştir. Bu enzim (AAC(6')-Ib-cr) siprofloksasin ve norfloksasine karşı direnç gelişmesine neden olmakta, ancak levofloksasin enzimden etkilenmemektedir. Ayrıca son dönemde tanımlanan plazmid geçişli QepA ve OqxAB dışa atım pompaları ile florokinolonlar için yorumlama kuralı geliştirmek daha da karmaşık bir hale gelmiştir. Stafilokok türleri ve *S. pneumoniae* gibi Gram pozitif bakterilerde yaklaşım; düşük etkili florokinolonlar (ofloksasin, siprofloksasin) dirençli, yüksek etkili florokinolonlar (levofloksasin, moksifloksasin) duyarlı saptandığında, florokinolonlarla tedavi sırasında direnç gelişebileceği uyarısının yapılması, yüksek etkili florokinolonlar da dirençli bulunduğu tüm florokinolonların dirençli olarak bildirilmesi yönündedir. EUCAST *S. pneumoniae*'de birinci basamak mutasyonların saptanmasında norfloksasinin daha etkili olduğunu belirtmektedir. Enterobacteriaceae için siprofloksasine dirençli bulunan kökenlerin tüm florokinolonlar için dirençli olarak bildirilmesi önerilmekle birlikte siprofloksasin direncine levofloksasini etkilemeyen AAC(6')-Ib-cr enziminin de yol açabileceği bilgisi eklenmektedir. Geçtiğimiz yıllarda Enterobacteriaceae'de florokinolon direnci için bir belirteç olarak kullanılan nalidiksik asit duyarlılığı, qnr ve diğer plazmid geçişli kinolon direnci mekanizmalarını saptayamadığı için terk edilmiş, onun yerine siprofloksasin sınır değerlerinde değişikliğe gidilmiştir.

Sonuç olarak, uzman kurallar AMDT test sonuçlarını altta yatan direnç mekanizmasını açığa çıkarmak ve klinik gereklilik durumlarında sonuçlar üzerinde değişiklik yapmak için geliştirilmiştir. AMDT sonuçlarının uzman kurallar ekseninde değerlendirilmesinin bir diğer önemli katkısı ise, yorumlayarak okumanın AMDT için kalite kontrol anlamı da içeriyor olmasıdır. Ayrıca belirlenen direnç mekanizmaları sayesinde direnç epidemiyolojisinin takibinde de yararlıdır. AMDT sonuçlarında değişiklik yapılmasının gerektiği durumlar mevcut sınır değerlerinin tüm direnç mekanizmalarını saptamakta yetersiz kalmasından kaynaklanmaktadır. Sınır değerler sürekli geliştirilmektedir, bu sebeple bazı uzman kuralların zaman içerisinde değiştirileceği ya da gerekliliğini yitirecek olması kaçınılmazdır. Her ne kadar direnç mekanizmalarındaki çeşitlilik gün geçtikçe artsa da, klinik mikrobiyologlar güncel bilgileri yakından takip etmeli ve yorumlamalı okuma pratiğini klinik bir gereklilik olarak kabul ederek, mikrobiyoloji laboratuvarının günlük işleyişi içerisine dâhil etmelidir. Bu sayede hastalara uygulanan antibiyotik tedavisinin başarı şansının artırılacağı gibi, antibiyotiklere direnç gelişmesinin de azaltılacağı öngörülebilir.

### 1.2 Kısıtlı Bildirim

İnsanlarda enfeksiyonlara yol açan klinik önemi olan bakteriler tedavide kullanılan antibiyotiklere direnç gösterme özelliğinde olabilirler. Bu sebeple, klinik mikrobiyoloji laboratuvarında organizmanın izolasyonunun ardından, antibiyotiklere duyarlılığının da belirlenmesi gerekmektedir. Laboratuvar tarafından klinisyen için hazırlanan raporlar bu sebeplerle tanımlama sonucu yanı sıra organizmanın antibiyotiklere duyarlılık profilini de içerir. AMDT klinik örneklerden izole edilen bakterilerin tedavide kullanım potansiyeli olan antibiyotiklerin ürün prospektüsünde yer alan dozajı ile uygulandığında enfeksiyon bölgesinde elde edilebilen konsantrasyonları ile öldürülebileceğinin veya üremesinin inhibe edilebileceğinin belirlenmesi amacıyla yapılır. AMDT sonuçları genellikle değerlendirme kategorileri ile bildirilir. "Duyarlı" kategorisi enfeksiyon bölgesi için önerilen doz kullanıldığında antibiyotiğin sıklıkla ulaşılabilir konsantrasyonları ile bakterilerin üremelerinin engelleneceğini belirtir. "Orta-duyarlı" kategorisi antibiyotiğin sıklıkla ulaşılabilir kan ve doku

konsantrasyonlarına duyarlı bakterilere göre daha düşük yanıt oranı gösteren bakterileri tanımlar. Orta duyarlı kategorisi duyarlı ve dirençli kategoriler arasında bir tampon bölgesi vazifesi görür. Ayrıca enfeksiyon bölgesinde konsantre olan antibiyotiklerin tedavi seçeneği kabul edilebileceği ihtimalini de belirtir (örneğin idrar yolu enfeksiyonlarında nitrofurantoin kullanımı). "Dirençli" kategorisi normal doz uygulamaları ile antibiyotiklerin sıklıkla erişilebilir konsantrasyonları ile inhibe olmayan bakterileri tanımlar ve antibiyotiğin kullanılması ile yeterli klinik etkinlik elde edilemeyeceğini belirtir (1). Klinisyenler hastaları için hangi antibiyotiğin etkili olacağını belirlemek üzere bu değerlendirmeleri kullanırlar. Rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarının birincil görevi enfeksiyon hastalıklarının tedavini yönlendirmek için zamanında ve doğru AMDT sonuçlarını klinisyene ulaştırmaktır. Buna ek olarak AMD sonuçları ampirik tedavi seçeneklerinin belirlenmesinde, kurumsal veya ulusal ölçekte antibiyotik kullanımı politikalarının belirlenmesinde, epidemiyolojik çalışmalar veya direnç sürveyansı yürütmek için ve yeni geliştirilen antibiyotiklerin etkinliklerini değerlendirmek için kullanılabilir.

Sadece enfeksiyon etkeni bakteriler için AMDT uygulanmalıdır. Bu sebeple enfeksiyon bölgesinde yer alan normal flora üyeleri ile enfeksiyonun gerçek etmeni arasında ayırım yapılması gereklidir. Klinik örnekten izole edilen hangi organizmaya/organizmalara AMDT uygulanacağı kararı verilirken organizmanın izole edildiği vücut bölgesi, klinik örnekte diğer bakterilerin varlığı ve örneğin kalitesi, konağın durumu, örneğin alındığı vücut bölgesinde bakterinin enfeksiyona neden olma kabiliyeti, vb gibi önemli faktörler göz önünde bulundurulmalıdır.

### Test Edilecek ve Bildirilecek Antibiyotiklerin Seçimi

Her laboratuvar kapasitesi, kaynakları, deneyim seviyesi veya kurum ihtiyaçları arasında kendine özgüdür. Bu sebeple hangi antibiyotiklerin test edileceği her laboratuvarın kendi özelliklerine göre belirlenir ve genellenemez. Test edilecek antibiyotikler enfeksiyon hastalıkları uzmanı, hastane eczacısı ve enfeksiyon kontrol komitesi üyelerinin görüşlerine başvurularak kararlaştırılır ve seçilen antibiyotikler hastane formülleri ile uyumlu olmalıdır. Örneğin ülkemizde bulunmayan antibiyotiklerin test edilmesi veya sonuç raporunda bildirilmesi uygun değildir. Genellikle, bir laboratuvar çeşitli organizmalar veya organizma gruplarının rutin test edilmesi amacıyla 10 – 15 kadar antibiyotik belirler, tanımlanan bu antibiyotiklere antibiyotik paneli adı verilir. CLSI M100 dokümanlarında yer alan Tablo 1A (A.B.D.'de klinik mikrobiyoloji laboratuvarları tarafından kolay üreyen organizmalar için rutin olarak test edilmesi ve bildirilmesi gereken FDA klinik endikasyonuna sahip antibiyotiklerin önerilen gruplandırılması) yerel seviyede bu tip tabloların oluşturulmasında kullanılabilir değerli bir kaynaktır (1). AMDT uygulandığında sıklıkla bakteri kökeninin tanımlanması gerçekleşmemiş olduğundan, bu köken için bildirilmesi uygun olmayan bazı antibiyotikler test edilebilir, ancak bu antibiyotikler sonuç raporunda bildirilmemelidir.

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarının hedefi klinisyeni en az toksik özellik gösteren, en maliyet-etkin ve mevcut antibiyotikler arasında klinik etkinliği en yüksek olan antibiyotiği kullanmaya yönlendirecek sonuç raporunu oluşturmaktır. Bu hedefe CLSI tarafından sağlanan kısıtlı bildirim kurallarına uyularak ulaşılabilir. Bu amaçla antibiyotikler CLSI tarafından dört grupta (grup A, B, C ve U) değerlendirilir. Grup A, rutin test panelinde bulunması gereken, sonuçları birincil olarak bildirilecek antibiyotikleri içerir. Grup B içerisinde öncelikli olarak test edilmesi gereken ancak sonuçları kısıtlı olarak bildirilmesi gereken antibiyotiklerdir. Çünkü bu grupta yer alan

antibiyotikler genel olarak etki spektrumları daha geniş olan antibiyotiklerdir. Ancak, köken grup A'daki birincil antibiyotiklere dirençli ise, köken özelliği olan bir vücut bölgesinden izole edilmişse (örn. Beyin omurilik sıvısından izole edilen enterik basil için üçüncü kuşak sefalosporin veya idrar yolu izolatlar için trimetoprim-sülfametoksazol) hasta grup A'daki ilaçları tolere edemiyor ise, enfeksiyon Grup A'daki antibiyotiklerin kullanıldığı tedaviye yanıt vermiyorsa veya hastada başka bir vücut bölgesinden izole edilen farklı organizmalar varsa ve grup B'de yer alan ikincil bir antibiyotik ile diğer organizma(lar) da tedavi edilebilecekse grup B'de yer alan ikincil bir antibiyotik bu enfeksiyon için daha iyi bir klinik seçenek olabilir. Bu gibi durumlarda grup B'de yer alan antibiyotiklerin duyarlılıkları da bildirilmelidir. Grup C özel durumlar (olgular) için alternatif veya ek antibiyotikleri içerir. Örneğin dirençli kökenlerin tedavisi, birincil antibiyotiklere alerjisi olan hastaların tedavisi, ender rastlanan etkenlerin tedavisi için (örn. Bağırsak dışı *Salmonella* spp. izolatları için kloramfenikol) ve enfeksiyon kontrolüne epidemiyolojik katkıda bulunmak gibi amaçlar. Son olarak grup U sadece veya öncelikle idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antibiyotikleri içerir (örneğin nitrofurantoin, norfloksasin). Bu antibiyotikler, diğer enfeksiyon bölgelerinden soyutlanan etkenler için rutin olarak bildirilmemelidir. Belirli idrar patojenleri için (örn. *Pseudomonas aeruginosa*) daha geniş endikasyonu olan başka ilaçlar da Grup U içine alınabilir (1).

Kısıtlı bildirim sonuç raporlarının klinik ile ilişkisinin gelişmesini sağlar ve dar spektrumlu antibiyotik seçeneği duyarlı iken geniş spektrumlu antibiyotiğin kullanımını engellediği için çoğul dirençli sağlık hizmeti ile ilişkili kökenlerin seçilmesinin önlenmesine katkıda bulunur.

Tablo 6'da etkenlere yönelik birincil test ve bildirim gereken A grubu ilaçlar, birincil test ve kısıtlı bildirim gereken B grubu ilaçlar, test edilecek ve kısıtlı bildirilecek ek ilaçlar ile idrar yolu enfeksiyonlarında A grubu ilaçlar ile beraber birincil test ve rapor edilecek ilaçları listelenmektedir.

**Tablo 6.** Rutin olarak test edilmesi ve bildirilmesi gereken antibiyotiklerin önerilen gruplandırılması (1 no'lu kaynaktan derlenmiştir)

Organizma	Birincil Test Edilecek ve Bildirilecek Antimikrobiyaller (Grup A)	Birincil Test Edilecek Kısıtlı Bildirilecek Antimikrobiyaller (Grup B)	Ek Test Kısıtlı Bildirim Gerektiren Antimikrobiyaller (Grup C)	İdrar Yolu Enfeksiyonlarında Birincil Test Edilecek ve Bildirilecek Antimikrobiyaller (Grup U)
<i>Enterobacteriaceae</i>	Ampisilin Sefazolin Gentamisin Tobramisin	Amikasin, Amoksisilin-klavulanat Ampisilin-sulbaktam Piperasilin-tazobaktam Sefuroksim Sefepim Sefoksitin Sefotaksim veya seftriakson	Seftazidim Kloramfenikol Tetrasiklin	Ofloksasin Nitrofurantoin Sülfisoksazol

## Antibiyoqram Yorumlama Kriterleri ve Kısıtlı Bildirim Kuralları

Organizma	Birincil Test Edilecek ve Bildirilecek Antimikrobiyaller (Grup A)	Birincil Test Edilecek Kısıtlı Bildirilecek Antimikrobiyaller (Grup B)	Ek Test Kısıtlı Bildirim Gerektiren Antimikrobiyaller (Grup C)	İdrar Yolu Enfeksiyonlarında Birincil Test Edilecek ve Bildirilecek Antimikrobiyaller (Grup U)
		Siprofloksasin Levofloksasin Doripenem Ertapenem İmipenem Meropenem Trimetoprim-sülfametoksazol		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Seftazidim Gentamisin Tobramisin	Amikasin Sefepim, Siprofloksasin Levofloksasin Doripenem İmipenem Meropenem Piperasilin-tazobaktam		Ofloksasin
<i>Staphylococcus</i> spp.	Azitromisin veya klaritromisin veya eritromisin, Klindamisin Oksasilin Sefoksitin Penisilin, Trimetoprim-sülfametoksazol	Daptomisin Linezolid Doksisiklin, Tetrasiklin Vankomisin Rifampin	Kloramfenikol Siprofloksasin veya Levofloksasin veya Ofloksasin Moksifloksasin Gentamisin	Nitrofurantoin Sülfisoksazol
<i>Enterococcus</i> spp.	Ampisilin Penisilin	Daptomisin Linezolid Vankomisin	Gentamisin (sadece yüksek-düzye direnç taranması) Streptomisin (sadece yüksek-düzye direnç taranması)	Siprofloksasin Levofloksasin Nitrofurantoin Tetrasiklin
<i>Acinetobacter</i> spp.	Ampisilin-sulbaktam Seftazidim Siprofloksasin Levofloksasin İmipenem Meropenem Gentamisin Tobramisin	Amikasin, Piperasilin-tazobaktam, Sefepim, Sefotaksim Seftriakson Doksisiklin Tetrasiklin, Trimetoprim-		

## Antibiyogram Yorumlama Kriterleri ve Kısıtlı Bildirim Kuralları

Organizma	Birincil Test Edilecek ve Bildirilecek Antimikrobiyaller (Grup A)	Birincil Test Edilecek Kısıtlı Bildirilecek Antimikrobiyaller (Grup B)	Ek Test Kısıtlı Bildirim Gerektiren Antimikrobiyaller (Grup C)	İdrar Yolu Enfeksiyonlarında Birincil Test Edilecek ve Bildirilecek Antimikrobiyaller (Grup U)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Trimetoprim-sülfametoksazol	sülfametoksazol Seftazidim Kloramfenikol Levofloksasin Meropenem		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Trimetoprim-sulfametoksazol	Seftazidim Kloramfenikol, Levofloksasin,		
Diğer <i>Enterobacteriaceae</i> dışındakiler	Seftazidim Gentamisin Tobramisin	Amikasin Sefepim Siprofloksasin, Levofloksasin İmipenem Meropenem Piperasilin-tazobaktam Trimetoprim-sülfametoksazol	Sefotaksim Seftriakson Kloramfenikol	Ofloksasin Sülfisoksazol Tetrasiklin
<i>Haemophilus influenzae</i> ve <i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Ampisilin Trimetoprim-sülfametoksazol	Ampisilin-sulbaktam Sefuroksim (parenteral) Sefotaksim veya seftazidim veya seftriakson Kloramfenikol Meropenem	Azitromisin Klaritromisin Amoksisilin-klavulanat Sefaklor Sefprozil Sefdinir veya sefiksim veya sefpodoksim Sefuroksim (oral) Siprofloksasin veya levofloksasin veya moksifloksasin veya ofloksasin Gemifloksasin Ertapenem veya imipenem Rifampin Telitromisin Tetrasiklin	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Seftriakson Sefiksim Siprofloksasin Tetrasiklin			

## Antibiyoqram Yorumlama Kriterleri ve Kısıtlı Bildirim Kuralları

Organizma	Birincil Test Edilecek ve Bildirilecek Antimikrobiyaller (Grup A)	Birincil Test Edilecek Kısıtlı Bildirilecek Antimikrobiyaller (Grup B)	Ek Test Kısıtlı Bildirim Gerektiren Antimikrobiyaller (Grup C)	İdrar Yolu Enfeksiyonlarında Birincil Test Edilecek ve Bildirilecek Antimikrobiyaller (Grup U)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Eritromisin Penisilin (oksasilin diski) Trimetoprim-sülfametoksazol	Sefepim Sefotaksim Seftriakson Klindamisin Doksisiklin Gemifloksasin Levofloksasin Moksifloksasin Ofloksasin Meropenem Telitromisin Tetrasiklin Vankomisin	Amoksisilin Amoksisilin-klavulanat Sefuroksim Kloramfenikol Ertapenem Meropenem Linezolid Rifampin	
<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolitik grup	Klindamisin Eritromisin Penisilin veya ampisilin	Sefepim veya sefotaksim veya seftriakson, Vankomisin	Kloramfenikol Daptomisin Levofloksasin Ofloksasin Linezolid	
<i>Streptococcus</i> spp. viridans grup	Ampisilin Penisilin	Sefepim Sefotaksim Seftriakson Vankomisin	Kloramfenikol Klindamisin Eritromisin Linezolid	
<i>Bacteroides fragilis</i> Grubu ve Diğer Gram-Negatif Anaeroblar	Amoksisilin-klavulanat Ampisilin-sulbaktam Piperasilin-tazobaktam Klindamisin, Doripenem Ertapenem İmipenem, Meropenem, Metronidazol		Penisilin Ampisilin Seftizoksım Seftriakson Kloramfenikol Moksifloksain	
Gram-Pozitif Anaeroblar	Ampisilin Penisilin Amoksisilin-klavulanat Ampisilin-sulbaktam, Piperasilin-tazobaktam Klindamisin,		Seftizoksım Seftriakson Tetrasiklin Moksifloksasin	

## Antibiyogram Yorumlama Kriterleri ve Kısıtlı Bildirim Kuralları

Organizma	Birincil Test Edilecek ve Bildirilecek Antimikrobiyaller (Grup A)	Birincil Test Edilecek Kısıtlı Bildirilecek Antimikrobiyaller (Grup B)	Ek Test Kısıtlı Bildirim Gerektiren Antimikrobiyaller (Grup C)	İdrar Yolu Enfeksiyonlarında Birincil Test Edilecek ve Bildirilecek Antimikrobiyaller (Grup U)
	Doripenem			
	Ertapenem			
	İmipenem			
	Meropenem			
	Metronidazol			

Kısıtlı Bildirim kuralları aşağıda sunulmaktadır. Mikrobiyoloji uzmanı antibiyogram raporu verirken bu ilkelere uymalı, gerektiğinde de bu hususları klinisyenlere açıklamak üzere eğitim saatleri düzenlemelidir. Laboratuvar kendi verilerini direnç açısından analiz etmeli, gerekli gördüğü durumlarda bu tablodan farklı uygulamalarda da bulunabilmeli, kendi hastanesine özgü direnç gelişiminde hız kazanan antibiyotikleri rapor etmekten kaçınmalıdır.

- 1) Birincil test ve bildirim gereken ilaçlar, laboratuvarında çalışılabildiği sürece (disk varlığı, vb.) bildirilmesi ve klinikte öncelikli olarak kullanımı tercih edilmesi gereken ilaçlardır. Birincil test ve kısıtlı bildirim gereken ilaçlar ise öncelikli olarak test edilmesi gereken ancak sonuçları kısıtlı olarak bildirilmesi gereken antibiyotikleri içerir.
- 2) BOS'tan izole edilen ve bu dökümanda yer alan bakteri türlerinden herhangi biri için şu antimikrobiyaller sadece oral yoldan kullanılabilirler için uygulanmamalıdır: birinci ve ikinci kuşak sefalosporinler (parenteral sefuroksim hariç) ve sefamisinler, klindamisin, makrolidler, tetrasiklinler ve florokinolonlar.
- 3) Rifampin antimikrobik kemoterapi için tek başına kullanılmamalıdır.
- 4) *Salmonella* ve *Shigella* spp.'nin dışkı izolatları test edildiğinde sadece ampicilin, bir florokinolon ve trimetoprim/sulfametoksazol rutin olarak bildirilmelidir. Ayrıca, *Salmonella* spp.'nin bağırsak dışı izolatları için bir üçüncü kuşak sefalosporin test edilmeli ve bildirilmelidir; kloramfenikol istek yapılırsa test edilip bildirilir.
- 5) Penisiline duyarlı stafilokoklar, aynı zamanda diğer penisilinlere,  $\beta$ -laktam/ $\beta$ -laktamaz inhibitör kombinasyonlarına, sefemlere ve karbapenemlere de duyarlıdır. Penisiline dirençli, oksasiline duyarlı kökenler  $\beta$ -laktamazlara dayanıksız penisilinlere dirençli, fakat  $\beta$ -laktamaza dayanıklı penisilinlere,  $\beta$ -laktam/ $\beta$ -laktamaz inhibitör kombinasyonlarına, antistafilokok etkili sefemlere ve karbapenemlere duyarlıdır. Oksasiline dirençli stafilokoklar anti-MRSA aktivitesine sahip yeni sefalosporinler dışında şu anda piyasada bulunan tüm  $\beta$ -laktam antibiyotiklere dirençlidir.
- 6) *Enterococcus* spp. için sefalosporinler, aminoglikozidler (yüksek düzey direnç taraması hariç), klindamisin ve trimetoprim-sulfametoksazol *in vitro* olarak aktif görünebilir, ancak klinik olarak etkili değildir ve tedavide kullanılmamalıdır.
- 7) *Enterococcus* spp. için endokardit gibi ciddi enfeksiyonlarda, gentamisin ve streptomisine karşı yüksek düzeyde direnç saptanmadıkça, ampicilin, penisilin veya vankomisin ile (duyarlı kökenlerde) bir aminoglikozid kombinasyonu tedavisi uygundur; bu kombinasyonların enterokoklara karşı sinerjik bakterisidal etkisi olduğu düşünülmektedir.



- 8) Amoksisilin-klavulanat, azitromisin, sefaklor, sefdinir, sefiksim, sefpodoksim, sefprozil, sefuroksim, klaritromisin, lorakarbef ve telitromisin *Haemophilus* spp.'ye bağlı solunum yolu enfeksiyonlarının ampirik tedavisinde kullanılabilir oral ilaçlardır. Bu antimikrobiyallerin duyarlılık testlerine rutin olarak test edilmelerine gerek yoktur, ancak srveyans veya epidemiyolojik çalışmalar açısından gerekebilir.
- 9) *H. influenzae'* nın BOS izolatlarında sadece ampisilin, nc kuşak sefalosporinlerden biri, kloramfenikol ve meropenem tedavide kullanılabilir.
- 10) *Neisseria gonorrhoeae* izolatlarında  $\beta$ -laktamaz testi sonucu laboratuvarдан istenebilir.
- 11) *S. pneumoniae'* nın özellikle kan ve BOS izolatlarında penisilin duyarlılığı Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değeri istenerek değerlendirilmelidir.
- 12) *Streptococcus* spp.; penisilin veya ampisiline orta-duyarlı kökenler bakterisidal etki için bir aminoglikozidle kombine tedaviye gereksinim gösterebilir.
- 13)  $\beta$ -hemolitik streptokok enfeksiyonlarının tedavisinde tercih edilecek antibiyotikler penisilin ve ampisilindir. Penisilinler ve diğer  $\beta$ -laktamlar için rutin duyarlılık testi yapılması klinik açıdan gerekli değildir.
- 14) Grup B streptokoklar için intrapartum profilakside penisilin veya ampisilin önerilmektedir. Anafilaksi yönünden düşük risk taşıyan penisiline allerjik kadınlarda sefazolin önerilirken, yüksek risk taşıyanlarda klindamisin veya eritromisin kullanılabilir. Grup B streptokoklar ampisilin, penisilin ve sefazoline duyarlıdır; ancak klindamisin ve/veya eritromisine dirençli olabilir. Ağır penisilin allerjisi olan (anafilaksi yönünden yüksek risk) bir hamile kadında grup B streptokok izole edildiğinde, klindamisin ve eritromisin test edilmeli ve bildirilmelidir.
- 15) Anaerobik enfeksiyonların büyük bölümü polimikrobiyal olup  $\beta$ -laktamaz pozitif ve negatif kökenlere bağlı gelişebilir. Sadece  $\beta$ -laktamaz negatif bir kökene bağlı gelişen enfeksiyonda test ve bildirim için penisilin veya ampisilin uygun olabilir.
- 16) Birçok Gram-pozitif anaerobik bakteri, dirençli bakterilerin de birlikte bulunabildiği polimikrobiyal enfeksiyonlardan izole edilmektedir; bununla birlikte *Clostridium* türleri (rn. *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. sordellii*) tek başına enfeksiyon etkeni olabilir ve penisilin ve ampisiline duyarlıdır, bu nedenle tedavide tercih edilebilirler.
- 17) Spor oluşturmayan, Gram-pozitif anaerobik basillerin birçoğu metronidazole dirençlidir.

## Kaynaklar

1. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
2. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameter. Version 4.0, 2014. <http://www.eucast.org>.
3. Courvalin P. Interpretive reading of in vitro antibiotic susceptibilities (the antibiogramme). Clin Microbiol Infect 1996;2(Suppl 1):S26-34.
4. Livermore DM, Winstanley TG, Shannon KP. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. J Antimicrob Chemother 2001;48(Suppl. 1):S87-102.
5. Leclercq R, Cantón R, Brown DFJ, Giske CG, Heisig P, *et al*. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Infect 2013;19:141-160.



T.C. Sağlık Bakanlığı

## ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

### ***Staphylococcus aureus:*** **Tanımlanması ve AMD Testleri** (MRSA saptama, Vankomisin duyarlılık, D-zon test)

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu 11
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri (AMD)
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	AMD-MT-01
Sürüm No	1.0
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik
----------	-------	------------

# İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	4
KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	4
GENEL BİLGİ .....	6
TEKNİK BİLGİLER .....	7
1 Hedef mikroorganizma(lar) .....	7
2 Tanı/tanımlama için asgari laboratuvar koşulları .....	7
2.1.Laboratuvar güvenliği .....	7
2.2.Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri .....	7
2.3.Örnek, ayıraç, kit, ekipman.....	7
2.3.1.İnceleme örneği, transportu, saklanması.....	7
2.3.2.Besiyeri .....	7
2.3.3.Boyalar ve diğer ekipman .....	8
2.4.Kalite kontrol.....	8
3 Tanı/tanımlama teknikleri .....	8
3.1.Mikroskopi (Gram boyalı inceleme) .....	8
3.2.Kültür.....	9
3.3.Koloni morfolojisi .....	9
3.4.S. aureus'u tanımlama testleri ve değerlendirme.....	9
3.4.1. Koagülaz testi .....	9
3.4.2. Hızlı lateks ve hemaglutinasyon testleri.....	10
3.4.3. Biyokimyasal testler.....	11
3.5.Seroloji .....	12
3.6.Moleküler testler .....	12
3.7.Saklama, referans merkeze gönderme.....	13
4 AMD testleri.....	13
4.1.S. aureus'da doğal ve kazanılmış direnç.....	13
4.2.S. aureus'da antimikrobiyal direnç testleri.....	14
4.2.1.Disk difüzyon testi .....	15
4.2.2.Sıvı dilüsyon testi .....	16
4.2.3.Penisilinaza bağlı penisilin direncinin saptanması ....	16
4.2.4.Metisilin direncinin saptanması .....	17
4.2.5.Azalmış glikopeptid duyarlılığı (VISA, hVISA) .....	18
4.2.6.İndüklenebilir klindamisin direnci: D-zon testi .....	19
4.2.7.Norfloksasilin tarama testi .....	19
5 Raporlama.....	19

6 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	21
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	22
KAYNAKLAR.....	22

## Kapsam ve Amaç

Bu doküman, klinik örneklerden *Staphylococcus aureus* izolasyonu ve tanımlaması ve *S. aureus* kökenlerinin antimikrobiyal duyarlılıklarının saptanması için klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının yararlanabileceği standart bir kaynak oluşturmak amacıyla hazırlanmıştır. Dokümanın kapsamında *S. aureus*'un klinik örneklerden izolasyonu, cins ve tür düzeyinde tanımlanması, ve antimikrobiyal duyarlılıklarını saptamak üzere kullanılacak standart fenotipik testler, test değerlendirmeleri, kullanıcı dostu algoritmalar ve tablolar yer almaktadır.

## Kısaltmalar ve Tanımlar

<b>AMDT</b>	Antimikrobiyal Duyarlılık Testi
<b>BHI agar</b>	Beyin-kalp infüzyon agar
<b>BOS</b>	Beyin Omurilik Sıvısı
<b>CLSI</b>	Clinical Laboratory Standarts Institute (ABD)
<b>EUCAST</b>	ESCMID Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi
<b>FISH</b>	Floresan In Situ Hibridizasyon
<b>GISA</b>	Glikopeptidlere duyarlılığı azalmış <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>GRSA</b>	Glikopeptidlere dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>HK-MRSA</b>	Hastane Kökenli MRSA
<b>I</b>	Orta-duyarlı
<b>KNS</b>	Koagülaz Negatif Stafilokok
<b>KOB</b>	Koloni Oluşturan Birim
<b>MALDI-TOF</b>	Matrix-Associated Laser Desorptin/Ionization-Time of Flight
<b>MİK</b>	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
<b>MRSA</b>	Metisilin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>MSSA</b>	Metisiline Hassas <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>R</b>	Dirençli
<b>S</b>	Duyarlı
<b>SCC</b>	Stafilokokal kaset kromozom
<b>TSS</b>	Toksik Şok Sendrom
<b>PBP</b>	Penisilin Bağlayan Protein
<b>PVL</b>	Panton-Valentine Leukocidin

<b>SSSS</b>	Stafilokokal Haşlanmış Deri Sendromu
<b>TK-MRSA</b>	Toplum Kökenli MRSA
<b>ULGR</b>	Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi
<b>VISA</b>	Vankomisine duyarlılığı azalmış <i>S. aureus</i>
<b>VRSA</b>	Vankomisine dirençli <i>S. aureus</i>

## Genel Bilgi

Stafilokoklar fakültatif anaerob mikroorganizmalar olup, *S. saccharolyticus* ve *S. aureus subsp. anaerobius* zorunlu anaerob stafilokok türleridir. Katalaz pozitif (nadir katalaz negatif kökenler rapor edilmiştir), modifiye oksidaz negatiftirler. %10 NaCl varlığında ve 18°C-40°C sıcaklık aralığında üreyebilirler. Stafilokoklar lizostafine duyarlıdırlar. 1925 yılında stafilokoların koagülaz pozitif (*S. aureus* grup) ve koagülaz negatif stafilokok (KNS) olarak gruplandırılmasına temel teşkil eden plazma koagülaz testi geliştirilmiştir. Daha sonra KNS'lar için novobiyosin-duyarlı (*S. epidermidis* grup) ve novobiyosin-dirençli (*S. saprophyticus* grup) olarak ileri gruplandırma yapılmıştır. *S. epidermidis* (novobiyosin-duyarlı) grubunda *S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis subsp. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. saccharolyticus*, *S. warneri* ve bir çok diğer tür yer almaktadır. *Staphylococcus saprophyticus* grubunda da *S. saprophyticus* dışında novobiyosin-dirençli diğer bazı KNS'ler (*S. cohnii*, *S. kloosii* ve *S. xylosus*) bulunmaktadır (1).

Stafilokoklar insanda nazofarenks, deri, vajına, rektum, perine ve burunda yaygın olarak kolonize olurlar ve fırsatçı patojen olarak insan enfeksiyonlarından en sıklıkla izole edilen mikroorganizmalar arasında yer alırlar. İnsandan insana direkt temas veya hava yoluyla bulaşabilirler. İnsanda en virülan türler *S. aureus* ve *S. lugdunensis*'tir. *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* da sırasıyla yabancı cisim ve üriner sistem enfeksiyonlarında önemli etkenlerdir.

Bu dokümana konu teşkil eden *S. aureus*, insanların %33'ü tarafından burunda taşınır. Doğurgan çağıdaki kadınların %10'u *S. aureus*'u vajende taşır. Diyabet hastaları, kronik hemodiyaliz hastaları, kronik dermatolojik hastalıkları olanlar, IV ilaç alışkanlıkları olanlar ve HIV pozitif kişilerde taşıyıcılık ve enfeksiyon oranları daha fazladır. *S. aureus*'un virülansında, kapsül, peptidoglikan tabaka ve teikoik asit, yüzey adezinleri, biyofilm gibi yapıların; katalaz, koagülaz, hyalüronidaz gibi enzimlerin; hemolizin, lökosidin, epidermolitik toksin, enterotoksinler ve TSST-1 gibi toksinlerin önemli rolü vardır. Hastane enfeksiyonlarının ikinci en sık etkeni olan HK-*S. aureus*'ların büyük çoğunluğu metisiline dirençlidir (HK-MRSA). MRSA kökenleri özellikle hastanelerde ve bakımevlerinde kolonize hastalar ve hastane çalışanlarının elleri aracılığı ile diğer hastalara bulaşır. HK-MRSA kökenlerinde çoklu antibiyotik direnci yaygındır. Antibiyotik kullanımı, kolonizasyon riskini arttırır. Son yıllarda TK- MRSA enfeksiyonları da giderek önem kazanmaya başlamıştır. Çoğunluğu Panton-Valentine toksini taşıyan bu kökenler daha çok deri-yumuşak doku enfeksiyonları ve pnömونيye yol açarlar. TK-MRSA kökenlerinde çoklu antibiyotik direnci HK-MRSA'lar kadar ayaygın değildir. *Staphylococcus aureus* ile oluşan lokalize enfeksiyonlar piyojenik eksuda veya apse şeklindedir. Bunlar arasında follikülit, fronkül, karbonkül, impetigo, mastit, erizipel, selülit, nekrotizan fasit, yara enfeksiyonları sayılabilir. *S. aureus*, bakteremi, endokardit, menenjit, perikardit, pnömوني, osteomyelit, septik artrit, septik bursit, ekzotoksinlere bağlı besin zehirlenmesi ve toksik şok sendromu gibi klinik tablolara da yol açar (2).



## Teknik Bilgiler

### 1 Hedef mikroorganizma(lar)

*Staphylococcus aureus*

### 2 Tanı/tanımlama için asgari laboratuvar koşulları

#### 2.1. Laboratuvar güvenliği

*Staphylococcus aureus*: Biyogüvenlik Düzeyi-2 mikroorganizma

Biyogüvenlik düzeyi 2 için belirtilen güvenli laboratuvar çalışma yöntem ve uygulama kurallarına uygun olarak çalışılır. Enfeksiyöz damlacık oluşturma riski olan laboratuvar uygulamaları biyogüvenlik kabininde çalışılmalıdır.

#### 2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Hedef mikroorganizmalarla çalışacak personelin; en az sağlık meslek yüksek okulu mezunu sağlık teknikeri veya sağlık meslek liselerinin tıbbi laboratuvar bölümünden mezun olan sağlık teknisyeni statüsünde biyogüvenlik eğitimi almış ve bakteriyoloji laboratuvarında en az bir aylık eğitim sürecini tamamlamış olması gereklidir.

#### 2.3. Örnek, ayıraç, kit, ekipman

##### 2.3.1. İnceleme örneği, transportu, saklanması

- *S. aureus*'un deri ve mukoz membranlardaki yaygın bulunuşu dikkate alınarak enfeksiyon bölgesinden örnek alınırken çevre mikrobiyotasının bulaşmasını engellemek üzere azami dikkat sarfedilmelidir.
- Standart metodlarla (mikrobiyata bulaşmasını engelleyecek şekilde) alınan kan, idrar, yara, apse, BOS, eklem sıvısı, balgam gibi örnekler *S. aureus* izolasyonu için uygundur (Bkz. B ÖY 1-7/9-14) <sup>(1)</sup>. Bu mikroorganizmalarla çalışmada standart metodlar uygulanır; özel bir metod ya da önleme gerek yoktur.
- Örneğin transportu ve saklanması için özel bir koşul ya da metod gerekmez. Mikrobiyolojik örneklerin genel transport ve saklanma standartları *S. aureus* izolasyonu yapılacak örnekler için de geçerlidir (Bkz. B ÖY 1-7/9-14). Örnek transportu, herhangi bir transport besiyerinde yapılabilir <sup>(1)</sup>.

##### 2.3.2. Besiyeri

- Primer kültür için %5 defibrine koyun kanlı Columbia agar.
- Enfeksiyon yeri itibarıyla yoğun kontaminasyon olma olasılığı bulunan örneklerin (Ör. Dışkı örneği) mannitol-tuz agar, yumurta sarısı-tellürit

piruvat içeren Baird-Parker besiyerine, Columbia kolitsin-nalidiksik asit agara, lipaz-tuz-mannitol agara (Remel, Lenexa, KS) ve feniletıl alkol agara ekılması uygundur.

- *S. aureus* kolonilerinin kromojenik madde ile renklenmesi prensibine dayalı, CHROMagar Staph aureus (CHROMagar, Paris, France), BBL CHROM agar Staph aureus (BD Diagnostics, Sparks, MD) ve *S. aureus* ID (bioMérieux, La Balme Les Grottes, France) ticari olarak mevcut seçici agarlar da primer izolasyonda özellikle tarama amacıyla kullanılabilir (1).
- Kateter-ilışkili kan enfeksiyonlarında stafilokok tanısı problemlidir ve bunun üstesinden gelmek üzere yarı kantitatif 'roll-plate' kateter kültürü yapılır. Bunun için santral venöz kateterin distal segmenti kesilir ve Columbia kanlı agar üzerinde bir uçtan bir uca en az 4 kez yuvarlanır ve bir gece inkübe edilir. 15 KOB/mL veya daha fazla sayıda koloni sayısı kateter kolonizasyonunu gösterir. Kateterden ve periferel venden eş zamanlı alınan çiftli kan kültürlerinin sonuçları, farklı zamanlarda alınmış ve pozitif sonuç elde edilmiş kültürlerle birlikte değerlendirilerek kateter ilişkili bir enfeksiyon olup olmadığına ve de kateterin çıkarılması ya da bırakılmasına karar verilir (1).

### 2.3.3. Boyalar ve diğer ekipman

- Gram boyama (Bkz. B TP 03).
- Katalaz testi (Bkz. B-TP-10)
- Koagülaz testi (Bkz. B-TP-12)

### 2.4. Kalite kontrol

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Katalaz ve koagülaz pozitif).
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 veya 14990 (Koagülaz testi için negatif kontrol).
- *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 (Katalaz testi için negatif kontrol)

## 3 Tanı/tanımlama teknikleri

### 3.1. Mikroskopi (Gram boyalı inceleme)

Eklem sıvısı veya BOS gibi steril vücut sıvılarının ve steril olmayan klinik örneklerin Gram boyalı incelemesi stafilokok cinsi bakterilerin ilk tanısında önemli bir basamaktır. Stafilokoklar kültürden ya da klinik örnekten hazırlanan preparatlarda, Gram pozitif, spor oluşturmeyen, 0.5-1.5 µm çapında yuvarlak, tek tek koklar olarak, çiftli, dörtlü kok kümeleri olarak, kısa zincir yapmış koklar olarak veya üzüm salkımı görünümünde düzensiz kümeler oluşturmuş koklar olarak görülebilirler. Direkt mikroskopik inceleme sonucuna göre 'stafilokoka benzer Gram pozitif koklar görüldü' şeklinde bir ön rapor verilebilir. Stafilokoklar, piyojenik bakteri olmaları dolayısıyla enfeksiyon yerinden kontaminasyonu engelleyecek şekilde alınan örneklerde çok sayıda polimorfonükleer lökositle birlikte görülürler (3).

### 3.2. Kültür

- Klinik örneklerden stafilocokların primer izolasyonunda %5 defibrine koyun kanı içeren Columbia agar kullanılabilir.
- Yoğun kontaminasyon riski olan klinik örneklerden *S. aureus* izolasyonunda mannitol-tuz agar, yumurta sarısı-tellürit piruvat içeren Baird-Parker besiyerine, Columbia kolitsin-nalidiksik asit agara, lipaz-tuz-mannitol agara (Remel, Lenexa, KS) ve feniletıl alkol agara ekilmesi uygundur.
- Kan kültürü için klasik kan kültürü besiyerleri (otomatize sistem kan kültür şişeleri) kullanılır.
- *S. aureus* kolonilerinin kromojenik madde ile renklenmesi prensibine dayalı, CHROMagar Staph aureus (CHROMagar, Paris, France), BBL CHROM agar Staph aureus (BD Diagnostics, Sparks, MD) ve *S. aureus* ID (bioMérieux, La Balme Les Grottes, France) ticari olarak mevcut seçici agarlar da primer izolasyonda özellikle tarama amacıyla kullanılabilir.

### 3.3. Koloni morfolojisi

- Stafilocok türlerinin büyük çoğunluğu kanlı agar gibi seçici olmayan besiyerlerinde 34°C-37°C'de normal atmosfer koşullarında 24 saatte 1-3 mm, 72 saatte 3-8 mm çapında koloniler oluşturur.
- *S. aureus* kanlı agarda tipik olarak pigmentli (sarı krem-oranj), düzgün yüzeyli, yekpare, besiyerinden hafifçe yüksek ve hemolitik koloniler oluşturur. Nadiren kapsül kalınlığı artmış kökenler mukoid koloniler oluşturur (4).
- *S. aureus* ve bazı KNS'ler (Ör. *S. haemolyticus* ve *S. lugdunensis*) koloni etrafında zayıf veya kuvvetli belli belirsiz ya da oldukça belirgin β-hemoliz oluştururlar.
- *S. aureus*'un küçük koloni varyantları veya bazı diğer stafilocok türleri, 24-72 saatlik inkübasyon sonrası çoğunlukla pigmentsiz, nonhemolitik küçük (iğne ucu görünümlü) koloniler oluşturabilirler. Bunlar karışık bir kültür görünümü verebilirler. Pasaj kültürlerinde yine aynı görünümde koloniler oluşturabilirler ya da tekrardan sokak tipi görünümüne kavuşabilirler. Besiyerine hemin veya timidin eklenmesi ve/veya CO<sub>2</sub>'li ortam kolonilerin normale dönmesini sağlayabilir (4).

### 3.4. *S. aureus*'u tanımlama testleri ve değerlendirme

*S. aureus*'la birlikte klinik önemi olan diğer stafilocokların tanımlanmasında kullanılan testler Tablo 1.de verilmiştir.

#### 3.4.1. Koagülaz testi

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında *S. aureus*'un tür tanımlanmasında en yaygın kullanılan yöntem, *S. aureus* varlığında plazmanın pıhtılaşmasını test eden ve iki farklı yöntemle (tüp testi, lam aglütinasyon testi) yapılabilen koagülaz testidir (Tablo 1) (1).

*Tüp Koagülaz Testi* (Bkz. B-TP-12): Stafilocokal koagülazın fibrinojeni fibrine dönüştürmesi prensibine dayalı bu test ekstraselüler serbest koagülazı saptar.

Kısaca, seçici olmayan besiyerinden alınan şüpheli koloni 0.5 mL tavşan plazması içine konur. 37°C'de 4 saat inkübe edilir ve pıhtı oluşumu açısından değerlendirilir. 4 saatte pıhtı oluşumu saptanmazsa inkübasyon 18 saate tamamlanır ve tekrar değerlendirilir.

*Lam aglütinasyon Testi* (Bkz. B-TP-12): Bu test ile tavşan plazması varlığında *S. aureus*'un hücre duvarı ilişkili fibrinojen adesini, pıhtılaşma (clumping) faktörü A'nın etkisi ile *S. aureus*'un agregasyonu test edilir. *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi* de lam aglütinasyon testinde özellikle insan plazması kullanıldığında pozitif olarak bulunabilir.

Tüp koagülaz ve lam aglütinasyon yöntemlerinin bazı dezavantajları vardır: Tüp koagülaz testinde inkübasyon süresinin uzunluğu, lam aglütinasyon testinin ise düşük duyarlılığı başlıca dezavantajlardır.

Şüpheli bir izolat lam aglütinasyon testinde negatif bulunuyorsa sonuç mutlaka tüp koagülaz testi ile doğrulanmalıdır.

Tablo 1. Klinik önemi olan stafilokokların tanımlanmasında anahtar testler

	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. schleiferi</i>	<i>S. saprophyticus</i>
<b>Pigmentasyon</b>	+	-	d	(d)	-	d
<b>Koagülaz</b>	+	-	-	-	-	-
<b>Pıhtılaşma faktörü</b>	+	-	-	+	+	-
<b>HS-nükleaz</b>	+	-	-	-	+	-
<b>ALP</b>	+	+	-	-	+	-
<b>PYR</b>	-	-	+	+	+	-
<b>Ornitin dekarboksilaz</b>	-	(d)	-	+	-	-
<b>Üreaz</b>	d	+	-	D	-	+
<b>β-galaktozidaz</b>	-	-	-	-	(+)	+
<b>Asetoin üretimi</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Novobiyosin direnci</b>	-	-	-	-	-	+
<b>Polimiksin B direnci</b>	+	+	-	D	-	-
<b>D-Trehaloz</b>	+	-	+	+	d	+
<b>D-Mannitol</b>	+	-	d	-	-	d
<b>D-Mannoz</b>	+	(+)	-	+	+	-
<b>D-Turanoz</b>	+	(d)	(d)	(d)	-	+
<b>D-Ksiloz</b>	-	-	-	-	-	-
<b>D-Sellobiyoz</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Maltoz</b>	+	+	+	+	-	+
<b>Sükroz</b>	+	+	+	+	-	+

Sembol ve kısaltmalar: HS, ısıya dayanıklı; ALP, alkalin fosfat; PYR, pirrolidonil arilamidaz; +, %90'dan fazlası pozitif; -, %90'dan fazlası negatif; d, %11-89'u pozitif. Parantez geç reaksiyon verdiğini göstermektedir.

### 3.4.2. Hızlı lateks ve hemaglütinasyon testleri

Ticari olarak mevcut olan bu testler arasında protein A ve pıhtılaşma faktörü (clumping) A'yı saptayanlara ek olarak yeni 3. kuşak testler yer almaktadır. Yeni

kuşak testler, *S. aureus* kapsül polisakkariti serotip 5 ve 8'i veya diğer *S. aureus* yapılarını saptayan monoklonal antikolar içerir. Bunlar arasında Pastorex Staph-Plus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), Slidex Staph Plus (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), Staphaurex Plus and Staphytest Plus (Oxoid, Cambridge, United Kingdom) sayılabilir. Bu testlerin duyarlılıkları çok yüksek (%98-%100) olmakla birlikte özgüllükleri %72-%99 arasındadır. Kapsül polisakkariti 8'i taşıyan bazı KNS'ler (*S. haemolyticus* ve *S. hominis*) ve hücre duvarı hemaglutininine sahip *S. saprophyticus* bu testlerde yalancı pozitifliğe yol açabilir.

### 3.4.3. Biyokimyasal testler

Rutin tanı laboratuvarlarında *S. aureus*'u tanımlamada koagülaz testi ve hızlı lateks ya da hemaglutinasyon testleri kolaylıkla uygulanabilirler. Ancak biyokimyasal testlerin manuel uygulaması zor ve zaman alıcı olup standardizasyonu da problemlidir. Günümüzde bu testler, ticari olarak mevcut manuel ve otomatize biyokimyasal test sistemlerinde kolaylıkla yapılabilmektedir. Bu sistemelerin çoğunda aynı zamanda mikroorganizmanın antimikrobiyal duyarlılığı da test edilebilmektedir. Bu da zaman ve iş gücü açısından çok önemli bir avantaj sağlamaktadır. Ticari tanımlama sistemleri, klinik önemi olan stafilokokları %70-%90 doğrulukla saptarlar. Bu sistemlerden öne çıkanlar Tablo 2.'de verilmiştir. Bu sistemler özellikle *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus*'u tanımlamada oldukça başarılıdırlar. Ancak bu türlerin fenotipik varyantlarının ya da gıda izolatlarının tanımlamasında bazı problemler yaşanabilir. Bu sistemlerle *S. aureus* olarak tanımlanan bir izolatın, özellikle de oksasilin dirençli ise ikinci bir testle tanımlamasının doğrulanması önerilir.

Tablo 2. Stafilokok türlerinin tanımlamasında kullanılan ticari sistemler ve bazı özellikleri

	Üretici firma	İnkübasyon süresi	Değerlendirme	Saptanan stafilokok türü sayısı
<b>API Staph</b>	bioMérieux	18 saat	Manuel	> 20 tür
<b>ID32 Staph</b>	bioMérieux	18 saat	Manuel veya otomatik	> 20 tür
<b>Rapidec Staph<sup>a</sup></b>	bioMérieux	2 saat	Otomatik	3 <sup>a</sup>
<b>Vitek 2 GPI ID</b>	bioMérieux	18 saat	Otomatik	26
<b>MicroScan Pos ID</b>	Siemens	18 saat (klasik panel) 2.5 saat (hızlı panel) 2-2.5 saat( 'Synergies plus' panel)	Otomatik Otomatik Otomatik	19
<b>BD BBL Crystal Rapid Gram-Positive ID</b>	BD Diagnostic Systems	4 saat	Otomatik	14
<b>BD Phoenix</b>	BD Diagnostic Systems	10-15.5 saat	Otomatik	34

<sup>a</sup> Rapidec Staph testi ile sadece 3 stafilokok türü, *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* tanımlaması yapılır.

### 3.5. Seroloji

*S. aureus* enfeksiyonlarının tanısında serolojik testlerin pek yeri yoktur. Bunun istisnaları, TSS ve SSSS gibi toksin ilişkili olgularda koruyucu antikörlerin saptanmasına yönelik serolojik testlerdir (1). Ancak bu testlerin de tanıdaki yeri oldukça kısıtlıdır. Bununla birlikte hasta örneklerinden veya kontamine gıda ürünlerinden izole edilen kökenlerde toksin üretimi ticari olarak mevcut bazı testlerle araştırılabilir. Bunlar arasında TSST-1 tanısında kullanılan TST-RPLA (Oxoid, Cambridge, United Kingdom), TST-RPLA Seiken (Denka Seiken, Tokyo, Japan), TSST-1 Evigene (AdvanDx, Woburn, MA); stafilokokal enterotoksin tanısında kullanılan Rida Screen set A, B, C, D, E (R-Biopharm, Darmstadt, Germany), SET-RPLA Seiken (Denka Seiken) testleri sayılabilir.

### 3.6. Moleküler testler

- *S. aureus* tanımlamasında *S. aureus*'un *nuc* (nükleazı kodlar) geninin hedef alındığı PCR metodu yaygın olarak kullanılmaktadır. PCR bazlı metodlarda kullanılan diğer *S. aureus* hedefleri, *clfA*, *coa*, *sodM*, *femA* ve *B* genlerini ve sadece MRSA'lar için kullanılan *IS 431*'i kapsamaktadır.
- Kültürden izole edilen stafilokok kökenlerinin tanımlanmasında kullanılan çeşitli ticari testler mevcuttur. Bunlar arasında GenoType Staphylococcus (Hain Lifescience, Nehren, Germany), StaphPlex Panel (Qiagen, Germantown, MD), AccuProbe (Gen-Probe, San Diego, CA), *S. aureus* Evigene (AdvanDx, Woburn, MA) sayılabilir.
- *S. aureus* kromozomunda *SCCmec* ve *orfX* gen bölgelerine bağlanan oligonükleotid primerlerin kullanıldığı testler, tek basamakta hem hem tür bazında *S. aureus*'u hem de metisilin direnç genini saptayabilme özellikleriyle tercih edilmektedirler. Ancak bu testlerde hedef olarak *mecA* yerine *SCCmec*'in kullanılması dolayısıyla yalancı pozitiflik veya yalancı negatiflik görülebilir. Amplifikasyon bazlı MRSA tarama testlerinin negatif prediktif değerleri çok iyi (%97-99) olmakla birlikte pozitif prediktif değerleri daha düşüktür (%65-95). Ticari olarak mevcut olan bu testler arasında BD GeneOhm MRSA assay (BD Franklin Lakes, NJ), GenoType MRSA Direct ve 'Geno-Quick MRSA Advanced Test (Hain Lifescience), Xpert MRSA (Cepheid, Sunnyvale, CA), Lightcycler MRSA Advanced Test (Roche, Basel, Switzerland) sayılabilir.
- GeneXpert (Cepheid) ve BD GeneOhm (BD Diagnostics) ticari test sistemleri MRSA ve MSSA tanımlamasını pozitif kan kültürü şişesinden direkt olarak da yapabilmektedir. *S. aureus* PNA FISH (bioMérieux) testi de pozitif kan kültüründen hazırlanan preparatlarda *S. aureus*'u direkt olarak tanımlayabilmektedir.
- PVL'yi kodlayan geni hedef alan PCR bazlı ticari testler de mevcuttur. Bunlar arasında GenoType Staphylococcus ve MRSA test sistemleri (Hain Lifescience) ve PVL EVIGENE kit (AdvanDx, Woburn, MA) sayılabilir.
- *S. aureus* tanımlamasında ayrıca MALDI-TOF kütle spektrometre yöntemi de kullanılabilir.
- MRSA'nın kültür bazlı yöntemle saptanması hala moleküler sonuçların doğrulanması için gereklidir ve yapılmalıdır.

### 3.7. Saklama, referans merkeze gönderme

*Staphylococcus aureus* kökenleri, liyofilize olarak saklanabilir. Taze kültürden hazırlanan yoğun hücre süspansiyonları direkt defibrine koyun veya tavşan kanında ya da 'skim milk' (% 10-20 skim milk, %10 gliserol, distile suda hazırlanır ve sterilize edilir) içinde -70°C veya daha düşük sıcaklıklarda yıllarca saklanabilir. 'Skim milk' besiyeri hazırlandıktan sonra 2 mL'lik tüplere 0.25-0.5 mL olacak şekilde dağıtılır ve daha sonra sterilize edilir. *S. aureus* aynı zamanda -20°C'de diğer yaygın kullanılan kriyoprezervatif besiyerlerinde de uzun yıllar saklanabilir.

*S. aureus*'un tür bazında tanımlanmasında problem yaşayan merkezler, kökenlerini referans merkezin kültür transport talimatına uygun olarak referans merkeze gönderirler.

## 4 AMD testleri

### 4.1. *S. aureus*'da doğal ve kazanılmış direnç

- *Staphylococcus aureus* da diğer Gram pozitif bakteriler gibi aztreonam, kolistin/polimiksin B ve nalidiksik asite doğal olarak dirençlidir. Buna ek olarak seftazidime de doğal olarak dirençlidir (Tablo 3).

Tablo 3. *S. aureus* ve diğer KNS'lerin doğal direnç gösterdikleri antimikrobiyaller

	CAZ	DS	AMG	E	DA	QDA	VAN	TPN	FA	FOS	NOV	SSS
<i>S. aureus</i> ve diğer KNS	R											
<i>S. saprophyticus</i>	R								R	R	R	
<i>S. cohnii</i>	R										R	
<i>S. capitis</i>	R										R	

Kisaltmalar: CAZ, seftazidim; DS, diğer sefalosporinler; AMG, aminoglikozidler; QDA, kinupristin-dalfopristin; VAN, vankomisin; TPN, teikoplanin; FA, fusidik asit; FOS, fosfomisin; NOV, novobiyosin; SSS, sulfonamidler; R, dirençli

- *Staphylococcus aureus*'ta *mecA* geninin kodladığı yeni bir PBP'nin (PBP2a/PBP2') yol açtığı metisilin direnci, diğer tüm  $\beta$ -laktamlara da dirence yol açması nedeniyle hasta tedavisinde büyük sorun yaratmaktadır. *S. aureus* ve diğer stafilokoklar *mecA* genini üzerinde taşıyan yabancı hareketli bir DNA elementini '*Staphylococcal Cassette Chromosome*'u (SCC*mec*) kazanarak metisiline dirençli hale gelirler. SCC*mec*'in birçok varyantı bulunmakla beraber HK-MRSA izolatlarında en yaygın olanları SCC*mec* tip I, II, III ve IV'dür (1).
- TK-MRSA ile kıyaslandıklarında HK-MRSA izolatları arasında çoklu ilaç direnci oldukça yaygındır. Dirençli oldukları diğer antibiyotik grupları arasında aminoglikozitler, fosfomisin, fusidik asit, glikopeptidler, ketolidler,

linkozamidler, makrolidler, kinolonlar, rifampin, tetrasiklinler ve trimetoprim-sulfametaksazol bulunmaktadır.

- Yükselmiş vankomisin MİK değerlerine (4-8 µg/mL) sahip VISA izolatları ve onların öncülü kabul edilen heterojen VISA (hVISA) kökenlerinin, artan vankomisin MİK değerleri, *S. aureus* hücre duvarında reorganizasyon ve kalınlaşma ile sonuçlanan değişikliklere bağlıdır (5). Vankomisine duyarlı (MİK ≤2 µg/mL) *S. aureus* izolatlarından oluşan bir bakteri popülasyonunun içinde çok az da olsa MİK değeri >2 µg/mL olan *S. aureus* izolatları bulunabilir. Bu durum heterojen VISA varlığını gösterir. VISA izolatlarının çoğu teikoplanine de dirençli olduklarından GISA olarak da adlandırılabilirler.
- VISA izolatları aynı mekanizma ile daptomisin direnci de (MİK ≥2 µg/mL) sergilemektedirler (6).
- hVISA veya VISA izolatlarının saptanmasında disk difüzyon yöntemi kullanılmaz.
- Ciddi enfeksiyonlarda hVISA fenotipinin varlığının kötü prognozla ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (5).
- Vankomisin MİK değeri >8 µg/mL olan *S. aureus* izolatları VRSA veya GRSA olarak adlandırılır (5). GRSA, enterokoklardan kazanılan *vanA* geni ile ilişkilidir.
- GRSA izolatlar henüz Avrupa'da rapor edilmemiştir (5). *vanA* genini taşıyan plazmidin stabil olmamasının ve transfer sıklığının düşük olmasının, VRSA'ların yaygınlaşmamasındaki ana nedenler olduğu ileri sürülmektedir.
- VISA, hVISA, VRSA ve vankomisine duyarlı *S. aureus* izolatlarının sergiledikleri MİK değerleri Tablo 4.'de verilmiştir.

Tablo 4. *S. aureus*'da vankomisin direnç fenotiplerinde MİK dağılımı

Kategori	Adlandırma	MİK (µg/mL)
Duyarlı	VSSA	≤2 µg/mL
Heterorezistan	hVISA	1-2 µg/mL
Orta-Dirençli	VISA	4-8 µg/mL
Dirençli	VRSA	>8 µg/mL

Kısaltmalar: VSSA, vankomisine duyarlı *S. aureus*; hVISA, vankomisine heterodirençli *S. aureus*; VISA, vankomisine azalmış duyarlılık gösteren *S. aureus*; VRSA, vankomisin dirençli *S. aureus*

## 4.2. *S. aureus*'da antimikrobiyal direnç testleri

- Stafilkokların antimikrobiyal duyarlılıkları standart olarak disk difüzyon, sıvı dilüsyon ve agar dilüsyon yöntemleri ile test edilir. Bu yöntemler bu dokümanda *S. aureus*'a özel durumları belirtilerek kısaca açıklanmıştır. Daha detaylı yöntem bilgileri için UMS'nin AMD-TP-1, -2, -3 ve -4 dokümanlarına bakınız.
- *S. aureus*'da test edilecek antibiyotikler ve değerlendirmeleri Tablo 5.'de verilmiştir. AMDT'de kullanılacak antibiyotikler, disk içerikleri ve sınır değerler bu tabloda her iki standart, CLSI (7) ve EUCAST (8) dikkate alınarak verilmiştir.
- EUCAST ve CLSI arasında disk difüzyon ve dilüsyon testleri bazı



farklılıklar mevcuttur. Bunun için hangi standart (EUCAST veya CLSI) kullanılıyorsa diskler ona göre seçilmeli ve sonuçlar kullanılan standarta göre yorumlanmalıdır (Tablo 5).

- CLSI'da kısıtlı bildirim için Tablo 5.'de verildiği gibi A, B, C, U, O gruplaması yapılmaktadır. Buna göre A grubunda yer alan antibiyotikler test edilir ve raporlanır; B grubunda yer alan antibiyotikler, test edilir ve kısıtlı raporlanır. Ör. A grubuna direnç varsa, polimikrobiyal enfeksiyon varsa, hastanın A grubu ilaçlara allerjisi, intoleransı varsa ya da A grubu ilaçlara tedavide yanıt alınamamışsa raporlanır. C grubu antibiyotikler, alternatif ve ek antimikrobisidler kapsar. U grubu, esas olarak yalnız İYE'da kullanılan antimikrobisidler kapsar. O grubu, Klinik endikasyonu olan ancak rutin test edilmesine ve raporlanmasına gerek olmayan antimikrobisidler kapsar (7).
- MRSA saptanması, kolonizasyon tesbiti için MRSA taraması, VISA saptanması aşağıda verilmiştir.
- *S. aureus*'da vankomisin, daptomisin ve oksasilin duyarlılık testi MİK tayini ile yapılır. Disk difüzyon kullanılmaz.

#### 4.2.1. Disk difüzyon testi

Bkz. AMD-TP-01, -02

Besiyeri: Mueller-Hinton Agar (Bkz. AMD TP 01)

İnokulum: 0.5 McFarland (direkt koloni süspansiyonu) (Bkz. AMD TP 02)

İnkübasyon: 35±1°C, 18±2 saat (vankomisin, oksasilin, metisilin için tam 24 saat)

Okuma: a) Linezolid, oksasilin ve vankomisin hariç, disk difüzyon plağı siyah bir zemin üzerinde 5-10 cm yükseklikte tutulur. İnhibisyon zonu ölçümünde, çıplak gözle herhangi bir üremenin görülmediği zon kenarı dikkate alınır. İnhibisyon zonunun kenarında sadece büyüteç ile görülebilen küçük belli belirsiz koloniler okumda dikkate alınmaz.

b) Linezolid ve vankomisin için inhibisyon zonu içinde fark edilebilir üremenin olması ilgili antimikrobiyale direnci gösterir. Linezolid inhibisyon zonu değerlendirilirken plak ışık kaynağına doğru tutulur ve zon çapı arkadan okunur.

c) Trimetoprim ve sulfonamidlerle ilgili olarak besiyerindeki antagonistler hafif bir üremeye neden olabilir. Bu hafif üreme (esas üremenin %20'sini veya daha azını teşkil ediyorsa) değerlendirmeye alınmaz ve zon çapı üremenin belirgin olduğu bölgenin kenarı dikkate alınarak yapılır.

Tablo 5. *S. aureus*'da antimikrobiyal duyarlılık belirlemede test edilecek antimikrobiyaller, disk içerikleri, sınır değerler<sup>a</sup>

Antimikrobiyal	Disk ug	Zon çapı sınır değeri (mm)			MİK ug/mL		
		S	I	R	S	I	R
<b>A Grubu</b>							
Penisilin (benzilpenisilin)	10 ünite	≥29 (26)	-	≤28 (<26)	≤0.12	-	≥ 0.25 (>0.12)
Sefoksitin	30	≥ 22 (22)	-	≤21 (<22)	≤4	-	>4 (>4)
Oksasilin	-	-	-	-	≤2	-	≥4 (>2)
Eritromisin	15	≥23 (21)	14-22	≤13 (<18)	≤0.5 (1)	1-4	≥ 8 (>2)
Klindamisin	2	≥21 (22)	15-20	≤14 (<19)	≤0.5 (0.25)	1-2	≥4 (>0.5)
Trim./sulfamet.	1.25-23.75	≥16 (17)	11-15	≤10 (<14)	≤2/38 (2)	-	≥4/76 (>4)
<b>B Grubu</b>							
Seftarolin	30	≥24 (20)	21-23	≤20 (<20)	≤1 (1)	2	≥4 (>1)
Daptomisin	-	-	-	-	≤ 1 (1)	-	(>1)
Linezolid	30 (10)	≥21 (19)	-	≤20 (<19)	≤4 (4)	-	≥8 (>4)
Tetrasiklin	30	≥19 (22)	15-18	≤14 (<19)	≤4 (1)	8	≥16 (>2)
Vankomisin	-	-	-	-	≤2	4-8	≥16 (>2)
Rifampin	5	≥20 (26)	17-19	≤16 (<23)	≤1 (0.06)	2	≥4 (>0.5)
<b>C Grubu</b>							
Kloramfenikol	30	≥18	13-17	≤12 (<18)	≤8 (8)	16	≥32 (>8)
Siprofloksasin	5	≥21 (20)	16-20	≤15 (<20)	≤1 (1)	2	≥4 (>1)
Levofloksasin	5	≥19 (22)	16-18	≤15 (<19)	≤1 (1)	2	≥4 (>2)
Gentamisin	10	≥15 (18)	13-14	≤12 (<18)	≤4 (1)	8	≥16 (>1)
<b>U Grubu</b>							
Nitrofurantoin <sup>c</sup>	300 (100)	≥17 (13)	15-16	≤14 (<13)	≤32 (64)	64	≥128 (>64)
Norfloksasilin	10	≥17	13-16	≤12 (<17)	≤4	8	≥16
Trimetoprim	5	≥16 (17)	11-15	≤10 (<14)	≤8 (2)	-	≥16 (>4)
Sulfonamidler	250 veya 300	≥17	13-16	≤12	≤256	-	≥512
Lomefloksasin	10	≥22	19-21	≤18	≤2	4	≥8
<b>O grubu</b>							
Amikasin	30	≥17 (18)	15-16	≤14 (<16)	≤16 (8)	32	≥64 (>16)
Kinupristin-dalfopristin	15	≥19	16-18	≤15	≤1	2	≥4
Telitromisin	15	≥22 (18)	19-21	≤18 (<16)	≤1 (8)	2	≥4 (>16)

<sup>a</sup> Bu tablo hazırlanırken CLSI'nin A, B, C, O, U grup ayırmaları dikkate alınmıştır (Bkz. 4.2. açıklama). Disk içerikleri ve sınır değerlerde EUCAST standartları parantez içinde belirtilmiştir.

<sup>b</sup> EUCAST nitrofurantoin sınır değerlerini sadece *S. saprophyticus* için belirtmektedir.

#### 4.2.2. Sıvı dilüsyon testi

Bkz. AMD-TP-01, -04 (<sup>9</sup>)

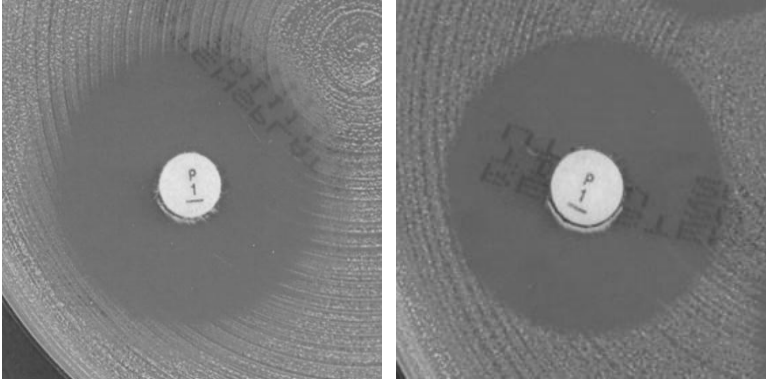
Besiyeri: Katyon ayarlı Mueller-Hinton Sıvı Besiyeri.

#### 4.2.3. Penisilinaza bağlı penisilin direncinin saptanması

Tablo 5.'de de görüldüğü gibi hem disk difüzyon hem de MİK yöntemi ile saptanabilir.

- **Disk difüzyon yöntemi:** 4.2.1.'de belirtildiği gibi benzilpenisilin diski ile yapılır (Tablo 5). MİK saptamaya göre daha güvenilirdir. Zon çapı, ≥26 mm ve zon sınırı belirsiz olup keskin değilse 'DUYARLI'; zon çapı ≥26 mm olduğu halde zon sınırı keskin ise 'DİRENÇLİ' olarak bildirilir. Emin olunamayan durumlarda 'DİRENÇLİ' olarak bildirilir. Tabii ki zon çapı <26 mm ise her durumda 'DİRENÇLİ' olarak bildirilir (Bkz. Şekil 1.). Kromojenik sefalosporin temelli beta-laktamaz testleri stafilokok penisilinazını güvenilir bir şekilde saptamamaktadırlar.

- **MİK belirleme:** 4.2.2.'de belirtildiği gibi yapılır. Eğer MİK >0.12 mg/L ise 'DİRENÇLİ' olarak bildirilmelidir. Eğer MİK ≤0.12mg/L ise duyarlılığın benzilpenisilin diski ile test edilmesi gerekmektedir.
- Beta-laktamaz pozitif kökenler benzilpenisilin, fenoksimetilpenisilin, amino-, karboksi- ve üreidopenisilinlere dirençlidir ve dirençli olarak rapor edilir. Beta-laktamaz negatif (penisilinaz negatif) ve sefoksitine duyarlı (metisiline duyarlı) kökenler adı geçen antibiyotiklere duyarlı olarak bildirilebilir.
- Beta-laktamaz pozitif olup sefoksitine duyarlı (metisiline duyarlı) izolatlar, penisilin/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonlarına ve penisilinaz dirençli penisilinlere (oksasilin, kloksasilin, dikloksasilin ve flukloksasilin) duyarlıdır.



Şekil 1. *S. aureus*'da benzilpenisilin inhibisyon zonunun değerlendirilmesi: soldaki resimde belirsiz zon sınırı ve ≥26 mm 'DUYARLI' olarak bildirilir, sağdaki şekilde keskin zon sınırı ve ≥26 mm 'DİRENÇLİ' olarak bildirilir.

#### 4.2.4. Metisilin direncinin saptanması

Tablo 5.'de de görüldüğü gibi hem disk difüzyon hem de MİK yöntemi ile saptanabilir (5).

