

Novinky v oblasti bakteriologického vyšetření krve

Miroslava Htoutou Sedláková, Kateřina Bogdanová, Milan Kolář

Ústav mikrobiologie, Fakultní nemocnice Olomouc a Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

Identifikace etiologického agens v krvi je jedno z nejdůležitějších, ale zároveň nejdelších vyšetření v diagnostice bakteriálních infekcí. Klasický postup hemokultivace za použití automatizovaných přístrojů, identifikace z 24hodinové bakteriální kultury a stanovení kvantitativní citlivosti k antibiotikům trvá zhruba 3–5 dní. V posledních letech byly implementovány do praxe nové metody umožňující identifikaci bakteriálního původce a stanovení citlivosti/rezistence k antibiotikům, včetně detekce genů rezistence pomocí amplifikačních technik, přímo z pozitivních hemokultivačních lahvíček. Tyto metody umožňují výrazně zkrátit čas od odběru krve do hlášení výsledku a současně aplikaci cílené antibiotické terapie. Předložený přehledový článek má za cíl seznámit klinické lékaře s novinkami v oblasti bakteriologického vyšetření krve používanými v rutinní mikrobiologické praxi.

Klíčová slova: hemokultury, MALDI-TOF MS, přímá identifikace.

Recent developments in blood bacteriological testing

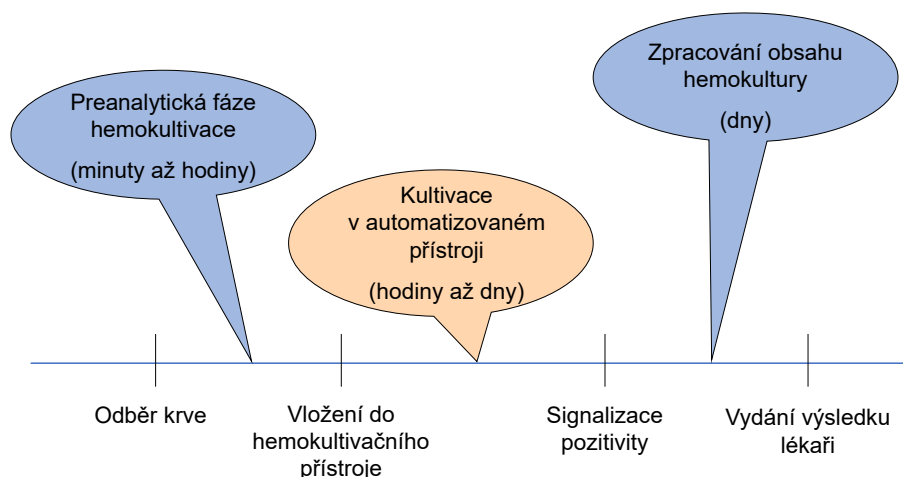
Identifying the etiological agent in blood is one of the most crucial yet time-consuming investigations in diagnosing bacterial infections. The conventional approach of blood culture utilizing automated systems, followed by identification from a 24-hour bacterial culture and determination of quantitative antibiotic susceptibility, typically takes about 3–5 days. However, in recent years, new methods have been implemented in practice, enabling the identification of bacterial pathogens and the determination of sensitivity/resistance to antibiotics, including the detection of resistance genes through amplification techniques directly from positive blood culture bottles. These methods significantly reduce the turnaround time from blood collection to result reporting, while also facilitating the application of targeted antibiotic therapy. The presented review article aims to acquaint clinical physicians with the latest advancements in the field of blood bacteriological testing.

Key words: blood cultures, MALDI-TOF MS, direct identification.

Rychlá a správná identifikace bakteriálních patogenů z krve je jedním z nejdůležitějších vyšetření u pacientů se sepsí či infekcí krevního řečiště. Standardní postup detekce bakterií v krvi je závislý na kultivaci a z toho důvodu trvá bakteriologické vyšetření krve zhruba 3–5 dní (v případě pomalu rostoucích bakterií i déle). Hemokultivace se již 30 let provádí v automatizovaných systémech založených na detekci produktů metabolismu množících se bakterií v hemokultivačních lahvíčkách. Lahvičky s médiem jsou dodávány výrobcem automatizovaných systémů a jsou určeny pro aerobní a anaerobní kultivaci bakterií. Množství bakterií v krvi při bakteriemii je velmi malé a kolísá mezi 1–10 CFU (colony forming unit)/ml (1). Proto je potřeba množství bakterií zvýšit pomnožením a hemokultivace tak zůstává zlatým standardem,

především pro možnost získání živého mikrobiálního agens, které je možné dále testovat.

