

**Metoda - Rychlé vyšetření antibiotické citlivosti EUCAST (RAST)
přímo z pozitivních hemokultivačních lahvíček.
(RAST, Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing)**

verze 12. dubna 2022

Změny proti předchozí verzi (v 2.0)

Sekce	Změna
Obecné informace	Přidána informace o 16-20 hodinové inkubaci
Inkubace a odečítání ploten	Přidána informace o 16-20 hodinové inkubaci
Tabulka 1	Přidána informace o 16-20 hodinové inkubaci
Vyšetřování ploten po inkubaci	Přidána informace o 16-20 hodinové inkubaci
Měření průměrů zón a interpretace citlivosti	Přidána informace o 16-20 hodinové inkubaci
Tabulka 2	Přidána informace o 16-20 hodinové inkubaci
Doporučení pro kontrolu kvality	Přidána informace o 16-20 hodinové inkubaci

Metoda EUCAST RAST je založena na standardní diskové difúzní metodě EUCAST, avšak s upraveným inokulem, zkrácenou dobou inkubace, upravenými pokyny pro odečítání a specifickými breakpointy RAST.

Cílem metody EUCAST RAST je získat rychlé výsledky testu citlivosti přímo z pozitivních hemokultur. Metoda RAST poskytuje specifické breakpointy pro měření po 4, 6 a/nebo 8 hodinách inkubace. Kromě toho byly pro *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* a *S. pneumoniae* stanoveny breakpointy RAST pro 16-20hodinovou inkubaci. Výsledky by měly být odečteny až po 16-20 hodinách, nelze-li odečíst výsledky po 4, 6 a/nebo 8 hodinách inkubace. Izoláty, jejichž výsledky jsou v ATU ve všech časech odečítání, musí být testovány standardní metodikou a standardními breakpointy.

Příprava hemokultivačních lahvíček

Metoda EUCAST RAST byla ověřena v hemokultivačních lahvíčkách BACTEC (Becton Dickinson), BacT/ALERT (bioMérieux) a VersaTREK (Thermo Fisher). Metodu RAST lze provádět v rozmezí 0 - 18 hodin po pozitivní signalizaci lahvíček. Byl posuzován vliv pokojové teploty po vytažení lahvíček z přístroje, které je nezbytné k provedení metody. Bylo zjištěno, že výsledky RAST nejsou ovlivněny až do 3 hodin po vytažení lahvíček. Metodu RAST nelze použít pro hemokultury se směsí druhů bakterií.

Očkování agarových destiček přímo z hemokultivačních lahvíček

Z pozitivní hemokultivační lahvíčky se na každou kruhovou agarovou plotnu MH/MH-F o průměru 90 mm přenese 125±25 µl neředěné kultivační půdy. Tekutina se na povrchu agaru jemně rozetře tamponem ve třech směrech nebo automatickým rotátorem, a plotna se poklade disky jako u standardní diskové difúzní metody. K omezení interference mezi antibiotiky se používá nejvýše 4-6 disků.

Inkubace a odečítání destiček

Plotny se inkubují podle pokynů v **tabulce 1**. Pro 4, 6 a 8 h inkubace: Inhibiční zóny se odečítají v rozmezí ± 5 minut od uvedeného času odečítání (4, 6 a/nebo 8 hodin). Je-li zapotřebí, plotny se do 10 minut dají znovu inkubovat, aby je bylo možno odečítat později (za 6 a/nebo 8 hodin). Je-li nezbytné inkubovat plotny déle než 8 h, odečítají se inhibiční zóny po 16-20 hodinách. Inkubace se již dále neprodlužuje.

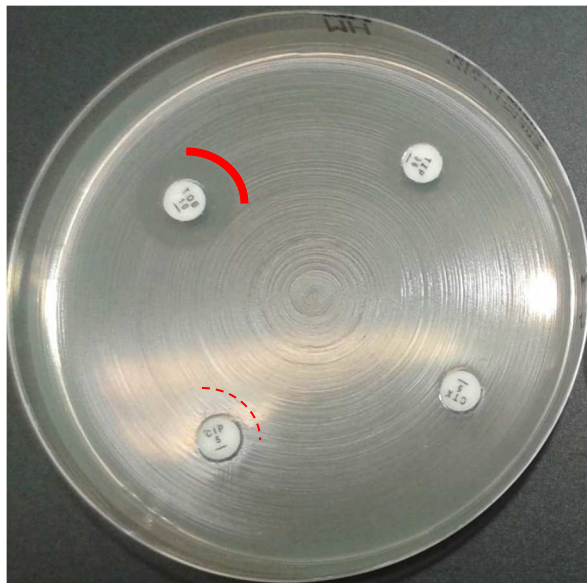
Tabulka 1. Podmínky inkubace ploten pro vyšetření antibiotické citlivosti.

