

**Szybkie oznaczanie lekowrażliwości (RAST) wg EUCAST
bezpośrednio z dodatnich butelek z posiewem krwi – metodyka**

Wersja 1.1

Maj 2019

Zmiany w stosunku do poprzedniej wersji (1.0)

Sekcja	Zmiana
Inokulacja podłoży stałych	Dodanie informacji o wymiarach płytek
Tabela 1, Tabela 2	Dodanie <i>A. baumannii</i>
Zalecenia dotyczące kontroli jakości	Poprawienie literówki w liczbie bakterii
Zalecenia dotyczące kontroli jakości	Dodanie informacji o rodzaju krwi do kontroli jakości RAST

Metoda RAST wg EUCAST opiera się na standardowej metodyce oznaczanie lekowrażliwości wg EUCAST. Modyfikacje dotyczą: inokulum, skrócenia czasu inkubacji, instrukcji odczytu i wartości granicznych wyznaczonych dla RAST.

Komentarz: metoda ta została opracowana WYŁĄCZNIE dla RAST i WYŁĄCZNIE dla inkubacji płytek antybiogramowych przez maksymalnie 8 godzin. Jeżeli zachodzi potrzeba dłuższej inkubacji, należy zastosować standardową metodę dyfuzyjno-krążkową.

Przygotowanie butelek z posiewem krwi

Metoda RAST wg EUCAST została zwalidowana przy użyciu następujących butelek do posiewu krwi: BACTEC (Becton Dickinson), BacT/ALERT (bioMérieux) i VersaTREK (Thermo Fisher). Metoda RAST może być stosowana 0-18 godzin po uzyskaniu dodatniego wyniku posiewu krwi. Dodatką butelkę z posiewem krwi najlepiej wyjąć z aparatu do hodowli krwi tuż przed wykonaniem RAST, jednak w celu umożliwienia transportu butelek pozytywnych sprawdzono wpływ trzymania butelek w temperaturze pokojowej po wyjęciu z aparatu. Pozostawienie butelek do 3 godzin w temperaturze pokojowej nie wpływa na wyniki RAST.

Inokulacja płytek bezpośrednio z dodatnich butelek z posiewem krwi

Na każdą okrągłą płytkę z podłożem MH/MH-F o średnicy 90 mm należy nakropić 125±25 µl nierozcieńczonego podłoża do posiewu krwi z dodatniej butelki z posiewem krwi. Zawiesinę należy delikatnie rozprowadzić na powierzchni agaru: ręcznie, w trzech kierunkach za pomocą wymazówki lub z użyciem automatycznego inokulatora do płytek. Krążki należy nakładać tak samo jak w standardowej metodzie badania lekowrażliwości.

Inkubacja i odczytywanie płytek

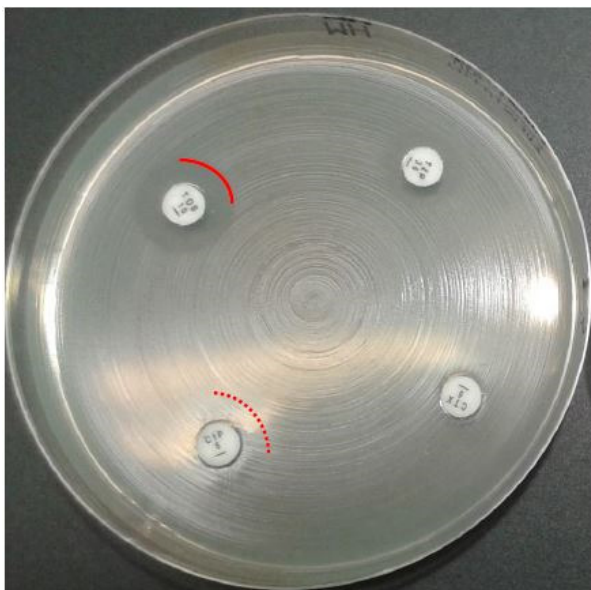
Płytki należy inkubować zgodnie z opisem z Tabeli 1. Płytki należy odczytywać w ciągu ± 5 minut od wyznaczonego czasu odczytu (4, 6 i/lub 8 godzin). Jeśli zachodzi taka potrzeba, płytki należy reinkubować w ciągu 10 minut, aby umożliwić odczyt po 6 i/lub 8 godzinach. Inkubacji nie należy prowadzić dłużej niż 8 godzin. Po czasie dłuższym niż 8 godzin nie należy także odczytywać wyników.

