



UNIKLINIK
KÖLN

Rapid AST aus Blutkulturen – erste Erfahrungen mit der schnellen Resistenztestung nach EUCAST

07.05.2018 | Philipp Thelen | Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene

EUCAST rapid AST aus Blutkulturen

- › Grundlagen der Methode
- › Rapid AST im Routinelabor
 - › Implementierung / QC
 - › Erfahrungen / Stolpersteine



**Methodology - EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST)
directly from positive blood culture bottles.**

Version 1.1

May 2019

http://www.eucast.org/rapid_ast_in_blood_cultures/

Grundlagen des rapid AST

- › **Standardisierte** und von EUCAST **validierte** Methode zur Resistenztestung direkt aus positiven Blutkulturen
- › Basierend auf EUCAST Agardiffusionsmethode

Klinische Breakpoints:

- › *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis*,
E. faecium, *S. pneumoniae*, *A. baumannii*

Screening Breakpoints (ESBL, Carbapenemasen)

- › *E. coli*, *K. pneumoniae*

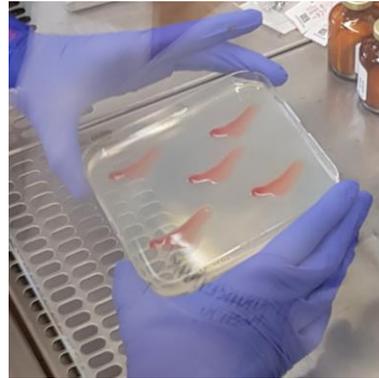
Inokulation und Inkubation



1. Positive BK
Gramfärbung
ID (MALDI-TOF)



2. 100 – 150 μ L BK
(runde 90 mm Platten)
Ca. 300 μ l quadratische Platten



3. Verteilen des
Materials



4. Vorsichtig auf
Platte ausstreichen

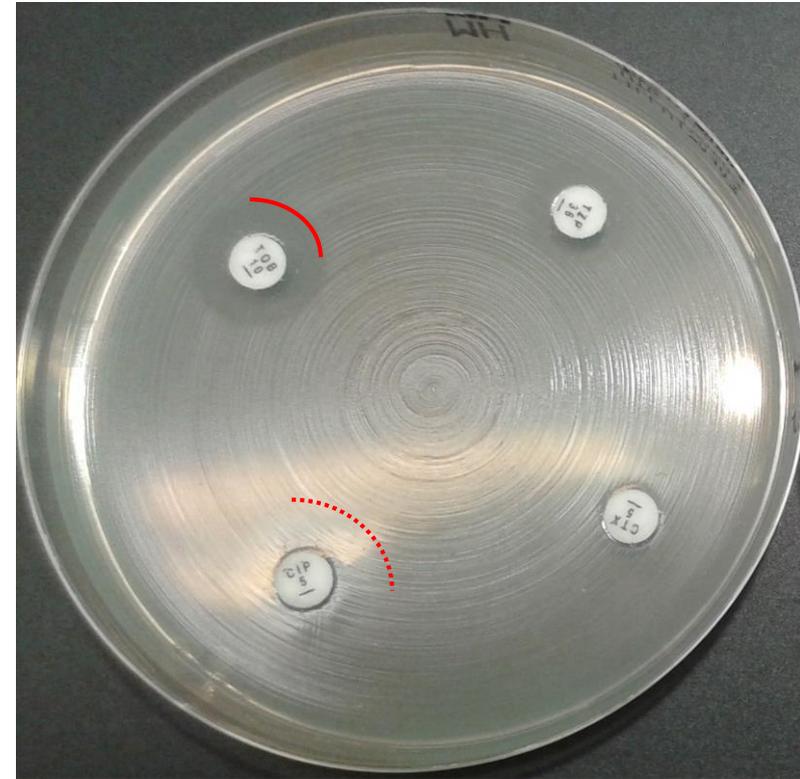
5. Antibiotikaplättchen auflegen

6. Inkubation + Ablesung nach: **4h, 6h, 8h** (jeweils \pm 5 Minuten)

Ablesung der HDD

- › Abstand ca. 30 cm
- › Ablesung von vorne ohne Deckel
- › Nur Ablesen, wenn ein klarer Rand erkennbar ist
- › Dünnes Wachstum innerhalb der Zone muss ignoriert werden

Nicht Ablesbar!
Was nun?



