

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

**verze 5.0**

**březen 2024**

Změny proti předchozí verzi (v. 4.0)

<b>Sekce</b>	<b>Změna</b>
<b>Úvod</b>	Přidány informace o druzích s breakpointy pro 16-20 hodin.
<b>Tabulka 1</b>	Přidány informace o druzích s breakpointy pro 16-20 hodin.
<b>Tabulka 2</b>	Přidány údaje pro 16-20 hodin.
<b>Doporučení pro kontrolu kvality</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Přidány informace o dostupných kmenech pro kritéria kontroly kvality po 16-20 hodinách.</li><li>- Přidány informace o defibrinované koňské krvi.</li></ul>

Metoda EUCAST RAST je založena na standardní metodice EUCAST pro diskovou difúzi, ale s upraveným inokulem, dobou inkubace, upravenými pokyny pro odečet a specifickými breakpointy RAST.

Účelem metody EUCAST RAST je umožnit rychlé výsledky testů citlivosti přímo z pozitivních hemokultur. Metoda RAST poskytuje specifické breakpointy pro odečty po 4, 6 a/nebo 8 hodinách inkubace. Kromě toho byly vyvinuty breakpointy RAST pro inkubaci 16-20 hodin. Výsledky by se měly odečítat až po 16-20 hodinách, pokud není možné odečíst výsledky po 4, 6 a/nebo 8 hodinách inkubace, například z důvodu omezené pracovní doby.

Metoda byla validována pro následující druhy: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* (včetně *Klebsiella variicola* a *Klebsiella quasipneumoniae*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* a *Streptococcus pneumoniae*.

### Příprava hemokultivačních lahviček

Metoda EUCAST RAST byla validována v hemokultivačních lahvičkách BACTEC (Becton Dickinson), BacT/ALERT (bioMérieux) a VersaTREK (Thermo Fisher). Metodu RAST lze provádět v rozmezí 0-18 hodin po pozitivní signalizaci lahviček. Pozitivní lahvičky s hemokulturou nevyjímejte z přístroje, dokud nejste připraveni pokračovat v metodě RAST. Abychom však umožnili transport pozitivních lahviček z jednoho pracoviště na druhé, vyhodnotili jsme vliv uchovávání lahviček při pokojové teplotě poté, co jsme je vyndali z přístroje. Bylo zjištěno, že výsledky RAST nebyly ovlivněny „zpožděním“ až 3 hodiny. Metoda RAST by se neměla provádět u hemokultur se směsí druhů bakterií.

### Inokulace agarových ploten přímo z hemokultivačních lahviček

Z pozitivní hemokultivační lahvičky se na každou kruhovou agarovou plotnu MH/MH-F o průměru 90 mm přenesou 125±25 µl neředěného obsahu. 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 na 1 plotnu umístí nejvýše 4-6 disků. Inokulujte plotny, aplikujte disky s antibiotiky a inkubujte destičky bez prodlení.

### Inkubace a odečítání ploten

Plotny se inkubují podle pokynů v **tabulce 1**. Pro 4, 6 a 8 hodin: 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 hodin, odečítají se inhibiční zóny po 16-20 hodinách. Plotny neinkubujte ani neodečítejte déle než 20 hodin.

