

Často kladené otázky EUCAST RAST v. 2.0

Pro další otázky kontaktujte emma.k.jonasson@kronoberg.se

1. Inokulace agarových ploten

1.1 Jak lze nejjednodušší přenést krev z hemokultivační nádoby na agarovou plotnu?

Krev může být přenesena na agarovou plotnu buď pipetou (po předchozím přenesení krve do prázdné zkumavky) nebo injekční stříkačkou. Pro přenášení přesného objemu $125 \pm 25 \mu\text{l}$ je důležité postup kalibrovat.

1.2 Metoda je validována na plotnách o průměru 90 mm. Lze použít plotny jiné velikosti a/nebo tvaru?

Ano, metodu lze provést na plotnách jiných velikostí a tvarů, ale je nutno změnit množství inokulované krve. Pro více informací o množství krve pro různé plotny kontaktujte EUCAST.

2. Odečítání inhibičních zón

2.1 Jak postupovat, pokud jsou inhibiční zóny nezřetelné nebo obtížně čitelné?

Inhibiční zóny pro každou kombinaci antibiotik se liší, některé jsou ostré a jiné nezřetelné. Aby bylo odečítání zón co nejjednodušší, je zapotřebí inokulum pečlivě rozetřít. Inokulum se po povrchu roztírá tak, aby nebyly viditelné očkovací čáry (netlačí se) a inokulum bylo rovnoměrně rozmístěno po povrchu plotny. Vhodné je použít rotační inokulátor ploten.

2.2 Proč by měly být při odečítání po 16-20 hodinách inkubace přehlíženy izolované kolonie *P. aeruginosa* uvnitř zón piperacilinu-tazobaktamu, imipenemu a meropenemu? Je možné, že při tomto postupu se neprokáže rezistence?

Růst izolovaných kolonií *P. aeruginosa* v inhibičních zónách u piperacilinu-tazobaktamu, imipenemu a meropenemu po 16-20 hodinách inkubace je výsledkem kombinace silného inokula a prodloužené inkubace. Stejný jev se objevuje u *P. aeruginosa* ATCC 27853 při zpracování podle RAST. Ignorování izolovaných kolonií klinických izolátů při odečítání zón je u těchto specifických kombinací ověřeno vyšetřením mikrodiluční metodou a nevede k chybné kategorizaci citlivosti. U všech ostatních kombinací druhů a antibiotik je nutno při odečítání vzít kolonie uvnitř zón do úvahy.

3. Obecná metodologie RAST

3.1 Než se provede RAST jsou hemokultivační lahvičky uchovány při pokojové teplotě déle než 3 hodiny. Lze ještě použít metodu RAST?

Po pozitivním signálu je EUCAST RAST validní do 3 hodin při pokojové teplotě a do 18 hodin v zařízení pro hemokultivaci. Jakoukoli změnu těchto postupů musí příslušná laboratoř ověřit.

3.2 Lze RAST vyšetřit z hemokultivační lahvičky, která obsahuje více než jeden druh bakterie?

Nikoli, RAST není určen pro hemokultivační lahvičky se směsí druhů.

3.3 K čemu slouží breakpointy RAST po 16-20 hodin inkubace?

Breakpointy RAST pro 16-20 hodinovou inkubaci umožňují interpretaci a hlášení výsledků RAST z hemokultivačních lahvíček s pozitivním signálem vyšetřených v čase (např. odpoledne), který neumožňuje odečítání výsledků za 4, 6 nebo 8 hodin. Inkubaci po dobu 16-20 h lze použít pouze v případě, kdy nelze plotny odečíst po 4, 6 nebo 8 hodinách inkubace.

4. Breakpointy RAST

4.1 Jsou breakpointy RAST pro *Acinetobacter baumannii* ověřeny pro další druhy *Acinetobacter baumannii* group (*A. baumannii*, *A. nosocomialis*, *A. pittii*, *A. dijkshoorniae*, *A. seifertii*)?

Breakpointy pro *A. baumannii* nejsou ověřeny pro jiné druhy *Acinetobacter*. Všechny breakpointy EUCAST RAST platí pouze pro druhy uvedené v tabulce.

4.2 Budou brzy k dispozici breakpointy pro jiné druhy?

V současnosti není v plánu stanovit breakpointy pro další druhy, ale předpokládá se stanovení breakpointů dalších antibiotik u *E. coli*, *K. pneumoniae* a *Pseudomonas aeruginosa*.