- **Disk difüzyon: sefoksitin diski ile metisilin direnci saptama;** 4.2.1'de verilen disk difüzyon yöntemi kullanılır. 30 µg'lık sefoksitin diski ile yapılır ve inhibisyon zon çapı Tablo 5.'de verildiği üzere değerlendirilir. Sefoksitin diski ile metisilin duyarlılığı iyi ışıkta zon içi üreme olup olmadığına dikkat ederek değerlendirilir. Zon içi üreme kontaminasyonun ya da heterojen metisilin direncinin göstergesi olabilir. Sefoksitine dirençli bulunan *S. aureus* izolatları diğer β-laktam antimikrobiyallere de, penisilinlere, β-laktam/β-laktamaz inhibitör kombinasyonlarına, sefemelere (anti-MRSA aktiviteli sefaloporinler hariç), karbapenemlere dirençli rapor edilir. Metisilin direncinin saptanmasında oksasilin disk difüzyon yöntemi kullanılmaz.
- **MİK ile metisilin direnci saptama:** Sefoksitin MİK'i veya Oksasilin MİK'i belirlenerek saptanabilir (Tablo 5). **Sefoksitin MİK belirleme:** 4.2.2.'de verilen yöntemle yapılır ve Tablo 5.'e göre değerlendirilir.
- Sefoksitin ve oksasilin test sonuçları arasında uyumsuzluk varsa Tablo 6.'ya göre değerlendirilir.
- *S. aureus*'da metisilin duyarlılığı saptamada kullanılacak kalite kontrol kökenleri  
*S. aureus* ATCC 29213: Metisiline duyarlı  
*S. aureus* NCTC 12493: Metisiline dirençli (*mecA*)  
*S. aureus* NCTC 13552: Metisiline dirençli (*mecC*)

Tablo 6. Oksasilin ve sefoksitin sonuçları uyumsuz olduğunda değerlendirme ve raporlama

	Sefoksitin MİK veya disk difüzyon	
	'S'	'R'
Oksasilin MİK 'R'	'R' olarak raporla	'R' olarak raporla
Oksasilin MİK 'S'	'S' olarak raporla	'R' olarak raporla

- *Metisilin direnci saptamada moleküler yöntemler:* *S. aureus* kormozomunda SCCmec ve *orfX* gen bölgelerine bağlanan oligonükleotid primerlerin kullanıldığı testler, tek basamakta hem hem tür bazında *S. aureus*'u hem de metisilin direnç genini saptayabilme özellikleriyle tercih edilmektedirler. Ancak bu testlerde hedef olarak *mecA* yerine SCCmec'in kullanılması dolayısıyla yalancı pozitiflik veya yalancı negatiflik görülebilir. Amplifikasyon bazlı MRSA tarama testlerinin negatif prediktif değerleri çok iyi (%97-99) olmakla birlikte pozitif prediktif değerleri daha düşüktür (%65-95). Ticari olarak mevcut olan bu testler arasında BD GeneOhm MRSA assay (BD Franklin Lakes, NJ), GenoType MRSA Direct ve 'Geno-Quick MRSA Advanced Test (Hain Lifescience), Xpert MRSA (Cepheid, Sunnyvale, CA), Lightcycler MRSA Advanced Test (Roche, Basel, Switzerland) sayılabilir. GeneXpert (Cepheid) ve BD GeneOhm (BD Diagnostics) ticari test sistemleri MRSA ve MSSA tanımlamasını pozitif kan kültürü şişesinden direkt olarak da yapabilmektedir. *S. aureus* PNA FISH (bioMérieux) testi de pozitif kan kültüründen hazırlanan preparatlarda *S. aureus*'u direkt olarak tanımlayabilmektedir.

#### 4.2.5. Azalmış glikopeptid duyarlılığı (VISA, hVISA)

- *S. aureus*'da vankomisine azalmış duyarlılık (VISA), standart olarak MİK tayini ile belirlenir. VISA ve hVISA saptanmasında kesinlikle disk difüzyon kullanılmaz. Standart dilüsyon testleri MİK belirlenemediği durumlarda Gradient testi yapılması önerilir (5).
- **Tanımlar:** VRSA; vankomisin MİK'i >8 µg/mL olan *S. aureus*, VISA; vankomisin MİK'i 4-8 µg/mL *S. aureus*, hVISA; hVISA popülasyonunda çoğu *S. aureus* izolatu vankomisine duyarlı (<2 µg/mL) iken popülasyonun 10<sup>6</sup> hücrede biri >2 µg/mL MİK'e sahiptir.
- **MİK ile VISA saptanması:** Vankomisin MİK'i 4.2.2'de belirtildiği gibi saptanır. MİK'i 4-8 µg/mL olan izolatlar VISA olarak tanımlanır.
- **hVISA (hGISA) saptanması için özel tarama testleri:**
  - Makro gradient testi:** Bu test hGISA, GISA ayırımı yapamaz. 90 mm'lik plaktaki BHI agara 2 McFarland bulanıklığındaki *S. aureus* süspansiyonundan 0.1 mL inoküle edilir. 35°C'de normal atmosferde 24-48 saat inkübe edilir. Makro gradient testinde yaygın olarak E-test kullanılır. Tam inhibisyonun olduğu noktadaki değer okunur. Yatay gelen ışıkta plak eğimli tutularak lensle buğulu üreme, mikrokoloni ve izole kolonilerin varlığı açısından incelenir. Vankomisin ve teikoplaninin her ikisi için de ≥8 µg/mL okuma (veya sadece teikoplanin için ≥12 µg/mL okuma) 'POZİTİF' sonuç olarak değerlendirilir. Her iki kriterde teikoplanini kapsadığı için vankomisin testi, teikoplanin sonucuna bağlı olarak yapılabilir (Tablo 7.).
  - Glikopeptid direnç saptanmasında gradient testi (GRD):** *S. aureus*'un 0.5 McFarland'lık süspansiyonundan %5 koyun kanlı MHA'a eküvyonla yayılır. İnhibisyon elipsi 35°C'de 24-48 saatlik inkübasyon sonrası okunur.

Vankomisin veya teikoplanin için 8 µg/mL okuma 'POZİTİF' olarak değerlendirilir.

c) *Teikoplanin tarama agar*: 5 µg/mL teikoplanin içeren MHA kullanılır. Serum fizyolojikte 2 McFarland'lık *S. aureus* süspansiyonu hazırlanır. Ve bundan 10 µL spot ekimle MHA yüzeyine inoküle edilip 35°C'de 24-48 saat inkübe edilir. 48 saatte 2 koloniden fazla üreme, glikopeptidlere azalmış duyarlılık olduğunu gösterir.

Tablo 7. Makrogradient test ile hVISA veya GISA taramasında algoritma

Teikoplanin MİK ≥12 µg/mL	GISA, hGISA veya GRSA
Teikoplanin MİK 8-12 µg/mL	Vankomisini test et. Okuma ≥8 µg/mL ise GISA, hGISA veya GRSA
Teikoplanin MİK <8 µg/mL	GISA veya hGISA yok

- *hVISA (VISA) saptaması için doğrulama testi*:  
Tarama testlerinde pozitif bulunan (hVISA/VISA olarak saptanan) her izolat 'population analysis profile area under curve' (PAP-AUC) testine alınmalıdır. Bu test sadece referans laboratuvarlarında çalışılır.
- *S. aureus*'da glikopeptid direncinin saptanmasında kullanılacak kalite kontrol kökenleri:  
*S. aureus* ATCC 29213: Glikopeptide duyarlı  
*S. aureus* ATCC 700698: hGISA (Mu3)  
*S. aureus* ATCC 700699: GISA (Mu50)

#### 4.2.6. İndüklenebilir klindamisin direnci: D-zon testi

- Mueller-Hinton sıvı besiyerinde 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan *S. aureus* süspansiyonları, % 5 koyun kanlı MHA yüzeyine steril eküvyonla yayılır.
- Eritromisin (15 µg) ve klindamisin (2µg) diskleri, birbirlerine uzaklıkları merkezden merkeze 15-20 mm olacak şekilde agar yüzeyine yerleştirilir ve plaklar %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 35±2 °C'de 20-24 saat inkübe edilir.
- Klindamisin diski etrafında oluşan inhibisyon zonu, eritromisin diskinin bakan tarafta küntleşme gösteriyorsa bu fenotip 'indüklenebilir klindamisin direnci pozitif' olarak değerlendirilir.

#### 4.2.7. Norfloksasilin tarama testi

Florokinolon direncinin taraması için 10 µg'lık norfloksasin diskleri kullanılarak tarama testi yapılabilir (Tablo 5). Norfloksasin inhibisyon zon çapı ≥17 mm ise ('S'), siprofloksasin, levofloksasilin, moksifloksasilin ve ofloksasine 'DUYARLI' ('S') olarak rapor edilir. Norfloksasin inhibisyon zon çapı <17 mm ('R') ise siprofloksasilin ve çalışılıyorsa levofloksasin için ayrıca test edilir ve sonuç bildirilir.

## 5 Raporlama

- *Staphylococcus aureus* da diğer Gram pozitif bakteriler gibi aztreonam, kolistin/polimiksin B ve nalidiksik asite ve ayrıca seftazidime doğal olarak dirençli olup doğal dirençli oldukları antimikrobiyallerin sonuç raporunda not olarak yer alması uygun olabilir.

- **Benzilpenisilin direnci ( $\beta$ -laktamaz üretimine bağlı) raporlama:** Benzilpenisilin sınır değerleri çoğunlukla, ancak kesin olmayan bir şekilde, beta-laktamaz üreten kökenleri üretmeyenlerden ayırır. a) Eğer MİK  $>0.12$  mg/L ise dirençli olarak bildirilmelidir. b) Eğer MİK  $\leq 0.12$  mg/L ise duyarlılığın benzilpenisilin diski ile test edilmesi gerekmektedir. c) Beta-laktamaz pozitif kökenler benzilpenisilin, fenoksimetilpenisilin, amino-, karboksi- ve üreidopenisilinlere (ampisilin, amoksisilin, azlosilin, karbenisilin, mezlosilin, piperasilin ve tikarsilin) dirençli 'R' olarak rapor edilir. d) Beta-laktamaz negatif ve sefoksitine duyarlı (metisiline duyarlı) kökenler c şıkkındaki antibiyotiklere duyarlı olarak bildirilebilir. e) Beta-laktamaz pozitif fakat sefoksitine duyarlı kökenler penisilin-beta-laktamaz inhibitör kombinasyonlarına ve penisilinaza dirençli penisilinlere (oksasilin, kloksasilin, dikloksasilin ve flukloksasilin) duyarlı olarak rapor edilir. f) Benzilpenisilin diski etrafında oluşan inhibisyon zonunun kenarı keskin ise çapı  $\geq 26$  mm olsa bile izolat penisiline 'DİRENÇLİ' 'R' olarak rapor edilir. Benzilpenisilin diski etrafında oluşan inhibisyon zonunun kenarı net değil 'belirsiz veya bulanık' ise ve zon çapı  $\geq 26$  mm ise izolat penisiline 'DUYARLI' 'S' olarak rapor edilir (Bkz. Şekil 1).
- **Metisilin direnci raporlama:** a) Sefoksitin veya oksasiline (MİK'le bakılır) dirençli kökenler metisiline dirençlidir ve MRSA'ya karşı onaylanmış etkinliği ve klinik sınır değeri bulunanlar dışında diğer beta-laktam antibiyotiklere (penisilinler,  $\beta$ -laktam/ $\beta$ -laktamaz inhibitör kombinasyonlarına, sefemlere (anti-MRSA aktiviteli sefalosporinler hariç) ve karbapenemlere 'DİRENÇLİ' 'R' olarak rapor edilir (Bkz. 4.2.4) b) Sefoksitin disk testinde dirençli bulunan izolatlar oksasilin dirençli olarak rapor edilir. Oksasilin MİK'ine (sıvı dilüsyon, agar dilüsyon, gradient test) bakan laboratuvarlar yöntemlerini belirtmek koşuluyla oksasilin sonuçlarını da bildirmelidir.
- **Vankomisine azalmış duyarlılık (VISA) raporlama:** a) Glikopeptidlere azalmış duyarlılık MİK tayini ile belirlenir. b) Vankomisin MİK'i 4-8  $\mu$ g/mL olan izolatlar VISA olarak tanımlanır (Bkz. 4.2.5). c) Vankomisin MİK'i  $>8$   $\mu$ g/mL olan izolatlar doğrulama için referans laboratuvara gönderilir.
- **Sefalosporinler:** *S. aureus*'da sefalosporin (seftazidim, sefiksim, seftibuten hariç) duyarlılığı sefoksitin duyarlılığına göre raporlanır. Sefoksitin MİK'i  $>4$   $\mu$ g/mL olan veya sefoksitin disk difüzyonda dirençli (inhibisyon zon çapı:  $<22$  mm) bulunan izolatlar diğer antistafilokokal sefalosporinlere de dirençli olarak rapor edilir. Seftazidim, sefiksim, seftibuten stafilokok enfeksiyonlarında etkinliği yoktur ve raporlanmaz. Metisiline duyarlı *S. aureus* izolatları seftaroline de duyarlı olarak rapor edilir.
- **Daptomisin:** MİK'i, duyarlılık sınır değerinin ( $\leq 1$ ) üstünde olan izolat çok nadirdir. Böyle bir izolat saptandığında tanımlama ve duyarlılık testi tekrarlanmalı ve aynı sonuç alınıyorsa izolat referans laboratuvarına gönderilmelidir. Daptomisin solunum yolu örneklerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarında rapor edilmemelidir.
- **Kinolonlar:** Norfloksasin inhibisyon zon çapı  $\geq 17$  mm ('S') ise izolat siprofloksasin, levofloksasin, moksifloksasin ve ofloksasine 'DUYALI' ('S') olarak rapor edilir. Norfloksasin inhibisyon zon çapı  $< 17$  mm ('R') ise siprofloksasilin ve çalışılıyorsa levofloksasilin ayrıca test edilir ve sonuç ona

göre raporlanır.

## 6 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- *S. aureus* tanımlamada lam koagülaz testi yalancı negatiflik verebilir.
- *S. aureus*'da metisilin direncinin moleküler yöntemler saptanmasında yalancı pozitiflik veya yalancı negatiflik görülebilir. Nedenler; *mecC* genine bakılmaması, *mecA* yerine SCC'yi saptaması gibi.
- Vankomisin duyarlılığı disk difüzyonla belirlenmez.
- Benzilpenisilin MİK'i  $\leq 0.12$ mg/L ise duyarlılığın benzilpenisilin diski ile test edilmesi gerekmektedir
- Kromojenik sefalosporin temelli beta-laktamaz testleri stafilokok penisilinazını güvenilir bir şekilde saptamamaktadırlar.

## İlgili diğer UMS belgeleri

B ÖY (Bakteriyoloji Örnek Yönetimi) 1-7/9-14

B TP (Bakteriyoloji test prosedürleri) 03, 10, 12

AMD-TP (Antimikrobiyal Duyarlılık-Test Prosedürleri) -01, 02, 04

## Kaynaklar

- <sup>1</sup> K Becker, C von Eiff. *Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci*. In: Manuel of Clinical Microbiology, Eds: J Versalovic, KC Carroll, G Funke. Volume 1 Eds: JH Jorgensen, ML Landry, DW Warnock. ASM Press, American Society for Microbiology, Washington DC, 2011.
- <sup>2</sup> V Dündar, D Öztürk Dündar. Stafilokok Enfeksiyonları. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi; Edt: A Willke Topçu, G Söyletir, M Doğanay. 3. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti., İstanbul, 2008
- <sup>3</sup> PR Murray, EJ Baron, JJ Jorgensen, MA Pfaller, and RH Tenover. Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. ASM Press: Washington, DC, 2003.
- <sup>4</sup> LS Garcia, HD Isenberg. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 3rd ed. ASM Press, American Society of Microbiology, Washington, DC, 2010
- <sup>5</sup> EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, Version 1, December 2013.
- <sup>6</sup> L Cui, E Tominaga, HM Neoh, K Hiramatsu. Correlation Between Reduced Daptomycin Susceptibility and Vancomycin Resistance in Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50: 1079-1082.
- <sup>7</sup> Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M100-S23; Vol. 33 No.1, January 2013.
- <sup>8</sup> European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0., valid from 2014-01-01.
- <sup>9</sup> ISO standart 20776-1,2006.





T.C. Sağlık Bakanlığı

## ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

# ***Enterococcus faecalis/faecium:*** **Tanımlanması ve AMD Testleri** (Vankomisin direnci, yüksek düzey aminoglikozit direnci)

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu 11
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri (AMD)
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	AMD-MT-02
Sürüm No	1.0
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

## İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	3
GENEL BİLGİ .....	4
TEKNİK BİLGİLER .....	5
1 Hedef mikroorganizmalar .....	5
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları .....	5
3 Tanı/tanımlama teknikleri .....	7
4 AMD testleri.....	13
5 Raporlama .....	20
6 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	21
EKLER.....	22
Ek-1 Basitrasın testi.....	22
Ek-2 L-arabinoz fermentasyon testi .....	23
Ek-3 Sorbitol fermentasyon testi .....	24
Ek-4 Metil- $\alpha$ -d-glukopiranozid testi (MGP) .....	25
Ek-5 Nitrosetin beta-laktamaz testi .....	26
Ek-6 EUCAST Enterokok antimikrobiyal duyarlılık test tablosu	27
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	30
KAYNAKLAR.....	30

## Kapsam ve Amaç

Bu doküman, klinik örneklerden enterokok cinsi bakterileri izole edebilmek, *E. faecalis* ve *E. faecium* tür ayırımını yapabilmek ve bunların antimikrobiyal duyarlılıklarını saptayabilmek üzere klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının yararlanabileceği standart bir kaynak oluşturmak amacıyla hazırlanmıştır. Dokümanın kapsamında enterokokların klinik örneklerden izolasyonu, cins düzeyinde tanımlanabilmeleri, *E. faecalis* ve *E. faecium*'un tür düzeyinde tanımlanabilmeleri ve antimikrobiyal duyarlılıklarını saptamak üzere kullanılacak standart fenotipik testler, test değerlendirilmeleri, kullanıcı dostu algoritmalar ve tablolar yer almaktadır.

## Kısaltmalar ve Tanımlar

<b>AMDT</b>	Antimikrobiyal Duyarlılık Testi
<b>CLSI</b>	Clinical Laboratory Standards Institute (ABD)
<b>EARSS</b>	European Antimicrobial Resistance Surveillance System
<b>EUCAST</b>	ESCMID Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi
<b>FISH</b>	Floresan in-situ hibridizasyon
<b>İYE</b>	İdrar yolu enfeksiyonu
<b>I</b>	Orta-duyarlı
<b>LAP</b>	Lösinaminopeptidaz
<b>MALDI-TOF</b>	Matrix-Associated Laser Desorption/Ionization-Time of Flight
<b>MHB</b>	Mueller Hinton Sıvı Besiyeri
<b>MGB</b>	Metil- $\alpha$ -Glukopiranozid
<b>MİK</b>	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
<b>PBP</b>	Penisilin bağlayan protein
<b>R</b>	Dirençli
<b>S</b>	Duyarlı
<b>SCOPE</b>	Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance
<b>SENTRY</b>	Antimicrobial Resistance Surveillance Program
<b>UAMDSS</b>	Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveys Sistemi
<b>ULGR</b>	Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi
<b>VRE</b>	Vankomisin Dirençli Enterokok

## Genel Bilgi

Önceleri *Streptococcus* cinsi içinde yer alan enterokoklar 1984 yılında *Enterococcus* olarak ayrı bir cins olarak tanımlanmıştır (1). Bu cinsin üyeleri fakültatif anaerob, Gram pozitif, katalaz negatif (bazı türler yalancı pozitiflik gösterir), hareketsiz (*E. casseliflavus*, *E. gallinarum* hariç) olup mikroskopik olarak tek veya çiftli ya da kısa zincir yapmış koklar olarak görülürler. Enterokoklar toprak, su gibi çevrelerde ve de insan ve hayvanların gastrointestinal sisteminde yaygın olarak bulunurlar. Normal bağırsak florasının önemli üyeleri olup 1 g dışkıdaki sayıları  $10^5$ - $10^7$ 'den fazladır (2).

Enterokoklar kommensal mikroorganizmalar olmakla birlikte fırsatçı patojen olarak davranarak insanda çeşitli enfeksiyonlara da yol açarlar. En sık olarak idrar yolu, kan, endokardium, yanık ve ameliyat yeri yaraları, abdomen, kateter ve safra yolunu enfekte ederler. Enterokokların kommensal olarak her yerde bulunmaları dolayısıyla enfeksiyon etkeni olup olmadıklarının belirlenmesinde dikkatli olmak gerekir.

Enterokoklar, özellikle virülan olanları kazanılmış antimikrobiyal direnç özelliğine ve direnç determinantlarını diğer bakterilere (ör., stafilokoklara) aktarabilme özelliğine sahiptirler. Biyofilm oluşturma özellikleri de virülanlarında çok önemli olup biyolojik ya da cansız yüzeylerde kolonize olmalarını ve antibiyotiklerden etkilenmemelerini sağlar.

*Enterococcus faecalis*, insan klinik örneklerinden en sıklıkla (%80-90) izole edilen tür olup bunu *E. faecium* (%5-10) izlemektedir. Bununla birlikte bu oranlar çeşitli faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Örneğin vankomisin dirençli *E. faecium* gibi salgın ilişkili izolatların yayılışındaki artış bu oranları değiştirebilir.

İnsan klinik örneklerinden daha az sıklıkta izole edilen türler, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. raffinosus*'dur. Bunları *E. avium*, *E. caccae*, *E. cecorum*, *E. dispar*, *E. durans* gibi türler izlemektedir.

Enterokokların tıbbi önemi otuz yılı aşkın bir süreden beri hasta morbiditesi ve mortalitesini ve de sağlık harcamalarını önemli ölçüde arttıran çoklu antibiyotik dirençli hastane ilişkili patojenler olarak öne çıkmaları nedeniyle belirgin şekilde artmıştır. Bu mikroorganizmaların hastane ilişkili enfeksiyon etkeni olarak tanımlanmaya başladıkları 1970'li yılların sonu aynı zamanda kullanımdaki antimikrobiyallere direnç artışının görülüşüyle paralellik göstermektedir.

Hastanelerde VRE'nin ortaya çıkışı ve epidemik artışına dair ilk raporların yayımlanması, enterokok enfeksiyonlarının insidans ve epidemiyolojisi üzerinde büyük etki yaratmıştır. Örneğin A.B.D.'de VRE izolatlarının oranı, 1989'da %0.3 iken; 1999'da bu oran %25'i aşmıştır. O zamandan beri enterokoklar yoğun bakım ünitesindeki hastalardan en sıklıkla izole edilen hastane ilişkili patojenler sıralamasında enfeksiyonun tipine bağlı olarak (idrар yolu ve yara enfeksiyonlarının, bakteremi) ikinci veya üçüncü sırada yer almaktadırlar.

Hastane ilişkili enterokok enfeksiyonlarının yarısı yoğun bakım ünitelerinde görülmektedir. Tüm hastane ilişkili enfeksiyonların %10'undan, bakteremilerin %9'undan ve hastane ilişkili idrar yolu enfeksiyonlarının %16'sından sorumludurlar.

SCOPE ve SENTRY verilerine göre kandan izole edilen *E. faecalis* izolatlarının %2'si; *E. faecium* izolatlarının ise %60'ı vankomisine dirençlidir.

EARSS'a göre çeşitli Avrupa ülkelerinde hastane ilişkili enterokokal bakteremilerde VRE prevalansı %5 ile %30 arasında değişmektedir.

Gastrointestinal sistemlerinde VRE taşıyan hastanede yatan hastalar, bu mikroorganizmanın esas rezervuarlarıdır ve bu hastalar VRE ile bir kez kolonize olduktan sonra bu mikroorganizmaları haftalarca aylarca taşırlar. VRE'ler direkt olarak hastadan hastaya bulaşabilecekleri gibi indirekt olarak sağlık çalışanlarının elleri, kontamine tıbbi aletler (şeker ölçüm aletleri, kan basıncı ölçüm aletleri, elektronik termometreler, elektrokardiyogram monitor ve kabloları) ve çevresel yüzeyler (hasta giysileri, çarşaf, yatak, başucu mobilyaları, kapı kolları, lavabo, zemin) aracılığı ile de bulaşrlar.

VRE kolonizasyonu ve enfeksiyonlarının artışı ve VRE yayılımını önlemek üzere CDC'nin Hastane Enfeksiyon Kontrol Uygulamaları Danışma Komitesi'nin hazırladığı rehberdeki öneriler, vankomisin dikkatli kullanımını, VRE'nin erken saptanması ve çapraz-kontaminasyonu sınırlamak üzere hasta izolasyonu, el yıkama, VRE bulaşı hakkında eğitim gibi enfeksiyon kontrol önlemlerini kapsamaktadır. VRE ile kolonize olan hastaların sadece az bir bölümünde ciddi sistemik enterokokal enfeksiyon geliştirmekteyse de, VRE ile intestinal kolonizasyon sonradan ortaya çıkan VRE enfeksiyonları ile açık bir biçimde ilişkilendirilmiştir. Karaciğer transplant hastaları, kronik hemodiyaliz hastaları, onkoloji hastaları (özellikle hematolojik malignensili hastalar) arasında VRE taşıyıcısı olanların ciddi enterokokal enfeksiyonları geliştirme riskleri diğerlerine göre fazladır. Bu yüksek risk grubundaki hastalarda VRE bulaş ve salgınlarını önlemek üzere aktif süreyans yapılmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır.

## Teknik Bilgiler

### 1 Hedef mikroorganizmalar

*Enterococcus faecalis* / *Enterococcus faecium*

### 2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

#### 2.1. Laboratuvar güvenliği

*Enterococcus faecalis* / *E. faecium*: Biyogüvenlik Düzeyi-2 mikroorganizmalar.

Biyogüvenlik düzeyi 2 için belirtilen güvenli laboratuvar çalışma yöntem ve uygulama kurallarına uygun olarak çalışılır. Enfeksiyöz damlacık oluşturma riski olan laboratuvar uygulamaları biyogüvenlik kabininde çalışılmalıdır.

#### 2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Hedef mikroorganizmalarla çalışacak personelin; en azsağlık meslek yüksek okulu mezunu sağlık teknikeri veya sağlık meslek liselerinin tıbbi laboratuvar bölümünden mezun olan sağlık teknisyeni statüsünde biyogüvenlik eğitimi almış vebakteriyoloji laboratuvarında en az bir aylık eğitim sürecini tamamlamış olması gereklidir.

## 2.3. İnceleme örneği, transportu ve saklanması

- Standart metodlarla alınan kan, idrar, yara sekresyonları ve diğer sekresyonlar, dışkı, gastrointestinal abse, eküvyonla alınmış örnekler (rektal, perianal sürüntü örnekleri) enterokok izolasyonu için uygundur (bkz. B ÖY 1-7/9-14) (1)
- Örneğin transportu ve saklanması için özel birkoşul ya da metod gerekmez. Mikrobiyolojik örneklerin genel transport ve saklanma standartları enterokok izolasyonu yapılacak örnekler için de geçerlidir (bkz. B ÖY 1-7/9-14). Örnek transportu, herhangi bir transport besiyerinde ya da pamuklu eküvyonla yapılabilir (1).

## 2.4. Kullanılacak besiyerleri, boyalar

### Besiyeri

- Steril vücut bölgelerinden alınan örnekler, 'Tripticase' soya agar, beyin kalp infüzyon agar, %5 oranında koyun, at veya tavşan kaniçerenkanlı agar gibi seçici olmayan besiyerlerine ekilir (1).
- Kan kültürü için klasik kan kültürü besiyerleri (otomatize sistem kan kültür şişeleri) kullanılır (1).
- Steril olmayan vücut bölgelerinden alınan klinik örnekler (özellikle Gram negatif bakterilerle yoğun olarak kontamine olan) için primer izolasyonda seçici besiyerleri kullanılması uygundur. Seçici besiyerlerinin çoğu seçici olarak sodyum azid, safra tuzları, ve/veya antibiyotik; indikatör madde olarak da eskülin veya tetrazolium (Ör: safra-eskülin-azid agar) içerir. Rektal örnekler veya dışkı örneklerinden enterokok izolasyonu için zenginleştirici sıvı besiyerleri kullanımı özellikle enterokok sayısının örnekte az olduğu durumlarda uygundur. İlk aşamada zenginleştirici sıvı besiyeri kullanımı tanımlama süresini uzatsa da enterokok izolasyon şansını artırır (1).
- VRE besiyerleri: VRE'lerin çeşitli vücut bölgelerinden özellikle rektal ve perianal sürüntü örneklerinden ve dışkıdan saptanmasında çeşitli sıvı ve agar besiyerleri kullanılır. VRE tarama besiyeri için genel kabul görmüş bir besiyeri adı vermek güç olsa da seçici zenginleştirici besiyeri kullanımının VRE izolasyon şansını arttırdığı bilinmektedir. Bu amaçla bir çok çalışmada da farklı konsantrasyonda vankomisin eklenerek kullanılan baz besiyeri 'Enterococcosel' sıvı besiyeri [safra-eskülinazid (BEA)] (Becton-Dickonson Microbiology Systems) önerilebilir. 6 µg/mL vankomisin en yaygın kullanılan vankomisin konsantrasyonudur.
- Yine vankomisin içeren beyin kalp infüzyon sıvı besiyerleri, ticari kromojenik agar besiyerleri de VRE tarama amaçlı kullanılabilir. Kromojenik agar besiyerlerinde *E. faecalis* / *E. faecium* tür ayırımı yapmak da mümkün olabilir (1). Kromojenik besiyerleri arasında CHROMagarorientation (Becton-Dickonson Microbiology Systems), CPS ID3 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa), ChromID VRE (bioMérieux) sayılabilir. ChormID VRE besiyerinde *E. faecium* kolonileri mor; *E. faecalis* kolonileri mavi veya mavi-yeşil görülür.

### Boyalar

- Gram boya (uygulama için bkz. B-TP-03)

## 2.5. Kalite kontrol

*Enterococcus faecalis* ATCC 29212: Vankomisin duyarlı, eskülin pozitif  
*Enterococcus faecalis* ATCC 51299: Vankomisin dirençli, eskülin pozitif  
*Streptococcus pyogenes* ATCC 19615: eskülin negatif

## 3 Tanı/tanımlama teknikleri

- Enterokoklar diğer bakterilerden klasik kültür yöntemleri ve biyokimyasal testlerle kolayca ayırt edilebilirler.
- Tüm tanımlama testleri ideal olarak seçici olmayan agarda üreyen kolonilerden yapılmalıdır.
- Enterokokların primer kültürden cins düzeyinde tanımlamaları, koloni morfolojileri, Gram boyalı preparattaki hücre morfolojileri, katalaz negatif (bazı türler zayıf pozitiflik gösterebilir), PYR ve LAP pozitif olmaları, eskülini hidrolize etmeleri, %6.5 NaCl'de üremeleri, 10°C ve 45°C'de üremeleri, optokine dirençli olmaları, ve streptokok grup antijen testinde (Lancefield grup testi) D grubunda bulunmaları dikkate alınarak yapılır.
- Tür düzeyinde tanımlamaları, esas olarak pahalı ve zaman alıcı bir yöntem olan nükleik asit dizilemesi ile yapılmakla birlikte *E. faecalis*'i *E. faecium*'dan ayırtmak üzere karbohidrat fermentasyon testleri ve diğer bazı fenotipik testlerden ve/veya antibiyotik direnç profillerinden (*E. faecalis* ampisiline duyarlı, kinupristin-dalfopristine doğal dirençli; *E. faecium* ise ampisiline doğal dirençli, kinupristin-dalfopristine duyarlıdır) yararlanılır (3).

### 3.1. Mikroskopi: Gram boyalı inceleme

- Enterokoklar Gram boyalı incelemede Gram pozitif, 0.6-2.5 µm boyutlarında koklar veya ovalimsi koklar olarak görülürler. Katı besiyerindeki kolonilerden hazırlanan preparatlarında hücreler bazen kokobasil olarak görülürken; sıvı besiyerindeki (Ör. tiyoglikolat sıvı besiyeri) kültürlerinden hazırlanan preparatlarda genellikle, çiftler veya kısa zincirler oluşturmuş, ovalimsi koklar olarak görülürler (1).

### 3.2. Kültür / Enterokokların primer izolasyonu

- Enterokoklar genellikle 10-45°C gibi geniş bir sıcaklık aralığında üreme kabiliyetinde olmakla birlikte optimal üreme 35-37°C'de görülür.
- Genel olarak artmış CO<sub>2</sub> düzeyi gibi özel atmosferik koşullara ihtiyaç göstermezler (bazı türler %5-10 CO<sub>2</sub>'e ihtiyaç gösterebilir).
- Türlerin büyük çoğunluğu %6.5 NaCl içeren sıvı besiyerlerinde ürer ve safra tuzlarının varlığında (safra-eskülin test) eskülini hidrolize eder.

- Aynı şekilde lösin - $\beta$ -naftilamid'i de hidrolize ederek LAP oluştururlar.
- Enterokok türlerinin büyük çoğunluğu PYR pozitifdir. Az sayıda enterokok türü 50°C'de pH 9.6'da üreme yeteneğindedir. İki enterokok türü (*E. casseliflavus*, *E. gallinarum*) dışında enterokoklar hareketsizdir.
- Steril vücut bölgelerinden alınan örnekler, 'Trypticase' soya agar, beyin kalp infüzyon agar, %5 oranında koyun, at veya tavşan kanı içeren kanlı agar gibi seçici olmayan besiyerlerine ekilir. Kan kültürü için klasik kan kültürü besiyerleri (otomatize sistem kan kültür şişeleri) kullanılır.
- Steril olmayan vücut bölgelerinden alınan klinik örnekler (özellikle Gram negatif bakterilerle yoğun olarak kontamine olan) için primer izolasyonda seçici besiyerleri kullanılması uygundur. Seçici besiyerlerinin çoğu seçici olarak sodyum azid, safra tuzları, ve/veya antibiyotik; indikatör madde olarak da eskülin veya tetrazolium (Ör: safra-eskülin-azid agar) içerir. Rektal örnekler veya dışkı örneklerinden enterokok izolasyonu için zenginleştirici sıvı besiyerleri kullanımı özellikle enterokok sayısının örnekte az olduğu durumlarda uygundur. İlk aşamada zenginleştirici sıvı besiyeri kullanımı tanımlama süresini uzatsa da enterokok izolasyon şansını artırır (1).

### VRE besiyerleri

- VRE'lerin çeşitli vücut bölgelerinden özellikle rektal ve perianal sürüntü örneklerinden ve dışkıdan saptanmasında çeşitli sıvı ve agar besiyerleri kullanılır.
- VRE tarama besiyeri için genel kabul görmüş bir besiyeri adı vermek güç olsa da seçici zenginleştirici besiyeri kullanımının VRE izolasyon şansını arttırdığı bilinmektedir. Bu amaçla bir çok çalışmada da farklı konsantrasyonda vankomisin eklenerek kullanılan baz besiyeri 'Enterococcosel' sıvı besiyeri [safra-eskülinazid (BEA)] (Becton-Dickonson Microbiology Systems) önerilebilir. 6  $\mu$ g/mL vankomisin en yaygın kullanılan vankomisin konsantrasyonudur.
- Yine vankomisin içeren beyin kalp infüzyon sıvı besiyerleri, ticari kromojenik agar besiyerleri de VRE tarama amaçlı kullanılabilir. *E. faecium*'un araştırıldığı durumlarda sefaleksim-aztreonam-arabinoz agar kullanılabilir. Kromojenik agar besiyerlerinde *E. faecalis* / *E. faecium* tür ayırımı yapmak da mümkün olabilir (1). Kromojenik besiyerleri arasında CHROMagar orientation (Becton-Dickonson Microbiology Systems), CPS ID3 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa), ChromID VRE (bioMérieux) sayılabilir. ChormID VRE besiyerinde *E. faecium* kolonileri mor; *E. faecalis* kolonileri mavi veya mavi-yeşil görülür.

### 3.3. Koloni morfolojisi

- Enterokoklar koyun kanlı agarda, 35 $\pm$ 2°C'de 24 saat inkübasyon sonrası genellikle 1-2 mm çapında (bazıları daha küçük koloni oluşturabilir), beyaz/gri, düzgün yüzeyli, alfa veya beta-hemolizli ya da non-hemolitik koloniler oluştururlar. Kolonileri genellikle streptokoklardan daha büyüktür.



- *E. faecalis* izolatlarının bazıları (yaklaşık 1/3'ü), insan, tavşan ve at kanlı agarda beta-hemoliz oluştururken; koyun kanlı agarda hemoliz oluşturmaz. Diğer enterokok türlerinin kanlı agardaki kolonileri alfa-hemolitik veya non-hemolitikdir (1).

### 3.4. Enterokokları cins düzeyinde tanımlama testleri

- Primer kültürden izole edilen, koloni özellikleri, mikrokopisi ile enterokok olduğundan şüphelenilen, katalaz negatif veya zayıf pozitif, PYR pozitif (*S. pyogenes*'i ekarte etmek koşulu ile) basitrasinin ve optokin direnci gösteren mikroorganizmalara ileri tanımlama için safra-eskülin, % 6.5 NaCl'de üreme, LAP, streptokok grup testleri yapılır ve 45°C'de üreme özelliklerine bakılır (Tablo 1).
- Sadece safra-eskülin testi ve %6.5 NaCl'de üreme özelliğine bakmak enterokok cinsini tanımlamada yetersiz kalabilir. Zira insan enfeksiyonlarından izole edilen *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, ve *Vagococcus* gibi Gram pozitif koklar da bu testler için enterokoklar ile benzer fenotip gösterirler. Yukarıda da (bkz. 3.2.) belirtildiği gibi klinikte en sık rastlanan enterokokları (*E. faecalis* ve *E. faecium*) saptamak üzere aynı zamanda vankomisin direncine de bakan kromojenik besiyerlerinden yararlanılabilir.
- *Katalaz testi* (bkz. B-TP-10): Enterokoklar katalaz negatif veya zayıf pozitifdir.
- *Optokin duyarlılık testi* (bkz. B TP 18): Genel olarak *S. pneumoniae* optokine duyarlı ve diğer streptokoklar ise (enterokoklar dahil) dirençlidir. *S. oralis*, *S. mitis* ve *S. pseudopneumoniae*'nin bazı suşları optokine duyarlı bulunabilir.
- *Basitrasinin duyarlılık testi*: Enterokoklar basitrasine dirençlidir. Grup A beta-hemolitik streptokoklardan ayırım için kullanılır (bkz. Ek-1)(4).
- *Streptokok grup testi*: Ticari olarak mevcut Streptokok grup antijen testleri kullanılarak Lancefield A, B, C, D, F ve G grupları tanımlanabilir. Test uygulaması ve sonuç değerlendirmesi üretici firma önerilerine göre yapılır. Çapraz reaksiyonlar görülebilir. Enterokoklar D grubunda yer alır. *Pediococcus* ve *Leuconostoc* ve bazı *Vagococcus* türleri anti grup D serumu ile reaksiyon verebilirler.
- *PYR testi*(bkz. B TP 19): Enterokoklar ve Grup A beta-hemolitik streptokoklar PYR pozitifdir.
- *Safra-eskülin hidroliz testi* (bkz. B-TP-02): Enterokoklar eskülini hidroliz eder.
- *Tuz tolerans testi* (%6.5 NaCl'de üreme) (bkz. B-TP-21): Enterokoklar %6.5 tuz konsantrasyonunda ürer.

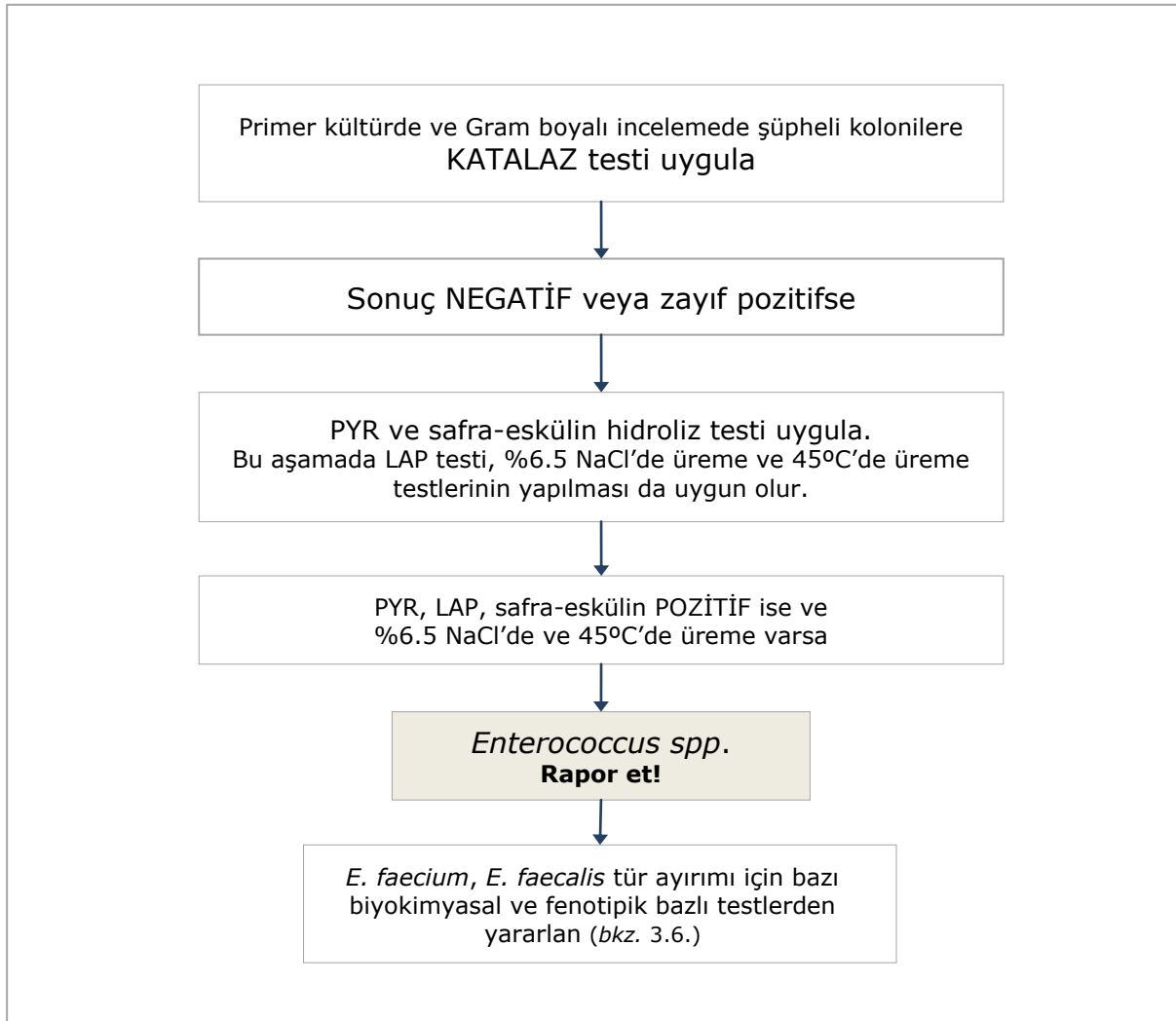
### 3.5. Enterokok tanımlama algoritması

- Enterokokları tanımlamada Şekil 1'de verilen algorithmadan yararlanılır.

**Tablo 1.** Gram pozitif kokların tanımlanmasında yararlı testler

	Lancefield Grup antijen testi	Optokin duyarlılık testi	45°C'de üreme	Katalaz testi	Hemoliz	Safra eskülin hidrolizi	%6.5 NaCl	PYR
Grup D	+	R	-	-	$\alpha$ , nonhemolitik	+	-	-
Enterokok	+	R	+	v	$\alpha, \beta, \gamma$	+	+	+
<i>S. bovis</i>	+	R	-	-	$\alpha$ , nonhemolitik	+	-	-
Pnömonokok	-	S	-	-	$\alpha$	-	-	-
Grup A	+	R	-	-	$\beta$	-	-	+
Grup B,C,G,F	+	R	-	-	$\beta$	-	-	-

R, dirençli; S, duyarlı, V, zayıf pozitiflik saptanabilir



**Şekil 1.** Enterokokların tanımlanmasında izlenmesi önerilen akış şeması

### 3.6. Tür düzeyinde tanımlama testleri

- Enterokokların tür düzeyinde tanımlanması esas olarak pahalı ve zaman alıcı bir yöntem olan nükleik asit dizilemesi ile yapılmakla birlikte *E. faecalis*'i *E. faecium*'dan ayırdetmek üzere karbohidrat fermentasyon testlerinden ve/veya antibiyotik direnç profillerinden yararlanılabilir. Ticari olarak mevcut kromojenik agar besiyerleri kullanılarak da hem vankomisin direnci hem de *E. faecalis* / *E. faecium* tür ayırımı aynı anda test edilebilir (bkz. 3.2).
- Biyokimyasal ve fenotipik testler:** Tablo 2. *Enterococcus* türlerinin ayırımında yardımcı olabilecek biyokimyasal ve fenotipik testleri göstermektedir (5). Bu testlerden L-arabinoz, sorbitol fermentasyon, 'methyl- $\alpha$ -d-glucopyranoside' (MGP) testlerinin prosedürleri Ek-2(6), Ek-3 (6), Ek-4'de (6) verilmiştir. *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum* hareketli enterokok türleri olmakla birlikte hareketsiz varyantları ile de karşılaşılabilir. Bu durumda MGP testi tanımlamada yardımcı olabilir (Tablo 2).

**Tablo 2.** Bazı enterokok türlerinin ayırımında yardımcı biyokimyasal ve fenotipik testler

	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. durans</i>
L-arabinoz <sup>a</sup>	-	+	+	+	-
Sorbitol <sup>b</sup>	+	-	d	d	-
Arbutin	-	+	+	+	+
4°C'de üreme	-	+	ND	ND	ND
%0.04 tellürit	+	-	d	d	-
%0.01 tetrazolium	+	-	ND	+	-
MGB <sup>c</sup>	-	-	+	+	-
MTA'da üreme ve mannitol fermentasyonu	+	-			
Hareket	-	-	+	+	-

<sup>a,b,c</sup> Test prosedürleri Ek-2, Ek-3, Ek-4'de verilmiştir.

d, referans metodlar arasında uyumsuzluk var; ND, data yok; MTA, mannitol tuz agar

**Tablo 3.** Bazı enterokok türlerini ayırımında kullanılacak doğal antimikrobiyal direnç paternleri.<sup>a</sup>

	FA	Sefalosporinler <sup>b</sup>	AmG <sup>c</sup>	DA	AMP	QDA	VAN	TPN	SSS <sup>d</sup>
<i>E. faecalis</i>	R	R	R	R		R			R
<i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i>	R	R	R	R		R	R		R
<i>E. faecium</i>	R	R	R	R	R				R

<sup>a</sup> Enterokoklar, diğer Gram pozitif bakteriler gibi aztreonam, polimiksin B/kolitsin ve naldiksik asite de doğal olarak dirençlidirler.

<sup>b,c,d</sup> *Enterococcus spp.* için sefalosporinler, aminoglikozitler (yüksek düzey direnç tarama hariç), klindamisin ve sulfonamidler in vitro etkili görülebilirler ancak klinik olarak DUYARLI rapor edilmemelidir.

FA, fusidik asit; AmG, aminoglikozitler; DA, klindamisin; AMP, ampisilin; QDA, kinupristin/dalfopristin; VAN, vankomisin; TPN, teikoplanin; SSS, sulfonamidler

- **Antibiyotik direnç profilleri:** *E. faecium* ve *E. faecalis*'in doğal direnç paternlerindeki farklılıklar, tür ayırımında yardımcı olabilir (bkz. Tablo 3 ve AMD TB 03). *E. faecalis* ampisiline duyarlı, kinupristin-dalfopristine doğal dirençli; *E. faecium* ise ampisiline doğal dirençli, kinupristin-dalfopristine duyarlıdır. *E. faecalis*'de ampisiline doğal direnç yoktur. *E. faecalis* ampisiline duyarlı ise imipeneme de duyarlıdır (7).
- **Ticari tanımlama testleri:** Enterokokların tanımlanmasında rutin tanı laboratuvarlarının kullanımına elverişli çeşitli manuel, yarı otomatize, otomatize ticari test sistemleri mevcuttur. Genel olarak bu test sistemleri sık ratlanan enterokok türlerini tanımlamada güvenilir olsalar da *E. faecalis*, *E. faecium* ayırımında problem hala yaşanmaktadır. Bunlar arasında Kromojenik VRE besiyeri, API 20S ve API Rapid ID32 STREP sistemi (bioMérieux Vitek, Inc., Hazelwood, MO), Crystal Gram-Positive ve Crystal Rapid Gram-Positive tanımlama sistemleri (Becton Dickonson Microbiology Systems, Sparks, MD), Vitek sisteminin (bioMérieux) 'Gram Positive Identification Card' ları, MicroScan Walk/Away sisteminin (Dade MicroScan, west Sacramento, CA) ve BD Phoenix Automated Microbiology sistemi (Becton Dickonson Microbiology Systems) sayılabilir (1).

### 3.7. Moleküler testler

- Enterokok türlerinin ayırımında DNA-DNA hibridizasyon ve 16S rRNA dizilemesi yöntemleri, taksonomik amaçlarla referans veya araştırma laboratuvarlarında kullanılmaktadır.
- Enterokokların klinikteki önemleri dikkate alındığında klasik yöntemlerin ihtiyaç duyduğu süre enfeksiyon kontrol önlemlerinin hızla uygulanmasını geciktirebilir. Bu nedenle özellikle VRE taramalarında klasik PCR ve gerçek zamanlı PCR bazlı metodlardan yararlanılmaktadır. Rektal sürüntü örneklerinden direkt VRE taraması yapmak üzere geliştirilmiş bazı testler FDA onayı almıştır. Bunlar arasında BD GeneOhm VanR assay, BD GeneOhm, San Diego, CA; XpertvanA assay, Cepheid, Sunnyvale, CA sayılabilir. Bu sistemlerin çoğunda *van* genlerini tesbit etmek üzere farklı primerler kullanılmaktadır ve duyarlılıkları farklılık göstermektedir. Özgüllükleri de *van* genlerinin diğer cins bakterilerde de bulunabilmesinden dolayı diğer bir potansiyel problem oluşturmaktadır.
- Enterokokların doğrudan kan örneklerinden tanımlanabildiği ticari moleküler bazlı testler de (LightCyclerSeptiFast Test, Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ) mevcut olmakla birlikte invaziv enterokok enfeksiyonlarının tanısında ve hasta tedavisini yönlendirmede bu testlerin sonuçlarının daha ileri değerlendirmelere ihtiyacı vardır. Ticari bir başka moleküler test olan DNA probe kit AccuProbe (Gen-Probe, Inc.)'nin de kan kültüründen direkt enterokok tanımlaması yapabildiği gösterilmişse de esas olarak bu test taze kültürden yapılan tanımlamalar için onay almıştır. FISH tekniği kullanılarak da kan kültüründen enterokok tanımlaması yapabilen testlere örnek olarak da PNA FISH (AdvanDx, Woburn, MA) verilebilir (1).
- Enteroklarda tür düzeyinde tanımlama için MALDI-TOF kütle spektrometre yöntemi de kullanılabilir.

### 3.8. Seroloji

- Farklı enterokok antijenlerine karşı oluşan antikorların saptanması mümkünse de serolojik testlerin rutin laboratuvarında enterokok enfeksiyonlarının tanısında kullanılması önerilmemektedir (1).

### 3.9. Saklama, referans merkeze gönderme

- Enterokok kökenleri, liyofilize olarak saklanabilir. Enterokokların taze kültürlerinden hazırlanan yoğun hücre süspansiyonları direkt defibrine koyun veya tavşan kanınında ya da 'skim milk' (% 10 skim milk, %10 gliserol) içinde -70°C veya daha düşük sıcaklıklarda yıllarca saklanabilir. Enterokok kültürleri aynı zamanda -20°C'de diğer yaygın kullanılan kriyoprezervatif besiyerlerinde de uzun yıllar saklanabilir. Enterokokların büyük kısmı agar (beyin kalp infüzyon agar, 'trypticase' soya agar) yüzeyinde 4°C'de birkaç ay canlılıklarını muhafaza ederler.
- Enterokokların tanımlanmasında problem yaşayan merkezler, kökenlerini referans merkezin kültür transport talimatına uygun olarak referans merkezine gönderirler.

## 4 AMD testleri

### 4.1. Enterokoklarda doğal ve kazanılmış direnç

- Enterokok türlerinin belirgin özelliklerinden biri de yaygın kullanılan çeşitli antimikrobiallere karşı gösterdikleri dirençtir(3).
- Antimikrobiyal dirençleri, doğal (intrinsik) veya kazanılmış olabilir.
- *Enterococcus* cinsi bakteriler diğer Gram pozitif bakteriler gibi aztreonam, polimiksin B/kolitsin ve nalidiksik asite doğal olarak direçlidirler.
- *Enterococcus* cinsi içinde tür bazında doğal direnç paternlerine örnekler Tablo 3'de verilmiştir.
- Enterokoklar, sefalosporinler, aminoglikozitler (yüksek düzey direnç tarama testi hariç), klindamisin ve trimetoprim-sulfametoksazole doğal direnç göstermelerine rağmen bu antimikrobialler in vitro etkili görülebilirler. Ancak doğal dirençleri dolayısıyla klinik olarak etkili değildirler ve bu antibiyotiklere karşı kesinlikle 'DUYARLI' olarak rapor edilmemelidirler.
- Enterokoklar aminoglikozitlere doğal olarak dirençli olmakla birlikte bu antibiyotiklerin penisilin ve vankomisin ile gösterdiği sinerjinedeniyile aminoglikozitler yüksek konsantrasyonlarda enterokoklara karşı klinikte etkili olabilirler. Bu yüzden enterokokların 'Yüksek Düzey' (YD) aminoglikozit direnç durumlarının belirlenmesi gereklidir (bkz.4.4). Bir enterokok kökeninde YD aminoglikozit direnci saptanırsa tedavide penisilinler veya vankomisinle sinerji sağlanamaz.
- Enterokoklarda özellikle *E. faecium*'da PBP'deki değişime bağlı YD penisilin ve ampisilin direnci oldukça yaygındır.

- Beta-laktamaz üretimine bağlı penisilin ve ampisilin direnci ise nadir görülür. Beta-laktamaz üretimine bağlı penisilin direnci olmayan enterokok izolatlarında ampisilinle yapılan duyarlılık test sonucu, amoksisilin, amoksisilin/klavulonik asit, ampisilin/sulbaktam, piperasilin, piperasilin/tazobaktam, imipenem için de geçerlidir. Ancak penisilin için geçerli değildir. Eğer penisilin sonucuna ihtiyaç varsa penisilin ayrıca test edilmelidir. Penisiline duyarlı bulunan enterokok izolatları ampisiline ve yukarıdaki diğer beta-laktam antibiyotiklere de duyarlıdır (8).
- Beta-laktamaz üretimine bağlı penisilin direncini saptamada nitrosefin bazlı beta-laktamaz testi kullanılır (Ek-5) (6).
- Enterokoklarda vankomisin direnci çeşitli *van* genleri tarafından kodlanan hedef değişimine bağlı olarak gelişir ve gene bağlı olarak farklı glikopeptid direnç fenotipleri ortaya çıkar. Bunlar arasında VanA ve VanB VRE fenotipleri, klinikte en sık karşılaşılan fenotipler olup *E. faecalis* ve *E. faecium* ile ilişkilidir (1).
- Vankomisin-bağımlı ve vankomisin-heterorezistan enterokok kökenlerinin nadir de olsa klinik örneklerden izole edilmesi, enterokokal enfeksiyonların tedavisinde gelecekte bir diğer önemli probleme işaret etmektedir.

#### 4.2. Enterokoklarda beklenmedik direnç fenotipleri

- Genel olarak doğal olarak dirençli buldukları antimikrobiyallere duyarlı bulunmaları (Tablo 3),
- *E. faecium*'un ampisiline DUYARLI; *E. faecalis*'in ise DİRENÇLİ bulunması,
- *E. faecium*'un kinupristin/dalfopristine DİRENÇLİ; *E. faecalis*'in ise DUYARLI bulunması,
- Bir enterokok izolatının daptomisin, linezolid, tigesiklin, vankomisine DUYARLI; teikoplanine DİRENÇLİ bulunması,
- *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum*'un vankomisine DUYARLI bulunması, durumlarında tanımlama ve/vaya duyarlılık testleri yenilenmeli, sonuç doğrulanmalı, tekrarlayan testlerde aynı sonuçlar alınıyorsa izolat referans laboratuvarına gönderilmelidir.

#### 4.3. Enterokoklarda glikopeptid direnci

- Enterokoklarda vankomisin direnci çeşitli *van* genleri tarafından kodlanan hedef değişimine bağlı olarak gelişir ve gene bağlı olarak farklı glikopeptid direnç fenotipleri ortaya çıkar.
- *E. faecalis*'de VRE oranı düşüktür (<%2). Enfeksiyon kontrolü açısından esas önemli tür *E. faecium* olup bu bakteri kökenlerinde VRE yaygındır.
- EARSS 2011 raporuna göre *E. faecium* kökenlerinin %17'si vankomisine dirençlidir. *E. faecium* CC17 klonu hastane ortamında yaygın bir klondur.

- Enterokoklarda 7 tip glikopeptid direnç fenotipi tanımlanmış olup bunlar içinde alt tipler de mevcuttur. Bunlar arasında 3 fenotip yaygın olarak görülür:
  - (a) *VanA fenotipi*: *vanA* geni tarafından kodlanır. Vankomisin ve teikoplanine indüklenebilir YD dirence yol açar (Tablo 4.). Klinikte VanB ile birlikte en önemli fenotip olarak kabul edilir. Esas olarak *E. faecium*'da olmak üzere *E. faecalis*'de de bulunur. *Tn1546* üzerinde taşınır.
  - (b) *VanB fenotipi*: *vanB* geni tarafından kodlanır. Sadece vankomisine indüklenebilir orta veya YD dirence yol açar. Teikoplanine direnç gelişmez (Tablo 4). *VanB* taşıyan enterokların tedavisi sırasında teikoplanin direncinin seçilmesiyle ilgili iki olgu raporu bulunmakla birlikte klinik başarısızlıkla ilgili raporlar yetersizdir ve halen geçerli olan EUCAST önerisi teikoplanin sonucunun bulunduğu gibi raporlanmasıdır<sup>(3)</sup>. Esas olarak *E. faecium*'da olmak üzere *E. faecalis*'de de bulunur.
  - (c) *VanC fenotipi*: *vanC* geni tarafından kodlanır. Vankomisine düşük düzey doğal (konstitütif) (MİK 4-16 mg/L) dirence yol açar. VanC fenotipi *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus*'un intrinsik özelliğidir. Genellikle enfeksiyon kontrol açısından önemli görülmemektedir.

**Tablo 4.** Enterokoklarda VanA ve VanB fenotiplerinde vankomisin ve teikoplanin MİKleri

	MİK (mg/L)	
Glikopeptid	VanA	VanB
Vankomisin	64-1024	4-1024
Teikoplanin	8-512	0.06-1

#### 4.4. Enterokoklarda AMDT'ninyapılışı

- Enterokokların antimikrobiyal duyarlılıkları standart disk difüzyon, sıvı dilüsyon ve agar dilüsyon yöntemleri ile test edilir (AMD TP 03)(3,7).
- Enterokoklarda duyarlılıkları test edilecek antibiyotikler Tablo 5'de verilmiştir.
- Disk difüzyon testi uygulamaları (besiyeri, inokulum, inkübasyon koşulları) için EUCAST ve CLSI önerileri aynı olmakla birlikte kullanılan bazı disklerin içerikleri (antibiyotik konsantrasyonları) farklılık göstermektedir.
- Disk difüzyon ve dilüsyon testleri için sınır değerlerde de bazı farklılıklar mevcuttur. Bunun için hangi standart (EUCAST veya CLSI) kullanılıyorsa diskler ona göre seçilmeli ve sonuçlar kullanılan standarta göre yorumlanmalıdır (Tablo 5) (3).

NOT: Raporlama için bu dokümanda Bölüm 5'e bakınız.

- CLSI'da kısıtlı bildirim için Tablo 5'de verildiği gibi A, B, C, U, O gruplaması yapılmaktadır. Buna göre (7);
  - (a) A grubunda yer alan antibiyotikler test edilir ve raporlanır;
  - (b) B grubunda yer alan antibiyotikler, test edilir ve kısıtlı raporlanır. Örneğin, A grubuna direnç varsa, polimikrobiyal enfeksiyon varsa, hastanın A grubu ilaçlara allerjisi, intoleransı varsa ya da A grubu ilaçlara tedavide yanıt alınamamışsa raporlanır.
  - (c) C grubu antibiyotikler, alternatif ve ek antimikrobisidler kapsar.
  - (d) U grubu, esasen yalnız İYE'de kullanılan antimikrobisidler kapsar. O grubu, klinik endikasyonu olan ancak rutin test edilmesine ve raporlanmasına gerek olmayan antimikrobisidler kapsar.

#### 4.4.1. Disk difüzyon testi

- Besiyeri: Mueller-Hinton Agar (*bkz.* AMD-TP-01) (9)
- İnokulum: 0.5 McFarland (direkt koloni süspansiyonu veya üreme bazlı inokulum) (*bkz.* AMD-TP-02)
- İnkübasyon: 35±2°C, 16-18 saat (vankomisin için tam 24 saat)
- Okuma:
  - (a) Vankomisin dışı antibiyotikler için inhibisyon zonu değerlendirmesinde plaklar aydınlatılmış siyah bir zemin üzerinde 5-10 cm yükseklikte tutulur. İnhibisyon zonu ölçümünde, çıplak gözle herhangi bir üremenin görülmediği zon kenarı dikkate alınır.
  - (b) Vankomisin için inhibisyon zonu ölçülürken, plak direkt ışık (transmitted light) kaynağına tutulur. Vankomisin duyarlı enterokoklar keskin zon kenarı oluştururlar. Keskin kenarlı zon olan ve zon çapı sınırdeğerin üzerinde olan izolatlar vankomisin duyarlı olarak rapor edilebilir (Tablo 5). Zon kenarına direkt ışıkta çok dikkatle bakılmalı, zon kenarında herhangi bir belirsizlik ya da zon kenarı ve içinde mikrokoloniler olup olmadığı incelenmelidir. Belirsiz zon kenarları olan veya zon içi mikrokoloniler olan izolatlar dirençli olabilir ve bu izolatlar, zon çapları ne olursa olsun, MİK'leri ile doğrulanmadan "duyarlı" olarak rapor edilmemelidir (Şekil 2).
- Değerlendirme: *bkz.* Tablo 5.

#### 4.4.2. VRE agar sınır değer saptama testi

- Besiyeri: 6 µg/mL vankomisin içeren Beyin Kalp İnfüzyon agar (ticari olarak da temin edilebilir, *bkz.* 2.4) (3).
- İnokulum: 0.5 McFarland süspansiyonundan 1-10 µL spot ekim yapılır.
- İnkübasyon: Normal atmosfer koşullarında 35±2°C'de tam 24 saat inkübasyon
- Değerlendirme: Bir koloniden fazla üreme olması MİK'in >6 mg/L olduğunu gösterir.

NOT: Test edilen izolatların *E. casseliflavus* / *E. gallinarum* olmadıklarından emin olmak üzere ayırt edici testler yapılmalıdır (*bkz.*



3.6). Zira *E. casseliflavus* ve *E.gallinarum* intrinsik olarak vankomisine dirençli olup MİK'leri 8-16 µg/mL arasındadır (*VanC* fenotipi).

- Ticari olarak mevcut vankomisinli kromojenik besiyerleri ile de VRE araştırılabilir (bkz. 3.2). Ayrıca PCR bazlı yöntemlerle direkt olarak dışkıdan ya da rektal sürüntü örneğinden VRE taraması hızlı olarak yapılabilir (bkz. 3.7). Özellikle yoğun bakım ünitesine yatırmadan önce hastada VRE varlığının belirlenmesi ve böylece hastanın izolasyonu enfeksiyon kontrolü açısından çok önemli olup moleküler testler bu konuda oldukça başarılıdır.

**Tablo 5.** Enterokoklarda antimikrobiyal duyarlılık belirlemede test edilecek antimikrobiyaller, disk içerikleri, sınır değerler<sup>a</sup>

Antimikrobiyal	Disk ug	Zon çapı sınır değeri (mm)			MİK ug/mL		
		S	I	R	S	I	R
A Grubu							
Penisilin <sup>b</sup>	10 ünite	≥ 15	-	≤ 14	≤8	-	≥ 16
Ampisilin <sup>c</sup>	10 (2)	≥ 17 (10)	-	≤ 16 (8)	≤8 (4)	-	≥ 16 (>8)
B Grubu							
Vankomisin <sup>d</sup>	30 (5)	≥ 17 (12)	15-16	≤ 14 (<12)	≤4 (4)	8-16	≥ 32 (>4)
Teikoplanin	30	≥ 14 (16)	11-13	≤ 10 (<16)	≤8 (2)	16	≥ 32 (>2)
C Grubu							
Gentamisin <sup>e</sup>	120 (30)	≥ 10 (8)	-	=6 (<8)	CLSI: Sıvı dilüsyon; 500 µg/mL gentamisinde herhangi bir üreme varsa YD gentamisin direnci var 'R' EUCAST: MİK ≥128 µg/mL ise YD gentamisin direnci var 'R'		
Gentamisin <sup>e</sup>	120 (30)	≥ 10 (8)	-	=6 (<8)	CLSI: Sıvı dilüsyon; 500 µg/mL gentamisinde herhangi bir üreme varsa YD gentamisin direnci var 'R' EUCAST: MİK ≥128 µg/mL ise YD gentamisin direnci var 'R'		
Streptomisin	300	≥ 10 (19)	-	=6 (<19)	CLSI: Sıvı dilüsyon; 1000 µg/mL streptomisinde herhangi bir üreme varsa YD streptomisin direnci var 'R' EUCAST: MİK ≥512 µg/mL ise YD streptomisin direnci var 'R'		
U Grubu							
Siprofloksasin <sup>f</sup>	5	≥ 21	16-20	≤ 15	≤1 (4)	2	≥4 (>4)
Levofloksasin	5	≥ 17	14-16	≤ 13	≤2 (4)	4	≥8 (>4)
Norfloksasin <sup>g</sup>	10	≥ 17 (12)	13-16	≤ 12 (<12)	≤4	8	≥16
Nitrofurantoin	300	≥ 17	15-16	≤ 14	≤32	64	≥128
Tetrasiklin	30	≥ 19	15-18	≤ 14	≤4	8	≥16
O grubu							
Kinupristin-dalfopristin	15	≥19 (22)	16-18	≤15 (<20)	≤1 (1)	2	≥4 (>4)
İmipenem <sup>h</sup>	10	(≥21)		(<18)	(≤4)		(>8)

<sup>a</sup> Bu tablo CLSI A, B, C, U grupları dikkate alınarak hazırlanmış olup CLSI disk içerikleri ve sınır değerleri parantezsiz, EUCAST disk içerikleri ve sınır değerleri parantez içinde verilmiştir. İki standart arasında farklılık yoksa tek değer yer almaktadır.

<sup>b</sup> Penisiline dirençli *E. faecium* diğer bütün beta-laktamlara ve imipeneme dirençli kabul edilir ve dirençli raporlanır.

<sup>c</sup> ampisilin duyarlılığı, beta-laktamaz inhibitörlü ve inhibitörsüz ampisilin, amoksisilin, piperasiline duyarlılığını gösterir. Tür tanısı doğrulanmış ampisiline duyarlı *E. faecalis* izolatları imipeneme de duyarlı kabul edilir.

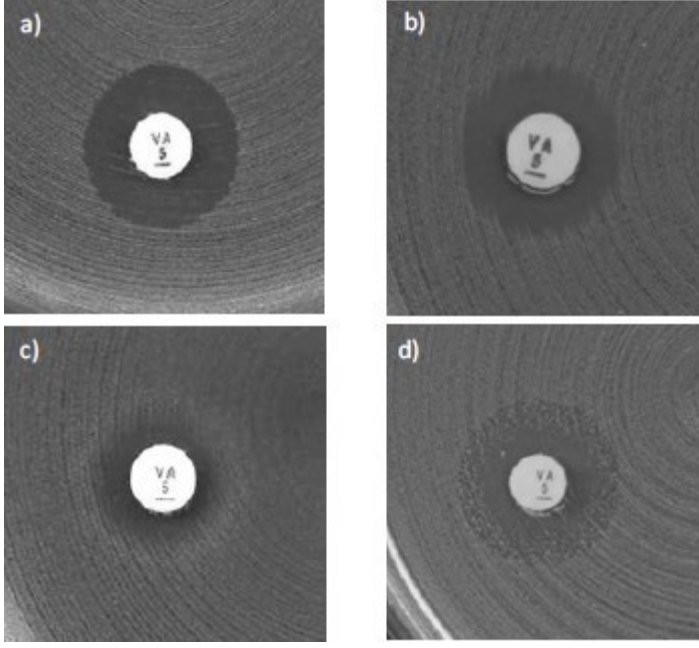
<sup>d</sup> Vankomisin duyarlılığını saptamak için plaklar tam 24 saat inkübe edilir. Ve okuma direkt ışığa (transmitted light) tutularak yapılır. Vankomisin zon kenarı belirsiz veya inhibisyon zonu içinde koloni varsa dirençten şüphelenilir.

<sup>e</sup> YD gentamisin direncinin saptanması durumunda YD streptomisin duyarlılığına mutlaka ayrıca bakılmalıdır.

<sup>f</sup> Florokinolon direncini saptamak üzere norfloksasin disk difüzyon tarama testi kullanılabilir. Siprofloksasin ve levofloksasin duyarlılığı, norfloksasin duyarlılığına bakarak öngörülebilir.

<sup>g</sup> Norfloksasin taramada direnç varsa siprofloksasilin ve levofloksasilin ayrıca test edilmelidir.

<sup>h</sup> İmipenem CLSI'da yer almamaktadır. Burada EUCAST sınır değerleri verilmiştir.



**Şekil 2.**

Enterokoklarda vankomisin ile inhibisyon zonlarının görünümüne örnekler.

**a)** Keskin zon kenarları ve zon çapı  $\geq 12$  mm. duyarlı olarak raporlanır.

**b-d)** Belirsiz zon kenarları ve/veya zon içi koloniler. Zon çapına bakmaksızın dirençli olarak raporlanır.

#### 4.4.3. Sıvı / Agar dilüsyon testleri ile MİK belirleme

- Sıvı dilüsyon besiyeri: Katyonlu MHB (9) (bkz. AMD TP 04)
- Agar dilüsyon besiyeri: Mueller Hinton Agar (9) (bkz. AMD TP 01)
- İnokulum: 0.5 McFarland (direkt koloni süspansiyonu veya üreme bazlı inokulum) (bkz. AMD TP 02)
- İnkübasyon: 16-20 saat. Vankomisin için tam 24 saat
- Değerlendirme: bkz. Tablo 5.

#### 4.4.4. Gradyent testi ile MİK belirleme

- Besiyeri: Mueller-Hinton Agar (bkz. AMD TP 01)
- MİK, gradiyent testini üreten firmanın önerileri doğrultusunda belirlenir (9). Örneğin bazı vankomisin gradiyent testleri için yüksek bakteri inokulumu (McFarland 2) ve farklı besiyeri (Beyin Kalp İnfüzyon agar) önerilmektedir.

#### 4.4.5. Enterokoklarda YD aminoglikozit direncinin saptanması

- Yüksek düzey gentamisin ve streptomisin direncini saptamada disk difüzyon ve sıvı dilüsyon testleri kullanılır. Bu testler aynı 4.4.1 ve 4.4.3'te belirtilen diğer antibiyotikler için de önerilen standart yöntemlerle yapılır. Burada farklı olan disk difüzyonda kullanılan gentamisin ve streptomisin konsantrasyonlarının yüksek olmasıdır (Tablo 6). YD aminoglikozit direncini saptamada kullanılan test koşulları ve değerlendirmeleri Tablo 6'da verilmiştir.

#### 4.4.6. AMDT'de kalite kontrol mikroorganizmaları

- *E. faecalis* ATCC 29212 Vankomisin duyarlı
- *E. faecalis* ATCC 51299 Vankomisin dirençli (VanB fenotipi)
- *E. faecium* NCTC 12202 Vankomisin dirençli (VanA fenotipi)

#### 4.5. *E. faecium* ve *E. faecalis*'de glikopeptid ve YD aminoglikozitdirençli ile ilgili önemli notlar

- AMD testleri, *vanA* tarafından kodlanan dirençli kolaylıkla saptar. *vanB* tarafından kodlanan dirençli saptanması daha zordur. Agar veya sıvı dilüsyon yöntemiyle MİK belirlenmesi doğru sonuç verir ancak rutin laboratuvarlarda uygulamasında güçlükler vardır. EUCAST'ın önerdiği şekilde 5 µg vankomisin diski ile yapılan disk difüzyon yöntemi iyi performans göstermektedir (Tablo 5).
- Ayrıca ticari olarak kullanıma hazır besiyerleri kullanılarak agar sınır değer saptama testi de kolaylıkla uygulanabilir (10). Bunlardan bazılarında vankomisin direncine ek olarak *E. faecalis*/*E. faecium* tür ayırımı da yapılabilmektedir.
- MİK veya disk difüzyon sonuçları yorumlanırken izolatin *E. gallinarum* veya *E. casseliflavus* olmadığından emin olmak gerekir. Bu izolatlar arabinoz pozitif olmaları nedeniyle yanlışlıkla *E. faecium* olarak tanımlanabilir. *E. gallinarum*/*E. casseliflavus*'u *E. faecium*'dan ayırt edebilmek için hareket testi veya MGP testi yapılır (Tablo 2.)
- Vankomisin disk difüzyon testinde dirençli bulunan enterokoklarda MİK belirlenmelidir. Vankomisin MİK'ini belirleyemeyen merkezler bu izolatları referans laboratuvarına gönderecektir.