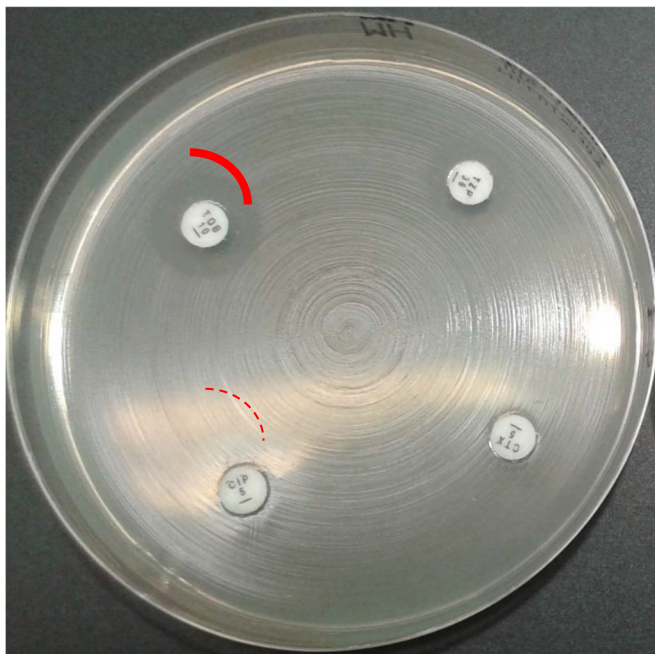
**Tabulka 1.** Podmínky inkubace ploten pro vyšetření antibiotické citlivosti.

Druh	Doba inkubace	Půda	Inkubace
<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 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>Streptococcus pneumoniae</i>	4, 6 a 8 hodin 16-20 hodin	MH-F	35±1°C při 4-6% CO <sub>2</sub> ve vzduchu

## Vyšetření ploten po inkubaci

### 4, 6 a 8 hodin inkubace:

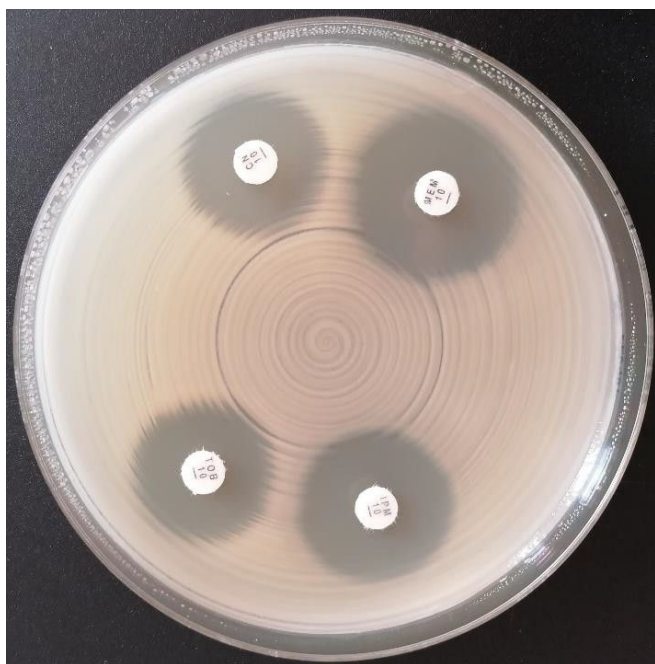
Po 4, 6 a 8 hodinách je růst na plotně s agarem Muller-Hinton často méně zřetelný než u standardní diskové metody. **Inhibiční zóny by měly být odečítány pouze tehdy, je-li růst splývavý a okraje zón jsou zřetelně viditelné, viz příklad na obrázku 1.**



**Obrázek 1.** *E. coli* po 4 hodinách inkubace. Zóny se zřetelně viditelným okrajem zóny by měly být odečteny (plná čára) a zastřené zóny by se odečítat neměly (tečkovaná čára).

### 16-20 hodin inkubace:

Po 16-20 hodinách inkubace RAST je růst na plotně s agarem Muller-Hinton obvykle silnější než u standardní diskové metody, viz příklad na **obrázku 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°. Plotna se naklání tak, aby se dal rozpoznat ostrý okraj zóny.
- Průměr inhibiční zóny se měří ručně s přesností na milimetry. Metoda RAST nebyla validována pro automatické odečítání.
- Slabý růst uvnitř inhibiční zóny s jasným okrajem by měl být ignorován. Toto se občas objevuje při časném odečtu u *E. coli* a *K. pneumoniae* a nejčastěji u  $\beta$ -laktamových antibiotik.

