

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Přehled současných hemokultivačních technik v
laboratořích klinické mikrobiologie**

Miroslava Hošková

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2019

Poděkování

Ráda bych poděkovala RNDr. Kláře Konečné, Ph.D. za cenné rady a vstřícný přístup při psaní této práce. Děkuji také Ing. Ivě Šamšulové za odborné vedení a poskytnuté materiály. V neposlední řadě děkuji celé mé rodině a kolegyním na mém pracovišti za trpělivost a podporu při mém studiu.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 7. 5. 2019

Obsah

1. Abstrakt.....	6
2. Abstract.....	7
3. Úvod.....	8
4. Zadání - cíl práce	9
6. Základní pojmy.....	10
6.1 Bakteriémie	10
6.2 Fungémie.....	10
6.3 Infekce krevního řečiště	10
6.3 Sepse	11
7. Nejčastější původci infekcí krevního řečiště.....	12
8. Pokyny pro odběr hemokultury	12
8.1 Dezinfekce místa vpichu.....	12
8.2 Vlastní odběr	13
8.3 Transport do laboratoře.....	13
9. Hemokultivační systémy	14
9.1 Manuální hemokultivační systémy	14
9.1.1 Signal™ Blood Culture systém	14
9.2 Automatizované hemokultivační systémy	15
9.2.1 VersaTREK®	15
9.2.2 BD BACTEC™ FX.....	17
9.2.3 BacT/ALERT® 3D	18
9.3 Hemokultivační systémy a lahvičky - srovnání.....	20
10. Možnosti identifikace původců infekce izolovaných z krve.....	21
10.1 Biochemické testy	21
10.2 MALDI-TOF	22

10.2.1	Přímá identifikace z hemokultivační lahvičky.....	23
10.3	Systém Vitek® 2.....	24
10.4	FilmArray® Blood Culture Identification Panel	25
11.	Stanovení citlivosti na antibiotika.....	26
11.1	Rychlé vyšetření antimikrobní citlivosti přímo z hemokultivačních lahviček	27
12.	Základní pracovní postup.....	28
12.1	Příjem hemokultur	28
12.2	Hemokultivační přístroj BacT/ALERT® 3D 60	29
12.2.1	Popis přístroje.....	29
12.3	Zavádění lahviček	29
12.4	Doba kultivace v hemokultivačním přístroji	30
12.5	Pozitivní vzorek - zpracování.....	31
12.5.1	Mikroskopie	31
12.5.2	Vyočkování lahviček	31
12.5.3	Stanovení citlivosti.....	32
12.5.4	Identifikace bakterií.....	34
12.6	Interpretace a vydávání výsledků	35
13.	Závěr	36
14.	Použité zkratky.....	38
16.	Seznam obrázků.....	39
17.	Seznam tabulek.....	40
18.	Seznam literatury.....	41

1. Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Studijní obor: Zdravotnická bioanalýtika

Autor: Miroslava Hošková

Školitel: RNDr. Klára Konečná Ph.D.

Název bakalářské práce: Přehled současných hemokultivačních technik v laboratořích klinické mikrobiologie

Cíl práce: Cílem této bakalářské práce je popsat současné metody hemokultivačního vyšetření, identifikace původce bakteriální infekce a následné určení citlivosti na antibiotika. Dále pak popsat, jakým způsobem probíhá rutinní zpracování hemokultur, konkrétně na Oddělení lékařské mikrobiologie v Nemocnici Boskovice s. r.o.

Hlavní poznatky: Infekce krevního řečiště, které se mohou rozvinout v sepse, patří mezi život ohrožující stavy. V těchto případech je klíčovým vyšetřením odběr krve na hemokultivaci. Automatizované hemokultivační systémy pomáhají zkrátit dobu detekce pozitivních vzorků, což nám umožňuje následně rychlejší identifikaci původců sepse a stanovení citlivosti na antibiotika. V případě, že je laboratoř vybavena navíc automatizovaným přístrojem pro identifikaci mikroorganismů, je možné získat výsledek v řádu několika hodin.

Závěry: Rozpoznání sepse je i dnes někdy velmi těžké. Včasná detekce a určení původců sepse je pro zdárnou léčbu infekce zcela zásadní. Stále je zde snaha o vývoj a neustálé zlepšování hemokultivačních technik, s převážným důrazem na zrychlení identifikace původce a stanovení citlivosti na antibiotika. Tyto faktory jsou přínosem zejména pro pacienta, jelikož může být včas zahájena adekvátní antibiotická terapie.

Klíčová slova: hemokultivace, hemokultivační systémy, infekce krevního řečiště, sepse, diagnostika sepse.