Klasická cesta hemokultivace začíná odběrem krve do hemokultivačních lahvíček, pokračuje vložením do automatizovaného hemokultivačního přístroje, ve kterém probíhá kultivace do zaznamenání metabolické aktivity uvnitř lahvičky, maximálně však 5 dnů při teplotě $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Bylo prokázáno, že 97 % klinicky významných bakterií je detekováno během prvních tří dnů hemokultivace a další 3 % během 4. a 5. dne (2). Prodloužení inkubace v automatizovaných systémech na více než 5 dní nezvýšilo zachytnost ani u náročných bakterií skupiny HACEK (*Haemophilus* sp., *Aggregatibacter* sp., *Cardiobacterium* sp., *Eikenella* sp., *Kingella* sp.) (3–5). Lahvičky bez detekce bakteriálního růstu jsou po

Obr. 1. Standardní postup bakteriologického vyšetření krve

5 dnech hlášeny jako negativní. V případě množení bakterií vyhodnotí sofistikovaný software hemokultivačního přístroje pozitivitu na základě nárůstu hladiny CO_2 . Pozitivní lahvičky jsou po vyjmutí z automatizovaného systému dále zpracovávány, resp. je provedeno mikroskopické vyšetření dle Grama, vyočkování na pevné kultivační půdy a provedena disková difúzní metoda pro stanovení orientační citlivosti k antibiotikům. Identifikace pomocí systému MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry) je provedena z čisté kultury po 16–24 hodinách od signalizace positivity. Definitivní antibiogram s minimálními inhibičními koncentracemi (MIC) je k dispozici za 48 hodin od signalizace positivity. Schéma celého procesu je uvedeno na obrázku 1. Po celou tuto dobu (tj. od odběru hemokultury do vydání definitivního výsledku, včetně kvantitativního antibiogramu) jsou pacienti s bakteriální infekcí léčeni antibiotiky dle zásad antibiotic stewardship, nicméně se nejedná o léčbu cílenou na daného původce (6). Je zde tedy riziko, že pacient je po tuto dobu léčen antibiotikem, na které je bakteriální původce infekce rezistentní, což zvyšuje morbiditu i mortalitu. Z uvedených důvodů je velmi žádoucí urychlit detekci a identifikaci bakteriálních patogenů v krvi a stanovení jejich citlivosti/resistence k antibiotikům, což umožní časnou cílenou antibiotickou léčbu. V tomto článku jsou prezentovány nové technologické i organizační možnosti zrychlení bakteriologického vyšetření krve v současné moderní mikrobiologické praxi.

Odběr krve pro hemokultivaci

Krev pro hemokultivaci by měla být odebrána za přísně sterilních kautel z periferní žíly nebo nově zavedeného centrálního žilního katétru před zahájením antibiotické léčby. Podle recentních znalostí není potřeba respektovat výši tělesné teploty (u septických pacientů se může vyskytnout hypotermie, teplota může být zkreslena podáním antipyretik, starší pacienti mnohdy nejsou schopni vyvinout febrilie atd.) (7). Hemokultivace je indikována při klinickém podezření na systémovou bakteriální infekci, včetně sepse, při pozitivních laboratorních markerech (vysoké CRP, prokalcitonin, leukocytóza nebo leukopenie) a zimnicích či třesavkách, které korelují se vstupem agens do krevního řečiště. Při intermitentních (sub)febrilích není

potřeba čekat na vzestup teploty a teplotní špičku, odběr by měl být proveden bezprostředně po vyslovení podezření na sepsi či infekci krevního řečiště (8).

Pro senzitivitu hemokultivace je zcela zásadní celkový objem odebrané krve, který by měl u dospělého pacienta činit 40–60 ml. Vzhledem k tomu, že se do jedné hemokultivační lahvičky pro dospělé pacienty odebírá 10 ml krve (popřípadě dle doporučení výrobce), znamená tento požadavek nutnost vyšetřit 4–6 hemokultivačních lahviček. Při hemokultivaci pouze jednoho páru lahviček (tj. 20 ml krve) činí senzitivita 73 %, dvou párů (40 ml) 90 % a tří párů (60 ml) dosahuje senzitivita 98 % (9). Proto je odběr a zaslání pouze jednoho páru lahviček (tzv. orphan blood culture – sirotčí hemokultura) zcela nedostačující. Stále více je doporučována strategie tzv. single-sample strategy (SSS), kterou lze charakterizovat jako jednorázový odběr požadovaného množství krve (tj. 4–6 lahviček) z jedné venepunkce najednou (8). Uvedení této strategie do praxe bylo podpořeno poznatkem, že při sepsi je bakteriémie kontinuální (i když s kolísajícím množstvím bakteriálních buněk v krvi) a není významný rozdíl ve vztahu k teplotě během 24 hodin (10). Není tedy důvod odebírat páry hemokultur odděleně v časových intervalech. Výhody této strategie jsou zřejmé: snížení zatížení personálu i pacienta nutností opakovat odběry, menší riziko kontaminace, zajištění požadovaného množství krve před nasazením antibioterapie a zabránění odebrání pouze orphan blood culture. Poslední dva argumenty se ukazují být velmi relevantní, protože v rutinní praxi se právě v těchto aspektech často chybí. Z klinických oddělení je mnohdy zaslán jen jeden pár hemokultur, což je zcela nedostačující objem krve s nízkou senzitivitou následného hemokultivačního vyšetření. U orphan blood culture je rovněž problematická interpretace při pozitivním záchytu agens patřící do kožní mikroflóry (typicky koaguláza-negativní stafylokoky, např. *Staphylococcus epidermidis*), protože chybí další lahvičky k potvrzení nebo vyloučení kontaminace při odběru. Pokud jsou zaslány druhý a třetí pár hemokultur, pak tyto jsou často odebírány při nasazené antibioterapii (vzhledem k požadavku nasazení antibiotik u septických pacientů co nejdříve, resp. do 1 hodiny), nebo se naopak zpožďuje nasazení antibioterapie kvůli odběru dalších párů lahviček s časovým odstupem.

