



UNIKLINIK
KÖLN

CARL
VON
OSSIEZKY
universität OLDENBURG



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

31.01.2020 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*

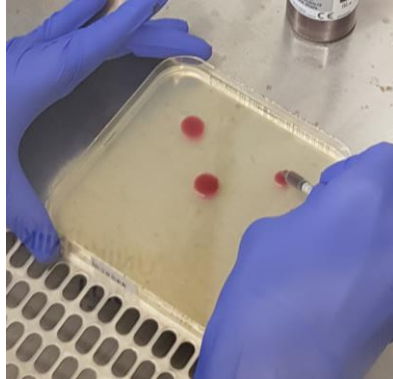
Screening Breakpoints (ESBL, Carbapenemasen)

- › *E. coli*, *K. pneumoniae*

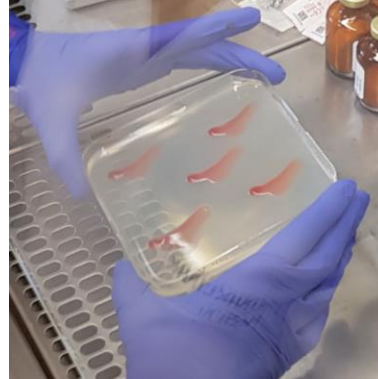
Inokulation und Inkubation



1. Positive BK
Gramfärbung
ID (MALDI-TOF)



2. 100 – 150 μ L BK
(runde 90 mm Platten)