**Tablo 6.** YD aminoglikozit direncini saptamada kullanılan testler ve değerlendirme

Test metodu	Yüksek Düzey Gentamisin Direnci			Yüksek Düzey Streptomisin Direnci		
	Disk difüzyon	Sıvı dilüsyon	Agar dilüsyon	Disk difüzyon	Sıvı dilüsyon	Agar dilüsyon
<b>Antimikrobiyal konsantrasyon</b>	30 µg			300 µg		
<b>İnokulum</b>	Standart DD	Standart SD	Standart AD	Standart DD	Standart SD	Standart AD
<b>İnkübasyon süresi</b>	16-18 saat	24 saat	24 saat	16-18 saat	24 saat	24 saat
<b>İnkübasyon koşulları</b>	35 ±2°C, normal atmosfer	35 ±2°C, normal atmosfer	35 ±2°C, normal atmosfer	35 ±2°C, normal atmosfer	35 ±2°C, normal atmosfer	35 ±2°C, normal atmosfer
<b>Sonuç değerlendirme</b>	Zon çapı ≥8 mm ise NEGATİF Zon çapı <8 mm ise POZİTİF (YD gentamisin dirençli var)	MİK ≤128 µg/mL ise NEGATİF; MİK >128 ise POZİTİF (YD gentamisin dirençli var)	MİK ≤128 µg/mL ise NEGATİF; MİK >128 ise POZİTİF (YD gentamisin dirençli var)	Zon çapı ≥19 mm ise NEGATİF Zon çapı <19 mm ise POZİTİF (YD sterptomisin dirençli var)	MİK ≤512 µg/mL ise NEGATİF; MİK >512 ise POZİTİF (YD stretopmisin dirençli var)	MİK ≤512 µg/mL ise NEGATİF; MİK >512 ise POZİTİF (YD stretopmisin dirençli var)

DD, disk difüzyon; SD, sıvı dilüsyon; AD, agar dilüsyon

- Enterokoklar aminoglikozitlere doğal dirençli olmakla birlikte yüksek konsantrasyonlarda hücre duvarı etkin ajanlarla (penisilin, vankomisin) birlikte kullanıldıklarında klinik etkinlik gösterirler.
- Ancak yüksek düzey aminoglikozitlere karşı da kazanılmış direnç gelişebilir. Bu neden yüksek düzey aminoglikozit direnci test edilmelidir.
- Enterokoklarda yüksek düzey gentamisin direnci ( $\geq 128 \mu\text{g/mL}$ ) saptanması; streptomisin dışında tüm aminoglikozitlere yüksek düzey direnç olduğunu gösterir. Streptomisin yüksek düzey direnci ayrıca test edilmelidir.

## 5 Raporlama

- Mikrobiyoloji laboratuvarı, antimikrobiyal direncinin yayılımının önlenmesindeki etki rolünü AMDT raporlarının niteliği ile ortaya koyar.
- Antimikrobiyal duyarlılık sonuçlarının kliniğe raporlamada en önemli unsur, hekimi reçete yazmadan önce klinik mikrobiyoloji uzmanı ile tartışmaya cesaretlendirir nitelikte olmasıdır.
- Çalışılan antibiyotikler için sınır değerleri Tablo 5'de hem EUCAST, hem de CLSI'a göre verilmiştir. Kullanılan standarta göre MİK ve/veya zon çapı belirlenen izolatin duyarlılık durumu, standartın belirlediği sınır değerlere göre yapılır ve 'Duyarlı', 'Dirençli' veya 'Orta-duyarlı' olarak raporlanır.
- Raporlamada enterokokların doğal dirençli oldukları antibiyotikler dikkate alınmalıdır (Tablo 3). Aztreonam, polimiksin B/kolitsine diğer Gram-pozitifler gibi dirençli olduklarından hiçbir şekilde bu antibiyotikler test edilmez ve raporlanmaz. Sefalosporinler, aminoglikozitler (yüksek düzey direnç tarama testi hariç) klindamisin ve trimetoprim-sulfametoksazole doğal olarak dirençlidirler ve bu antibiyotikler klinik olarak etkin değildirler. Ancak bu antibiyotikler *in vitro* etkin görülebilirler. Enterokok izolatları bu antibiyotiklere karşı hiçbir şekilde 'DUYARLI' olarak rapor edilmemelidirler.
- Antibiyotik direncinin yayılmasını önlemek üzere 'Kısıtlı ve Yorumlu' raporlama yapılır (bkz. AMD-TB-03). EUCAST'da kısıtlı bildirim önerilmemekle birlikte UAMDSS'nin önerisi CLSI gibi kısıtlı bildirim yapmak yönündedir.
- Kısıtlı bildirimde A grubunda yer alan antibiyotikler, birincil seçenek olup test edilmeli ve hepsi raporlanmalıdır. B grubunda yer alan antibiyotikler test edilmeli ve A grubundakilere direnç olduğu durumlarda, enfeksiyonun yerine bağlı olarak (ör., BOS izolatlarında), polimikrobiyal enfeksiyon düşünülüyorsa, alerji söz konusuysa raporlanmalıdır. U grubunda yer alan antibiyotikler sadece idrar yolu enfeksiyonlarında test edilir ve raporlanır. Enfeksiyon kontrol ünitesine tüm sonuçlar bildirilir (Tablo 5).
- Yorumlu raporlamaya örnekler:
  - (a) Raporda, enterokokların doğal olarak dirençli oldukları ve klinikte etkili olmayacak antimikrobiyaller yer almalıdır.

- (b) Yüksek düzey aminoglikozitin hücre duvarı aktif antimikrobiyallerle birlikte kullanıldığında klinik etkinlik elde edilebileceği belirtilmelidir. YD aminoglikozid direnci varsa kombinasyonla klinik bir etkinlik elde edilemeyeceği belirtilmelidir.
- (c) Vankomisin dirençli *E. faecium* raporlarken, enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması (hasta izolasyonu, diğer hastalada VRE tarama yapılması, v.b.) gerekliliği raporda yer almalıdır.
- (d) Vankomisin dirençli *E. faecalis* raporlarken, enfeksiyon kontrolü açısından çok önem taşımadığı raporda yer almalıdır. Tabii tür adının doğruluğundan emin olmak koşulu ile.
- (e) Yine *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*'da vankomisin direnci raporlarken, doğal (intrinsik) olarak vankomisine dirençli oldukları ve enfeksiyon kontrol önlemlerine gerek olmadığı raporda yer almalıdır.
- Disk difüzyonda vankomisine dirençli bulunan ya da disk difüzyonun değerlendirmesinde sorun varsa, enterokok kökeninin mutlaka vankomisin MİK'i belirlenmeli ve MİK sonucu raporlanmalıdır.
  - *E. faecium* ampisiline doğal olarak dirençli; *E. faecalis* değildir. *E. faecalis* eğer ampisiline duyarlı bulunursa amoksisilin, amoksisilin/klavülonik asit, ampisilin/sulbaktam, piperasilin, piperasilin/tazobaktam ve imipeneme 'DUYARLI' rapor edilir.
  - Ampisiline duyarlılık penisilin için geçerli değildir. Penisilin ayrıca test edilmelidir. Penisiline duyarlı bulunan bir enterokok kökeni ampisilin, amoksisilin, amoksisilin/klavülonik asit, ampisilin/sulbaktam, piperasilin, piperasilin/tazobaktam ve imipeneme 'DUYARLI' rapor edilir.
  - Enterokoklarda yüksek düzey gentamisin direnci ( $\geq 128$   $\mu\text{g/mL}$ ) saptanması; streptomisin dışında tüm aminoglikozitlere yüksek düzey direnç olduğu raporda belirtilir. Streptomisin yüksek düzey direnci ayrıca test edilir ve raporlanır.

## 6 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Enterokoklarda tür ayırımının (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*) yapılmasında sorunlar yaşanabilir.
- Disk difüzyonla vankomisin duyarlılığının belirlenmesinde sorunlar yaşanabilir.
- Vankomisin ve YD aminoglikozit MİK'lerinin standart yöntemlerle belirlenmesi rutin tanı laboratuvarları için zor olabilir. Bu durumda gradient testinden yararlanılabilir.

## Ekler

### Ek-1 Basitrasin testi

#### Besiyeri

%5'lik koyun kanı içeren Mueller-Hinton agar

#### Testin yapılışı ve değerlendirme

- 1 Gram boyama uygulayın. Yalnızca saf kültür kullanın.
- 2 Koyun kanlı agarda üremiş 3-5 benzer koloni seçin ve inokülasyon iğnesi veya öze kullanarak 4-5 mL'lik Mueller Hinton sıvı besiyerine veya serum fizyolojik içine aktarın. 0,5 McFarland'lık türbidite standardına eşdeğer olacak şekilde bulanıklığı ayarlayın. Seyreltme gerekiyorsa bu işlemi sıvı besiyeri veya serum fizyolojikle yapın. İnokülumu fotometrik olarak da standartlaştırabilirsiniz.
- 3 Pamuklu eküvyonu inokülüm süspansiyonuna daldırın ve fazla sıvının akması için pamuklu eküvyonu, tüpün iç üst duvarına bastırarak birkaç kez döndürün.
- 4 Bu süspansiyondan pamuklu eküvyonla koyun kanlı Mueller Hinton agar yüzeyine ekim yapın. Eşit bir inokülasyon elde etmek için plak her ekim sonrası 60° döndürülmelidir.
- 5 Yüzey neminin emilmesi için 3-5 dakika bekleyin ve sonra basitrasin diskini (0.04 U) agar yüzeyine yerleştirin.
- 6 Plakları 35°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 20-24 saat inkübe edin.
- 7 Herhangi bir inhibisyon zonunun varlığı pozitif test veya basitrasine duyarlılık olarak değerlendirilir. Disk kenarında üreme negatif test veya basitrasine direnç olarak değerlendirilir.

#### Kalite kontrol

Kalite kontrol basitrasin diskinin her yeni lotunda yapılmalıdır.

*Streptococcus pyogenes* pozitif (duyarlı kontrol),

*Enterococcus faecalis* SS1273 negatif (dirençli kontrol).

## Ek-2 L-arabinoz fermentasyon testi

### Besiyeri

Kalp infüzyon mor sıvı besiyeri (baz olarak)

- BHI, pepton, maya özütü, NaCl
- Brom krezol moru, pH 7.4

%1 L-arabinoz filtre edilerek sterilize edilir ve sıvı besiyeri sterilize edildikten sonra besiyerine eklenir (6).

### Testin yapılışı ve değerlendirme

- 1 Besiyeri oda sıcaklığına gelince, mikroorganizmanın 18-20 saatlik taze saf kültüründen öze ile direkt ya da önce serum fizyolojikte mikroorganizma süspansiyonu hazırlanıp oradan 1 damla inokülasyon yapılır.
- 2 Değerlendirme; Asit reaksiyon: sarı renk oluşumu (pH 5.2), mikroorganizmanın L-arabinozu fermente ettiğini gösterir. Besiyerinde renk değişimi olmazsa mikroorganizma L-arabinozu fermente etmiyor demektir.

### Kalite kontrol

Pozitif kontrol: *E. faecium*

Negatif kontrol: *E. faecalis*

## Ek-3 Sorbitol fermetasyon testi

### Besiyeri

Kalp infüzyon mor sıvı besiyeri (baz olarak)

- BHI, pepton, maya özütü, NaCl
- Brom krezol moru, pH 7.4

%1 sorbitol filtre edilerek sterilize edilir. Ve sıvı besiyeri sterilize edildikten sonra besiyerine eklenir.

### Testin yapılışı ve değerlendirme

- 1 Besiyeri oda sıcaklığına gelince, mikroorganizmanın 18-20 saatlik taze saf kültüründen öze ile direkt ya da önce serum fizyolojikte mikroorganizma süspansiyonu hazırlanıp oradan 1 damla inokülasyon yapılır.
- 2 Değerlendirme; Asit reaksiyon: sarı renk oluşumu (pH 5.2), mikroorganizmanın sorbitolü fermente ettiğini gösterir. Besiyerinde renk değişimi olmazsa mikroorganizma sorbitolü fermente etmiyor demektir (6).

### Kalite kontrol

Pozitif kontrol: *E. faecalis*

Negatif kontrol: *E. faecium*



## Ek-4 Metil- $\alpha$ -d-glukopiranozid testi (MGP)

Tipik olarak *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus*, *E. faecium*'dan hareket testi ile ayrılırlar. Bununla birlikte *E. gallinarum*'un hareketsiz kökenlerinin varlığı nedeniyle hareket testi bazen güvenilir olmayabilir. *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus* MGP'yi asidifiye ettiği halde *E. faecium* ve *E. faecalis* etmez (6).

Teste alınacak mikroorganizmalar: Hareketsiz, vankomisine dirençli (MİK <32  $\mu$ g/mL olmak koşulu ile), ampisiline duyarlı mikroorganizmalar

### Besiyeri

▪ Kazein (pankreatik özüt)	10 g
▪ NaCl	5 g
▪ MGP	10 g
▪ Fenol kırmızısı	18 mg
▪ Deiyonize su	1L

2-8°C'de direkt ışıktan uzakta 6 ay saklanır.

### Testin yapılışı ve değerlendirme

- 1 MGP sıvı besiyerine tek bir koloni inoküle edilir.
- 2 Yoğun inoklasyon yapılmaz.
- 3 35°C'de 24 saat inkübe edilir.
- 4 Değerlendirme: Renk değişikliği gözlenir. Sarı renk oluşumu MGP'nin asidifiye edildiğini gösterir. MGP asidifikasyonu olmadığında besiyerinin rengi değişmez, kırmızı veya oranj olarak kalır (6).

### Kalite kontrol

Pozitif kalite kontrol: *E. gallinarum* ATCC 49573 (besiyerinin rengi sarıya döner).  
Negatif kalite kontrol: *E. faecalis* ATCC 29212 (besiyeri kırmızı veya oranj renkte kalır).

## Ek-5 Nitrosefin beta-laktamaz testi

### Besiyeri

Seçici olmayan besiyeri: Koyun kanlı agar veya çukulata agar

### Materyal

Nitrosefin diski: Kromojenik sefalosporin diski (Ticari olarak mevcut). 2-8°C'de saklanır.

### Testin yapılışı ve değerlendirme

- 1 Nitrosefin diskini bir lam üzerine ya da cam petri içine koy.
- 2 Diski 1 damla distile su ile nemlendir.
- 3 Steril öze ya da plastik çubukla besiyeri yüzeyinden şüpheli birkaç koloni al ve diskin üzerine yay
- 4 Nitrosefin diskindeki renk değişimini izle. Sarıdan kırmızıya renk değişimi pozitif sonucu gösterir.
- 5 Pozitif sonuç genellikle 15 saniye ile 5 dakika içinde alınır.
- 6 Beş dakikada herhangi bir renk değişimi yoksa test sonucu negatif olarak değerlendirilir.

### Kalite kontrol

Pozitif kalite kontrol: *Staphylococcus aureus* ATCC 49213

Negatif kalite kontrol: *Haemophilus influenzae* ATCC 10211

## Ek-6 EUCAST Enterokok antimikrobiyal duyarlılık test tablosu

### Enterococcus spp.

	MİK sınır değeri (mg/L)		Disk içeriği (µg)	Zon çapı sınır değeri (mm)		Notlar Sayı ile belirtilen notlar MİK sınır değerleri ile ilişkilidir. Harf ile belirtilen notlar zon çapı sınır değerleri ile ilişkilidir.
	S ≤	R >		S ≥	R <	
<b>Penisilinler<sup>1</sup></b>						<p><b>1.</b> Penisiline dirençli <i>E. faecium</i> kökenleri karbapenemler dahil olmak üzere diğer tüm diğer beta-laktam antibiyotiklere dirençli kabul edilebilirler.</p> <p><b>2/A.</b> Beta-laktamaz inhibitörü içeren ve içermeyen ampisilin, amoksisilin ve piperasilin için duyarlılık ampisilin duyarlılık sonuçlarından çıkarsama yapılarak belirlenir.</p> <p><b>3.</b> Duyarlılık testlerinde kullanılmak üzere klavulanatın konsantrasyonu 2 mg/L olarak sabitlenmiştir.</p>
Benzilpenisilin	-	-	-	-	-	
Ampisilin	4	8	2	10	8	
Ampisilin-sulbaktam <sup>2</sup>	4	8		Not <sup>A</sup>	Not <sup>A</sup>	
Amoksisilin <sup>2</sup>	4	8		Not <sup>A</sup>	Not <sup>A</sup>	
Amoksisilin-klavulanat <sup>2</sup>	4 <sup>3</sup>	8 <sup>3</sup>		Not <sup>A</sup>	Not <sup>A</sup>	
Piperasilin <sup>2</sup>	Not <sup>2</sup>	Not <sup>2</sup>		Not <sup>A</sup>	Not <sup>A</sup>	
Piperasilin-tazobaktam <sup>2</sup>	Not <sup>2</sup>	Not <sup>2</sup>		Not <sup>A</sup>	Not <sup>A</sup>	
Tikarsilin	-	-		-	-	
Tikarsilin-klavulanat	-	-		-	-	
Fenoksimetilpenisilin	-	-		-	-	
Oksasilin	-	-		-	-	
Kloksasilin	-	-		-	-	
Dikloksasilin	-	-		-	-	
Flukloksasilin	-	-		-	-	
Mesilinam (sadece komplike olmayan İYE)	-	-		-	-	
<b>Sefalosporinler</b>						
Sefaklor	-	-		-	-	
Sefadroksil	-	-		-	-	
Sefaleksil	-	-		-	-	
Sefazolin	-	-		-	-	
Sefepim	-	-		-	-	
Sefiksim	-	-		-	-	
Sefotaksim	-	-		-	-	
Sefoksitin	-	-		-	-	
Sefpodoksim	-	-		-	-	
Seftarolin	-	-		-	-	
Seftazidim	-	-		-	-	
Seftibuten	-	-		-	-	
Seftriakson	-	-		-	-	
Sefuroksim iv	-	-		-	-	
Sefuroksim oral	-	-		-	-	
<b>Karbapenemler</b>						
Doripenem	-	-		-	-	
Ertapenem	-	-		-	-	
İmipenem	4	8	10	21	18	
Meropenem	-	-		-	-	

	MİK sınır değeri (mg/L)		Disk içeriği (µg)	Zon çapı sınır değeri (mm)		Notlar Sayı ile belirtilen notlar MİK sınır değerleri ile ilişkilidir. Harf ile belirtilen notlar zon çapı sınır değerleri ile ilişkilidir
	S ≤	R >		S ≥	R <	
<b>Monobaktamlar</b>						
Aztreonam	-	-		-	-	
<b>Florokinolonlar</b>						
Siprofloksasin (sadece komplike olmayan İYE)	4	4	5	HA <sup>A</sup>	HA <sup>A</sup>	<b>A.</b> Norfloksasin disk difüzyon testi florokinolon direncinin taranması için kullanılabilir. <b>Bakınız Not B.</b>
Levofloksasin (sadece komplike olmayan İYE)	4	4	5	HA <sup>A</sup>	HA <sup>A</sup>	
Moksifloksasin	-	-		-	-	
Nalidiksik asit (tarama)	UD	UD		UD	UD	
Norfloksasin (tarama)	UD	UD	10	12 <sup>B</sup>	12 <sup>B</sup>	<b>B.</b> Siprofloksasin ve levofloksasin için duyarlılık norfloksasin duyarlılık sonuçlarından çıkarsama yapılarak belirlenir.
Ofloksasin	-	-		-	-	
<b>Aminoglikozidler<sup>1</sup></b>						
Amikasin	Not <sup>2</sup>	Not <sup>2</sup>		Not <sup>A</sup>	Not <sup>A</sup>	<b>1.</b> Enterokoklar aminoglikozidlere doğal olarak dirençlidirler ve tedavide bir aminoglikozidin tek başına kullanılması etkisizdir. Kazanılmış yüksek-düzyer direnç yoksa, aminoglikozidler ile penisilinler veya glikopeptidler arasında enterokoklara karşı sinerji sağlanması olasıdır. Bu sebeplere bağlı olarak test etmenin amacı, doğal direnç ve yüksek-düzyer kazanılmış direnç ayrımının yapılmasıdır.
Gentamisin (yüksek-düzyer aminoglikozid direnci testi)	Not <sup>2</sup>	Not <sup>2</sup>	30	Not <sup>A</sup>	Not <sup>A</sup>	
Netilmisin	Not <sup>2</sup>	Not <sup>2</sup>		Not <sup>A</sup>	Not <sup>A</sup>	
Streptomisin (yüksek-düzyer streptomisin direnci testi)	Not <sup>3</sup>	Not <sup>3</sup>	300	Not <sup>B</sup>	Not <sup>B</sup>	<b>2/A. Negatif test:</b> Gentamisin MİK değeri ≤128 mg/L veya zon çapı ≥8 mm olan kökenler. Köken gentamisin için sokak tipidir ve düşük-düzyer doğal direnci bulunmaktadır. Diğer aminoglikozidler için durum farklı olabilir. Köken penisilin veya glikopeptid duyarlı ise penisilinler veya glikopeptidlerle sinerji beklenebilir. <b>Pozitif test:</b> Gentamisin MİK değeri >128 mg/L veya zon çapı <8 mm olan kökenler. Köken streptomisin dışındaki tüm aminoglikozidlere karşı yüksek-düzyer dirence sahiptir. Streptomisin duyarlılığının ise ayrı olarak test edilmesi gereklidir ( <b>Bakınız Not 3/B</b> ). Penisilinler veya glikopeptidlerle sinerji sağlanamaz.
Tobramisin	Not <sup>2</sup>	Not <sup>2</sup>		Not <sup>A</sup>	Not <sup>A</sup>	<b>3/B.</b> Gentamisine yüksek-düzyer dirençli olan kökenler streptomisine yüksek-düzyer dirençli olmayabilir. <b>Negatif test:</b> Streptomisin MİK değeri ≤512 mg/L veya zon çapı ≥19 mm olan kökenler. Köken streptomisin için sokak tipidir ve düşük-düzyer doğal direnci bulunmaktadır. Köken penisilin veya glikopeptid duyarlı ise penisilinler veya glikopeptidlerle sinerji beklenebilir. <b>Pozitif test:</b> Streptomisin MİK değeri >512 mg/L veya zon çapı <19 mm olan kökenler. Köken streptomisine yüksek-düzyer dirençlidir. Penisilinler veya glikopeptidlerle sinerji sağlanamaz.
<b>Glikopeptidler</b>						
Teikoplanin	2	2	30	16	16	
Telavansin	YK	YK		YK	YK	
Vankomisin	4	4	5	12 <sup>A</sup>	12 <sup>A</sup>	<b>A.</b> Vankomisine duyarlı enterokoklar keskin zon sınırı gösterirler. Zon sınırlarını plağa arkadan gelen bir ışık ile (plak ışığa doğru kaldırılarak) incelemek gerekmektedir ve vankomisin zon sınırları belirsizse veya

	MİK sınır değeri (mg/L)		Disk içeriği (µg)	Zon çapı sınır değeri (mm)		Notlar
	S ≤	R >		S ≥	R <	
<p><b>Makrolidler, linkozamidler ve streptogaminler</b></p>						
Azitromisin	-	-	-	-	-	
Klaritromisin	-	-	-	-	-	
Eritromisin	-	-	-	-	-	
Roksitromisin	-	-	-	-	-	
Telitromisin	-	-	-	-	-	
Klindamisin	-	-	-	-	-	
Kinupristin-dalfopristin	1 <sup>1</sup>	4 <sup>1</sup>	15	22 <sup>A</sup>	20 <sup>A</sup>	<b>1/A.</b> Kinupristin-dalfopristin sınır değerleri sadece <i>E. faecium</i> içindir.
<p><b>Tetrasiklinler</b></p>						
Doksisiklin	-	-	-	-	-	
Minosiklin	-	-	-	-	-	
Tetrasiklin	-	-	-	-	-	
Tigesiklin	0.25 <sup>1</sup>	0.5	15	18	15	<b>1.</b> Duyarlılık sınır değeri üzerinde MİK değerlerine sahip kökenler çok nadirdir veya henüz hiç bildirilmemiştir. Bu tip kökenler için tanımlama ve antimikrobik duyarlılık testleri tekrar edilmeli ve sonuç doğrulanırsa köken bir referans laboratuvarına gönderilmelidir. MİK değeri güncel direnç sınır değerinin üzerinde olan doğrulanmış kökenler için klinik yanıt ilişkin kanıt oluşana dek sonuçlar dirençli olarak bildirilmelidir.
<p><b>Çeşitli antimikrobikler</b></p>						
Kloramfenikol	-	-	-	-	-	
Kolistin	-	-	-	-	-	
Daptomisin	IE	IE	-	IE	IE	
Fosfomisin iv	-	-	-	-	-	
Fosfomisin oral	-	-	-	-	-	
Fusidik asit	-	-	-	-	-	
Linezolid	4	4	10	19	19	
Metronidazol	-	-	-	-	-	
Mupirosin	-	-	-	-	-	
Nitrofurantoin (sadece komplike olmayan İYE)	64 <sup>1</sup>	64 <sup>1</sup>	100	15 <sup>A</sup>	15 <sup>A</sup>	<b>1/A.</b> Nitrofurantoin sınır değerleri sadece <i>E. faecalis</i> içindir.
Rifampisin	-	-	-	-	-	
Spektinomisin	-	-	-	-	-	
Trimetoprim (sadece komplike olmayan İYE) <sup>2</sup>	0.03	1	5	50	21	<b>2.</b> Sokak tipi popülasyonun orta-duyarlı kategorisinde bulunması sebebiyle, trimetoprimin enterokoklara etkisi belirsizdir.
Trimetoprim-sülfametoksazol <sup>3</sup>	0.03	1	1.25-23.75	50	21	<b>3.</b> Trimetoprim:sülfametoksazol oranı 1:19. Sınır değerler trimetoprim konsantrasyonu olarak ifade edilir.

## İlgili diğer UMS belgeleri

B ÖY (Bakteriyoloji Örnek Yönetimi) 1-7/9-14

B TP (Bakteriyoloji Test Prosedürleri)- 02, 03, 10, 18, 19, 21

AMD TB (Antimikrobiyal Duyarlılık Temel Bilgiler)- 03

AMD TP (Antimikrobiyal Duyarlılık Test Prosedürleri)- 01, 02, 03, 04

## Kaynaklar

- 1 LM Teixeira, MG Siqueira Carvalho, PL Shewmaker, RR Facklam. *Enterococcus*. In: Manuel of Clinical Microbiology, Eds: J Versalovic, KC Carroll, G Funke. Volume 1 Eds: JH Jorgensen, ML Landry, DW Warnock. ASM Press, American Society for Microbiology, Washington DC, 2011.
- 2 G Durmaz. Enterokoklar. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi; Edt: A Willke Topçu, G Söyletir, M Doğanay. 3. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd: Şti., İstanbul, 2008.
- 3 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0., valid from 2014-01-01
- 4 PR Murray, EJ Baron, JJ Jorgensen, MA Tenover, and RH Tenover. Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. ASM Press: Washington, DC, 2003.
- 5 Manero A, Blanch AR. Identification of *Enterococcus spp.* with a Biochemical Key. Appl. Environ. Microbiol. 1999, 65(10):4425.
- 6 LS Garcia, HD Isenberg. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 3rd ed. ASM Press, American Society of Microbiology, Washington, DC, 2010.
- 7 Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M100-S23; Vol. 33 No.1, January 2013.
- 8 Leclercq R, Cantón R, Brown DFJ, Giske CG. EUCAST Expert Rules in Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical Microbiology and Infection. 2013; 19: 141-160.
- 9 ISO standart 20776-1, 2006
- 10 EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, Version 1, December 2013.



T.C. Sağlık Bakanlığı

## ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

# ***Streptococcus pneumoniae*** **İçin AMD Testleri** (Penisilin direncinin saptanması vb.)

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu 11
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri (AMD)
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	AMD-MT-03
Sürüm No	1.0
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

---

# İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	3
GENEL BİLGİ .....	4
TEKNİK BİLGİLER .....	5
1 Hedef mikroorganizma(lar) .....	5
2 Tanı/tanımlama için asgari laboratuvar koşulları .....	5
3 AMD testleri.....	6
3.1.Disk Diffüzyon Yöntemi .....	6
3.2.Gradyent Test Yöntemi.....	6
3.3.Otomatize Sistem ile MİK saptanması.....	7
3.4.Oksasilin ile Penisilin Direncinin Saptanması .....	7
3.5.İndüklenebilir Klindamisin Direncinin Saptanması .....	7
4 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması .....	7
5 Raporlama.....	8
6 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	8
EKLER.....	9
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	13
KAYNAKLAR.....	13



## Kapsam ve Amaç

Bu doküman, *Streptococcus pneumoniae'* nın neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılacak antibiyotiklerin in vitro duyarlılıklarının çalışılması için geçerli yöntemleri ve değerlendirme kriterlerini kapsamaktadır. Etki spektrumu içinde *S. pneumoniae'* nın yer aldığı antibiyotiklerin uygun yöntemler ile belirlenmiş in vitro duyarlılık sonuçları ile neden olduğu enfeksiyonların doğru/etkin bir şekilde tedavilerinin yönlendirilmesi amaçlanmaktadır.

## Kısaltmalar ve Tanımlar

<b>ATCC</b>	Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection) <a href="http://www.atcc.org">http://www.atcc.org</a>
<b>CCUG</b>	Göteborg Üniversitesi Kültür Koleksiyonu (Culture Collection University of Göteborg) <a href="http://www.ccug.se">http://www.ccug.se</a>
<b>CIP</b>	Pastör Enstitüsü Koleksiyonu (Collection de Institut Pasteur) <a href="http://www.cabri.org/CABRI/srs-doc/cip_bact.info.html">http://www.cabri.org/CABRI/srs-doc/cip_bact.info.html</a>
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>DSM</b>	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)'den bakteri kültürleri ve DSM numaraları (Bacterial cultures from Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) have DSM numbers) <a href="http://www.dsmz.de/index.htm">http://www.dsmz.de/index.htm</a>
<b>EUCAST</b>	Antimikrobiyel Duyarlılık Testi ile ilgili Avrupa Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) <a href="http://www.eucast.org">http://www.eucast.org</a>
<b>MH</b>	Mueller-Hinton
<b>MH-F</b>	Mueller-Hinton agar -zor üreyen organizmalar (5% defibrine at kanı ve 20 mg/L $\beta$ -NAD eklenmiş MH)
<b>MİK</b>	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
<b>NCTC</b>	Ulusal Tip Kültür Koleksiyonları (National Collection of Type Cultures) <a href="http://www.hpacultures.org.uk">http://www.hpacultures.org.uk</a>
<b><math>\beta</math>-NAD</b>	$\beta$ -Nikotinamid adenin dinukleotid
<b>SF</b>	0.85% NaCl'ün sudaki çözeltisi

---

## Genel Bilgi

*S pneumoniae* için antimikrobiyal duyarlılık testleri manuel çalışan rutin laboratuvarlarda disk difüzyon ve gradient test yöntemleri ile çalışılmaktadır. Birçok antibiyotiğin duyarlılığını test edip duyarlı, orta dirençli ve dirençli olarak tanımlamak için disk diffüzyon yöntemi yeterli iken, gradiyent yöntemi ile antibiyotiklerin MİK'ları hakkında genel bilgi sağlanabilir. Otomatize duyarlılık test sistemleri kullanan laboratuvarlarda sıklıkla mikrodilüsyon yöntemi ile antibiyotiklerin duyarlılıkları belirlenmekte ve MİK hakkında bilgi edinilebilmektedir. Sıvı dilüsyon yöntemi rutin çalışma uygulayan laboratuvarlar için *S pneumoniae* izolatlarının duyarlılıklarını belirlemede zor ve maliyetli testler olması nedeniyle kullanılmamaktadır.

Duyarlılık testleri sonucu elde edilen veriler EUCAST standartları doğrultusunda değerlendirilerek raporlanmalıdır (<sup>1</sup>). CLSI standartlarını kullanan laboratuvarlar için Performance Standarts for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Information Supplement M100-S23 Vol.33 No.1 Clinical and Laboratory Standards Institute 2013 veya güncel CLSI dökümanı referans alınmalıdır (<sup>2</sup>).

---

# Teknik Bilgiler

## 1 Hedef mikroorganizma

*Streptococcus pneumoniae*

## 2 Tanı/tanımlama için asgari laboratuvar koşulları

### 2.1. Laboratuvar güvenliği

*S pneumoniae* duyarlılık testleri Biyogüvenlik Düzeyi-2 için belirtilen güvenli laboratuvar çalışma yöntem ve uygulama kurallarına uygun olarak çalışılır.

### 2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

*S pneumoniae* duyarlılık testlerini çalışacak personelin; en az Sağlık Meslek Yüksek Okulu mezunu Sağlık Tekniker veya Sağlık Meslek Liselerinin Tıbbi Laboratuvar programından mezun olan Sağlık Teknisyeni statüsünde, biyogüvenlik eğitimi almış ve bakteriyoloji laboratuvarında en az bir aylık eğitim sürecini tamamlamış olması gerekir.

### 2.3. Örnek, Reajen, Kit, Ekipman

#### İnceleme örneği

- Değişik hasta örneklerinde izole edilerek *S pneumoniae* olarak tanımlanmış mikroorganizmaları kapsamaktadır.

#### Besiyeri / Ayıraç

- MH-F Agar - Laboratuvarda hazırlanması için, AMD Testlerinde Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması (AMD-TP-01) dokümanından yararlanılır. Ticari olarak piyasadan hazır olarak da temin edilebilir.
- Otomatize sistemler

### 2.4. Kalite kontrol

- Antimikrobiyal duyarlılık test sonuçlarının doğruluğu ve geçerliliği EUCAST standartında yer alan en az bir standart *S pneumoniae* suşu ile çalışılarak ilgili standartta ifade edilen değerler aralığında sonuçların alınması ile kanıtlanmalıdır<sup>(1)</sup>.
- Kalite kontrol suşu olarak *S pneumoniae* ATCC 49619 kullanılması önerilir<sup>(1)</sup>.
- Alternatif olarak *S pneumoniae*'nin NCTC 12977, CIP 104340, DSM 11967, CCUG 33638 standart suşları da kalite kontrol amacıyla kullanılabilir<sup>(1)</sup>.

## 3 AMD testleri

### 3.1. Disk Diffüzyon Yöntemi

Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi (AMD-TP-03) dokümanına uygun olarak hazırlanıp değerlendirilir.

Oksasilin (tarama amacıyla), sefaklor, siprofloksasin, levofloksasin, moksifloksasin, norfloksasin (tarama amacıyla), ofloksasin, teikoplanin, vankomisin, eritromisin, telitromisin, klindamisin, minosiklin, tetrasiklin, kloramfenikol, linezolid, rifampisin, trimetoprim-sülfametaksazol disk difüzyon yöntemi ile duyarlılığı çalışılan antimikrobiklerdir<sup>(1)</sup>.

Kanlı agar veya çukulata agar besiyerinde bir gecelik inkübasyon sonrası üreyen kolonilerden steril öze veya pamuk eküvyon ile steril SF çözeltisinde veya MH sıvı besiyeri içinde bir suspansiyon hazırlanır.

*S pneumoniae*, tercihen kanlı agar plaktan McFarland 0.5 standart yoğunluğuna suspense edilmelidir. *S pneumoniae* çukulata agar plağından hazırlandığında McFarland 1.0 standardına eşdeğer suspansiyon hazırlanmalıdır<sup>(1)</sup>.

Süspansiyonun yoğunluğunu ayarlamakta fotometrik bir cihaz kullanılması önerilmektedir. Fotometrik cihaz, üretici firmanın önerileri doğrultusunda kalibre edilerek kullanılmalıdır.

Alternatif olarak, suspansiyonun bulanıklığı görsel olarak da McFarland 0.5 bulanıklık (çukulata agar plağından hazırlandığında McFarland 1.0 standardına eşdeğer bulanıklık) standartıyla karşılaştırılır. (bkz. McFarland Baryum Sülfat Opasite Standardı hazırlanması (AMD-TP-02))

Plaklar, %5 CO<sub>2</sub> içeren atmosferik koşulda 16-20 saat 35°C sıcaklıkta inkübe edilmelidir. CO<sub>2</sub> inkübatörü yok ise mumlu kavanoz (desikatör) uygun atmosferik ortamı oluşturmak için kullanılabilir.

Kullanılması önerilen disk içerikleri, sınır değerler ve kalite kontrol tablosu <http://www.eucast.org> adresinde yer almaktadır<sup>(1)</sup>.

Zon çapları Ek 1'de yer alan sınır değer tablosuna göre değerlendirilir<sup>(3)</sup>

### 3.2. Gradyent Test Yöntemi

MİK saptama yöntemleri (AMD-TP-04) dokümanı esas alınarak çalışılır.

Benzilpenisilin, ampisilin, sefaklor, sefotaksim, sefpodoksim, seftriakson, sefuroksim, doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem, siprofloksasin, levofloksasin, moksifloksasin, ofloksasin, teikoplanin, vankomisin, azitromisin, klaritromisin, eritromisin, roksitromisin, telitromisin, klindamisin, doksisisiklin, minosiklin, tetrasiklin, kloramfenikol, linezolid, rifampisin, trimetoprim-sülfametoksazol gradyent yöntemi ile duyarlılığı çalışılan antimikrobiklerdir<sup>(1)</sup>.

Duyarlılık testi gradyent yöntemi ile yapılan antibiyotiklerin MİK değerleri Ek 1'de yer alan sınır değer tablosuna göre değerlendirilir (3).

### 3.3.Otomatize Sistem ile MİK saptanması

Üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışılarak saptanan değerler sistemin Database'inden seçilecek CLSI veya EUCAST standartlarına göre yorumlanması sağlanır.

### 3.4.Oksasilin ile Penisilin Direncinin Saptanması

Disk difüzyon yöntemine uygun hazırlanan plakta oksasilin duyarlılığı değerlendirilir. Ek-2'de yer alan değerlendirme kriterlerine göre yorumlanır. 20mm'nin altındaki zon çaplarında Penisiline dirençli olarak bildirilmekle beraber penisilin duyarlılığı gradiyent test yöntemi ile çalışılarak MİK olarak tespit edilmelidir<sup>(1)</sup>.

### 3.5.İndüklenebilir Klindamisin Direncinin Saptanması

İndüklenebilir klindamisin direnci sadece bir makrolid antibiyotiğin de klindamisin ile birlikte test edilmesi durumunda saptanabilir<sup>(1)</sup>.

Disk difüzyon testinde eritromisin ve klindamisin diskleri kenardan kenara 12-20 mm uzaklıkta yerleştirilmelidir.

Eritromisinin klindamisin üzerindeki belirgin antagonist etkisine bakılmalıdır (D-zon testi).

## 4 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması

Disk difüzyon, gradiyent test yöntemi ve otomatize sistemle mikrodilüzyon yöntemle çalışılan antibiyotiklerin sınır değerleri Ek-1'de yer alan "MİK ve zon çapı değerlendirmek için sınır değer tabloları" incelenerek duyarlı, orta dirençli veya dirençli olarak yorumlanır. Penisilin direncini tespit etmek için kullanılan oksasilin tarama testi Ek-2'de sunulan "*S. pneumoniae*'de beta-laktam direncinin taranması tablosu" esas alınarak değerlendirilir. Oksasilin zon çapı 20 mm'nin altında saptandığında penisiline dirençli olarak raporlanmakla beraber MİK düzeyi saptanarak da raporlanmalıdır. Saptanan MİK değerleri BOS ve solunum yolu örnekleri için EK-1 de sunulan tablo esas alınarak farklı yorumlanmalıdır. Oksasilin inhibisyon zon çapı 20 mm'nin altında saptandığında; Benzilpenisilin (menenjit) ve fenoksimetilpenisilin (tüm endikasyonlar) dirençli bildirilmeli; Benzilpenisilin (menenjit dışındaki enfeksiyonlar için) MİK belirlenmeli ve klinik sınır değerler uyarınca değerlendirilmeli; Ampisilin, amoksisilin ve piperasilin (beta-laktamaz inhibitörü içeren ve içermeyen), sefepim, sefotaksim oksasilin zon çapı  $\geq 8$  mm ise duyarlı bildirilmeli, oksasilin zon çapı  $< 8$  mm ise klinik kullanım için düşünülen beta-laktam antimikrobikler için MİK belirlenmeli ancak (beta-laktamaz inhibitörü içeren ve içermeyen) ampisilin, amoksisilin ve piperasilin için duyarlılık ampisilin MİK değerinden çıkarsama yapılarak belirlenmeli; diğer beta-laktam antimikrobikler için ise klinik kullanım için düşünülen antimikrobik için MİK belirlenmeli ve klinik sınır değerler uyarınca değerlendirilmelidir<sup>(1,3)</sup>.

İndüklenebilir klindamisin direncini saptamak üzere disk difüzyon testinde

eritromisinin klindamisin üzerinde belirgin antagonist etkisi saptanır ise sonuç klindamisine direnç olarak bildirilir<sup>(1)</sup>.

## 5 Raporlama

Çalışılan antibiyotikler sınır değerleri Ek-1'de yar alan MİK ve zon çapı değerlendirmek için sınır değer tabloları incelenerek duyarlı, orta dirençli veya dirençli olarak raporlanır.

Penisilin direncini tespit etmek için kullanılan oksasilin tarama testi Ek-2'de sunulan *S. pneumoniae*'de beta-laktam direncinin taranması tablosu esas alınarak değerlendirilip, raporlanır.

*S pneumoniae*'da disk difüzyon testinde eritromisinin klindamisin üzerindeki belirgin antagonist etkisi saptanır ise indüklenabilir klindamisin direnci varlığı, klindamisine direnç olarak raporlanır.

## 6 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

CLSI standartları kullanıldığında disk difüzyon testi için %5 koyun kanlı MH Agar kullanılmalıdır<sup>(2)</sup>.

CLSI standartlarını kullanan laboratuvarlar için Performance Standarts for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Information Supplement M100-S23 Vol.33 No.1 Clinicaland Laboratory Standards Institue 2013 veya güncel CLSI dökümanı referans alınmalıdır<sup>(2)</sup>.

Trimetoprim sulfametaksazol diski ile duyarlılık testi çalışılırken test yapılan besiyerinin timidin içermemesi gereklidir.

## Ekler

### Ek-1 *S.pneumoniae* EUCAST Klinik Sınır Değer Tablosu

	MİK sınır değeri (mg/L)		Disk içeriği (µg)	Zon çapı sınır değeri (mm)		Notlar
	S ≤	R >		S ≥	R <	
<b>Penisilinler<sup>1</sup></b>						<p>Sayı ile belirtilen notlar MİK sınır değerleri ile ilişkilidir.</p> <p>Harf ile belirtilen notlar zon çapı sınır değerleri ile ilişkilidir.</p> <p><b>1. Benzilpenisilin dışındaki penisilinler için sınır değerleri sadece menenjit dışı kökenler içindir.</b></p> <p><b>Benzilpenisiline tamamen duyarlı olan kökenler (MİK ≤0.06 mg/L ve/veya oksasilin disk tarama ile duyarlı, bakınız Not C) ("Not" içerenler de dahil olmak üzere) klinik sınır değer belirtilen beta-laktam antimikrobikler için duyarlı olarak bildirilebilirler.</b></p> <p><b>2. Pnömonide</b>, 1,2 g x 4 dozu uygulanıyorsa, <b>MİK ≤0.5 mg/L</b> olan kökenler duyarlı kabul edilmelidir.</p> <p><b>Pnömonide</b>, 2,4 g x 4 veya 1,2 g x 6 dozu uygulanıyorsa, <b>MİK ≤1 mg/L</b> olan kökenler duyarlı kabul edilmelidir.</p> <p><b>Pnömonide</b>, 2,4 g x 6 dozu uygulanıyorsa, <b>MİK ≤2 mg/L</b> olan kökenler duyarlı kabul edilmelidir.</p> <p><b>A.</b> 1 µg oksasilin diski ile beta-laktam direnci taranmalıdır, <b>bakınız Not C.</b></p>
Benzilpenisilin (menenjit dışındaki enfeksiyonlar için)	0.06 <sup>1,2</sup>	2 <sup>1,2</sup>		Not <sup>A</sup>	Not <sup>A</sup>	
Benzilpenisilin (menenjit)	0.06 <sup>1</sup>	0.06 <sup>1</sup>		Not <sup>A</sup>	Not <sup>A</sup>	
Ampisilin	0.5 <sup>1</sup>	2 <sup>1</sup>		Not <sup>A,B</sup>	Not <sup>A,B</sup>	<b>B.</b> Duyarlılık ampisilin MİK değerinden çıkarsama yapılarak belirlenir.
Ampisilin-sulbaktam	Not <sup>1,3</sup>	Not <sup>1,3</sup>		Not <sup>A,B</sup>	Not <sup>A,B</sup>	<b>3.</b> Duyarlılık ampisilin MİK değerinden çıkarsama yapılarak belirlenir.
Amoksisilin	Not <sup>1,3</sup>	Not <sup>1,3</sup>		Not <sup>A,B</sup>	Not <sup>A,B</sup>	
Amoksisilin-klavulanat	Not <sup>1,3</sup>	Not <sup>1,3</sup>		Not <sup>A,B</sup>	Not <sup>A,B</sup>	
Piperasilin	Not <sup>1,3</sup>	Not <sup>1,3</sup>		Not <sup>A,B</sup>	Not <sup>A,B</sup>	
Piperasilin-tazobaktam	Not <sup>1,3</sup>	Not <sup>1,3</sup>		Not <sup>A,B</sup>	Not <sup>A,B</sup>	
Tikarsilin	-	-		-	-	
Tikarsilin-klavulanat	-	-		-	-	
Fenoksimetilpenisilin	Not <sup>1</sup>	Not <sup>1</sup>		Not <sup>A</sup>	Not <sup>A</sup>	
Oksasilin (tarama)	UD	UD	1	20 <sup>C</sup>	Not <sup>C</sup>	<b>C. Oksasilin disk tarama testinin değerlendirilmesi için aşağıdaki ek tabloya bakınız.</b> Oksasiline duyarlı olmayan kökenler için her zaman benzilpenisilin MİK değeri belirlenmelidir.
<b>Sefalosporinler</b>						
Sefaklor	0.03	0.5	30	50	28	
Sefepim	1 <sup>1</sup>	2		Not <sup>A</sup>	Not <sup>A</sup>	<b>1.</b> Duyarlılık sınır değeri üzerinde MİK değerlerine sahip kökenler çok nadirdir veya henüz hiç bildirilmemiştir. Bu tip kökenler için tanımlama ve antimikrobik duyarlılık testleri tekrar edilmeli ve sonuç doğrulanırsa köken bir referans laboratuvarına gönderilmelidir. MİK değeri güncel direnç sınır değerinin üzerinde olan doğrulanmış kökenler için klinik yanıtla ilişkin kanıt oluşana dek sonuçlar dirençli olarak bildirilmelidir.

## Streptococcus pneumoniae için AMD testleri

	MİK sınır değeri (mg/L)		Disk içeriği (µg)	Zon çapı sınır değeri (mm)		Notlar Sayı ile belirtilen notlar MİK sınır değerleri ile ilişkilidir. Harf ile belirtilen notlar zon çapı sınır değerleri ile ilişkilidir. <b>A.</b> 1 µg oksasilin diski ile beta-laktam direnci taraması. <b>Aşağıdaki ek tabloya bakınız.</b>
	S ≤	R >		S ≥	R <	
Sefotaksim	0.5 <sup>1</sup>	2		Not <sup>A</sup>	Not <sup>A</sup>	
Sefoksitin	UD	UD		UD	UD	
Sefpodoksim	0.25	0.5		Not <sup>A</sup>	Not <sup>A</sup>	
Seftarolin	0.25	0.25		Not <sup>A</sup>	Not <sup>A</sup>	
Seftazidim	-	-		-	-	
Seftriakson	0.5 <sup>1</sup>	2		Not <sup>A</sup>	Not <sup>A</sup>	
Sefuroksim iv	0.5	1		Not <sup>A</sup>	Not <sup>A</sup>	
Sefuroksim oral	0.25	0.5		Not <sup>A</sup>	Not <sup>A</sup>	
<b>Karbapenemler</b>						
Doripenem <sup>1</sup>	1 <sup>2</sup>	1		Not <sup>A</sup>	Not <sup>A</sup>	<b>1.</b> Menenjitte kullanılmaz (menenjitte kullanımı olan tek karbapenem meropenemdir). <b>2.</b> Duyarlılık sınır değeri üzerinde MİK değerlerine sahip kökenler çok nadirdir veya henüz hiç bildirilmemiştir. Bu tip kökenler için tanımlama ve antimikrobik duyarlılık testleri tekrar edilmeli ve sonuç doğrulanırsa köken bir referans laboratuvarına gönderilmelidir. MİK değeri güncel direnç sınır değerinin üzerinde olan doğrulanmış kökenler için klinik yanıtla ilişkin kanıt oluşana dek sonuçlar dirençli olarak bildirilmelidir. <b>A.</b> 1 µg oksasilin diski ile beta-laktam direnci taraması. <b>Aşağıdaki ek tabloya bakınız.</b>
Ertapenem <sup>1</sup>	0.5 <sup>2</sup>	0.5		Not <sup>A</sup>	Not <sup>A</sup>	
İmipenem <sup>1</sup>	2 <sup>2</sup>	2		Not <sup>A</sup>	Not <sup>A</sup>	
Meropenem <sup>3</sup> (menenjit dışındaki enfeksiyonlar için)	2	2		Not <sup>A</sup>	Not <sup>A</sup>	<b>3.</b> Meropenem menenjitte kullanımı olan tek karbapenemdir.
Meropenem <sup>3</sup> (menenjit)	0.25	1		Not <sup>A,B</sup>	Not <sup>A,B</sup>	<b>B.</b> Menenjit olguları için meropenem MİK değeri belirlenmelidir.
<b>Florokinolonlar</b>						
Siprofloksasin <sup>1</sup>	0.12	2	<b>5</b>	50 <sup>A</sup>	16 <sup>A</sup>	<b>1.</b> Sokak tipi <i>S. pneumoniae</i> kökenlerinin siprofloksasine duyarlı olmadıkları kabul edilir ve bu sebeple orta duyarlı kategorisinde değerlendirilir. <b>A.</b> Norfloksasin disk difüzyon testi florokinolon direncinin taranması için kullanılabilir. <b>Bakınız Not B.</b> <b>2.</b> Levofloksasin sınır değerleri yüksek doz tedavi ile ilişkindir.
Levofloksasin <sup>2</sup>	2	2	<b>5</b>	17 <sup>A</sup>	17 <sup>A</sup>	
Moksifloksasin	0.5	0.5	<b>5</b>	22 <sup>A</sup>	22 <sup>A</sup>	
Nalidiksik asit (tarama)	UD	UD		UD	UD	
Norfloksasin (tarama)	UD	UD	<b>10</b>	12 <sup>B</sup>	Not <sup>B</sup>	<b>B.</b> Norfloksasine duyarlı kökenler levofloksasin ve moksifloksasin duyarlı, siprofloksasin ve ofloksasine orta duyarlı olarak bildirilebilir. Duyarlı bulunmayan kökenlerde her bir florokinolonun duyarlılığı ayrı ayrı test edilerek belirlenmelidir.
Ofloksasin <sup>3</sup>	0.12	4	<b>5</b>	50 <sup>A</sup>	13 <sup>A</sup>	<b>3.</b> Sokak tipi <i>S. pneumoniae</i> kökenlerinin ofloksasine duyarlı olmadıkları kabul edilir ve bu sebeple orta duyarlı kategorisinde değerlendirilir.
<b>Glikopeptidler</b>						
Teikoplanin	2 <sup>1</sup>	2	<b>30</b>	17 <sup>A</sup>	17 <sup>A</sup>	<b>1.</b> Duyarlılık sınır değeri üzerinde MİK değerlerine sahip kökenler çok nadirdir



	MİK sınır değeri (mg/L)		Disk içeriği (µg)	Zon çapı sınır değeri (mm)		Notlar Sayı ile belirtilen notlar MİK sınır değerleri ile ilişkilidir. Harf ile belirtilen notlar zon çapı sınır değerleri ile ilişkilidir. veya henüz hiç bildirilmemiştir. Bu tip kökenler için tanımlama ve antimikrobik duyarlılık testleri tekrar edilmeli ve sonuç doğrulanırsa köken bir referans laboratuvarına gönderilmelidir. MİK değeri güncel direnç sınır değerinin üzerinde olan doğrulanmış kökenler için klinik yanıtla ilişkin kanıt oluşana dek sonuçlar dirençli olarak bildirilmelidir. <b>A.</b> Henüz dirençli kökenler saptanmadığı için zon çapı sınır değerleri sokak tipi kökenlerin dağılımına dayanmaktadır.
	S ≤	R >		S ≥	R <	
Telavansin	YK	YK		YK	YK	
Vankomisin	2 <sup>1</sup>	2	5	16 <sup>A</sup>	16 <sup>A</sup>	

### Makrolidler, linkozamidler ve streptograminler

Azitromisin	0.25 <sup>1</sup>	0.5 <sup>1</sup>		Not <sup>A</sup>	Not <sup>A</sup>	<b>1/A.</b> Azitromisin, klaritromisin ve roksitromisin duyarlılığının belirlenmesi amacıyla eritromisin kullanılabilir.
Klaritromisin	0.25 <sup>1</sup>	0.5 <sup>1</sup>		Not <sup>A</sup>	Not <sup>A</sup>	
Eritromisin	0.25 <sup>1</sup>	0.5 <sup>1</sup>	15	22 <sup>A</sup>	19 <sup>A</sup>	
Roksitromisin	0.5 <sup>1</sup>	1 <sup>1</sup>		Not <sup>A</sup>	Not <sup>A</sup>	
Telitromisin	0.25	0.5	15	23	20	
Klindamisin <sup>2</sup>	0.5	0.5	2	19 <sup>B</sup>	19 <sup>B</sup>	<b>2/B.</b> İndüklenebilir klindamisin direnci sadece bir makrolid antibiyotik için de test edilmesi durumunda saptanabilir. Disk difüzyon testinde eritromisin klindamisin üzerindeki belirgin antagonist etkisine bakılmalıdır (D-test).
Kinupristin-dalfopristin	-	-		-	-	

### Tetrasiklinler

Doksisiklin	1 <sup>1</sup>	2 <sup>1</sup>		Not <sup>A</sup>	Not <sup>A</sup>	<b>1/A.</b> Tetrasikline duyarlı olan kökenler doksisiklin ve minosikline de duyarlıdır, ancak tetrasikline dirençli olan bazı kökenler minosikline ve/veya doksisikline duyarlı olabilir. Gerekli durumlarda tetrasikline dirençli kökenlerin doksisiklin duyarlılığını belirlemek üzere bir MİK yöntemi kullanılmalıdır.
Minosiklin	0.5 <sup>1</sup>	1 <sup>1</sup>	30	24 <sup>A</sup>	21 <sup>A</sup>	
Tetrasiklin	1 <sup>1</sup>	2 <sup>1</sup>	30	25 <sup>A</sup>	22 <sup>A</sup>	
Tigesiklin	YK	YK		YK	YK	

### Çeşitli

Kloramfenikol	8	8	30	21	21	
Kolistin	-	-		-	-	
Daptomisin	YK	YK		YK	YK	
Fosfomisin iv	YK	YK		YK	YK	
Fosfomisin oral	-	-		-	-	
Fusidik asit	-	-		-	-	
Linezolid	2	4	10	22	19	
Metronidazol	-	-		-	-	
Mupirosin	-	-		-	-	
Nitrofurantoin (sadece komplike olmayan İYE)	-	-		-	-	
Rifampisin	0.06	0.5	5	22	17	

	MİK sınır değeri (mg/L)		Disk içeriği (µg)	Zon çapı sınır değeri (mm)		Notlar Sayı ile belirtilen notlar MİK sınır değerleri ile ilişkilidir. Harf ile belirtilen notlar zon çapı sınır değerleri ile ilişkilidir.
	S ≤	R >		S ≥	R <	
Spektinomisin	-	-	-	-	-	
Trimetoprim (sadece komplike olmayan İYE)	-	-	-	-	-	
Trimetoprim-sülfametoksazol <sup>1</sup>	1	2	1.25-23.75	18	15	1. Trimetoprim:sülfametoksazol oranı 1:19. Sınır değerler trimetoprim konsantrasyonu olarak ifade edilir.

## Ek-2 S pneumoniae’de beta-laktam direncini taranması EUCAST Klinik Sınır Değer Tablosu

Oksasilin 1 µg disk Zon çapı	Antimikrobik madde	İleri test ve/veya değerlendirme
≥ 20 mm	("Not" içerenler dahil olmak üzere) klinik sınır değerleri belirlenmiş tüm beta-laktamlar	Klinik endikasyondan bağımsız olarak (sefaklor dışındaki beta-laktam antimikrobikler) duyarlı olarak bildirilmelidir. Sefaklor duyarlılığı, eğer bildirilecekse, orta duyarlı olarak bildirilmelidir.
< 20 mm*	Benzilpenisilin (menenjit ve fenoksimetilpenisilin (tüm endikasyonlar)	Dirençli bildirilmelidir.
	Benzilpenisilin (menenjit dışındaki enfeksiyonlar için)	MİK belirlenmeli ve klinik sınır değerler uyarınca değerlendirilmelidir.
	Ampisilin, amoksisilin ve piperasilin (beta-laktamaz inhibitörü içeren ve içermeyen), sefepim, sefotaksim, seftarolin ve seftriakson	<b>Oksasilin zon çapı ≥ 8 mm:</b> Duyarlı bildirilmelidir.
	Diğer beta-laktam antimikrobikler	<b>Oksasilin zon çapı &lt; 8 mm:</b> Klinik kullanım için düşünülen beta-laktam antimikrobikler için MİK belirlenmelidir ancak (beta-laktamaz inhibitörü içeren ve içermeyen) ampisilin, amoksisilin ve piperasilin için duyarlılık ampisilin MİK değerinden çıkarsama yapılarak belirlenmelidir. Klinik kullanım için düşünülen antimikrobik için MİK belirlenmeli ve klinik sınır değerler uyarınca değerlendirilmelidir.
<b>*Oksasilin 1 µg &lt; 20 mm: Her zaman benzilpenisilin MİK değeri saptanmalıdır, ancak bildirimde gecikmemek adına yukarıdaki öneri takip edilmelidir.</b>		

<http://www.eucast.org> :The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, 2014.

---

## İlgili diğer UMS belgeleri

AMD-TP (Antimikrobiyal Duyarlılık Test Prosedürleri)-01, 02, 03, 04

AMD-TB (Antimikrobiyal Duyarlılık Temel Bilgiler)-03

## Kaynaklar

---

- <sup>1</sup> <http://www.eucast.org> : EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing - Version 4.0 (April 2013)
- <sup>2</sup> Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility susceptibility testing; Twenty- third Informational supplement. 2013 M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- <sup>3</sup> The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, 2014. <http://www.eucast.org>



T.C. Sağlık Bakanlığı

## ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

# ***Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae*'nin Tanımlanması ve AMD Testleri** (GSBL saptama ve Karbapenemaz testleri)

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu 11
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri (AMD)
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	AMD-MT-04
Sürüm No	1.0
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik
----------	-------	------------

# İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	3
GENEL BİLGİ .....	4
TEKNİK BİLGİLER .....	5
1 Hedef mikroorganizma(lar) .....	5
2 Tanı/tanımlama için asgari laboratuvar koşulları .....	5
3 Tanı/tanımlama teknikleri .....	6
4 Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz ve Karbapenemaz varlığının saptanması .....	11
4.1 Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz varlığının saptanması ..	11
4.2 Karbapenemaz varlığının saptanması.....	16
5 Raporlama .....	22
6 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	22
Ek-1:CLSI önerilerine göre <i>Enterobacteriaceae</i> türlerinde GSBL'lar için Tarama, Doğrulama Testleri ve Kalite Kontrol Önerileri (M100- S23).....	23
Ek-2.GSBL (CTX-M, TEM SHV) Genlerinin Saptanması.....	26
EK-3 Karbapenemaz Direnç Genlerinin Saptanması.....	30
İlgili diğer UMS belgeleri .....	34
KAYNAKLAR .....	34

## Kapsam ve Amaç

Bu uygulama prosedürü Enterobacteriaceae ailesi üyelerinden *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae*'nin tanımlanmasını ve bu türlerde beta-laktam direncine yol açan mekanizmalardan genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) ile karbapenemazların saptanmasını ele almaktadır.

Bu doküman, Enterobacteriaceae tanımlama testleri ile ilgili test prosedürleri ve Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans standart uygulama prosedürü ile birlikte kullanılmalıdır.

## Kısaltmalar ve Tanımlar

<b>CLSI</b>	Clinical Laboratory Standarts Institute (ABD)
<b>EUCAST</b>	ESCMID Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi
<b>GSBL</b>	Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz
<b>MHT</b>	Modifiye Hodge Testi
<b>PZT/PZR</b>	Polimeraz zincir tepkimesi/reaksiyonu
<b>ATM</b>	Aztreonam
<b>CTX</b>	Sefotaksim
<b>CAZ</b>	Seftazidim
<b>CRO</b>	Seftriakson
<b>DOR</b>	Doripenem
<b>ETP</b>	Ertapenem
<b>IPM</b>	İmipenem
<b>MEM</b>	Meropenem
<b>MHA</b>	Mueller Hinton Agar
<b>CAMHB</b>	Katyonu ayarlanmış Mueller Hinton Sıvı Besiyeri
<b>CTX-CLA</b>	Sefotaksim-klavulanik asit
<b>CAZ-CLA</b>	Seftazidim-klavulanik asit

## Genel Bilgi

*E.coli* ve *K.pneumoniae*, klinik mikrobiyoloji laboratuvarında en sık izole edilen Enterobacteriaceae türleridir. *E.coli*, hem toplum hem de hastane kökenli idrar yolu enfeksiyonlarının ve buna bağlı bakteriyemilerin en sık raslanan etkeni iken, *K.pneumoniae* özellikle hastane ortamında solunum yolu enfeksiyonları, ventilatörle ilişkili pnömoni ve bakteriyemi etkeni olarak saptanmaktadır. Her iki mikroorganizmanın tür tanımının ve antibiyotik duyarlılıklarının hızlı ve doğru olarak yapılması, hasta tedavisi yanı sıra Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans (UAMDS) Sistemine yapılan bildirimler açısından da önem taşımaktadır.

*E.coli* ve *K.pneumoniae*'de beta-laktam direncinde iki mekanizma ön plandadır. Bunlardan ilki, Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretimidir(1). GSBL'ler oksimino- $\beta$ -laktamlar (sefuroksim, 3. ve 4. Kuşak sefalosporinler ve aztreonam) da dahil olmak üzere penisilinler ve sefalosporinlerin çoğunu hidrolize eden, ancak sefamisinler ve karbapenemleri etkilemeyen enzimlerdir (2-4). GSBL üreten suşlar, 1983'de ilk kez saptanmalarından itibaren geçen sürede tüm dünyada gözlenir olmuşlardır. Bu yayılım; klonal çoğalma, GSBL genlerinin plazmidler üzerinde aktarılması ve nadiren de yeni enzimlerin ortaya çıkmasının bir sonucudur. GSBL'ler içerisinde en önemli grup CTX-M enzimleridir. Bu grubu, SHV ve TEM-türevi GSBL'ler izlemektedir (5-8). GSBL üretimi en sık *E.coli* ve *K.pneumoniae*'de olmak üzere tüm Enterobacteriaceae üyelerinde, önce hastane ortamında, daha sonra bakım evlerinde ve CTX-M tipi GSBL'lerin yayıldığı 2000'li yıllardan itibaren de toplumda (poliklinik hastaları, sağlıklı taşıyıcılar, hasta ve sağlıklı hayvanlar, yiyecek ürünleri) izlenmektedir (9,10). GSBL prevalansı, coğrafi konuma ve sağlık hizmeti verilen kuruluşa göre değişmekle birlikte, özellikle Akdeniz ülkelerinde %50'ye ulaşmıştır (11).

GSBL prevalansındaki bu artış, karbapenemlerin kullanılmasında da artışa neden olmuştur. Bu yaygın ve yanlış kullanımın kaçınılmaz sonucu; başta *Klebsiella pneumoniae* olmak üzere Enterobacteriaceae üyelerinde karbapenemaz (karbapenemleri hidrolize eden beta-laktamazlar) üretiminin görülmesi ve giderek artması olmuştur.

Karbapenemazlar, tüm beta-laktamlara dirence yol açmaları nedeniyle, bir endişe kaynağı oluşturmaktadır (12). Karbapenemaz üreten suşlar genellikle diğer direnç mekanizmalarını da taşıdıkları için çoklu dirençlidirler ve karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae enfeksiyonları yüksek mortalite hızları ile ilişkilidir (13-15). Avrupa ülkelerinde karbapenemaz problemi, metallo-beta-laktamazlarla başlamıştır (16,17). Ülkemizde ise, Enterobacteriaceae'de metallo-beta-laktamalara bağlı sporadik olgular ve küçük salgınlar görülse de esas problem, son 5 yılda OXA-48 karbapenemazının birçok hastanede yayılması ile ortaya çıkmıştır (18). Karbapenemaz üretimi en sık *K.pneumoniae*'de görülmekle birlikte *E.coli* ve diğer Enterobacteriaceae'de de saptanabilmektedir. İnvazif *K.pneumoniae* izolatlarında karbapenem direnç oranlarının %50'ye ulaştığı hastaneler bulunmaktadır (17).

Her iki direnç mekanizmasının doğru ve hızlı olarak saptanması, enfeksiyon kontrolü ve yayılımın engellenmesi açısından önem taşımaktadır. Özellikle karbapenemazlar klinik mikrobiyoloji laboratuvarının kritik değerleri arasında yer almaktadır. Saptanmaları halinde enfeksiyon kontrol ekibine bildirim yapılmalıdır.

GSBL ve karbapenemaz varlığının gösterilmesi amacıyla çeşitli test yöntemleri geliştirilmiştir. Bu belgede de EUCAST ve CLSI kılavuzları dikkate alınarak geliştirilen saptama yöntemleri yer almaktadır (1-3).

## Teknik Bilgiler

### 1 Hedef mikroorganizmalar

*Esherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae*

### 2 Tanı/ tanımlama için asgari laboratuvar koşulları

#### 2.1. Laboratuvar güvenliği

*Esherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* Biyogüvenlik Düzeyi-2 için belirtilen güvenli laboratuvar çalışma yöntem ve uygulama kurallarına uygun olarak çalışılır.

#### 2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Hedef mikroorganizmalarla çalışacak personelin; en az Sağlık Meslek Yüksek Okulu mezunu sağlık tekniker veya sağlık meslek liselerinin tıbbi laboratuvar programından mezun olan sağlık teknisyeni statüsünde, biyogüvenlik eğitimi almış ve bakteriyoloji laboratuvarında en az bir aylık eğitim sürecini tamamlamış olması gereklidir.

#### 2.3. Örnek, Ayraç, Kit, Ekipman

##### İnceleme örneği

- Kan
- BOS
- İdrar/Dışkı
- Balgam
- Bronş Lavaj
- Bronko alveoler Lavaj
- Yara Sürüntü
- Doku
- Apse
- Aspirasyon
- Kateter ucu
- Steril vücut sıvıları



### Besiyeri / Ayrac

- Besiyerleri:
  - a) Örnek ekimi için: Kanlı agar (%5 koyun kanlı), EMB agar veya McConkey agar, çukulata agar (invazif örnekler) (Bkz Örnek Yönetimi belgeleri)
  - b) Antibiyotik duyarlılık testi için: Mueller Hinton Agar
- Diğer malzeme (Bkz AMD-TP-03 Kirby Bauer Disk Difüzyon dokümanı)

## 2.4. Kalite kontrolü

*Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının identifikasyonunda kullanılan tüm besiyeri ve ayraclar için iç kalite kontrolü yapılmalıdır. Kalite kontrol testleri ve bu testlerde kullanılan kalite kontrol suşları, ilgili tanımlama testlerinin altında yer almaktadır. ( Daha ayrıntılı bilgi için Bkz. Bakteriyoloji Test Prosedürleri )

## 3 Tanı/tanımlama teknikleri

Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarları, otomatize sistem kullansa da bakteri tanımlamada önce şu basamakları yerine getirmelidir:

### 3.1. Mikroskopi (Gram boyama)

Hedef mikroorganizmalar, gelen örnek veya üreyen kültürden hazırlanan preparatın Gram boyama sonrası yapılan incelemesinde Gram negatif basiller olarak görülür (Bkz B-TP-03).

### 3.2 Kültür ve Koloni morfolojisi inceleme:

EMB ya da Mac-Conkey agarda laktozu kullanan *Enterobacteriaceae* üyeleri (*Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter* spp.) opak ve renkli (sıklıkla kırmızı-mor) koloni oluştururlar. Laktozu kullanmayan *Enterobacteriaceae* üyeleri (Ör: *Salmonella* spp., *Shigella* spp.) bu besiyerinde renksiz, şeffaf koloni oluştururlar. Kanlı ve çukulata agarda ise genellikle 3-5 mm çapında S ve M koloniler bu türler için karakteristiktir.

### 3.3 Biyokimyasal Testler

a. Oksidaz testi: Yukarıda belirtilen koloni morfolojisine ve mikroskopik görünümüne sahip mikroorganizmaları non-fermentatif gram-negatif basillerden (*Pseudomonas* spp.) ayırt etmek üzere oksidaz testi uygulanır.

*Enterobacteriaceae* üyesi mikroorganizmaların çoğunda sitokrom oksidaz enzimi bulunmaz. Oksidaz testi NEGATİF olan gram negatif basiller ileri biyokimyasal tanımlama testlerine tabi tutulurlar (Bkz B-TP-16).

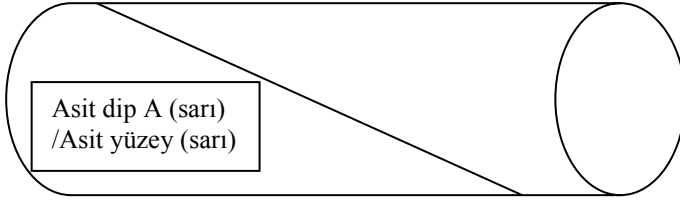
**b. Triple Sugar Iron (TSI) Agarda karbonhidrat fermentasyonu ve IMVIC testleri:**

**TSI:** EMB veya Mac Conkey agardaki şüpheli tek bir koloniden iğne öze yardımıyla bir miktar alınır ve besiyerinin dik kısmına batırma ekimi yapılır. Daha sonra öze dip kısımdan çıkarılır ve besiyerinin yatay yüzeyine ekim yapılır.

Bir gecelik inkübasyon sonrası, TSI'deki renk değişimleri değerlendirilir.

**TSI'deki reaksiyonun değerlendirilmesi:**

Her üç şekeri de fermente eden basiller, *E. coli*, *Klebsiella* spp. *Enterobacter* spp. olabilir. Bu bakteriler besiyerinde bir gecelik inkübasyonu takiben yoğun asit üretimine bağlı olarak besiyerinin renginin tümüyle kırmızıdan sarıya değişmesine neden olurlar. Asit dip (sarı dip) / Asit yüzey (Sarı yüzey) (Şekil 1) (Tablo 1) ((Bkz B-TP-11).



Şekil 1: Bir gecelik inkübasyon sonrası *E.coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. v.b. bakterilerin TSI'de oluşturdukları renk değişimi

**c. Üre agarda üreaz üretimi (Bkz B-TP-22):**

Üreaz enzimi bulunan enterik basiller, amonyak üretimine bağlı olarak üre içeren besiyerinin pH'sını alkaliye çevirirler ve besiyerinin rengi indikatör (nötral red) sayesinde inkübasyon sonrası sarıdan pembeye değişir. *Klebsiella pneumoniae* üreaz pozitif / *E. coli* üreaz negatif tir (Tablo 1).

**d.İndol üretimi (Bkz B-TP-06)**

Triptofanaz enzimi bulunan gram negatif basiller (*E. coli* triptofonaz pozitif / *Klebsiella pneumoniae* triptofonaz negatif) sıvı besiyerinde triptofondan indol oluştururlar (Tablo 1).

**e. Metil kırmızısı ve Voges Proskauer testleri (MR-VP) (Bkz B-TP-06)**

Bu test tanımlanmak istenen gram negatif basilin glukoz fermentasyonu sonucu karışık asitler mi yoksa asetil metil karbinol mü oluşturduğunu ayırt etmek üzere yapılır.

