

Ministerstwo
Zdrowia



Zadanie realizowane ze środków
Narodowego Programu Zdrowia na lata 2021-2025
finansowane przez Ministra Zdrowia

Narodowy Instytut Leków
ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa

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

Wersja 7.0

Styczeń 2026

Zmiany w stosunku do poprzedniej wersji (6.0)

Sekcja	Zmiana
Przygotowanie butelek do posiewu krwi	Dodano informacje o innych butelkach do posiewów krwi.
Inokulacja płytek agarowych bezpośrednio z butelek do posiewów krwi	Dodano informacje dotyczące inokulacji i inkubacji płytek
Ważne uwagi dotyczące stosowania metody EUCAST RAST	Dodano informacje dotyczące stosowania punktów odcięcia EUCAST RAST w zależności od sposobu podawania

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

Celem metody EUCAST RAST jest umożliwienie szybkiego oznaczania wrażliwości bezpośrednio z dodatnich posiewów krwi. Metoda RAST pozwala odczytać wartości graniczne po 4, 6 i/lub 8 godzinach inkubacji. Dodatkowo opracowano wartości graniczne RAST dla inkubacji trwającej 16-20 godzin. Wyniki powinny być odczytywane po 16-20 godzinach tylko wtedy, gdy nie jest możliwe ich odczytanie po 4, 6 i/lub 8 godzinach inkubacji, na przykład z powodu ograniczonych godzin pracy laboratorium.

Metoda została zwalidowana dla następujących gatunków: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* (w tym *Klebsiella variicola* i *Klebsiella quasipneumoniae*), *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* oraz *Streptococcus pneumoniae*.

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 w ciągu 0-18 godzin po uzyskaniu dodatniego wyniku posiewu krwi. Dodatknią butelkę z posiewem krwi najlepiej wyjąć z aparatu do hodowli krwi tuż przed wykonaniem oznaczenia lekowrażliwości metodą RAST, jednak w celu umożliwienia transportu butelek pozytywnych sprawdzono wpływ trzymywania butelek w temperaturze pokojowej po wyjęciu z aparatu. Pozostawienie butelek do 3 godzin w temperaturze pokojowej po wyjęciu z aparatu nie wpływa na wyniki RAST. Metody RAST nie należy stosować do posiewów krwi zawierających mieszane gatunki drobnoustrojów.

Inokulacja płytek bezpośrednio z dodatnich butelek z posiewem krwi

Na każdą okrągłą płytkę z podłożem MH/MH-F o średnicy 90 mm należy nanieść 125±25 µl nierozcieńczonego podłoża do posiewu krwi z dodatknej 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, natychmiast po inokulacji płytek należy nałożyć krążki antybiotykowe, maksymalnie 4-6 krążków na płytkę. Inkubację płytek najlepiej rozpocząć bez żadnych opóźnień, maksymalnie na stos można umieścić 5 płytek.

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. Jeśli konieczne jest inkubowanie płytek przez więcej niż 8 godzin, strefy zahamowania wzrostu należy odczytać w ciągu 16-20 godzin. Nie należy inkubować ani odczytywać płytek dłużej niż 20 godzin.

Tabela 1. Warunki inkubacji dla płytek antybiogramowych

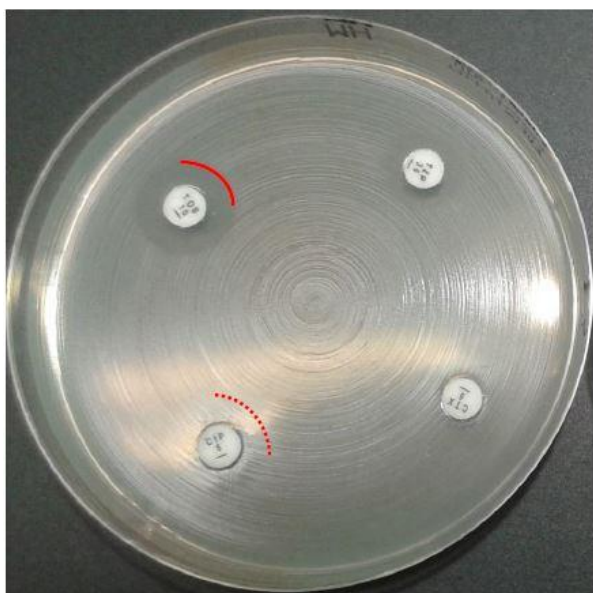
Drobnoustrój	Czas inkubacji	Podłoże	Warunki inkubacji
<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Salmonella enterica</i> <i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i>	4, 6, 8 i 16-20 godzin	MH	35±1°C, warunki tlenowe