Zkrácení doby od odběru hemokultury do vložení do hemokultivačního přístroje

Je běžné, že mikrobiologické laboratoře nepracují v non-stop režimu. Jejich provoz je přizpůsoben běžné pracovní době nemocnic a v době pohotovostního režimu nejsou k dispozici. Z toho vyplývá, že pokud je hemokultura odebrána v době, kdy mikrobiologická laboratoř není v provozu, musí lahvičky být uchovány v pokojové teplotě (podle instrukcí výrobce) do doby, než je laboratoř převezme ke kultivaci. Pokud má laboratoř pracovní dobu 7:00–16:00, pak se může stát, že hemokultura čeká na vložení do automatizovaného hemokultivačního přístroje až 15 hodin. Tento problém řeší tzv. satelitní moduly hemokultivačních přístrojů, které jsou umístěny na oddělení v non-stop (24/7) režimu. Zde proběhne příjem hemokultur, vložení lahviček do satelitního modulu a v čase otevření mikrobiologické laboratoře se lahvičky transportují na mikrobiologii (ty, které jsou již detekovány jako pozitivní, jsou dále zpracovávány, negativní jsou opět vloženy do hemokultivačního automatizovaného přístroje). Satelitní moduly ovšem neřeší zkrácení doby od signalizace positivity do zpracování pozitivní hemokultury. Tuto část hemokultivačního vyšetření je schopen provádět pouze vyškolený personál mikrobiologických laboratoří. Tento problém by mohl být vyřešen zavedením non-stop režimu mikrobiologických pracovišť. Podle recentně provedené studie zkoumající, mimo jiné, i pracovní dobu 870 nemocničních mikrobiologických laboratoří a její dopad na hlášení výsledků hemokultur je režim 24/7 zaveden pouze v 12 % evropských laboratoří (11). Podíl laboratoří, které mají non-stop pracovní dobu, je větší (13 %) v případě velkých nemocnic (> 1 000 lůžek) ve srovnání s menšími nemocnicemi (0–250 lůžek), kde tento podíl činí 9 %. Z výsledků vyplývá, že výrazně větší procentuální podíl laboratoří schopných hlásit první výsledek hemokultivace (např. výsledek mikroskopie) do 24 hodin je v režimu 24/7 než u laboratoří s limitovanou pracovní dobou (70 % vs. 49 %, $p < 0,001$) (11). V rámci současné mikrobiologie lze spatřovat trend směrem k zavádění nepřetržitého provozu, neboť přes všechny moderní technologické pokroky se okamžité zpracovávání vzorků a neodkladné hlášení výsledků jeví jako základní a nenahraditelná část mikrobiologického vyšetření.

Přímá detekce bakteriálních agens z plné krve („by-pass“ hemokultivace)

Jako nejrychlejší metoda se nabízí detekce a identifikace bakteriálního původce přímo z plné krve. Problém této metody spočívá v relativně velmi nízké kvantitě bakteriálních buněk v odebraném vzorku. Každý mililitr infikované krve obsahuje asi $4\text{--}6 \times 10^9$ červených krvinek, až $1,6 \times 10^7$ bílých krvinek a $1,3\text{--}4 \times 10^8$ krevních destiček, ale pouze 1 až 10 živých bakteriálních buněk, což výrazně snižuje pravděpodobnost záchytu etiologického agens (1). V poslední dekádě byly vyvinuty nové generace diagnostických přístrojů a postupů bez předchozí kultivace. Nejvíce diskutovaným systémem je T2MR (T2Biosystem, USA), založený na kombinované technologii PCR a miniaturizované magnetické rezonanci. T2MR dokáže rychle a přesně identifikovat určité molekulární cíle v různých biologických materiálech pacientů (plná krev, plazma, sérum, sliny, sputum a moč) bez potřeby čištění nebo extrakce cílových molekul. Výhodou je nízký detekční práh (2–11 CFU/ml), vysoká senzi-