*Escherichia coli* MR pozitif (karışık asit üretir)VP negatiftir. *Klebsiella pneumoniae* ise MR negative, VP pozitiftir (Tablo 1).

**f.Sitrat testi (Bkz B-TP-06)**

Gram negatif basillerin bazıları sodyum sitratı, karbon kaynağı olarak kullanabilirler. Tanımlanmak istenen mikroorganizmanın sitratı kullanıp kullanmadığını belirlemek üzere bu test yapılır.

Bir gecelik inkübasyon sonrası, eğer sitrat karbon kaynağı olarak kullanılmışsa besiyerinin rengi yeşilden koyu maviye değişir (alkali pH). *Klebsiella pneumoniae* sitrat pozitif; *Escherichia coli* negatiftir (Tablo 1).

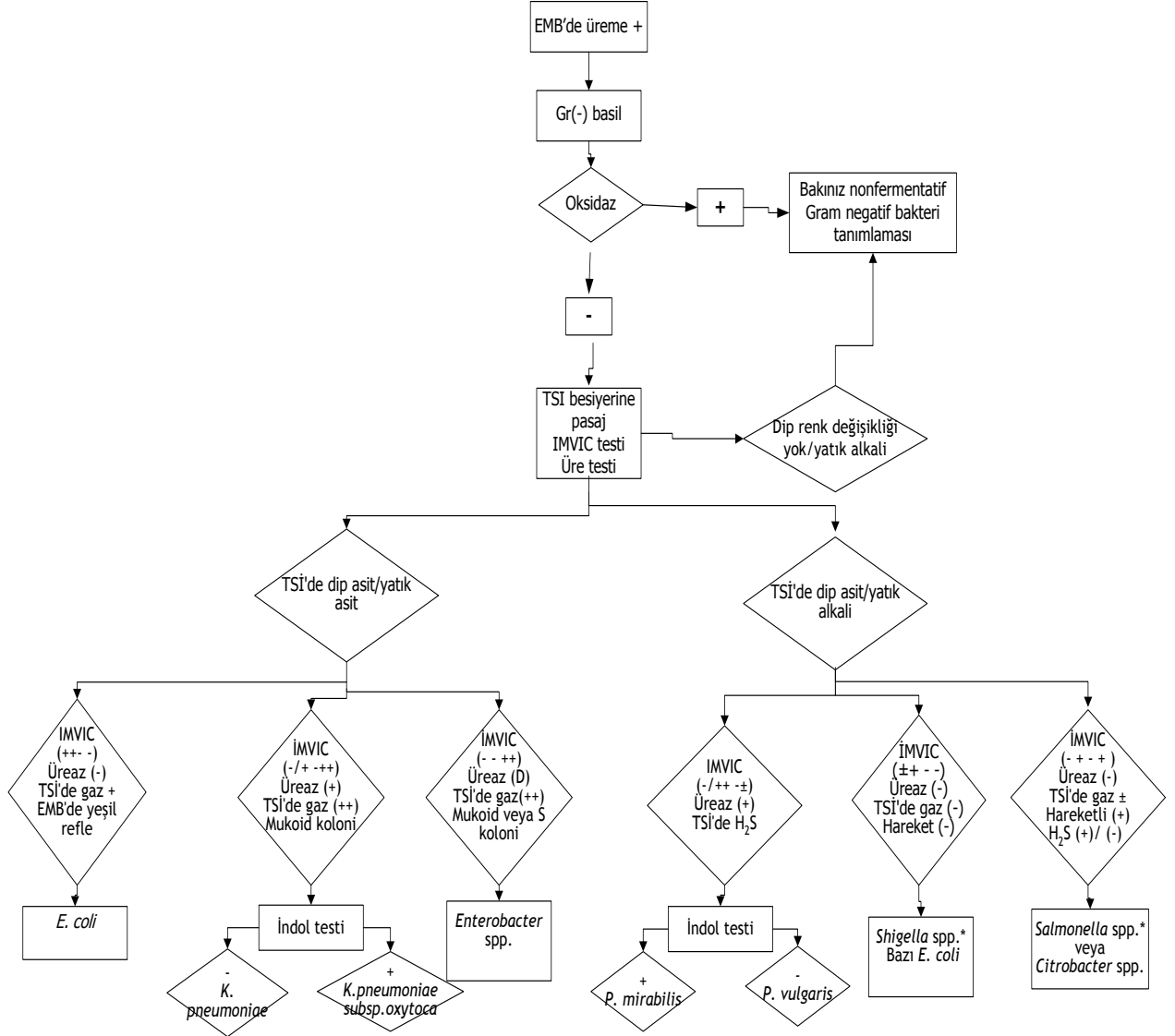
Tablo 1: Enterobacteriaceae üyesi bazı bakterilerin ve non-fermentatiflerden Pseudomonas spp.'nin karakteristik reaksiyonları

\* TSI reaksiyonları: A/A: asit dip/ asit yüzey \*\*TSI reaksiyonu: A/ALK: asit dip / alkali yüzey  
\*\*\*TSI reaksiyonu: ALK/ALK: alkali dip/ alkali yüzey

	TSI'de reaksiyon										
	Glukoz	Laktöz	Sükroz	Gaz	H <sub>2</sub> S	Ureaz	Indol	MR	VP	Sitrat	Motilite
<b><i>E.coli</i> A/A*</b>	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+
<b><i>Klebsiella</i> A/A</b>	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-
<b><i>Salmonella</i> A/ALK** (H<sub>2</sub>S)</b>	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
<b><i>Shigella</i> A/ALK</b>	+	-	-	-	-	-	+/-	+	-	-	-
<b><i>Proteus</i> A/ALK (H<sub>2</sub>S)</b>	+	-	-	+/-	+	+	+	+	-	-/+	+
<b><i>Pseudomonas</i> ALK/ALK***</b>	+	-	-	-	-	V	V	V	-	-	+

### 3.4 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması

Enterobacteriaceae tanımlama şeması aşağıda özetlenmiştir



### 3.5. Saklama, Referans merkeze gönderme

Karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae ve invazif izolatlar gibi, toplum ve hastane kökenli infeksiyonlar açısından önemli mikroorganizmaların stoklanması, klinisyen tarafından istenebilecek ve etkene yönelik yeni bir işlemin yapılmasını (örneğin antibiyotik MİK değerlerinin belirlenmesi gibi) sağlamaktadır. Bunun dışında özellikle hastane infeksiyonlarında geriye dönük salgın incelemesi ve moleküler tiplendirme yapılabilmesi için bakteriler 6 ay dondurularak saklanmaktadır.

#### Ön Hazırlıklar

#### Stok Besiyeri Hazırlanması:

Beyin Kalp İnfüzyon sıvı besiyeri

3.7 g

Distile su 100 mL

Önce besiyeri erlen içine konur üzerine distile su eklenir. İyice eritilir.

Sıvı besiyeri uygun sporlara dizilmiş 1,5 mL. lik mikrosantrifüj tüplerine 900 mikrolitre olacak şekilde dağıtılır. Tüplerin ağzı sıkıca kapatılır. Üstü alüminyum folyo ile kaplanıp birkaç yerden otoklav bandı ile tutturulur. Otoklavda 121°Cde 15 dakika tutularak steril edilir. Kullanmadan önce iyice soğuması beklenir.

Saklanması: Buzdolabında 8-10°Cde tutulur. Kullanılmadan önce oda ısısına gelmesi beklenir

### **Gliserol çözeltisi (%50)**

Gliserol (%87) 144 mL

Distile su 106 mL

121°C'de 15 dakika otoklavlanır. Oda ısısında saklanır.

#### **Uygulama basamakları:**

- Mikrosantrifüj tüpleri üzerine örneğe ait barkodlu etiket yapıştırılır.
- İzolatların stoklandığı mikrosantrifüj tüpleri kare kapaklı çok gözlü saklama kaplarına yerleştirilir. Bu kutuların kapaklarına ilk ve son örneğin tarihleri yazılır.
- Öze alev kaynağında yakılıp soğutulduktan sonra, istenilen koloni iğne uçlu öze ile alınır.
- Koloni mikrosantrifüj tüpündeki steril stok besiyerinin kenarında ezilir ve yavaş yavaş sıvı ile karıştırılır. Mikrosantrifüj tüplerinde 900 mikrolitre besiyeri bulunmaktadır.
- Ekim yapılan besiyeri bir gece etüvde (35°C) bekletilir. Bu basamak şart olmayıp bir üst basamakta 3-4 koloni kullanılarak bir sonraki basamağa geçilebilir.
- Mikrosantrifüj tüplerinin kapağı açılarak içine 100 mikrolitre %50lik gliserol eklenir. Bu işlem için steril pipet uçları kullanılmalıdır.
- Gliserol eklendikten sonra tüpler bekletilmeden derin dondurucuya (-80°C) kaldırılır. Altı ay saklanır.

**Önemli not:** Bakterilerin dondurulması için kullanılan gliserol bakteriler için toksiktir. Bu nedenle gliserol eklenir eklenmez bakterinin derin dondurucuya kalkması gerekir. Dolayısıyla gliserol ekleme işleminin derin dondurucunun yanında yapılması toplu yapılan stoklarda 5 mikrosantrifüj tüpüne gliserol eklenir eklenmez tüplerin derin dondurucuya kaldırılması gereklidir.

## 4. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz ve Karbapenemaz varlığının saptanması

### 4.1 Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz varlığının saptanması

#### Tanım

GSBL'ler oksimino- $\beta$ -laktamlar (sefuroksim, 3. ve 4. Kuşak sefalosporinler ve aztreonam) da dahil olmak üzere penisilinler ve sefalosporinlerin çoğunu hidrolize eden, ancak sefamisinler ve karbapenemleri etkilemeyen enzimlerdir (1-4,22). GSBL'lerin çoğu Ambler Sınıf A'da yer alır ve  $\beta$ -laktamaz inhibitörleri (klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam) ile inhibe olur.

#### Kapsam ve Amaç

Bu yönergede GSBL enzimlerini saptama yöntemleri ele alınmaktadır.

GSBL saptanması ve enzimlerin tanımlanması, (güncel EUCAST ve CLSI önerilerine göre) enfeksiyon kontrolü ve epidemiyolojik izlem açısından önem taşımaktadır (1-3).

GSBL varlığının saptanması halinde, duyarlılık test sonuçları değiştirilmemekte, ancak ilgili servis ve enfeksiyon kontrol ekibine mekanizma ve temas önlemleri konusunda -tercihan yazılı rapor halinde- bilgi verilmektedir.

Enterobacteriaceae üyelerinde GSBL saptanması açısından önerilen strateji, öncelikle oksimino- sefalosporinlere "duyarlı olmama" özelliğinin saptanması ile başlamakta, bunu takiben fenotipik (bazen genotipik) doğrulama testleri uygulanmaktadır

#### Test Uygulamaları

#### Tarama Testleri

GSBL tarama testleri için kullanılan antibiyotikler, disk içerikleri, zon çapları ve MİK değerleri aşağıdaki tabloda (Tablo 2) özetlenmiştir. Tarama testlerine göre şüpheli bulunan izolatlarda GSBL varlığı fenotipik doğrulama yöntemlerinden biri kullanılarak araştırılır.

Tablo 2: Enterobacteriaceae için GSBL tarama yöntemleri (2,3)

Antibiyotik	CLSI			EUCAST		
	Disk Difüzyon		Sıvı veya agar dilüsyon	Disk Difüzyon		Sıvı veya agar dilüsyon
	Disk İçeriği	Zon Çapı (mm)	MİK	Disk İçeriği	Zon Çapı (mm)	MİK
Sefpodoksım	10 $\mu$ g	$\leq 17$	4 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ g	<21	>1 $\mu$ g/ml
Seftazidim	30 $\mu$ g	$\leq 22$	1 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ g	<22	>1 $\mu$ g/ml
Aztreonam	30 $\mu$ g	$\leq 27$	1 $\mu$ g/ml	-	-	-
Sefotaksim	30 $\mu$ g	$\leq 27$	1 $\mu$ g/ml	5 $\mu$ g	<21	>1 $\mu$ g/ml
Seftriakson	30 $\mu$ g	$\leq 25$	1 $\mu$ g/ml	30 $\mu$ g	<23	-

## Doğrulama Testleri

### Fenotipik doğrulama testleri

GSBL aktivitesinin in vitro şartlarda klavulanik asit ile inhibisyonu temeline dayanan fenotipik yöntemlerden dördü GSBL doğrulaması için önerilmektedir. Bunlar; kombinasyon disk testi (KDT), çift disk sinerji testi (ÇDS), GSBL gradiyent testi (GT) ve sıvı mikrodilüsyon testidir (Tablo 3) (23,24,25). Bu testlerden KDT, çok merkezli bir çalışma sonucuna göre, GSBL gradiyent testiyle eşit duyarlılığa sahip, ancak bu teste kıyasla göre daha özgündür (26). Otomatize sistem üreticileri, duyarlılık test panellerine, GSBL'lerin klavulanik asit ile inhibisyonunu gösterecek şekilde, saptama testleri eklemiştir. Sonuçlar, suş koleksiyonuna ve kullanılan sisteme göre değişmektedir (27-29).

#### a) Kombinasyon Disk Testi (KDT)

Her test için sadece sefalosporin (sefotaksim, seftazidime, sefepim) içeren diskler ile aynı sefalosporinin klavulanik asit eklenmiş kombinasyon diskleri kullanılır. Her ikisinin inhibisyon zonları ölçülerek kıyaslanır. Eğer kombinasyon diski çevresindeki zon, tek başına sefalosporin içeren diskin inhibisyon zonunza kıyasla  $\geq 5$  mm daha genişse, test pozitifdir (Tablo 3) (30,31).

#### b) Çift Disk Sinerji Testi (ÇDST)

Sefalosporin (sefotaksim, seftazidime, sefepim) içeren diskler, plakta klavulanik asit içeren bir diskin (örneğin amoksisilin-klavulanik asit) yanına konur. Sefalosporin disklerinden herhangi birinin zon çapı klavulanik asit diskine bakan yüzünde genişlerse, test pozitif olarak değerlendirilir. Diskler arasındaki uzaklık, ÇDS testi başarısında belirleyicidir ve sefalosporin 30µg diskleri için optimal uzaklık 20 mm (merkezden merkeze) olarak belirlenmiştir. Ancak, çok yüksek veya düşük direnç düzeyleri söz konusu ise, bu uzaklık azaltılabilir (15 mm) veya arttırılabilir (30 mm) (23). Bu önerinin, EUCAST disk difüzyon yönteminde yer alan ve daha düşük ilaç konsantrasyonları içeren diskler için, tekrar gözden geçirilmesi gereklidir.

#### c) Gradyent testi

Gradyent testleri, üretici önerilerine göre uygulanır, değerlendirilir ve yorumlanır. Klavulanik asit ile kombine edildiğinde sefalosporin MİK değerinde  $\geq 8$  kat düşüş gözleniyorsa veya bir " hayalet zon" ("phantom zone") ya da elips şeklinde bozulma varsa (lütfen üretici önerilerindeki resimleri inceleyiniz), test pozitifdir (Tablo 3). MİK'in stripteki en yüksek değerden daha fazla olması nedeniyle MİK belirlenemiyor ve oran değerlendirilemiyorsa, test sonucu belirsizdir ("Indeterminate"). Diğer bütün durumlarda, test negatiftir. GSBL gradiyent testi sadece GSBL doğrulaması için kullanılmalıdır; MİK saptanması için güvenilir değildir.

#### d) Mikrodilüsyon

Sıvı mikrodilüsyon; sefotaksim, seftazidim ve sefepimin 0.125-512 mg/L arasındaki seri iki katlı dilüsyonlarını tek başlarına veya sabit konsantrasyonda (4mg/L) klavulanik asit ile birlikte içeren Mueller-Hinton sıvı besiyeri kullanılarak uygulanır. Klavulanik asit ile kombine edilen

sefalosporin MİK değeri, sefalosporin tek başına olduğunda ölçülen MİK değerinden  $\geq 8$  kat daha düşükse test pozitifdir. Diğer durumlarda test negatiftir.

e) Yorumlama sırasında dikkate alınacak hususlar

Sefotaksim indikatör sefalosporin olarak kullanıldığı GSBL doğrulama testlerinde, kromozomal K1 veya OXY- benzeri  $\beta$ -laktamazları aşırı üreten *Klebsiella oxytoca* izolatları yalancı pozitif sonuç verebilir (32). Yine klavulanik asit ile inhibe olan kromozomal  $\beta$ -laktamazlar üreten *Proteus vulgaris*, *Citrobacter koseri*, *Kluyvera spp* ve *C.sedlakii*, *C. farmeri* ve *C.amaloniticus* gibi *C.koseri* ile ilişkili bazı türlerde de benzer bir fenotip ile kaşılaşılabilir (33-34). Yalancı pozitifliğin olası nedenlerinden bir başkası da SHV-1, TEM-1 veya OXA-1-benzeri geniş spektrumlu  $\beta$ -laktamazlarının aşırı üretimi ile beraber geçirgenliğin bozulduğu durumlardır (28).

**Tablo 3.** GSBL tarama testinde pozitif olan *Enterobacteriaceae* (Tablo 2'ye bakınız) için GSBL doğrulama yöntemleri.

Yöntem	Antimikrobiyal ajan (disk içeriği)	GSBL doğrulama kriteri
<b>Etest GSBL stripleri</b>	Sefotaksim +/-klavulanik asit	MİK oranı $\geq 8$ veya elips şeklinde bozulma varsa
	Seftazidim +/-klavulanik asit	MİK oranı $\geq 8$ veya elips şeklinde bozulma varsa
<b>Kombinasyon disk difüzyon testi (KDT)</b>	Sefotaksim (30 $\mu$ g) +/-klavulanik asit (10 $\mu$ g)	İnhibisyon zonunda $\geq 5$ mm artış
	Seftazidim (30 $\mu$ g) +/-klavulanik asit (10 $\mu$ g)	İnhibisyon zonunda $\geq 5$ mm artış
<b>Sıvı mikrodilüsyon</b>	Sefotaksim +/-klavulanik asit (4mg/L)	MİK oranı $\geq 8$
	Seftazidim +/-klavulanik asit (4mg/L)	MİK oranı $\geq 8$
	Sefepim +/-klavulanik asit (4mg/L)	MİK oranı $\geq 8$
<b>Çift disk sinerji testi (ÇDS)</b>	Sefotaksim, seftazim, sefepim	İndikatör sefalosporin zonunun amoksisilin-klavulanik asit diskine doğru genişlemesi

### Sinerjiyi maskeleyen diğer $\beta$ -laktamazlar varlığında GSBL enzimlerinin fenotipik olarak saptanması

GSBL varlığını maskeleyen yüksek düzey AmpC üretimi olduğunda belirsiz (Etest) veya yalancı negatif (KDT, ÇDS, Etest ve mikrodilüsyon) test sonuçları alınabilir (23,35,36). Yüksek düzey AmpC üreten izolatlar, genellikle 3. Kuşak sefalosporinlere dirençlidir. Ayrıca sefamisin direnci (sefoksitin MİK  $> 8$  mg/L) de AmpC  $\beta$ -laktamazların yüksek düzey ekspresyonu için bir göstergedir (28). Sadece ACC  $\beta$ -laktamaz varlığında sefamisin direnci görülmeyebilir (37).

Yüksek düzey Amp C varlığında GSBL saptanması için, AmpC tarafından genellikle parçalanmayan sefepimin indikatör sefalosporin olarak kullanıldığı, ek bir doğrulama testi yapılması önerilmektedir. Sefepim, KDT, ÇDS, Etest ve sıvı



dilüsyon testlerinin tümünde kullanılabilir (32,38-40). Diğer yaklaşımlar arasında iyi bir AmpC inhibitörü olan kloksasilin kullanımı yer almaktadır. Bu amaçla, hem kloksasilin, hem de klavulanik asit eklenmiş indikatör sefalosporin (sefotaksim VE seftazidim) diskleri ile KDT uygulanır. Ayrıca agar içerisine kloksasilin eklenerek (200-250 mg/L) ÇDS veya standart KDT yapılabilir (23). Bunlar yanı sıra, klavulanik asit ve kloksasilin içeren diskler ticari olarak da bulunmaktadır, ancak henüz bunlarla çok merkezli değerlendirme çalışmaları yapılmamıştır.

GSBL'ler ayrıca MBL veya KPC ve/veya geçirgenlik ile ilgili defektlerin varlığında da maskelenebilir (41,42). OXA-48 ise normalde sefalosporinleri etkilemediği için, bu duruma yol açmaz. Bu durumda GSBL'lerin epidemiyolojik önemi sorgulanabilir çünkü karbapenemaz varlığı, halk sağlığı açısından daha önemlidir. Ancak yine de saptanmaları isteniyorsa moleküler yöntemler uygulanması önerilir. Sınıf D grubundan (OXA-tipi) GSBL'lerin klavulanik asit ile inhibe olmadığı, bu nedenle de yukarıda yer alan yöntemlerle saptanamayacağı da hatırla tutulmalıdır (7,23). Bu enzimler günümüzde Enterobacteriaceae üyelerinde nadir olarak bulunmaktadır.

### Genotipik doğrulama

GSBL genlerinin genotipik olarak tanımlanması, PZR ve GSBL gen dizi analizi basamaklarını içermektedir (3). Bunlar yanı sıra, bir DNA mikroarray –temelli yöntem de kullanılabilir. Check-KPC GSBL mikroarray (Check-Points, Wageningen, Hollanda) ve bilinen GSBLlerin çoğunu kapsayan bir suş koleksiyonu ile yapılan yakın zamanlı değerlendirme çalışmalarında yöntemin performansı başarılı bulunmuştur (43-47). Bu yöntem ile test sonuçları genellikle 24 saat içinde tamamlanmaktadır. Ancak, sporadik gruptan bazı GSBL'ler ile yeni GSBL'lerin bu yöntem ile saptanamayacağı hatırla tutulmalıdır.

CTX-M, TEM ve SHV GSBL genlerinin PZR yöntemi ile saptanmasında kullanılan primerler ve reaksiyon koşulları ile ilgili bir örnek, EK-2'de yer almaktadır.

### Kalite kontrolü

**Tablo 4.** GSBL saptama yöntemlerinin kalite kontrolü amacıyla kullanılan uygun suşlar ve beklenen test sonuçları (1)

Antibiyotik	Disk	Negatif kontrol <i>E.coli</i> ATCC 25922		Pozitif kontrol <i>K.pneumoniae</i> ATCC 700603	
		Zon çapı	MİK	Zon çapı	MİK
Sefpodoksim	10 µg	23-28	0.25-1	9-16	≥8
Seftazidim	30 µg	25-32	0,06-0,5	10-18	≥2
Aztreonam	30 µg	28-36	0.06-0.25	9-27	≥2
Sefotaksim	30 µg	29*35	0.12-0.5	17-25	≥2
Seftriakson	30 µg	29-35	0,03-0.12	16-24	≥2
Seftazidim / klavulanik asit	30/10 µg	≤2 mm artış	MİK'te < 3 dilüsyon azalma	≥5 mm artış	MİK'te ≥ 3 dilüsyon azalama
Sefotaksim/	30/10 µg	≤2 mm artış	MİK'te < 3 dilüsyon	≥3 mm artış	MİK'te ≥ 3 dilüsyon

klavulanik asit	azalma	azalama
-----------------	--------	---------

## Kullanılan malzeme

**Tablo 5.** GSBL saptama testlerinde gerekli malzeme

Antibiyotikler	Antibiyotik Diskleri	Disk içeriği	Gradient Test Stripleri	Besiyeri	Diğer
<b>Sefpodoksim</b>	Sefpodoksim	10 µg		MHA	Kumpas
<b>Seftazidim</b>	Seftazidim	30 µg, 10 µg	Seftazidim	CAMHB	Mikrodilüsyon plakları
<b>Aztreonam</b>	Aztreonam	30 µg	Aztreonam		Otomatik pipetör
<b>Sefotaksim</b>	Sefotaksim	30 µg, 5 µg	Sefotaksim		Steril pipet ucu
<b>Seftriakson</b>	Seftriakson	30 µg	Seftriakson		Steril Tüp
<b>Klavulanik asit</b>	Seftazidim / klavulanik asit	30 /10 µg	Seftazidim / klavulanik asit		SF
	Sefotaksim/ klavulanik asit	30 /10 µg	Sefotaksim/ klavulanik asit		Öze
					Eküvyon

## Raporlama

*E.coli* ve *K. pneumoniae* dahil olmak üzere Enterobacteriaceae üyelerinde GSBL varlığının saptanması, epidemiyolojik izlem ve enfeksiyon kontrolü için önem taşımaktadır. Ayrıca, GSBL üreten bakterilerin çoklu dirençli olmaları nedeniyle, hastalarda mortalite ve morbidite artışı olmaktadır. Bunlar yanısıra, toplumdaki bireylere ve çevreye yayılım eğilimine ilişkin kanıtlar bulunmaktadır.

Güncel önerilere göre, GSBL varlığından etkilenen antibiyotiklerin (oksiimino sefalosporinler ve aztreonam) duyarlılık sonuçları, değiştirilmeden, bulunduğu gibi verilir. Ancak, klinik kanıtlar tam olarak oluşuncaya kadar, raporda tedavi başarısı açısından izlem yapılmasına ilişkin bir not yer alabilir.

Mekanizmanın saptandığı izolatlar ile ilgili olarak hastane enfeksiyon kontrol ekibi ve ilgili servis/hekim, tercihan yazılı rapor ile uyarılır. Raporda saptanan mekanizma ile "hastaya temas önlemleri uygulanması" notu yer almalıdır: "Genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz üreten suştur. Hastaya temas önlemleri uygulanması önerilir. Tedavide 3. veya 4. Kuşak sefalosporinlerin kullanılması durumunda, hasta tedavi başarısı açısından izlenmelidir" gibi.

## Kısıtlılıklar

GSBL varlığı, aynı suşun AmpC ve/veya karbapenemaz üretmesi halinde maskelenmektedir. Bunun için yukarıdaki bölümlerdeki test modifikasyonlarının uygulanması gerekir

AmpC ve porin mutasyonlarının birlikte olması halinde 3. Kuşak sefalosporinlere

direnc görülebilir. Bu durum tek başına GSBL varlığı olarak yorumlanmamalıdır.

Genotipik testler uygulanması halinde; TEM ve SHV grubunda, aynı polimeraz zincir tepkimesi yöntemleri GSBL dışı enzim varyantlarını da saptamaktadır. Bu nedenle PZT testinde pozitif bant görülmesi halinde, sonuçlar mutlaka dizi analizi ve BLAST veri tabanı ile ulaşılan dizilerin hizalanması ile doğrulanmalıdır.

## 4.2 Karbapenemaz varlığının saptanması

### Tanım

Karbapenemazlar; penisilinleri, çoğu zaman sefalosporinleri ve değişen derecelerde olmak üzere karbapenemleri ve monobaktamları hidrolize eden beta-laktamazlardır. Enterobacteriaceae üyelerinin karbapenemleri hidrolize eden beta-laktamazları; sınıf A,B (metallo-b-laktamazlar), D(OXA grubu karbapenemazlar) içinde yer alabilirler (12,13,17). Monobaktamlar, metallo-beta-laktamazlar tarafından parçalanmazlar.

Karbapenemazlar, tüm beta-laktamlara dirence yol açmaları nedeniyle bir endişe kaynağı oluşturmaktadır, çünkü karbapenemaz üreten suşlar genellikle diğer direnc mekanizmalarını da taşıdıkları için çoklu dirençlidirler ve karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae enfeksiyonları yüksek mortalite hızları ile ilişkilidir (14-16,48).

### Kapsam ve Amaç

Bu yönergede karbapenemaz varlığını saptama yöntemleri ele alınmaktadır.

Karbapenemaz saptanması ve mekanizmanın tanımlanması, (güncel EUCAST ve CLSI önerilerine göre) enfeksiyon kontrolü ve epidemiyolojik izlem açısından önem taşımaktadır(1-3). Bir başka deyişle, karbapenemaz varlığının saptanması halinde, duyarlılık test sonuçları değiştirilmemekte, ancak ilgili servis ve enfeksiyon kontrol ekibine mekanizma ve temas önlemleri konusunda -tercihan yazılı rapor halinde- bilgi verilmektedir.

Enterobacteriaceae üyelerinde karbapenemaz saptanması açısından önerilen strateji, öncelikle karbapenem grubu antibiyotiklere "duyarlı olmama" özelliğinin saptanması ile başlamakta, bunu takiben fenotipik (bazen genotipik) doğrulama testleri uygulanmaktadır.

Karbapenemaz üreten izolatların çoğu genişlemiş spektrumlu (oksimino) sefalosporinlere de dirençlidir (49) Bazı enzimlerin varlığında (ör OXA-48 benzeri enzimler), bakteri sefalosporinlere duyarlı da olabilir. Ancak, bu izolatların çoğu aynı zamanda CTX-Mler gibi bir sefalosporin-hidrolize eden bir enzim de ürettiğinden, sıklıkla sefalosporin direnci izlenir. Karbapenemazların, özellikle de karbapenemlerden (imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem) birine duyarlılıkta azalmaya neden olmuşsa, epidemiyolojik açıdan yüksek önem taşıdığı kabul edilir (50).

### Tarama Testleri

GSBL'lerde olduğu gibi karbapenemaz taranması için bazı eşik değerler bulunmaktadır. Bu amaçla özellikle EUCAST ECOFF değerlerinin ve antibiyotik olarak da meropenem kullanılması önerilmektedir (50-54). Ertapenemin

duyarlılığı yüksek ancak özgüllüğü düşüktür. Bu antibiyotik, porin mutasyonları varlığında GSBL ve AmpC tipi enzimlere göreceli olarak duyarlı olduğu için, bu durum özellikle *Enterobacter* spp'de belirgindir (51). CLSI ve EUCAST standartlarına göre karbapenemaz taranması için uygun eşik değerler Tablo-6'da gösterilmiştir. Özgüllüğü arttırmak için, imipenem ve ertapenem eşik değerleri, ECOFF'larından bir dilüsyon yüksektir.

**Tablo-6** Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* için tarama eşik değerleri(1-3)

Antibiyotik	CLSI			EUCAST		
	Disk Difüzyon		Sıvı veya agar dilüsyon	Disk Difüzyon		Sıvı veya agar dilüsyon
	Disk İçeriği	Zon Çapı (mm)	MİK	Disk İçeriği	Zon Çapı (mm)	MİK
Meropenem <sup>1</sup>	10 µg	≤23	1 µg/ml	10 µg	<25 <sup>2</sup>	> 0.12
İmipenem <sup>3</sup>	10 µg	≤23	1 µg/ml	10 µg	<23	>1
Ertapenem <sup>4</sup>	10 µg	≤22	0,5 µg/ml	10 µg	<25 <sup>2</sup>	> 0.12
Doripenem	10 µg	≤23	1 µg/ml	-	-	-

<sup>1</sup>Duyarlılık ve özgüllük dengesi en iyi olan

<sup>2</sup>Bazı durumlarda OXA-48 üreten izolatlar için zon çapı 26 mm'ye kadar ulaşabilmektedir. Bu nedenle, OXA-48 üreten *Enterobacteriaceae* salgınlarında, özgüllükte düşüş göze alınarak <27 mm tarama eşik değeri olarak kullanılabilir.

<sup>3</sup>İmipenem ile sokak tipi (Wild type;WT) ve karbapenemaz üreticileri arasındaki ayrımı göreceli olarak zayıftır. Bu nedenle imipenemin tek tarama bileşiği olarak kullanılması, önerilmemektedir.

<sup>4</sup>Yüksek duyarlılık ancak düşük özgüllük, bu nedenle rutin tanımlama için önerilmemektedir.

## Fenotipik doğrulama yöntemleri

Rutin duyarlılık testlerinde, karbapenemlere duyarlılıkta azalma saptandığında, karbapenemazların saptanması için fenotipik yöntemler uygulanmalıdır.

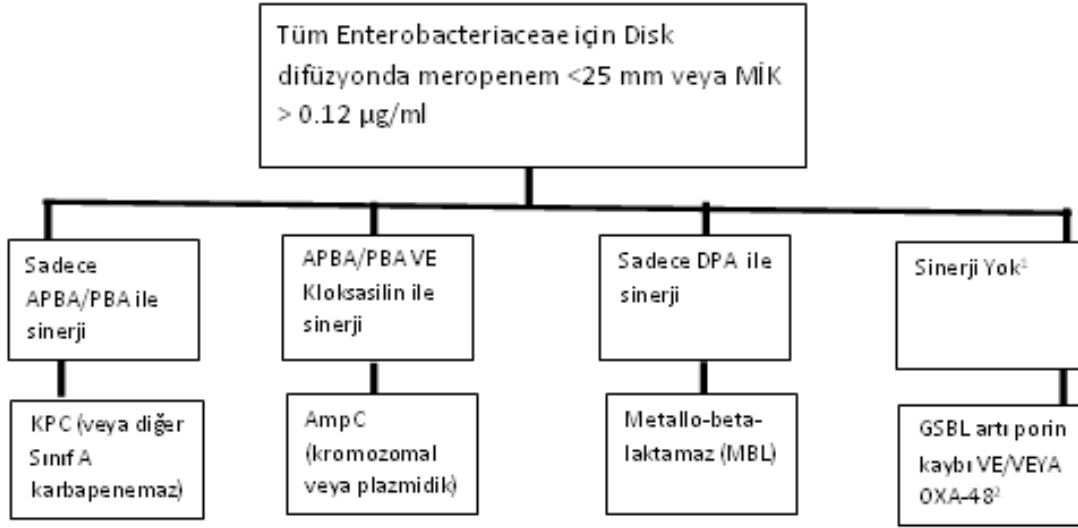
Kombinasyon disk yöntemi, çeşitli çalışmalarla valide edilmiş olması ve ticari olarak bulunabilmesi ( Mast, ROSCO) gibi avantajlara sahiptir. Diskler veya tabletler meropenem yanı sıra, 2.4.3 bölümünde belirtilen çeşitli inhibitörleri içerirler. Kısaca, bu inhibitörlerden boronik asit sınıf A karbapenemazları inhibe ederken, dipikolinik asit sınıf B karbapenemazları inhibe eder. Sınıf D karbapenemazlar için kullanılan bir inhibitör bulunmamaktadır. Kloksasilin testlere aşırı AmpC üretimi ve porin kaybı birlikteliği ile ortaya çıkan karbapenem direnci ile karbapenemaz üretiminin ayrılması amacıyla eklenir.

### *Kombinasyon disklerinin hazırlanması(55)*

Meropenem diskleri üzerine 100 mg/L dipikolinik asit (DPA) , 0.2 M EDTA, 60 mg/ml aminofenil boronik asit (APBA) ve 75 mg/L kloksasilin solüsyonundan 10'ar µl damlatılarak hazırlanır. DPA, dimetil sülfoksit içinde, EDTA, APBA ve kloksasilin steril distile suda eritilir. Diskler kullanılmadan önce 30 dakika oda ısısında kurutulur.

0.5 McFarland standardına göre hazırlanan inokulum Mueller Hinton agar plaklarına yayılıp üzerine biri inhibitör içeren ve içermeyen meropenem disklerinden birer adet (toplam beş disk) konur. Bir gece inkübasyon sonrası zon çapları değerlendirilir.

İnhibitör testlerinin yorumlanması ile ilgili akış şeması Şekil-2'de, değerlendirme kriterleri ise Tablo-7'de görülmektedir. Bu yöntemlerle ilgili temel dezavantaj, yapılması için 18 saat (pratikte bir gecelik inkübasyon) gerekmesidir. Bu nedenle de yeni hızlı yöntem arayışları sürmektedir.



Şekil-2

Kısaltmalar: APBA=Aminofenil boronik asit, PBA= fenil boronik asit, DPA= Dipikolinik asit (tümü kombinasyon diski testlerinde, meropenem içeren disk veya tabletlere eklenen β-laktamaz inhibitörleridir)

<sup>1</sup>KPC ve MBL birlikteliği de sinerji görülmesine neden olur. Normal olarak bu izolatların karbapenemlere yüksek düzeyde dirençlidir. En kolay moleküler yöntemlerle saptanırlar. <sup>2</sup>Yüksek düzey temosilin direnci (MIC > 32 mg/L (12,18) veya temosilin diski (30µg) ile ≤10 mm zon (58), OXA-48 için fenotipik belirleyicidir.

## Fenotipik saptama yöntemlerinin yorumlanması

**Tablo 7**'de belirtilen akış şemasında metallo-beta-laktamazlar, sınıf A karbapenemazlar, sınıf D karbapenemazlar ve karbapenemaz dışı mekanizmalar ayırt edilmektedir. Testler, güç üreyenler dışındaki bakteriler için EUCAST disk difüzyon yöntemi kullanılarak yapılabilir (55-57). Bu amaçla kullanılacak diskler (Mast, Birleşik Krallık) ve tabletler (Rosco, Danimarka) ticari olarak bulunmaktadır. Testler üretici önerilerine uyularak uygulanmalıdır.

Günümüzde OXA-48 benzeri enzimler için herhangi bir inhibitör bulunmamaktadır. Temosiline yüksek düzey direnç (MİK>32 mg/L) OXA-48 üreten suşlar için bir fenotipik belirleyici olarak önerilmiştir (52,57,58). Buna karşın, diğer direnç mekanizmaları da benzer fenotipe yol açabildiği için, temosilin direnci OXA-48 – tipi karbapenemazlara özgül değildir. Bu nedenle de OXA-48 varlığı genotipik yöntemlerle doğrulanmalıdır.

Modifiye Hodge Testi (Yonca yaprağı testi), hem sonuçların yorumunun zor olması hem de duyarlılık ve özgüllüğünün düşük olması nedeniyle, önerilmemektedir (51). Bu test için de bazı yeni değişiklikler önerilmişse de, bunların rutinde uygulanması zor ve zaman alıcıdır; ayrıca duyarlılık ve özgüllük ile ilgili tüm problemler de çözülmemektedir.

**Tablo-7** Disk veya tabletlerle uygulanan fenotipik testlerin yorumu (karbapenemazlar **kyu font** ile yazılmıştır)

B-laktamaz	Meropenem (10µg) disk/tableti ile zon çapında artış (mm)				Temosilin MİK>32mg/L
	DPA/EDTA	APBA/PBA	DPA+APBA	CLX	
MBL	≥ 5	-	-	-	Uygulanmaz <sup>1</sup>
KPC	-	≥4	-	-	Uygulanmaz <sup>1</sup>
MBL+KPC <sup>2</sup>			≥5		Uygulanmaz <sup>1</sup>
OXA-48-benzeri	-	-	-	-	Evet
<b>AmpC+porin kaybı</b>	-	≥4	-	≥5	Uygulanmaz <sup>1</sup>
<b>GSBL+porin kaybı</b>	-	-	-	-	Hayır

Kısaltmalar: MBL= Metallo-β-laktamaz, KPC= *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase, DPA= Dipikolinik asit, EDTA= Etilendiamintetraasetik asit, APBA= aminofenil boronik asit, PBA=fenil boronik asit, CLX= kloksasilin

<sup>1</sup>Temosilin sadece hiçbir sinerjinin gözlenmediği durumlarda OXA-48 üretimi ile GSBL+porin kaybının ayırt edilmesinde önerilir.  
<sup>2</sup>İki inhibitörü (DPA veya EDTA +APBA/PBA) bir arada içeren tabletlerin kullanıldığı sadece bir yayın bulunmaktadır., ancak halen çok merkezli çalışmalar veya tek merkezde yapılmış çok sayıda çalışma sonuçları eksiktir.Bu fenotip Yunanistan dışında nadirdir ve karbapenemlere yüksek düzey direnç yol açar.

## Carba NP Testi

Bu testin çalışma prensibi, karbapenem hidrolizinin pH değişimine yol açması ve bunun sonucunda fenol kırmızısı solüsyonunun renk değiştirmesidir ( test pozitifse kırmızıdan sarıya döner) (59,60). Carba NP testinin yöntem onayı (validasyon basamağı) Mueller Hinton agar, kanlı agar, triptikaz soya agar ve karbapenemaz tarama besiyerlerinin çoğunda üretilmiş koloniler ile yapılmıştır. Carba NP testi, Drigalski ve McConkey agar plaklarında üretilmiş kolonilerde uygulanamaz. Tekrarlanabilir sonuçlar alınabilmesi için, yöntem basamakları ile ilgili detaylar dikkatle izlenmeli ve uygulanmalıdır.

## Genotipik doğrulama

Tanımlama da kullanılan PZR tabanlı genotipik yöntemler de bildirilmiştir (61). Ancak bu yöntemlerin yeni β-laktamazları tanımlayamama veya rutin için pahalı olma gibi dezavantajları bulunmaktadır (51).

Geliştirilmekte olan ticari DNA mikroarray yöntemleri bu tip testlerin kullanıcı dostu olma özelliğini arttırabilirse de genotipik yöntemlerin genel kısıtlılıkları bunlar için de geçerlidir (62). Sürveyans için mutlak gerekli olmamakla birlikte, en azından referans laboratuvarlarının genotipik doğrulama yöntemlerini uygulayabilir olması, önerilir.

OXA-48, IMP, VIM, KPC ve NDM GSBL genlerinin PZR yöntemi ile saptanmasında kullanılan primerler ve reaksiyon koşulları EK-5'de yer almaktadır.

## Kalite kontrol

**Tablo 8.** Karbapenemaz testi için uygun kontrol suşları

Suş	Mekanizma
<i>Enterobacter cloacae</i> CCUG 59627	AmpC ve azalmış porin ekspresyonu
<i>Enterobacter cloacae</i> CCUG 58547	Metallo- $\beta$ -laktamaz (VIM)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 13440	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 13443	Metallo- $\beta$ -laktamaz (NDM-1)
<i>E.coli</i> NCTC 13476	Metallo- $\beta$ -laktamaz (IMP)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCUG 56233	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase (KPC)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 13438	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 13442	OXA-48
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 25955	Negatif kontrol

## Raporlama

Karbapenemaz varlığının saptanması, epidemiyolojik izlem ve enfeksiyon kontrolü için önem taşımaktadır. Karbapenemaz üreten izolatların çoklu dirençli olması nedeniyle hastalarda mortalite ve morbidite artışı görülmektedir. Ayrıca, NDM-1 örneğinde olduğu gibi toplumdaki bireylere ve çevreye yayılıma ilişkin kanıtlar bulunmaktadır. Bu nedenle, saptanmaları enfeksiyon kontrolü açısından ACİL bir durumdur ve ilgili klinik ile enfeksiyon kontrol ekibinin uyarılması kritik önem taşır.

Güncel önerilere göre karbapenemlerin duyarlılık sonuçları, değiştirilmeden, bulunduğu gibi verilir. Ancak, mekanizmanın saptandığı izolatlar ile ilgili olarak hastane enfeksiyon kontrol ekibi ve ilgili servis/hekim, tercihan yazılı rapor ile uyarılır. Raporda saptanan mekanizma ile "hastaya temas önlemleri uygulanması" notu yer almalıdır. Örneğin, "Karbapenemaz üreten suştur. Hastaya temas önlemleri uygulanması önerilir" vb.

Karbapenemaz üretimi laboratuvar "Kritik Değerler Listesi"nde yer almalıdır.

## Kısıtlılıklar

- Karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae üyelerinde karbapenem MİK'leri klinik sınır değerlerin altında olabilir (50,51,53). Ancak, EUCAST tarafından belirlenen ECOFF değerleri karbapenemaz üreticilerinin saptanması için kullanılabilir.
- Meropenem, karbapenemaz üreticilerinin saptanmasında duyarlılık ve özgüllük dengesi açısından en iyi ajandır (51,54). Ertapenem duyarlılık açısından mükemmel olmakla birlikte, özgüllüğü düşüktür. Bu antibiyotik, porin mutasyonları varlığında GSBL ve AmpC tipi enzimlerden etkilendiği için, karbapenemaz bulunmasa da, bu mekanizmalar varlığında azalmış duyarlılık veya direnç görülebilmektedir.
- Ülkemizde özellikle *Klebsiella pneumoniae*'de en yaygın karbapenemaz olan OXA-48 enziminin fenotipik yöntemlerle saptanması için uygun bir inhibitör madde halen bildirilmemiştir. Temosiline yüksek düzey direnç

(MİK>32 mg/L) OXA-48 üreten suşlar için bir fenotipik belirleyici olarak önerilmekle beraber, diğer direnç mekanizmaları da benzer fenotipe yol açabildiği için, temosilin direnci OXA-48 -tipi karbapenemazlara özgül değildir. Bu nedenle de OXA-48 varlığı genotipik yöntemlerle doğrulanmalıdır.

- Modifiye Hodge Testi (Yonca yaprağı testi), hem sonuçların yorumunun zor olması, hem de duyarlılık ve özgüllüğünün düşük olması nedeniyle, önerilmemektedir (51).
- Fenotipik saptama için kullanılabilecek ticari disk ve şeritler bulunmakla birlikte, ülkemizde halen bunlardan bir kısmına (Mast, Rosco), ulaşılamamaktadır. Bununla ilgili olarak THSK ilgili rehber güncellemeleri izlenmelidir
- Genotipik testler hızlı olmakla birlikte, pahalıdır ve özel teknik donanım ile yetişmiş personel gerekmektedir. Halen rutinde uygulanabilecek, tüm karbapenemazları tanımlayabilecek, maliyet etkin ve kullanıcı dostu bir ticari yöntem bulunmamaktadır.

## Kullanılan malzeme

**Tablo 9.** Karbapenemaz saptama testlerinde kullanılan malzemeler

Antibiyotikler	Antibiyotik Diskleri	Disk içeriği	Gradient Test Stripleri	Besiyeri	Diğer
<b>Meropenem</b>	Meropenem	10 µg	Meropenem	MHA	Kumpas
<b>İmipenem</b>	İmipenem	10 µg	İmipenem	CAMHB	Mikrodilüsyon plakları
<b>Ertapenem</b>	Ertapenem	10 µg	Ertapenem		Otomatik pipetör
<b>Doripenem</b>	Doripenem	10 µg	Doripenem		Steril pipet ucu
İnhibitörler	MEM+EDTA	730 µg *	Imipenem + EDTA		Steril Tüp
	MEM+ Dipikolinik Asit	1000 µg*			SF
	MEM +Aminofenil boronik asit	600 µg* (fenil boronik asit ise 400 µg*)			Öze
	MEM+ Kloksasilin	750 µg*			Eküvyon

\* Meropenem (MEM) diskinde bulunan son inhibitör konsantrasyonu



## 5 Raporlama

*E.coli* ve *K. pneumoniae* dahil olmak üzere Enterobacteriaceae üyelerinde GSBL ve karbapenemaz varlığının saptanması, epidemiyolojik izlem ve enfeksiyon kontrolü için önem taşımaktadır. Ayrıca, her iki enzim grubu ile ilgili olarak çoklu direnç, hastalarda mortalite ve morbidite artışı, toplumdaki bireylere ve çevreye yayılıma ilişkin kanıtlar bulunmaktadır.

Güncel önerilere göre her iki enzim grubundan etkilenen antibiyotiklerin duyarlılık sonuçları, değiştirilmeden, bulunduğu gibi verilir. Ancak, mekanizmanın saptandığı izolatlar ile ilgili olarak hastane enfeksiyon kontrol ekibi ve ilgili servis/hekim, tercihan yazılı rapor ile uyarılır. Raporda saptanan mekanizma ile "hastaya temas önlemleri uygulanması" notu yer almalıdır. Örneğin, "Karbapenemaz üreten suştur. Hastaya temas önlemleri uygulanması önerilir"vb.

## 6 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

İlgili başlıklar altında olası sorunlar ve çözüm önerileri yer almaktadır. Lütfen ilgili belge kısımlarına bakınız.

## Ekler

### Ek-1:CLSI önerilerine göre *Enterobacteriaceae* türlerinde GSBL'lar için Tarama, Doğrulama Testleri ve Kalite Kontrol Önerileri (M100-S23)

**Not: Henüz EUCAST önerilerine geçiş yapmamış laboratuvarlar için**

Sefalosporinler (sefazolin, sefotaksim, seftazidim, seftizoksim ve seftriakson) ve aztreonam için PK-PD özellikleri ve sınırlı klinik verilerin değerlendirilmesi sonucu yenilenmiş yorumlama kriterleri ilk önce Ocak 2010 (M100-S20) da yayımlanmıştır ve bu tabloda verilmektedir. Yeni yorumlama kriterleri kullanılırken, sonuçları bildirmeden önce rutin olarak GSBL testi yapılmasına artık gerek yoktur (yani, sefalosporinler, aztreonam veya penisilinler için sonuçları duyarlıdan dirençliye değiştirmeye gerek yoktur). Buna karşın laboratuvarlar yeni yorumlama kriterlerini kullanmaya başlayana kadar bu tabloda tanımlandığı gibi GSBL testi uygulanmalıdır. GSBL testi epidemiyoloji ve enfeksiyon kontrol amaçları için hala kullanışlı olabilir.

Test	İlk Tarama Testi		Fenotipik Doğrulama Testi		
<b>Test Yönt.</b>	Disk Difüzyon	Sıvı Mikrodilüsyon	Disk Difüzyon	<b>Sıvı Mikrodilüsyon</b>	
<b>Besiyeri</b>	Mueller-Hinton Agar	CAMHB	Mueller-Hinton Agar	CAMHB	
<b>Antimikrobik Konsantrasyonu</b>	<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>E. coli</i> için	<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>E. coli</i>	Seftazidim 30 µg Seftazidim/klavulanik asit 30 /10 µg	Seftazidim 0.25-128 µg /ml Seftazidim / klavulanik asit	
	Sefpodoksim 10 µg veya Seftazidim 30 µg veya Aztreonam 30 µg veya Sefotaksim 30 µg veya Seftriakson 30 µg	Sefpodoksim 4 µg /ml veya Seftazidim 1 µg /ml veya Aztreonam 1 µg /ml veya Sefotaksim 1 µg /ml veya Seftriakson 1 µg /ml	ve	0.25/4-128/4 µg /ml Sefotaksim 0.25-128 µg /ml	
	<i>P.mirabilis</i> için: Sefpodoksim 10 µg veya Seftazidim 30 µg veya Sefotaksim 30 µg	<i>P.mirabilis</i> için: Sefpodoksim 4 µg /ml veya Seftazidim 1 µg /ml veya Sefotaksim 1 µg /ml	Sefotaksim 30 µg Sefotaksim/klavulanik asit 30 /10 µg	Sefotaksim / klavulanik asit 0.25/4-128/4 µg /ml	
	(Tarama için birden fazla antimikrobik ilaç kullanılması testin duyarlılığını artırır)	(Tarama için birden fazla antimikrobik ilaç kullanılması testin duyarlılığını artırır)	Doğrulama testinde hem sefotaksim hem de seftazidim tek başına ve klavulanik asit ile birlikte test edilmelidir)	Doğrulama testinde hem sefotaksim hem de seftazidim tek başına ve klavulanik asit ile birlikte test edilmelidir)	
	<b>İnokulum</b>	Standart disk difüzyon önerileri	Standart sıvı dilüsyon önerileri	Standart disk difüzyon önerileri	Standart sıvı dilüsyon önerileri
	<b>İnkübasyon koşulları</b>	35±2 C°, normal atmosfer	35±2 C°, normal atmosfer	35±2 C°, normal atmosfer	35±2 C°, normal atmosfer
	<b>İnkübasyon süresi</b>	16-18 saat	16-20 Saat	16-18 saat	16-20 Saat
	<b>Sonuçlar</b>	<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>E. coli</i> için Sefpodoksim zonu ≤ 17 mm Seftazidim zonu ≤ 22 mm Aztreonam zonu ≤ 27mm Sefotaksim zonu ≤ 27mm Seftriakson zonu ≤ 25mm	Tarama konsantrasyonlarında veya daha yüksek konsantrasyonlarda üreme GSBL üretimini gösterebilir. (Örneğin <i>E. coli</i> , <i>K.pneumoniae</i> ve <i>K.oxytoca</i> 'da sefpodoksim için MİK ≥ 8 µg /ml veya seftazidim, aztreonam, sefotaksim ve seftriakson için MİK ≥ 2 µg /ml; <i>P. mirabilis</i> 'te sefpodoksim, sefotaksim veya seftazidim MİK ≥ 2 µg /ml)	Test edilen antimikrobik ilaçlardan birinin zon çapının klavulanik asit ile birlikte test edildiğinde tek başına test edilmesine göre ≥ 5 mm artması=GSBL (örneğin; seftazidim zonu=16; Seftazidim / klavulanik asit zonu= 21)	Test edilen antimikrobik ilaçlardan birinin klavulanik asit ile birlikte test edildiğindeki MİK değerine göre ≥ 3 dilüsyon azalması=GSBL (örneğin; seftazidim MİK =8; Seftazidim / klavulanik asit MİK =1)

(Devam)

Test	İlk Tarama Testi		Fenotipik Doğrulama Testi	
Test Yöntemi	Disk Difüzyon	Sıvı Mikrodilüsyon	Disk Difüzyon	Sıvı Mikrodilüsyon
<b>Bildirim</b>			<p>GSBL ürettiği kesinleşen tüm suşlarda: Eğer laboratuvarlar sefalosporin ve aztreonam için yeni yorumlama kriterlerini yorumlamaya başlamadılar ise test yorumu tüm penisilinlere, sefalosporinlere ve aztreonama dirençli olarak bildirilmelidir.</p> <p>Eğer laboratuvarlar sefalosporin ve aztreonam için yeni yorumlama kriterlerini uyguluyor ise test yorumlarını değerlendirmeye gerek yoktur.</p>	
<b>KK Önerileri</b>	<p>GSBL tarama testi yapılırken <i>K.pneumoniae</i> ATCC 700603 kalite değerlendirmesi için (örneğin; eğitim, yeterlilik veya test değerlendirmesi) kullanılır. Bundan sonra rutinde <i>K.pneumoniae</i> ATCC 700603 ve <i>E.coli</i> ATCC 25922 KK için (haftalık veya günlük) kullanılmaktadır.</p> <p><i>E.coli</i> ATCC 25922 (M100-S23 Tablo 3 A'daki kontrol sınırlarına bkz.)</p> <p><i>K.pneumoniae</i> ATCC 700603: Sefpodoksim zonu 9-16mm Seftazidim zonu 10-18 mm Aztreonam zonu 9-17 mm Sefotaksim zonu 17-25 mm Seftriakson zonu 16-24 mm</p>	<p>GSBL tarama testi yapılırken <i>K.pneumoniae</i> ATCC 700603 kalite değerlendirmesi için (örneğin; eğitim, yeterlilik veya test değerlendirmesi) kullanılır. Bundan sonra rutinde <i>K.pneumoniae</i> ATCC 700603 ve <i>E.coli</i> ATCC 25922 KK için (haftalık veya günlük ) kullanılmaktadır.</p> <p><i>E.coli</i> ATCC 25922 (M100-S23 Tablo 3 A'daki kontrol sınırlarına bkz.)</p> <p><i>K.pneumoniae</i> ATCC 700603: Sefpodoksim MİK≥8 Seftazidim MİK ≥2 Aztreonam MİK ≥2 Sefotaksim MİK ≥2 Seftriakson MİK ≥2</p>	<p>GSBL doğrulama testi yapılırken <i>K.pneumoniae</i> ATCC 700603 ve <i>E.coli</i> ATCC 25922 haftalık rutin olarak test edilmektedir.</p> <p><i>E.coli</i> ATCC 25922: İlacın zon çapının klavulanik asit ile test edildiğinde tek başına test edildiğine göre göre ≤2 mm artması</p> <p>Klebsiella pneumoniae ATCC 700603: Seftazidim / klavulanik asit zon çapında ≥5 mm; Sefotaksim /klavulanik asit zon çapında ≥3 mm artış.</p>	<p>GSBL doğrulama testi yapılırken <i>K.pneumoniae</i> ATCC 700603 ve <i>E.coli</i> ATCC 25922 haftalık rutin olarak test edilmektedir.</p> <p><i>E.coli</i> ATCC 25922: Antimikrobik ilacın klavulanik asit ile birlikte test edildiğinde MİK değerinin tek başına test edildiğine göre &lt; 3 dilüsyon azalması</p> <p>Klebsiella pneumoniae ATCC 700603: Antimikrobik ilacın klavulanik asit ile birlikte test edildiğinde MİK değerinin tek başına test edildiğine göre ≥3 dilüsyon azalması</p>

## Ek-2.GSBL (CTX-M, TEM SHV) Genlerinin Saptanması

### 1. Amaç

Bu ekte, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz genlerinin, polimeraz zincir testi (PZT) ile saptanması ele alınmaktadır. Anlatılan yöntemler sadece grubun saptanmasına yöneliktir.

### 2. Kısıtlılıklar

TEM ve SHV grubunda, aynı PZT GSBL dışı enzim varyantlarını da saptamaktadır. Bu nedenle PZT testinde pozitif bant görülmesi halinde sonuçlar mutlaka dizi analizi ve BLAST veri tabanı ile ulaşılan dizilerin hizalanması ile doğrulanmalıdır.

Aşağıdaki yöntemler Enterobacteriaceae üyelerinde daha az görülen (sporadik) GES, PER, OXA GSBL varyantları ile yeni enzimleri kapsamamaktadır.

### 3. Uygulama

#### 3.1. DNA eldesi:

24 saatlik kültürde üreyen orta boy kolonilerden 2-3 koloni alınarak 250 µl deiyonize suda süspansiyon hazırlanır ve 100 C'de 10 dakika kaynatılır. 10000 devirde beş dakika santrifüj edildi ve 5 µl süpernatant kalıp DNA olarak kullanılır.

#### 3.2. Primerler:

Beta laktamaz direnç genlerinin araştırılmasında kullanılan primer dizileri ve beklenen bant büyüklükleri aşağıda yer almaktadır.

Primer	Ürün Büyüklüğü
CTX-1-F: 5'- CCCATGGTTAAAAAATCACTG -3'	891 bp
CTX-1-R: 5'- CCGTTTCCGCTATTACAAAC -3'	
TEM-F:5'-ATAAAATTCTTGAAGACGAAA-3'	1080 bp
TEM-R:5'-GACAGTTACCAATGCTTAATC-3'	
SHV-F:5'- GGG TTA TTC TTA TTT GTC GC-3'	930 bp
SHV-R:5'- TTA GCG TTG CCA GTG CTC-3'	
TEM-S1-F: TACTACTATTCTCAGAATGACT	TEM dizi analizi
TEM-S2-R: TTCTGTGACTGGTGAGTACT	
SHV-S(LE): CAGATCGGCGACAACGTCAC	SHV dizi analizi
SHV-S2(LA): GTGACGTTGTCGCCGATCTG	

### 3.3. CTX-M PCR

a.) **CTX-M Reaksiyon Karışımı** : CTX-M özgül primerleri kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlanır.

Toplam hacim	50 µl	Son konsantrasyon
<b>10X PCR buffer</b>	5 µl	1x
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	4 µl	2,0 mM
<b>dNTP stok solüsyon</b>	5 µl	0,2 mM her bir
<b>CTX-M-F primeri</b>	1 µl	20 pmol
<b>CTX-M-R primeri</b>	1 µl	20 pmol
<b>Taq polimeraz</b>	0,5 µl	2,5 Ü
<b>Kalıp DNA</b>	5 µl	
<b>Deiyonize su</b>	28,5 µl	

#### b.) CTX-M Reaksiyon Koşulları

94 °C → 5 dakika	ön denatürasyon	
94 °C → 1 dakika	denatürasyon	} ⇒ 30 döngü
48 °C → 1 dakika	birleşme	
72 °C → 2 dakika	uzama	
72 °C → 20 dakika	son uzatma	

### 3.4. TEM PCR

a.) **TEM Reaksiyon Karışımı** : TEM özgül primerleri kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlanır.

Toplam hacim	50 µl	Son konsantrasyon
<b>10X PCR buffer</b>	5 µl	1x
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	3 µl	1,5 mM
<b>dNTP stok solüsyon</b>	5 µl	0,2 mM her bir
<b>TEM-F primeri</b>	1 µl	20 pmol
<b>TEM-M-R primeri</b>	1 µl	20 pmol
<b>Taq polimeraz</b>	0,5 µl	2,5 Ü
<b>Kalıp DNA</b>	5 µl	
<b>Deiyonize su</b>	29,5 µl	

**b.)TEM Reaksiyon Koşulları**

94 °C→3dakika	ön denatürasyon	
94 °C→1dakika	denatürasyon	} ⇒30 döngü
50 °C→1dakika	birleşme	
72 °C→2dakika	uzama	
72 °C→20 dakika	son uzatma	

**3.5. SHV PCR****a.)SHV Reaksiyon Karışımı**

Toplam hacim	50 µl	Son konsantrasyon
10X PCR buffer	5 µl	1x
MgCl <sub>2</sub>	3 µl	1,5 mM
dNTP stok solüsyon	5 µl	0,2 mM her bir
SHV-F primeri	1 µl	20 pmol
SHV-R primeri	1 µl	20 pmol
Taq polimeraz	0,5 µl	2,5 Ü
Kalıp DNA	5 µl	
Deiyonize su	29,5 µl	

**b.)SHV Reaksiyon Koşulları**

94 °C→3dakika	ön denatürasyon	
94 °C→1dakika	denatürasyon	} ⇒30 döngü
55 °C→1dakika	birleşme	
72 °C→2dakika	uzama	
72 °C→20 dakika	son uzatma	

**3.6. Agaroz Jel Elektrofrez ve PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi**

PCR ürünlerinin görüntülenmesi amacıyla %2'lik agaroz jel; 1 g agaroz 50 ml 1X TBE tamponu içerisinde eritilerek hazırlanır. İçerisine 0.5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromid eklendi ( stok solüsyondan 5 µl). Tarakları hazırlanmış kalıba dökülür. Jel donduktan sonra tarak çıkarılarak jel, elektroforez tankına yerleştirilir. İki µl jel yükleme tamponu (Fermentas R0611, Litvanya) ve 10 µl PCR ürünü karıştırılarak her kuyucuğa 12 µl yüklenir. Ayrıca bant büyüklüğünü görebilmek amacıyla bir kuyuya da marker (100bp DNA ladder) (Fermentas SMO241, Litvanya) pipetlenir. Jel 1X TBE tamponu (Tris-Borik asit-EDTA, pH: 8) içinde 120 volt uygulanarak 45 dakika yürütülür ve ardından ultraviyole aydınlatıcıda (BIO-1D++, Almanya) incelenerek bantlar görüntülenir.

#### 4. Ek-2 Kaynaklar

1. Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee JH *et al.* Dissemination of transferable CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Korea. J Appl Microbiol 2005; 98(4), 921-27
2. Kim J, Lim Y, Jeong YS, Seol Sy. Occurrence of CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-14 and CTX-M-9 Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Enterobacteriaceae* Clinical Isolates in Korea. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(4): 1572-1575
3. Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Martínez-Martínez L *et al.* Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients, J Clin Microbiol 2004; 42(3): 1089-9.



## EK-3 Karbapenemaz Direnç Genlerinin Saptanması

### 1. Amaç ve Kapsam

Bu ek, karbapenemaz direnç genlerinin saptanması amacıyla Dokuz Eylül Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında kullanılan genotipik yöntemleri kapsamaktadır.

### 2. Kısıtlılıklar

PZT, karbapenemleri hidrolize eden enzim ailelerinin saptanmasına yöneliktir.

PZT testinde pozitif bant görülmesi halinde, enzim varyantının tam olarak saptanması ve sonuçların doğrulanması için "altın standart", dizi analizidir. Saptanan DNA dizileri, BLAST veri tabanı ile ulaşılan diziler ile hizalanarak fenotipten sorumlu enzim tanımlanabilir.

Aşağıda yer alan yöntemler, aslında GSBL olup bazı aile üyeleri karbapenemaz niteliği de gösteren GES türevlerini kapsamamaktadır.

### 3. Uygulama

**3.1. DNA eldesi:** 24 saatlik kültürde üreyen orta boy kolonilerden 2-3 koloni alınarak 250 µl deiyonize suda süspansiyon hazırlandı ve 100 C'de 10 dakika kaynatıldı. 10000 devirde beş dakika santrifüj edildi ve 5 µl süpernatant kalıp DNA olarak kullanıldı.

**3.2. Primerler:** Karbapenemaz direnç genlerinin araştırılmasında kullanılan primer dizileri ve beklenen bant büyüklükleri

Primer	Ürün Büyüklüğü	Kaynak
<b>OXA-48A:5'-TTGGTGGCATCGATTATCGG 3'</b> <b>OXA-48B:5'-GAGCACTTCTTTTGTGATGGC 3'</b>	743 bp	4.1
<b>IMP-A:5'-GAA GGY GTT TAT GTT CAT AC-3' (Y:C/T)</b> <b>IMP-B:5'-GTA MGT TTC AAG AGT GAT GC-3' (M:A/C)</b>	587 bp	4.2
<b>VIM-A:5'-GTT TGG TCG CAT ATC GCA AC-3'</b> <b>VIM-B:5'- TCG GTC GAA TGC GCA GCA CC-3'</b>	388 bp	4.2
<b>KPCF: 5'-GTATCGCCGTCTAGTTCTGC-3'</b> <b>KPCR: 5'-GGTCGTGTTCCCTTTAGCC-3'.</b>	493 bp	4.3
<b>NDM-1-F:5'- CAA TAT TAT GCA CCC GGT CG-3'</b> <b>NDM-1-R:5'- ATC ATG CTG GCC TTG GGG AA-3'</b>	726 bp	4.4

Primer	Ürün Büyüklüğü	Kaynak
OXA-48A:5'-TTGGTGGCATCGATTATCGG 3' OXA-48B:5'-GAGCACTTCTTTTGTGATGGC 3'	743 bp	4.1
IMP-A:5'-GAA GGY GTT TAT GTT CAT AC-3' (Y:C/T) IMP-B:5'-GTA MGT TTC AAG AGT GAT GC-3' (M:A/C)	587 bp	4.2
VIM-A:5'-GTT TGG TCG CAT ATC GCA AC-3' VIM-B:5'- TCG GTC GAA TGC GCA GCA CC-3'	388 bp	4.2
KPCF: 5'-GTATCGCCGTCTAGTTCTGC-3' KPCR: 5'-GGTCGTGTTCCCTTAGCC-3'.	493 bp	4.3
NDM-1-F:5'- CAA TAT TAT GCA CCC GGT CG-3' NDM-1-R:5'- ATC ATG CTG GCC TTG GGG AA-3'	726 bp	4.4

### 3.3. OXA-48, IMP, VIM ve KPC PZR

a) **Reaksiyon Karışımı** : OXA-48, IMP, VIM ve KPC özgül primerleri kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlanır.

Toplam hacim	50 µl	Son konsantrasyon
10X PCR buffer	5 µl	1x
MgCl <sub>2</sub>	5 µl	2,5 mM
dNTP stok solüsyon	5 µl	0,2 mM her bir
Özgül F primeri	1 µl	20 pmol
Özgül-R primeri	1 µl	20 pmol

#### b) Reaksiyon Koşulları

94 °C→5 dakika	ön denatürasyon	} ⇒30 döngü
94 °C→1dakika	denatürasyon	
53 °C→1dakika	birleşme	
72 °C→1dakika	uzama	
72 °C→10 dakika	son uzatma	

### 3.4. NDM PZR

**a)Reaksiyon Karışımı:** NDM özgül primerleri ile hazırlanır.

Toplam hacim	50 µl	Son konsantrasyon
10X PCR buffer	5 µl	1x
MgCl <sub>2</sub>	5 µl	2,5 mM
dNTP stok solüsyon	5 µl	0,2 mM her bir dNTP
NDM-1 F primeri	1 µl	20 pmol
NDM-1 -R primeri	1 µl	20 pmol
Taq polimeraz	0,5 µl	2,5 Ü
Kalıp DNA	5 µl	
Deiyonize su	29,5 µl	

### b)NDM Reaksiyon Koşulları

94 °C→5 dakika	ön denatürasyon	} ⇒30 döngü
94 °C→1dakika	denatürasyon	
54 °C→1dakika	birleşme	
72 °C→1dakika	uzama	
72 °C→10 dakika	son uzatma	

### 3.5. Agaroz Jel Elektrofrez ve PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi:

PCR ürünlerinin görüntülenmesi amacıyla %2'lik agaroz jel; 1 g agaroz 50 ml 1X TBE tamponu içerisinde eritilerek hazırlanır. İçerisine 0.5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromid eklendi ( stok solüsyondan 5 µl). Tarakları hazırlanmış kalıba dökülür. Jel donduktan sonra tarak çıkarılarak jel, elektroforez tankına yerleştirilir. İki µl jel yükleme tamponu (Fermentas R0611, Litvanya) ve 10 µl PCR ürünü karıştırılarak her kuyucuğa 12 µl yüklenir. Ayrıca bant büyüklüğünü görebilmek amacıyla bir kuyuya da marker (100bp DNA ladder) (Fermentas SMO241, Litvanya) pipetlenir. Jel 1X TBE tamponu (Tris-Borik asit-EDTA, pH: 8) içinde 120 volt uygulanarak 45 dakika yürütülür ve ardından ultraviyole aydınlatıcıda (BIO-1D++, Almanya) incelenerek bantlar görüntülenir.

#### 4. Ek-3 Kaynaklar

1. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(1):15-22.
2. Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol.* 2005;43(7):3129-35.
3. Wolter DJ, Khalaf N, Robledo IE, Vázquez GJ, Santé MI, Aquino EE, Goering RV, Hanson ND. Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(4):1660-4.
4. Samuelsen Ø, Thilesen CM, Heggelund L, Vada AN, Kümmel A, Sundsfjord A. Identification of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Norway. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(3):670-2

## İlgili diğer UMS belgeleri

Bakteriyoloji Test Prosedürleri

Bakteriyoloji Örnek Yönetimi

AMD- TP (Antimikrobiyal Duyarlılık Test Prosedürleri)- 02, 03, 04

AMD- TB (Antimikrobiyal Duyarlılık Temel Bilgiler)- 03

## Kaynaklar

1. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. EUCAST; 2013. Version 3.0 [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)(last accessed 23 December 2012).
2. [www.eucast.org](http://www.eucast.org): EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance - Version 1.0 (December 2013)
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty- third Informational supplement. 2013 M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
4. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother. 1995;39:211-1233.
5. Livermore DM.  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev. 1995;8:557-584.
6. Bradford PA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev. 2001;14:933-951.
7. Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. Clin Microbiol Infect.2008;14(Suppl1):45-52.
8. Canton R, Novais A, Valverde A, Machoda E, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Prevalence and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases-producing Enterobacteria In Europe. Clin Microbiol Infect 2008;14 (Suppl1):144-153.
9. Livermore DM,Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, Ayala J, Coque TM, Kern-Zdanowich I, Luzzaro F, Poirel L, Woodford N. CTX-M: changing the face of ESBL s in Europe. J Antimicrob Chemother. 2007;59:165-174.
10. Carattoli A. Animal reservoirs for extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producers. Clin Microbiol Infect. 2008;14(Suppl1):117-123.
11. European Centres for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011. Annual report European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net).
12. Canton R, Akova M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, et al.Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. Clin Microbiol Infect. 2012;18(5):413-31

13. European Centres for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)
14. Souli M, Galani I, Antoniadou A, Papadomichelakis E, Poulakou G et al. An outbreak of infection due to  $\beta$ -lactamase *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. Clin Infect Dis 2010;50:364-73.
15. Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M, Quale J. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. Arch Intern Med. 2005;165(12):1430-5.
16. Marchhaim D, Navon-Venezia S, Schwaber MJ, Carmeli Y. Isolation of imipenem-resistant Enterobacter species: emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes. Antimicrob Agents Chemother.2008;52(4):1413-8
17. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases : the versatile  $\beta$ -lactamases. Clin Microbiol Rev 2007;20:440-58
18. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2004 Jan;48(1):15-22.
19. Thomson RB, Miller JM. Granato PA. Reagents, stains and media: Bacteriology. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC eds. Manual of Clinical Microbiology. 8<sup>th</sup> ed. Washington: ASM Press. 2003: 354-383.
20. HPA Standards Unit. UK Standards for Microbiology Investigations: Bacteriology- Identification of Enterobacteriaceae. Issue nr 3.1, 2011.
21. Isenberg Clinical microbiology procedures handbook—2nd ed. update / editor in chief, Lynne S. Garcia., American Society for Microbiology, Washington, DC, 2007
22. Gniadkowski M. 2008. Evolution of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases by mutation. Clin Microbiol Infect.2008;14(Suppl1):11-32.
23. Driex L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. Clin Microbiol Infect.2008;14 Suppl 1:90-103.
24. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev. 2005;18(4):657-86
25. Jeong SH, Song W, Kim HS, Lee KM. Broth microdilution method to detect extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and AmpC  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae isolates by use of clavulanic acid and boronic acid as inhibitors. J Clin Microbiol. 2009;47(11):3409-12.
26. Platteel TN, Cohen Stuart JW, de Neeling AJ, Vorts GM, Scharringa J et al. Multi-centre evaluation of a phenotypic extended spectrum  $\beta$ -lactamase detection guideline in the routine setting. Clin Microbiol Infect.2013;19(1):70-6.
27. Leverstein-van Hall MA, Fluit AC, Paauw A, Box AT, Brisse S, Verhoef J. Evaluation of the Etest ESBL and the BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 automated instruments for detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* J Clin Microbiol.2002;40(10):3703-11.