Tabela 1. Warunki inkubacji dla płytek antybiogramowych

Drobnoustrój	Czas inkubacji	Podłoże	Warunki inkubacji
<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i>	4, 6 i 8 godzin	MH	35±1°C, warunki tlenowe
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 i 8 godzin	MH	35±1°C, warunki tlenowe
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4, 6 i 8 godzin	MH-F	35±1°C, 4-6% CO ₂

Kontrola płytek po inkubacji

Po 4-8 godzinnej inkubacji wzrost na podłożu Muller-Hinton często jest mniej wyraźny niż przy standardowym czasie inkubacji (16-20 godzin). **Wielkości stref zahamowania wzrostu należy odczytywać, gdy wzrost jest zlewny, a granice stref wyraźne. Patrz Zdjęcie 1.**



Zdjęcie 1. *E. coli* po 4 godzinach inkubacji. Należy odczytywać wyłącznie strefy o wyraźnych krawędziach (linia ciągła). Nie należy odczytywać stref, których granice są niewyraźne (linia przerywana).

Pomiar wielkości stref zahamowania wzrostu i interpretacja lekowrażliwości

Zarówno płytki z podłożem MH, jak i MH-F należy odczytywać **manualnie, od przodu płytki i ze zdjętą przykrywką**, w świetle odbitym. Płytki z podłożem MH należy odczytywać na ciemnym tle, a z podłożem MH-F na jasnym tle. Płytkę należy odczytywać z odległości 30 cm, pod kątem 45 stopni. Trzymając płytkę pod kątem łatwiej jest zobaczyć wyraźne krawędzie stref. Wielkość stref zahamowania wzrostu należy mierzyć w zaokrągleniu do milimetra. Słaby wzrost w strefie o wyraźnych krawędziach należy ignorować. Takie sytuacje zdarzają się na wczesnych etapach odczytu, najczęściej antybiotyków β -laktamowych, dla *E. coli* i *K. pneumoniae*. Czasami po 4 godzinach brak jest wyraźnej strefy zahamowania wzrostu, ale po 6 godzinach wynik jest łatwy do odczytania (Tabela 2). Nie zawsze jest możliwe odczytanie wielkości stref zahamowania wzrostu dla wszystkich nastawionych antybiotyków.

Tabela 2. Odsetek wielkości stref zahamowania wzrostu, które można odczytać po 4, 6 i 8 godzinach inkubacji.

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

*Cefoksytyna i gentamycyna są łatwe do odczytania, natomiast norfloksacyna i klindamycyna – trudniejsze.

Zalecenia dotyczące kontroli jakości

Dla standardowej metody dyfuzyjno-krążkowej wg EUCAST zaleca się codzienną kontrolę wewnętrzną w celu sprawdzenia procedury i materiałów używanych do badania lekowrażliwości. EUCAST wyznaczył kryteria dla wyników po 4, 6 i 8 godzinach inkubacji dla trzech szczepów wzorcowych (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213 i *S. pneumoniae* ATCC 49619). Kryteria te są dostępne w Tabelach wartości granicznych dla RAST. Kontrolę jakości dla RAST wykonuje się głównie w celu ustawienia i sprawdzenia implementacji nowej procedury. Kiedy już procedura zostanie ustalona, do momentu wprowadzenia nowego personelu lub materiałów (zmiana systemu do hodowli krwi, podłoży lub krążków), kontrola jakości RAST nie jest wymagana. Zgodnie z zaleceniami EUCAST, prócz kontroli RAST, należy regularnie przeprowadzać także wewnętrzną kontrolę jakości dla standardowej metodyki.

Kontrola jakości RAST polega na inokulacji butelki do posiewu krwi 1 ml zawiesiny szczepu wzorcowego 100-200 CFU/ml (0,5 McFarlanda rozcieńczone 1:1 000 000) z dodatkiem ok. 5 ml jałowej krwi końskiej lub baraniej. Inokulowane butelki należy inkubować w aparacie do posiewu krwi i po uzyskaniu dodatniego wyniku postępować zgodnie z opisaną metodyką.

Istotne uwagi do stosowania metody RAST wg EUCAST

- Wielkości stref zahamowania wzrostu należy odczytywać wyłącznie kiedy występuje wzrost zlewny, a krawędzie stref są wyraźnie widoczne.
- Wyniki pomiarów wielkości stref należy interpretować zgodnie z Tabelami interpretacji wielkości stref zahamowania wzrostu dla RAST wg EUCAST, a nie standardowymi Tabelami interpretacji oznaczania lekowrażliwości zgodnie z EUCAST.
- Inkubacji nie należy prowadzić dłużej niż 8 godzin.