3. Verteilen des
Materials



4. Vorsichtig auf
Platte ausstreichen

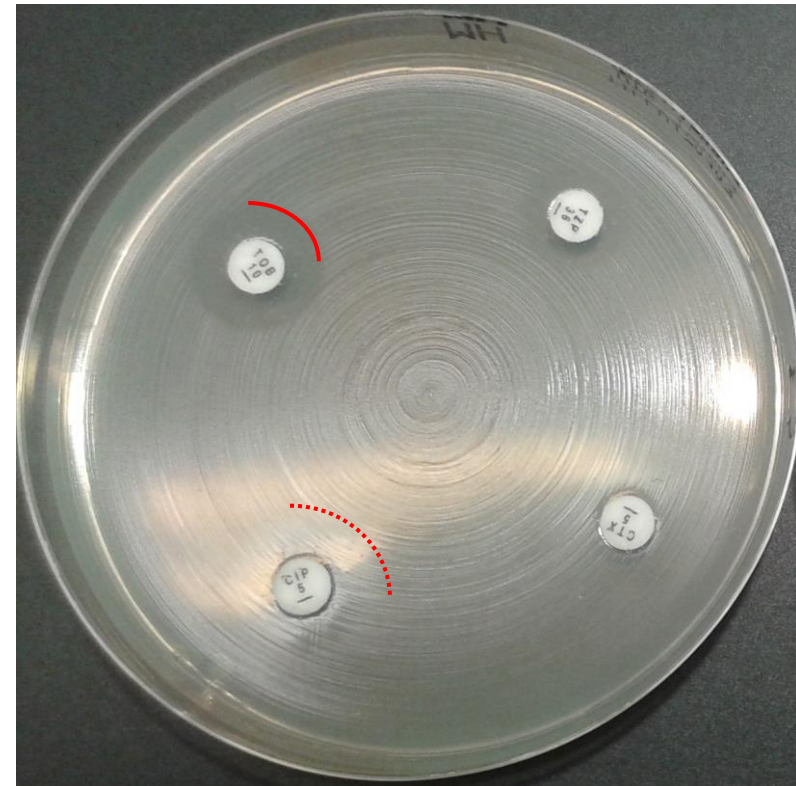
5. Antibiotikaplättchen auflegen

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

Ablesung der HHD

- › 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

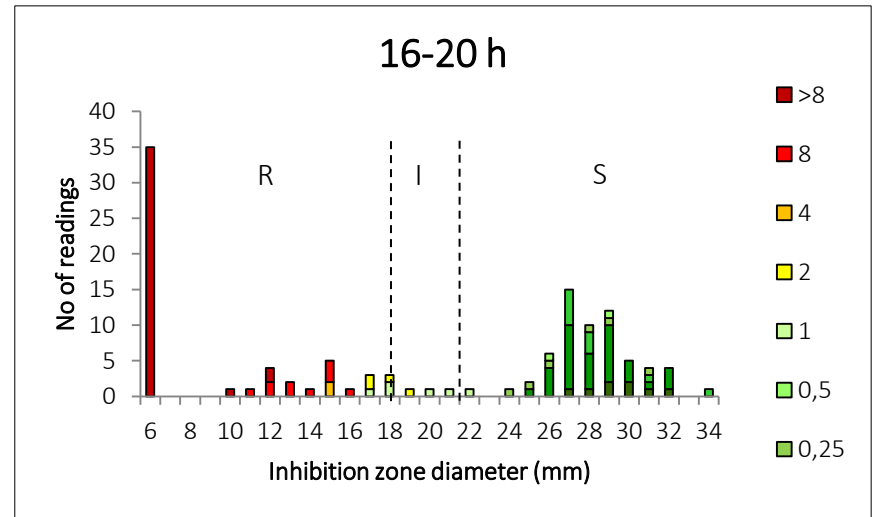
Zone diameter breakpoints for RAST directly from blood culture bottles

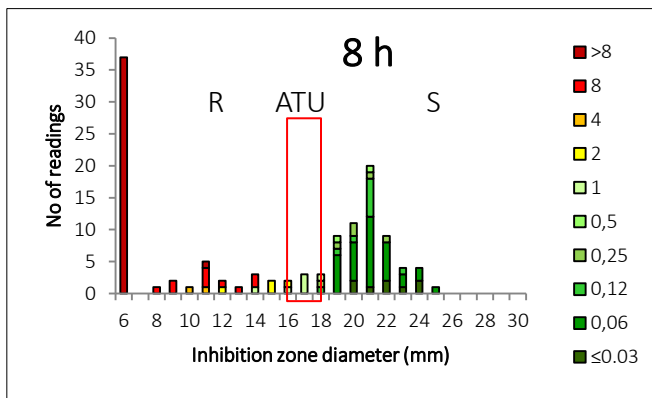
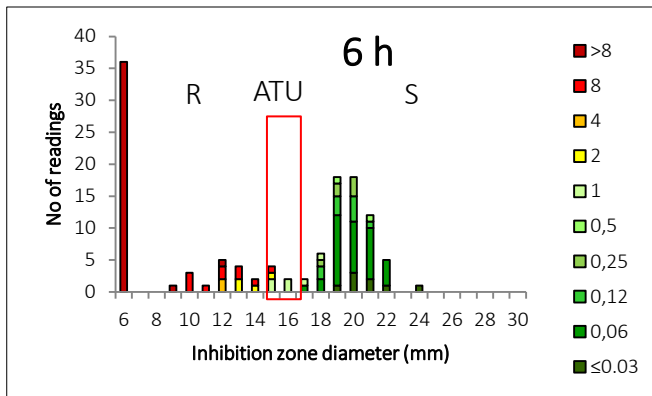
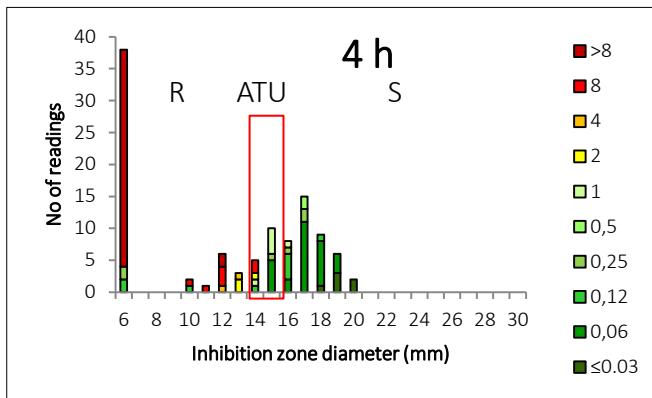
EUCAST rapid disk diffusion method directly from positive blood culture bottles
Medium: Mueller-Hinton (MH) agar
Inoculum: 125±25 µL directly from a positive blood culture bottle
Incubation: Air, 35±1°C
Incubation time: 4, 6 and 8 hours
Reading: Remove lid and read zone edges from the front against a 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