28. Spanu T, Sanguinetti M, Tumbarello M, D'Inzeo. Evaluation of the new VITEK 2 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) test for rapid detection of ESBL production in Enterobacteriaceae isolates. J Clin Microbiol. 2006 Sep;44(9):3257-62.
29. Thomson KS, Cornish NE, Hong SG, Hemrick K, Herdt C, Moland ES. Comparison of Phoenix and VITEK 2 extended-spectrum-beta-lactamase detection tests for analysis of Escherichia coli and Klebsiella isolates with well-characterized beta-lactamases. J Clin Microbiol. 2007;45(8):2380-4
30. M'Zali FH, Chanawong A, Kerr KG, Birkenhead D, Hawkey PM. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the MAST DD test, the double disc and the Etest ESBL. J Antimicrob Chemother. 2000;45(6):881-5.
31. Towne TG, Lewis JS 2 nd, Herrera M, Wickes B, Jorgensen JH. Detection of SHV-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in *Enterobacter* isolates. J Clin Microbiol. 2010;48(1):298-9.
32. Stürenburg E, Sobottka I, Noor D, Laufs R, Mack D. Evaluation of a new cefepime-clavulanate ESBL Etest to detect extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in an Enterobacteriaceae strain collection. J Antimicrob Chemother 2004; 54(1): 134-8.
33. Nukaga M, Mayama K, Crichlow GV, Knox JR. Structure of an extended-spectrum class A  $\beta$ -lactamase from *Proteus vulgaris* K1. J Mol Biol. 2002;317(1):109-17.
34. Petrella S, Renard M, Ziental-Gelus N, Clermont D, Jarlier V, Sougakoff W. Characterization of the chromosomal class A  $\beta$ -lactamase CKO from *Citrobacter koseri*. FEMS Microbiol Lett. 2006;254(2):285-92.
35. Jacoby GA. AmpC  $\beta$ -lactamases. Clin Microbiol Rev 2009;22(1):161-82
36. Munier GK, Johnson CL, Snyder JW, Moland ES, Hanson ND, Thomson KS. Positive extended-spectrum- $\beta$ -lactamase (ESBL) screening results may be due to AmpC  $\beta$ -lactamases more often than to ESBLs. J Clin Microbiol. 2010;48(2):673-4.
37. Bauernfeind A, Schneider I, Jungwirth R, Sahly H, Ullmann U. A novel type of AmpC  $\beta$ -lactamase, ACC-1, produced by a *Klebsiella pneumoniae* strain causing nosocomial pneumonia. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43(8): 1924-31.
38. Polsfuss S, Bloemberg GV, Geiger J, Meyer V, Böttger EC, Hombach M. Evaluation of a diagnostic flow chart for detection and confirmation of extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) in Enterobacteriaceae. Clin Microbiol Infect. 2012;18(12):1194-204.
39. Yang JL, Wang JT, Lauderdale TL, Chang SC. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacter cloacae* in Taiwan and comparison of 3 phenotypic confirmatory methods for detecting extended-spectrum beta-lactamase production. J Microbiol Immunol Infect. 2009;42(4):310-6.
40. Jeong SH, Song W, Kim JS, Kim HS, Lee KM. Broth microdilution method to detect extended-spectrum beta-lactamases and AmpC beta-lactamases in enterobacteriaceae isolates by use of clavulanic acid and boronic acid as inhibitors. J Clin Microbiol. 2009;47(11):3409-12.

41. Tsakris A, Poulou A, Themeli-Digalaki K, Voulgari E, Pittaras T, Sofianou D, Pournaras S, Petropoulou D. Use of boronic acid disk tests to detect extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of KPC carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2009;47(11):3420-6.
42. March A, Aschbacher R, Dhanji H, Livermore DM, Böttcher A et al. Colonization of residents and staff of a long-term-care facility and adjacent acute-care hospital geriatric unit by multiresistant bacteria. Clin Microbiol Infect. 2010Jul;16(7):934-44.
43. Cohen Stuart J, Dierix C, Al Naiemi N, Karczmarek A, Van Hoek AH et al. SHV and CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae using ligation-mediated amplification with microarray analysis. J Antimicrob Chemother. 2010;65(7):1377-81
44. Endimiani A, Hujer AM, Hujer KM, Gatta JA, Schriver AC et al. Evaluation of a commercial microarray system for detection of SHV-, TEM-, CTX-M, and KPC type  $\beta$ -lactamase genes in Gram-negative isolates. J Clin Microbiol. 2010;48(7):2618-22.
45. Naas T, Cuzon G, Truong H, Bernabeu S, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray, the Check-Points ESBL/KPC array, for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and KPC carbapenemases. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(8):3086-92.
46. Platteel TN, Stuart JW, Voets GM, Scharringa J, van de Sande N et al. Evaluation of a commercial microarray as a confirmation test for the presence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in isolates from the routine clinical setting. Clin Microbiol Infect. 2011;17(9):1435-9.
47. Willemsen I, Overvest I, Al Naiemi N, Rijnsburger M, Savelkoul P et al. New diagnostic microarray (Check-KPC ESBL) for detection and identification of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in highly resistant Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2011;49(8):2985-7.
48. Vatopoulos A. High rates of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece—a review of the current evidence. Euro Surveill. 2008;13(4).doi:pil:8023
49. Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. J Antimicrob Chemother. 2009;63:659-67
50. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Website with MIC-distributions. (<http://mic.eucast.org/>, accessed on 23 December 2012)
51. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poriel L, Woodford N, Miriagou V. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Clin Microbiol Infect. 2012;18(5):432-8.
52. Glupczynski Y, Huang TD, Bouchahrouf W, Rezende de Castro R, Bauraing C et al. Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates in Belgian hospitals. Int J Antimicrob Agents. 2012;39(2):168-72.
53. Tato M, Coque TM, Ruiz-Garbajosa P, Pintado V, Cobo J et al. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of Enterobacteriaceae infection involving VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in Spain: toward endemicity? Clin Infect Dis. 2007;45(9):1171-8:



54. Vading M, Samuelsen Ø, Haldorsen B, Sundsfjord AS, Giske CG. Comparison of disk diffusion, E test and VİTEK2 for detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* with the EUCAST and CLSI breakpoint system. Clin Microbiol Infect.2011;17(5):668-74.
55. Giske CG, Gezelius L, Samuelsen Ø, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo-  $\beta$ -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. Clin Microbiol Infect. 2011;17(4):552-6.
56. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. J Clin Microbiol. 2012; (50)12:3877-80.
57. van Dijk K, Voets G, Scharringa J, Voskuil S, Fluit A, Rottier W, Leverstein-Van Hall M, Cohen Stuart J. A disk diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in Enterobacteriaceae using phenyl boronic acid, dipicolinic acid, and temocillin. Clin Microbiol Infect 2013. In press
58. Hartl R, Widhalm S, Kerschner H, Apfalter P. Temocillin and meropenem to discriminate resistance mechanisms leading to decreased carbapenem susceptibility with focus on OXA-48 in Enterobacteriaceae. Clin Microbiol Infect. 2013;19 (5):E230-2.
59. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis. 2012;18(9):1503-7.
60. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid Identification of carbapenemase Types in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. by Using a Biochemical Test. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(12):6437-40:
61. Millillo M, Kwak YI, Snesrud E, Waterman PE, Lesho E, McGann P. Rapid and simultaneous detection of *bla*<sub>KPC</sub> and *bla*<sub>NDM</sub> by use of multiplex real-time PCR. J Clin Microbiol.2013;51(4):1247-9.
62. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC,OXA-48,VIM,IMP and NDM). J Antimicrob Chemother. 2012 ;67(8): 1865-9.



T.C. Sağlık Bakanlığı

## ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

# *Pseudomonas aeruginosa:* Tanımlanması ve AMD Testleri

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu 11
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri (AMD)
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	AMD-MT-05
Sürüm No	1.0
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

# İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	3
GENEL BİLGİ .....	4
TEKNİK BİLGİLER .....	6
1 Hedef mikroorganizma(lar) .....	6
2 Tanı/tanımlama için asgari laboratuvar koşulları .....	6
3 Tanı/tanımlama teknikleri .....	8
4 AMD testleri.....	9
4.1. Disk Diffüzyon Yöntemi .....	9
4.2. Gradyent Test Yöntemi.....	10
4.3. Otomatize Sistem ile MİK saptanması.....	10
5 Raporlama.....	10
5.1 Raporlama, Yorumlamada Dikkat Edilecek Noktalar .....	10
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	14
KAYNAKLAR.....	14

## Kapsam ve Amaç

Bu doküman klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının tanımlanması ve bu mikroorganizmaların yol açtığı enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek antibiyotiklerin in vitro duyarlılıklarının çalışılması için geçerli yöntemlerin değerlendirilmesi kriterlerini kapsamaktadır ve Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans standart uygulama prosedürü ile birlikte kullanılmalıdır.

## Kısaltmalar ve Tanımlar

<b>AAC</b>	Aminoglycoside acetyltransferase
<b>APH</b>	Aminoglycoside Resistance Determinant
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>CAMHB</b>	Cation Adjusted Mueller Hinton Broth
<b>CCUG</b>	Culture Collection University of Göteborg
<b>CECT</b>	Spanish Type Culture Collection
<b>CLSI</b>	Clinical Laboratory Standards Institute
<b>CIP</b>	Collection de Institut Pasteur
<b>DSM</b>	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
<b>ECOFF</b>	Epidemiological Cut-Off
<b>EUCAST</b>	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
<b>GSBL</b>	Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz
<b>MHA</b>	Mueller-Hinton Agar
<b>MİK</b>	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
<b>NCTC</b>	National Collection of Type Cultures
<b>SF</b>	Serum Fizyolojik
<b>UAMDS</b>	Ulusal Antimikrobiyal Duyarlılık Standartları
<b>UMS</b>	Ulusal Mikrobiyoloji Standartları

## Genel Bilgi

*Pseudomonas aeruginosa* klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında pnömoni, dolaşım sistemi enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları ve cerrahi alan enfeksiyonları gibi sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonların sık nedenlerindedir. Sağlıklı bireylerin normal florasında nadiren bulunan *P. aeruginosa* en sık gastrointestinal sistem, boğaz, burun mukozası ile koltuk altı, perine gibi nemli deri yüzeylerinde kolonize olur.

*P. aeruginosa* suşlarında beta laktamazlar, eflüks pompaları, dış membran porin kaybı ve hedef bölge mutasyonları gibi mekanizmalarla antimikrobiyal ilaçlara direnç gelişmektedir. Çoğul ilaç direnci bu mekanizmalardan birkaçının bir izolatta bulunması ya da tek bir güçlü direnç mekanizmasının varlığı sonucu meydana gelir. Çoğul ilaç dirençli *P. aeruginosa*'lar tüm dünyada giderek önem kazanmaktadır ve bunların yol açtığı enfeksiyonların tedavisinde sorun yaşanmaktadır. Bu hastalarda uygun olmayan empirik tedavi ve doğru tedavinin gecikmesi nedeniyle hastanede yatış süreleri uzamakta, enfeksiyon devam etmekte ve sonuç olarak mortalite artmaktadır (1).

*P. aeruginosa* suşlarında kromozomal ve indüklenebilir özellikte olan Amp C sefalosporinazlar, Ambler sınıf C'de yer alan  $\beta$ -laktamazlardır. Amp C  $\beta$ -laktamazlar penisilinler, sefalosporinler ve monobaktamları hidrolize eder. Bu  $\beta$ -laktamazlar, 3. kuşak sefalosporinleri parçalarken, 4. kuşak sefalosporinleri genellikle etkilemez. Genel olarak, Amp C  $\beta$ -laktamazlar klavulanik asit başta olmak üzere klasik GSBL inhibitörleri ile inhibe olmaz. *P. aeruginosa*'larda kromozomal Amp C  $\beta$ -laktamazların derepresyonu ya da aşırı üretimi sonucu başlangıçta duyarlı bulunan sefalosporinler ile  $\beta$ -laktam/ $\beta$ -laktamaz inhibitörlerine karşı tedavi sırasında yüksek düzey direnç gelişebilir (2).

Çoğul ilaç dirençli *P.aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* suşlarına oldukça iyi etki gösteren kolistin ilk olarak 1952 yılında kullanılmaya başlanmıştır. Çoğul ilaç direnci taşıyan bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kolistin yaygın kullanımı sonucunda *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* suşlarında direnç geliştiği bildirilmiştir. Dirençli bakterilerin yol açtığı enfeksiyonların tedavisinde kolistin tek başına kullanımı, bu antibiyotiğe direnç gelişmesinde oldukça önemlidir. Bu nedenle kolistin dışında tüm antibiyotiklere dirençli *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde kolistin tek başına kullanılması yerine başka antibiyotiklerle kombine kullanımı tercih edilmelidir. Yapılan çalışmalarda kolistin gram negatif bakterilere karşı karbapenemlerle sinerji oluşturduğu gösterilmiştir. Bunların dışında kolistin seftazidim, rifampisin ve glikopeptidlerle sinerji oluşturduğu yönünde bildirimler de bulunmaktadır. Bu durumun, mikroorganizma sadece kolistine duyarlı olmasına karşın kolistin karbapenemlerle birlikte kullanıldığında, karbapenem kullanımı sonucu bakteri hücre duvarında ortaya çıkan kısmi harabiyet ile hücre membranı üzerindeki kolistin etkinliğinin zamana bağlı olarak artış göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Kolistin kullanımının 14 günlük kullanım süresini aşması ise kolistin direnci gelişmesinde önemli bir risk faktörüdür.

Bakteriyemilerde intravenöz kolistin kullanılmasıyla % 90'larda tedavi başarısına ulaşıldığı halde, pnömonilerde bu oran % 75 civarındadır. İntravenöz kullanımla birlikte, aerosol şeklinde kullanım, intratekal ve intraventriküler kullanım da son dönemlerde giderek artış göstermektedir.

Öte yandan kolistin, ciddi enfeksiyonların tedavisinde günümüzde bir çok antibiyotiğin yetersiz kaldığı dirençli mikroorganizmalara karşı, mutlaka korunması ve endikasyon durumunda kombine kullanılması gereken bir antibiyotiktir(3).

*P. aeruginosa*'nın etken olarak izole edildiği enfeksiyonlarda duyarlılık testleri sonucu elde edilen veriler EUCAST standartları doğrultusunda değerlendirilerek raporlanmalıdır (4). CLSI standartlarını kullanan laboratuvarlar için Performance Standarts for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Information Supplement M100-S23 Vol.33 No.1 Clinical and Laboratory Standards Institute 2013 veya güncel CLSI dökümanı referans alınmalıdır(5).

*P. aeruginosa* izolatlarında tür tayini ve antimikrobiyal duyarlılık testinin hızlı ve doğru olarak yapılması, hasta tedavisinin yanı sıra çoğul ilaç direnci gelişiminin önlenmesi ve UAMDS Sistemine yapılan bildirimler açısından da önem taşımaktadır.

# Teknik Bilgiler

## 1 Hedef mikroorganizma

*Pseudomonas aeruginosa*

## 2 Tanı/tanımlama için asgari laboratuvar koşulları

### 2.1. Laboratuvar güvenliği

*P. aeruginosa* ile ilgili işlemler asgari Biyogüvenlik düzeyi 2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Kültür incelemesi için gönderilen tüm örnekler enfeksiyöz kabul edilmeli, 'standart önlemler' uygulanmalı, laboratuvar çalışmaları biyogüvenlik düzeyine uygun biyolojik güvenlik kabininde gerçekleştirilmelidir.

### 2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Hedef mikroorganizmalarla çalışacak personelin; en az Sağlık Meslek Yüksek Okulu mezunu sağlık tekniker veya sağlık meslek liselerinin tıbbi laboratuvar programından mezun olan sağlık teknisyeni statüsünde, biyogüvenlik eğitimi almış ve bakteriyoloji laboratuvarında en az bir aylık eğitim sürecini tamamlamış olması gereklidir.

### 2.3. Örnek, Ayıraç, Kit, Ekipman

#### İnceleme örneği

- İdrar
- Yara
  - a) Yanık
  - b) Dış kulak yolu sürüntü
  - c) Doku
  - d) Apse
  - e) Aspirasyon
- Kan
  - a) Yenidoğanlar
  - b) İmmünespresif hastalar
  - c) Yanık hastaları
- BOS
- Solunum yolu örnekleri
  - a) Balgam
  - b) Bronkoalveolar lavaj
  - c) Trakeal aspirat

- Steril vücut sıvıları

#### **Besiyeri / Ayıraç**

Örnek ekimi için:

- Kanlı agar (%5 koyun kanlı)
- Mac Conkey agar veya EMB agar, çukulata agar (invazif örnekler) (Bkz. UMS, B-ÖY-01-14)

Antimikrobiyal duyarlılık testi için:

- Mueller Hinton agar
- Otomatize sistemler
- Diğer malzeme (Bkz. UMS, AMD-TP-03)
- Kanlı agar, Mac Conkey agar ve Mueller Hinton agar besiyerleri - Ticari olarak piyasadan hazır temin edilebilir ya da laboratuvarda UMS, AMD-TP-01 dokümanından yararlanılarak hazırlanabilir.

## 2.4. Kalite kontrol

- *P.aeruginosa* izolatlarının tanımlanmasında kullanılan tüm besiyeri ve ayıraçlar için iç kalite kontrolü yapılmalıdır.
- Kalite kontrol testleri ve bu testlerde kullanılan kalite kontrol suşları, ilgili tanımlama testlerinin altında yer almaktadır. (Daha ayrıntılı bilgi için Bkz. UMS, B-TP-01-23)
- Tanımlama testlerinde kalite kontrol suşu olarak;

Pozitif kontrol: *P.aeruginosa* ATCC 27853

Negatif kontrol :*Escherichia coli* ATCC 25922 kullanılır.

- Antimikrobiyal duyarlılık test sonuçlarının doğruluğu ve geçerliliği EUCAST standartında yer alan en az bir standart *P. aeruginosa* suşu ile çalışılarak ilgili standartta ifade edilen değerler aralığında sonuçların alınması ile kanıtlanmalıdır (4).
- Kalite kontrol suşu olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanılması önerilir(4).
- *E. coli* ATCC 35218 ( $\beta$ -laktam/  $\beta$ -laktamaz inhibitör konsantrasyonları için) (5).
- Alternatif olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853, NCTC 12934, CIP 76110, DSM 1117, CCUG 17619, CECT standart suşları da kalite kontrol amacıyla kullanılabilir (4).



## 3 Tanı/tanımlama teknikleri

Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarları, otomatize sistem kullansa da bakteri tanımlamada önce şu basamakları yerine getirmelidir:

### 3.1. Mikroskopi (bütün mikroskobik teknikler)

Hedef mikroorganizmalar, gelen örnek veya üreyen kültürden hazırlanan preparatın Gram boyama sonrası yapılan mikroskobik incelemesinde gram negatif basiller olarak görülür (Bkz. B-TP-03). Gram negatif basiller tek başına, ikili ya da kısa zincirler halinde bulunabilir. Özel bir görünümü yoktur, görünümü diğer enterik bakterilerden farksızdır.

### 3.2. Kültür

Toprak, su, bitkiler ve hayvanlarda yaygın olarak bulunan *P. aeruginosa* suşları zorunlu aéroptur ve bir çok besiyerinde kolayca ürer. *P. aeruginosa* suda çözünen pigmenti piyosiyanın sayesinde yeşil- mavi koloniler oluşturabilir. Üreme sonucu besiyerinin kapağı açıldığında karakteristik üzüm aromasını andıran bir koku hissedilir. *P. aeruginosa* suşları koyun kanlı besiyerinde düzensiz kenarlı ya da mukoid koloniler oluşturur. EMB ve Mac-Conkey agarda ise laktozu kullanmadıklarından laktoz negatif, düzensiz kenarlı ya da mukoid koloniler oluştururlar. Bazı suşlar kanı hemoliz eder. *P. aeruginosa* floresan yeşilimsi renkte koloniler oluşturur. *P. aeruginosa* 5-42<sup>0</sup> C'da üreyebilirken, diğer *Pseudomonas spp.* 42<sup>0</sup> C'da üremez. Değişik koloni tiplerindeki *P. aeruginosa*'lar değişik biyokimyasal ve enzimatik aktiviteleri ve antimikrobik duyarlılık kalıpları gösterebilir (6).

### 3.3. Biyokimyasal testler

#### a. Oksidaz testi:

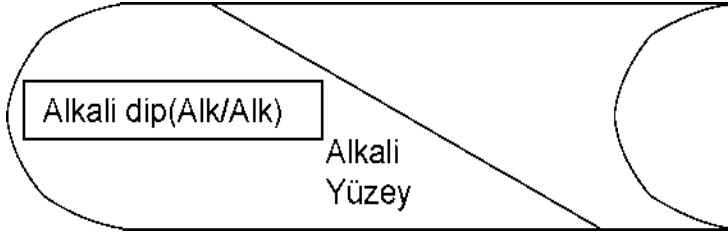
*Pseudomonas spp.*'i diğer bazı non-fermenter bakteriler ile Enterobacteriaceae üyelerinden ayırt etmek üzere oksidaz testi uygulanır ( Bkz. B-TP-16). *Pseudomonas spp.* oksidaz pozitifdir.

#### b. Manuel Biyokimyasal Tanımlama Testleri:

Triple Sugar Iron (TSI) Agarda karbohidrat fermentasyonu: Mac Conkey agardaki şüpheli tek bir koloniden iğne öze yardımıyla bir miktar alınır ve besiyerinin dik kısmına batırma ekimi yapılır. Daha sonra öze dip kısımdan çıkarılır ve besiyerinin yatay yüzeyine ekim yapılır.

*TSI'deki reaksiyonun değerlendirilmesi:*

*P. aeruginosa*'nın tanımlaması TSI'de yapılamaz. Zira TSI'ye inoküle edilen bu basiller, TSI'de herhangi bir renk değişimine yol açmazlar (Şekil) (Tablo 1).



Şekil: *P. aeruginosa* bir gecelik inkübasyon sonrası TSI'de herhangi bir renk değişimine yol açmaz .

*P. aeruginosa* tür ayırımı ya çeşitli şekerleri içeren oksidasyon-fermentasyon besiyerleri kullanılarak ya da otomatize sistemlerde yapılır.

### 3.4. Moleküler

Antimikrobiyal direnç araştırmaları ve epidemiyolojik çalışmalarda moleküler yöntemler kullanılmaktadır.

### 3.5. Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması

Koloni morfolojisi, oksidaz pozitifliği, tipik pigmentlerin varlığı, 42° C'da üreme ile *P. aeruginosa* suşları tanımlanır.

### 3.6. Saklama, Referans merkeze gönderme

İnvazif *P. aeruginosa* izolatları gibi, toplum ve hastane kökenli infeksiyonlar açısından önemli mikroorganizmaların stoklanması, klinisyen tarafından istenebilecek ve etkene yönelik yeni bir işlemin yapılmasını (örneğin antibiyotik MİK değerlerinin belirlenmesi gibi) sağlamaktadır. Bunun dışında özellikle hastane infeksiyonlarında geriye dönük salgın incelemesi ve moleküler tiplendirme yapılabilmesi için bakteriler 6 ay dondurularak saklanmaktadır. Ayrıca doğal direnç dışı ve beklenmeyen direnç fenotipleri saptandığında da, mikroorganizma tanımlama ve duyarlılık testi sonucu doğrulandıktan sonra suşlar saklanmalı ve uygun yöntemlerle referans laboratuvara gönderilerek doğrulanmalıdır (Bkz. AMD-MT-04).

## 4 AMD testleri

### 4.1. Disk Diffüzyon Yöntemi

*P. aeruginosa* izolatlarında antimikrobiyal duyarlılık testleri disk difüzyon yöntemi, gradiyent yöntemi, otomatize sistemler gibi farklı yöntemlerle çalışıldıktan sonra, sonuçlar uygun standartlara göre yorumlanarak raporlanır.

Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi AMD-TP-03 dokümanına uygun olarak hazırlanıp değerlendirilir.

Kanlı agar besiyerinde bir gecelik inkübasyon sonrası üreyen kolonilerden steril öze veya pamuk eküvyon ile steril SF çözeltisinde veya MH sıvı besiyeri içinde bir suspansiyon hazırlanır.

*P. aeruginosa*, tercihen kanlı agar plaktan McFarland 0.5 standart yoğunluğunda hazırlanmalıdır. Süspansiyonun yoğunluğunu ayarlamakta fotometrik bir cihaz kullanılması önerilmektedir. Fotometrik cihaz, üretici firmanın önerileri doğrultusunda

kalibre edilerek kullanılmalıdır.

Alternatif olarak, suspansiyonun bulanıklığı görsel olarak da McFarland 0.5 bulanıklık standartı ile karşılaştırılır (Bkz. AMD-TP-02).

Plaklar 16-20 saat 35°C sıcaklıkta inkübe edildikten sonra antimikrobiyal duyarlılık test sonucu için zon çapları Ek 1'de yer alan sınır değer tablosuna göre değerlendirilmelidir.

**Değerlendirme:** 150 mm'lik plakta maksimum 12; 100 mm'lik plakta ise maksimum 5 disk test edilir. İnkübasyon sonrası disk etrafında üremenin tümüyle inhibe olduğu zonun çapı çıplak gözle ölçülür. Ölçüm yapılırken zon kenarı olarak çıplak gözle herhangi bir üremenin görülmediği yer dikkate alınır. İnhibisyon zonu kenarında ancak lens ile bakıldığında görülebilen ince üremeler dikkate alınmaz. Trimetoprim ve sulfonamidler test edildiğinde besiyerindeki antagonistlere bağlı olarak yoğun üremenin bittiği inhibisyon zonu kenarından itibaren hafif üremeli bir alan daha görülebilir. Bu durumda yoğun üremeli alanın bittiği zon kenarı dikkate alınarak ölçüm yapılır.

Kullanılması önerilen disk içerikleri, sınır değerler ve kalite kontrol tablosu <http://www.eucast.org> adresinde yer almaktadır(4).

## 4.2. Gradyent Test Yöntemi

Kolistin duyarlılık araştırması için gradiyent test yöntemi kullanılır. MIK saptama yöntemleri (UMS, AMD-TP-04) dokümanı esas alınarak çalışılır.

## 4.3. Otomatize Sistem ile MIK saptanması

Üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışılarak saptanan değerlerin sistemin veri tabanından seçilecek CLSI veya EUCAST standartlarına göre yorumlanması sağlanır.

# 5 Raporlama

İdrar, solunum yolu ve yara örneklerinde kolonizasyon/kontaminasyon dışındaki tüm sonuçlar ile kan, BOS ve diğer steril vücut sıvılarından izole edilen tüm suşlar rapor edilir.

## 5.1 Raporlama, Yorumlamada Dikkat Edilecek Noktalar

- Antimikrobiyal duyarlılık testinde dilüsyon yöntemleri kullanılacaksa CLSI 2013'ün önerisi: Buyyon dilüsyon için CAMHB, agar dilüsyon için MHA kullanılması ve 18±2 saat inkübasyon yapılmasıdır.
- Kistik fibrozlu hastalardan izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarında antimikrobiyal duyarlılık testi disk difüzyon ya da dilüsyon yöntemleri ile çalışılabilir, fakat duyarlı olarak raporlamadan önce inkübasyonun 24 saate tamamlanması gereklidir.
- Antimikrobial ajanlarla tedavi sırasında başlanıçta duvarlı olarak saptanan *P. aeruginosa* izolatları kromozomal AmpC β-laktamaz varlığı nedeniyle 3-4 gün içerisinde kullanılan beta-laktam antibiyotiklere direnç geliştirebileceğinden kontrol kültürleri yapıp duyarlılık testinin tekrarlanması gerekir.
- Aminoglikozidler ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 ile söz konusu olan inhibisyon

zonlarının kalite kontrol sınırlarının üzerinde/altında olması divalan katyonların konsantrasyonunun yüksek ya da düşük olduğuna işaret edebilir.

- *P. aeruginosa* kanamisin ve neomisine düşük düzey APH (3')-IIb aktivitesi nedeniyle doğal dirençlidir.
- *P. aeruginosa* tipik olarak trimetoprime dirençli, sulfonamidlere orta duyarlıdır. İn vitro trimetoprim sulfametoksazole duyarlı görülebilmesine karşı dirençli olarak rapor edilmelidir.
- CLSI M100-S23, 2013 dokümanında *P. aeruginosa*'nın fosfomisine doğal dirençli olduğu belirtilmekle birlikte EUCAST Klinik Sınır değer Tablosu v.4.0'da; kişisel görüşlere dayalı kanıt sokak tipi kökenlere (ECOFF: ST ≤ 128 mg/L) bağlı enfeksiyonların fosfomisin ve diğer antimikrobiklerin kombine kullanımı ile tedavi edilebileceği belirtilmektedir (4,5).
- *P. aeruginosa* suşlarında tobramisin I/R, gentamisin S, amikasin de S saptanmış ise; *Enterobacteriaceae*'den farklı olarak (*Enterobacteriaceae*'de amikasin sonucu I olarak raporlanır), amikasin sonucu R olarak değiştirilerek raporlanır.

<i>P. aeruginosa</i>	Tobramisin	Gentamisin	Amikasin Test	Amikasin Rapor
	I/R	S	S	R

Kazanılmış AAC (6')-I enzimi varlığında amikasinin modifikasyonuna rağmen bu durum fenotipik olarak kendini göstermeyebilir.

- *P. aeruginosa*'ya etkili bir penisilin-tikarsilin veya piperasilin- bir aminoglikozid ile genellikle tobramisinle kombine edilerek tedavide kullanılmaktadır.
- Kolistin duyarlılık testi *P. aeruginosa*'da CLSI standartlarına göre disk difüzyon yöntemi ve MİK yöntemi ile çalışılabilirken, EUCAST'e göre yalnızca MİK yöntemi kullanılmaktadır. CLSI'ya göre MİK ≥ 8 µg/ml, EUCAST'e göre ise MİK > 4 µg/ml dirençli olarak yorumlanmalıdır.
- Kolistine direnç *P. aeruginosa*'da beklenmeyen direnç fenotiplerindedir. Saptanıldığında izolatin ve direncin doğrulanması gereklidir.
- *P. aeruginosa*'nın doğal dirençli olduğu diğer antimikrobiyaller ile beklenmeyen direnç fenotipleri AMD-TB-03 belgesinde bildirilmiştir. Beklenmeyen direnç fenotipleri ile doğal direnç ile uyumsuz sonuçlar saptandığında mikroorganizma tanımlama ve antimikrobiyal duyarlılık test sonucu doğrulanmalıdır.

## Ekler

### Ek-1 Pseudomonas aeruginosa EUCAST Klinik Sınır Değer Tablosu

	MİK sınır değeri (mg/L)		Disk içeriği (µg)	Zon çapı sınır değeri (mm)		Notlar Sayı ile belirtilen notlar MİK sınır değerleri ile ilişkilidir. Harf ile belirtilen notlar zon çapı sınır değerleri ile ilişkilidir.
	S ≤	R >		S ≥	R <	
<b>Penisilinler</b>						
Ampisilin-sulbaktam	-	-	-	-	-	
Amoksisilin-klavulanat	-	-	-	-	-	
Piperasilin <sup>1</sup>	16	16	30	19	19	1. Sınır değerler (tazobaktam içeren veya içermeyen, 4 g x 4) yüksek dozla tedaviye dayanmaktadır.
Piperasilin-tazobaktam <sup>1</sup>	16 <sup>2</sup>	16 <sup>2</sup>	30-6	19	19	2. Duyarlılık testlerinde kullanılmak üzere tazobaktamın konsantrasyonu 4 mg/L olarak sabitlenmiştir.
Tikarsilin <sup>3</sup>	16	16	75	17	17	3. Sınır değerler (klavulanat içeren veya içermeyen, 3 g x 4) yüksek dozla tedaviye dayanmaktadır.
Tikarsilin-klavulanat <sup>3</sup>	16 <sup>4</sup>	16 <sup>4</sup>	75-10	17	17	4. Duyarlılık testlerinde kullanılmak üzere klavulanatın konsantrasyonu 2 mg/L olarak sabitlenmiştir.
<b>Sefalosporinler</b>						
Sefepim	8 <sup>1</sup>	8	30	18	18	1. Sınır değerler yüksek dozla tedavi (2 g x 3) içindir.
Sefotaksim	-	-	-	-	-	
Sefoksitin	UD	UD	-	UD	UD	
Seftazidim	8 <sup>1</sup>	8	10	16	16	
Seftriakson	-	-	-	-	-	
Sefuroksim iv	-	-	-	-	-	
Sefuroksim oral	-	-	-	-	-	
<b>Karbapenemler</b>						
Doripenem	1	4	10	25	19	
Ertapenem	-	-	-	-	-	
İmipenem	4 <sup>1</sup>	8	10	20	17	1. Sınır değerler yüksek dozla, sık tedavi (1 g x 4) içindir.
Meropenem	2	8	10	24	18	
<b>Monobaktamlar</b>						
Aztreonam	1	16 <sup>1</sup>	30	50	16	1. Dirençli sınır değeri yüksek dozla tedavi içindir. Duyarlı sınır değeri sokak tipi kökenlerin orta duyarlı olarak bildirilmelerini güvence altına almak için belirlenmiştir.
<b>Florokinolonlar</b>						
Siprofloksasin	0.5	1	5	25	22	
Levofloksasin	1	2	5	20	17	
Moksifloksasin	-	-	-	-	-	
Nalidiksik asit (tarama)	UD	UD	-	UD	UD	
Norfloksasin	-	-	-	-	-	
Ofloksasin	-	-	-	-	-	
<b>Aminoglikozidler<sup>1</sup></b>						

1. Aminoglikozid sınır değerleri yüksek aminoglikozid dozunun günde bir kez uygulanmasına dayanmaktadır.

	MİK sınır değeri (mg/L)		Disk içeriği (µg)	Zon çapı sınır değeri (mm)		Notlar Sayı ile belirtilen notlar MİK sınır değerleri ile ilişkilidir. Harf ile belirtilen notlar zon çapı sınır değerleri ile ilişkilidir. Aminoglikozidler sıklıkla beta-laktam antibiyotiklerle beraber kullanılırlar.
	S ≤	R >		S ≥	R <	
Amikasin	8	16	30	18	15	
Gentamisin	4	4	10	15	15	
Netilmisin	4	4	10	12	12	
Tobramisin	4	4	10	16	16	
<b>Çeşitli</b>						
Kloramfenikol	-	-	-	-	-	
Kolistin	4	4	-	Not <sup>A</sup>	Not <sup>A</sup>	A. MİK yöntemi kullanılmalıdır.
Daptomisin	-	-	-	-	-	
Fosfomisin iv <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	1. Kişisel görüşlere dayalı kanıt sokak tipi kökenlere (ECOFF: ST ≤ 128 mg/L) bağlı enfeksiyonların fosfomisin ve diğer antimikrobiklerin kombine kullanımı ile tedavi edilebileceğini önermektedir.
Fosfomisin oral	-	-	-	-	-	
Trimetoprim (sadece komplike olmayan İYE)	-	-	-	-	-	
Trimetoprim-sülfametoksazol	-	-	-	-	-	

## İlgili diğer UMS belgeleri

B-ÖY (Bakteriyoloji Örnek Yönetimi) 01-14

B-TP (Bakteriyoloji Test Prosedürleri) 01, 03, 16 ve 23

AMD TP (Antimikrobiyal Duyarlılık Test Prosedürleri)-01, 02, 03

## Kaynaklar

1. Hirsch EB, Tam VH. Impact of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res.* 2010;10:441-451.
2. Moland ES, Kim SY, Hong SG, Thomson KS. Newer  $\beta$ -lactamases: Clinical and laboratory implications, part1. *Clin Microbiol Newsl.* 2008;30:71-77.
3. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis.* 2005;40:1333-1341.
4. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation on MICs and zone diameters. Version 4.0, 2014. [http: www.eucast.org](http://www.eucast.org)
5. Performance Standarts for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Information Supplement M100-S23 Vol.33 No.1 Clinical and Laboratory Standards Institute 2013.
6. Henry, DA, Speert, DP (2010). *Pseudomonas*. Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW.(Eds). *Manual of Clin Microbiol* 10th ed. (p677-691). ASM pres, Washington.



T.C. Sağlık Bakanlığı

## ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

# ***Acinetobacter baumannii:* Tanımlanması ve AMD Testleri**

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu 11
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri (AMD)
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	AMD-MT-06
Sürüm No	1.0
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik
----------	-------	------------



# İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	3
GENEL BİLGİ .....	4
TEKNİK BİLGİLER .....	6
1 Hedef mikroorganizma .....	6
2 Tanı/tanımlama için asgari laboratuvar koşulları .....	6
3 Tanı/tanımlama teknikleri .....	7
4 AMD testleri.....	9
4.1. Disk Diffüzyon Yöntemi .....	9
4.2. Gradyent Test Yöntemi.....	9
4.3. Otomatize Sistem ile MIK saptanması.....	9
5 Raporlama.....	9
5.1. Raporlama, Yorumlamada Dikkat Edilecek Noktalar .....	10
EKLER.....	11
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	13
KAYNAKLAR.....	13

## Kapsam ve Amaç

Bu doküman klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının tanımlanması ve bu mikroorganizmaların yol açtığı enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek antibiyotiklerin in vitro duyarlılıklarının çalışılması için geçerli yöntemlerin değerlendirilmesi kriterlerini kapsamaktadır.

## Kısaltmalar ve Tanımlar

<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>ATPaz</b>	Adenozin trifosfataz
<b>CAMHB</b>	Cation Adjusted Mueller Hinton Broth
<b>CCUG</b>	Culture Collection Universtity of Göteborg
<b>CECT</b>	Spanish Type Culture Collection
<b>CLSI</b>	Clinical Laboratory Standards Institute
<b>CIP</b>	Collection de Institut Pasteur
<b>DSM</b>	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
<b>EMB</b>	Eozin Metilen Mavisi Agar
<b>EUCAST</b>	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
<b>MHA Agar</b>	Mueller-Hinton Agar
<b>MİK</b>	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
<b>NCTC</b>	National Collection of Type Cultures
<b>SF</b>	Serum Fizyolojik
<b>UMS</b>	Ulusal Mikrobiyoloji Standartları

## Genel Bilgi

*Acinetobacter* türleri Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarlarında, özellikle yoğun bakım hastalarında pnömoni ve dolaşım sistemi enfeksiyonlarında etken olarak izole edilen gram-negatif nonfermentatif mikroorganizmalar arasında *Pseudomonas aeruginosa*'dan sonra ikinci sırada yer almaktadır. Son yıllarda çoğul dirençli *Acinetobacter baumannii* suşlarının yol açtığı yüksek mortaliteyle seyreden enfeksiyonlarda artış görülmektedir.

Bazı *Acinetobacter* suşları, son seçenek olarak kabul edilen karbapenemler de dahil, aminoglikozidler, sefalosporinler ve kinolonlara dirençlidir. *A. baumannii* suşlarında beta laktamazlar, eflüks pompaları, dış membran porin kaybı ve hedef bölge mutasyonları gibi bilinen tüm mekanizmalarla antimikrobiyal ilaçlara direnç gelişmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalar sonucunda bu mekanizmalara yenileri eklenmiştir. Örneğin ATPaz geni içerisine entegre olan bir direnç adasının varlığı farklı *A. baumannii* suşlarında gösterilmiştir (1). Çoğul ilaç direnci bu mekanizmalardan birkaçının bir izolatta bulunması ya da tek bir güçlü direnç mekanizmasının varlığı sonucu meydana gelir. Çoğul ilaç dirençli *A. baumannii*'ler tüm dünyada giderek önem kazanmaktadır ve bunların yol açtığı enfeksiyonların tedavisinde sorun yaşanmaktadır. Bu hastalarda uygun olmayan empirik tedavi ve doğru tedavinin gecikmesi nedeniyle hastanede yatış süreleri uzamakta, enfeksiyon devam etmekte ve sonuç olarak mortalite artmaktadır (2).

*A. baumannii* suşlarında kromozomal ve indüklenebilir özellikte olan Amp C sefalosporinazlar, Ambler sınıf C'de yer alan  $\beta$ -laktamazlardır. Amp C  $\beta$ -laktamazlar penisilinler, sefalosporinler ve monobaktamları hidrolize eder. Bu  $\beta$ -laktamazlar, 3. kuşak sefalosporinleri parçalarken, 4. kuşak sefalosporinleri genellikle etkilemez. Genel olarak, Amp C  $\beta$ -laktamazlar klavulanik asit başta olmak üzere klasik GSBL inhibitörleri ile inhibe olmaz. *A. baumannii*'larda kromozomal Amp C  $\beta$ -laktamazların derepresyonu ya da aşırı üretimi sonucu başlangıçta duyarlı bulunan sefalosporinler ile  $\beta$ -laktam/ $\beta$ -laktamaz inhibitörlerine karşı tedavi sırasında yüksek düzey direnç gelişebilir (3).

Çoğul ilaç dirençli *P.aeruginosa*, *A.baumannii* suşlarına oldukça iyi etki gösteren kolistin ilk olarak 1952 yılında kullanılmaya başlanmıştır. Çoğul ilaç direnci taşıyan bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kolistin yaygın kullanımı sonucunda *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* suşlarında direnç geliştiği bildirilmiştir. Dirençli bakterilerin yol açtığı enfeksiyonların tedavisinde kolistin tek başına kullanımı, bu antibiyotiğe direnç gelişmesinde oldukça önemlidir. Bu nedenle kolistin dışında tüm antibiyotiklere dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde kolistin tek başına kullanılması yerine başka antibiyotiklerle kombine kullanımı tercih edilmelidir. Yapılan çalışmalarda kolistin gram negatif bakterilere karşı karbapenemlerle sinerji oluşturduğu gösterilmiştir. Bunların dışında kolistin seftazidim, rifampisin ve glikopeptidlerle sinerji oluşturduğu yönünde bildirimler de bulunmaktadır. Kolistin karbapenemlerle birlikte kullanıldığında, mikroorganizma sadece kolistine duyarlı olmasına karşın, karbapenem kullanımı sonucunda bakteri hücre duvarında ortaya çıkan kısmi harabiyet ile hücre membranı üzerindeki kolistin etkinliği zamana bağlı olarak artış göstermektedir. Bunun dışında kolistin kullanımının 14 günlük kullanım süresini aşması da kolistin direnci gelişmesinde önemli bir risk faktörüdür.

Bakteriyemilerde intravenöz kolistin kullanılmasıyla % 90'larda tedavi başarısına ulaşıldığı halde, pnömonilerde bu oran % 75 civarındadır. İntravenöz kullanımla

birlikte, aerosol şeklinde kullanım, intratekal ve intraventriküler kullanım da son dönemlerde giderek artış göstermektedir.

Öte yandan kolistin, ciddi enfeksiyonların tedavisinde günümüzde bir çok antibiyotiğin yetersiz kaldığı dirençli mikroorganizmalara karşı, mutlaka korunması ve endikasyon durumunda kombine kullanılması gereken bir antibiyotiktir(4).

Tigesiklin ise çoğul dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde alternatif ilaç seçeneklerinden biridir. Tigesiklinin, 1997 yılından beri yapılan çok sayıda araştırmada, çoğul dirençli *A. baumannii* suşlarında etkili olduğu gösterilmiştir. Öte yandan *P. aeruginosa*'ya aktivitesinin olmaması ve serumda düşük seviyede bulunması tigesiklin kullanımını kısıtlamaktadır (5).

*A.baumannii*'nin etken olarak izole edildiği enfeksiyonlarda duyarlılık testleri sonucu elde edilen veriler EUCAST standartları doğrultusunda değerlendirilerek raporlanmalıdır (6). CLSI standartlarını kullanan laboratuvarlar için Performance Standarts for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Information Supplement M100-S23 Vol.33 No.1 Clinical and Laboratory Standards Institute 2013 veya güncel CLSI dökümanı referans alınmalıdır (7).

*A. baumannii* izolatlarında bölgesel direnç oranlarının bilinmesi, lokal ve bölgesel enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması enfeksiyonların zamanında doğru olarak tanımlanması ve klinik ve enfeksiyon kontrol birimlerinin bilgilendirilip, uyarılması ile mümkündür. Çalışılan birimdeki direnç eğilimlerinin bilinmesi ve akılcı antibiyotik kullanımının teşvik edilmesi son derece önemlidir.

# Teknik Bilgiler

## 1 Hedef mikroorganizma

*Acinetobacter baumannii*

## 2 Tanı/tanımlama için asgari laboratuvar koşulları

### 2.1. Laboratuvar güvenliği

*A.baumannii* ile ilgili işlemler asgari Biyogüvenlik düzeyi 2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Kültür incelemesi için gönderilen tüm örnekler enfeksiyöz kabul edilmeli, 'standart önlemler' uygulanmalı, laboratuvar çalışmaları biyogüvenlik düzeyine uygun biyolojik güvenlik kabininde gerçekleştirilmelidir.

### 2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Hedef mikroorganizmalarla çalışacak personelin; en az Sağlık Meslek Yüksek Okulu mezunu sağlık tekniker veya sağlık meslek liselerinin tıbbi laboratuvar programından mezun olan sağlık teknisyeni statüsünde, biyogüvenlik eğitimi almış ve bakteriyoloji laboratuvarında en az bir aylık eğitim sürecini tamamlamış olması gereklidir.

### 2.3. Örnek, Ayıraç, Kit, Ekipman

#### İnceleme örneği

- İdrar
- Yara
  - a) Yanık
  - b) Dış kulak yolu sürüntü
  - c) Doku
  - d) Apse
  - e) Aspirasyon
- Kan
  - a) Yenidoğanlar
  - b) İmmünespresif hastalar
  - c) Yanık hastaları
- BOS
- Solunum yolu örnekleri
  - a) Balgam
  - b) Bronkoalveolar lavaj
  - c) Trakeal aspirat

- Steril vücut sıvıları

### Besiyeri / Ayıraç

Örnek ekimi için:

- Kanlı agar (%5 koyun kanlı)
- Mac Conkey agar veya EMB agar, çukulata agar (invazif örnekler) (Bkz. B-ÖY-01-14)

Antimikrobiyal duyarlılık testi için:

- Mueller Hinton agar
- Otomatize sistemler
- Diğer malzeme (Bkz. AMD-TP-03)
- Kanlı agar, Mac Conkey agar ve Mueller Hinton agar besiyerleri - Ticari olarak piyasadan hazır temin edilebilir ya da laboratuvarında AMD-TP-01 dokümanından yararlanılarak hazırlanabilir.

## 2.4. Kalite kontrol

- *A. baumannii* izolatlarının tanımlanmasında kullanılan tüm besiyeri ve ayıraçlar için iç kalite kontrolü yapılmalıdır.
- Kalite kontrol testleri ve bu testlerde kullanılan kalite kontrol suşları, ilgili tanımlama testlerinin altında yer almaktadır. (Daha ayrıntılı bilgi için Bkz. B-TP-01-23)
- Antimikrobiyal duyarlılık test sonuçlarının doğruluğu ve geçerliliği EUCAST standartında yer alan en az bir standart *P. aeruginosa* suşu ile çalışılarak ilgili standartta ifade edilen değerler aralığında sonuçların alınması ile kanıtlanmalıdır (5).
- Kalite kontrol suşu olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanılması önerilir (5).
- *E. coli* ATCC 35218 ( $\beta$ -laktam/  $\beta$ -laktamaz inhibitör konsantrasyonları için) (6).
- Alternatif olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853, NCTC 12934, CIP 76110, DSM 1117, CCUG 17619, CECT standart suşları da kalite kontrol amacıyla kullanılabilir (5).

## 3 Tanı/tanımlama teknikleri

Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarları, otomatize sistem kullansa da bakteri tanımlamada önce şu basamakları yerine getirmelidir:

### 3.1. Mikroskopi (bütün mikroskopik teknikler)

Hedef mikroorganizmalar, gelen örnek veya üreyen kültürden hazırlanan preparatın Gram boyalı mikroskopik incelemesinde gram negatif kokobasil, kok olarak görülür (Bkz.B-TP-03).

İlk izolasyonda ve bir günlük taze kültürlerinde kokobasil formunda olup, sub kültürlerinde veya penisilinli ortamda ürediklerinde çomak şeklinde görülürler. Vücut sıvılarında ve katı besiyerlerinde daha çok diplokok şeklindedirler. Basil şeklinde de

olabilir, bazen gram pozitif görülebilirler. Özellikle kan kültürlerinden izole edildiğinde örnekten ilk boyandığında gram pozitif olarak değerlendirilebilir (1).

*A. baumannii* hareketsizdir.

### 3.2. Kültür

Toprak ve suda yaygın olan zaman zaman deriden, mukoza zarlarından, sekresyonlardan ve hastane ortamından izole edilen aerop gram negatif bakterilerdir. 30-35<sup>0</sup> C'da ürer. Bir çok besiyerinde kolayca ürer. Kanlı agarda hemolizsiz gri, opak S koloniler yaparken, Mac Conkey agarda renksiz koloniler oluşturur (1).

### 3.3. Biyokimyasal testler

*A. baumannii* oksidaz negatiftir.

*A.baumannii* klinik örneklerden izole edildikleri zaman çoğunlukla glukoz pozitif, non-hemolitik , oksidaz negatif, hareketsiz bakterilerdir. *A. baumannii* 44<sup>0</sup> C'da üreyebilir.

Çoğu ticari tanımlama kiti *Acinetobacter* türlerini diğer non-fermenterler ve *Enterobacteriaceae*'den ayırt edebilir. Öte yandan güvenilir sonuçlar vermeyebileceğinden klinik ya da epidemiyolojik olarak önem taşıyan suşlar referans laboratuvara gönderilmelidir.

### 3.4. Moleküler

Antimikrobiyal direnç araştırmaları ve epidemiyolojik çalışmalarda moleküler yöntemler kullanılmaktadır.

### 3.5. Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması

Koloni morfolojisi, Gram boyama sonucu, oksidaz ve katalaz negatifliği ile *Acinetobacter* türleri tanımlanır.

### 3.6. Saklama, Referans merkeze gönderme

İnvazif *A. baumannii* izolatları gibi, toplum ve hastane kökenli infeksiyonlar açısından önemli mikroorganizmaların stoklanması, klinisyen tarafından istenebilecek ve etkene yönelik yeni bir işlemin yapılmasını (örneğin antibiyotik MİK değerlerinin belirlenmesi gibi) sağlamaktadır. Bunun dışında özellikle hastane infeksiyonlarında geriye dönük salgın incelemesi ve moleküler tiplendirme yapılabilmesi için bakteriler 6 ay dondurularak saklanmaktadır. Ayrıca doğal direnç ve beklenmeyen direnç fenotipleri saptandığında da, mikroorganizma tanımlaması ve duyarlılık testi sonucu doğrulandıktan sonra suşlar saklanmalı ve uygun yöntemlerle referans laboratuvara gönderilerek doğrulanmalıdır. (Bkz. AMD-MT-04)

## 4 AMD testleri

### 4.1. Disk Diffüzyon Yöntemi

*A. baumannii* izolatlarında antimikrobiyal duyarlılık testleri disk difüzyon yöntemi, gradiyent yöntemi, otomatize sistemler gibi farklı yöntemlerle çalışıldıktan sonra, sonuçlar uygun standartlara göre yorumlanarak raporlanır.

Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi AMD-TP-03 dokümanına uygun olarak hazırlanıp değerlendirilir.

Kanlı agar besiyerinde bir gecelik inkübasyon sonrası üreyen kolonilerden steril öze veya pamuk eküvyon ile steril SF çözeltisinde veya MH sıvı besiyeri içinde bir süspansiyon hazırlanır.

*A.baumannii*, tercihen kanlı agar plaktan McFarland 0.5 standart yoğunluğunda hazırlanmalıdır. Süspansiyonun yoğunluğunu ayarlamakta fotometrik bir cihaz kullanılması önerilmektedir. Fotometrik cihaz, üretici firmanın önerileri doğrultusunda kalibre edilerek kullanılmalıdır.

Alternatif olarak, süspansiyonun bulanıklığı görsel olarak da McFarland 0.5 bulanıklık standardı ile karşılaştırılır (Bkz. AMD-TP-02).

Plaklar 16-20 saat 35°C sıcaklıkta inkübe edildikten sonra antimikrobiyal duyarlılık test sonucu için zon çapları değerlendirilmelidir.

Değerlendirme: 150 mm'lik plakta maksimum 12; 100 mm'lik plakta ise maksimum 5 disk test edilir. İnkübasyon sonrası inhibisyon zonu sınırı, yansıyan ışıkla aydınlatılmış siyah bir zemin üzerinde plağa tersinden bakıldığında, çıplak gözle görülebilir üremenin bittiği çizgi olarak kabul edilir.

Kullanılması önerilen disk içerikleri, sınır değerler ve kalite kontrol tablosu <http://www.eucast.org> adresinde yer almaktadır (5).

### 4.2. Gradiyent Test Yöntemi

Kolistin duyarlılık araştırması için gradiyent test yöntemi kullanılır. MİK saptama yöntemleri (AMD-TP-04) dokümanı esas alınarak çalışılır.

### 4.3. Otomatize Sistem ile MİK saptanması

Üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışılarak saptanan değerler sistemin veri tabanından seçilecek CLSI veya EUCAST standartlarına göre yorumlanması sağlanır.

## 5 Raporlama

İdrar, solunum yolu ve yara örneklerinde kolonizasyon/kontaminasyon dışındaki tüm sonuçlar ile kan, BOS ve diğer steril vücut sıvılarından izole edilen tüm suşlar rapor edilir.



## 5.1.Raporlama, Yorumlamada Dikkat Edilecek Noktalar

- *Acinetobacter baumannii*'nin doğal dirençli olduğu diğer antimikrobiyaller ile beklenmeyen direnç fenotipleri AMD-TB-03 belgesinde bildirilmiştir. Beklenmeyen direnç fenotipleri ile doğal direnç ile uyumsuz sonuçlar saptandığında mikroorganizma tanımlama ve antimikrobiyal duyarlılık test sonucu doğrulanmalıdır.
- Antimikrobiyal duyarlılık testinde dilüsyon yöntemleri kullanılacaksa CLSI 2013'ün önerisi: Buyyon dilüsyon için CAMHB, agar dilüsyon için MHA kullanılması ve 18±2 saat inkübasyon yapılmasıdır (7).
- Klinik olarak önemli enfeksiyonlar tek ilaçla tedavi edilmemelidir. Tek ilaç kullanıldığında kolayca direnç geliştirebilir. Yapısal olarak *AmpC* bulunduğundan tedavinin 3. gününde kullanılan beta-laktam antibiyotiklere direnç geliştirebilir.
- CLSI'da *Acinetobacter spp.* için tikarsilin, piperasilin ve bunların β-laktamaz inhibitörlü kombinasyonları için disk difüzyon ve MİK sınır değerleri belirtilmesine karşın, EUCAST'de hepsi için yeterli kanıt bulunmadığı belirtilmektedir.
- *A. baumannii* ampisiline doğal dirençli olmasına karşın, ampisilin-sulbaktama sulbaktamın etkisinden dolayı duyarlı olabilir.
- Trimetoprim ve sülfonamidlerle, besiyerindeki antagonistler nedeniyle hafif bir üreme görülebilir. %80 inhibisyon varlığında sonuç duyarlı olarak değerlendirilir.
- Trimetoprim-sülfametoksazol MİK sınır değerleri CLSI'da kombinasyon olarak belirtilirken, EUCAST'de trimetoprim konsantrasyonu olarak ifade edilir.
- *Acinetobacter spp.*'de CLSI dokümanında tetrasiklinler için disk zon çapı ve MİK değerleri belirtilmiş olmakla birlikte EUCAST dokümanlarında tetrasiklinler ile ilgili kanıtların yetersiz olduğu belirtilmektedir. CLSI dokümanlarında tetrasiklinlere duyarlı mikroorganizmalar doksisisiklin ve minosikline de duyarlıdır. Öte yandan tetrasiklinlere orta duyarlı ya da dirençli olan bazı mikroorganizmalar doksisisiklin ve/veya minosiklinlere duyarlı olabilir (5,7).
- Tigesiklin için CLSI dolümanında disk difüzyon ya da MİK ile ilgili herhangi bir sınır değer bulunmazken, EUCAST'ın 'MİK ve zon çapı değerlendirmek için sınır değer tabloları'na göre: Bu ilaçla tedavi için söz konusu türün iyi bir hedef olup olmadığı hakkında yetersiz kanıt bulunduğunu belirtir. S, I veya R kategorileri belirtilmeden, bir yorum eşliğinde MİK değeri bildirilebilir (5). Tigesiklin test edildiğinde MİK değeri belirtilerek yukarıdaki notun rapora eklenmesi uygundur.
- Kolistin duyarlılık testi disk difüzyon yöntemi ile yapılmamalıdır, MİK yöntemi kullanılmalı ve CLSI'ya göre MİK≥8 µg/ml, EUCAST'e göre ise MİK>2 µg/ml dirençli olarak yorumlanmalıdır (5,7).
- Kolistine direnç *A. baumannii*'de beklenmeyen direnç fenotiplerindedir. Saptanıldığında izolata ve antimikrobiyal direncin doğrulanması gereklidir.

## Ekler

### Ek-1 Acinetobacter baumannii EUCAST Klinik Sınır Değer Tablosu

	MİK sınır değeri (mg/L)		Disk içeriği (µg)	Zon çapı sınır değeri (mm)		Notlar Sayı ile belirtilen notlar MİK sınır değerleri ile ilişkilidir. Harf ile belirtilen notlar zon çapı sınır değerleri ile ilişkilidir.
	S ≤	R >		S ≥	R <	
<b>Penisilinler<sup>1</sup></b>						1. Acinetobacter spp.'nin penisilinlere duyarlılık için test edilmesi güvenilir değildir. Acinetobacter spp. çoğu durumda penisilinlere dirençlidir.
Benzilpenisilin	-	-		-	-	
Ampisilin	-	-		-	-	
Ampisilin-sulbaktam	YK	YK		YK	YK	
Amoksisilin	-	-		-	-	
Amoksisilin-klavulanat	-	-		-	-	
Piperasilin	YK	YK		YK	YK	
Piperasilin-tazobaktam	YK	YK		YK	YK	
Tikarsilin	YK	YK		YK	YK	
Tikarsilin-klavulanat	YK	YK		YK	YK	
<b>Sefalosporinler</b>						
Sefepim	-	-		-	-	
Sefotaksim	-	-		-	-	
Seftazidim	-	-		-	-	
<b>Karbapenemler</b>						
Doripenem	1	4	10	21	15	
Ertapenem	-	-		-	-	
İmipenem	2	8	10	23	17	
Meropenem	2	8	10	21	15	
<b>Monobaktamlar</b>						
Aztreonam	-	-		-	-	
<b>Florokinolonlar</b>						
Siprofloksasin	1	1	5	21	21	
Levofloksasin	1	2	5	21	18	
Moksifloksasin	-	-		-	-	
Nalidiksik asit (tarama)	UD	UD		UD	UD	
Norfloksasin	-	-		-	-	
Ofloksasin	-	-		-	-	
<b>Aminoglikozidler<sup>1</sup></b>						
Amikasin	8	16	30	18	15	
Gentamisin	4	4	10	17	17	
Netilmisin	4	4	10	16	16	
Tobramisin	4	4	10	17	17	
<b>Tetrasiklinler</b>						
Doksisiklin	-	-		-	-	
Minosiklin	YK	YK		YK	YK	

	MİK sınır değeri (mg/L)		Disk içeriği (µg)	Zon çapı sınır değeri (mm)		Notlar Sayı ile belirtilen notlar MİK sınır değerleri ile ilişkilidir. Harf ile belirtilen notlar zon çapı sınır değerleri ile ilişkilidir.
	S ≤	R >		S ≥	R <	
Tetrasiklin	-	-	-	-		
Tigesiklin	YK	YK	YK	YK		
<b>Çeşitli</b>						
Kloramfenikol	-	-	-	-		
Kolistin	2	2	Not <sup>A</sup>	Not <sup>A</sup>	<b>A.</b> MİK yöntemi kullanılmalıdır.	
Fosfomisin iv	-	-	-	-		
Fosfomisin oral	-	-	-	-		
Trimetoprim (sadece komplike olmayan İYE)	-	-	-	-		
Trimetoprim-sülfametoksazol <sup>1</sup>	2	4	<b>1.25-23.75</b>	16	13	<b>1.</b> Trimetoprim:sülfametoksazol oranı 1:19. Sınır değerler trimetoprim konsantrasyonu olarak ifade edilir.

[www.eucast.org](http://www.eucast.org): EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing - Version 3.0 (April 2013)

## İlgili diğer UMS belgeleri

B-ÖY (Bakteriyoloji Örnek Yönetimi)-01-14

AMD-TP (Antimikrobiyal Duyarlılık Test Prosedürleri) -02, 03

B-TP(bakteriyoloji Test Prosedürleri )- 01-23

AMD-MT (Antimikrobiyal Duyarlılık Mikrobiyolojik Tanı)-04

## Kaynaklar

1. Vanechoutte M, Dijkshoorn L, Nemec A, Kampf P, Wauters G (2010). *Acinetobacter, Chryseobacterium, Moraxella*, and other non fermentative gram-negative rods. Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW.(Eds). *Manual of Clin Microbiol* 10th ed.(p714-738). ASM pres, Washington
2. Coelho MJ, Turton JF, Kaufmann ME, et al. Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and Southeast England. *J Clin Microbiol*. 2006;44:3623-3627.
3. Moland ES, Kim SY, Hong SG, Thomson GS. Newer  $\beta$ -lactamases: Clinical and laboratory implication, part1. *Clin Microbiol Newsl*. 2008;30:71-77.
4. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 2005;40:1333-1341.
5. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation on MICs and zone diameters. Version 4.0, 2014. [http: www.eucast.org](http://www.eucast.org)
6. Özgür Akın FE, Bayram A, Balcı İ. Çoğul dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarında kolistin, polimiksin B ve tigesiklin direncinin saptanmasında disk difüzyon, E-test ve buyyon mikrodilüsyon yöntemlerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul*. 2010;44:203-210.
7. Performance Standarts for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Information Supplement M100-S23 Vol.33 No.1 *Clinical and Laboratory Standards Institue* 2013.

## ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

# Antimikrobiyal Duyarlılık (AMD) Testlerinde Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu 11
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri (AMD)
Bölüm	Test prosedürleri
Standart No	AMD-TP-01
Sürüm No	1.0
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

# İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	3
GENEL BİLGİ .....	4
TEKNİK BİLGİLER .....	4
1 Asgari laboratuvar koşulları .....	4
1.1. Laboratuvar güvenliği .....	4
1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri.....	4
1.3. Reajen, Kit, Ekipman .....	4
2 Besiyerlerinin hazırlanması.....	5
2.1. Mueller-Hinton Agar besiyeri yapılışı.....	5
2.2. Mueller-Hinton sıvı besiyeri (MHB) yapılışı.....	6
2.3. Mueller-Hinton–Fastidious (MH-F) agar besiyeri yapılışı ...	6
2.4. Mueller-Hinton–Fastidious (MH-F) sıvı besiyeri yapılışı ....	7
2.5. Koyun kanlı (%5) Mueller-Hinton agar besiyeri yapılışı....	8
2.6. <i>Haemophilus</i> test (HTM) agar besiyeri yapılışı.....	8
2.7. GC Agar (+ %1 Defibrine Üreme Katkısı) besiyeri yapılışı	8
3 Kalite kontrol .....	9
3.1. Sterilite kontrolleri .....	9
3.2. pH .....	9
3.3. Agar Kalınlığı .....	10
3.4. Kalite Kontrol Suşları ile Performans testi.....	10
3.5. Görünüm .....	10
4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	11
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	12
KAYNAKLAR.....	12

## Kapsam ve Amaç

Bu test prosedürü, kolay üreyen bakteriler ve güç üreyen bakterilerin antimikrobiyal duyarlılık testlerinde kullanılan özgül katı ve sıvı besiyerlerinin hazırlanması için yapılan işlemleri kapsamaktadır.

Antimikrobiyal duyarlılık testlerinde kullanılan besiyerlerinin, mikroorganizmaları üretebilmek için gereksinim duyulan üreme ortamını sağlaması yanında, tekrarlanabilir duyarlılık test sonuçları verebilmesi, sülfonamid, trimetoprim ve tetrasiklin inhibitörünün düşük düzeyde olması gereklidir.

## Kısaltmalar ve Tanımlar

<b>ATCC</b>	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection) <a href="http://www.atcc.org">http://www.atcc.org</a>
<b>CLSI</b>	Amerika Birleşik Devletleri "Clinical Laboratory Standarts Institute" <a href="http://www.clsi.org">www.clsi.org</a>
<b>EUCAST</b>	Antimikrobiyel Duyarlılık Testi ile ilgili Avrupa Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) <a href="http://www.eucast.org">http://www.eucast.org</a>
<b>GC Agar</b>	Gonococci Agar
<b>HTM agar</b>	Haemophilus Test besiyeri
<b>MHA</b>	Muller-Hinton agar
<b>MHB</b>	Mueller-Hinton sıvı besiyeri
<b>MH-F</b>	Muller-Hinton agar –Fastidious (zor üreyen organizmalar) (5% defibrine at kanı ve 20 mg/L $\beta$ -NAD eklenmiş MH)
<b><math>\beta</math>-NAD</b>	$\beta$ -Nikotinamid adenin dinukleotid

## Genel Bilgi

Kolay üreyen bakterilerin disk difüzyon, agar dilüsyon, gradient test ve sıvı mikrodilüsyon duyarlılık testleri için CLSI ve EUCAST Standartları tarafından en uygun besiyeri olarak Mueller-Hinton Agar (MHA) ve Mueller-Hinton sıvı besiyeri (MHB) önerilmektedir (1 2 3). Bunun nedenleri; değişik üretim serileri ile tekrar edilebilir duyarlılık test sonuçları elde edilebilmesi, sülfonamid, trimetoprim ve tetrasiklin inhibitörü içeriğinin düşük düzeyde olması, kolay üreyen bakterilerin büyük çoğunluğu için yeterli üremeyi sağlayabilmesi ve bu besiyeri ile yapılmış duyarlılık test sonuçları ile ilgili yeterli deneyim ve bilgi birikimi olmasıdır (2).

Güç üreyen bakterilerin duyarlılık testlerinde ise; CLSI ve EUCAST Standartları tarafından önerilen besiyerlerinde farklılıklar vardır. CLSI Standartlarına göre *Streptococcus pneumoniae* ve diğer Streptokoklar için %5 koyun kanlı MHA, *Haemophilus* spp. için Haemophilus Test besiyeri (HTM agar), *Neisseria gonorrhoeae* ve *Neisseria meningitidis* için %1 üreme katkısı eklenmiş GC Agar besiyerleri önerilmektedir (1,2). EUCAST Standartlarında ise tüm güç üreyen bakteriler (*Streptococcus pneumoniae* dahil *Streptococcus* spp., *Haemophilus* spp., *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* ve *coli*, *Pasteurella multocida* ve daha birçok güç üreyen mikroorganizmalar) için %5 defibrine at kanı ve  $\beta$ -NAD eklenmiş MH-F agar kullanılması önerilmektedir (3).

Bu besiyerleri ticari olarak hazır bulunan dehidrate içeriklerle hazırlanır.

## Teknik Bilgiler

### 1 Asgari laboratuvar koşulları

#### 1.1. Laboratuvar güvenliği

Besiyerlerinin hazırlanması sırasında Biyogüvenlik düzeyi-1 için belirtilen güvenli laboratuvar çalışma yöntem ve uygulama kurallarına uygun olarak çalışılır.

#### 1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Besiyeri hazırlanmasında görev alacak personelin; en az Sağlık Meslek Yüksek Okulu mezunu sağlık tekniker veya sağlık meslek liselerinin tıbbi laboratuvar programından mezun olan sağlık teknisyeni statüsünde, biyogüvenlik eğitimi almış ve bakteriyoloji laboratuvarında en az bir aylık eğitim sürecini tamamlamış olması gereklidir.

#### 1.3. Reajen, Kit, Ekipman

##### 1.3.1. Besiyeri / Reajen

Mueller-Hinton agar (MHA), Mueller-Hinton sıvı besiyeri (MHB) ve Mueller-



Hinton–Fastidious (MH-F) agar besiyerleri ticari olarak piyasadan hazır temin edilebilir, ya da laboratuvarında hazırlanabilir.

a) Distile (veya deiyonize) su (Oda ısısında saklanır)

b) Dehidrate Mueller-Hinton agar (Oda ısısında saklanır)

c) Dehidrate sıvı Mueller-Hinton (Oda ısısında saklanır)

d) Katkıları ve ilaveler:

- Mekanik olarak defibrine edilmiş at kanı (2-8°C'de saklanır)
- Mekanik olarak defibrine edilmiş koyun kanı (2-8°C'de saklanır)
- $\beta$ -Nicotinamide adenine dinucleotide ( $\beta$ -NAD) solüsyonu tozu, saflık  $\geq 98\%$ . (Oda ısısında saklanır)
- Hematin tozu (sığır hematini) (2-8°C'de saklanır)
- Maya özütü (Oda ısısında saklanır)
- GC Agar %1 üreme katkısı (2-8°C'de saklanır)
- 1 N NaOH (Oda ısısında saklanır)
- 1 N HCl (Oda ısısında saklanır)
- Katyonlar ( $\text{Ca}^{2+}$  ve  $\text{Mg}^{2+}$ )

### 1.3.2. Diğer materyal, ekipman

a) Cihazlar: Buzdolabı (2-8°C), hassas terazi, pH metre, otoklav,  $48 \pm 2^\circ\text{C}$  ayarlı su banyosu, , sıcak ısı bloğu yada ısıtıcı, yüksek devirli santrifüj (lize at kanını hazırlamak için), otomatik dağıtıcı cihazı (pipetboy), bunzen beki

b) Gereçler: Tartı kağıdı veya tartı kabı, spatula, petri kapları (100 ve 150 mm), steril kapaklı tüpler, hacim ayarlı erlenmayerler ve değişik boyutlarda şişeler, yüksek santrifüj devrine dayanıklı steril tüpler (lize at kanı hazırlamak için), membran filtreler (por büyüklüğü 0.22 ve 0.45 $\mu\text{m}$ ), ölçekli silindirler, manyetik karıştırıcı ve çubuklar, steril pipetler

## 2 Besiyerlerinin hazırlanması

### 2.1. Mueller-Hinton Agar besiyeri yapılışı

Bu yöntem 1 litre besiyerinin ticari olarak bulunan dehidrate MHA tozu ile hazırlanmasını tarif eder, diğer hacimlere göre değiştirip uygulanabilir.

- Uygun miktarda dehidrate Mueller-Hinton agar tozunu tartılır (kutunun üzerinde yazan üretici firmanın önerileri doğrultusunda) ve 2 litrelik erlenmayere koyulur.
- Bir litre distile su ekleyerek tozu eritmek için çalkalanır.
- Manyetik karıştırıcısı olan sıcak ısı bloğuna (ya da herhangi bir ısıtıcı alete) koyarak tozu eritene kadar ısıtılır.
- pH ayarı yapılır (kabul edilebilen aralık 7.2 ile 7.4'tür).
- Gevşek şekilde erlenmayerin ağzını kapatılır ve  $121^\circ\text{C}$ 'de 15 dakika otoklavlanır.
- $48 \pm 2^\circ\text{C}$ 'deki su banyosunda soğutulur.
- Steril bir ortamda, steril plaklara besiyerinin kalınlığı 4 mm  $\pm$  0.5 mm olacak şekilde dağıtılmalıdır (yaklaşık 90 mm'lik dairesel plakta 25 mL,

100 mm dairesel plakta 31 mL, 150 mm dairesel plakta 71 mL).