2. Abstract

Charles University in Prag

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Subject of study: Healthcare bioanalytics

Student: Miroslava Hošková

Supervisor: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

Title: Overview of current blood culture techniques in clinical microbiology laboratories

Background: The purpose of this bachelor thesis is to describe current methods of blood culture examination, the process of identification of the causative agents of bacterial infection and subsequent determination of antibiotic sensitivity profile, as well as to describe the routine of blood culture processing at the Department of Medical Microbiology of Hospital in Boskovice.

Main findings: The infection of bloodstream that may develop into sepsis is a life-threatening condition. In such cases a blood draw for culture is crucial. Automatic blood culture systems help shorten the time of detection of positive specimen, which enables faster consequent identification of the bacterial agent and its antibiotic sensitivity. If the laboratory is equipped with an automatic bacterial identification system, the result can be ascertained within several hours.

Conclusions: Diagnosis of sepsis is still very difficult. An early detection and determination of the causative agent is absolutely crucial for the successful treatment of the infection. There is continuous effort in the development and improvement of blood culture technique, especially with the focus on faster identification and antibiotic sensitivity evaluation. These factors are profitable particularly for patients, because adequate treatment procedure can be realized in time.

Key words: blood culture, blood culture systems, infection of bloodstream, sepsis, sepsis diagnostics

3. Úvod

Infekce krevního řečiště se řadí k život ohrožujícím stavům. Vznikají po průniku mikroorganismů do krevního oběhu. Hemokultivace je klíčové vyšetření a jejím cílem je určení etiologie nemoci a zjištění citlivosti původce na antibiotika. Jedná se o mikrobiologické kultivační vyšetření krve. Největší záchyt bakterií v hemokultuře je bezprostředně po jejich uvolnění do krevního řečiště. Odběr krve se provádí obvykle z periferní žíly. [1, 2]

V průběhu let se technika hemokultivace postupně vyvíjela. Od používání manuálních hemokultivačních systémů až po dnešní poloautomatické či plně automatické systémy, které využívají speciální lahvičky pro kultivaci. Výhodou těchto moderních automatizovaných systémů je nejen usnadnění práce v laboratoři, ale hlavně zkrácená doba detekce pozitivních vzorků. Trendem dnešní doby je co nejrychlejší identifikace původce a následné stanovení citlivosti na antibiotika. [3]

Určení původce septického stavu a správná interpretace výsledku je nezbytná pro adekvátní antibiotickou léčbu a má zásadní význam z hlediska konkrétního pacienta. Léčba sepse je vždycky velmi komplexní a finančně náročná.

4. Zadání - cíl práce

Cílem mé práce je nastínit možnosti současných hemokultivačních technik. Dále pak informovat o situacích, při kterých je toto vyšetření nutné a popsat, jak rutinně probíhá postup zpracování hemokultur po přijetí do laboratoře, konkrétně na Oddělení lékařské mikrobiologie v Nemocnici Boskovice s.r.o., kde pracuji.

6. Základní pojmy

V průběhu let vznikla řada pojmů, které se snažily pojmenovat proces, při němž proniká mikrobiální původce do krevního řečiště, odtud se šíří do celého organismu a vyvolává závažnou reakci organismu. [3]

Tyto stavy jsou spojené s vysokou mortalitou a mají velký vliv na zdravotní péči. [4]

6.1 Bakteriémie

Tento termín vyjadřuje pouze fakt přítomnosti životaschopných bakterií v krvi. Může být příčinou rozvoje infekce krevního řečiště, ale také nemusí. Zdrojem bakterií v krvi zdravého jedince mohou být drobné chirurgické zákroky v oblastech, které jsou osídleny běžnou flórou. [3]

Bakteriémie může být dále příznakem některých malignit nebo může být častým následkem intravenózně aplikovaných drog. U mnoha lokalizovaných či celkových infekcí se může vyskytovat přechodná bakteriémie. Lze ji pozorovat například u pneumonií, meningitid, pyelonefritid nebo osteomyelitid. [5]

V rámci bakteriémie pak bývají bakterie většinou průběžně fagocytovány a nepodílí se na rozvoji patologického procesu. [6]

6.2 Fungémie

Přítomnost hub či kvasinek v krvi se označuje jako fungémii. Mezi nejčastější původce patří kvasinky rodu *Candida*. Ve většině případů kandidóz je nejčastěji izolována *Candida albicans*, *Candida tropicalis* či *Candida lusitanae*. Kandidózy můžeme pozorovat nejčastěji u hospitalizovaných osob po operaci nebo při imunosupresi. [7, 8]

6.3 Infekce krevního řečiště

Jedná se o stav, kdy je průnik mikroorganismů do krevního oběhu provázen již celkovými známkami infekčního procesu. V praxi pak bývá tento termín často zaměňován s pojmem sepse. [3]