tivita a specifita, rychlost provedení (3,5 hodiny), plná automatizace a non-interference s případnou aplikovanou antibiotickou léčbou. Nevýhodou je zatím omezené spektrum bakteriálních species zahrnující *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli* (resp. ESKAPE patogeny) a vysoká cena pořízovacích i provozních nákladů. Vzhledem k tomu, že kromě identifikace bakteriálního původce je potřeba získat informaci o citlivosti k antibiotikům, není tato metoda schopna nahradit stávající standardní postup vyšetření hemokultur. Nicméně je možným doplňkem, kterým se výrazně zkrátí doba od odběru do identifikace bakteriálního agens. Bylo prokázáno, že implementace T2MR do postupu bakteriologického vyšetření krve snížilo dobu potřebnou k druhové identifikaci průměrně o 55 hodin (12). Průměrný čas od přijetí vzorku do identifikace byl 6,1 hodin ($SD \pm 5,4$), zatímco při použití standardního postupu založeného na hemokultivaci a následné kultivaci činil 62 hodin ($SD \pm 54$) ($p = 0,001$) (12). Z publikovaných zkušeností s tímto systémem vyplývá, že T2MR byl schopen identifikovat etiologické agens z krve u velkého počtu pacientů, u kterých byla hemokultivace negativní (12–13). To odpovídá obecným poznatkům demonstrujícím skutečnost, že senzitivita hemokultur se snižuje o 50 % po zahájení antibiotické terapie (14). Tento automatizovaný identifikační systém se zdá být vhodnou metodou „point-of-care“, tj. umístění přímo na klinickém oddělení s možností okamžitého provedení ošetřujícím personálem bez přítomnosti klinického mikrobiologa. Je však nutné zdůraznit nezbytnost paralelního hemokultivačního vyšetření standardním postupem z důvodů uvedených výše. Další systémy pro identifikaci bakteriálních agens z plné krve bez předchozí kultivace jsou většinou založeny na principu kvantitativní PCR v reálném čase v kombinaci s dalšími technikami (systém Magicplex™ SeeGene, Korea, systém VYOO®, SIRS-Lab GmbH, Germany a systém LightCycler SeptiFast Test MGRADE® Roche Diagnostics, Switzerland), hmotnostní spektrometrie založené na elektrostatickém ionizačním letu (Electrospray Ionization Flight of Mass Spectrometry) (Iridica BAC BSI assay Abbott Diagnostics, USA), širokospektrální 16S a 18S rRNA PCR a sekvenční analýze bakterií (SepsitTest™ Molzym, Germany), případně na bázi mikročipů (CubeDx GmbH, Austria). Některé však nenašly uplatnění v rutinní mikrobiologické praxi kvůli nízké senzitivitě a příliš vysoké ceně, takže vývoj a zavádění rychlých diagnostických metod z plné krve zůstává nadále velkou výzvou.

Přímá detekce bakteriálních agens z pozitivních hemokultivačních lahviček

Před několika lety byla do klinické mikrobiologie zavedena nová technologie MALDI-TOF MS, která je využívána pro rychlou identifikaci bakterií a dále také hub, virů a některých parazitů. Metoda je založena na hmotnostní spektrofotometrii nabitých částic (proteinů), které vzniknou po laserové desorpci/ionizaci malého množství materiálu (pro představu stačí bakteriální kolonie nabraná na špičku párátko) v přítomnosti chemické substance nazývané matrice. Výsledkem je získání hmotnostního spektra charakteristického pro daný druh (peptide mass fingerprint – „otisk prstu“). Identifikace probíhá porovnáním tohoto spektra s existující databází (např. komerční platformy MALDI BioTyper

nebo VITEK®MS), které jsou neustále aktualizované. Identifikace bakterií pomocí MALDI-TOF nemusí probíhat pouze z vykultivovaných bakterií, ale přímo v klinických materiálech od pacientů. Kromě hemokultur lze identifikovat bakterie i v likvoru (u hnisavé meningitidy), nebo v moči. MALDI-TOF nachází stále další uplatnění, například v detekci specifických mechanismů rezistence a v rámci klinické epidemiologie, kde umožňuje nahradit drahé a složité metody jako MLST (multilokusová sekvenční typizace) nebo pulzní gelová elektroforéza (15, 16).