- Erimiş agar yüzeyinde oluşan baloncukları bunzen bekinin alevini agarın yüzeyinden hızla (ve dikkatlice) geçirerek yok edilebilir.
- Plak kapaklarını tam kapatmadan oda ısısında katılaşmasını sağlar. Hazırlanan plaklar etiketlenerek 4-8°C'de ağzı kapalı plastik paketlerde depolanmalıdır.
- Ticari olarak hazırlanmış plaklar, üreticinin önerileri doğrultusunda saklanmalı ve son kullanma tarihini geçirmeden kullanılmalıdır (4)

## 2.2. Mueller-Hinton sıvı besiyeri (MHB) yapılışı

Bu yöntem 1 litre besiyerinin ticari olarak bulunan dehidrate Mueller-Hinton sıvı besiyeri (MHB) tozu ile hazırlanmasını tarif eder, diğer hacimlere göre değiştirip uygulanabilir.

- Uygun miktarda dehidrate MHB tozunu tartılarak (kutunun üzerinde yazan üretici firmanın önerileri doğrultusunda) ve 2 litrelik erlenmayere konulur.
- Bir litre distile su eklenerek tozu eritmek için çalkalanır.
- Manyetik karıştırıcısı olan sıcak ısı bloğuna (yada herhangi bir ısıtıcı alete) konularak toz eritene kadar ısıtılır.
- pH ayarı yapılır (kabul edilebilen aralık 7.2 ile 7.4'tür).
- Gevşek şekilde erlenmayerin ağzını kapatılır ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanır.
- Oda ısısında soğutulularak steril ortamda istenilen miktarlarda kapaklı steril cam şişelere dağıtılır ve etiketlenerek 4-8°C'de saklanır.
- Besiyerine özgül katyon içeriğinin etikette yazılan kadar olması kontrol edilmelidir (4)

## 2.3. Mueller-Hinton-Fastidious (MH-F) agar besiyeri yapılışı

### 2.3.1. $\beta$ -NAD stok solüsyonunun hazırlanması:

- $\beta$ -NADyi 20 mg/mL konsantrasyonunda olacak şekilde steril deiyonize su içinde eritilir.
- 0.2  $\mu$ m' lik membran filtre ile solüsyonu steril edilir.
- Stok solüsyonu alikotlanarak -20°C de saklanır ve gerektiğinde çözülerek kullanılır, artan solüsyon tekrar dondurulmamalıdır.

### 2.3.2. Agar plaklarının hazırlanması:

- Üreticinin talimatları doğrultusunda MHA hazırlanır ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanır.

- $48\pm 2$  °C'deki su banyosunda soğutulur.
- MH-F için, besiyerine litre başına aseptik şartlarda mekanik olarak defibrine edilmiş 50 mL at kanı ve 1 mL  $\beta$ -NAD stok solüsyonundan eklenerek iyice karıştırılır ve hemen plaklara dökülür.
- Besiyeri steril petri plaklarına derinliği  $4 \pm 0.5$  mm (yaklaşık 90 mm'lik yuvarlak plaklar için 25 mL, 100 mm'lik yuvarlak plaklar için 31 mL, 150 mm'lik yuvarlak plaklar için 71 mL, 100 mm kare plaklar içinse 40 mL ) olacak şekilde dökülmelidir.
- Erimiş agar yüzeyinde oluşan baloncuklar bunzen bekinin alevini agarın yüzeyinden hızla (ve dikkatlice) geçirerek giderilebilir.
- Plak kapaklarını tam kapatmadan oda ısısında katılaşması sağlanır.

### 2.3.3. Agar plaklarının depolanması:

- Hazırlanan plaklar etiketlenerek  $4-8^{\circ}\text{C}$ 'de ağzı kapalı plastik paketlerde depolanmalıdır.
- Ticari olarak hazırlanmış plaklar, üreticinin önerileri doğrultusunda saklanmalı ve son kullanma tarihini geçirmeden kullanılmalıdır (3).

## 2.4. Mueller-Hinton–Fastidious (MH-F) sıvı besiyeri yapılışı

### 2.4.1. %50 lize at kanı stok solüsyonunun hazırlanışı:

- At kanını eşit miktarda steril deiyonize su ile aseptik şartlarda seyreltilir.
- Kan  $-20^{\circ}\text{C}$  de bir gece dondurulur ve çözülür. Bu döngü hücreler tam olarak lize oluncaya kadar tekrarlanır. (üç döngü genelde yeterlidir ancak ISO standardı 20776-1'de yedi döngüye kadar uygulama önerir).
- %50 lize at kanı santrifüj ile netleştirilir.
- Stok solüsyonunu alikotlanarak  $-20^{\circ}\text{C}$  de tutulur ve gerektiğinde çözülerek kullanılır. Artan solüsyon tekrar dondurulmamalıdır.

### 2.4.2. $\beta$ -NAD stok solüsyonunun hazırlanması:

- $\beta$ -NADyi 20 mg/mL konsantrasyonunda olacak şekilde steril deiyonize su içinde eritilir .
- $2\ \mu\text{m}$ ' lik membran filtre ile solüsyon steril edilir.
- Stok solüsyonunu alikotlanarak  $-20^{\circ}\text{C}$  de tutulur ve gerektiğinde çözülür. Artan solüsyon tekrar dondurulmamalıdır.

### 2.4.3. MH-F sıvı besiyerinin hazırlanması:

- Üreticinin talimatları doğrultusunda katyon ayarlı MHB hazırlanır ve otoklavlanır, ancak lize at kanı ekleyebilmek için litre başına 100 mL daha az deiyonize su kullanılmalıdır.
- Besiyeri  $42-45^{\circ}\text{C}$  ye soğutulur.
- Besiyerine litre başına aseptik şekilde 100 mL 50% lize at kanı ve 1 mL  $\beta$ -NAD stok solüsyonu eklenerek karıştırılır.
- Hazırlanmış olan MH-F besiyeri kapaklı steril cam şişelere dağıtılır.

#### 2.4.4. MH-F sıvı besiyerinin depolanması:

- MH-F sıvı besiyeri 4-8°C'de saklanmalıdır.
- Stok şartları ve raf ömrü laboratuvar kalite güvencesi programının kapsamında belirlenmelidir. Beklenen raf ömrü 6 aydır (3).

#### 2.5. Koyun kanlı (%5) Mueller-Hinton agar besiyeri yapılışı

Bu besiyeri *Streptococcus pneumoniae* ve diğer Streptokoklar için CLSI tarafından önerilmektedir.

- 2.1 numaralı başlıkta tarif edildiği gibi 1 litre Mueller-Hinton agar hazırlanır.
- Otoklavlandıktan sonra 45-50°C'ye soğutulmuş agar içine 50 mL steril defibrile koyun kanı eklenir.
- Karıştırmak için nazıkçe çalkalanarak plaklara dökülür.
- pH otoklavdan çıkan ve soğuyan besiyerine kanın aseptik bir şekilde eklenmesinden sonra ölçülür. pH MHA'daki gibi 7.2-7.4 arasında olmalıdır.
- Oda ısısında katılaşmasını bekledikten sonra hazırlanan plaklar etiketlenerek 4-8°C'de ağzı kapalı plastik paketlerde depolanmalıdır (4)

#### 2.6. Haemophilus test (HTM) agar besiyeri yapılışı

Bu besiyeri *Haemophilus* spp. için CLSI tarafından önerilmektedir.

- 50 mg hematin tozu 100mL 0.01 mol/L NaOH içinde ısıtılıp, toz tamamen eriyinceye kadar karıştırılarak taze bir hematin stok çözeltisi hazırlanır.
- 50 mg NAD 10 mL distile suda çözünüp filtrasyon ile steril edilerek NAD stok çözeltisi hazırlanır.
- Uygun miktarda dehidrate Mueller-Hinton agar tozunu tartılarak (kutunun üzerinde yazan üretici firmanın önerileri doğrultusunda) 2 litrelik erlenmayere konulur. Bir litre distile su eklenerek tozu eritmek için çalkalanır.
- Hazırlanmış olan MHA'a 5 g maya özütü ve 30mL hematin stok çözeltisi eklenir.
- Otoklavlandıktan sonra su banyosunda sonra 45-50°C'ye kadar soğutulur.
- NAD stok çözeltisinden 3 mL aseptik olarak eklenir. pH MHA'daki gibi 7.2-7.4 arasında olmalıdır.
- Oda ısısında katılaşmasını bekledikten sonra hazırlanan plaklar etiketlenerek 4-8°C'de ağzı kapalı plastik paketlerde depolanmalıdır (4)

#### 2.7. GC Agar (+ %1 Defibrine Üreme Katkısı) besiyeri yapılışı

Her litre için aşağıdaki bileşenleri içeren %1 tanımlanmış üreme katkısı kullanılmalıdır.

##### %1 Üreme Katkısı:

- 1.1 g L-sistin
- 0.03 g guanin HCL
- 0.003 g tiamin HCL

- 0.013 g *p*-aminobenzoik asit
- 0.01 g vitamin B<sub>12</sub>
- 0.1 g tiamin pirofosfat (kokarboksilaz)
- 0.25 g nikotinamid adenin dinükleotid (NAD)
- 1 g adenin
- 10 g L-glutamin
- 100 g glukoz
- 0.02 g ferrik nitrat ve
- 25.9 g L-sistein HCL

GC agar bazı, ticari olarak elde edilen dehidrate bazdan üreticinin önerilerine göre hazırlanır.

Otoklavlandıktan sonra su banyosunda sonra 45-50°C'ye kadar soğutulur.

%1 tanımlanmış üreme katkısından 10 mL eklenir. Karıştırılarak plaklara dökülür.

Oda ısısında katılaşmasını bekledikten sonra hazırlanan plakları etiketlenerek 4-8°C'de ağzı kapalı plastik paketlerde depolanır (4)

### 3 Kalite kontrol

Besiyerlerini hazırlarken aşağıdaki kontroller yapılmalıdır:

#### 3.1. Sterilite kontrolleri

Her yeni hazırlanan besiyeri partisinden %5-10 oranında örnek ayırıp 35°C'de 48 saat inkübe edilmelidir. Anlamlı bir kontaminasyon varsa (inkübe edilen besiyerlerinin  $\geq$ %10) tüm parti atılmalıdır. Sporadik kontaminasyonlar ise (örn: besiyerinin sadece birisi) önemsenmez.

#### 3.2. pH

Hazırlanan her yeni parti besiyeri için oda ısısına kadar soğuduğunda, pH kontrolü yapılmalıdır. Mueller-Hinton bazlı besiyerleri için kabul edilebilen aralık 7.2 ile 7.4'dür.

Agarların pH kontrolünü aşağıdaki yöntemlerden biriyle yapılmalıdır:

- Yüzey elektrodu kullanılabilir.
- Besiyeri nötral distile su içinde yumuşatılarak daldırma elektrodu kullanılabilir.
- pH metrenin elektrodları çevresinde agarın katılaşması sağlanarak ölçülebilir.

Sıvı besiyerleri için daldırma elektrodu sıvının içine yerleştirilerek ölçülmelidir.

### 3.3. Agar Kalınlığı

Her bir parti besiyerinden 2-5 plak seçerek kalınlığı kontrol edilmelidir. Agarın derinliğini ölçmek için 3,4 ve 5 mm işaretlenmiş steril kalibre problemleri kullanılabilir. Disk difüzyon için kabul edilebilen aralık  $4 \pm 0.5$  mm'dir.

### 3.4. Kalite Kontrol Suşları ile Performans testi

Her yeni besiyeri ve reagen lotu kullanıma sokulmadan önce pozitif ve negatif kalite kontrol suşları ile test edilmelidir. Tüm bakteri-antimikrobiyal ajan kombinasyonları için inhibisyon zonlarının kontrol sınırları içinde olduğu kontrol edilmelidir.

- Mueller-Hinton agar ve sıvı besiyeri performans testi için ;  
*Escherichia coli* ATCC 25922  
*Staphylococcus aureus* ATCC 25923  
*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (agar difüzyon)  
*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853  
*Enterococcus faecalis* ATCC 29212  
*Escherichia coli* ATCC 35218
- Mueller-Hinton-F agar ve sıvı besiyeri performans testi için;  
*Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619  
*Haemophilus influenzae* ATCC 49247  
*Haemophilus influenzae* ATCC 49766  
*N.gonorrhoeae* ATCC 49226
- Koyun kanlı (%5) Mueller-Hinton agar besiyeri performans testi için;  
*Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619
- *Haemophilus* test (HTM) agar besiyeri performans testi için;  
*Haemophilus influenzae* ATCC 49247  
*Haemophilus influenzae* ATCC 49766
- GC Agar (+ %1 Defibrine Üreme Katkısı) besiyeri performans testi için;  
*N.gonorrhoeae* ATCC 49226 kalite kontrol suşları kullanılmalıdır.

Olması gereken sonuçlar için Bkz. AMD-TP-03 Ek-1

### 3.5. Görünüm

Her kullanımdan önce besiyeri bulanıklık ve renk değişimi olup olmadığı yönünden kontrol edilmeli; bulanık veya renk değişikliği olmuş tüpler atılmalıdır. Çatlak, yırtık, yetersiz dolum, hava kabarcığı olup olmadığı

incelenmelidir (%3 den az olmalı). Ayrıca hemoliz ve donmuş olup olmaması açısından incelenmelidir (4).

## 4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Bazen katkılar test edilecek antimikrobiyal ajanları inaktive edebilir. Üzerinde çok çalışma yapılmamış katkılar dikkatli kullanılmalıdır. Hasta örneklerini çalışmadan önce daima kalite kontrol referans suşları ile besiyerini test ediniz. Testin geçerli olabilmesi için sonuçların özgül sınırlar içinde olması gerekir.
- Farklı üretici firmalar arasında ya da aynı firmanın ürettiği farklı lot besiyerlerinde performans farkları olabilir (4).

## İlgili diğer UMS belgeleri

AMD-TP (Antimikrobiyal Duyarlılık Test Prosedürleri)-03 Ek-1

## Kaynaklar

<sup>1</sup> Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement Jan. 2013 M100-S23

<sup>2</sup> Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Antimikrobik Disk Duyarlılık Testleri için Uygulama Standartları; Onaylanmış Standart-Onuncu Baskı. Ocak 2009 M02-A10. Cilt 29 Sayı 1. ISBN:978-605-4488-08-7. ISSN:1302-5414.

<sup>3</sup> The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)  
<http://www.eucast.org/>

<sup>4</sup> Clinical Microbiology Procedures Handbook, Third Edition and 2007 Update (2010) Lynne S. Garcia, Editor in Chief, original and second editions Henry D. Isenberg Volume 2, section 5 Antimicrobial Susceptibility Testing, Section Editor: Janet Fick Hinder, Associate section editor: Susan Munro, 5.14.3 Preparation of Agar and Broth Media Used in Routine Antimicrobial Susceptibility Tests (956-965)





T.C. Sağlık Bakanlığı

## ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

# McFarland Baryum Sülfat Bulanıklık Standardı Hazırlanması

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu 11
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri (AMD)
Bölüm	Test prosedürleri
Standart No	AMD-TP-02
Sürüm No	1.0
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik
----------	-------	------------

# İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	3
GENEL BİLGİ .....	4
TEKNİK BİLGİLER .....	4
1 Asgari laboratuvar koşulları .....	4
2 Bulanıklık standardının hazırlanması .....	5
3 Kalite kontrol .....	6
4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	7
EKLER.....	8
Ek-1 Wickerham Eşeli .....	8
KAYNAKLAR.....	9

## Kapsam ve Amaç

Özellikle antimikrobiyal duyarlılık testlerin yapımında hazırlanan bakteri süspansiyonlarında bakterinin belirli sayıda olması istenmektedir. Bakterilerin sıvı ortamdaki sayıları ile paralel oluşturduğu bulanıklığın McFarland baryum sülfat bulanıklık standartları ile karşılaştırılarak standart ve tekrarlanabilir bir değerlendirmenin yapılması amaçlanmaktadır. Bu doküman, McFarland baryum sülfat bulanıklık standartlarının hazırlanması, saklanması ve standartlar ile bakteri süspansiyonlarının değerlendirilmesi için gereken işlemleri kapsamaktadır.

## Kısaltmalar ve Tanımlar

<b>BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	Baryum klorit
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Sülfürik asit
<b>cfu</b>	Colony Forming Unit

# Genel Bilgi

McFarland baryum sülfat bulanıklık standardı sıvı ortamda oluşturulan bakteri süspansiyonlarında bulanıklık ile oluşturulan McFarland standartlarının gözle karşılaştırılarak içerdikleri bakteri sayısını yaklaşık olarak saptamayı sağlamaktadır. McFarland standartları, baryum klorit ve sülfürik asitin karışımı suçu oluşan baryum sülfatın neden olduğu bulanıklık esasına dayanır. Baryum klorit ve sülfürik asidin farklı volümlerde karıştırılması ile oluşan farklı bulanıklık düzeyleri ile bakterilerin farklı sayıları ile oluşturduğu bulanıklıkların karşılaştırılarak standardize edilmesi sağlanır. McFarland Standartlarının karşılık geldiği bakteri sayıları bakteri türlerine göre değişiklik gösterebilmektedir<sup>(1)</sup>.

Bu standart en sık McFarland 0.5 değeri ile klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında antimikrobiyal duyarlılık testleri için kullanılacak bakteri yoğunluğunu ayarlamak için kullanılır. McFarland 0.5; süspansiyon içinde  $1,5 \times 10^8$  cfu/mL (genellikle  $1,0 \times 10^8$  ile  $2,0 \times 10^8$  arasında cfu/mL) bakteri varlığını ifade etmektedir<sup>(1)</sup>.

Laboratuvarda bu test prosedürü doğrultusunda hazırlanacak McFarland baryum sülfat bulanıklık standardı kullanılabilmesi gibi ticari olarak geleneksel olarak baryum sülfat ile veya lateks partikülleri ile hazırlanmış ürünler de kullanılabilir.

McFarland standartlarına göre bakteri sayısını değerlendirmek amacıyla spektrofotometrik ölçüm esası ile çalışan cihazlarda bu amaçla yaygın kullanılmaktadır.

# Teknik Bilgiler

## 1 Asgari laboratuvar koşulları

### 1.1. Laboratuvar güvenliği

McFarland baryum sülfat bulanıklık standardı hazırlanması için laboratuvarın minimum biyogüvenlik düzeyi 1 olmalıdır.

### 1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Hedef mikroorganizmalarla çalışacak personelin; en az Sağlık Meslek Yüksek Okulu mezunu Sağlık Tekniker veya Sağlık Meslek Liselerinin Tıbbi Laboratuvar programından mezun olan Sağlık Teknisyeni statüsünde, biyogüvenlik eğitimi almış ve bakteriyoloji laboratuvarında en az bir aylık eğitim sürecini tamamlamış olması gerekir.

### 1.3. Reajen, Ekipman

#### Reajen

- Sülfürik asit (%1'lik)  $H_2SO_4$
- Baryum klorit (%1,175)  $BaCl_2 \cdot 2H_2O$

**Diğer materyal, ekipman**

- Burgulu kapaklı tüp (13x100mm)
- Spektrofotometre cihazı
- Vorteks

## 2 Bulanıklık standardının hazırlanması

### 2.1. %1'lik Sülfürik asit hazırlanması

- Distile su 100 mL
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 mL
- 100mL'lik ölçekli şişeye 90 mL distile su konulup üzerine 1.0 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eklenip karıştırılır ve hacim 100mL'ye distile su ile tamamlanır.
- Laboratuvar güvenliği açısından sülfürik asitin suya eklenmesi önemlidir.
- Ağzı kapalı şişelerde 1 yıl süreyle saklanabilir.

### 2.2. %1.175'lik Baryum kloridin hazırlanması

- Distile su 100 mL
- BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 1.175 mg
- BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O tartılarak 100 mL'lik ölçekli şişeye aktarılır. Şişeye 50 mL distile su konularak karıştırılarak BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O'nun erimesi sağlanıp hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.
- Ağzı kapalı şişelerde 1 yıl süreyle saklanabilir.

### 2.3. McFarland standartları hazırlanması

- %1'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- %1.175'lik BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O
- Burgulu kapaklı tüplere Tablo 1'de yer alan volümlerde karşım sağlanarak McFarland Standartları hazırlanır.
- Tüpün burgulu kapağı kapatılarak, uygun şekilde etiketlenir.
- Hazırlanan standart tüpleri oda sıcaklığında ve 3 ay saklanabilir.

Tablo 1: McFarland standartlarının hazırlanması için kullanılacak %1.175'lik BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O ve %1'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oranları<sup>(2)</sup> uyarlanmış)

Standart no	Hacim (mL)		Bakteri/mL sayısı (X10 <sup>8</sup> )*
	BaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (%1.175)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%1)	
0.5	0,5	99,5	1,5
1	0,1	9,9	3
2	0,2	9,8	6
3	0,3	9,7	9
4	0,4	9,6	12
5	0,5	9,5	15
6	0,6	9,4	18
7	0,7	9,3	21
8	0,8	9,2	24
9	0,9	9,1	27
10	1,0	9,0	30

\*Bakteri türlerine göre değerler değişmekle beraber *E. coli* için değerler tabloda sunulmuştur.

## 2.4. McFarland standartlarının kullanılması

- Karşılaştırılacak McFarland Standart tüpü önce vorteks cihazı yardımı ile kabarcık oluşturmadan karıştırılmalıdır.
- McFarland standardı ile karşılaştırılacak bakteri süspansiyonu iyi bir ışık altında beyaz zeminde yer alan siyah bantlar üzerinde veya Wickerham eşeli kullanılarak karşılaştırılır<sup>(3)</sup>. Test edilen bakteri süspansiyonunun yer aldığı tüp ve McFarland standart tüpünün bulanıklığı eşit ise süspansiyonda hedeflenen bakteri sayısı elde edilmiş olduğu kabul edilir. Bulanıklık eşit değil ise bakteri süspansiyonuna bakteri ilave edilerek veya süspansiyon dilüe edilerek bulanıklığın eşitlenmesi sağlanır.

## 3 Kalite kontrol

- 0.5 McFarland standart süspansiyonu spektrometrede 625nm'de 0,08-0,10 arası absorbans göstermelidir<sup>(4)</sup>.
- *E. coli*'den inokulum hazırlanıp bulanıklığı McFarland 0.5'ye ayarlandıktan sonra 1/10 ve 1/100 kat sulandırılıp ekim yapılır. Bir gecelik inkübasyondan sonra koloni sayımı yapılarak 10 ya da 100 ile çarpılarak McFarland 0.5 standartında kaç koloni bulunduğu kontrol edilir. Beklenen koloni sayısı 1,5X10<sup>8</sup> cfu/ml olmalıdır<sup>(4)</sup>.
- Diğer McFarland standart no'ları için de yine *E. coli*'den inokulum hazırlanıp McFarland 0.5 için 1/100 kat sulandırım, diğerleri için artan seri sulandırım yapılır ve ekilir. Ekim sonrası üreyen koloni sayısı sulandırım oranı ile çarpılarak elde edilen cfu tablodaki beklenen sayı ile

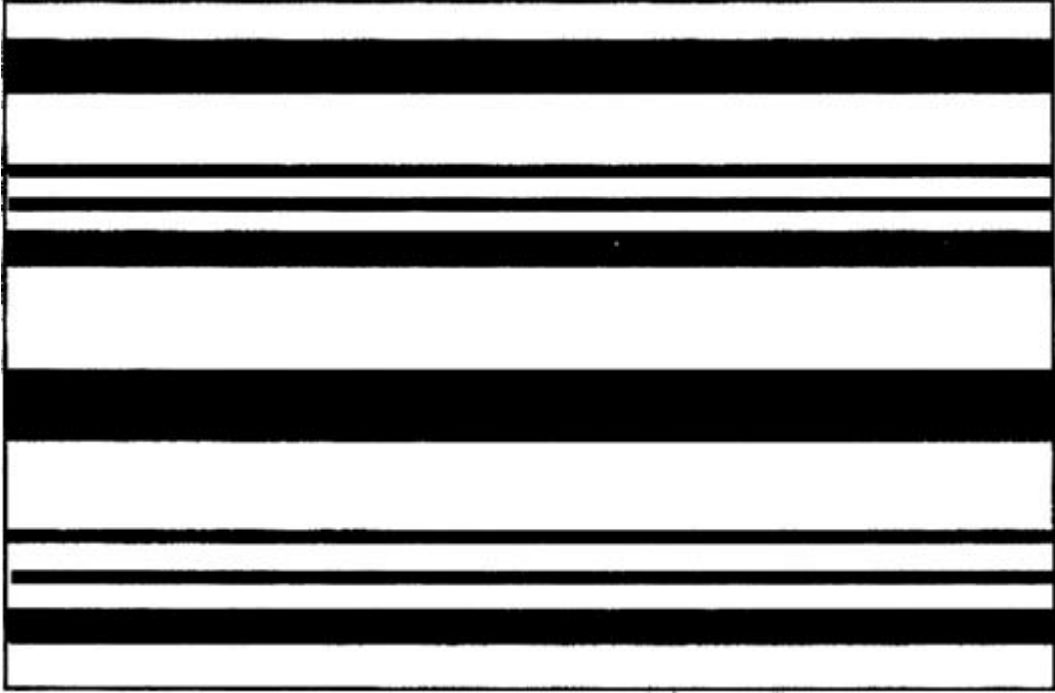
karşılaştırılır<sup>(4)</sup>.

## 4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Laboratuvarda hazırlanmış McFarland baryum sülfat bulanıklık standart tüplerinin uygun şekilde etiketlenmesi, son kullanma tarihleri içinde kullanılması ve oda ısısında, karanlıkta saklanması gerekmektedir. Bu koşullara uyulmadığında yapılacak değerlendirmelerde sorun yaşanacaktır.
- Ticari olarak hazırlanmış McFarland standartları üreticinin öngördüğü son kullanma tarihi geçtikten sonra kullanılmamalı, kullanım süresi içinde oda sıcaklığı ve karanlıkta muhafaza edilmelidir.
- McFarland baryum sülfat bulanıklık standartları yerine, McFarland ölçümü yapmak üzere geliştirilmiş cihazların kullanımı önerilmektedir. Bu amaçla kullanılacak cihazların üretici önerileri doğrultusunda ve kalibre edilerek kullanılması gerekmektedir.

**Ekler**

Ek-1 Wickerham Eşeli (2)





## Kaynaklar

---

- <sup>1</sup> Lynne S. Garcia. Clinical microbiology procedures handbook.-3rd ed. Washington, DC, 2010.
- <sup>2</sup> K. C. Chapin and T. Lauderdale. Reagents, stains, and media: bacteriology,p.358. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenenbaum (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C., 2003.
- <sup>3</sup> L. J. Wickerham. 1951. Taxonomy of yeasts, p. 11. In Technical bulletin no. 1029. U.S.Department of Agriculture, Washington, D.C.
- <sup>4</sup> Bildirimi zorunlu bulaşıcı hastalıkların laboratuvar tanısına yönelik standart uygulama prosedürleri. Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, s:93-95, 2008.

## ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

# Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi (*CLSI Standartları kullananlar için*)

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu 11
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri (AMD)
Bölüm	Test prosedürleri
Standart No	AMD-TP-03
Sürüm No	1.0
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

# İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ .....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR.....	4
GENEL BİLGİ .....	6
TEKNİK BİLGİLER .....	8
1 Test için asgari laboratuvar koşulları .....	8
2 Testin uygulanması .....	9
2.1. Ön Değerlendirme .....	9
2.1.1. Duyarlılık Testlerinin Gerekli Durumlar .....	9
2.1.2. Rutin Olarak Test Edilecek ve Bildirilecek Antimikrobik İlaçların Seçimi .....	9
2.2. Ön hazırlık.....	9
2.2.1. Disk Difüzyon Testi için Gerekli Malzeme ve Hazırlanışı .....	9
2.2.2. Antibiyotik Disklerinin saklanması .....	10
2.2.3. Disk Difüzyon Testleri için İnokulum Hazırlanması .....	10
2.3. Disk Difüzyon Testinin Yapılışı .....	10
2.4. Ekim Yapılmış Agar Plaklarına Disklerin Yerleştirilmesi.....	11
3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması .....	11
3.1. Sonucun raporlanması ve klinik yorum .....	11
3.1.1. Antimikrobik duyarlılık testi yorumlama kategorisi.....	11
3.1.2. Disk Difüzyon Plakların Okunması ve Sonuçların Yorumlanması.....	12
4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
EKLER.....	14
Ek-1 Disk difüzyon iç kalite kontrol.....	14
Ek 2. Kalite Kontrol Suşlarının Kullanıma Hazırlanması.....	28
Ek-3:Mikrobiyoloji Laboratuvarında Kolay ve Güç Üreyen Mikroorganizmaların Rutin Test ve Bildiriminde Önerilen Antimikrobik İlaç Gruplamaları.....	29
Ek-4: Antibiyotik disklerinin plaklara yerleştirilmesi kullanılan Antibiyotik diskleri ve kısaltmalar.....	34
Ek-5: Kullanımdaki diskler ve en sık karşılaşılan türler ile ilgili duyarlılık testi değerlendirme tabloları.....	39
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ .....	41
KAYNAKLAR .....	41

## Kapsam ve Amaç

Bu belgenin kapsamı, aerop koşullarda üreyen bakterilerin in vitro duyarlılığını belirlemek amacıyla disk difüzyon test yöntemi ile ilgili standart uygulamaları tanımlamaktır. Bu amaçla, disk difüzyon testi için kullanılacak agar plakları, test koşulları (inokulumun hazırlanması ve standardizasyonu, inkübasyon süresi ve ısı), uygulama basamakları, sonuçların yorumlanması ve kalite kontrol ile ilgili özellikler ve işlemler ele alınmıştır.

## Kısaltmalar ve Tanımlar

<b>THSK</b>	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
<b>ADTS</b>	Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu Çalışma Grubu
<b>ATCC</b>	American type Tissue Culture Collection
<b>EUCAST</b>	Antimikrobiyal Duyarlılık Testi ile ilgili Avrupa Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) <a href="http://www.eucast.org">http://www.eucast.org</a>
<b>CLSI</b>	Amerika Birleşik Devletleri "Clinical Laboratory Standarts Institute" <a href="http://www.clsi.org">www.clsi.org</a>
<b>MRSA</b>	Metisilin Dirençli <i>S.aureus</i>
<b>AMP</b>	Ampisilin
<b>PIP</b>	Piperasilin
<b>AMC</b>	Amoksisilin klavulanik asit
<b>TZP</b>	Piperasilin Tazobaktam
<b>SCF</b>	Sulbaktam Sefaperazon
<b>FOX</b>	Sefoksitin
<b>CXM</b>	Sefuroksim
<b>CTX</b>	Sefotaksim
<b>CAZ</b>	Seftazidim
<b>ETP</b>	Ertapenem
<b>IPM</b>	İmipenem
<b>MEM</b>	Meropeem
<b>GN</b>	Gentamisin
<b>NN</b>	Tobramisin
<b>CIP</b>	Siprofloksasin
<b>LEV</b>	Levofloksasin
<b>NOR</b>	Norfloksasin
<b>SXT</b>	Trimetoprim-Sulfametoksazol
<b>FOS</b>	Fosfomisin
<b>F/M</b>	Nitrofurantoin
<b>MN</b>	Minosiklin
<b>TE</b>	Tetrasiklin
<b>E</b>	Eritromisin
<b>CC</b>	Klindamisin

<b>LZD</b>	Linezolid
<b>VA</b>	Vankomisin
<b>GN120</b>	Gentamisin 120 mg
<b>S300</b>	Streptomisin120 mg
<b>OX</b>	Oksasilin
<b>OP</b>	Optokin
<b>KK</b>	Kalite Kontrol
<b>NCTC</b>	Birleşik Krallık Ulusal Tip Kültür Koleksiyonları (National Collection of Type Cultures) <a href="http://www.hpacultures.org.uk">http://www.hpacultures.org.uk</a>

## Genel Bilgi

Duyarlılık testleri, antimikrobiyal kemoterapi gereken bir enfeksiyon hastalığına yol açmış ve antibiyotik duyarlılığı tür tanımı ile kesin olarak bilinmeyen tüm etkenler için uygulanması gereken testlerdir. Antibiyotik duyarlılık testleri, öncelikle klinik tedavide sık kullanılan antibiyotiklere direnç gösterebildiği bilinen türler için uygulanır.

Bakterilerin antibiyotiklere in vitro duyarlılığının ölçümü için, çeşitli laboratuvar yöntemleri kullanılabilir. Bunlar arasında disk difüzyon klinik laboratuvarında sık görülen, kolay ve kısmen güç üreyen bakteriler için uygulanabilir.

Disk difüzyon, antimikrobiyal duyarlılık testinde en eski yaklaşımlardan biri olup rutin klinik laboratuvarlarda en yaygın kullanılan antimikrobiyal duyarlılık test yöntemlerinden biri olarak kalmıştır. Güç üreyen ancak sık rastlanan bakteriler de dahil bakteriyel patojenlerin çoğunu test etmeye uygundur. Ayrıca, birçok antimikrobiyal ajanın eş zamanlı test edilmesi sağlanır ve özel bir ekipmana gerek yoktur.

Ancak bu tekniğin güvenilir, etkin, verimli sonuçlar verebilmesi için, doğru ve standart laboratuvar uygulamalarının yapılması gerekir.

Disk difüzyon uygulamalarının ülkede ve tüm dünyada standardizasyonu amaçlayan birçok ulusal ve uluslararası standardizasyon komitesi/ kuruluşu bulunmaktadır. Bunlar arasında önerileri en yaygın kullanılanlar: EUCAST (Antimikrobiyal Duyarlılık Testi ile ilgili Avrupa Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) <http://www.eucast.org> ve CLSI (Amerika Birleşik Devletleri "Clinical Laboratory Standards Institute" [www.clsi.org](http://www.clsi.org))dir.

### 1. CLSI

CLSI, kar amacı gütmeyen ve klinik laboratuvar standartlarını geliştirip yerleştirerek laboratuvar tıbbında mükemmeliyete ulaşmak ortak amacıyla, dünya çapında laboratuvar ile uğraşan uzmanların değişik görüşlerini bir araya getiren bir üyelik organizasyonudur. CLSI böylelikle laboratuvarların sorumluluklarını etkinlik verimlilik ve tüm dünyada uygulanabilirlik ölçütleriyle yerine getirmelerine yardımcı olmayı amaçlar. CLSI iki yılda bir disk difüzyon için M02 (en son 11. basım M02-A11), sulandırım testleri için M-07 (en son 9. Basım, M07-A9), ve her sene her iki belgeyi ilgilendiren güncel değişiklikleri kapsayan M-100 (en son M100-S23; 2013) kılavuzlarını yayınlamaktadır. Bu belgelere [www.clsi.org](http://www.clsi.org) adresinden ücreti karşılığında ulaşılabilir veya Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti ADTS grubu üyelerinin yayınladığı belgeler ve düzenlediği kurslar izlenebilir.

CLSI kılavuzlarında aerop koşullarda hızlı üreyen bakterilerle ilgili tablolar ve duyarlılık sınırları bulunabilmektedir. Ancak, *Campylobacter*, *Pasteurella*, HACEK grubu gibi mikroorganizmalar ile ilgili öneriler için M-45 kılavuzunun alınması gereklidir.

## 2. EUCAST

Özellikle Avrupa ülkeleri ve üniversite çevresinden uzmanların bir araya geldiği, endüstriden bağımsız tamamen bilimsel dayanaklara göre karar alan bir kuruluştur. Disk difüzyon ile ilgili ilk kılavuzları 2009 yılında oluşturulmuştur. Bu kılavuz 2013 yılında güncellenmiş, Ocak 2014 tarihinden itibaren [www.eucast.org](http://www.eucast.org) sitesinden ulaşılabilir olması planlanmıştır.

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

EUCAST yönteminin zon çapı sınır değerleri, EUCAST tarafından uyumlulaştırılan sınır değerlere göre belirlenmiştir. Bu değerler, EUCAST tarafından yayınlanmıştır. Bu bilgilere, EUCAST elektronik sitesinden (<http://www.eucast.org>) ücretsiz ulaşılabilir.

### Ülkemiz ve EUCAST Standartlarına uyum süreci

Ülkemizde klinik laboratuvarlarda otomatize sistemler kullanılsa dahi, disk difüzyon halen ek testler için kullanılması gereken, bu nedenle de en yaygın olarak uygulanan yöntemdir. Disk difüzyon için halen en sık CLSI önerilerine uyulsa da, uygulamaların çok benzer olması, dokümanlarına kolay ve ücretsiz ulaşılması gibi nedenlerle EUCAST standartlarına geçilmesi hem ülkemizdeki uzman grupların hem de Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı'nın ortak görüşüdür.

Bu amaçla Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti bünyesindeki Antibiyotik Duyarlılık Testleri Standardizasyonu (ADTS) çalışma grubu EUCAST'ın Ulusal düzeydeki temsilcisi olarak EUCAST standartlarına geçiş için gerekli belgeleri ve eğitim programlarını hazırlamaktadır. Günümüze kadar EUCAST disk difüzyon kılavuzu, EUCAST sınır değer tabloları, Özel Direnç Mekanizmalarının Saptanması kılavuzu bu grup tarafından dilimize çevrilmiştir. Bu belgelere ve güncellemelerine Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi internet sitesinden (<http://uamdss.thsk.gov.tr>) ulaşılabilir.



# Teknik Bilgiler

## 1 Test için asgari laboratuvar koşulları

### 1.1. Laboratuvar güvenliği

Biyogüvenlik Düzeyi-2 için belirtilen güvenli laboratuvar çalışma yöntem ve uygulama kurallarına uygun olarak çalışılır.

### 1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Hedef mikroorganizmalarla çalışacak personelin; en az Sağlık Meslek Yüksek Okulu mezunu sağlık tekniker veya sağlık meslek liselerinin tıbbi laboratuvar programından mezun olan sağlık teknisyeni statüsünde, biyogüvenlik eğitimi almış ve bakteriyoloji laboratuvarında en az bir aylık eğitim sürecini tamamlamış olması gereklidir.

### 1.3. Örnek, Araç, Kit, Ekipman

#### İnceleme örneği

Bakteriyoloji laboratuvarına gönderilen boğaz kültürü hariç diğer örneklerden üretilen ve etken kabul edilen mikroorganizmalar için, eğer o mikroorganizmanın türünden duyarlılığı öngörülemezse, disk difüzyon yöntemi ile duyarlılık testi yapılır.

### 1.4. Kalite kontrol

- Kontrol suşları
  - a) *Escherichia coli* ATCC 25922
  - b) *Escherichia coli* ATCC 35218
  - c) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
  - d) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
  - e) *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
  - f) *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619
  - g) *Streptococcus pyogenes*
- CLSI önerilerine göre Kalite kontrol testlerinin gerektiği durumlar, yapılma sıklığı ve gerekli ayrıntılar EK-1'de yer almaktadır.
- Her bir KK suşu ile 3 farklı inokulum hazırlanıp 5 gün boyunca KK tekrarlanır. 15 testte  $\leq 1$  sıra dışı sonuç gözlemlendiğinde haftalık teste geçilir.
- Mueller Hinton Agar besiyeri lotu, zon çapı ve MİK değerlerinin beklenen sınırlarda olup olmadığını belirlemek için KK suşları ile test edilmelidir. Eğer

- beklenen değerler elde edilmezse malzeme reddedilir.
- En az bir ekim yapılmamış agar plağı sterilite kontrolü için uygun şartlarda bir gece inkübe edilir.
- Kullanılan her malzeme ve her test günü için kayıt tutulmalıdır.

## 2 Testin uygulanması

Aerop koşullarda üreyen bakterilerin in vitro duyarlılığını belirlemek amacıyla disk difüzyon test yöntemi ile ilgili standart uygulamaları tanımlamaktır. Bu amaçla, disk difüzyon testi için kullanılacak agar plakları, test koşulları (inokulumun hazırlanması ve standardizasyonu, inkübasyon süresi ve inkübasyon sıcaklığı), sonuçların yorumlanması ve kalite kontrol ile ilgili özellikler ve işlemler ve işlemler ele alınmıştır.

### 2.1.Ön Değerlendirme

#### 2.1.1. Duyarlılık Testlerinin Gerektiği Durumlar

Antimikrobik kemoterapi gerektiren bir enfeksiyonda etken olan her mikroorganizma için, eğer o mikroorganizmanın türünden duyarlılığı öngörülemiyorsa, duyarlılık testi gerekmektedir.

#### 2.1.2. Rutin Olarak Test Edilecek ve Bildirilecek Antimikrobik İlaçların Seçimi

Tablo 1 ve Tablo 2'ye göre etken tür için duyarlılık testi yapılacak ve sonuçları kısıtlı bildirim prensiplerine göre bildirilecek antimikrobiyal diskler seçilir. Tablolar uluslararası standartlara göre oluşturulmakta ve güncellenmektedir (Ek-3:Tablo1 ve Tablo 2) .

### 2.2.Ön hazırlık

#### 2.2.1. Disk Difüzyon Testi için Gerekli Malzeme ve Hazırlanışı

- **Besiyerleri** (Bkz.AMD-TP-01)
- **Mueller-Hinton Agar:** Kolay üreyen bakterilerin disk difüzyon testi Mueller-Hinton agar kullanılmaktadır (EUCAST ve CLSI).
- **Kanlı Mueller Hinton Agar:**CLSI önerilerine göre *Streptococcus pneumoniae*, viridans (alfa) ve beta hemolitik streptokokların disk difüzyon testi için %5 koyun kanlı MHA kullanılmaktadır.
- **Hemophilus Test Medium (HTM):**CLSI önerilerine göre *Haemophilus influenzae* için kullanılmaktadır.
- **GC agar:** CLSI önerilerine göre *Neisseria meningitidis* ve *N. gonorrhoeae* için kullanılmaktadır.
- **MH-F "Mueller- Hinton- Fastidious" Agar:** EUCAST önerilerine göre tüm zor üreyen bakteriler için (*Haemophilus*, *Neisseria*, *S.pneumoniae*, diğer streptokoklar, *Campylobacter* vb) kullanılabilen %5 defibrine at

kanı ve 20 mg/L  $\beta$ -NAD (nikotinamid adenin dinükleotid) katkısı içeren besiyeridir.

### 2.2.2. Antibiyotik Disklerinin saklanması

Duyarlılık testi için hazırlanmış ticari disk kartuşları nem almalarını önleyecek şekilde ambalajlanmıştır. Kullanımdaki diskler kullanım öncesi buzdolabında 8°C veya daha düşük sıcaklıkta; diğer stoklar ise -14°C'nin altında derin dondurucuda (son kullanma tarihine kadar) saklanmalıdır.

### 2.2.3. Disk Difüzyon Testleri için İnokulum Hazırlanması

#### Uygulama basamakları:

- İnokulum, 18-24 saatlik agar plağındaki (kanlı agar gibi seçici olmayan bir besiyeri kullanılmalıdır) tek düşmüş kolonilerden doğrudan serum fizyolojik içinde süspansiyon yapılarak hazırlanır.
- Süspansiyonun bulanıklığı Mc Farland 0.5 standardına eşdeğer bulanıklığa ayarlanır. (Bkz. AMD-TP-02)
- Süspansiyonun yoğunluğunu ayarlamakta fotometrik bir cihaz kullanılması önerilmektedir. Fotometrik cihaz, üretici firmanın önerileri doğrultusunda McFarland 0.5 standartına kalibre edilmelidir.
- Alternatif olarak inokulum yoğunluğunun standardizasyonunda 0.5 McFarland standardına eşdeğer baryum sülfat bulanıklık standardı kullanılmalıdır. Bu basamağı doğru bir şekilde yapabilmek için yeterli ışık altında üzerinde siyah çizgiler bulunan beyaz bir kart önünde 0.5 McFarland tüpü ile inokulum tüpü gözle kıyaslanır

## 2.3. Disk Difüzyon Testinin Yapılışı

- İnokulum süspansiyonunun bulanıklığı ayarlandıktan sonra ideal olarak 15 dakika içinde ( mutlaka 60 dakika içinde) kullanılmalıdır.
- Steril bir eküvyon bakteri süspansiyonuna daldırılır, birkaç kez döndürülür, süspansiyonun dışında tüpün iç duvarına bastırılır. Böylece eküvyon üzerindeki fazla sıvı atılmış olur.
- İnokulum ile ıslatılmış eküvyon, yüzeyi kurutulmuş olan MHA plağının yüzeyine sürülerek bakteri tüm agar yüzeyine inoküle edilir. Plak her defasında 60° döndürülerek agar yüzeyinde ekim yapılmamış yer kalmayacak şekilde işlem iki kez daha yinelenir. Son basamakta eküvyon, plağın kenarlarında çepeçevre gezdirilerek inokülasyon işlemi tamamlanır.
- Antibiyotik emdirilmiş diskler uygulanmadan önce inoküle edilen bakteri süspansiyonunun absorbe olması ve yüzeydeki fazla nemin kaybolması için plak beş dakika bekletilir; bekleme süresi 15 dakikayı geçmemelidir.
- 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 dk içinde yerleştirilmelidir.

## 2.4.Ekim Yapılmış Agar Plaklarına Disklerin Yerleştirilmesi

- Yüzey ekimi yapılmış agar plağı üzerine daha önceden belirlenmiş olan listeye göre antibiyotik ilaç diskleri yerleştirilir. Diskler agar yüzeyi ile tam temas edecek şekilde bastırılarak yerleştirilir. Dağıtıcı aracılığıyla ya da elle yerleştirilen disklerin merkezleri arasında en az 24 mm ara bulunmalıdır. MHA plaklarına en fazla altı kanlı MHA plaklarına ise en fazla beş disk yerleştirilir. Zon çakışmalarını önlemek açısından diskler EK-5'de yer alan şablonlara göre yerleştirilir.
- Diskler bir kez agar plağına yerleştirildikten sonra yerinden oynatılmamalıdır, çünkü diskten antimikrobiyalin difüzyonu çok hızlıdır.
- İndüklenebilir klindamisin direncini saptamak amacıyla eritromisin dirençli klindamisin duyarlı *Streptococcus pneumoniae* ve *Staphylococcus aureus* dahil stafilokok türlerinde D zon testi uygulanır. Bu amaçla 15 µg'lık eritromisin (E) diski ile klindamisin (C) (2 µg) diski disk merkezleri arası 20 mm olacak şekilde yerleştirilir. E diskiye bakan C zonunda (D harfine benzeyen) düzleşme pozitif olarak değerlendirilir ve klindamisin dirençli verilir.
- Disklerin yerleştirilmesinden sonra 15 dakika içinde plaklar kapakları altına gelecek şekilde  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'ye ( $35^{\circ}\text{C}$ 'nin üstündeki sıcaklıklar MRSA'yı saptayamayabilir) ayarlanmış etüve konur. Streptokok türleri için kullanılan kanlı MHA plakları  $\text{CO}_2$ 'li ortamda inkübe edilir.

## 3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması

### 3.1.Sonucun raporlanması ve klinik yorum

#### 3.1.1. Antimikrobik duyarlılık testi yorumlama kategorisi

Bir mikroorganizmanın bir antimikrobik ilaca o ilacın normalde verilen dozlarla ulaşabileceği kan veya doku düzeylerine denk gelen düzeylerdeki *in vitro* yanıtını temel alan bir sınıflama.

- **Duyarlı(S):** İzolatların antimikrobik ilacın infeksiyon bölgesi için önerilen dozda kullanıldığında ulaşabildiği konsantrasyonlarında inhibe olacağını ifade eder.
- **Orta (I):** Antimikrobik ilaç için MİK değerleri genellikle erişilebilir kan ve doku düzeylerinde bulunan, ancak duyarlı izolatlarla kıyasla tedaviye daha düşük yanıt vermesi beklenen izolatlardır. içerir. "Orta " kategorisi, ilacın fizyolojik olarak yoğun olduğu bölgelerde (örn. idrarda kinolonlar ve betalaktamlar) veya normalden yüksek dozlarda kullanılabileceği durumlarda (örn. betalaktamlar), söz konusu suşa klinik olarak etkili olabileceğini belirtmektedir.

- **Dirençli (R):** İzolatların, ilacın normal doz uygulamaları ile erişilebilen sistemik veya yerel konsantrasyonlarında inhibe edilemeyeceğini ifade eder
- **Duyarlı olmayan (NS):** Sadece duyarlı yorumlama kategorisi olup orta duyarlı veya dirençli kategorileri olmayan bakteriler için kullanılan bir kategoridir.

### 3.1.2. Disk Difüzyon Plakların Okunması ve Sonuçların Yorumlanması

Plaklar 16-18 saatlik inkübasyondan sonra (vankomisin dışında Bkz "Farklı durumlar" başlığı) önce makroskobik olarak değerlendirilir. İnokulum yoğunluğu iyi ayarlanmış ve ekim doğru yapılmışsa inhibisyon zonu düzgün bir daire şeklinde ve üreme sınırı belirgin, üreme ise bitişik olmalıdır. Tek tek kolonilerin görülmesi inokulum yoğunluğunun az olduğu anlamına gelir, test tekrar edilmelidir.

- **İnhibisyon Zonlarının Ölçümü**
  - a) Plak aydınlık bir ortamda yansıtıcı olmayan siyah bir zeminin birkaç cm üzerinde tutulur (farklı durumlar aşağıda belirtilmiştir). Tam inhibisyonun gözleendiği alanın çapı "**zon çapı**", cetvel veya kumpas kullanılarak petri kabının tersinden, disk zon çapı da dahil olacak şekilde ölçülür.
  - b) Streptokoklarda olduğu gibi, besiyerine kan eklenmişse, petri plağının kapağı açık olarak ve yansıyan ışık altında iç taraftan agar yüzeyinden ölçüm yapılır.
  - c) İnhibisyon zonu sınırı, çıplak gözle görülebilir üremenin bittiği çizgi olarak kabul edilir. İnhibisyon zonunun kenarında sadece büyüteç ile görülebilen zayıf üreme dikkate alınmaz.
  - d) Berrak bir inhibisyon zonunun içinde göze çarpan koloniler gözleendiğinde heterojen direnç nedeniyle bakteri dirençli ("R") olarak rapor edilir.
- **Farklı Durumlar**
  - a) *Enterococcus* spp.'de vankomisin test edildiğinde inkübasyon süresi 24 saat olmalıdır; diğer antibiyotikler 16-18 saatte okunup bildirilir. Vankomisin disklerinin zonu içerisinde zayıf bir üreme veya küçük kolonilerin görülebilmesi için plak arkadan gelen bir ışık ile (ışığa doğru kaldırılarak) incelenir. İnhibisyon zonu içinde fark edilebilen en küçük üreme vankomisin direnci göstergesidir.
  - b) *Staphylococcus* spp.'de sefoksitin zon çapları, arkadan gelen değil, yansıyan ışıkta okunmalıdır.
  - c) *Staphylococcus* spp.'de linezolid zon çapları arkadan gelen ışıkta okunmalıdır.
  - d) *Proteus* spp.'de, belirgin kenarlı inhibisyon zonu içinde buğu şeklindeki ince üreme dikkate alınmaz.
  - e) Streptokokları test ederken kullanılan kan katkılı besiyerinde hemoliz inhibisyon zonu değil, üreme inhibisyon zonu ölçülmelidir.

- **Raporlama**

Disk Difüzyon Testinde ölçülen zon çapları dış kaynak olarak kayıtlı "Antibiyotik Duyarlılık Testleri için Uygulama Standartları; 23.Bilgi Eki (CLSI M100-S23)" de bulunan tablolardaki değerler ile karşılaştırılarak bakteri test edilen antibiyotiğe karşı "duyarlı (S)", "orta (I)", "dirençli (R)" şeklinde bildirilir.

Rapor verilirken kısıtlı bildirim kurallarına uyulmalıdır (*Bkz.* AMD-TB-03)

## Ekler

### Ek-1 Disk difüzyon iç kalite kontrol

#### 1. Uygulama

**1.1.** Antibiyotik duyarlılık testlerinde kalite kontrolü (KK), güvenilir sonuçlar alındığından emin olmak için bir test sistemini performansını izlemek amacıyla yapılan işlemlerin tümünü kapsar. KK, genel olarak incelenen antimikrobijale karşı duyarlılıkları bilinen kalite kontrol suşlarının test edilmesi ile sağlanmaktadır ancak bununla kısıtlı değildir. KK,

- Sonuçların kesinliği (tekrarlanabilirliği) ve doğruluğu,
- Testte kullanılan malzeme ve gereçlerin yeterliliği,
- Testi uygulayan ve değerlendiren kişilerin yetkinliği,

gibi parametrelerin izlenimi amaçlanmaktadır.

#### 1.2. Kalite Kontrol Suşlarının Seçimi ve Disk difüzyon testlerinde kullanılan suşlar

- KK suşları olarak en sık ATCC (American Type Culture Collection) suşları ve CLSI M-100 dökümanlarındaki sınır değerler kullanılmaktadır. Duyarlılık testlerinin iç kalite kontrolünde kullanılan suşlar ve test edilen antibiyotik diskleri Tablo 1'de gösterilmektedir.

**Tablo 1:**Disk difüzyon Kalite kontrol suşları ve test edilen antibiyotik diskleri

Kontrol suşları	Antibiyotik diskleri
<b><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</b>	Ampisilin, Sefuroksim, Sefotaksim, Seftazidim Ertapenem, İmipenem, Meropenem Gentamisin, Tobramisin, Levofloksasin, Siprofloksasin, Norfloksasin Trimetoprim-sulfametoksazol Minosiklin, Nitrofrantoin Fosfomisin, Nalidiksik asit, Tetrasiklin
<b><i>Escherichia coli</i> ATCC 35218</b>	Amoksisilin klavulanat Piperasilin tazobaktam
<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</b>	Penisilin, Sefoksitin, Eritromisin, Klindamisin Linezolid, Minosiklin, Nitrofrantoin Gentamisin, Siprofloksasin, Levofloksasin, Tetrasiklin, Trimetoprim-sulfametoksazol, Fosfomisin, Piperasilin, Piperasilin tazobaktam
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853</b>	Seftazidim, İmipenem, Meropenem Gentamisin, Tobramisin, Levofloksasin
<b><i>Enterococcus faecali</i> ATCC 29212</b>	Vankomisin, Gentamisin (120 µg), Streptomisin (300

	µg)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	Optokin, oksasilin, eritromisin, levofloksasin, Trimetoprim-sulfametoksazol
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Basitrasin

### 1.3. KK suşlarının saklanması ve kullanımı

KK suşları klinik suşlarla aynı koşullarda (aynı malzeme, yöntem vb) teste alınır. KK suşlarının optimal perfonmansı için saklama koşulları son derece önemlidir. Uzun süreli saklama için stok kültürler -20 °C ve altında tutulur ( $\leq -60$  °C veya altında saklanma yeğlenmelidir). Dondurma için % 10 gliserol içeren beyin kalp infüzyon sıvı besiyeri kullanılmalıdır.

- Stok kültürler; kullanım kültürlerinin hazırlanması için, uygun besiyerine (kanlı agar) pasajlanır. Kullanıma sokulmadan önce katı besiyerindeki pasaj bir kez daha tekrarlanır (yani test öncesi iki kez pasaj yapılır). İkinci kültür, kullanım kültürü (1.gün) olarak adlandırılır (EK-1)
- Pasajlar 2°C – 8°C'de (mikroorganizma için hangisi uygunsa) saklanır.
- Günlük kullanım kültürleri, buzdolabındaki ikinci pasajdan tekrar pasaj yapılarak hazırlanır. KK'da kullanılacak kültürler günlük, taze pasaj olmalıdır.
- Günlük kullanım kültürleri için kullanılan pasajlar (1.gün kullanım kültürü) ana stoktan haftalık olarak hazırlanır.

### 1.4. KK Besiyeri veya test sisteminin kalite kontrolü

- Her yeni Mueeler Hinton Agar besiyeri lotu, zon çapı ve MİK değerlerinin beklenen sınırlarda olup olmadığını belirlemek için KK suşları ile test edilmelidir. Eğer beklenen değerler elde edilmezse malzeme reddedilir.
- En az bir ekim yapılmamış agar plağı sterilite kontrolü için uygun şartlarda bir gece inkübe edilir.
- Kullanılan her malzeme ve her test günü için kayıt tutulmalıdır.

### 1.5. Zon çapı kalite kontrol sınırları

- Disk difüzyon testlerinin iç kalite kontrolünde kullanılan suşlar, antibiyotik diskleri ve elde edilmesi gereken referans zon çapları Tablo 2'de gösterilmektedir.



**Tablo 2:** Kalite Kontrol suşları ve beklenen zon çapları

<b>Antimikrobik İlaç</b>	<b>Disk İçeriği</b>	<b><i>E.coli</i> ATCC® 25922</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923<sup>a</sup></b>	<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853</b>	<b><i>Escherichia coli</i> ATCC® 35218</b>	<b><i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619</b>
Amikasin	30	19-26	25-26	18-25	-	-
Amoksisilin-klavulanik asit	20/10	18-24	28-36	-	17-22	-
Ampisilin	10	16-22	27-35	-	-	-
Eritromisin	15	-	22-30	-	-	25-30
Ertapenem	10	29-36	24-31	-	-	-
Fosfomisin	200	22-30	25-33	-	-	-
Gentamisin	10	19-26	19-27	17-23	-	-
İmipenem	10	26-32	-	20-28	-	-
Klindamisin	2	-	24-30	-	-	19-25
Levofloksasin	5	29-37	25-30	19-26	-	20-25
Linezolid	30	-	25-32	-	-	-
Meropenem	10	28-34	29-37	27-33	-	-
Minosiklin	30	24-30	-	-	-	-
Nalidiksik asit	30	22-28	-	-	-	-
Nitrofurantoin	300	20-25	18-22	-	-	-
Norfloksasin	10	28-35	17-28	22-29	-	-
Oksasilin	1	-	18-24	-	-	≤12
Penisilin	10U	-	26-37	-	-	-
Piperasilin	100	24-30	-	25-33	12-18	-
Piperasilin-tazobaktam	100/10	24-30	27-36	25-33	24-30	-
Sefoksitin	30	25-29	23-29	-	-	-
Sefuroksim	30	20-26	27-35	-	-	-
Sefotaksim	30	29-35	25-31	-	-	-
Seftazidim	30	25-32	16-20	22-29	-	-
Siprofloksasin	5	30-40	22-30	25-33	-	-
Teikoplanin	30	-	15-21	-	-	-
Tetrasiklin	30	18-25	24-30	-	-	27-31
Tobramisin	10	18-26	19-29	20-26	-	-
Trimetoprim-sulfametoksazol	1.25/23.75	23-29	24-32	-	-	20-28
Vankomisin	30	-	17-21	-	-	-

### 1.6. Kalite Kontrol Testi Uygulama Sıklığı (Tablo 3)

Öncelikle her test sisteminin veya kullanılan malzemenin yeterli

performans gösterip göstermediği testin uygulandığı her gün kalite kontrolü de uygulanarak kontrol edilir. Uygun performans belirlenirse o zaman haftalık testlere geçilebilir. Haftalık KK, haftada birden az uygulanan dilüsyon testleri için geçerli değildir. Bu durumda testin uygulandığı her gün KK'de yapılır. Bunun dışında, dayanıksız ajanlar (örn. İmipenem, vankomisin) için de her gün test uygulanmalıdır.

**Tablo 3:** Disk Difüzyon Testi- Kalite Kontrol Test Sıklığı için Başvuru Kılavuzu

Testteki Değişiklik	Ardışık KK Testinin Gerektiği Gün Sayısı			Yorumlar
	1	5	20 veya 30	
<b>Diskler</b>				
Yeni ürün veya serinin kullanılması	X			
Yeni bir üretici kullanılması	X			
<b>Besiyeri (hazırlanan agar plakları)</b>				
Yeni ürün veya serinin kullanılması	X			
Yeni bir üretici kullanılması		X		
<b>İnokulum hazırlanması</b>				
İnokulum hazırlanmasının/standardizasyonunun kendi KK protokolü olan bir aletle yapılmaya başlanması		X		Örnek: Bulanıklık gözle ayarlanırken, kendi kalite kontrol işlemi olan bir fotometrik alete geçirilmesi.
İnokulum hazırlanmasının/standardizasyonunun kullanıcının tekniğine dayanan bir yöntemle yapılmaya başlanması			X	Örnek: Bulanıklık gözle ayarlanırken, fotometrik bir alete dayanmayan bir yöntemle geçilmesi.
<b>Zonların Ölçümü</b>				
Zon ölçüm yönteminin değiştirilmesi			X	Örnek: Manuel zon ölçümünden otomatize zon okuyucuya geçilmesi  Ayrıca, kendi değerlendirme çalışmalarının yapılması

**Kısaltmalar:** ADT, antimikrobiyal duyarlılık testi;KK,kalite kontrol

**NOT 1:** Herhangi bir YENİ antimikrobik ilaç eklendiğinde, 20-30 ardışık günde yeterli sonuç alındıktan sonra (bakınız M02-A10,Bölüm 15.7) bu kılavuz kullanılmalıdır.

**NOT 2:** KK hasta izolatlarından önce veya aynı zamanda yapılabilir. Eğer kalite kontrol suşları kabul edilebilir sınırları içindeyse hasta sonuçları o gün bildirilebilir.

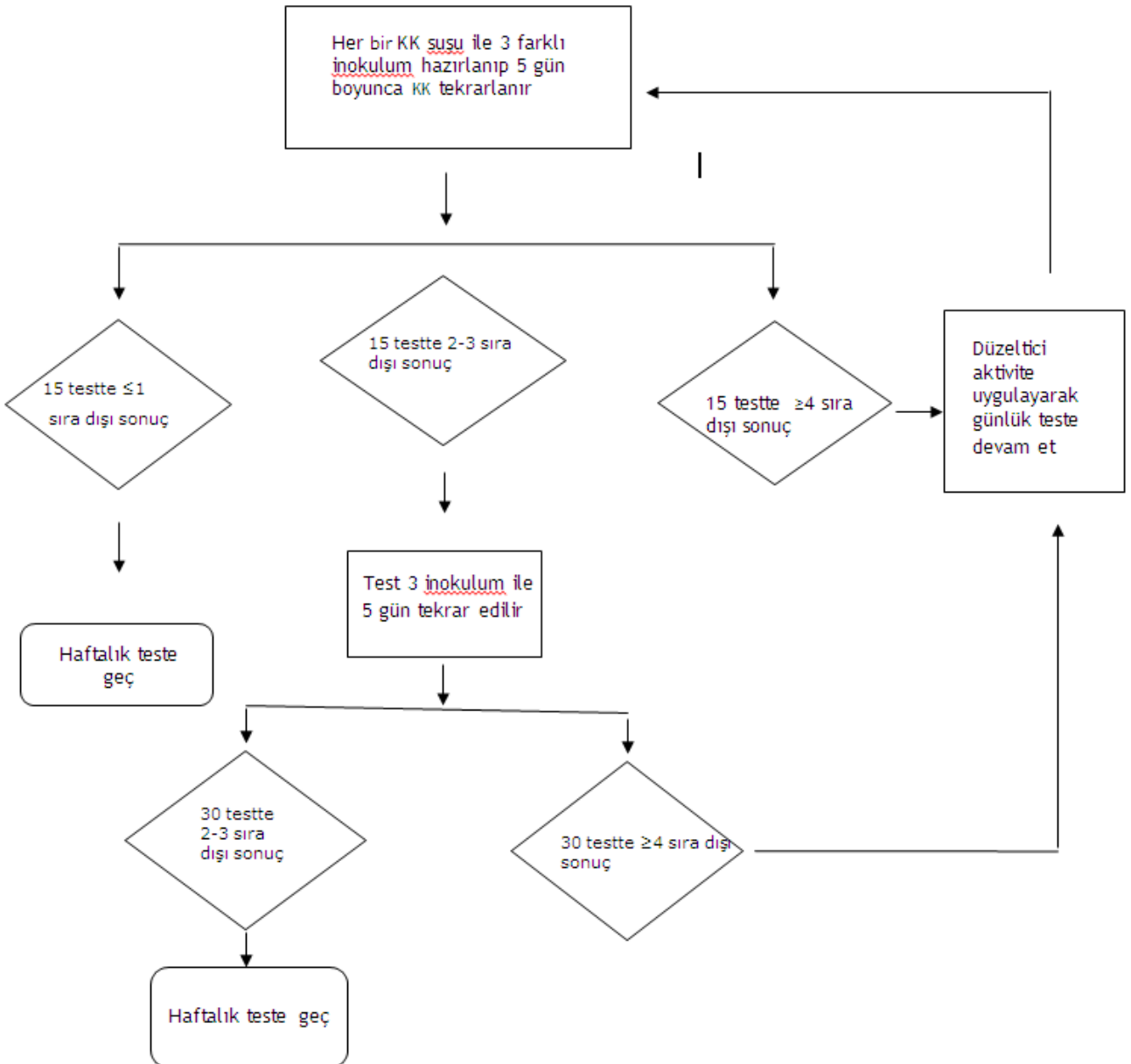
**NOT 3:** Ticari üreticiler veta testleri kendileri yapanlar kendi işlem ve yönetmeliklerini uygulamalıdır.

**NOT 4:** Sınır dışı sonuçlarda nedenleri araştırmak için M02-A10,Bölüm 15.8'e bakınız.

**NOT 5:** Bir inokulumu hazırlamakta kullanılan buyyon, serum fizyolojik ve/veya su için rutin kalite kontrol gerekmez.

**Dipnot:** a. Rutin olarak haftalık veya günlük KK testi yapılması gerekliliğini ortadan kaldırmaz.

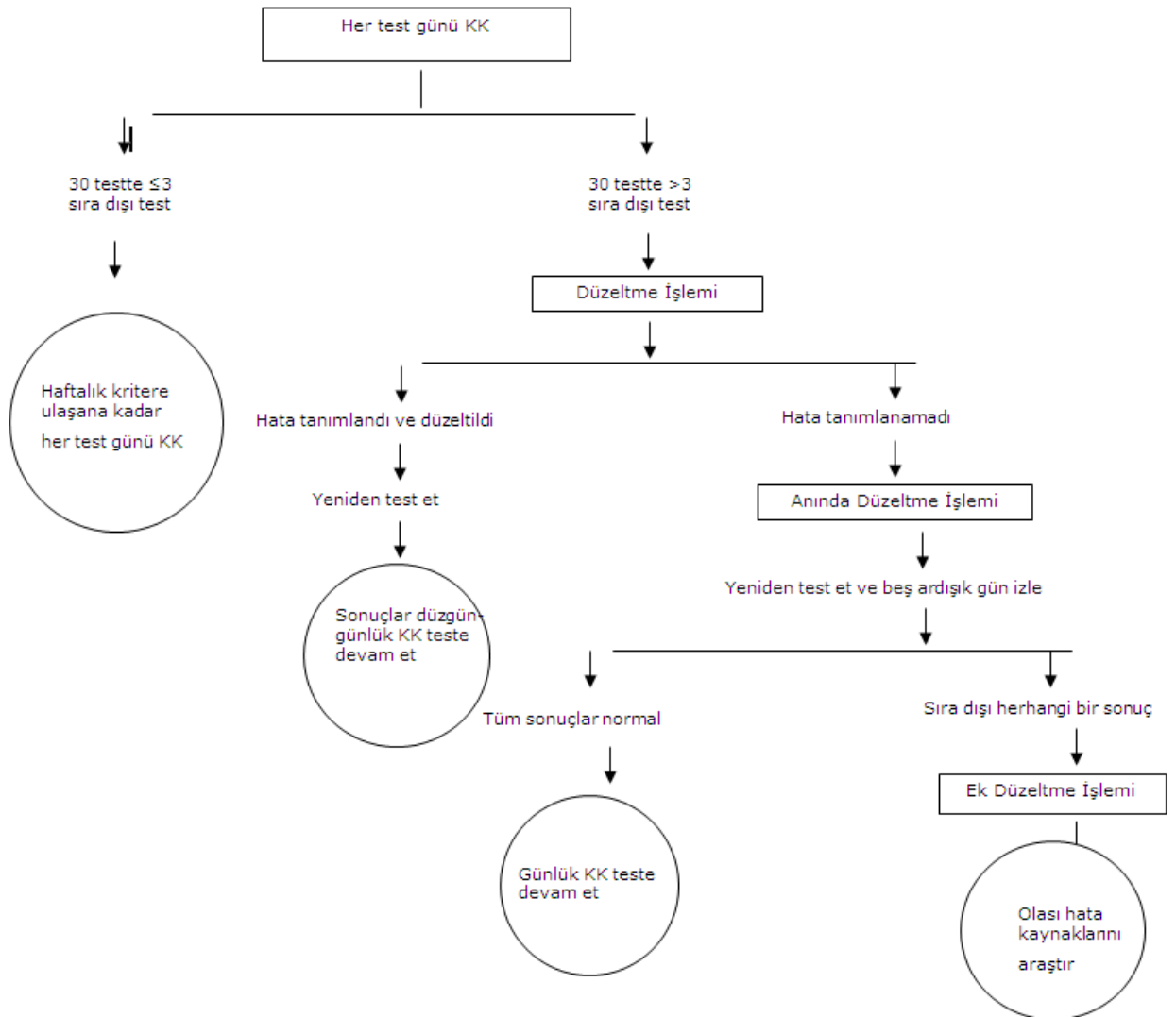
### Kalite Kontrol Akış Şeması (3x5 gün 15 tekrar)



- **Günlük kalite kontrol**

- Günlük kalite kontrol testinde her antiimikrobiyal ilaç/mikroorganizma kombinasyonu için 30 ardışık sonuçtan en fazla üçü kabul edilebilir sınırlar dışında kalıyorsa, test performansı yeterlidir. Eğer problem içeren sonuç sıklığı daha fazla ise düzeltici aktivite uygulanır. Haftalık teste geçmek için öncelikle günlük KK testlerinin performansının yeterli olduğu belirlenir. Bu amaçla;
- Öncelikle tüm KK suşları 20 veya 30 ardışık gün test edilir ve sonuçlar kaydedilir.
- Her antibiyotik/mikroorganizma kombinasyonu için 20 zon çapı/MİK değerinde 1 veya 30 zon çapı/MİK değerinde üçten fazlasının beklenen sınırlar dışında kalmaması gerekir.
- Yukarıdaki şartlar sağlandığında haftalık teste geçilir.