5. Implementace metody RAST

5.1 Doporučuje EUCAST nějaký specifický protokol nebo počet testování kmenů pro kontrolu kvality při implementaci metody RAST?

EUCAST nevydal oficiální doporučení kolikrát je zapotřebí opakovat kontrolu kvality před tím, než bude systém považován za validovaný. Je vhodné provést testování nejméně v pěti dnech. Výsledky by pak měly být porovnány s cílovými hodnotami a rozmezím kontroly kvality RAST. Provedou se úpravy a podle potřeby se opakuje kontrola kvality.

5.2 Mají se kmeny pro kontrolu kvality očkovat do aerobních nebo anaerobních hemokultivačních lahvíček?

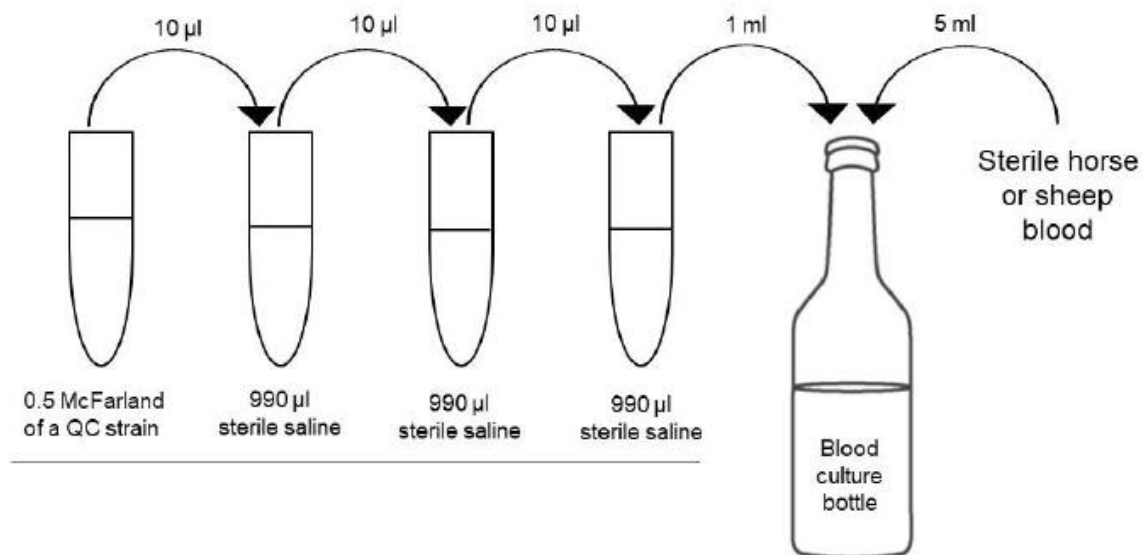
Lze použít aerobní nebo anaerobní hemokultivační lahvičku.

5.3 Lze při provádění kontroly kvality RAST přidat jinou krev než ovčí nebo koňskou?

Metoda byla vyvinuta pro koňskou nebo ovčí krev. Důsledkem použití jiných druhů krve nebo růstových doplňků mohou být odlišné velikosti zón a proto musí být ověřeny místní laboratoři.

5.4 Jak získat správné ředění (1 ml roztoku s obsahem 100-200 CFU/ml) kontrolního kmene?

Připraví se suspenze o koncentraci 0,5 McFarlandova zákalu a zředí 1:1 000 000 přenesením 10 µl roztoku do zkumavky s 990 µl fyziologického roztoku. Tento krok se opakuje celkem 3 x za sebou. Z poslední zkumavky se odebere 1 ml a přenesese do hemokultivační lahvičky. Viz obrázek níže.



- Připraví se suspenze kontrolního kmene v koncentraci 0,5 McFarlanda.
- Podle výše uvedeného obrázku se připraví série ředění a do hemokultivační lahvičky se přidá ovčí nebo koňská krev.
- Lahvička se inkubuje v zařízení pro inkubaci lahviček.
- Lahvičky, u nichž byl zaznamenán pozitivní signál, se dále zpracovávají podle metodologie RAST.
- K posouzení výsledků se použije dokument RAST QC (kontrola kvality), který obsahuje kritéria RAST QC.