Metoda MALDI-TOF zkracuje identifikaci bakterií ve srovnání s dříve používanými biochemickými testy o 24 hodin. Standardně je pro identifikaci agens z hemokultur ovšem nutné vyočkovat krev z pozitivní hemokultivační lahvičky na pevné půdy a identifikaci provést až za 24 hodin z čisté bakteriální kultury. Pro zrychlení diagnostiky z krve byly vyvinuty komerční kity i „in-house“ metody, které umožňují identifikaci pomocí MALDI-TOF MS přímo z pozitivní hemokultury bez výše uvedeného mezikroku (17–23). Tím se zkrátí doba nutná pro identifikaci až o 24 hodin (o 48 hodin v porovnání s biochemickými testy). Včasná identifikace agens je zásadní z hlediska posouzení adekvátnosti již nasazené antibiotické terapie. Tím, že je species identifikováno výrazně dříve, než tomu bylo doposud, je umožněna změna případné neadekvátní antibiotické terapie na základě znalosti primární rezistence detekované bakterie k antibiotikům téměř o 24 hodin dříve. Díky včasné identifikaci je možné rovněž aplikovat metody pro detekci genů rezistence nebo rychlé stanovení bakteriální citlivosti k antibiotikům přímo z pozitivních hemokultivačních lahviček, což má pro pacienty se závažnými bakteriálními infekcemi zásadní význam.

Detekce genů rezistence z pozitivních hemokultivačních lahviček

Díky novým automatizovaným systémům je možné zavést amplifikační metody (PCR, loop-mediated isothermal amplification (LAMP)) pro detekci genů rezistence přímo z pozitivních hemokultivačních lahviček do celkového algoritmu vyšetření hemokultur a rychle získat představu o přítomnosti/absenci genů rezistence v bakteriálním genomu. Výhodou těchto vyšetření je vysoká senzitivita, snadné provedení a rychlý výsledek (30 minut až dvě hodiny). Limitacemi bývá vysoká cena, požadavek na specifické přístrojové vybavení a omezený počet detekčních cílů v daném komerčním kitu. Nejčastěji detekovanými geny jsou *mecA* a *mecC* zodpovědné za fenotyp MRSA (methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*), *vanA* a *vanB* zodpovědné za fenotyp VRE (vancomycin-rezistentní enterokok), geny pro karbapenemázy (IMP, KPC, OXA, NDM, VIM) a širokospektré beta-laktamázy ESBL (CTX-M), případně plazmidově přenositelný gen pro rezistenci ke kolistinu (*mcr-1*). Přestože je ve většině případů tato znalost přínosná pro případnou úpravu iniciační terapie, mohou nastat situace, kdy reálný fenotyp neodpovídá prokázanému genotypu. Příkladem může být tichý gen (tj. gen s mutací, která zapříčiní jeho nefunkčnost, resp. zabrání expresi), v tomto případě se očekávaný fenotyp rezistence nepotvrdí. Horší variantou je, pokud gen detekován není, ale bakterie je fenotypově rezistentní (rezistence je způsobena jinými mechanismy nebo je způsobena odlišným genem/variantou genu, který není detekován). Proto je kromě vyšetření genů rezistence nezbytné vždy provést fenotypové vyšetření a získání antibiogramu s hodnotami MIC jednotlivých antibiotik.

Významnou výhodou těchto genetických metod je možnost kombinace různých detekčních cílů v jedné reakci, čehož se využívá pro současnou identifikaci bakteriálního species a genů rezistence. Jako příklad lze uvést komerční sady eazyplex® BloodScreen (AmplexDiagnostics GmbH, Austria) pro detekci 4 grampozitivních nebo 5 gramnegativních bakterií v kombinaci vždy se 2 geny rezistence, nebo BioFire BCID2 Panel (bioMérieux, France) s 43 detekčními cíli zahrnujícími gramnegativní i grampozitivní bakterie, kvasinky a 10 genů rezistence. Výsledek těchto metod je k dispozici za 0,5–2 hodiny podle rozsahu spektra detekčního kitu.