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6, 8 i 16-20 godzin	MH	35±1°C, warunki tlenowe
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4, 6, 8 i 16-20 godzin	MH-F	35±1°C, 4-6% CO ₂

Kontrola płytek po inkubacji

4, 6 i 8 godzin inkubacji

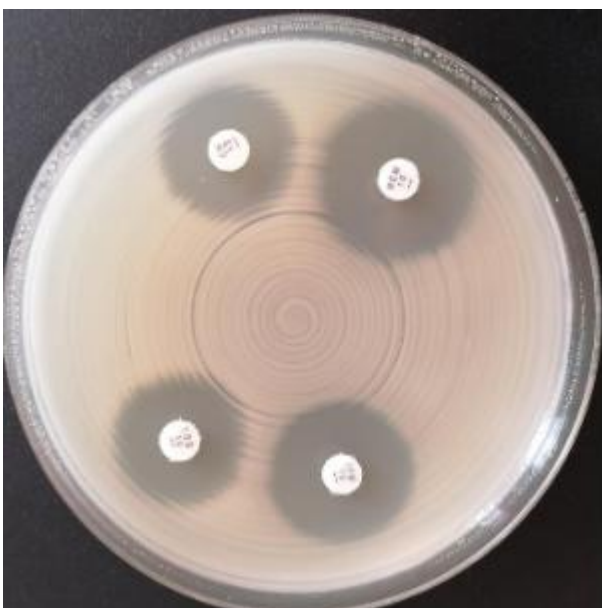
Po 4-8 godzinnej inkubacji wzrost na podłożu Muller-Hinton często jest mniej wyraźny niż przy standardowym czasie inkubacji (16-20 godzin). **Wielkości stref zahamowania wzrostu należy odczytywać, gdy wzrost jest zlewny, a granice stref wyraźne. Patrz Zdjęcie 1.**



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).

16-20 godzin inkubacji

Po inkubacji przez 16-20 godzin metodą RAST, wzrost na płycie agarowej Mueller-Hinton będzie często bardziej intensywny w porównaniu do standardowej metody dyfuzyjno-krażkowej EUCAST. **Patrz Zdjęcie 2.**



Zdjęcie 2. *E. coli* po 16-20 godzinach inkubacji.

Pomiar średnicy zahamowania wzrostu

Ogólne instrukcje odczytu stref zahamowania wzrostu

- Odczytuj płytki MH na tle ciemnym, płytki MH-F na tle jasnym. Trzymaj płytkę około 30 cm od oczu, pod kątem 45 stopni względem powierzchni blatu roboczego. Pochyl płytkę w kierunku siebie, aby zidentyfikować wyraźne krawędzie stref zahamowania wzrostu.
- Mierz średnicę stref zahamowania wzrostu ręcznie, z dokładnością do milimetra. Metoda RAST nie została zwalidowana dla czytników automatycznych. Wszystkie pomiary powinny być wykonywane ręcznie.
- Należy zignorować cienki wzrost w strefie zahamowania wzrostu z wyraźną krawędzią strefy. Taki obraz pojawia się we wczesnym odczycie w przypadku *E. coli* i *K. pneumoniae*, najczęściej dla antybiotyków β -laktamowych.

Szczegółowe instrukcje pomiaru wielkości stref zahamowania wzrostu po 4,6 i 8 godzinach

- Płytki z podłożem MH, jak i MH-F należy odczytywać **manualnie, od przodu płytki i ze zdjętą przykrywką**, w świetle odbitym.
- Dla *Acinetobacter baumannii* przy trimetoprimie-sulfametoksazolu należy odczytywać zewnętrzną krawędź strefy zahamowania wzrostu i zignorować wzrost wewnątrz strefy.
- Czasami po 4 godzinach nie ma wyraźnej strefy zahamowania, ale średnica strefy może być łatwo zmierzona po 6 godzinach (Tabela 2). Nie zawsze jest możliwe odczytanie stref zahamowania dla wszystkich testowanych środków przeciwbakteryjnych.