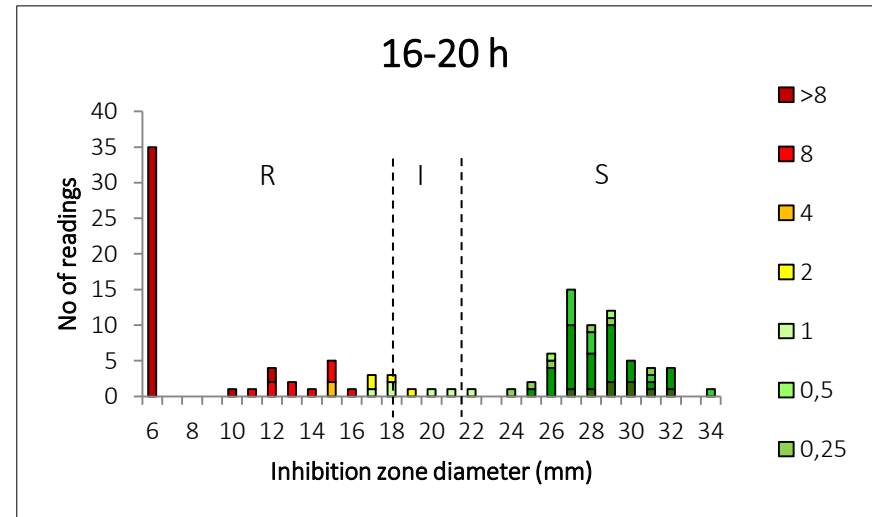
Warum neue Breakpoints

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





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

Zur Verfügung gestellt von Emma Jonasson,
Department of Clinical Microbiology,
Växjö, Växjö, Sweden

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

Emma Jonasson, ECCMID 2019, Abstract O0254

EUCAST rapid AST im Routinelabor

Rapid AST im Routinelabor

Für welche BK Flaschen

- › Bis 18h nach positivem Ergebnis
- › Bis zu 3h nach Entnahme

Keine Breakpoints für Spezies
=
KEINE Interpretation

Ablesen und Interpretation

- › ID unverzichtbar
- › Ablesung innerhalb des Zeitpunktes
- › Reinkubation innerhalb des Zeitpunktes
- › Interpretation nach dem Zeitpunkte
- › KEINE Inkubation > 8h

Endgültige Ergebnisse

Implementierung und Qualitätskontrollen

Implementierung / Änderungen im Procedere / Einarbeitung

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

Routine QC für Materialien

- › Standard Qualitätskontrollen nach EUCAST Agardiffusionsmethode

Persönliche Erfahrungen

Für welche Spezies benötigen wir rapid AST in unserem Setting?