### Specifické pokyny k odečítání po 4, 6 a 8 hodinách inkubace

- Plotny MH a MH-F se odečítají z **přední strany plotny se sejmutým víčkem** v odraženém světle.
- U *A. baumannii* s trimethoprim-sulfametoxazolem (kotrimoxazolem) se odečítá vnější okraj zóny a ignoruje se růst uvnitř zóny.
- Někdy není po 4 hodinách patrná inhibiční zóna, ale po 6 hodinách již lze průměr zóny snadno změřit (**tabulka 2**). Inhibiční zóny u všech testovaných antibiotik není vždy možno odečíst.

### Specifické pokyny k odečítání po 16-20 hodinách inkubace

- Po 16-20 hodinách se plotny s **MH agarem odečítají ze spodní strany plotny** v odraženém světle a **plotny MH-F se odečítají z přední strany se sejmutým víčkem** v odraženém světle.
- U *P. aeruginosa* s piperacilin-tazobaktamem, imipenemem, imipenemem-relebaktamem, meropenemem a meropenemem-vaborbaktamem se ignorují ojedinělé kolonie uvnitř inhibiční zóny a odečítá se vnější okraj zóny, viz příklad na **obrázku 3**.



**Obrázek 3.** Ojedinělé kolonie uvnitř inhibiční zóny se ignorují a odečítá se vnější okraj zóny.

**Tabulka 2. Podíl průměrů zón (%) které je možné 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	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

\* V tabulce je uvedeno "je možno odečíst", nikoli "je možno interpretovat", neboť některé průměry zón mohou být v ATU.

\*\* U některých izolátů *P. aeruginosa* je slabý růst při RAST, izoláty mají obvykle slabý růst i při standardní diskové difuzi po 16-20 hodinách inkubace.

\*\*\* Cefoxitin a aminoglykosidy lze snadno odečíst, zatímco norfloxacin a klindamycin se odečítají obtížněji.

### Interpretace výsledků

- Naměřené průměry inhibičních zón interpretujte podle nejnovější verze tabulek breakpointů RAST.
- Někdy není možné uvést kategorii citlivosti pro všechny testované antimikrobiální přípravky, a to buď proto, že nedochází k růstu, nelze zónu spolehlivě odečíst, nebo proto, že průměr zóny je v ATU. V těchto případech ponechte hlášení pro příslušný přípravek prázdné. Doporučujeme, aby laboratoře do hlášení o pozitivních hemokulturách uváděly komentář, který vysvětluje, proč někdy nelze hlásit některé výsledky. Komentář by mohl znít takto: „Při vyšetření antimikrobiální citlivosti přímo z pozitivních hemokultivačních lahvíček, kdy se výsledky odečítají po 4, 6 a/nebo 8 hodinách, lze hlásit pouze spolehlivé výsledky. Neúplný výsledek vyšetření citlivosti po krátké inkubaci může být později doplněn dalšími výsledky.“

### Oblast technické nejistoty (ATU)

ATU je rozsah průměru inhibičních zón. U metody EUCAST RAST existují ATU pro všechny kombinace organismů a antimikrobiálních látek. V oblasti ATU je nesnadné rozlišit kategorie citlivosti (C, I a R). Interpretační chyby se v této oblasti dramaticky zvyšují a proto se nedoporučuje interpretovat kategorie citlivosti. Výsledky nad nebo pod ATU lze spolehlivě interpretovat.

Pokud je výsledek uvnitř ATU, nelze jej interpretovat a místo pro výsledek se ponechá prázdné. Po 4 hodinách se plotny do 10 minut reinkubují a znovu se odečítají po 6 a případně po 8 hodinách, a je-li nezbytné po 16-20 hodinách. Pokud nelze poskytnout úplný výsledek po 8 nebo 16-20 hodinách inkubace, proveďte vyšetření antimikrobiální citlivosti standardní diskovou difúzní metodou EUCAST.