Szczegółowe instrukcje pomiaru wielkości stref zahamowania wzrostu po 16-20 godzinach

- **Płytki z podłożem MH** należy odczytywać **manualnie, z tyłu płytki** w świetle odbitym, **płytki z podłożem MH-F** **od przodu płytki i ze zdjętą przykrywką**, w świetle odbitym.
- Dla *Pseudomonas aeruginosa* odczytując strefę zahamowania wzrostu następujących leków przeciwdrobnoustrojowych: piperacyliny-tazobaktamu, imipenemu, imipenemu-relebaktamu, meropenemu i meropenemu-waborbaktamu należy pominąć pojedyncze kolonie wewnątrz strefy zahamowania wzrostu. **Patrz Zdjęcie 3.**



Zdjęcie 3. Zignoruj pojedyncze kolonie w strefie zahamowania wzrostu i odczytaj zewnętrzną krawędź strefy.

Tabela 2. Odsetek wielkości stref zahamowania wzrostu, które można odczytać po 4-20 godzinach inkubacji.

Drobnoustrój	4 godziny (%)	6 godzin (%)	8 godzin (%)	16-20 godzin(%)
<i>Escherichia coli</i>	90	99	99	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	96	98	98	100
<i>Salmonella enterica</i>	93	100	100	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> **	-	88	97	100
<i>Acinetobacter baumannii</i>	99	100	100	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	55 ***	91	95	100
<i>Enterococcus faecalis</i>	93	99	100	100
<i>Enterococcus faecium</i>	44	93	99	100
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	68	83	95	100

* W tabeli wskazano „możliwe do odczytania”, a nie „możliwe do interpretacji”, ponieważ niektóre średnice stref będą w ATU.

** U niektórych izolatów *P. aeruginosa* może występować słaby wzrost podczas testu RAST. Te same izolaty zazwyczaj wykazują słaby wzrost również w standardowej metodzie dyfuzyjno-krążkowej po 16-20 godzinach inkubacji.

*** Cefoksytyna i aminoglikozydy są łatwe do odczytania, podczas gdy norfloksacyna i klindamycyna są trudniejsze.

Interpretacja wyników

- Zinterpretuj zmierzone średnice stref zahamowania wzrostu zgodnie z najnowszą wersją tabeli wartości granicznych RAST.
- Czasami nie jest możliwe podanie kategorii wrażliwości dla wszystkich testowanych leków przeciwdrobnoustrojowych z powodu braku wzrostu, braku możliwości wiarygodnego odczytania strefy lub średnica strefy jest podana w ATU. W takich przypadkach pozostaw raport pusty dla danego antybiotyku. Sugerujemy, aby laboratoria zamieszczały komentarz w raportach dotyczących dodatniego wyniku badania krwi, który wyjaśnia, dlaczego niektóre wyniki mogą czasami pozostać puste. Proponowany komentarz: „Testowanie wrażliwości na antybiotyki bezpośrednio z pozytywnych butelek krwi, gdzie wyniki często mogą być dostępne po 4, 6 i/lub 8 godzinach,

wymaga, aby tylko wiarygodne wyniki były raportowane. Raport o wrażliwości, który nie zawiera wyników po krótkiej inkubacji, może zostać uzupełniony o dodatkowe wyniki na późniejszym etapie inkubacji. Ważne jest, aby wyniki przedstawione po krótkim czasie inkubacji były dokładne i oparte na solidnych dowodach, a dalsze wyniki mogą zostać dodane, jeśli wyniki po pełniejszej inkubacji różnią się.”

Obszar niepewności technicznej (ATU)

ATU to zakres średnic stref zahamowania wzrostu. Wyznaczono ATU dla wszystkich kombinacji organizmów i środków przeciwdrobnoustrojowych w metodzie EUCAST RAST. ATU reprezentuje obszar, w którym rozdzielenie kategorii wrażliwości jest słabe. W tym obszarze dramatycznie wzrasta ryzyko błędnej interpretacji, a sama interpretacja nie jest możliwa. Wyniki powyżej lub poniżej ATU mogą być wiarygodnie zgłaszane.