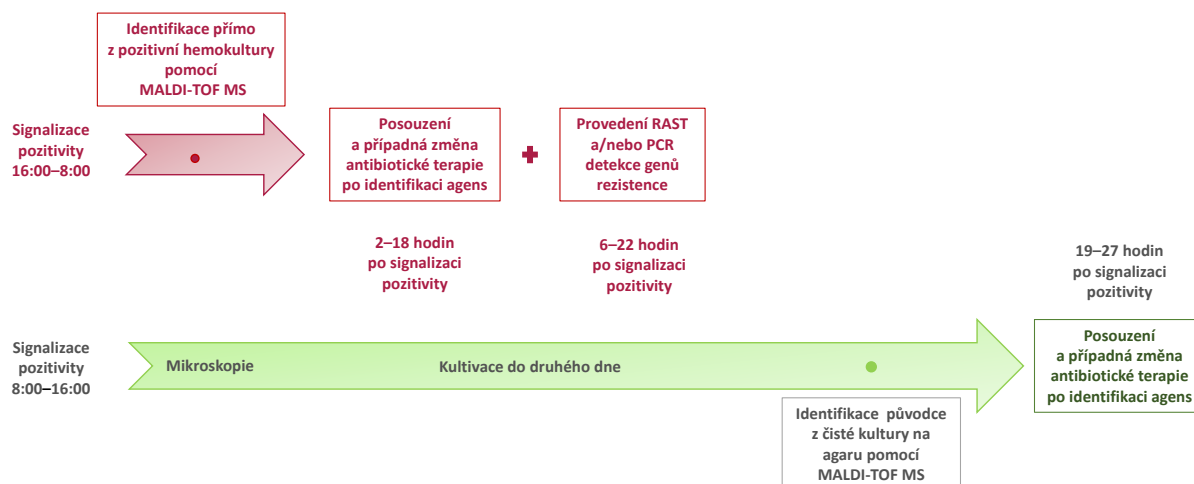
Rychlé stanovení bakteriální citlivosti k antibiotikům z pozitivních hemokultivačních lahviček

Klasickými metodami testování citlivosti k antibiotikům (diluční mikrometodou, E-testem či agarovou diskovou metodou) je získán antibiogram za 16–24 hodin. V současnosti existují možnosti, jak toto vyšetření urychlit a výsledek mít k dispozici do několika hodin od signalizace positivity hemokultivační lahvičky. Jako nejjednodušší a nejlevnější se jeví metoda publikovaná v roce 2019 Evropskou komisí pro testování bakteriální citlivosti k antibiotikům (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST). Jedná se o rychlé testování přímo z hemokultivačních lahviček pod zkratkou RAST (Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing) (24). RAST je klasická disková difuzní metoda, která se odečítá za 4, 6 a 8 hodin od rozetření vzorku krve z pozitivní lahvičky na povrch kultivačního agaru a aplikace antibiotických disků. Pro daný bakteriální druh a konkrétní antibiotikum jsou v uvedených časových intervalech stanoveny hraniční hodnoty inhibičních zón (s dobou odečítání se mění), které umožní daný bakteriální kmen interpretovat jako citlivý nebo rezistentní. Aktuálně je RAST metoda definována pro 8 významných bakteriálních druhů (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* a *Streptococcus pneumoniae*) a vybraná antibiotika, nicméně jsou to právě agens, která jsou nejvýznamnějšími původci infekcí krevního řečiště a sepsí (25–28).

Dalšími možnostmi jsou automatizované a semiautomatizované systémy na principu časosběrné detekce morfologických, kinetických, případně metabolických změn bakteriálních buněk v prostředí antibiotik. Detekce může být provedena mikroskopií v temném poli, fluorescenční průtokovou cytometrií, pomocí plastových mikročipů, biosenzorů atd. (29). Antibiogramy lze u těchto metod získat za 1,5–7 hodin, limitacemi jsou nutnost pořízení speciálního přístrojového vybavení a vyšší cena jednotlivého vyšetření.

Racionalizace hemokultivačního vyšetření v rutinní praxi

Mikrobiologická pracoviště využívají některé z výše uvedených metod jako doplnění ke klasickému hemokultivačnímu vyšetření. Cílem je předat ošetřujícímu lékaři výsledek identifikace bakteriálního původce a jeho citlivost/rezistenci k antibiotikům co nejrychleji. Jako příklad implementace moderních metod do klasického postupu hemokultivace může sloužit algoritmus Ústavu mikrobiologie Fakultní nemocnice

Obr. 2. Příklad racionálního algoritmu bakteriologického vyšetření krve v rutinní mikrobiologické praxi

Olomouc, kde jsou používány nové a rychlé metody tak, aby bylo dosaženo co nejrychlejších a nejsprávnějších výsledků za co nejnižší finanční náklady. Především je uspišen začátek kultivace používáním satelitního hemokultivačního modulu ve spolupráci s Oddělením klinické biochemie, které je v non-stop provozu a je schopno přijímat hemokultivační lahvičky mimo pracovní dobu Ústavu mikrobiologie. Tím je ušetřeno až 15 hodin mezi okamžikem odběru a začátkem hemokultivace. Z tohoto oddělení jsou všechny lahvičky předány mezi sedmou a osmou hodinou ránní na Ústav mikrobiologie. Všechny pozitivní lahvičky (ze satelitního i domácího hemokultivačního přístroje) se ráno začnou zpracovávat standardními postupy (mikroskopie dle Grama, inokulace na pevné kultivační půdy, kultivace do druhého dne, identifikace původce z čisté kultury na agaru, testování citlivostí k antibiotikům z čisté kultury diluční mikrometodou, příp. E-testy) a navíc proběhne přímá identifikace z hemokultivační lahvičky pomocí MALDI-TOF MS, která je hotová do 45 minut. Výsledek této rychlé identifikace je sdělen ošetřujícímu lékaři v rámci konzultační činnosti Antibiotického střediska. V případě aplikace antibiotika, ke kterému je identifikovaný původce přirozeně rezistentní, je nutné změnit antibiotickou terapii. Navíc lze díky této včasné identifikaci provést rychlé metody testování citlivosti k antibiotikům, konkrétně RAST, k jejíž interpretaci je nutné znát bakteriální druh. U indikovaných pacientů (zejména pacienti v závažném stavu) je provedeno i vyšetření genů rezistence pomocí molekulárně-biologických amplifikačních metod. Tato vyšetření jsou hotová během pracovní doby a jejich výsledek, pokud je významný z hlediska antibiotické léčby, je okamžitě konzultován s ošetřujícím lékařem. Tímto postupem jsou kritické výsledky zprostředkovány ošetřujícím lékařům o 24–48 hodin dříve, než při standardním hemo-

