

Metodologia - EUCAST szybkie badanie wrażliwości drobnoustrojów (RAST) bezpośrednio z dodatnich butelek do posiewów krwi.

Metoda EUCAST RAST opiera się na standardowej metodzie dyfuzyjno-krążkowej EUCAST, ale ze zmodyfikowanym inokulum, skróconym czasem inkubacji, zmienionymi instrukcjami odczytu oraz określonymi wartościami granicznymi RAST.

Uwaga. Metoda została zatwierdzona **WYŁĄCZNIE** do wykonywania badań RAST, a także metoda została zatwierdzona **WYŁĄCZNIE** dla maksymalnie 8 godzinnej inkubacji płytek AST. W przypadku, gdy konieczny jest **dłuższy** czas inkubacji, należy użyć standardowej metody dyfuzyjno-krążkowej EUCAST.

Przygotowanie butelek do posiewu krwi

Metoda EUCAST RAST została zatwierdzona przy użyciu butelek do posiewu krwi BACTEC (Becton Dickinson), BacT/ALERT (bioMerieux) oraz VersaTREK (Thermo Fisher). Metoda RAST może być użyta w czasie 0 - 18 godzin po uzyskaniu dodatniego wyniku oznaczenia butelek do posiewu krwi. Nie należy wyjmować dodatnich butelek z instrumentu do posiewu krwi, dopóki nie będzie można wykonać testu RAST. Aby jednak możliwy był transport dodatnich butelek z jednego laboratorium do drugiego, oceniliśmy wpływ przechowywania butelek w temperaturze pokojowej po wyjęciu ich z instrumentu. Na wyniki RAST nie miało wpływu „opóźnienie” wynoszące do 3 godzin.

Inokulacja płytek z podłożem agarowym bezpośrednio z butelek do posiewu krwi

Każdą płytkę z podłożem agarowym MH/MH-F należy zaszczyć 100-150 µl nierozcieńczonego bulionu z posiewu krwi z dodatniej butelki hodowlanej. Następnie należy delikatnie rozprowadzić bulion na powierzchni agaru wykonując rozmaz w trzech kierunkach lub za pomocą automatycznego rotatora do płytek i nałożyć krążki, jak w przypadku standardowej procedury AST.

Inkubacja i odczyt płytek

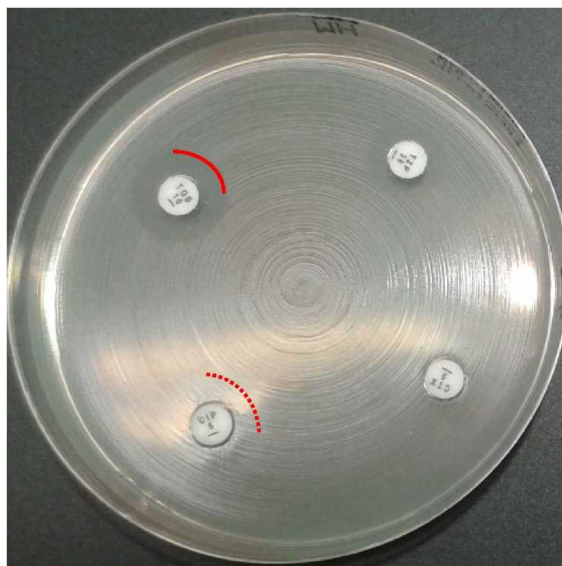
Płytki należy inkubować w sposób opisany w Tabeli 1. Odczytać strefy zahamowania wzrostu po ± 5 minutach od podanego czasu odczytu (4, 6 i/lub 8 godzin). W razie potrzeby należy ponownie inkubować płytki w ciągu 10 minut, aby możliwy był odczyt w późniejszym czasie (6 i/lub 8 godzin). Nie należy inkubować, ani odczytywać płytek po czasie dłuższym niż 8 godzin.

Tabela 1. Warunki inkubacji płytek do badań antybiotykowrażliwości.

