

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 časově 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