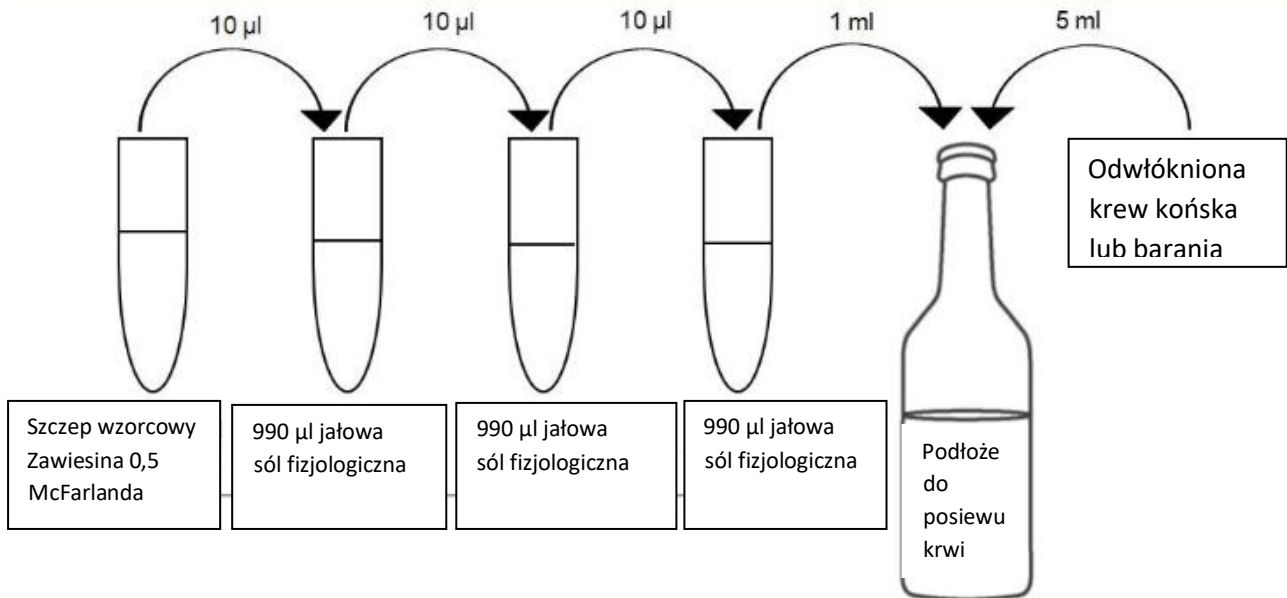
Gdy wynik znajduje się w obrębie ATU, nie można go zinterpretować. Nie wahaj się pozostawić raportu pustego dla danego antybiotyku. Po 4 godzinach, ponownie inkubuj płytki w ciągu 10 minut i odczytaj ponownie po 6 godzinach, 8 godzinach oraz, w razie konieczności, po 16-20 godzinach. Jeśli pełny wynik nie może zostać uzyskany po inkubacji przez 8 lub 16-20 godzin, wykonaj oznaczenie lekowrażliwości przy użyciu standardowej metody dyfuzyjno-krążkowej wg EUCAST.

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, 8 i 16-20 godzinach inkubacji dla pięciu szczepów wzorcowych (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212 i *S. pneumoniae* ATCC 49619). Kryteria te są dostępne w Tabelach wartości granicznych dla QC RAST. Kontrolę jakości dla RAST wykonuje się głównie w celu ustawienia i sprawdzenia implementacji nowej procedury. Wszystkie czasy odczytu stosowane w laboratorium powinny być walidowane przy użyciu wskazanych szczepów wzorcowych. Kiedy procedura zostanie już 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 100-200 CFU/MI* szczepu wzorcowego z dodatkiem ok. 5 ml jałowej odwódnionej krwi końskiej lub baraniej. Inokulowane butelki należy inkubować w aparacie do posiewu krwi i po uzyskaniu dodatniego wyniku postępować zgodnie z opisaną metodyką.

*100-200 CFU/MI = zawiesina 0,5 McFarlanda rozcieńczona 1:1 000 000, patrz rysunek poniżej



- Przygotuj zawiesinę szczepu wzorcowego o gęstości 0,5 McFarlanda.
- Rozcieńcz zgodnie z podanym schematem oraz dodaj odwłóknionej krwi baraniej lub końskiej.
- Inkubuj butelkę w aparacie do posiewu krwi.
- Po uzyskaniu wyniku dodatkowo opracuj butelkę zgodnie z opisaną metodologią RAST.
- Użyj kryteriów QC RAST do oceny wyników.

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.
- Wielkości stref zahamowania wzrostu należy odczytać wyłącznie w wyznaczonych przedziałach czasowych tj. po 4,6 i 8 godzinach, a gdy jest to możliwe (np. z powodu godzin pracy pracowni/laboratorium), po 16-20 godzinach inkubacji.
- Wyniki pomiarów wielkości stref należy interpretować zgodnie z Tabelami wartości granicznych EUCAST RAST, a nie standardowymi Tabelami wartości granicznych EUCAST. Wartości graniczne dotyczą stosowania antybiotyków w formie dożyłnej. W przypadku rozważania innych sposobów podania leków przeciwdrobnoustrojowych, należy zwrócić uwagę na uzyskanie wystarczającej ekspozycji.