Druh	Doba inkubace	Půda	Prostředí inkubace
<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	4, 6 a 8 hodin 16-20 hodin	MH	35±1°C na vzduchu
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 a 8 hodin 16-20 hodin	MH	35±1°C na vzduchu
<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Acinetobacter baumannii</i>	4, 6 a 8 hodin	MH	35±1°C na vzduchu
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4, 6 a 8 hodin 16-20 hodin	MH-F	35±1°C v 4-6% CO ₂

Vyšetření destiček po inkubaci

4, 6 a 8 hodin inkubace:

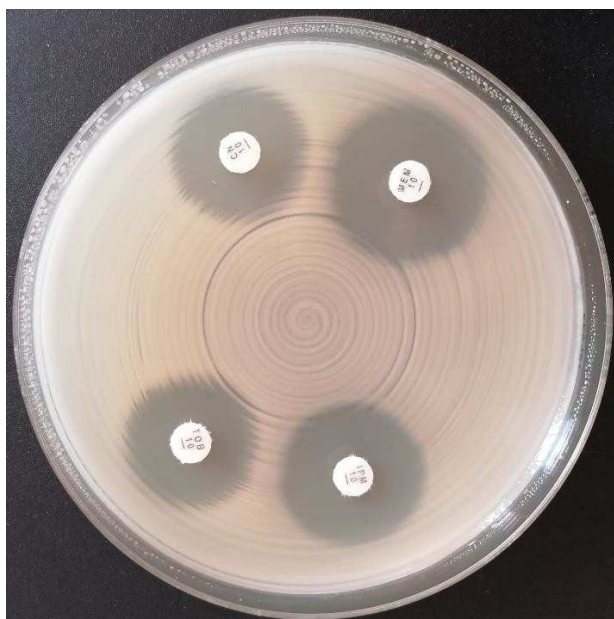
Po 4, 6 a 8 h inkubace RAST je růst na plotně s agarem Muller-Hinton často méně zřetelný než u standardní diskové metody. **Inhibiční zóny by měly být odečítány pouze tehdy, je-li růst splývavý a okraje zón jsou zřetelně viditelné, viz příklad na obrázku 1.**



Obrázek 1. *E. coli* za 4 hodiny inkubace. Zóny se zřetelně viditelným okrajem zóny lze odečítat (plná čára), zastřené zóny by se odečítat neměly (tečkovaná čára).

16-20 hodin inkubace:

Po 16-20 h inkubace RAST je růst na plotně s agarem Muller-Hinton často silnější než u standardní metody, příklad viz **obrázek 2**.



Obrázek 2. *E. coli* po 16-20 hodinách inkubace.

Měření zón inhibice

Obecné pokyny k odečítání

- Plotny s MH se odečítají proti tmavému pozadí, plotny s MH-F proti světlému pozadí. Plotny se odečítají ve vzdálenosti 30 cm od oka pod úhlem 45 stupňů. Plotna se naklání tak, aby se dal rozpoznat ostrý okraj zóny.
- Průměr inhibiční zóny se měří s přesností na nejbližší 1 mm. Metoda RAST není validována pro automatické odečítání.

Specifické pokyny k odečítání po 4, 6 a 8 h inkubace

- Plotny MH a MH-F se **po odstranění víčka odečítají z horní strany** v odraženém světle.
- Slabý růst v inhibiční zóně se zřetelným okrajem by se měl ignorovat. Takový růst se vyskytuje při časném odečítání u *E. coli* a *K. pneumoniae* a nejčastěji u β -laktamových antibiotik.
- U *A. baumannii* a kotrimoxazolu se odečítá vnější okraj zóny a ignoruje se růst uvnitř zóny.
- Po 4 hodinách se někdy zřetelná inhibiční zóna nevytvoří, ale po 6 hodinách již lze průměr zóny snadno měřit (**tabulka 2**). Inhibiční zóny u všech testovaných antibiotik není vždy možno odečíst.

Specifické pokyny k odečítání po 16-20 h inkubace

- Po 16-20 h inkubaci se plotny s **MH agarem odečítají ze spodní strany plotny** v odraženém světle a **plotny MH-F se po odstranění víčka odečítají z horní strany** v odraženém světle. Po 4 hodinách se někdy zřetelná inhibiční zóna nevytvoří, ale po 6 hodinách již lze průměr zóny snadno měřit (tabulka 2). Inhibiční zóny u všech testovaných antibiotik není vždy možno odečíst.
- U *P. aeruginosa* a piperacilinu-tazobaktamu, imipenemu a meropenemu se ignoruje růst uvnitř inhibiční zóny a odečítá se od vnějšího okraje, viz **obrázek 3**.



Obrázek 3. Kolonie uvnitř zóny se ignorují a odečítá se od ostrého okraje zóny.

Tabulka 2. Podíl průměrů zón (%) které je možno* odečíst po 4-20 h inkubace.