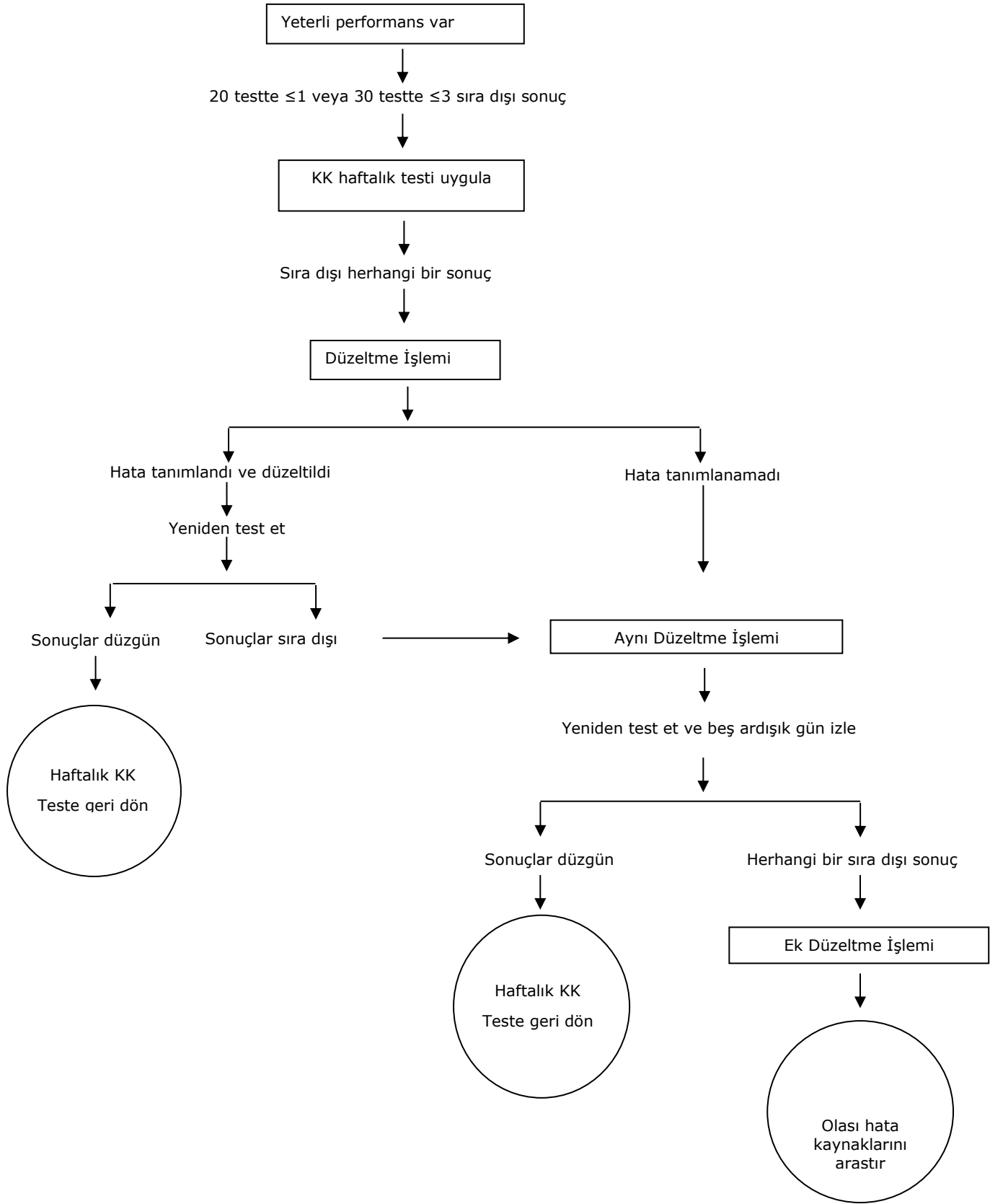
### Kalite Kontrol Protokolü Günlük Test Akış Çizelgesi



- **Haftalık kalite kontrol**

- a) Bir malzeme değişikliği olmadığı müddetçe haftalık test yürütülür. Malzeme değişikliği olduğunda (ör.yeni bir ilaç eklenmesi veya farklı bir üreticiden alınan besiyerinin kullanılması) tekrar günlük teste geçilir. 20-30 ardışık sonuçtaki performans yeterli ise tekrar haftalık teste devam edilir. Bunun dışında eskiden beri kullanılan bir malzemenin yeni bir kutusuna geçildiğinde bir kez KK testi uygulanır. Sonuçta problem yoksa haftalık testlere devam edilir.
- b) Haftalık test sırasında sonuçların birinin bile beklenen dışında çıkması halinde düzeltici aktivite uygulanır.
- c) Dayanıksız antibiyotikler için testler her gün yapılmalıdır (klavulanik asit kombinasyonları, imipenem, vankomisin gibi).

## Kalite Kontrol Protokolü Haftalık Test Akış Çizelgesi



**Düzeltilici aktiviteler**

KK test sonuçları beklendiği gibi çıkmadığında bazı düzeltici aktiviteler uygulanmalıdır. KK sonuçları bazı durumlarda sorunun nerede olduğunu gösterebilir (Tablo 4).

**Tablo 4:**Disk difüzyon testlerinde KK uygulamalarında karşılaşılabilecek problemler ve olası çözümler

Antimikrobik İlaç	KK Suşu	Gözlem	Olası Neden	Yorumlar/Önerilen İşlemler
<b>Aminoglikozidler</b>	Herhangi bir suş	Zon çok küçük	Besiyeri pH'sı çok düşük	Kabul edilebilir pH sınırları=7.2-7.4 pH'yı düşüren CO2 inkübasyonundan kaçının
<b>Aminoglikozidler</b>	Herhangi bir suş	Zon çok büyük	Besiyeri pH'sı çok yüksek	Kabul edilebilir pH sınırları=7.2-7.4
<b>Aminoglikozidler</b>	<i>P.aeruginosa</i> ATCC27853	Zon çok küçük	Ca++ ve/veya Mg++ içeriği çok yüksek	Farklı parti (lot) besiyeri kullanın
<b>Aminoglikozidler</b>	<i>P.aeruginosa</i> ATCC27853	Zon çok büyük	Ca++ ve/veya Mg++ içeriği çok düşük	Farklı parti (lot) besiyeri kullanın
<b>Amoksisilin-klavulanik asit</b>	<i>E.coli</i> ATCC35218	Zon çok küçük	Klavulanik asit labil. Diskte aktivite kaybı	Farklı disk kartuşu kullanın Saklama koşullarını ve paketi kontrol edin.
<b>Ampisilin</b>	<i>E.coli</i> ATCC35218	Zon çok büyük (dirençli olduğu için hiç zon görülmemeli)	B-laktamazı kodlayan plazmidin kendiliğinden kaybolması	KK suşu devam ettirme için Bkz. Yorum (1).
<b>B-laktam grubu</b>	Herhangi bir suş	Önce uygun olan zon çapında sonradan azalma ve sınırların dışına kayma	Dsikte aktivite kaybı	Farklı disk kartuşu kullanın Saklama koşullarını ve paketi kontrol edin.. İmipenem, klavulanik asit özellikle dayanıksızdır
<b>Sefotaksim</b> <b>Seftazidim</b>	<i>K.pneumoniae</i> ATCC700603	Zon çok büyük	B-laktamazı kodlayan plazmidin kendiliğinden kaybolması	KK suşu devam ettirme için Bkz. Yorum (1).
<b>Sefotaksim-klavulanik asit</b> <b>Seftazidim-klavulanik asit</b>	<i>K.pneumoniae</i> ATCC700603	GSBL doğrulama testi negatif	B-laktamazı kodlayan plazmidin kendiliğinden kaybolması	KK suşu devam ettirme için Bkz. Yorum (1).
<b>Karbapenemler</b>	<i>P.aeruginosa</i> ATCC27853	Zon çok küçük	Besiyerindeki Zn++ konsantrasyonu çok yüksek	Farklı parti kullanın
<b>Karbapenemler</b>	<i>P.aeruginosa</i> ATCC27853	Zon çok küçük	Dsikte aktivite kaybı	Farklı parti(lot) kullanın Saklama koşullarını ve paketi kontrol edin.
<b>Penisilinler</b>	Herhangi bir suş	Zon çok büyük	Besiyeri pH'sı çok düşük	Kabul edilebilir pH sınırları=7.2-7.4

## Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi

Antimikrobik İlaç	KK Suşu	Gözlem	Olası Neden	Yorumlar/Önerilen İşlemler
				pH'yı düşüren CO2 inkübasyonundan kaçının
<b>Penisilinler</b>	Herhangi bir suş	Zon çok küçük	Besiyeri pH'sı çok yüksek	Kabul edilebilir pH sınırları=7.2-7.4
<b>Klindamisin</b>	<i>S.aureus</i> ATCC25923	Zon çok küçük	Besiyeri pH'sı çok düşük	Kabul edilebilir pH sınırları=7.2-7.4
				pH'yı düşüren CO2 inkübasyonundan kaçının
<b>Klindamisin</b>	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	Zon çok büyük	Besiyeri pH'sı çok yüksek	Kabul edilebilir pH sınırları=7.2-7.4
<b>Makrolidler</b>	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	Zon çok küçük	Besiyeri pH'sı çok düşük	Kabul edilebilir pH sınırları=7.2-7.4
				pH'yı düşüren CO2 inkübasyonundan kaçının
<b>Makrolidler</b>	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	Zon çok büyük	Besiyeri pH'sı çok yüksek	Kabul edilebilir pH sınırları=7.2-7.4
<b>Kinolonlar</b>	Herhangi bir suş	Zon çok küçük	Besiyeri pH'sı çok düşük	Kabul edilebilir pH sınırları=7.2-7.4
				pH'yı düşüren CO2 inkübasyonundan kaçının
<b>Kinolonlar</b>	Herhangi bir suş	Zon çok büyük	Besiyeri pH'sı çok yüksek	Kabul edilebilir pH sınırları=7.2-7.4
<b>Tetrasiklinler</b>	Herhangi bir suş	Zon çok büyük	Besiyeri pH'sı çok yüksek	Kabul edilebilir pH sınırları=7.2-7.4
				pH'yı düşüren CO2 inkübasyonundan kaçının
<b>Tetrasiklinler</b>	Herhangi bir suş	Zon çok küçük	Besiyeri pH'sı çok yüksek	Kabul edilebilir pH sınırları=7.2-7.4
<b>Tetrasiklinler</b>	Herhangi bir suş	Zon çok küçük	Ca++ ve/veya Mg++ içeriği çok yüksek	Farklı parti (lot) kullanın
<b>Tetrasiklinler</b>	Herhangi bir suş	Zon çok büyük	Ca++ ve/veya Mg++ içeriği çok düşük	Farklı parti (lot) kullanın
<b>Sülfonamidler, Trimetoprim-sulfametoksazol</b>	<i>E.coli</i> ATCC 25922	Zon ≤20mm		Farklı parti(lot) kullanın
<b>Çeşitli</b>	Herhangi bir suş	Birçok Zon çok büyük	İnokulum yoğunluğu düşük. İnokulum hazırlamada hata Besiyeri kalınlığı az MHA kalitesi uygun değil	McFarland 0.5 bulanıklık standardını veya standart cihazı kullanarak tekrar edin. Baryum sülfat veya lateks standardı kullanıyorsanız son kullanma tarihini ve saklama koşullarını kontrol edin. Agar kalınlığını 4 olarak ayarlayınmm Farklı parti MHA ile deneyin
Antimikrobik İlaç	KK Suşu	Gözlem	Olası Neden	Yorumlar/Önerilen İşlemler
<b>Çeşitli</b>	Herhangi bir suş	Birçok Zon çok küçük	İnokulum yoğunluğu	McFarland 0.5 bulanıklık standardını veya standart cihazı



Antimikrobik İlaç	KK Suşu	Gözlem	Olası Neden	Yorumlar/Önerilen İşlemler
			düşük. İnokulum hazırlamada hata Besiyeri kalınlığı az MHA kalitesi uygun değil	kullanarak tekrar edin. Baryum sülfat veya lateks standardı kullanıyorsanız son kullanma tarihini ve saklama koşullarını kontrol edin. Agar kalınlığını 4 olarak ayarlayın Farklı parti MHA ile deneyin
Çeşitli	Herhangi bir suş	Bir veya daha fazla zon çok küçük veya çok büyük	Ölçüm hatası Kayıt hatası Arada hatalı disk Diskler agara iyi yerleşmiyor	Ölçümleri tekrar edin yeniden kaydedin Testi tekrar edin. Hata bulunmamışsa ve sonuçlar yine sonuçların dışındaysa düzeltme işlemlerini başlatın
Çeşitli	S.pneumoniae ATCC49619	Zonlar çok büyük üreme az ve dağınık	İnokulumun hazırlandığı besiyeri plağı eski ve inokulum çok sayıda cansız bakteri içeriyor. 18-20 saatlik olmalı.	KK suşunun pasajını yapın ve KK testini tekrar edin veya stoktan yeni KK suşu açın.
Çeşitli	Herhangi bir suş	Aynı antibiyotik için bir KK suşu sınırların dışında sonuç veriyor.	Bir KK bakterisi KK sorunu hakkında daha iyi bir indikatör olabilir	Bu suşu tekrar test edin ve uygun sonuçların tekrarlanabilir olduğunu doğrulayın. MİK'leri bilinen farklı suşlarla tekrar değerlendirin. Sorunlu KK suşu/antibiyotik ikilisi için düzeltme işlemi başlatın.
Çeşitli	Herhangi bir suş	Aynı antibiyotik için bir KK suşu sınırların dışında sonuç veriyor.	Disk sorunu	Farklı disk kartuşu kullanın Saklama koşullarını ve paketi kontrol edin.
Çeşitli	Herhangi bir suş	Zonlar birbirine geçmiş	Plakta fazla sayıda disk	150 mm'lik plakta 12'den, 100 mm'lik plakta 5'ten fazla disk kullanmayın. Çok büyük zonlar veren bazı güçüreyen bakteriler için disk sayısını daha da azaltın.

## 1.7. Antimikrobiyal Duyarlılık Testlerinde Diğer KK İşlemleri

KK açısından besiyeri sterilitesi yanısıra, test uygulanırken diğer kontroller de yapılmalıdır. Bunlar:

- Üreme (canlılık) kontrolü: Öncelikle test suşunun canlılığı değerlendirilir. Test sırasında mutlaka antibiyotik içermeyen ve testte kullanılan besiyerine incelenecek mikroorganizma testte kullanılan inokulum yoğunluğunda eklenir. Üreme kontrolü aynı zamanda inhibisyonun değerlendirilmesi açısından bulanıklık kontrolü olarak da kullanılabilir.

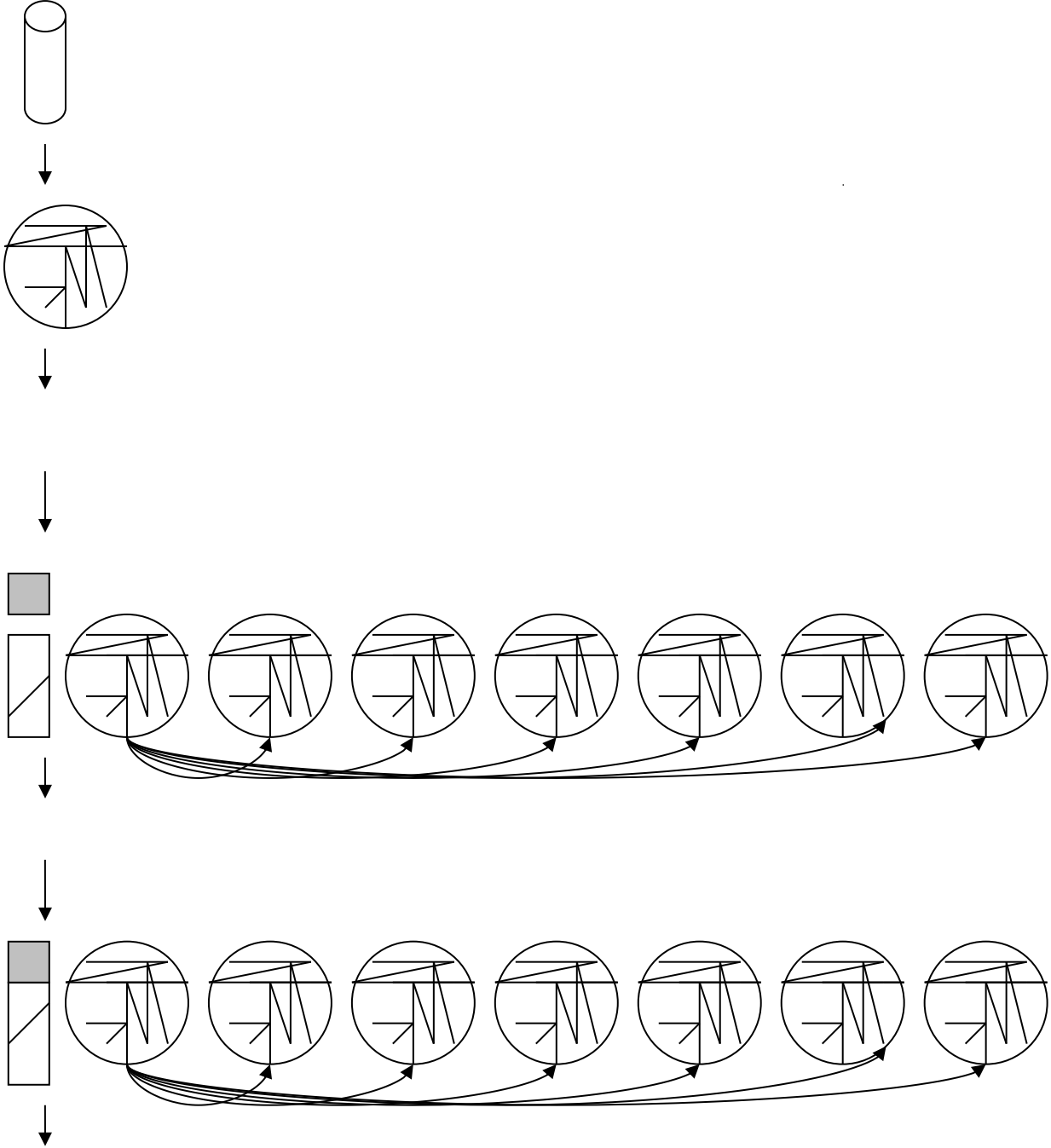
- Saflık kontrolü: Kullanılan inokulum süspansiyonu uygun bir agar plağına pasajlanır ve kontaminasyon olup olmadığı değerlendirilir.
- İnokulum kontrolü: 0.5 Mc Farland standardının ve sulandırım için kullanılan diğer malzemenin performansını değerlendirmek için 4 haftada bir kontrol yapılmalıdır. Bunun için inokulum eklenir eklenmez örnek alınıp koloni sayımı uygulanmalıdır.
- Sonuç değerlendirme kontrolü: Bu kontrol testin yapılmasından sorumlu tüm personelin aynı sonucu verebilmesi, MİK değerlerinde kişiye bağlı varyasyon olmaması için yapılır. Tüm değerlendiricilerin sonuçları  $\pm 1$  dilüsyon içinde olmalıdır.

## Ek 1 Duyarlılık Testi İçin İç KK Kayıt Formu

Kalite Kontrol izolatı, Disk (konsantrasyon), Zon çapı (mm)	TARİH											
	ZON ÇAPI (mm)											
<b><i>E. coli</i> ATCC 25922</b>												
Minosiklin(30µg) (19-25)												
CAZ(30 µg) (25-32)												
IMP(10 µg) (26-32)												
CTX(30 µg) (29-35)												
FOS(200 µg) 22-30)												
AMP(10 µg) (16-22)												
NN(10 µg) (18-26)												
CIP(5 µg) (30-40)												
SXT(1.25/23.75 µg) (23-29)												
GN(10 µg) (19-26)												
NOR(5 µg) (28-35)												
F(300 µg) (20-25)												
CXM(30 µg) (20-26)												
MEM(10 µg) (28-34)												
ERT(10 µg) (29-36)												
TE(30 µg) (18-25)												
NA(30 µg) (22-29)												
<b><i>E.coli</i> ATCC 35218</b>												
AMC(30 µg) (17-22)												
TZP(110 µg) (24-30)												
<b><i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853</b>												
CAZ(30 µg) (22-29)												
IMP(10 µg) (20-28)												
PRL(100 µg) (25-33)												
TZP(110 µg) (25-33)												
SCF(30 µg/75 µg)												
NN(10 µg) (19-25)												
LEV(5 µg) (19-26)												
GN(10 µg) (16-21)												
MEM(10 µg) (27-33)												
<b><i>S.aureus</i> ATCC 25923</b>												
P(10 U) (26-37)												
VA(30 µg) (17-21)												
E(30 µg) (22-30)												
GN(10µg) (19-27)												
CIP(5 µg) (22-30)												
SXT(1.25/23.75 µg) (24-32)												
FOX(1 µg) (23-29)												

DA(2 µg) (24-30)																			
LZD(30 µg) (25-32)																			
F(300 µg) (18-22)																			
Minosiklin(30µg) (25-30)																			
TE(30 µg) (24-30)																			
<i>E.faecalis</i> ATCC 29212																			
GN(120 µg) (16-23)																			
S (300 µg) (14-20)																			
<i>S.pneumoniae</i> ATCC 49619																			
OP																			
OX(1 µg) (<12)																			
E(30 µg) (25-30)																			
SXT(1.25/23.75 µg) (20-28)																			
LEV(5 µg) (20-25)																			
<i>S.pyogenes</i>																			
A (0.04 U)																			
<b>KONTROL EDEN</b>																			

## Ek 2. Kalite Kontrol Suşlarının Kullanıma Hazırlanması



NOT 1: Dondurulmuş ya da liyofilize kültürlerin testten önce iki kez pasajları yapılmalıdır

NOT 2: Kalite kontrol testleri için elde edilen kültürlerden izole edilen koloniler seçilir.

NOT 3: Kalite kontrol plakları kontamine veya kontrol testinin sonuçları güvenilir değilse; yeni bir pasaj hazırlanır veya yeni bir stok açılır.

NOT 4: Bazı organizmalar için kalite kontrol suşları en fazla iki hafta pasajlanır veya her hafta stoktan yeni kültür hazırlanır. (*P.aeruginosa* ATCC® 27853, *E.faecalis* ATCC® 51299, *S.pneumoniae* ATCC® 49619)

## Ek-3: Mikrobiyoloji Laboratuvarında Kolay ve Güç Üreyen Mikroorganizmaların Rutin Test ve Bildiriminde Önerilen Antimikrobik İlaç Gruplamaları

**Tablo 1:** Mikrobiyoloji Laboratuvarında Kolay Üreyen Mikroorganizmaların Rutin Test ve Bildiriminde Önerilen Antimikrobik İlaç Gruplamaları

	<i>Enterobacteriaceae</i> <sup>e</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter spp.</i> <sup>g</sup>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <sup>g</sup>	*Diğer <i>Enterobacteriaceae</i> Dışındakiler <sup>g</sup>
Grup A Öncelikle Test edilecek ve bildirilecek ajanlar	Ampisilin <sup>g</sup> Sefazolin <sup>f</sup> Gentamisin Tobramisin	Seftazidim Gentamisin Tobramisin Piperasilin	Seftazidim Siprofloksasin Levofloksasin İmipenem Meropenem Gentamisin Tobramisin	Trimetoprim-sülfametoksazol	Seftazidim Gentamisin Tobramisin Piperasilin
Grup B Test edilecek Kısıtlı Bildirilecek Ajanlar**	Amikasin Amoksisilin-klavulanik asit Piperasillin-tazobaktam Sefuroksim Sefoksitin Sefotaksim/seftriakson <sup>e,f</sup> Siprofloksasin <sup>e</sup> Levofloksasin <sup>e</sup> Doripenem Ertapenem İmipenem Meropenem Piperasillin Trimetoprim-sülfametoksazol <sup>e</sup>	Amikasin Siprofloksasin Levofloksasin İmipenem Meropenem Piperasillin-tazobaktam	Amikasin Piperasillin-tazobaktam Sefotaksim Minosiklin Tetrasiklin Piperasilin Trimetoprim-sülfametoksazol	*Seftazidim *Kloramfenikol <sup>c</sup> Levofloksasin Minosiklin	Amikasin Siprofloksasin Levofloksasin İmipenem Meropenem Piperasillin-tazobaktam Trimetoprim-sülfametoksazol
Grup C Ek Kısıtlı Bildirilecek Ajanlar	Seftazidim Kloramfenikol <sup>c,e</sup> Tetrasiklin				Sefotaksim Kloramfenikol <sup>c</sup>
Grup U Ek Sadece İdrar İzolatları İçin***	Sefalotin <sup>d</sup> Norfloksasin Nitrofurantoin	Norfloksasin			Norfloksasin

**Tablo 1 Devamı:** Mikrobiyoloji Laboratuvarında Kolay Üreyen Mikroorganizmaların Rutin Test ve Bildiriminde Önerilen Antimikrobik İlaç Gruplamaları

	<b><i>Staphylococcus spp.</i></b>	<b><i>Enterococcus spp.</i></b>
Grup A Öncelikle Test edilecek ve bildirilecek ajanlar	Azitromisin/klaritromisin/eritromisin <sup>c</sup> Klindamisin <sup>c</sup> *, <sup>+</sup> Oksasilin <sup>h,j</sup> Sefoksitin <sup>h,j</sup> Penisilin <sup>h</sup> Trimetoprim-sülfametoksazol	Ampisilin Penisilin <sup>m</sup>
Grup B Test edilecek Kısıtlı Bildirilecek Ajanlar**	*Daptomisin <sup>h</sup> Linezolid Minosiklin <sup>e</sup> Tetrasiklin <sup>a</sup> Vankomisin Rifampin <sup>b</sup>	*Daptomisin <sup>h</sup> Linezolid Vankomisin
Grup C Ek Kısıtlı Bildirilecek Ajanlar	Kloramfenikol <sup>c</sup> Siprofloksasin/levofloksasin Gentamisin	Gentamisin (yalnız yüksek düzey direnç taraması için) Streptomisin (yalnız yüksek düzey direnç taraması için)
Grup U Ek Sadece İdrar İzolatları İçin***	Norfloksasin Nitrofurantoin	Siprofloksasin Levofloksasin Norfloksasin Nitrofurantoin Tetrasiklin <sup>a</sup>

\*: Sadece MİK Testi, disk difüzyon testi güvenilir değil

\*\* : Kısıtlı bildirimde dirençli ajanlar bildirilir, duyarlılar eğer A kategorisindeki ajanlara direnç varsa veya ilaç hastanın tedavisinde uygulanmaktaysa bildirilir.

\*\*\*: İdrar izolatları için öncelikle uygulanacak ve A kategorisi ile birlikte bildirilecek antibiyotikler

+ : Dış kaynakta yer alan oksasilin sefoksitin ve vankomisin önerilerine bakınız.

## Genel Yorumlar:

a. Tetrasikline duyarlı olan bakteriler doksisisiklin ve minosikline de duyarlı kabul edilir. Bununla birlikte tetrasikline orta duyarlı ve dirençli olan bazı bakteriler minosiklin veya doksisisikline yada her ikisine tetrasiklinden daha duyarlı olabilir.

b. Rifampin antimikrobik kemoterapi için tek başına kullanılmamalıdır.

c. Üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen bakterilerde rutin olarak bildirilmez.

## ***Enterobacteriaceae***

d. Sefalotin yorumlama kriterleri sadece oral ilaçlar; sefadroksil, sefpodoksim, sefaleksim ve lorakarbef sonuçlarını öngörmek için uygulanabilir. Geçmişteki sefalotinin diğer bazı sefalosporinlere duyarlılığı öngörebileceği bilgisi hala doğru olabilir ancak bunu doğrulayacak güncel bir veri yoktur.

e. *Salmonella* ve *Shigella spp.*'nin dışkı izolatları test edildiğinde sadece ampisilin, bir florokinolon ve trimetoprim/sülfametoksazol rutin olarak bildirilmelidir. Ayrıca, *Salmonella spp.*'nin bağırsak dışı izolatları için bir üçüncü kuşak sefalosporin test edilmeli ve bildirilmelidir; kloramfenikol istek yapılırsa test edilip bildirilir. **Duyarlılık testi ekstraintestinal ve intestinal kaynaklardan izole edilmiş tifoidal *Salmonella* (*S. Typhi* ve *Salmonella Paratyphi A-C*) için endikedir. Rutin duyarlılık testi intestinal kaynaklardan izole edilmiş tifoidal olmayan *Salmonella spp.* için endike değildir.**

f. BOS izolatlarında sefazolin yerine sefotaksim ve seftriakson denenmeli ve bildirilmelidir.

#### **Diğer Enterobacteriaceae-dışı türler**

g. Diğer Enterobacteriaceae dışı türler *Pseudomonas spp.* ve diğer kolay üreyen, glukozu fermente eden, gram negatif çomakları içerir, ancak *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Burkholderia cepacia*, ve *Stenotrphomonas maltophilia*'yı kapsamaz, çünkü bunlar için test edilmesi ve rapor edilmesi önerilen ilaçların ayrı listeleri bulunmaktadır.

*B. mallei* ve *B. pseudomallei* için test ve raporlama önerileri CLSI M45 dökümanında bulunmaktadır.

#### **Staphylococcus spp.**

h. Penisiline duyarlı stafilokoklar aynı zamanda stafilokok infeksiyonlarında klinik etkinliği kanıtlanmış diğer B-laktam ajanlara da duyarlıdırlar. Penisiline dirençli stafilokoklar penisilinaz labil penisilinlere dirençlidirler. Oksasiline dirençli stafilokoklar anti-MRSA aktivitesi olan tüm yeni sefalosporinler dışında şu anda piyasada bulunan tüm B-laktam antimikrobiyal ajanlara karşı dirençlidir. Bu nedenle, sadece penisilin ve sefoksitin veya oksasilin test edilerek, çok çeşitli B-laktam antimikrobiyal ajana karşı duyarlılık ve dirençlilik belirlenebilir. Diğer B-laktam ajanların, anti-MRSA aktivitesine sahip olanlar hariç, rutin olarak test edilmesi önerilmez.

#### **i. Solunum yolu izolatları için daptomisin rapor edilmemelidir.**

j. Sefoksitin disk difüzyon veya sefoksitin MİK testlerinin sonuçları *S. aureus* ve *S. lugdinensis*'de *mecA*'ya bağlı oksasilin direncini öngörmek için kullanılabilir. Koagülaz negatif stafilokoklarda (*S. lugdinensis* dışında) sefoksitin disk difüzyon testi, *mecA* kaynaklı oksasilin direncinin saptanmasında bir gösterge olarak kullanılır; sefoksitin sonuçlarına göre izolat oksasiline duyarlı veya dirençli olarak bildirilir. Penisilinaza dayanıklı bir penisilin test edilecek ise, tercih edilecek ilaç oksasilindir; sonuçlar penisilinaza dayanıklı diğer penisilinlere, kloksasilin, dikloksasilin ve flukloksasiline uygulanabilir.

k. Test sonucu duyarlı stafilokoklarda, aminoglikozidler sadece test sonucu duyarlı diğer aktif ajanlarla kombine olarak kullanılır.

#### **Enterococcus spp.**

l. **Uyarı:** *Enterococcus spp.* için sefalosporinler, aminoglikozidler (yüksek düzey direnç taraması hariç), klindamisin ve trimetoprim-sülfametoksazol in vitro olarak aktif görünebilir, ancak klinik olarak etkili değildirler ve bu izolatlar duyarlı olarak bildirilmemelidirler.

m. Penisiline duyarlı olan enterokokların B-laktamaz üretmiyorlar ise ampisilin, amoksisilin, ampisilin-sulbaktam, amoksisilin-klavulanat, piperasilin ve



piperasilin-tazobaktama da duyarlı olduğu öngörülebilir. Bununla birlikte, ampisiline duyarlı olan enterokokların penisiline duyarlı olduğu kabul edilemez. Eğer penisilin sonuçlarına gereksinim var ise penisilin test edilmelidir. Endokardit gibi ciddi infeksiyonlarda, gentamisin ve straptomisine karşı yüksek düzey direnç saptanmadıkça, ampisilin, penisilin veya vankomisin ile (duyarlı izolatlarda) bir aminoglikozid kombinasyonu tedavisi uygundur; bu kombinasyonların enterokoklara karşı sinerjik öldürücü etkisi olduğu düşünülmektedir.

**Tablo 2:** Mikrobiyoloji Laboratuvarında Güç Üreyen Mikroorganizmaların Rutin Test ve Bildiriminde Önerilen Antimikrobik İlaç Gruplamaları

	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus spp. Beta-hemolitik grup</i>	<i>Streptococcus spp. Viridans grup</i>
Grup A Öncelikle Test edilecek ve bildirilecek ajanlar	Eritromisin	Klindamisin	Ampisilin
	Penisilin (Oksasilin diski)	Eritromisin	Penisilin
	Trimetoprim-sülfametoksazol	Penisilin veya ampisilin	
Grup B	Sefepim	Sefepim veya	Sefepim
Test edilecek	Sefotaksim	sfotaksim veya	Sefotaksim
Kısıtlı Bildirilecek	Seftriakson	seftriakson	Seftriakson
Ajanlar**	Klindamisin	Vankomisin	Vankomisin
	Gemifloksasin		
	Levofloksasin		
	Moksifloksasin		
	Ofloksasin		
	Meropenem		
	Telitromisin		
	Tetrasiklin		
	Vankomisin		
Grup C Ek Kısıtlı Bildirilecek Ajanlar	Amoksisilin	Kloramfenikol	Kloramfenikol
	Amoksisilin-klavulanik asit	Daptomisin	Klindamisin
	Sefuroksim	Levofloksasin	Eritromisin
	Kloramfenikol	Ofloksasin	Linezolid
	Ertapenem	Linezolid	
	İmipenem	Kunipristin-dalfopristin	
	Linezolid		
	Rifampin		

\*:Sadece MİK Testi, d,sk difüzyon testi güvenilir değil

\*\*::Kısıtlı bildirimde dirençli ajanlar bildirilir, duyarlılar eğer A kategorisindeki ajanlara direnç varsa veya ilaç hastanın tedavisinde uygulanmaktaysa bildirilir.

+:Dış kaynakta yer alan oksasilin sefoksitin ve vankomisin önerilerine bakınız.

## **Genel Yorumlar**

- a. Azitromisin, klaritromisin ve diritromisine karşı duyarlılık ve direnç, eritromisain test edilerek belirlenebilir.
- b. Tetrasiklin duyarlı olan izolatlar her zaman doksisisiklin ve minosiklin duyarlı kabul edilir.
- c. Üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen bakterilerde rutin olarak bildirilmez.

## **Streptococcus pneumoniae**

j. Levofloksasine duyarlı olan *S. pneumoniae* izolatlarının gemifloksasin ve moksifloksasine de duyarlı olduğu öngörülebilir. Buna karşın gemifloksasin ve moksifloksasine de duyarlı

olan *S. pneumoniae*'nin levofloksasine duyarlı olduğu kabul edilemez.

k. *S. pneumoniae*'nin BOS izolatlarında penisilin ve sefotaksim veya seftriakson veya meropenem güvenilir bir MİK yöntemi ile test edilmeli ve bildirilmelidir. Bu izolatlarda MİK veya disk yöntemi kullanılarak vankomisin de test edilmelidir. Diğer örneklerden gelen izolatlarda oksasilin disk tarama testi kullanılabilir. Eğer oksasilin zon çapı  $\leq 19$  mm ise penisilin ve sefotaksim veya seftriakson veya meropenem MİK'leri belirlenmelidir.

l. Rifampin antimikrobik kemoterapi için tek başına kullanılmamalıdır.

## **Streptococcus spp.**

m. Penisilin ve ampisiline orta duyarlı izolatlar bakterisidal etki için bir aminoglikozidle kombine tedaviye gereksinme gösterebilir.

n. Beta hemolitik streptokok infeksiyonlarının tedavisinde tercih edilecek antibiyotikler penisilin ve ampisilindir. Penisilinler ve FDA'nın beta hemolitik streptokokların tedavisi için onay verdiği diğer  $\beta$ -laktamların rutin olarak duyarlılık testlerinin yapılmasına gerek yoktur, çünkü duyarlı olmayan izolatlar (yani penisilin MİK'leri  $>0.12$  ve ampisilin MİK'leri  $>0.25\mu\text{g/ml}$ ) beta hemolitik streptokoklar arasında çok ederdir. *Streptococcus pyogenes*'de bildirilmemiştir. Eğer test yapılır ve herhangi bir beta hemolitik streptokok izolatı ile "duyarlı olmayan" sonucu alınırsa bu izolat tekrar tanımlanmalı, tekrar test edilmeli ve eğer sonuç doğrulanırsa bir halk sağlığı laboratuvarına gönderilmelidir.

o. *S. pyogenes*'de bildiriniz.

p. Grup B streptokoklar için intrapartum proflakside penisilin veya ampisilin önerilmektedir. Anafilaksi yönünden düşük risk taşıyan penisiline alerjik kadınlarda sefazolin önerilirken, yüksek risk taşıyanlarda klindamisin veya eritromisin kullanılabilir. Grup B streptokoklar penisilin, ampisilin ve sefazoline duyarlıdır; ancak klindamisin ve/veya eritromisine dirençli olabilir. Ağır penisilin alerjisi olan bir hamile kadında grup B streptokok izole edildiğinde, klindamisin ve eritromisin test edilmeli ve bildirilmelidir.

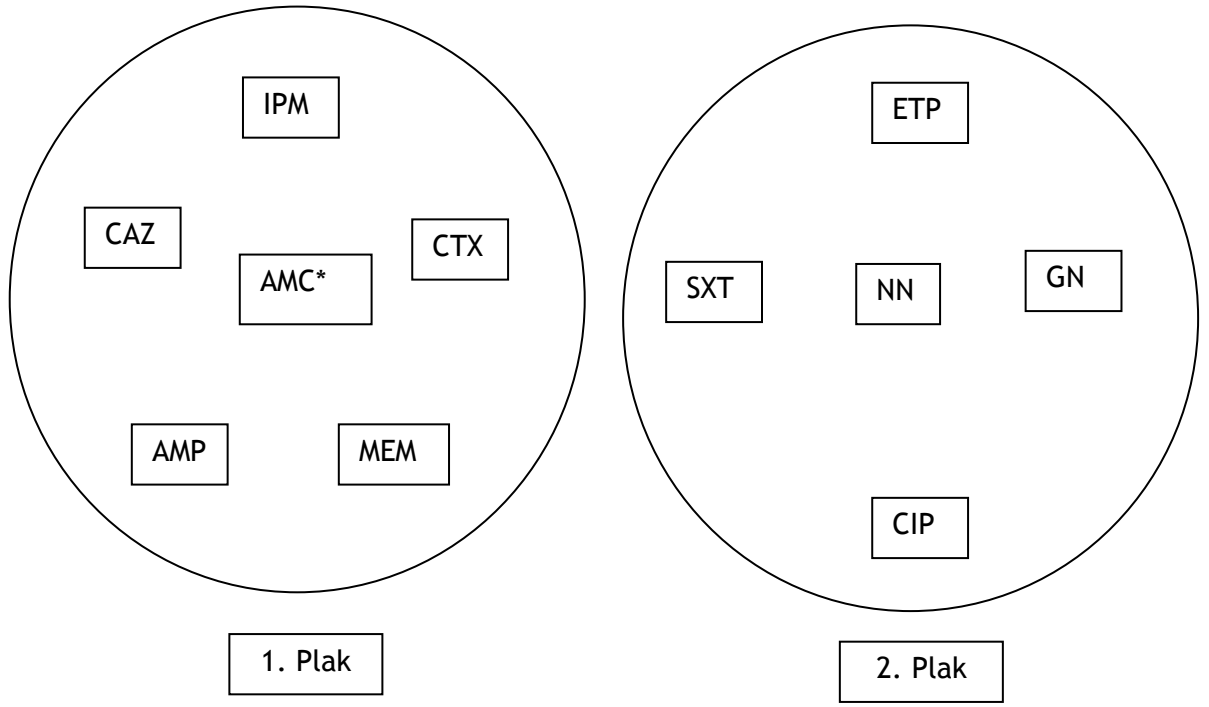
q. Bu tabloda beta hemolitik grup, streptokokların Grup A (*S. pyogenes*), C veya G antijeni içeren, büyük koloni oluşturan piyojenik suşların ve Grup B antijeni içeren (*S. agalactiae*) suşları kapsamaktadır. Grup A,C,F veya G antijenlerini içeren ama küçük koloniler oluşturan beta hemolitik suşlar (*S. anginosus*

(eskiden *S.millieri* olarak adlandırılmıştır)) viridans grubundan sayılmaktadır ve bunlara viridans grubu için verilen yorumlama kriterleri kullanılmaktadır.

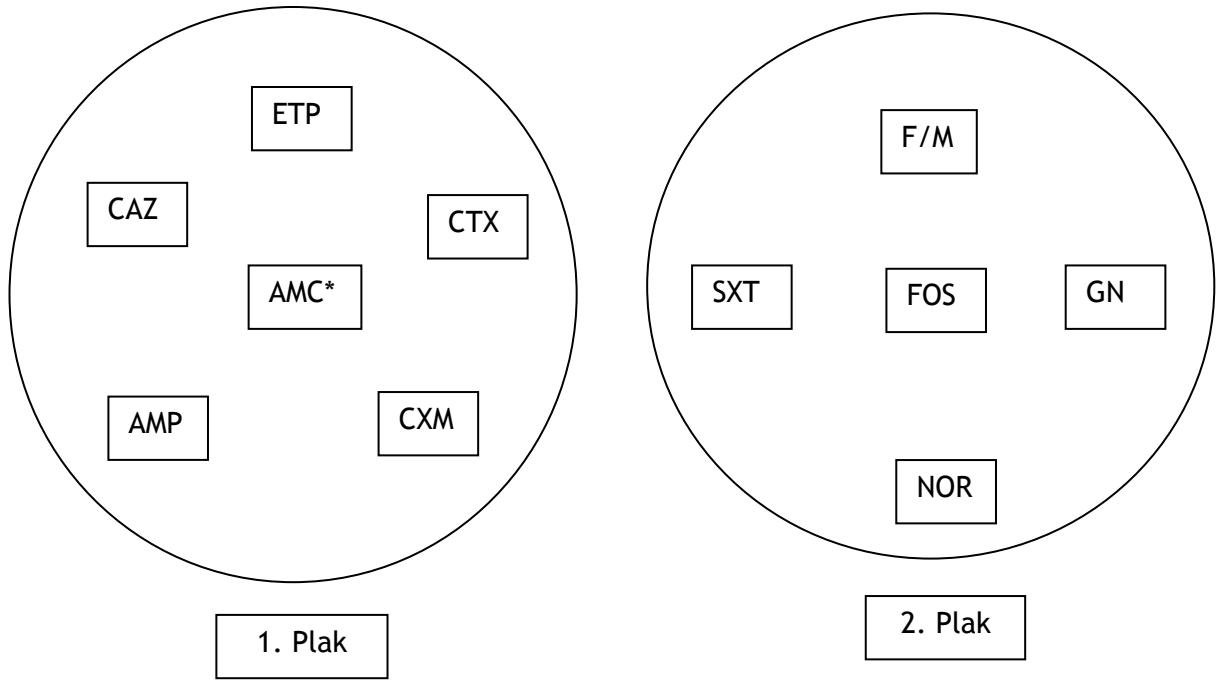
r. **Solunum yolu izolatları için daptomisin rapor edilmemelidir.**

## Ek-4: Antibiyotik disklerinin plaklara yerleştirilmesi kullanılan Antibiyotik diskleri ve kısaltmalar

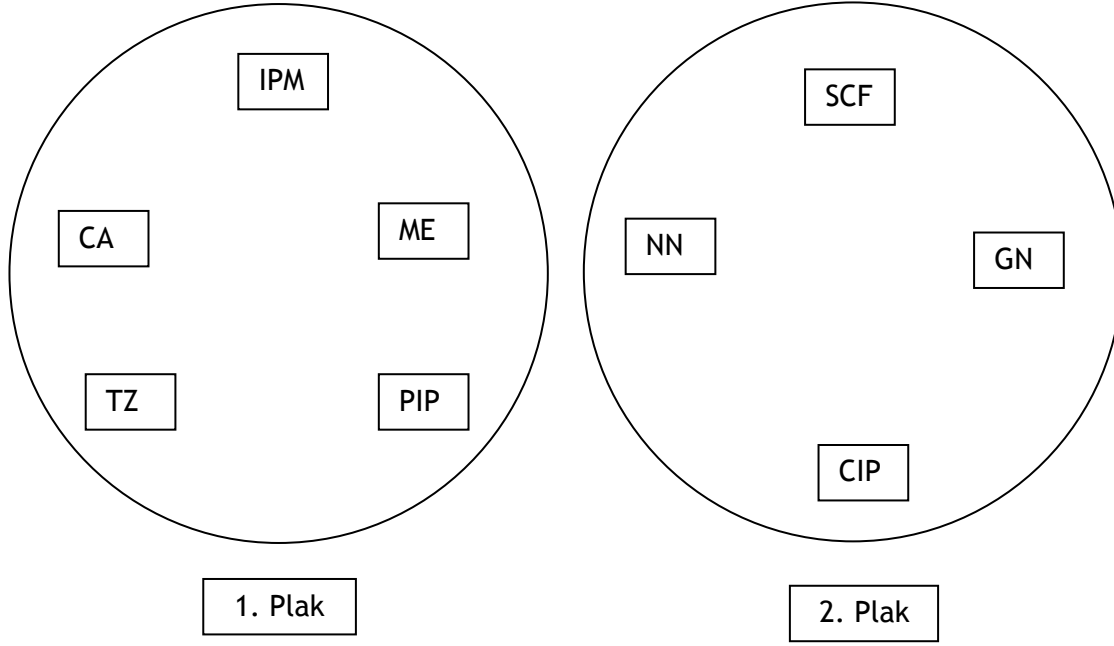
Antibiyotik	Kısaltma
Ampisilin	AMP
Piperasilin	PIP
Amoksisilin klavulanik asit	AMC
Piperasilin Tazobaktam	TZP
Sulbaktam Sefaperazon	SCF
Sefoksitin	FOX
Sefuroksim	CXM
Sefotaksim	CTX
Seftazidim	CAZ
Ertapenem	ETP
İmipenem	IPM
Meropeem	MEM
Gentamisin	GN
Tobramisin	NN
Siprofloksasin	CIP
Levofloksasin	LEV
Norfloksasin	NOR
Trimetoprim-Sulfametoksazol	SXT
Fosfomisin	FOS
Nitrofurantoin	F/M
Minosiklin	MN
Tetrasiklin	TE
Eritromisin	E
Klindamisin	CC
Linezolid	LZD
Vankomisin	VA
Gentamisin 120 mg	GN120
Streptomisin 120 mg	S300
Oksasilin	OX
Optokin	OP



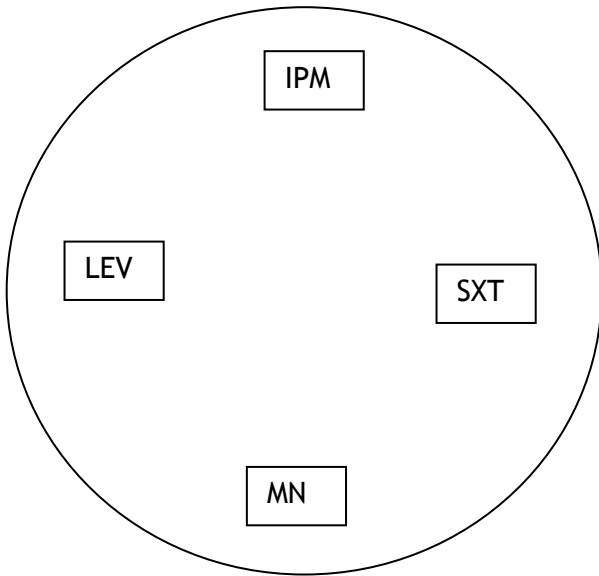
**Şekil 1: Gram negatif bakteriler (İdrar dışı örneklerde)**  
 \*:Kan kültür örneklerinde AMC yerine SCF yerleştirilir



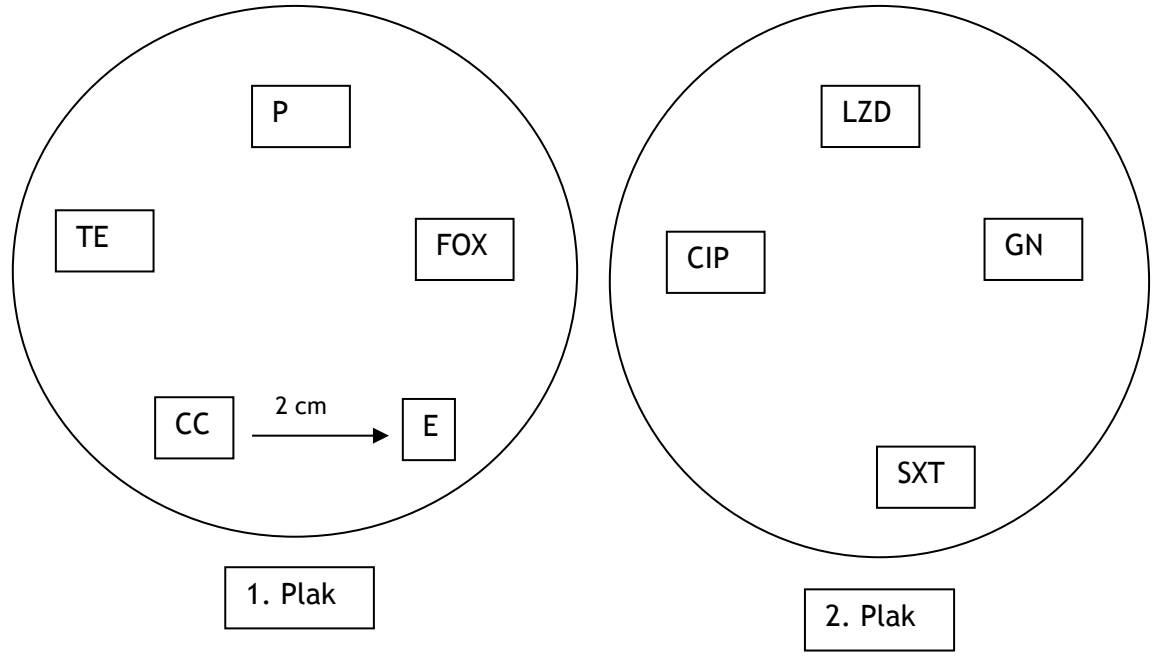
**Şekil 2: Gram negatif bakteriler (İdrar örneklerinde)**



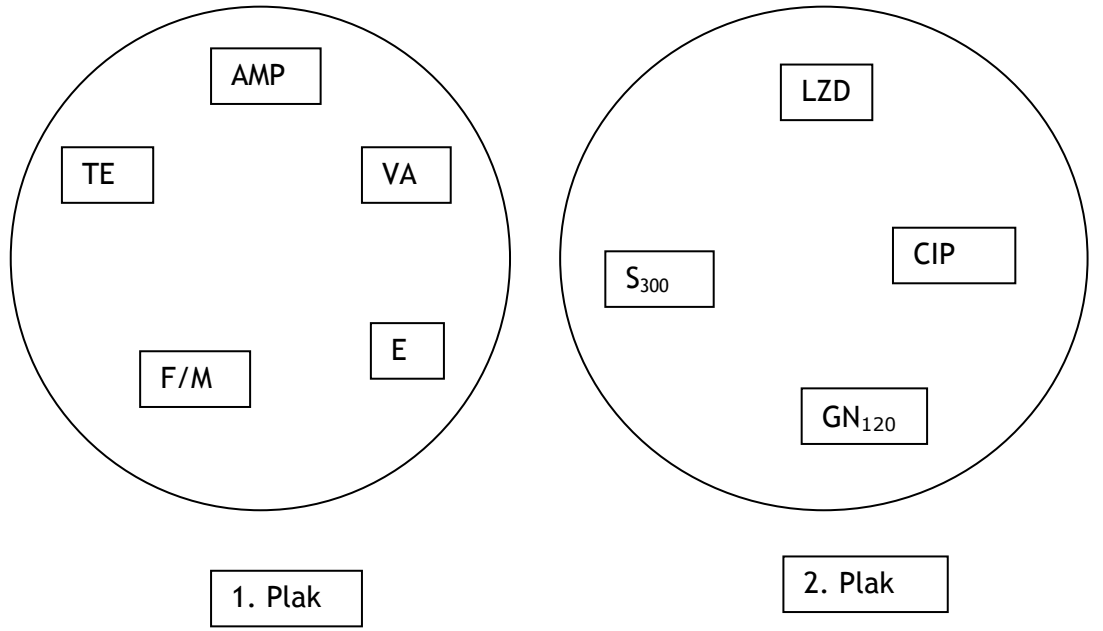
**Şekil 3: *Pseudomonas aeruginosa***



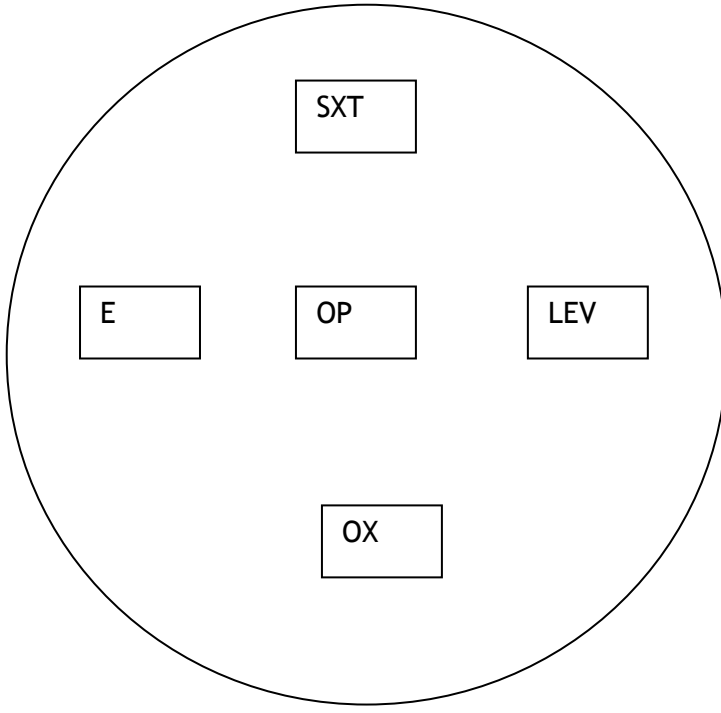
**Şekil 4: *Stenotrophomonas maltophilia***



**Şekil 5:** *Staphylococcus spp.* (İdrar örneklerinde CC test edilmemektedir. Birinci plağa F/M ve NOR ikinci plağa ise NV diskleri yerleştirilir.)



**Şekil 6:** *Enterococcus spp.* (F/M: Sadece idrar örneklerinde test edilir.)



**Şekil 7:** *Streptococcus pneumoniae*

## Ek-5: Kullanımdaki diskler ve en sık karşılaşılan türler ile ilgili duyarlılık testi değerlendirme tabloları

### Enterobacteriaceae Zon Çapları

	S	I	R	Uyarılar
<b>AMP*</b>	≥17	14-16	≤13	
<b>TZP</b>	≥21	18-20	≤17	
<b>AMC*</b>	≥18	14-17	≤13	
<b>CTX</b>	≥26	23-25	≤22	ESBL tarama sınırı ≤27 mm
<b>CAZ</b>	≥21	18-20	≤17	ESBL tarama sınırı ≤22 mm
<b>ETP</b>	≥22	19-21	≤18	I/R karbapenemaz uyarısı
<b>IMP</b>	≥23	20-22	≤19	I/R karbapenemaz uyarısı
<b>MEM</b>	≥23	20-22	≤19	I/R karbapenemaz uyarısı
<b>GN10*</b>	≥15	13-14	≤12	
<b>NN/TOB*</b>	≥15	13-14	≤12	
<b>CIP*</b>	≥21	18-20	≤17	* <i>Salmonella spp.</i> dışı
	≥31	21-30	≤20	* <i>Salmonella spp.</i>
<b>NA</b>	≥19	14-18	≤13	<i>Salmonella ve Shigella</i>
<b>SXT*</b>	≥16	11--15	≤10	
<b>F</b>	≥17	15-16	≤14	İdrar izolati
<b>NOR</b>	≥17	13-16	≤12	İdrar izolati
<b>CXM</b>	≥23	15-22	≤14	İdrar izolati
<b>FOS</b>	≥16	13-15	≤12	İdrar izolati

\*: Öncelikle raporlanacaktır. Direnç varsa diğer antibiyotikler bildirilir.

### *Pseudomonas spp., Acinetobacter spp.* Zon Çapları

	S	I	R	
PIP	≥21	15-20	≤14	<i>Pseudomonas spp.</i>
	≥21	18-20	≤17	<i>Acinetobacter spp.</i>
TZP	≥21	15-20	≤14	<i>Pseudomonas spp.</i>
	≥21	18-20	≤17	<i>Acinetobacter spp.</i>
CAZ	≥18	15-17	≤14	<i>Pseudomonas spp.</i>
	≥18	15-17	≤14	<i>Acinetobacter spp.</i>
IPM	≥19	16-18	≤15	<i>Pseudomonas spp.</i>
	≥16	14-15	≤13	<i>Acinetobacter spp.</i>
MEM	≥19	16-18	≤15	<i>Pseudomonas spp.</i>
	≥16	14-15	≤13	<i>Acinetobacter spp.</i>
GN <sub>10</sub>	≥15	13-14	≤12	
NN/TOB	≥15	13-14	≤12	
CIP	≥21	16-20	≤15	
SXT	≥16	11--15	≤10	<i>Acinetobacter spp.</i>



## *Stenotrophomonas maltophilia*

	R	I	S
Minosiklin	≤14	15-18	≥19
Levofloksasin	≤13	14-16	≥17
SXT	≤10	11-15	≥16

Karbapenem ve aminoglikozidlere doğal dirençli

## *Burkholderia cepacia*

	R	I	S
CAZ	≤17	18-20	≥21
MEM	≤15	16-19	≥20
Minosiklin	≤14	15-18	≥19
SXT	≤10	11-15	≥16

Aminoglikozidlere doğal dirençli

## *Staphylococcus spp. Zon Çapları*

	S	I	R	
P	≥29	-	≤28	
FOX	≥25	-	≤24	KNS*
	≥22	-	≤21	S. aureus**
E	≥23	14-22	≤13	
CC/DA	≥21	15-20	≤14	
CIP	≥21	16-20	≤15	
SXT	≥16	11--15	≤10	
GN10	≥15	13-14	≤12	
LZD	≥21	-	≤20	
TE	≥19	15-18	≤14	
NOR	≥17	13-16	≤12	İdrar izolatu
F	≥17	13-16	≤12	İdrar izolatu

\* S.lugdunensis dışı

\*\* S.aureus ve S.lugdunensis için

\*\*\*: İdrarda sadece VA direnci saptandığında bildirilir.

## *Enterococcus spp. Zon Çapları*

	S	I	R	
AMP veya P*	≥17	-	≤16	
VA**	≥17	15-16	≤14	
E	≥23	14-22	≤13	
TE*	≥19	15-18	≤14	İdrar izolatu
GN120	≥10	-	≤9	
S300	≥10	-	≤9	
CIP	≥21	16-20	≤15	
LZD	≥23	21-22	≤20	
NOR*	≥17	13-16	≤12	İdrar izolatu
F*	≥17	15-16	≤14	İdrar izolatu
FOS*	≥16	13-15	≤12	İdrar izolatu

\*: İdrar izolatlarında test edilecek diskler.  
FOS sadece *E.faecalis* için bildirilir.

## *Streptococcus pneumoniae*

### Zon Çapları

	S	I	R
OX*	≥20	-	≤15
E	≥21	16-20	≤15
LEV/LVX	≥17	14-16	≤13
SXT	≥19	16-18	≤15

\*: zon çapı daha küçükse penisilin MİK çalışılır

## *Streptococcus pneumoniae* için Beta Laktam MİK Değerleri MİK (µg/ml)

	S	I	R
Penisilin paranteral (menejit dışı)	≤2	4	≥8
Penisilin parenteral (menejit)	≤0.06	-	≥0.12
Penisilin (oral penisilin V)	≤0.06	0.12 – 1	≥2
Sefotaksim (menejit)	≤0.5	1	≥2
Sefotaksim (menejit dışı)	≤1	2	≥4

## *Streptococcus spp. β-Hemolitik Grup*

	S	I	R
P* veya AMP	≥24	-	≤15
CTX	≥24	-	≤15
VA	≥17	-	≤15
E*	≥21	16-20	≤15
CC/DA*	≥19	16-18	≤15
TE	≥23	19-22	≤18
LEV/LVX	≥17	14-16	≤13
LZD	≥21	-	≤15

\*: Öncelikle test edilir ve bildirilir. *S.pyogenes* için P/AMP çalışılmasına gerek yoktur.

## *Streptococcus spp. Viridans Grup*

	S	I	R
CTX*	≥28	26-27	≤25
VA* <sup>1</sup>	≥17	-	≤15
E* <sup>1</sup>	≥21	16-20	≤15
CC/DA* <sup>1</sup>	≥19	16-18	≤15
TE	≥23	19-22	≤18
LEV/LVX	≥17	14-16	≤13
LZD	≥21	-	≤15

\*: Öncelikle çalışılır. Penisilin için MİK çalışılır.

<sup>1</sup>İdrarda bildirilmez. İdrar için TE, LVX, CTX çalışınız.

## İlgili diğer UMS belgeleri

AMD TP (Antimikrobiyal Duyarlılık Test Prosedürleri)-01 ve 02

AMD TB(Antimikrobiyal Duyarlılık Temel Bilgiler) -03

## Kaynaklar

1. Clinical and Laboratory Standards Institute.Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard, 10th ed. 2009. M2-A10. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute.Performance standards for antimicrobial susceptibility susceptibility testing; Twenty- third Informational supplement. 2013 M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
3. [www.eucast.org](http://www.eucast.org): EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing - Version 3.0 (April 2013)
4. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance - Version 1.0 (December 2013)



T.C. Sağlık Bakanlığı

## ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

# Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi (*EUCAST Standartları kullananlar için*)

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu 11
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri (AMD)
Bölüm	Test prosedürleri
Standart No	AMD-TP-03
Sürüm No	1.0
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

# İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	4
GENEL BİLGİ .....	5
TEKNİK BİLGİLER .....	7
1 Test için asgari laboratuvar koşulları .....	7
2 Testin uygulanması .....	11
2.1. Besiyeri Hazırlama .....	11
2.2. İnokulum Hazırlama .....	12
2.3. Agar plaklarının ekimi .....	13
2.4. Antimikrobiyal disklerin yerleştirilmesi.....	13
2.5. Plakların inkübasyonu .....	14
3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması .....	15
3.1. İnkübasyon sonrası plakların incelenmesi.....	15
3.2. Zonların ölçülmesi ve duyarlılık yorumlaması .....	15
EKLER.....	17
Ek -1 <i>Campylobacter jejuni</i> ve <i>coli</i> için disk difüzyon test.....	17
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	18
KAYNAKLAR.....	18

## Kapsam ve Amaç

Bu belgenin kapsamı, aerop koşullarda üreyen bakterilerin in vitro duyarlılığını belirlemek amacıyla disk difüzyon test yöntemi ile ilgili standart uygulamaları tanımlamaktır. Bu amaçla, disk difüzyon testi için kullanılacak agar plakları, test koşulları (inokulumun hazırlanması ve standardizasyonu, inkübasyon süresi ve inkübasyon sıcaklığı), uygulama basamakları, sonuçların yorumlanması ve kalite kontrol ile ilgili özellikler ve işlemler ele alınmıştır.

Bu doküman EUCAST standartları temel alınarak hazırlanmıştır.

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

# Kısaltmalar ve Tanımlar

<b>ATCC</b>	Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection) <a href="http://www.atcc.org">http://www.atcc.org</a>
<b>BLNAR</b>	$\beta$ -Laktamaz Negatif, Ampisilin Dirençli (resistant)
<b>CCUG</b>	Göteborg Üniversitesi Kültür Koleksiyonu (Culture Collection University of Göteborg) <a href="http://www.ccug.se">http://www.ccug.se</a>
<b>CECT</b>	İspanyol Tip Kültür Koleksiyonu (Colección Española de Cultivos Tipo.) <a href="http://www.cect.org">http://www.cect.org</a>
<b>CIP</b>	Pastör Enstitüsü Koleksiyonu (Collection de Institut Pasteur) <a href="http://www.cabri.org/CABRI/srs-doc/cip_bact.info.html">http://www.cabri.org/CABRI/srs-doc/cip_bact.info.html</a>
<b>DSM</b>	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)'den bakteri kültürleri ve DSM numaraları (Bacterial cultures from Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) have DSM numbers) <a href="http://www.dsmz.de/index.htm">http://www.dsmz.de/index.htm</a>
<b>GSBL</b>	Genişlemiş spektrumlu $\beta$ -laktamaz (ESBL, Extended spectrum $\beta$ -lactamase)
<b>EUCAST</b>	Antimikrobiyel Duyarlılık Testi ile ilgili Avrupa Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) <a href="http://www.eucast.org">http://www.eucast.org</a>
<b>MH</b>	Muller-Hinton agar
<b>MH-F</b>	Muller-Hinton agar –zor üreyen organizmalar (5% defibrine at kanı ve 20 mg/L $\beta$ -NAD eklenmiş MH)
<b>MRSA</b>	Metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> ( <i>mecA</i> veya <i>mecC</i> geni ile)
<b>NCTC</b>	Ulusal Tip Kültür Koleksiyonları (National Collection of Type Cultures) <a href="http://www.hpacultures.org.uk">http://www.hpacultures.org.uk</a>
<b><math>\beta</math>-NAD</b>	$\beta$ -Nikotinamid adenin dinukleotid
<b>SF/Salin</b>	0.85% NaCl'ün sudaki solusyonu

## Genel Bilgi

Duyarlılık testleri, antimikrobiyal kemoterapi gereken bir enfeksiyon hastalığına yol açmış ve antibiyotik duyarlılığı tür tanımı ile kesin olarak bilinmeyen tüm etkenler için uygulanması gereken testlerdir. Antibiyotik duyarlılık testleri, özellikle klinik tedavide sık kullanılan antibiyotiklere direnç gösterebildiği bilinen türler için uygulanır.

Bakterilerin antibiyotiklere in vitro duyarlılığının ölçümü için, çeşitli laboratuvar yöntemleri kullanılabilir. Bunlar arasında disk difüzyon klinik laboratuvarında sık görülen, kolay ve kısmen güç üreyen bakteriler için uygulanabilir.

Disk difüzyon, antimikrobiyal duyarlılık testinde en eski yaklaşımlardan biri olup rutin klinik laboratuvarlarda en yaygın kullanılan antimikrobiyal duyarlılık test yöntemlerinden biri olarak kalmıştır. Zor üreyen ancak sık rastlanan bakteriler de dahil bakteriyel patojenlerin çoğunu test etmeye uygundur. Ayrıca, birçok antimikrobiyal ajanın eş zamanlı test edilmesi sağlanır ve özel bir ekipmana gerek yoktur. Ancak bu tekniğin güvenilir, etkin, verimli sonuçlar verebilmesi için, doğru ve standart laboratuvar uygulamalarının yapılması gerekir.

Disk difüzyon uygulamalarının ülkede ve tüm dünyada standardizasyonu amaçlayan birçok ulusal ve uluslararası standardizasyon komitesi/ kuruluşu bulunmaktadır. Bunlar arasında önerileri en yaygın kullanılanlar: EUCAST (Antimikrobiyal Duyarlılık Testi ile ilgili Avrupa Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) <http://www.eucast.org> ve CLSI (Amerika Birleşik Devletleri "Clinical Laboratory Standards Institute" [www.clsi.org](http://www.clsi.org)) dir.

## CLSI

CLSI, kar amacı gütmeyen ve klinik laboratuvar standartlarını geliştirip yerleştirerek laboratuvar tıbbında mükemmeliyete ulaşmak ortak amacıyla, dünya çapında laboratuvar ile uğraşan uzmanların değişik görüşlerini bir araya getiren bir üyelik organizasyonudur. CLSI böylelikle laboratuvarların sorumluluklarını etkinlik verimlilik ve tüm dünyada uygulanabilirlik ölçütleriyle yerine getirmelerine yardımcı olmayı amaçlar. CLSI iki yılda bir disk difüzyon için M02 (en son 11.basım M02-A11), sulandırım testleri için M-07 (en son 9. Basım, M07-A9), ve her sene her iki belgeyi ilgilendiren güncel değişiklikleri kapsayan M-100 (en son M100-S23; 2013) kılavuzlarını yayınlamaktadır. Bu belgelere [www.clsi.org](http://www.clsi.org) adresinden ücreti karşılığında ulaşılabilir veya Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti ADTS grubu üyelerinin yayınladığı belgeler ve düzenlediği kurslar izlenebilir.

CLSI kılavuzlarında aerop koşullarda hızlı üreyen bakterilerle ilgili tablolar ve duyarlılık sınırları bulunabilmektedir. Ancak, *Campylobacter*, *Pasteurella*, HACEK grubu gibi mikroorganizmalar ile ilgili öneriler için M-45 kılavuzunun alınması gereklidir.

## EUCAST

Özellikle Avrupa ülkeleri ve üniversite çevresinden uzmanların bir araya geldiği, endüstriden bağımsız tamamen bilimsel dayanaklara göre karar alan bir kuruluştur. Disk difüzyon ile ilgili ilk kılavuzları 2009 yılında oluşturulmuştur. Bu kılavuz 2013

yılında güncellenmiş, Ocak 2014 tarihinden itibaren [www.eucast.org](http://www.eucast.org) sitesinden ulaşılabilir olması planlanmıştır.

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

EUCAST yönteminin zon çapı sınır değerleri, EUCAST tarafından uyumlulaştırılan sınır değerlere göre belirlenmiştir. Bu değerler, EUCAST tarafından yayınlanmıştır. Bu bilgilere, EUCAST elektronik sitesinden (<http://www.eucast.org>) ücretsiz ulaşılabilir.

## Ülkemiz ve EUCAST Standartlarına uyum süreci

Ülkemizde klinik laboratuvarlarda otomatize sistemler kullanılsa dahi, disk difüzyon halen ek testler için kullanılması gereken, bu nedenle de en yaygın olarak uygulanan yöntemdir. Disk difüzyon için halen en sık CLSI önerilerine uyulsa da, uygulamaların çok benzer olması, dokümanlarına kolay ve ücretsiz ulaşılması gibi nedenlerle EUCAST standartlarına geçilmesi hem ülkemizdeki uzman grupların hem de sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı (THSK)'nın ortak görüşüdür.

Bu amaçla Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti bünyesindeki Antibiyotik Duyarlılık Testleri Standardizasyonu (ADTS) çalışma grubu EUCAST'ın Ulusal düzeydeki temsilcisi olarak EUCAST standartlarına geçiş için gerekli belgeleri ve eğitim programlarını hazırlamaktadır. Günümüze kadar EUCAST disk difüzyon kılavuzu, EUCAST sınır değer tabloları, Özel Direnç Mekanizmalarının Saptanması kılavuzu bu grup tarafından dilimize çevrilmiştir. Bu belgelere ve güncellemelerine Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi internet sitesinden (<http://uamdss.thsk.gov.tr>) ulaşılabilir.

Bu doküman EUCAST standartları temel alınarak hazırlanmıştır.



# Teknik Bilgiler

## 1 Test için asgari laboratuvar koşulları

### 1.1. Laboratuvar güvenliği

Biyogüvenlik Düzeyi-2 için belirtilen güvenli laboratuvar çalışma yöntem ve uygulama kurallarına uygun olarak çalışılır.

### 1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Hedef mikroorganizmalarla çalışacak personelin; en az Sağlık Meslek Yüksek Okulu mezunu sağlık tekniker veya sağlık meslek liselerinin tıbbi laboratuvar programından mezun olan sağlık teknisyeni statüsünde, biyogüvenlik eğitimi almış ve bakteriyoloji laboratuvarında en az bir aylık eğitim sürecini tamamlamış olması gereklidir.

### 1.3. Örnek, Ayrac, Kit, Ekipman

#### İnceleme örneği

Bakteriyoloji laboratuvarına gönderilen boğaz kültürü hariç diğer örneklerden üretilen ve etken kabul edilen mikroorganizmalar için disk difüzyon yöntemi ile duyarlılık testi yapılır.

#### Gerekli diğer malzemeler

(Bkz. AMD-TP 02)

### 1.4. Kalite kontrol

1.4.1. Testin performansını izlemek için belirtilen kontrol suşları kullanılmalıdır.(Tablo 1) Prensip olarak önerilen suşlar tipik duyarlı suşlardır, ama dirençli suşlar da, yöntemin bilinen direnç mekanizmalarına bağlı direnci belirleyebileceğini doğrulamak için kullanılabilir (Tablo 2). Bu suşlar kültür kolleksiyonlarından veya ticari kaynaklardan satın alınabilir.

1.4.2. Kontrol suşlarını, canlılığını ve organizma karakterlerini sürdürebileceği koşullar altında saklanmalıdır. Gliserol sıvı besiyeri (veya ticari bir eşdeğeri) içindeki cam boncuklarda ve  $-70^{\circ}\text{C}$ 'da saklamak uygun bir yöntemdir. Hızlı üreyen organizmalar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'da saklanabilir. Kontrol suşları, biri kullanım kaynağı olarak ve diğeri gereğinde kullanım kaynağını tazelemek amacıyla arşiv olarak kullanılmak üzere iki şişe hazırlanarak saklanmalıdır.

1.4.3. Her hafta kullanımdaki şişeden bir boncuk, seçici olmayan uygun bir besiyerine pasajlanmalı ve saflık açısından kontrol edilmelidir. Haftanın her günü bu saf kültürden bir subkültür hazırlanmalıdır. Plakta beş-altı gün canlı kalamayacak olan zor üreyen organizmalar için, suşlar bir haftadan daha fazla pasajlanmamalıdır.