kultivačním vyšetření. Algoritmus bakteriologického vyšetření krve je zobrazen na obrázku 2, z něhož vyplývá, že lahvičky označené jako pozitivní v době 8:00–16:00 jsou zpracovávány okamžitě. Lahvičky, které jsou označeny jako pozitivní mimo pracovní dobu, tj. 16:00–8:00, musí sice čekat na zpracování do zahájení provozu laboratoře, nicméně tato časová prodleva je vykompenzována provedením rychlých metod identifikace a testů citlivosti k antibiotikům. Po implementaci nové metody identifikace přímo z pozitivních hemokultivačních lahviček pomocí MALDI-TOF MS došlo ke zkrácení doby od signalizace pozitivita do hlášení identifikace bakteriálního species lékařům na 3–16 hodin, na rozdíl od standardní procedury, kdy hlášení identifikovaného species proběhne za 19–27 hodin (30). Výzvou do budoucna je zajištění okamžitého zpracovávání pozitivních lahviček v režimu 24/7 tak, aby kritické výsledky hemokultivačního vyšetření byly předávány ošetřujícím lékařům do 1–6 hodin od signalizace pozitivita.

Závěr

Nové metody a technologie, které má klinická mikrobiologie v současnosti k dispozici, jsou velmi významné, až převratné, ve správnosti, citlivosti a rychlosti, s jakou jsou schopny stanovit bakteriálního původce infekce. Nicméně samy o sobě nejsou schopny plnit očekávání, jaká jsou do nich vkládána. Jejich potenciál může být využit teprve v komplexním přístupu začínajícím správným odběrem klinického materiálu, pokračujícím adekvátním výběrem a včleněním nových metod do diagnostického algoritmu a končícím kvalitní interpretací a bezodkladným hlášením výsledků, včetně posouzení probíhající antibiotické léčby. Teprve tímto komplexním přístupem mohou tyto novinky přinést skutečný přínos pro pacienty.

PROHLÁŠENÍ AUTORŮ: Prohlášení o původnosti: Publikace byla zpracována s využitím uvedené literatury a nebyla publikována ani zaslána k recenznímu řízení do jiného média. **Střet zájmů:** Žádný. **Financování:** Podpořeno Projektem Národního ústavu virologie a bakteriologie (program EXCELES, ID: LX22NPO5103, financováno Evropskou unií – Next Generation EU), projekty RVO FNOL 00098892, IGA LF_2024_034 a AZV NU22-B-112. **Poděkování:** N/A. **Registrace v databázích:** N/A. **Projednání etikou komisí:** N/A.

LITERATURA

- Opota O, Jaton K, Greub G. Microbial diagnosis of bloodstream infection: towards molecular diagnosis directly from blood. Clin Microbiol Infect. 2015;21:323-331.
- Bourbeau PP, Foltzer M. Routine incubation of BacT/ALERT FA and FN blood culture bottles for more than 3 days may not be necessary. J Clin Microbiol 2005;43(5):2506-9.

