

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 okamžitě 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 specificita, 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 (SepsisTest™ 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