1.4.4. Kontrol suşlarının kabul edilebilir sınırları AMD-TP-03 (CLSI'a göre) Ek-1'de gösterilmiştir.

1.4.5. Test performansını izlemek için önerilen kalite kontrol suşları kullanılmalıdır (Tablo 1ve Tablo 2).

Kontrol testleri, en azından rutin panellerin bir parçası olan antibiyotikler için, günlük olarak yapılmalı ve kontrol edilmelidir.

Testlerin yapıldığı her gün, son 20 ardışık testin sonuçlarını incelenmelidir. Sonuçlar gidişat ve sürekli beklenenin altında ya da üstünde kalan zonlar açısından incelenmelidir. Eğer 20 testin iki veya daha fazlası sınır dışında kalıyorsa bunun nedeni araştırılmalıdır.

1.4.6. Kontrol suşları testin performansının tatminkar olduğu gösterilene kadar (20 testte 1'den fazla kontrol sınırı dışına çıkan olmadıkça) günlük olarak test edilmelidir. İstenen performanstan sonra test sıklığı haftada bire indirilebilir. Eğer performans standartları karşılanamıyorsa, sebebi araştırılmalıdır.

1.4.7. Rutin KK testlerine ek olarak, her yeni Muller-Hinton agar partisi test edilerek tüm zonların sınırlar içinde olduğundan emin olunmalıdır.

Aminoglikozid diskleri besiyerindeki divalent katyonların kabul edilemez değişkenliklerini, tigesiklin magnezyum değişkenliklerini gösterebilir ortaya koyabilir, trimetoprim-sulfametoksazol timidin içeriği ile sorun gösterebilir, eritromisin besiyerinin kabul edilemez pH'sını sergileyebilir.

**Tablo 1** Rutin tesler için kalite kontrol organizmaları

Organizma	Suş	Karakterisitik
<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 $\beta$ -laktamaz üreten
<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	Kromozomal aracılı düşük-düzey penisilin dirençli
<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

**Tablo 2** Özel direnç mekanizmalarını saptamak için ek kalite kontrol organizmaları

Organizma	Suş	Karakterisitik
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218 NCTC 11954 CIP 102181 DSM 5564 CCUG 30600 CECT 943	TEM-1 $\beta$ -laktamaz, ampisilin dirençli
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603 NCTC 13368 CCUG 45421 CECT 7787	GSBL-üreten suş (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-düzy aminoglikozid dirençli (HLAR) ve vankomisin dirençli ( <i>vanB</i> pozitif)
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 49247 NCTC 12699 CIP 104604 DSM 9999 CCUG 26214	$\beta$ -laktamaz negatif, ampisilin dirençli (BLNAR)

## 2 Testin uygulanması

### 2.1. Besiyeri Hazırlama

- MH agarı, üretici firmanın önerileri doğrultusunda, zor üreyen bakteriler için Tablo 3'de belirtilen ek katkıları ile hazırlayınız. (Bkz. AMD-TP-01)
- 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).
- Agar yüzeyi kullanılmadan önce kurutulmalıdır. Plakların kurutulmaya ihtiyacının olup olmaması ve agar yüzeyinin kurumaması için gereksinim duyulan zaman, saklama ve kurutma koşullarına bağlıdır. Plaklar, fazla kurutulmamalıdır.
- Laboratuvar koşullarında hazırlanan plakları 8-10°C'de depolayın. Eğer plaklar 7 günden uzun saklanacaksa başka bir saklama yöntemi, örneğin 4-8°C'de ağzı kapalı plastik torbalarda saklamak gerekli olabilir.
- Laboratuvar koşullarında hazırlanan plaklar için, plağın kurutulması, saklama koşulları ve raf ömrü laboratuvarın kalite güvencesi programının bir parçası olarak belirlenmelidir.
- Ticari olarak hazırlanmış plaklar, üreticinin önerileri doğrultusunda saklanmalı ve son kullanma tarihini geçirmeden kullanılmalıdır.

**Tablo 3 Antimikrobiyal duyarlılık testi için besiyeri**

Organizma	Besiyeri
<b>Enterobacteriaceae</b>	MH agar
<i>Pseudomonas spp.</i>	MH agar
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	MH agar
<i>Acinetobacter spp.</i>	MH agar
<i>Staphylococcus spp.</i>	MH agar
<i>Enterococcus spp.</i>	MH agar
<b>Streptococcus grup A, B, C ve G</b>	MH-F agar <sup>1</sup>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	MH-F agar <sup>1</sup>
<b>Viridans grup streptokoklar</b>	MH-F agar <sup>1</sup>
<i>Haemophilus spp.</i>	MH-F agar <sup>1</sup>
<i>Moraxella catarrhalis</i>	MH-F agar <sup>1</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i>	MH-F agar <sup>1</sup>
<i>Pasteurella multocida</i>	MH-F agar <sup>1</sup>
<i>Campylobacter jejuni ve coli</i>	MH-F agar <sup>1</sup> (Bkz. Ek 2)
<b>Diğer zor üreyen organizmalar</b>	Karara bağlanmamış

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

## 2.2. İnokulum Hazırlama

- Organizmanın salinde McFarland 0,5 bulanıklık standardı (Ek 1) yoğunluğunda suspansiyonunu yapmak için, doğrudan koloni suspansiyon yöntemi kullanılmalıdır. Bu değer *Escherichia coli* için yaklaşık  $1-2 \times 10^8$  CFU/mL'ye karşılık gelir.
- Doğrudan koloni suspansiyon yöntemi zor üreyen *Haemophilus spp.*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*,  $\beta$ -hemolitik ve diğer streptokoklar gibi organizmalar da dahil tüm organizmalar için uygundur.
- İnokulum Süspansiyonu seçici olmayan bir besiyerinde bir gecelik inkübasyon sonrası üreyen kolonilerden hazırlanmalıdır. Atipik varyantları seçmekten kaçınmak için (eğer mümkünse) morfolojik olarak benzer olan pek çok koloni kullanılmalı ve steril öze veya pamuk eküvyon çubuğu ile steril tuzlu su çözeltisinde bir suspansiyon hazırlanmalıdır.
- İnokulum suspansiyonu McFarland 0.5 standart yoğunluğuna standardize edilmelidir. Daha yoğun inokulum suspansiyonu inhibisyon zonunun azalmasına yol açarken, daha az inokulum ise tersine bir etkiye sahip olacaktır.
- Süspansiyonun yoğunluğunu ayarlamakta fotometrik bir cihaz kullanılması önerilmektedir. Fotometrik cihaz, üretici firmanın önerileri doğrultusunda McFarland 0.5 standartına kalibre edilmelidir. Alternatif olarak, suspansiyonun dansitesi görsel olarak da McFarland 0.5 bulanıklık standardıyla karşılaştırılabilir.
- Bulanıklık standardı kullanmadan önce bir vorteks karıştırıcısıyla kuvvetlice karıştırılmalıdır (bazı ticari standartlar jel-esaslı olup karıştırılmamalıdır, dolayısı ile üreticinin önerileri takip edilmelidir). Karşılaştırmaya yardımcı olmak için, test ve standartı üzerinde siyah çizgiler olan beyaz bir kağıt üzerinde karşılaştırılmalıdır, Wickerham Eşeli kullanılabilir. (Bkz. AMD-TP-02)
- *Streptococcus pneumonia*, tercihen kanlı agar plaktan McFarland 0.5 standart yoğunluğuna suspense edilmelidir. *Streptococcus pneumonia* çukulata agar plağından hazırlandığında McFarland 1.0 standardına eşdeğer olmalıdır.
- Süspansiyon optimal olarak hazırlandıktan sonra 15 dk içinde kullanılmalı ve en çok 60 dk saklanmalıdır

### 2.3. Agar plaklarının ekimi

- Steril pamuk silgeçi suspansiyona batırılır ve fazla sıvı, silgeçi kabın cidarında döndürerek uzaklaştırılır.

Fazla sıvının uzaklaştırılması, özellikle Gram-negatif organizmalar için plağı fazla inokulasyondan korumak için önemlidir.

- Inokulumu plağın yüzeyine, üç yönlü sürerek veya otomatik plak döndürücü kullanarak eşit dağılacak şekilde yayılmalıdır.
- İnokulum ağarın yüzeyine ekim yapıldıktan sonra diskler 15 dk içinde yerleştirilmelidir. Eğer plaklar diskler yerleştirilmeden önce, uzun süre oda ısısında bırakılırsa organizma üremeye başlayabilir, bu durum inhibisyon zon ölçülerinde hatalı azalmayla sonuçlanır.

### 2.4. Antimikrobiyal disklerin yerleştirilmesi

- Gereken disk içerikleri, sınır değerler ve kalite kontrol önerileri listelenmiştir. <http://www.eucast.org>.
- Diskler, ekim yapılmış ve kurutulmuş agar plağına uygun şekilde yerleştirilmelidir. Agara temas sıkı ve eşit olmalıdır. Diskler bir kez agar plağına yerleştirildikten sonra yerinden oynatılmamalıdır, çünkü diskten antimikrobiyalin difüzyonu çok hızlıdır.
- Plaktaki disk sayısı, zonların üst üste binmesinden ve ajanlar arası etkileşimden korumak için sınırlı olmalıdır. Zon çaplarının güvenilir şekilde ölçülmesi önemlidir. 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.
- Stafilkok ve streptokoklarda indüklenebilir klindamisin direncini saptayabilmek için, eritromisin ve klindamisin diskleri kenardan kenara 12-20 mm uzaklıkta yerleştirilmelidir.
- Diskteki antimikrobiyal ajanın potens kaybı, sık bir hata kaynağıdır ve zon çapında azalmaya yol açar. Bu durumda aşağıdaki basamakların izlenmesi gereklidir:
- Dağıtıcı (dispenser) dakiler de dahil olmak üzere, diskler bir nem giderici ile birlikte ağız sıkıca kapatılmış kaplarda ve ışıktan korunacak şekilde saklanmalıdır. (metranidazol, kloramfenikol, ve florokinolonların da içinde yer aldığı bazı antimikrobiyaller ışığa uzun süre maruz kaldıklarında inaktive olurlar).
- Disk stokları, tedarikçi açıklamalarında farklı bir bilgi yazmadıkça, -20°C'de saklanmalıdır. Eğer bu mümkün değilse, diskler <8°C'da saklanmalıdır.
- Çalışmada kullanılacak ek malzemeler <8°C'de saklanmalıdır.
- Nemlenmeyi önlemek için disklerin ambalajları/saklama kapları açılmadan oda ısısına gelmelerini sağlanmalıdır.
- Üretici firma tarafından kutu üzerinde belirtilen son kullanma tarihi geçtiğinde diskler atılmalıdır.

## 2.5. Plakların inkübasyonu

- Diskleri yerleştirdikten sonra 15 dk içinde plakları ters çevrilerek inkübe edilir. Eğer plaklar, diskler konduktan sonra oda ısısında bırakılırsa, pre-difüzyon hatalı geniş inhibisyon zonu ile sonuçlanabilir.
- 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 güvence programının bir parçası olmalıdır.
- Plaklar Tablo 4'de sunulan koşullarda inkübe edilmelidir.
- Bazı *Enterococcus* spp.'de 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 izolatların plakları 24 saate kadar tekrar inkübe edilmeli ve yeniden okunmalıdır.

**Tablo 4** Antimikrobiyal duyarlılık test plakları için inkübasyon koşulları

Organizma	Inkübasyon koşulları
<b>Enterobacteriaceae</b>	35±1°C'de, normal atmosferde, 16-20 saat
<b><i>Pseudomonas</i> spp.</b>	35±1°C'de, normal atmosferde, 16-20 saat
<b><i>Stenotrophomonas maltophilia</i></b>	35±1°C'de, normal atmosferde, 16-20 saat
<b><i>Acinetobacter</i> spp.</b>	35±1°C'de, normal atmosferde, 16-20 saat
<b><i>Staphylococcus</i> spp.</b>	35±1°C'de, normal atmosferde, 16-20 saat
<b><i>Enterococcus</i> spp.</b>	35±1°C'de, normal atmosferde, 16-20 saat (glikopeptidler için 35±1°C 35±1°C'de, normal atmosferde, 24 saat)
<b>Streptococcus grup A, B, C ve G</b>	35±1°C'de, %4-6 CO <sub>2</sub> 'li atmosferde, 16-20 saat
<b><i>Streptococcus pneumoniae</i></b>	35±1°C'de, %4-6 CO <sub>2</sub> 'li atmosferde, 16-20 saat
<b>Viridans grup streptokoklar</b>	35±1°C'de, %4-6 CO <sub>2</sub> 'li atmosferde, 16-20 saat
<b><i>Haemophilus</i> spp.</b>	35±1°C'de, %4-6 CO <sub>2</sub> 'li atmosferde, 16-20 saat
<b><i>Moraxella catarrhalis</i></b>	35±1°C'de, %4-6 CO <sub>2</sub> 'li atmosferde, 16-20 saat
<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>	35±1°C'de, %4-6 CO <sub>2</sub> 'li atmosferde, 16-20 saat
<b><i>Pasteurella multocida</i></b>	35±1°C'de, %4-6 CO <sub>2</sub> 'li atmosferde, 16-20 saat
<b><i>Campylobacter jejuni</i> ve <i>coli</i></b>	Bakınız Ek 2
<b>Diğer zor üreyen organizmalar</b>	Karara bağlanmamış



## 3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması

### 3.1. İnkübasyon sonrası plakların incelenmesi

- Doğru bir inokulum ve uygun ekim yapılmış plaklarda, kolonilerin birbirleriyle birleşerek bir tabaka oluşturduğu bir üreme gözlenmelidir..
- Üreme, düzgün dairesel (pürüzlü olmayan) inhibisyon zonları sağlamak için plağın üzerine eşit olarak dağılmalıdır.
- Eğer tek tek koloniler görülebiliyorsa inokulum çok azdır ve test tekrarlanmalıdır.
- İnhibisyon zonlarının kalite kontrol sınırları içinde olduğu kontrol edilmelidir.

### 3.2. Zonların ölçülmesi ve duyarlılık yorumlanması

- Tüm ilaçlar için zon kenarı, plak gözden 30 cm uzakta tutularak çıplak gözle bakıldığında tam inhibisyonun olduğu noktada okunmalıdır.
- Katkı maddeleri ('Supplement') eklenmemiş plaklar, yansıyan ışık ile tersinden ve plağı koyu bir arka planın üzerine tutularak okunmalıdır.
- atkı maddeli plaklar ön yüzünden, kapağı açılarak ve yansıyan ışık ile okunmalıdır.
- Aksi söylenmedikçe, geçirgen ışık (plak ışığa tutularak) veya büyüteç kullanılmamalıdır.
- İnhibisyon zonunun çapı bir cetvel (en yakın milimetreye göre), kompas veya otomatik zon okuyucu ile ölçülmelidir.
- Zon çapları sınır değer tablosuna göre değerlendirilir. <http://www.eucast.org>.
- 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 versiyonu ile uyumlu olduğundan emin olunmalıdır. Şablon hazırlamak için ücretsiz bir program <http://bsac.org.uk/susceptibility/template-program> adresinden elde edilebilir.

#### **Okuma için özel talimatlar:**

- İnhibisyon zonu içinde tek düşecek şekilde üreyen koloniler pasajlanarak tanımlanmalı, gerekirse test tekrarlanmalıdır.
- Besiyerindeki antagonistler, sulfonamid veya trimetoprim zonu içinde diske kadar uzanabilen soluk üreme ile sonuçlanabilir. Böyle üremeler gözardı edilmeli ve zon çapı daha bariz olan zon kenarından ölçülmelidir.
- *Stenotrophomonas maltophilia* ve trimetoprim-sulfametoksazol ikilisinde zon içi üremeler olabilir. Böyle üremeler göz ardı edilmeli ve eğer herhangi bir zon kenarı görülebiliyorsa inhibisyon zonu okunmalıdır. Diske kadar üreme varsa ve hiç inhibisyon zonu görülemiyorsa zon yok olarak okunmalıdır.
- Enterobacteriaceae ve ampicilin ikilisinde, bazı Muller-Hinton agar partileri ile hazırlanan plaklarda bir iç zon şeklinde gözlenen ince bir film şeklindeki üremeler göz ardı edilir.
- *E.coli* ve mesilinam ikilisinde, inhibisyon zonunun içindeki izole koloniler gözardı edilmelidir.
- *Proteus* spp. için, yayılmayı göz ardı edin ve üremenin inhibisyonunu okuyun.

- Stafilokoklar ve benzilpenisilin ikilisinde, plak ışığa kaldırarak zon kenarı yakından incelenmelidir (geçirgen ışık). Zon çapı  $\geq$  duyarlı sınır değeri olan izolatlarda keskin zon kenarı varsa dirençli olarak rapor edilmelidir.
- *Staphylococcus aureus*'ta metisilin direnci saptamak için sefoksitin kullanıldığında, bariz olan zon ölçülür, inhibisyon zonu içindeki kolonileri görebilmek için iyi bir ışık ile zon dikkatlice incelenir. Bunlar ya kontaminasyondur ya da heterojen metisilin direncinin yansıması olabilir.
- Stafilokoklarda linezolid duyarlılık testleri plak ışığa kaldırarak tersinden okunmalıdır (geçirgen ışık).
- Enterokoklar ve vankomisin ikilisinde, plak ışığa kaldırarak zon kenarı yakından incelenmelidir (iletken ışık). Belirsiz zon kenarları ve zon içi koloniler vankomisin direncini gösterir ve ileri araştırma gerektirir.
- MH-F besiyerindeki hemolitik streptokoklar için, hemolizin zonunu değil üremenin inhibisyonu okunmalıdır.  $\beta$ -hemoliz genellikle üremeden bağımsız olurken,  $\alpha$ -hemoliz ve üreme genellikle birlikte.

# Ekler

## Ek-1

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

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

<b><i>Campylobacter jejuni</i> ve <i>coli</i> için disk difüzyon yöntemi</b>	
<b>Besiyeri</b>	%5 defibrine at kanı ve 20 mg/L $\beta$ -NAD eklenmiş Muller-Hinton agar (MH-F) Yayılmayı önlemek için, MH-F plaklar inokulasyondan önce kurutulmalıdır (20-25°C'de bir gece, veya 35°C'de, kapağı açılarak 15 dk).
<b>İnokulum</b>	McFarland 0.5
<b>İnkübasyon</b>	Mikroaerobik ortam 41±1°C 24 saat  İnkübasyon eşit olarak dağılan bir üreme ile sonuçlanmalıdır. Bazı <i>C. coli</i> izolatları 24 saatlik inkübasyondan sonra yeterli üreme gösteremeyebilir. Bunlar hemen tekrar inkübe edilmeli ve toplam 40-48 saatlik inkübasyondan sonra okunmalıdır.  <i>Campylobacter</i> spp.nin üremesi için uygun koşulları sağlamak için 41±1°C'lik bir inkübasyon ısısı seçilmiştir.
<b>Okuma</b>	Standart EUCAST okuma kriterleri kullanılmıştır: MH-F plaklarını, yansıyan ışık kullanarak ve kapağı açarak önden okuyun. Zon kenarları plak gözden 30 cm uzakta tutularak, çıplak gözle tam inhibisyon olduğuna karar verilen nokta olarak okunmalıdır.
<b>Kalite kontrol</b>	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560 inhibisyon zonu tanımlanan sınırlar içinde olmalıdır ( <a href="http://www.eucast.org">http://www.eucast.org</a> ).

## İlgili diğer UMS belgeleri

AMD-TP (Antimikrobiyal Duyarlılık Test Prosedürleri)-01, 02

AMD-TP (Antimikrobiyal Duyarlılık Test Prosedürleri)-03 (CLSI'a göre) Ek-1

## Kaynaklar

1. [www.eucast.org](http://www.eucast.org): EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing - Version 3.0 (April 2013)

## ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

### MIK Saptama Yöntemleri

(Gradient difüzyon, sıvı dilüsyon ve agar dilüsyon)

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu 11
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri (AMD)
Bölüm	Test prosedürleri
Standart No	AMD-TP-04
Sürüm No	1.0
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

# İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	3
GENEL BİLGİ .....	4
TEKNİK BİLGİLER .....	5
1 Test için asgari laboratuvar koşulları .....	5
1.1. Laboratuvar güvenliği .....	5
1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri.....	5
2 Kolay Üreyen Bakteriler için Antimikrobik Duyarlılık Testleri.....	5
2.1. Dilüsyon testleri.....	5
Deyim ve tanımlar .....	5
Antimikrobik İlaçlar.....	6
Stok çözeltilerin Hazırlanması .....	7
2.1.1. SIVI DİLÜSYON YÖNTEMİ .....	9
Test Edilecek Konsantrasyonların Sayısı .....	9
Dilüsyon Testleri İçin İnokulumun Hazırlanması .....	10
MAKRODİLÜSYON (TÜP) YÖNTEMİ .....	10
İnokulumun Hazırlanması ve İnokülasyon: .....	12
SIVI MİKRODİLÜSYON YÖNTEMİ .....	12
Sulandırılmış Antimikrobik İlaçların Hazırlanması ve Saklanması ..	12
İnokulumun Hazırlanması ve İnokülasyon.....	13
İnkübasyon .....	13
MİK Değerlerinin Belirlenmesi.....	13
2.1.2. AGAR DİLÜSYON YÖNTEMİ .....	14
Maddeler ve Gereçler .....	14
Kontrol Plaklar .....	15
İnokulum .....	15
Agar Dilüsyon Plaklarının İnokülasyonu .....	15
Agar Dilüsyon Plaklarının İnkübasyonu.....	16
Agar Dilüsyon MİK'lerinin Belirlenmesi .....	16
2.1.3. GRADİYENT TESTİ .....	16
İnokulum .....	16
Test plaklarının inokülasyonu.....	17
Gradyent Test Şeritlerinin Plaklara Yerleştirilmesi.....	17
İnkübasyon .....	17
Plakların okunması ve sonuçların yorumlanması .....	17
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	18
KAYNAKLAR.....	19

## Kapsam ve Amaç

Bu bölümde EUCAST' in önerdiği gibi ISO 20776 standartları ve CLSI temel alınarak sıvı dilüsyon testleri tanımlanmıştır. MİK, tanımlanan test koşullarında ilacın aktivitesini yansıtmaktadır ve klinikte tedavi amacıyla ilacın farmakolojisi veya bakteriyel direnç mekanizmaları da dikkate alınarak yorumlanabilir.

## Kısaltmalar ve Tanımlar

<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>CFU</b>	Koloni Oluşturan Birim
<b>CLSI</b>	Clinical Laboratory Standards Institute
<b>EUCAST</b>	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
<b>I</b>	Orta duyarlı (intermediate)
<b>ISO</b>	International Organization for Standardization (Uluslararası Standartlık Örgütü)
<b>IU</b>	Uluslararası Birimde (International Unit)
<b>MİK</b>	Minimum İnhibitor Konsantrasyon
<b>MHA</b>	Mueller Hinton Agar
<b>R</b>	Dirençli (resistance)
<b>S</b>	Duyarlı (susceptible)
<b>SD</b>	Sınırdeğer

## Genel Bilgi

In vitro duyarlılık testleri hastalık etkeni olan mikroorganizmalarda, özellikle etkenin kullanımda olan antibiyotiklere direnç gösterme olasılığı olduğu düşünüldüğünde yapılmaktadır. Bu testler ayrıca direnç surveyansında, epidemiyolojik çalışmalarda ve yeni veya kullanımda olan antibiyotiklerin kıyaslanmasında önemlidir (<sup>1,2</sup>).

Dilüsyon yöntemleri antibiyotiklerin minimum inhibitör konsantrasyonlarını (MİK) saptamak için kullanılmaktadır ve antibiyotik duyarlılık testlerinde referans testlerdir.

MİK yöntemleri direnç surveyansı, yeni ilaçların kıyaslanması, rutin testlerde eşdeğer sonuç alınan mikroorganizmaların duyarlılığının saptanması, rutin testlerin güvenilir olmadığı mikroorganizmaların test edilmesi ve tedavide kantitatif bir sonuç gerektiğinde kullanılmaktadır.

Dilüsyon testlerinde mikroorganizmaların antibiyotiğin seri sulandırımını içeren bir dizi agar plağı (agar dilüsyon) veya buyyonda (sıvı dilüsyon) gözle görülür bir üreme oluşturması test edilir.

Tanımlanmış bir süre içinde bir mikroorganizmanın gözle görülebilen üremesini engelleyen en düşük antibiyotik konsantrasyonu (mg/l) MİK olarak tanımlanmaktadır.

MİK, mikroorganizmanın duyarlılığına ilişkin klinisyene bir rehberdir ve tedaviye karar verirken yardımcı olmaktadır. Sonuçlar kullanılan yöntemden önemli ölçüde etkilenebileceğinden laboratuvar içinde ve laboratuvarlar arasında tekrarlanabilir olması için dikkatli bir kontrol ve standardizasyon gerekmektedir. Genellikle MİK testlerinin gerçek son değerden  $\pm$  bir sulandırım (bir kuyucuk veya bir tüp) farklı olması tekrarlanabilir kabul edilir.

Sıvı dilüsyon, eş hacimde buyyon ve antibiyotik çözeltisi içeren kaplara (genellikle artan geometrik konsantrasyonlarda) belli sayıda mikroorganizmanın inoküle edildiği bir tekniktir.

Sıvı mikrodilüsyon ise sıvı dilüsyon testinin mikrodilüsyon plaklarında yapıldığı şeklidir.

Burada tanımlanan yöntem bir gecelik agar kültüründe kolay üreyen ve Mueller-Hinton buyyonda kolay üreyebilen aerobik bakterilerin saf kültürleri içindir (1,2).



## Teknik Bilgiler

### 1 Test için asgari laboratuvar koşulları

#### 1.1. Laboratuvar güvenliği

Biyogüvenlik Düzeyi-2 için belirtilen güvenli laboratuvar çalışma yöntem ve uygulama kurallarına uygun olarak çalışılır.

#### 1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Hedef mikroorganizmalarla çalışacak personelin; en az Sağlık Meslek Yüksek Okulu mezunu sağlık tekniker veya sağlık meslek liselerinin tıbbi laboratuvar programından mezun olan sağlık teknisyeni statüsünde, biyogüvenlik eğitimi almış ve bakteriyoloji laboratuvarında en az bir aylık eğitim sürecini tamamlamış olması gereklidir.

### 2 Kolay Üreyen Bakteriler için Antimikrobik Duyarlılık Testleri

#### 2.1. Dilüsyon testleri

Bu bölümde EUCAST' in (1) önerdiği gibi ISO 20776 standartları <sup>(3)</sup> ve CLSI (2) temel alınarak sıvı dilüsyon testleri tanımlanmıştır. MİK, tanımlanan test koşullarında ilacın aktivitesini yansıtmaktadır ve klinikte tedavi amacıyla ilacın farmakolojisi veya bakteriyel direnç mekanizmaları da dikkate alınarak yorumlanabilir. Buna göre üç kategori vardır: Duyarlı (S), orta (I) veya dirençli (R).

#### DEYİM VE TANIMLAR

##### Antimikrobik ilaç

Enfeksiyonların tedavisinde kullanılan, biyolojik, sentetik veya yarı sentetik kökenli olup bakteri üremesini engelleyen veya bakteriyi öldüren madde.

NOT: Dezenfektan, antiseptik ve prezervatifler bu tanımda yer almamaktadır.

Antimikrobik ilaçlar — özellikler

##### Potens

Test edilecek maddenin antimikrobik olarak aktif olan kısmıdır.

NOT: Potens, gram başına kütle oranı (mg/g) veya gram başına uluslararası birimde (IU) aktivite içeriği, yüzde olarak hacim veya kütle oranı, test maddesinin litresindeki mol olarak (kütle fraksiyonu) ifade edilmektedir.

##### Konsantrasyon

Tanımlanmış bir hacim sıvıdaki antimikrobik ilaç miktarıdır.

NOT 1: Konsantrasyon mg/l olarak ifade edilir

NOT 2: mg/l = µg/ml ama µg/ml biriminin kullanılması önerilmemektedir.

**Stok çözelti:** Daha sonraki sulandırmalarda kullanılacak ilk çözeltidir.

**MİK:** Tanımlanmış in vitro koşullarda bakteri üremesini engelleyen en düşük konsantrasyondur. MİK mg/l olarak ifade edilir

**Sınırdeğer (SD):** MİK (disk difüzyon tesinde zon çapı) gibi özel parametreler; bunlara göre bakteriler duyarlı, orta veya dirençli olarak sınıflandırılır. Geçerli yorumlama sınırdeğerleri için, bu referans yöntemi uygulayan standartlara bakılabilir (örn. EUCAST ve CLSI).

**Duyarlı (S):** Tedavide büyük olasılıkla başarı sağlayacak antibiyotik konsantrasyonu ile inhibe olan bakteri suşudur. Bu sınır değer koşullarda değişiklik olursa değişebilir (örn. kullanılan ilaç dozajlarının değiştirilmesi, yeni direnç mekanizmalarının çıkışı gibi)

**Orta (I):** Tedavi etkisi belirsiz olan bir antibiyotik konsantrasyonu ile inhibe olan bakteri suşudur.

- Bu duyarlılık kategorisi, izolata bağlı bir enfeksiyonun ilacın fizyolojik olarak konsantre olduğu vücut bölgelerinde veya ilacın yüksek dozu kullanıldığında tedavi edilebileceğini belirtmektedir.
- Bu kategori küçük, kontrol edilemeyen teknik hataların yorumlamada büyük hatalara yol açmasını engelleyecek bir 'tampon zonu' oluşturmaktadır.
- Bu sınır değer, koşullarda değişiklik olursa değişebilir (örn. kullanılan ilaç dozajlarının değiştirilmesi, yeni direnç mekanizmalarının çıkışı gibi)

**Dirençli (R):** Tedavide büyük olasılıkla başarısız olacak antibiyotik konsantrasyonu ile inhibe olan bakteri suşudur. Bu sınır değer, koşullarda değişiklik olursa değişebilir (örn. kullanılan ilaç dozajlarının değiştirilmesi, yeni direnç mekanizmalarının çıkışı gibi)

**Sokak tipi:** Antimikrobik ilaca kazanılmış direncin olmadığı bakteri suşu

**Referans suş:** Sabit, tanımlanmış antimikrobik duyarlılık fenotipleri ve/veya genotipleri olan kataloglanmış, karakterize edilmiş bakteri

NOT: Referans suşlar stok kültürü olarak saklanır ve bunlardan pasaj yapılır. Bunlar kültür koleksiyonlarında bulunur ve kalite kontrol suşu olarak kullanılırlar.

## ANTİMİKROBİK İLAÇLAR

### Kaynak

Antimikrobik standartlar veya referans toz antibiyotikler doğrudan ilaç üreticisinden, veya ticari kaynaklardan sağlanabilir. Parenteral preparatlar duyarlılık testlerinde kullanılmamalıdır. Bu amaca uygun tozlar, ilacın jenerik adını, seri numarasını, potensini [genellikle her mg toz için mikrogram (µg) veya International Unit (IU) olarak gösterilmektedir] ve son kullanma tarihini içeren bir etiket taşımaktadır. Tozlar üreticinin önerilerine göre veya 4-8°C'de desikatör içerisinde saklanmalıdır. Desikatör, buzdolabı veya derin dondurucudan çıkarıldığında, açılmadan önce (buğu oluşumunu engellemek için oda sıcaklığına gelmesi beklenmelidir).

Antimikrobik ilaç tozları kalibre edilmiş analitik terazilerde tartılır. Mümkünse 100

mg'dan fazla toz tartılmaldır. Antimikrobik ilacın gerekenden fazla tartılması ve istenen son konsantrasyona ulaşmak için gereken sulandırıcı hacminin aşağıdaki formüle göre hesaplanması önerilmektedir:

$$\text{Ağırlık (mg)} = \frac{\text{Hacim (mL)} \times \text{Konsantrasyon } (\mu\text{g/mL})}{\text{Potens } (\mu\text{g/mg})}$$

$$\text{Hacim (mL)} = \frac{\text{Ağırlık (mg)} \times \text{Potens } (\mu\text{g/mg})}{\text{Konsantrasyon } (\mu\text{g/mL})}$$

## STOK ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

Antimikrobik ilaç stok çözeltileri en az 1000  $\mu\text{g/mL}$ 'lik (örn. 1280  $\mu\text{g/mL}$ ) konsantrasyonda hazırlanır. Antimikrobik ilaçlar üretici firma başka bir öneride bulunmadıkça steril distile su ile çözülüp sulandırılmalıdır. Bazı ilaçlar sudan başka çözücülerde eritilmelidir (Tablo I). Böyle durumlarda:

- Antimikrobik tozu çözebilecek en az miktarda çözücü kullanılmalıdır.
- Stok konsantrasyonunun son sulandırımı su veya uygun bir tamponla yapılmalıdır.

Tablo I. Antimikrobik İlaçların Stok Çözeltilerinin Hazırlanması İçin Gerekli Çözücü ve Sulandırıcılar

Antimikrobik ilaç	Çözücü	Sulandırıcı
<b>Amikasin</b>	Su	
<b>Amoksisilin</b>	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L
<b>Amoksisilin-klavulanik asit</b>	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L
<b>Ampisilin</b>	Fosfat tamponu, pH 8.0, 0.1 mol/L	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L
<b>Azitromisin</b>	%95 etanol veya glasiyal asetik asit <sup>a,b</sup>	Buyyon besiyeri
<b>Aztreonam</b>	Doymuş sodyum bikarbonat çözeltisi	Su
<b>Daptomisin</b>	Su	Su
<b>Doksisiklin</b>	Su	
<b>Doripenem</b>	% 0.85 serum fizyolojik	% 0.85 serum fizyolojik
<b>Eritromisin</b>	%95 etanol veya glasiyal asetik asit <sup>a,b</sup>	Su
<b>Ertapenem</b>	Fosfat tamponu, pH 7.2, 0.01 mol/L	Fosfat tamponu, pH 7.2, 0.01 mol/L
<b>Gentamisin</b>	Su	
<b>İmipenem</b>	Fosfat tamponu, pH 7.2, 0.01 mol/L	Fosfat tamponu, pH 7.2, 0.01 mol/L
<b>Kinupristin-dalfopristin</b>	Su	
<b>Klaritromisin</b>	Metanol <sup>a</sup> veya glasiyal asetik asit <sup>a,b</sup>	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L
<b>Klavulanik asit</b>	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L
<b>Klindamisin</b>	Su	
<b>Kloramfenikol</b>	%95 etanol	Su

<b>Kolistin<sup>c</sup></b>	Su	Su
<b>Levofloksasin</b>	½ hacim su, sonra eriyene kadar 0.1mol/L NaOH damlatılır	Su
<b>Linezolid</b>	Su	
<b>Meropenem</b>	Su	
<b>Metronidazol</b>	DMSO <sup>a</sup>	Su
<b>Minosiklin</b>	Su	
<b>Moksifloksasin</b>	Su	
<b>Mupirosin</b>	Su	Su
<b>Nalidiksik asit</b>	½ hacim su, sonra eriyene kadar 0.1mol/L NaOH damlatılır	
<b>Netilmisin</b>	Su	
<b>Nitrofurantoin<sup>d</sup></b>	Fosfat tamponu, pH 8.0, 0.1 mol/L	Fosfat tamponu, pH 8.0, 0.1 mol/L
<b>Norfloksasin</b>	½ hacim su, sonra eriyene kadar 0.1mol/L NaOH damlatılır	Su
<b>Ofloksasin</b>	½ hacim su, sonra eriyene kadar 0.1mol/L NaOH damlatılır	Su
<b>Oksasilin</b>	Su	
<b>Penisilin</b>	Su	
<b>Piperasilin</b>	Su	
<b>Rifampin</b>	Metanol <sup>a</sup> (Maksimum konsantrasyon = 640 mg/L)	Su (karıştırılarak)
<b>Sefaklor</b>	Su	
<b>Sefalotin</b>	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L	Su
<b>Sefazolin</b>	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L
<b>Sefepim</b>	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L
<b>Sefetamet</b>	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L	Su
<b>Sefiksım</b>	Fosfat tamponu, pH 7.0, 0.1 mol/L	Fosfat tamponu, pH 7.0, 0.1 mol/L
<b>Sefoksitin</b>	Su	
<b>Sefoperazon</b>	Su	
<b>Sefotaksim</b>	Su	
<b>Sefotetan</b>	DMSO <sup>a</sup>	Su
<b>Sefpodoksim</b>	%0.10 (11.9mmol/L) sulu sodium bikarbonat	Su
<b>Sefprozil</b>	Su	
<b>Seftazidim</b>	Sodyum karbonat <sup>e</sup>	Su
<b>Seftizoksim</b>	Su	
<b>Seftriakson</b>	Su	
<b>Sefuroksim</b>	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L
<b>Siprofloksasin</b>	Su	
<b>Streptomisin</b>	Su	
<b>Sulbaktam</b>	Su	

<b>Sulfonamidler</b>	½ hacim su, sonra eriyene kadar 2.5mol/L NaOH damlatılır	Su
<b>Tazobaktam</b>	Su	
<b>Teikoplanin</b>	Su	
<b>Tetrasiklin</b>	Su	
<b>Tigesiklin</b>	Su	
<b>Tobramisin</b>	Su	
<b>Trimetoprim</b>	Son hacmin %10'ü kadar 0.05mol/L laktik <sup>a</sup> veya hidroklorik asit	Su (ısıtmak gerekebilir)
<b>Trimetoprim (laktat ise)</b>	Su	
<b>Vankomisin</b>	Su	

a. Bu bileşikler toksik olabilir. Bu maddelerden herhangi biri kullanılmadan önce üreticinin sağladığı güvenlik broşürleri (MSDS) incelenmelidir.

b. 1/2 hacim suya 2.5 µL/mL'yi geçmeyecek şekilde eriyene kadar glasiyal asetik asit damlatılır.

c. Antimikrobik duyarlılık testlerinde kullanılan kolistin formülü kolistin metan sülfonat (sülfometat) değil kolistin sülfattır.

d. Diğer bir seçenek, nitrofurantoinin dimetil sülfoksit ile çözünmesidir.

e. Seftazidim için anhidroz sodyum karbonat, kullanılacak seftazidimin tam %10'u ağırlığında kullanılır. Sodyum karbonat, gereken suyun bir bölümü içinde eritilir. Antibiyotik bu sodyum karbonat çözeltisinde çözünür ve istenen hacime kadar su eklenir. Bu çözelti en kısa sürede kullanılmalıdır, fakat 25°C'yi aşmayan sıcaklıkta 6 saat saklanabilir.

Kontaminasyon çok ender olduğundan, filtre ile sterilize edilmemiş, ancak aseptik olarak hazırlanmış çözeltiler kullanılabilir. Buna karşın, istenirse, çözeltiler membran filtrasyonu ile sterilize edilebilir. Filtrasyon yapılacaksa, uygun testler ile sistemin adsorbsiyon yapmadığı belirlenmelidir. Stok çözeltilerin stabilitesine ilişkin bilgi verilmemişse her kullanım için taze hazırlanmalıdır.

Steril stok çözeltiler küçük hacimler halinde iyice kapatılmış steril cam, polipropilen, polistren veya polietilen şişelere paylaştırılarak saklanabilir (hiç bir zaman -20°C'den daha sıcak olmamak kaydıyla, tercihen -60°C ve altında hiç bir zaman kendinden eriyen dondurucuda olmamak koşuluyla). Çözeltiler gereksinme olduğunda eritilip aynı gün kullanılabilir. Kullanılmayan ilaç gün bitiminde atılmalıdır. Antimikrobik ilaçların çoğunun stok çözeltileri -60°C veya altında, aktivitesini kaybetmeksizin altı ay veya daha fazla saklanabilir. Bu genel önerilere ek olarak, ilaç üreticisinin önerileri de göz önünde tutulmalıdır. Antimikrobik ilaçtaki herhangi bir belirgin bozulma, kalite kontrol suşları kullanılarak yapılan duyarlılık testleri ile saptanmalıdır.

### 2.1.1. SIVI DİLÜSYON YÖNTEMİ

#### Test Edilecek Konsantrasyonların Sayısı

Her antimikrobik ilaç için test edilecek konsantrasyonlar, bakteri ve ilaca göre değişir. Bu konsantrasyonlar yorumlama sınır değerlerini içermelidir ancak, denenecek konsantrasyon sayısı laboratuvarın kararına kalmıştır. Buna karşın en azından kalite kontrol bakterilerinden birinin konsantrasyon aralığında olacağı bir dağılım seçilmesi önerilir. Bazı özel amaçlar için normalde kullanılmayan konsantrasyonlar test edilebilir (örn. enterokoklara karşı penisilin veya glikopeptid antibiyotiklerle sinerjistik etkisini göstermek için gentamisin ve streptomisin yüksek konsantrasyonları test edilebilir; Bkz. AMD-MT-02)

## Dilüsyon Testleri İçin İnokulumun Hazırlanması

### Doğrudan Koloni Süspansiyon Yöntemi:

Doğrudan koloni süspansiyonu yöntemi, inokulum hazırlamak için en uygun yöntemdir. Bu yöntem, birçok bakteri için kullanılabilir.

1. İnokulum, 18-24 saatlik agar plağındaki (kanlı agar gibi seçici olmayan bir besiyeri kullanılmalıdır) tek düşmüş kolonilerden doğrudan buyyon veya serum fizyolojik içinde süspansiyon yapılarak hazırlanır.
2. Süspansiyonun bulanıklığı 0.5 McFarland bulanıklığına eşdeğer olarak ayarlanır. Bunun sonucunda, *Escherichia coli* ATCC. 25922 için yaklaşık 1-2 x 10<sup>8</sup> CFU/mL içeren bulanıklığa eşdeğer bir süspansiyon elde edilir. Bu basamağı doğru bir şekilde yapabilmek için ya fotometrik bir cihaz kullanılır (Bkz AMD-TP-02) ya da gözle bakılacaksa yeterli ışık altında üzerinde siyah çizgiler bulunan beyaz bir kart önünde 0.5 McFarland tüpü ile inokulum tüpü kıyaslanır.

### Buyyon Kültürü Yöntemi:

Bu yöntem ikinci bir seçenek olarak kullanılabilir ve bazen kolonilerin doğrudan süspansiyon edilmesinin güç olduğu veya iyi bir süspansiyonun hazırlanamadığı durumlarda tercih edilebilir. Ayrıca, kolay üreyen mikroorganizmaların (stafilokoklar hariç) doğrudan koloni süspansiyon yöntemi için gerekli olan taze (24 saat) kolonileri o sırada mevcut değilse üreme yöntemi kullanılır.

1. Kültür plağındaki kolonilerden benzer morfolojide olan en az üç-beş tanesi seçilir. Seçilen her koloni öze veya steril eküvyon ile alınır ve 4-5 mL "triptik soy buyyon" gibi uygun bir sıvı besiyerine aktarılır.
2. Sıvı besiyerindeki kültürler bulanıklık 0.5 McFarland standardına ulaşıncaya veya aşıncaya kadar (genellikle iki-altı saat) inkübe edilir.
3. Kültürün bulanıklığı, steril serum fizyolojik veya sıvı besiyeri eklenerek 0.5 McFarland standardına eşdeğer bulanıklığa ayarlanır. Bu basamağı doğru bir şekilde yapabilmek için ya fotometrik bir cihaz kullanılır (Bkz AMD-TP-02) ya da gözle bakılacaksa yeterli ışık altında üzerinde siyah çizgiler bulunan beyaz bir kart önünde 0.5 McFarland tüpü ile inokulum tüpü kıyaslanır.

Besiyeri (Bkz. AMD-TP-01)

Mueller-Hinton Sıvı Besiyeri

- Kolay izole edilen ve hızlı üreyen aerop veya fakültatif bakteriler için besiyeri olarak Mueller-Hinton sıvı besiyeri önerilmektedir.
- Rutin sıvı dilüsyon testinde seçilecek besiyeri katyonu ayarlanmış MHB (CAMHB)'dir.

## MAKRODİLÜSYON (TÜP) YÖNTEMİ

1. Test için steril 13 x 100 mm boyutlarında tüpler kullanılmalıdır.
2. Tüpler gevşek vidalı kapaklar, plastik ya da metal kapaklar ya da pamuk tıpa ile kapatılabilir.
3. Test edilen her bakteri için antibiyotiksiz sıvı besiyeri içeren bir kontrol tüpü kullanılmalıdır.

4. Antimikrobik ilacın son iki kat (veya başka) sulandırılmaları hacim olarak sıvı besiyerinde hazırlanır.

Tablo II şema sulandırılmaları hazırlamak için uygun ve güvenilir bir yöntemdir.

Tablo II. Sıvı Dilusyon ile Yapılan Duyarlılık Testlerinde Kullanılacak Antimikrobik İlaçların Sulandırımı Şeması:

Antimikrobik Çözelti								
Adım	Konsantrasyon (µg/mL)	Kaynak	Hacim <sup>a</sup> (mL)	+	CAMHB <sup>b</sup> Hacim <sup>a</sup> (mL)	=	Son Konsantrasyon (µg/mL)	Log <sub>2</sub>
1	5120	Stok	1		9		512	9
2	512	Adım 1	1		1		256	8
3	512	Adım 1	1		3		128	7
4	512	Adım 1	1		7		64	6
5	64	Adım 4	1		1		32	5
6	64	Adım 4	1		3		16	4
7	64	Adım 4	1		7		8	3
8	8	Adım 7	1		1		4	2
9	8	Adım 7	1		3		2	1
10	8	Adım 7	1		7		1	0
11	1	Adım 10	1		1		0.5	-1
12	1	Adım 10	1		3		0.25	-2
13	1	Adım 10	1		7		0.125	-3

Kısaltma: CAMHB, katyonu ayarlanmış Mueller-Hilton buyyon.

Dipnotlar:

- Seçilecek hacimler, yapılacak test sayısına bağlı olarak bu rakamların herhangi bir katı olabilir.
- Katyonu ayarlama, eğer gerekliyse bu adımdan önce yapılır.

Test için, her sulandırımın son hacmi en az 1 mL olmalıdır. Tüm çözümleri ölçerken ve ilk tüpe stok antimikrobik çözeltisini eklerken tek bir pipet kullanılabilir. O setteki diğer tüm sulandırılmaları için ayrı bir pipet kullanılmalıdır. Eşit hacimde inokulum eklendiğinde ilaçlar 1:2 sulanmış olacağından, antimikrobik sulandırılmaları çoğunlukla istenilen son konsantrasyonun iki katı olacak şekilde hazırlanır.

5. Tüpler hazırlandıklarında hemen kullanılmalı veya  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 'de (daha iyisi  $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 'de) derin dondurucuda tutulmalıdır. Dondurulmuş tüplerdeki antimikrobik ilaçlar genellikle aylarca dayanabilirse de bazı ilaçlar (klavulanik asit ve imipenem) diğerlerine göre daha dayanıksızdır ve  $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmalıdır. Tüpler kendi kendine defrost olabilen derin dondurucularda saklanmamalı ve bir kez çözülmüş

antimikrobik ilaçlar yeniden dondurulmamalıdır; yeniden dondurup çözmeler özellikle  $\beta$ -laktamlar başta olmak üzere bazı antimikrobik ilaçların bozulmalarını hızlandırmaktadır.

### İnokulumun Hazırlanması ve İnokülasyon:

1. Standart inokulum yukarıda anlatıldığı gibi doğrudan koloni süspansiyonu veya üreme yöntemi kullanılarak hazırlanır.
2. En uygun koşul, ayarlanmış inokulum süspansiyonunun hazırlandıktan sonra 15 dakika içinde inokülasyon sonunda her tüpte  $5 \times 10^5$  CFU/mL olacak şekilde sıvı besiyerinde sulandırılmasıdır. Bu da 0.5 McFarland süspansiyonu 1:150 sulandırılarak elde edilir, bunun sonucunda bir tüpte yaklaşık  $1 \times 10^6$  CFU/mL bulunur. Daha sonra 3. basamaktaki 1:2 sulandırımı ile son inokulum  $5 \times 10^5$  CFU/mL olacaktır.
3. Yukarıda tanımlandığı gibi, standart inokulum hazırlandıktan sonra 15 dakika içinde, 1 mL antimikrobik ilaç içeren her bir tüpe 1 mL eklenir (bir de sadece sıvı besiyeri içeren pozitif kontrol tüpüne) ve karıştırılır. Bu işlem sonunda her antimikrobik ilaç konsantrasyonu ve inokulum 1:2 oranında sulandırılmış olur. İnokulum süspansiyonundan bir miktar alınarak seçici olmayan bir agara ekilip eş zamanlı inkübasyona bırakılarak saflık kontrolü yapılması önerilir.

### SIVI MİKRODİLÜSYON YÖNTEMİ

Bu yönteme "mikrodilüsyon" adının verilmesinin nedeni, besiyerlerinin küçük hacimlerde yuvarlak ya da konik tabanlı kuyucukları olan steril plastik mikrodilüsyon plaklarına dağıtılmasıdır. Her kuyucuk 0.1 mL sıvı içermelidir.

#### Sulandırılmış Antimikrobik İlaçların Hazırlanması ve Saklanması

1. Mikrodilüsyon plaklarını hazırlamak için antimikrobik ilacın buyyon veya steril suda çift kat (veya diğer) ara sulandırmaları yapılır. Ara (10x) antimikrobik çözeltiler için konsantre antimikrobik ilaç çözeltisi Tablo II'de tanımlandığı gibi veya çift kat seri sulandırım yaparak sulandırılır. Tüm sulandırıcılar için ve stok antibiyotik çözeltisini ilk tüpe koymak için tek bir pipet kullanılır. Sonraki tüm sulandırım basamaklarında yeni bir pipet kullanılır. Antimikrobik/sıvı çözeltileri plastik mikrodilüsyon plaklarına dağıtılır.
2. Mikrodilüsyon plaklarının hazırlanmasında en uygun yöntem, en az 10 mL sıvı besiyerinde hazırlanmış antibiyotik sulandırmalarını kullanabilen dağıtıcı aletlerdir. Bu sulandırmalar 96 kuyucuklu standart bir mikroplaktaki her bir kuyucuğa  $0.1 \pm 0.02$  mL dağıtılmak üzere kullanılmaktadır.
3. Eğer inokulum bir pipet yardımı ile eklenecekse, antimikrobik çözeltiler istenilen konsantrasyonlarının iki katı olacak şekilde hazırlanır ve kuyucuklara 0.1 mL yerine 0.05 mL hacminde doldurulur. Her plakta bir üreme kontrol kuyucuğu ile bir sterilite (inoküle edilmemiş) kuyucuk bulunmalıdır.
4. Doldurulmuş mikroplaklar plastik torbalara sarılmalı ve vakit geçirmeden, kullanıncaya değin  $\leq -20^\circ\text{C}$ 'de (daha iyisi  $\leq -60^\circ\text{C}$ 'de) derin dondurucuda tutulmalıdır. Dondurulmuş plaklarda antimikrobik ilaçlar genellikle aylarca dayanabilirse de bazı ilaçlar (klavulanik asit ve imipenem) diğerlerine göre daha dayanıksızdır ve  $\leq -60^\circ\text{C}$ 'de saklanmalıdır. Plaklar kendi kendine defrost olabilen



derin dondurucularda saklanmamalı ve bir kez çözülmüş antimikrobik ilaçlar yeniden dondurulmamalıdır; yeniden dondurup çözmeler özellikle  $\beta$ -laktamlar başta olmak üzere bazı antimikrobik ilaçların bozunmalarını hızlandırmaktadır.

### İnokulumun Hazırlanması ve İnokülasyon

1. Standart inokulum yukarıda tanımlandığı gibi doğrudan koloni süspansiyonu veya üreme yöntemi kullanılarak hazırlanır.
2. En uygun koşul, ayarlanmış inokulum süspansiyonunun hazırlandıktan sonra 15 dakika içinde inokülasyonsonunda her kuyucukta  $5 \times 10^5$  CFU/mL olacak şekilde ( $2-8 \times 10^5$  CFU/mL) su, serum fizyolojik veya sıvı besiyerinde sulandırılmasıdır. Bu son inokulumu elde etmek için kullanılan sulandırma işlemi inokulumun kuyucuklara dağıtıldığı yönteme ve test edilecek bakteriye göre değişmektedir ve her durumda hesaplama yapılmalıdır. Mikrodilüsyon testlerinde bu hesaplamanın yapılabilmesi için kuyucuklara konan inokulumun kesin hacmi bilinmelidir. örneğin; eğer kuyucuktaki besiyerinin hacmi 0.1 mL ise ve inokulum hacmi 0.01 mL ise o zaman 0.5 McFarland süspansiyonu ( $1 \times 10^8$  CFU/mL) 1:20 sulandırılmalı ve  $5 \times 10^6$  CFU/mL elde edilmelidir. Bu süspansiyondan 0.01 mL sıvı besiyerine eklendiğinde testteki bakterinin son konsantrasyonu ortalama  $5 \times 10^5$  CFU/mL (veya mikrodilüsyon yönteminde  $5 \times 10^4$  CFU/kuyucuk) olacaktır.
3. Yukarıda tanımlandığı gibi, standart inokulum hazırlandıktan sonra 15 dakika içinde mikrodilüsyon plağındaki her kuyucuğa kuyucuktaki hacmin %10'unu geçmeyecek şekilde bir hacim bırakan bir inokülatör kullanılarak inokülasyon yapılır (örn. 0.1 mL antimikrobik ilaç çözeltisi içine  $\leq 10 \mu\text{L}$  inokulum). Buna karşılık 0.05 mL'lik bir pipet kullanılacaksa makrodilüsyon yönteminde olduğu gibi her kuyucuğun (0.05 mL içeren) içeriği 1:2 sulanmış olacaktır.
4. İnokulum süspansiyonundan bir miktar alınarak seçici olmayan bir agara ekilip eş zamanlı inkübasyona bırakılarak saflık kontrolü yapılması önerilir.

### İnkübasyon

1. İnoküle edilmiş makrodilüsyon tüpleri veya mikrodilüsyon plakları  $35^\circ\text{C}$ 'de 16-20 saat süre ile aerop koşullarda etüvde inkübe edilir. Tüm kültürlerde aynı inkübasyon sıcaklığını sağlayabilmek için mikrodilüsyon plakları üst üste dörtten fazla dizilmemelidir.
2. Her mikroplak kurumayı önlemek amacıyla inkübasyondan önce plastik bir torba, plastik bir bant veya plastic bir kapakla kapatılmalıdır.
3. Güç üreyen bakteriler veya direncinin belirlenmesi güç olan bazı sorun bakteriler için inkübasyon süreleri farklı olabilir; CLSI M07'deki ilgili tablo izlenmelidir.

### MİK Değerlerinin Belirlenmesi

MİK, bakterilerinin tüplerdeki veya mikrodilüsyon kuyucuklarındaki üremesini tamamen inhibe eden ve çıplak gözle belirlenebilen en düşük antimikrobik ilaç konsantrasyonudur.

1. MİK belirlenirken antibiyotik içeren tüp ya da kuyucuklardaki üreme yoğunluğu her test setinde kullanılan kontrol tüp veya kuyucuklardaki (antibiyotiksiz) üreme yoğunluğu ile kıyaslanmalıdır. Bir testin geçerli olabilmesi için, pozitif kontrol kuyucuğunda kabul edilebilir üremenin ( $\geq 2$  mm bir düğme veya belirgin bulanıklık) oluşması gerekir.
2. Trimetoprim ve sülfonamidlerle besiyerinde bulunabilen antagonistler zayıf bir

üremeye neden olabilir. Bu nedenle MİK olarak üremede kontrol ile kıyaslandığında  $\geq$  %80 bir azalmanın olduğu konsantrasyon okunmalıdır.

3. Bir mikrodilüsyon testinde arada üreme olmamış tek bir kuyucuk görülürse en yüksek MİK okunmalıdır. Arada birden fazla üreme olmayan kuyucuğun olduğu ilaçlara ilişkin sonuçlar bildirilmemelidir.

4. Genel olarak, mikrodilüsyon yönteminde gram-negatif basiller için elde edilen MİK değerleri makrodilüsyonda elde edilen MİK değerleri ile kıyaslandığında ya aynıdır, ya da bir-iki kat sulandırım daha düşüktür.

### 2.1.2. AGAR DİLÜSYON YÖNTEMİ

Antimikrobik duyarlılığın belirlenmesinde agar dilüsyon yöntemi yerleşmiş bir tekniktir. Antimikrobik ilaç, her plak farklı konsantrasyonda ilaç içerecek şekilde agar besiyerine karıştırılır. İnokülumlar eşzamanlı olarak ve hızla her plağa 32 ila 36 inokülum aktarabilen aletler (replikator) ile agar yüzeyine bırakılır. Günümüzde kullanılan replikatorlerin çoğu her bir plağa 32 ila 36 inokülum aktarabilmektedir.

Burada agar dilüsyonu yapmak için genel işlem basamakları verilmektedir.

#### Maddeler ve Gereçler

Besiyeri: Mueller-Hinton Agar kullanılır

İnokülum Replikatorları: İnokülum replikatorlarının pek çoğu her plağa 32 ila 36 adet inokülum transfer edebilmektedir. Çapı 3 mm olan replikatorlar agar yüzeyine yaklaşık 2  $\mu$ L (1-3  $\mu$ L) damlatabilirler. 1 mm'den küçük içneli olanlar ise 10 kat daha az, yaklaşık 0.1-0.2  $\mu$ L damlatabilirler.

Agar Dilüsyon Plaklarının Hazırlanması:

Sulandırım Şeması:

M07 Tablo 6'daki sulandırım şeklini kullanarak veya çift kat seri sulandırım yaparak ardışık 1:2, 1:4 ve 1:8 sulandırımlar ile antimikrobik ilaç çözeltilerinin ara (10x) çözeltileri hazırlanır. Sonra, 10x antimikrobik çözeltiden 1 kısım dokuz kısım erimiş agara eklenir.

Yöntem:

- Antimikrobik çözeltilerin uygun dilüsyonları sıcaklığı su banyosunda 45-50°C'ye getirilmiş, erimiş haldeki test agarlarına eklenir.
- Agar ve antimikrobik çözelti iyice karıştırılır ve karışım düz bir yüzeyde, agar derinliği 3-4 mm olacak şekilde petri kutularına dökülür.
- Karışım, karıştırma kabında soğumayı ve kısmi katılaşmayı önlemek için plaklara mümkün olduğunca çabuk dökülmelidir. Karıştırırken köpük oluşmasından kaçınılmalıdır.
- Agar oda ısısında katılaşmaya bırakılır; plaklar ya hemen kullanılır ya da ağız bağlanmış plastik torbaların içinde 2-8°C'de referans çalışmalar için en fazla beş gün, rutin testler için daha uzun süre saklanır. Sefaklor, ampisilin, metisilin, imipenem ve klavulanik asit plakları 48 saat içinde kullanılmalıdır.

NOT: Tüm antimikrobik ilaçların bu saklama koşullarında potenslerini koruyacakları sanılmamalıdır. Kullanıcı, plakların dayanıklılığını kontrol suşlarıyla elde edeceği sonuçlarla değerlendirmeli ve uygulanabilir raf ömrü kriterlerini

geliştirmelidir. Bu bilgi bazen ilaç üreticilerinden sağlanabilir.

- 2-8°C'de saklanan plaklar kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirilmelidir. Plakların inoküle edilmeden önce agar yüzeyinin kuru olduğundan emin olunmalıdır. Eğer gerekiyorsa, plaklar agar yüzeyinin kuruması için kapakları aralık bırakılarak etüvde veya laminar akım kabininde yaklaşık 30 dakika bekletilebilir.

### **Kontrol Plaklar**

Aynı besiyerinden hazırlanmış ilaç içermeyen plaklar üreme kontrolü için kullanılabilir.

### **İnokulum**

#### **İnokulumun Hazırlanması**

Agar dilüsyon yöntemi için standart inokulum yukarıda anlatıldığı gibi ya doğrudan yada bakterileri 0.5 McFarland bulanıklığına ulaşana kadar üreterek hazırlanabilir.

#### **İnokulum Süspansiyonunun Sulandırımı**

0.5 McFarland standardına ayarlanmış kültürler birçok tür için yaklaşık  $1-2 \times 10^8$  CFU/mL bakteri içerir ve istenen son inokulum 5-8 mm çapında bir alan içerisinde her damlatma için  $10^4$  CFU'dur. 3 mm çapında iğneleri olan 2 µL damlatabilen replikatörler kullanıldığında,  $10^7$  CFU/mL'lik bir konsantrasyon eldesi için, 0.5 McFarland bulanıklığına eşdeğer süspansiyon, steril buyyon veya serum fizyolojik içinde 1:10 oranında sulandırılır.

Böylece son inokulum agar yüzeyinde damlatma başına yaklaşık  $10^4$  CFU olacaktır. Eğer 0.1-0.2 µL damlatabilen 1 mm çapında uçları olan replikatörler kullanılırsa ayrıca bir sulandırım yapmaya gerek kalmaz. Optimal olarak, ayarlanmış süspansiyonlar, son inokulum için, hazırlandıktan itibaren 15 dakika içinde kullanılmalıdır.

#### **Agar Dilüsyon Plaklarının İnokülasyonu**

1. Ayarlanmış ve sulandırılmış ( $10^7$  CFU/mL) bakteri süspansiyonları içeren tüpler sıra ile bir supora dizilir. İyiçe karıştırılmış her süspansiyondan alınan bir miktar, replikatorun inokulum parçasında denk gelen kuyucuğa konur.

2. Agar plakları inokulum noktalarının yönünü gösterecek şekilde işaretlenir.

3. Standart öze veya pipetler ya da replikatör yardımıyla her inokulumdan bir miktar agar yüzeyine bırakılır.

$10^4$  CFU/damla'lık bir son konsantrasyon elde etmek için transfer edilen inokulum hacmine bağlı olarak inokulum süspansiyonunun uygun sulandırımı hazırlanmalıdır

4. Önce üreme kontrol plağına (antimikrobik ilaç içermeyen) inokülasyonla başlanır ve sonra en düşük konsantrasyondan başlamak üzere farklı antimikrobik konsantrasyonları içeren plaklar inoküle edilir. En son olarak, kontaminasyon olmadığından veya önemli bir miktar antimikrobik ilacın taşınıp taşınmadığından emin olmak için, ikinci bir üreme kontrol plağı inoküle edilir.

5. Kültürlerin karışık olup olmadığını anlamak ve testleri yeniden yapmak gerekirse taze kültür elde etmek amacıyla her inokulumdan alınmış bir örnek seçici olmayan bir agar yüzeyine ekilir ve bir gece inkübe edilir.

### Agar Dilüsyon Plaklarının İnkübasyonu

1. İnoküle edilen plaklar oda sıcaklığında inokulum noktalarının agara absorbe olmalarına kadar bekletilir (noktalar kuruyana değin, ancak 30 dakikadan fazla olmamak koşuluyla). Plaklar ters döndürülür ve  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de 16-20 saat inkübe edilir
2. Güç üreyen bakteriler dışındakiler için plaklar  $\text{CO}_2$ 'i arttırılmış bir ortamda inkübe edilmemelidir, çünkü böyle bir ortamda agar yüzey pH'sı değişebilir. Ancak, *N. gonorrhoeae*, streptokoklar ve *N. meningitidis* %5  $\text{CO}_2$  içeren bir atmosferde inkübe edilmelidir

### Agar Dilüsyon MİK'lerinin Belirlenmesi

1. Plaklar MİK'lerin belirlenmesi amacıyla koyu renkli, ışığı yansıtmayan bir yüzey üzerine yerleştirilmelidir.

Üremeyi inhibe eden en düşük antimikrobik ilaç konsantrasyonu MİK olarak kaydedilir; tek bir koloni üremesi veya inokulumun neden olduğu üreme benzeri bir iz dikkate alınmaz. Trimetoprim ve sulfonamidlerde besiyerindeki antagonistler zayıf bir üremeye yol açabilir. Bu nedenle MİK kontrole göre üremede %80 veya daha fazla azalma gözlenen konsantrasyondur.

2. Eğer iki ya da daha fazla koloni, ilacın belli bir MİK'inden yüksek konsantrasyonlarında üremeye devam ediyorsa veya düşük konsantrasyonlarda üreme yokken yüksek konsantrasyonlarda üreme gözleniyorsa kültürün saflığı kontrol edilmeli ve gerekirse test yinelenmelidir.

### 2.1.3. GRADİYENT TESTİ

Gradyent testi, disk difüzyon ve dilüsyon testlerinin bazı özelliklerini taşıyan bir duyarlılık testidir. Ticari olarak ülkemizde Etest (*Bio-Merieux*), M.I.C.E. testleri (*Oxoid*) ve MİK test strip (*Liofilchem*) olmak üzere üç ürün mevcuttur.

Gradyent testinin en önemli üstünlüğü, 150 mm lik bir agar plağında beş farklı antimikrobik ilaç için MİK değerlerinin belirlenebilmesidir.

Antibiyotik gradiyent test şeritlerinin saklanması: Duyarlılık testi için hazırlanmış ticari gradiyent test stripleri kullanım öncesi derin dondurucuda (en az -  $20^\circ\text{C}$ 'de) saklanmalıdır. Kullanılmak üzere ambalajı açılmış olan şeritler özel steril tüp ya da kaplara yerleştirilmeli, kullanımdan önce oda sıcaklığına gelmeleri beklenmeli ve kullanıldıktan sonra bekletilmeden tekrar derin dondurucuya kaldırılmalıdır. E-test şeritleri mutlaka etiketlerinde bulunan son kullanım tarihlerinden önce tüketilmelidir.

Çalışılacak olan izolat için CLSI veya EUCAST Standartlarında önerilen besiyerleri, inkübasyon koşulları, test edilecek antibiyotikler ve kalite kontrol ATCC izolatları belirlenir.

### İnokulum

İnokulum hazırlanması: Yukarıda anlatıldığı gibi doğrudan koloni süspansiyon yöntemi ile hazırlanır.

## Test plaklarının inokülasyonu

İnokulum süspansiyonu hazırlandıktan sonra 15 dakika içinde MHA'a inoküle edilmelidir. MHA'a ekim yapmadan önce besiyerinin yüzeyinin tamamen kuru olduğundan emin olunmalıdır. Gerekirse etüvde kapakları açık olmamak kaydıyla 10-30 dakika tutulduktan sonra kullanılmalıdır. Steril pamuklu eküvyon inokulum süspansiyonuna batırılıp fazla sıvının bırakılmasından sonra inokülasyona geçilir. Tüm agar yüzeyine yaklaşık 60 derecelik açılarla 3 kez yayıldıktan sonra eküvyon son olarak plağın çevresinde gezdirilir. Şeritler bundan sonra 15 dakika içinde yerleştirilmelidir. Şeritler yerleştirilmeden önce nemin absorbe olması için 3-5 dakika beklenmelidir.

## Gradyent Test Şeritlerinin Plaklara Yerleştirilmesi

- Derin dondurucudan çıkarılan şeritler oda ısısına geldikten sonra, daha önceden belirlenmiş olan listeye göre, agar yüzeyine yerleştirilir. Paketi açılıp kullanılmamış olan şeritler nemden korunacak şekilde kapağı sıkı kapanabilen tüplere konularak saklanmalıdır. Tüpler nem, ısı ve ışıktan korunmalı ve 4 hafta içinde tüketilmelidir.
- Agar yüzeyinin tamamen kuru olmasına dikkat edilerek şeritler aplikatörle ya da bir ince uçlu pensetle uç tarafından tutularak alınmalı ve inokulumla kaplı agar yüzeyine yerleştirilmelidir. Yerleştirme sırasında en düşük konsantrasyonun bulunduğu uçtan başlayarak bırakılmalıdır. Şeritin agar yüzeyine tam olarak temas etmesi sağlanmalıdır.
- Hava kabarcığı oluşması halinde düşük konsantrasyondan yükseğe doğru pensetle hafifçe bastırarak kabarcık çıkartılmalıdır.
- 100 mm'lik plak kullanıldığında 1-2 adet, 150 mm'lik plate kullanıldığında ise en çok 6 şerit yerleştirilebilir.
- Şeritlerin birbirinden eşit uzaklıkta olup merkezden dışa doğru ışınal bir dizilim göstermesi sağlanmalıdır. Şerit agara temas eder etmez antimikrobik salınımı başlar, bu nedenle bir kez yerleştirildikten sonra asla yerinden alınmamalı, başka bir yere konulmamalıdır.

## İnkübasyon

Gradyent test şeritleri yerleştirildikten sonra en fazla 15 dakika içinde plaklar kapakları alta gelecek şekilde  $35 \pm 2$  °C inkübatöre kaldırılır. (Güç üreyen bakteriler için %5 CO<sub>2</sub> ortamı gereklidir, bunlar mikroaerofilik kavanoz içerisinde veya CO<sub>2</sub> 'li inkübatörde inkübe edilir.) Plaklar 16-18 saat inkübe edilir.

## Plakların okunması ve sonuçların yorumlanması

Plaklar uygun inkübasyondan sonra; aydınlık bir ortamda koyu renk bir zeminin üzerinde, göz ile değerlendirilerek tam inhibisyon zonunun gradyent test şeridine temas ettiği konsantrasyon belirlenir. Besiyerine kan eklenmişse (streptokoklarda olduğu gibi), petri plağının kapağı açık olarak ve yansıyan ışık altında agar yüzeyinden ölçüm yapılır.

- Eğer zon şeridin altına kadar iniyorsa MİK değeri en düşük konsantrasyonun da altındadır.
- İnhibisyon zonunun iki değer arasında kalması halinde yüksek olan değer MİK olarak kabul edilir.
- Kanlı besiyeri kullanıldığında hemoliz zonu değil, üremenin inhibe olduğu zon değerlendirmeye alınır.

- Eğer inhibisyon zonunun şeride temas ettiği noktalar iki tarafta farklı ise ve bu fark iki kat dilüsyonun yarısını aşmıyorsa yüksek olan sonuç değerlendirmeye alınmalıdır. Fark iki kat dilüsyonu aşarsa test tekrarlanmalıdır.
- İnokulum yoğun ise inhibisyon zonunun şeride temas ettiği yer çok belirgin olmayabilir ya da çift zon oluşabilir. Bu sonuçlar geçersiz olup test tekrarlanmalıdır.
- İnhibisyon zonunun içinde üreyen iri koloniler karışık kültürü yada dirençli varyantları gösterir. Bu durumda test ilk plaktan inokulum alınarak tekrarlanmalıdır. Test sonucu yine aynı olursa zon içinde üreyen koloniler pasajlanıp tanımlanmalı ve Test tekrarlanmalıdır. Bu tekrardan sonra da aynı sonucun alınması halinde dirençli olarak rapor edilmelidir.
- Proteus sp. test edildiğinde oluşan yayılma gözardı edilmeli, üreyen kolonilerin inhibisyon zonu dikkate alınmalıdır.
- Sulfonamidler, trimetoprim yada trimetoprim/sulfametoksazol test edildiğinde oluşan zayıf üremeler göz ardı edilmeli, %80 ve üzerindeki üremeler okunmalıdır.
- Beta-laktam antibiyotikler test edildiğinde inhibisyon zonunun şeritle temas ettiği kısımda oluşabilecek iri koloniler direnci gösterebilir.
- Klindamisin test edildiğinde çift uçlu bir inhibisyon zonu oluşabilir, bu durumda üstteki zon değerlendirilir.

Sonuçların değerlendirilmesinde Ölçülen MİK değeri, kullanılan Standartta (CLSI/ EUCAST) yer alan sınır değer tablolarındaki MİK sınır değerleri dikkate alınarak duyarlı, orta derecede duyarlı ve dirençli olarak belirtilir (1,2).

Test sonuçları değerlendirilirken, kullanılan ürünün kataloğunda yer alan fotoğraflardan yararlanılabilir.

Gradyent testinde kullanılan besiyerinin pH'sı ve kalınlığının uygunsuz olması, inkubasyon koşullarının uygunsuzluğu, E-test striplerinin saklama koşullarının uygun olmaması test sonuçlarını etkileyebilir.

## İlgili diğer UMS belgeleri

AMD TP (Antimikrobiyal Duyarlılık Test Prosedürleri)-01 ve 02

AMD MT (Antimikrobiyal Duyarlılık Mikrobiyolojik Tanı)-02

AMD TB (Antimikrobiyal Duyarlılık Temel Bilgiler)- 02 ve 03

## Kaynaklar

---

<sup>1</sup> European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.1., valid from 2013-02-11

<sup>2</sup> Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M100-S23; Vol. 33 No.1, January 2013

<sup>3</sup> ISO standard 20776-1, 2006.