E. Coli nach 4h Inkubation

http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/RAST/EUCAST_RAST_methodology_v1.1_Final.pdf

Anteil der ablesbaren HHD in %

Organismus	4h	6h	8h
<i>Escherichia coli</i>	90	99	99
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	96	98	98
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	88	97
<i>Acinetobacter baumannii</i>	99	100	100
<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

Min 80 %

http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/RAST/EUCAST_RAST_methodology_v1.1_Final.pdf

EUCAST rAST Breakpoints Table

Escherichia coli

EUCAST RAST breakpoint table v. 1.1, valid from 2019-05-02

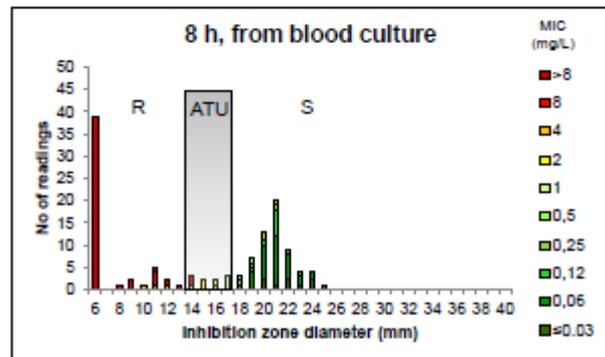
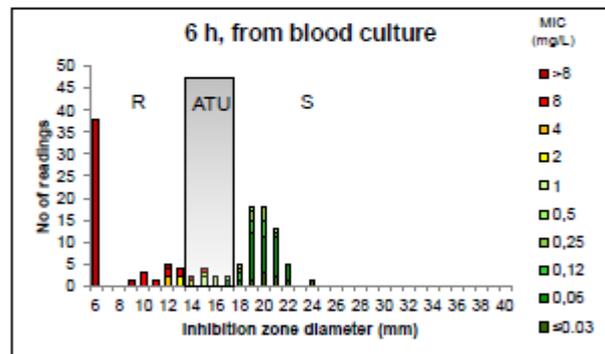
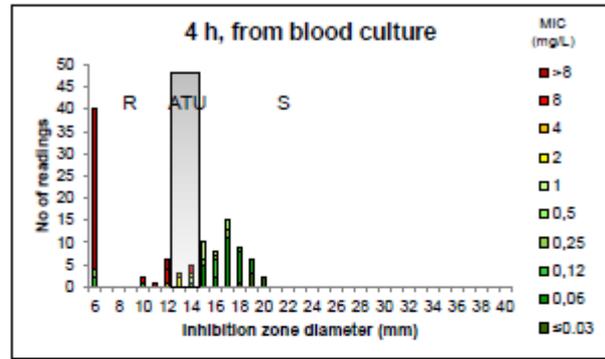
Zone diameter breakpoints for RAST directly from blood culture bottles

EUCAST rapid disk diffusion method directly from positive blood culture bottles
Medium: Mueller-Hinton (MH) agar
Inoculum: 125±25 µL directly from a positive blood culture bottle
Incubation: Air, 35±1°C
Incubation time: 4, 6 and 8 hours
Reading: Remove lid and read zone edges from the front against a dark background illuminated with reflected light.
[QC for implementation of RAST](#)

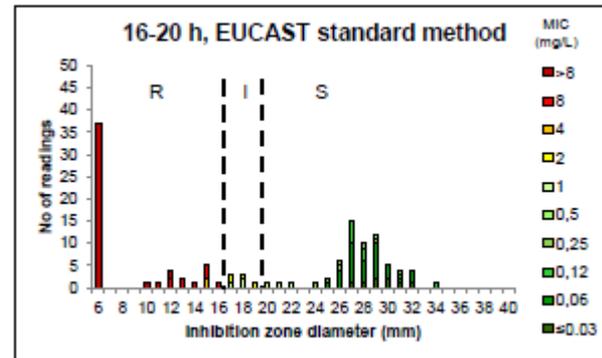
Antimicrobial agent	Disk content (µg)	4 hours			6 hours			8 hours		
		S ≥	ATU	R <	S ≥	ATU	R <	S ≥	ATU	R <
Piperacillin-tazobactam	30-6	17	12-16	12	18	14-17	14	18	14-17	14
Cefotaxime ¹	5	15	13-14	13	16	14-15	14	17	15-16	15
Ceftazidime ¹	10	15	12-14	12	16	14-15	14	17	15-16	15
Meropenem ²	10	18	15-17	15	17	15-16	15	17	15-16	15
Ciprofloxacin	5	17	14-16	14	20	17-19	17	20	17-19	17
Amikacin	30	15	13-14	13	15	13-14	13	15	13-14	13
Gentamicin	10	14	12-13	12	14	12-13	12	14	12-13	12
Tobramycin	10	14	12-13	12	15	13-14	13	15	13-14	13