3. Wilson ML, Weinstein MP, Reinier LG, et al. Controlled comparison of the BacT/Alert and BACTEC 660/730 nonradiometric blood culture systems. *J Clin Microbiol.* 1992;30:323-9.
4. Baron EJ, Scott JD, Tompkins LS. Prolonged incubation and extensive subculturing do not increase recovery of clinically significant microorganisms from standard automated blood cultures. *Clin Infect Dis.* 2005;41:1677-1680.
5. Petti CA, Bhally HS, Weinstein MP, et al. Utility of extended blood culture incubation for isolation of *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, and *Kingella* organisms: a retrospective multicenter evaluation. *J Clin Microbiol.* 2006;44:257-259.
6. Kolar M, Htoutou Sedlakova M, Urbanek K, et al. Implementation of Antibiotic Stewardship in a University Hospital Setting. *Antibiotics.* 2021;10(1):93.
7. Riedel S, Bourbeau P, Swartz B, et al. Timing of specimen collection for blood cultures from febrile patients with bacteremia. *J Clin Microbiol.* 2008;46(4):1381-5.
8. Lamy B, Dargère S, Arendrup MC, et al. How to Optimize the Use of Blood Cultures for the Diagnosis of Bloodstream Infections? A State-of-the-Art. *Front Microbiol.* 2016;12(7):697.
9. Lee A, Mirrett S, Reller LB, Weinstein MP. Detection of Bloodstream Infections in Adults: How Many Blood Cultures Are Needed? *J Clin Microbiol.* 2007;45:3546-3548.
10. Li J, Plorde JJ, Carlson LG. Effects of volume and periodicity on blood cultures. *J Clin Microbiol.* 1994;32:2829-2831.
11. Scheer C, Idelevich EA, Annane D, et al. Reported time to blood culture results in hospitals with 24/7 microbiological service compared to hospitals with limited microbiological service: results from an international survey in 870 hospitals. *ECCMID 2023.*
12. Drevinek P, Hurych J, Antuskova M, et al. Direct detection of ESKAPEc pathogens from whole blood using the T2Bacteria Panel allows early antimicrobial stewardship intervention in patients with sepsis. *Microbiologyopen.* 2021;10(3):e1210.
13. Salar-Vidal L, Fernández-Roblas F, Gadea-Gironés I, et al. T2 magnetic resonance for selected adult patients: experience in a tertiary hospital with sepsis code. *ECCMID 2023.*
14. Cheng MP, Stenstrom R, Paquette K, et al. Blood culture results before and after antimicrobial administration in patients with severe manifestations of sepsis: A diagnostic study. *Ann of Intern Med.* 2019;171(8):547-554.
15. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol.* 2015;6:791.
16. Torres-Sangiao E, Leal Rodriguez C, García-Riestra C. Application and Perspectives of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Microbiology Laboratories. *Microorganisms.* 2021;9(7):1539.
17. Morgenthaler NG, Kostrzewa M. Rapid identification of pathogens in positive blood culture of patients with sepsis: review and meta-analysis of the performance of the sepsityper kit. *Int J Microbiol.* 2015;2015:827416.
18. Bazzi AM, Rabaan AA, El Edaily Z, et al. Comparison among four proposed direct blood culture microbial identification methods using MALDI-TOF MS. *J Infect Public Health.* 2017;10(3):308-15.
19. Azrad M, Keness Y, Nitzan O, et al. Cheap and rapid in-house method for direct identification of positive blood cultures by MALDI-TOF MS technology. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):72.
20. La Scola B, Raoult D. Direct Identification of Bacteria in Positive Blood Culture Bottles by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry. *PLoS One.* 2009;4(11):e8041.
21. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Muñoz-Bellido J et al. Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method. *Clin Microbiol Inf.* 2011;17(7):1007-1012.
22. Juiz P, Almela M, Melción C, et al. A comparative study of two different methods of sample preparation for positive blood cultures for the rapid identification of bacteria using MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011;31(7):1353-1358.
23. Yonetani S, Ohnishi H, Ohkusu K, et al. Direct identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF MS using an in-house saponin method. *Int J Infect Dis.* 2016;52:37-42.
24. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Methodology – EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from positive blood culture bottles. [cit. 2023-01-04] : Available from www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/RAST/2023/2023_June/EUCAST_RAST_Breakpoint_Table_v_6.1_final_PDF.pdf
25. Kreidl P, Kirchner T, Fille M, et al. Antibiotic resistance of blood cultures in regional and tertiary hospital settings of Tyrol, Austria (2006-2015): Impacts & trends. *PLoS ONE.* 2019;14(10):e0223467.
26. Karlowsky JA, Jones ME, Draghi DC, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibilities of bacteria isolated from blood cultures of hospitalized patients in the United States in 2002. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2004;10:3-7.
27. Wilson J, Elgohari S, Livermore DM, et al. Trends among pathogens reported as causing bacteraemia in England, 2004–2008. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:451-458.
28. Htoutou Sedláková M, Fišerová K, Kolář M. Původci bakteriemií ve Fakultní nemocnici Olomouc. *Klin mikrobiol inf lék.* 2020;26(1):4-11.
29. Banerjee R, Humphries R. Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing Methods for Blood Cultures and Their Clinical Impact. *Front Med. (Lausanne)* 2021;10(8):635831.
30. Fiserova K, Htoutou Sedlakova M, Kolar M. The impact of rapid blood cultures identification by MALDI-TOF MS technology. *ECCMID 2023*, the accepted abstract (Poster number P1564).