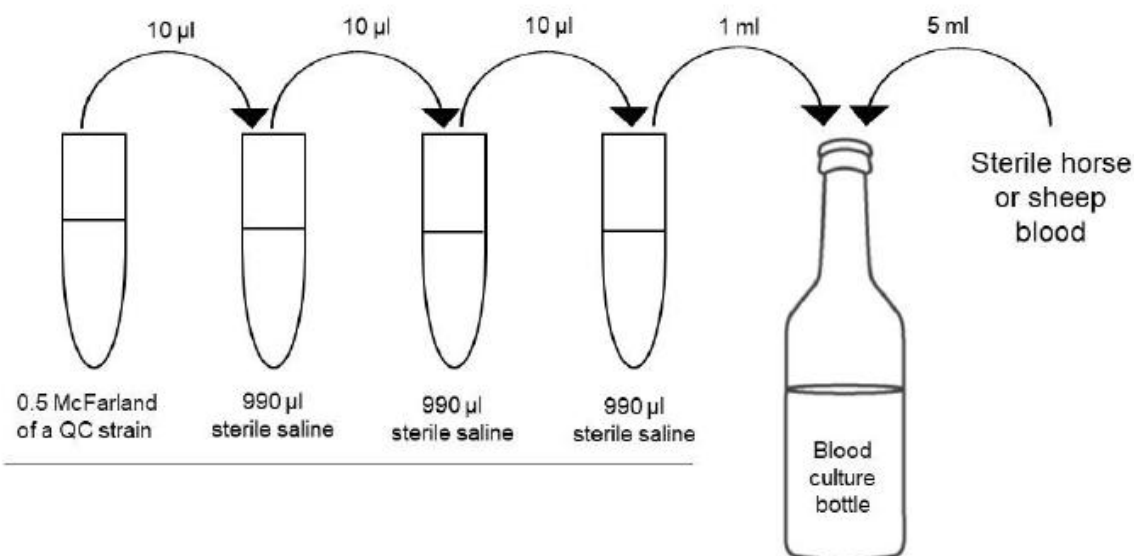
### Doporučení pro kontrolu kvality.

U standardní diskové difúze EUCAST doporučuje EUCAST provádět interní kontrolu kvality (QC) denně za účelem validace postupu a materiálů vyšetření antimikrobiální citlivosti. EUCAST rovněž vypracoval kritéria pro odečítání za 4, 6, 8 a 16-20 hodin pro pět kmenů kontroly kvality - QC (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212 a *S. pneumoniae* ATCC 49619). Kritéria jsou k dispozici v Tabulkách RAST QC. Kontrola kvality RAST QC se provádí především ke kalibraci a validaci zavedení nového postupu. Všechny časy odečtu používané v laboratoři by měly být validovány pomocí kmenů QC. Jakmile je postup zaveden a jsou s ním seznámeni i noví pracovníci nebo je ověřen u nových materiálů (při změně systému kultivace

krve nebo médií či disků), není zapotřebí nadále provádět QC RAST. Pravidelnou interní QC u standardní metody vyšetření ke kontrole používaných materiálů a vybavení je však podle doporučení EUCAST zapotřebí provádět stále.

Kmeny QC se testují inokulací hemokultivační lahvičky 1 ml suspenze 100-200 CFU/ml\* kmene pro QC a přidá se přibližně 5 ml defibrinované 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 ředí v poměru 1:1 000 000, viz příklad v grafu níže.



- Připraví se suspenze kontrolního kmene (QC kmen) 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 kultivaci krve.
- 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 zbytí (např. z důvodu omezené pracovní doby) pak za 16 -20 h.
- Pro interpretaci výsledků do kategorií citlivosti se používají Tabulky breakpointů EUCAST RAST, nikoli běžné Tabulky breakpointů EUCAST.