Warum neue Breakpoints

Figure 1. Inhibition zone distributions for *E. coli* vs. cefotaxime per incubation time, with corresponding MICs as coloured bars. The proposed ATU is shaded in grey and standard breakpoints are shown as dotted lines.



E. coli with cefotaxime 5 µg vs. BMD Spiked BC bottles vs. standard DD



- › HHD ändern sich mit der Zeit
 - › Separation erhöht sich bei längerer Inkubationsdauer
- › Neue Breakpoints für RAST
- › Area of Technical Uncertainty verhindert den Report falscher Ergebnisse

http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/EUCAST_Presentations/2017/EUCAST_posters_ECCMID_2017.pdf



UNIKLINIK
KÖLN

Testperformance EUCAST rAST

› rAST categorical agreement vs. EUCAST standard Agardiffusion (%)

E. Coli (150 Isolate)			
	4h	6h	8h
Correct	79	89	82
mE	0,6	1,4	1,5
ME	1,7	0,8	0,7
VME	0,4	0,3	0,4
ATU	18	9	7

Emma Jonasson, ECCMID 2019, Abstract O0254

EUCAST rapid AST im Routinelabor

Rapid AST im Routinelabor

Für welche BK Flaschen

- › Bis 18h nach positivem Signal
- › Bis zu 3h nach Entnahme aus BK Automat

Ablesen und Interpretation der Ergebnisse

- › ID unverzichtbar
- › Ablesung innerhalb von ± 5 Minuten des vorgegebenen Ablesezeitpunktes
- › Reinkubation innerhalb von 10 Minuten möglich
- › Interpretation nach **zeit- und speziesspezifischen** Breakpoints
- › **KEINE** Inkubation > 8h

Keine Breakpoints für
Spezies

=

KEINE Interpretation

Endgültige Ergebnisse

Implementierung und Qualitätskontrollen

Routine QC für Materialien

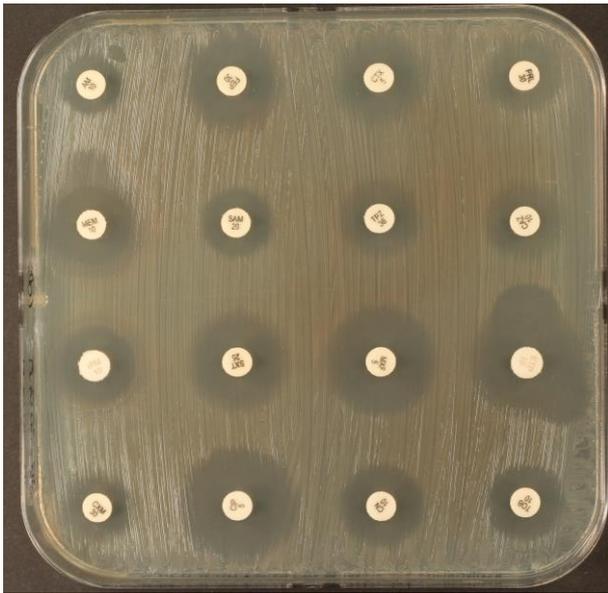
- › Standard Qualitätskontrollen nach EUCAST Agardiffusionsmethode

Implementierung / Änderungen im Procedere / Einarbeitung

- › rAST QC Procedere:
 - › Gespikte BK (QC Stamm + Pferde/Schafsblut)
 - › Rapid AST
 - › Inkubation und Ablesung 4h, 6h, 8h