Dnes bychom mohli rozdělit infekce krevního řečiště (IKR) na:

- **primární IKR** - neznámého původu, infekční původce je zachycen hemokultivací, ale není spojen s jiným infekčním procesem
- **sekundární IKR** - jiné než katérové, infekční původce je zachycen hemokultivací a současně je původcem infekčního onemocnění v jiném místě
- **infekční endokarditida** - infekce srdečních chlopní nebo jiných částí endokardu, nejčastějšími původci jsou enterokoky, viridující streptokoky nebo koaguláza-negativní stafylokoky
- **katérové sepse** - možnost osídlení katetru bakteriemi z místa jeho zavedení nebo z krve, mezi nejčastější původce patří koaguláza-negativní stafylokoky

Toto rozdělení předpokládá pouze bakteriální původce IKR, což je zjednodušující pohled, který vyplývá z podmínek ve vyspělých zemích. [3]

6.3 Sepse

Termín sepsy pochází z řečtiny, kde původním významem slova bylo hniloba. Do češtiny se pak překládal jako „otrava krve“. Jedná se o klinický syndrom, který je charakterizovaný přítomností infekce v organismu a systémové zánětlivé odpovědi. Sepse je stále hlavní příčinou úmrtí na infekční choroby. Rozpoznat sepsi není jednoduché a včasná diagnóza vyžaduje zkušenosti. Pohled na problematiku sepsy se v posledních letech dramaticky vyvíjí. [6]

V roce 2016 byla představena nová definice sepsy a septického šoku. Tato definice, označovaná též jako „Sepsis-3“, označuje sepsi jako život ohrožující orgánovou dysfunkci způsobenou deregulovanou odpovědí hostitelského organismu na přítomnost infekce. [9]

Definice vyžaduje rozpoznání orgánové dysfunkce, k čemuž slouží tzv. skóre SOFA¹. Pomocí bodové stupnice se hodnotí respirační funkce, parametry koagulace,

¹ Sequential/Sepsis-related Organ Failure Assessment (skórovací systém k hodnocení závažnosti zánětlivé odpovědi organismu na zátěž)

renální a jaterní funkce, hemodynamika a stav vědomí. Sepsis-3 umožňuje vzbudit podezření na sepsi u pacientů, kde diagnóza není klinicky zcela jednoznačná. Pro určení SOFA skóre je zapotřebí řada laboratorních testů, které však nemusí být vždy včas dostupné. V tomto případě bylo zavedeno tzv. „quick SOFA“ (qSOFA) skóre. Jedná se o třibodový systém, kde se hodnotí pouze změna vědomí, dechová frekvence a nízký krevní tlak. [10, 11]

7. Nejčastější původci infekcí krevního řečiště

Frekvence bakteriálních původců způsobujících infekce krevního řečiště se v posledních letech výrazně mění. Dříve patřily mezi nejčastější agens kmeny *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* či *Staphylococcus aureus*. V dnešní době vidíme také nárůst četnosti koaguláza-negativních druhů stafylokoků, gram-negativních bakterií rodu *Enterobacter cloacae* komplex, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*. [3]

Výskyt bakteriálních patogenů je výrazně ovlivněn skladbou pacientů a také jejich základním onemocněním. Pokud bychom se zaměřili na infekce krevního řečiště z pohledu nozokomiálních nákaz, tak bychom zjistili, že nejčastěji izolovanými jsou gram- pozitivní mikroorganismy (65%). Druhými nejčastěji izolovanými mikroorganismy jsou gram-negativní bakterie (25%). Kvasinky a houby pak byly prokázány v 9,5% případů. [12]

8. Pokyny pro odběr hemokultury

8.1 Dezinfekce místa vpichu

Doporučeným postupem je očištění místa vpichu dezinfekčním prostředkem. Vhodným antiseptikem k dezinfekci kůže je stále jódová tinktura nebo prostředky na bázi alkoholu. Dezinfekční přípravek je nutné nechat zaschnout a teprve poté provést odběr. Před vpichem by se měl provádět stěr sterilním tamponem, který se zasílá společně s hemokulturou do laboratoře ke kultivaci. Pomáhá vyloučit případnou kontaminaci kožní mikroflórou. [6]

8.2 Vlastní odběr

Odběr se provádí ve sterilních rukavicích. Krev je optimální odebrat při vzestupu tělesné teploty, resp. za prvních příznaků horečky, protože v tomto okamžiku je hladina mikrobů v krvi relativně vysoká. Pokud není u pacienta podezření na katérovou sepsi, upřednostňuje se periferní odběr. V případě, že se jedná o suspektní katérovou infekci nebo není periferní odběr možný, je krev odebrána ze zavedeného katétru. Tento údaj by měl být vždy zaznamenán na průvodním listu. [6]