Organizm	Czas inkubacji	Podłoże	Warunki inkubacji
<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i>	4, 6 i 8 godzin	MH	35 \pm 1°C w powietrzu
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 i 8 godzin	MH	35 \pm 1°C w powietrzu
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4, 6 i 8 godzin	MH-F	35 \pm 1°C przy 4-6% CO ₂ w powietrzu

Kontrola płytek po inkubacji

Przy czasie inkubacji wynoszącym 4-8 godzin wzrost na płytce z podłożem agarowym Muller-Hinton często wydaje się mniej wyraźny, niż w przypadku standardowego czasu inkubacji (16-20 godzin). Strefy zahamowania wzrostu należy odczytywać tylko wtedy, gdy wzrost jest konfluentny, a krawędzie strefy są wyraźnie widoczne - patrz przykład na rysunku 1.



Rysunek 1. *E. coli* po 4 godzinach inkubacji. Należy odczytać strefy z wyraźnie widoczną krawędzią (linia ciągła). Natomiast strefy bez przezroczystej otoczki nie powinny być odczytywane (linia przerywana).

Pomiar średnic stref i interpretacja antybiotykowrażliwości

Płytki MH, jak i MH-F, należy odczytywać ręcznie, patrząc z przodu płytki, po zdjęciu pokrywki, przy świetle odbitym. Płytki MH należy odczytywać na ciemnym tle, a płytki MH-F - na jasnym. Płytkę należy trzymać około 30 cm od oka, pod kątem 45 stopni. Płytkę należy ustawić pod kątem, aby zidentyfikować ostre krawędzie strefy. Należy zmierzyć średnice strefy hamowania wzrostu, zaokrąglając je do najbliższej wartości w milimetrach. Należy zignorować słaby wzrost w strefie zahamowania wzrostu z wyraźną krawędzią strefy. Wzrost taki obserwuje się czasami w przypadku wczesnego odczytu kolonii *E. coli* i *K. pneumoniae* oraz, najczęściej, antybiotyków β -laktamowych. Czasami nie ma wyraźnej strefy zahamowania wzrostu po 4 godzinach, ale średnicę strefy można łatwo zmierzyć po 6 godzinach (tabela 2). Nie zawsze można odczytać strefy zahamowania wzrostu dla wszystkich badanych antybiotyków.

Tabela 2. Procent średnic stref (%) możliwy do odczytania po 4, 6 i 8 godzinach inkubacji.

Organizm	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>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

* Strefy zahamowania wzrostu dla cefoksytyny i gentamycyny są łatwe do odczytania, podczas gdy dla norfloksacyny i klindamycyny - trudniejsze.

Zalecenia dotyczące kontroli jakości

W przypadku standardowej metody dyfuzyjno-krążkowej EUCAST, EUCAST zaleca, aby wewnętrzna kontrola jakości przeprowadzana była codziennie w celu walidacji procedury i materiałów AST. EUCAST opracował również kryteria dla 4, 6 i 8 godzin inkubacji dla trzech szczepów QC (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213 i *S. pneumoniae* ATCC 49619). Kryteria te podane zostały w tabelach wartości granicznych RAST. Procedura QC RAST wykonywana jest głównie w celu kalibracji i walidacji podczas wdrażania nowej procedury. Po wdrożeniu procedury, przeszkoleniu nowych pracowników oraz wprowadzeniu nowych materiałów (zmiana systemu posiewu krwi, podłoży hodowlanych oraz krążków) QC RAST nie jest wymagana. Należy jednak nadal przeprowadzać regularną, wewnętrzną kontrolę jakości opartą na standardowej metodologii, zgodnie z zaleceniami EUCAST.

Procedurę QC RAST przeprowadza się przez zaszczepienie butelek do posiewu krwi 1 ml roztworu zawierającego 100-200 CFU/ml (0,5 McFarland, rozcieńczonego 1: 100 000) szczepu QC z dodatkiem około 5 ml jałowej krwi. Zaszczepione butelki są inkubowane w instrumencie do posiewu krwi i, w przypadku uzyskania sygnału dodatniego, opracowywane zgodnie z opisaną metodologią.

Ważne uwagi dotyczące stosowania metody EUCAST RAST

- Strefy zahamowania wzrostu należy odczytywać tylko wtedy, gdy wzrost jest konfluentny, a krawędzie są wyraźnie widoczne.
- Podczas interpretowania wyników dla średnic stref, należy stosować tabele wartości granicznych EUCAST RAST, a nie standardowe tabele wartości granicznych.
- Nie należy przekraczać 8 godzinnego czasu inkubacji.