Persönliche Erfahrungen

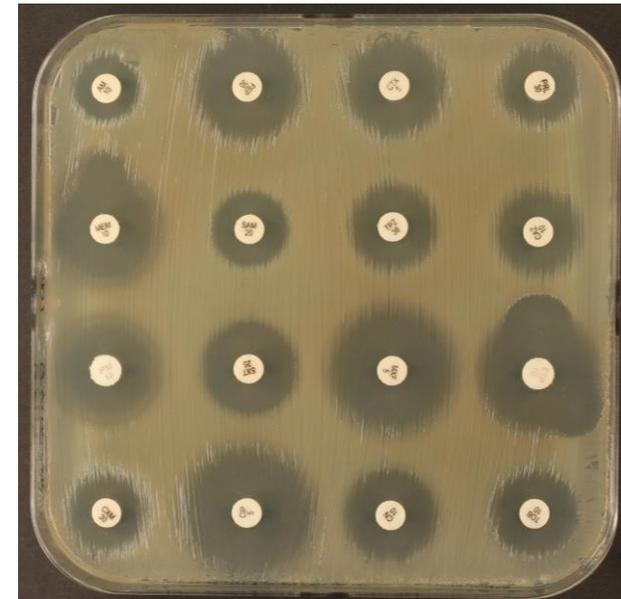
E. coli ATCC 25922



4h

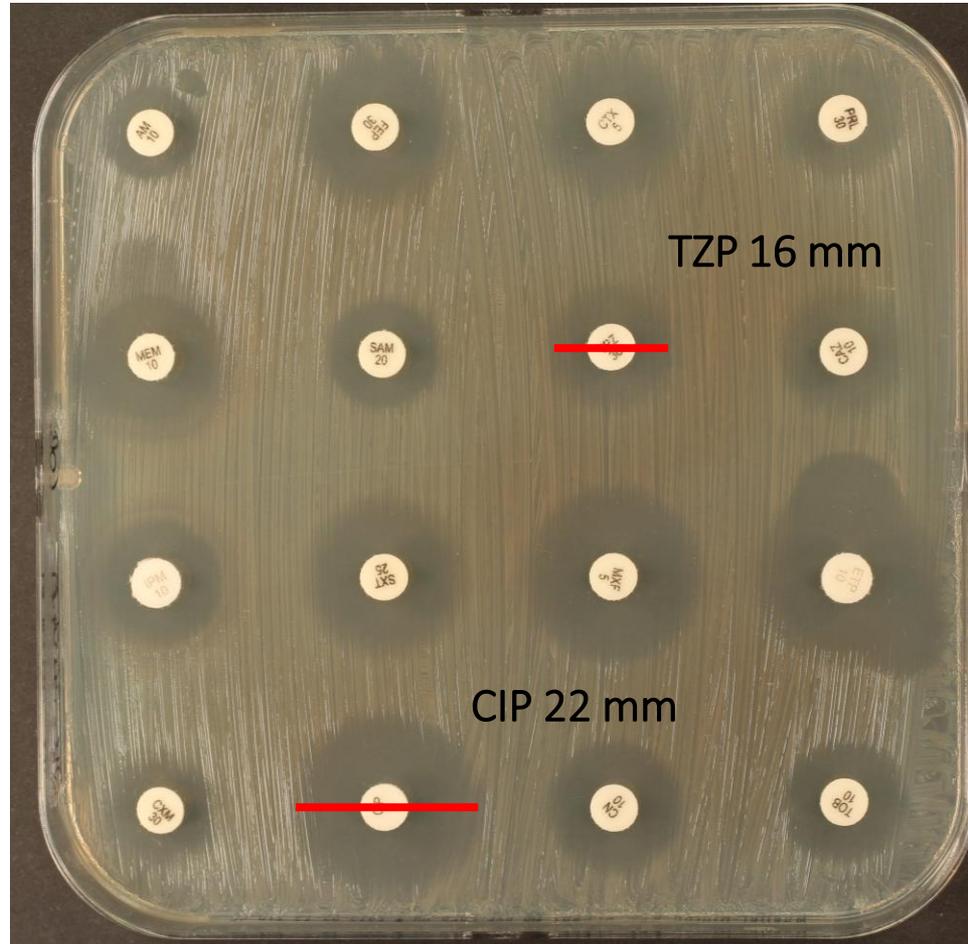


6h

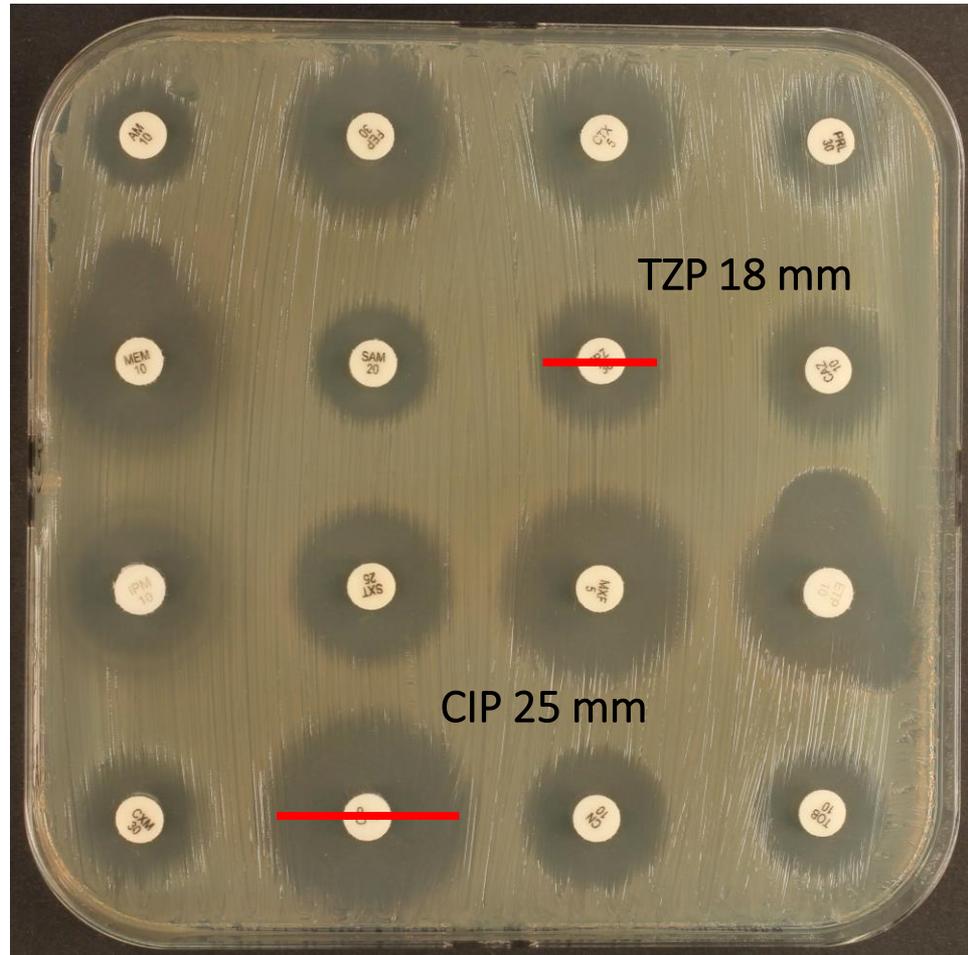


8h

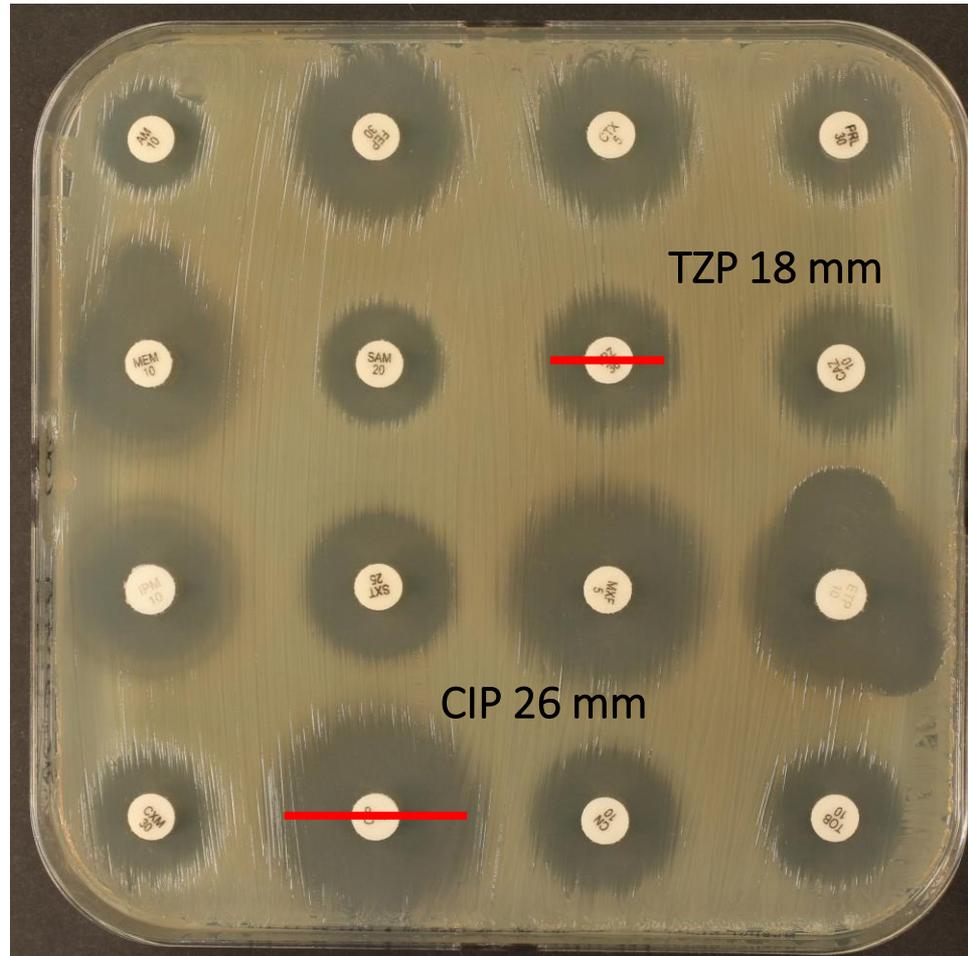
E. coli ATCC 25922 4h



E. coli ATCC 25922 6h



E. coli ATCC 25922 8h



Ergebnisse der QC Testungen

HHD lesbar in %	4h	6h	8h
<i>E. coli</i> ATCC 25922	90	96	100