Druh	4 hodiny	6 hodin	8 hodin	16-20 hodin
<i>Escherichia coli</i>	90	99	99	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	96	98	98	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	88	97	100
<i>Acinetobacter baumannii</i>	99	100	100	ND
<i>Staphylococcus aureus</i>	55*	91	95	100
<i>Enterococcus faecalis</i>	93	99	100	ND
<i>Enterococcus faecium</i>	44	93	99	ND
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	68	83	95	100

* tabulka uvádí "je možno odečíst", nikoli "je možno interpretovat", neboť některé průměry zón mohou být v ATU

** cefoxitin a aminoglykosidy lze snadno odečíst, zatímco norfloxacin a klindamycin se odečítají obtížněji

ND: data nejsou k dispozici, testování nebylo provedeno.

Interpretace výsledků

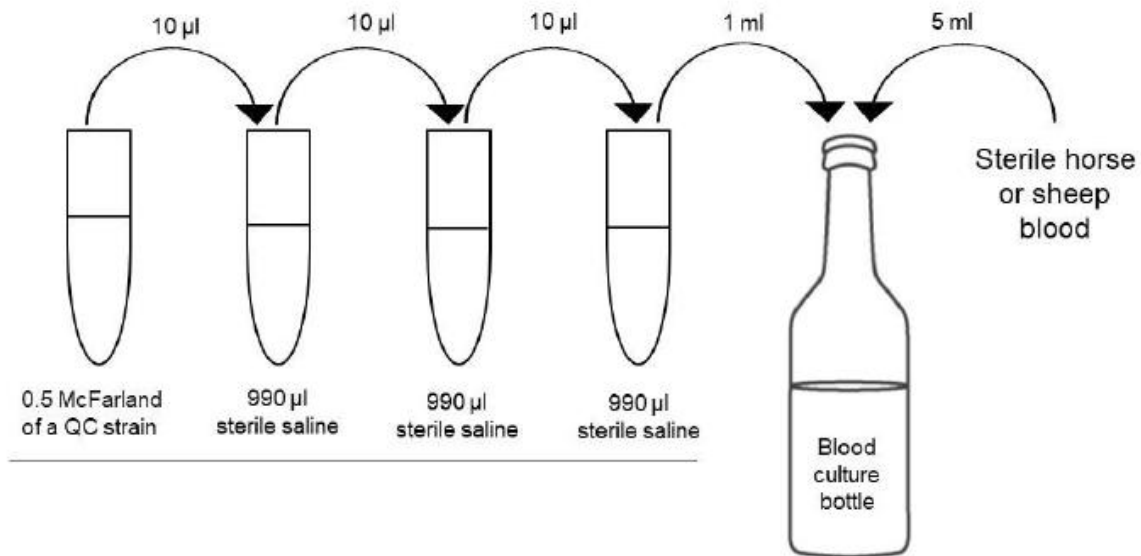
- Naměřené průměry inhibičních zón se interpretují podle poslední verze tabulek breakpointů RAST.
- Někdy není možné nahlásit kategorii citlivosti pro všechny testované antimikrobní přípravky protože zónu nelze spolehlivě odečíst, nebo průměr zóny je v ATU. V těchto případech se ponechá prázdný výsledek.

Doporučení pro kontrolu kvality.

EUCAST doporučuje denně provádět interní kontrolu kvality (QC) ke kontrole postupu při vyšetřování antibiotické citlivosti standardní diskovou difúzní metodou a k validaci použitého materiálu. EUCAST rovněž předkládá kritéria pro rychlé odečítání za 4, 6 a 8 hodin pro pět kmenů pro QC (*E.coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212 a *S. pneumoniae* ATCC 49619) po 16-20 h pro čtyři kmeny (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213 a *S. pneumoniae* ATCC 49619). Kritéria jsou k dispozici v Tabulkách breakpointů RAST. Kontrola kvality RAST QC se provádí především ke kalibraci a validaci provádění nového postupu. Jakmile je tento postup zaveden a jsou s ním seznámeni i noví zaměstnanci nebo je ověřen u nových materiálů (při změně systému kultivace krve, půd nebo disků), není zapotřebí nadále provádět QC RAST. Pravidelnou interní QC u standardní metody vyšetření je však podle doporučení EUCAST zapotřebí provádět stále.

Do hemokultivační lahvičky se naočkuje 1 ml suspenze 100-200 CFU/ml* kmene pro QC a přidá se přibližně 5 ml sterilní koňské nebo ovčí krve. Naočkované lahvičky se inkubují v přístroji pro hemokultivaci a po pozitivním signálu se zpracují podle metodiky RAST.

*100-200 CFU/ml = Suspenze upravená na 0,5 McFarland se zředí 1:1 000 000, viz příklad v grafu 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 použijí kritéria uvedená v dokumentu RAST QC.

Důležité upozornění při používání metody EUCAST RAST

- Zóny inhibice lze odečítat pouze tehdy, je-li růst splývavý a okraje jsou zřetelně viditelné.
- Zóny se odečítají pouze v určených časech, tj. za 4, 6 a 8 h a není-li zbytek pak za 16-20 h.
- Pro interpretaci výsledků do kategorií citlivosti se používají Tabulky breakpointů EUCAST RAST, nikoli běžné Tabulky breakpointů EUCAST.