Spezies

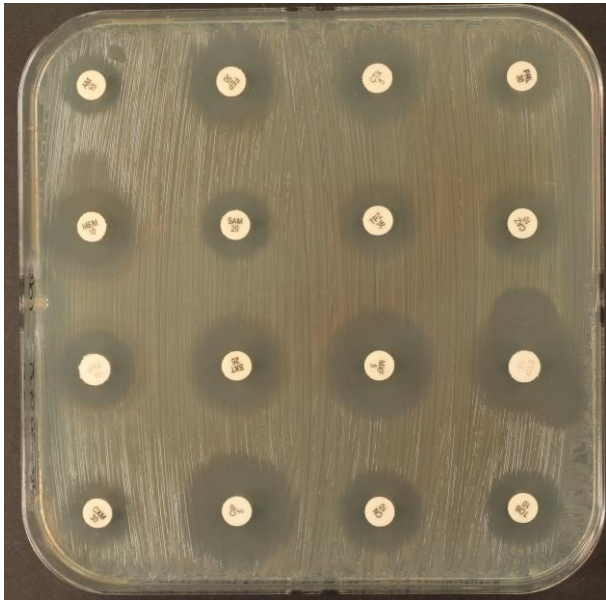
Escherichia coli

Klebsiella pneumoniae

Pseudomonas aeruginosa

Acinetobacter baumannii

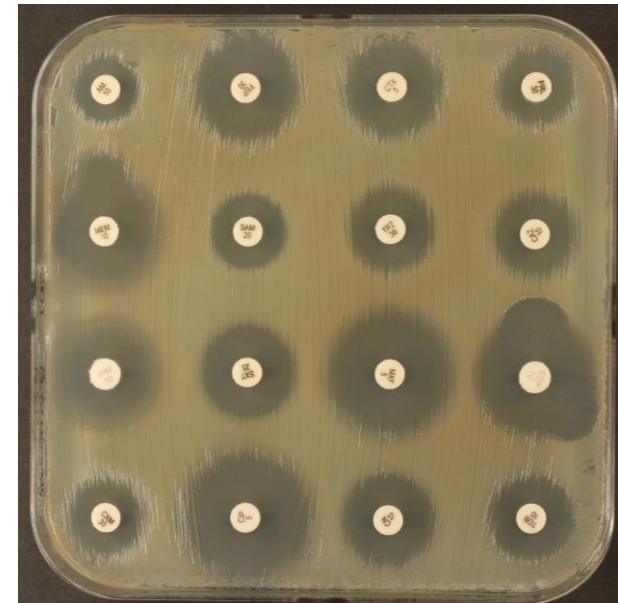
E. coli ATCC 25922



4h



6h



8h

Ergebnisse 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

Laboröffnungszeiten

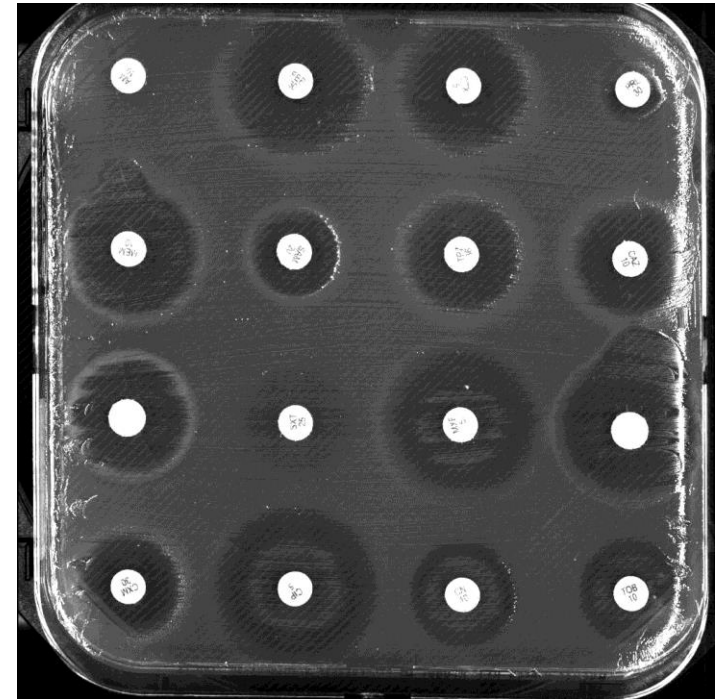
Mo-Fr 7:30 – 20:00

Sa 7:30 – 13:00

So 7:30 – 14:00

- › Ein Ablesezeitpunkt 6h
- › Semiautomatische Inkubation + Ablesung
- › rapid AST Mo.-Fr. 7:30 – 12:00
- › Kein rapid AST nach 12:00 Uhr und am Wochenende
- › 1x pro Episode einer BSI mit *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*

- › Start im Routinebetrieb August 2019



Performance rapid AST im Routinebetrieb Sep – Nov `19

BSI Episoden insgesamt	146
Proben im rAST Zeitfenster	56 (38%)
rAST durchgeführt	48 (33%)
Standard AST	98 (67%)
<hr/>	
Mo – Fr	56 (38%)
Wochenende	42 (27%)

<i>E. coli</i>	33 (69%)
<i>K. pneumoniae</i>	8 (17%)
<i>P. aeruginosa</i>	6 (13%)
<i>A. baumannii</i>	1 (2%)

Readability	99 %
Correct	89 %
mE	0,5 %
ME	0 %
VME	0,5 %
ATU*	9,9 %

* 65% Anteil von TZP

Ausblick

- › Breakpoints für weitere Antibiotika in Planung

Ongoing work (to be finalised 2019-20):

- Interpretive criteria for more antibiotics than those currently available (2019-20).

- › weitere Spezies

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit

Philipp.Thelen@uk-koeln.de