10 Testläufe mit endgültigem Inokulum und Handling

Stolpersteine

Handling

- › Vorsichtiges Ausstreichen (Tupferspuren erschweren Ablesen)
- › Unterschiede zum Ablesen der normalen Agardiffusion

Arbeitsabläufe im Labor

- › Inkubationsdauer einhalten **± 5 Minuten**
- › Reinkubation bei Unlesbarkeit (häufig min. 2 Ablesezeitpunkte)
- › Bei ATU Testung mit weiterer Methode
- › 8 h Zeitpunkt ggf. außerhalb der Arbeitszeit

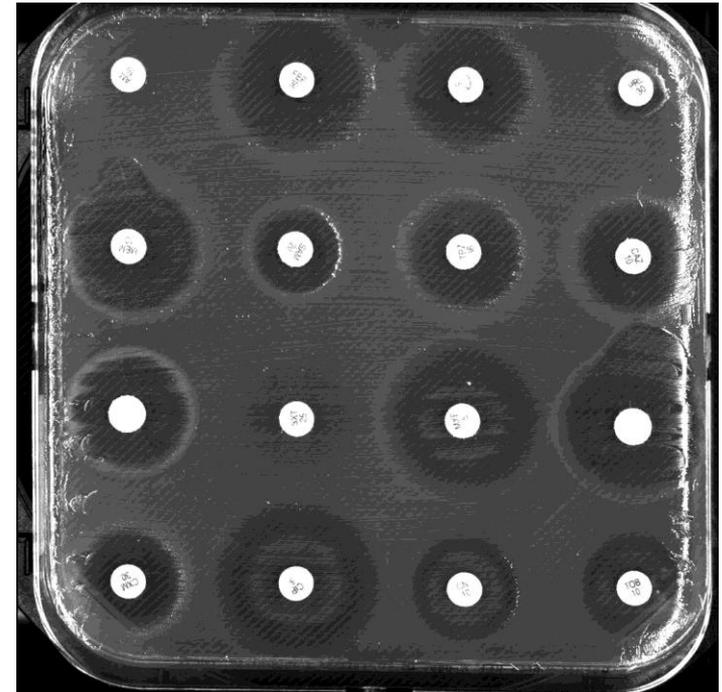
Arbeitsablauf in der Routine

- › Ein Ablesezeitpunkt 6h
- › Semiautomatische Inkubation + Ablesung

Testung von Routineproben (n=30)

Readability	95 %
Correct	89 %
mE	0,5 %
ME	0 %
VME	0,5 %
ATU*	9,9 %

* 73% Anteil von TZP



Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit

Philipp.Thelen@uk-koeln.de