Objem odebírané krve bývá nejkritičtějším faktorem, protože počet zárodků může být nízký. Doporučený objem je 20 - 30 ml. Ve výjimečných případech lze provést hemokultivaci z množství menšího než 8 ml. [13]

Krev se odebírá přímo do speciálních lahviček, které se liší podle toho, jaký typ přístroje je používán v mikrobiologické laboratoři. Existují lahvičky pro aerobní a anaerobní kultivaci. Dále speciální lahvičky pro mykobakterie s různými suplementy, antikoagulanty, objemem půdy a s různou atmosférou a přítomnosti antimikrobních neutralizačních látek [13].

Za optimální se považují minimálně dva, spíše tři odběry na hemokulturu a to s určitým časovým odstupem. Pokud se jedná o suspektní katérovou sepsi, doporučuje se odběr jedné hemokultury z katétru a druhé z periferie. [6]

Ve všech lahvičkách je podtlak, který umožňuje snadnější inokulaci krve do lahviček [3].

8.3 Transport do laboratoře

Odebrané hemokultury je vhodné dopravit do laboratoře co nejdříve. Pokud jsou hemokultury odebrány mimo pracovní dobu laboratoře, jsou lahvičky uchovávány při pokojové teplotě. Nikdy ne na přímém slunci nebo u zdroje tepla ani v lednici. [14]

9. Hemokultivační systémy

Dříve běžně využívaný způsob přípravy hemokultivačních systémů přímo v laboratoři je již minulostí. V dnešní době většina laboratoří v České republice využívá některý z kontinuálně měřících automatů. Největšími výhodami těchto systémů je plná automatizace, snadná obsluha a rychlá detekce patogenů v řádu několika hodin. Na trhu jsou dnes nejčastěji dostupné VersaTrek® (TREK Diagnostic Systems), BD Bactec™FX (Becton Dickinson Int.) nebo Bact/ALERT®3D (BioMérieux Inc.). Za kompromisní řešení však můžeme považovat manuální systém *Oxoid Signal Blood Culture system*, který je stále využíván v menších laboratořích. Přináší totiž výhodu rychlejší detekce positivity při nižší ceně bez nutnosti investice do drahého přístroje. [3]

9.1 Manuální hemokultivační systémy

9.1.1 Signal™ Blood Culture systém

Tento systém tvoří jeden typ hemokultivačních lahvíček, které obsahují speciální živné médium. Lahvička umožňuje růst aerobních, anaerobních i mikroaerofilních mikroorganismů. Systém se skládá ze dvou částí. První částí je lahvička s médiem a pryžovým uzávěrem a druhou částí je plastový nástavec, opatřený na konci jehlou. V laboratoři se pak na inokulovanou lahvičku napíchne plastový nástavec s jehlou, která dosahuje až do média s krví. Lahvička se vloží do termostatu vytemperovaného na 36 - 37°C. Během kultivace se vlivem růstu bakterií tvoří plyn, který svým tlakem vytlačuje tekuté médium dutou jehlou do horní plastové nádoby. Lahvička se pravidelně kontroluje. Detekce positivity je tedy jednoduchá. Snadný přístup ke kultivačnímu médiu je šroubovacím uzávěrem horní nádoby (Obr. 1). [15, 3]



*Obr. 1 Manuální hemokultivační systém Signal™ Blood Culture systém
(výrobce Oxoid, Thermo Scientific)*

V levé části je znázorněna pozitivní hemokultivační lahvička s vytlačeným médiem vlivem produkce CO₂, v pravé části je znázorněna hemokultivační lahvička před inokulací [16]

9.2 Automatizované hemokultivační systémy

V sedmdesátých letech 20. století byly vyvinuty první přístroje. Během vývoje se postupně redukovaly technické manipulace s lahvičkami, možnosti kontaminace, zvyšovala se rychlost detekce pozitivních hemokultur a také se měnily principy metod. Jedním z prvních systémů pracoval na principu detekce radioaktivního oxidu uhličitého (CO₂). V přístroji byl z každé lahvičky odebírán vzorek plynu a měřena jeho radioaktivita. Používání radioaktivních reagensů mělo však své nevýhody. Další přístroje již pracovaly na principu detekce CO₂ spektrofotometricky, pomocí senzoru, pomocí tekuté fluorescenční složky či pomocí tlaku. Hemokultivační systémy, které monitorují kontinuálně, způsobily převrat v mikrobiologické diagnostice.[3]

9.2.1 VersaTREK®

Jedná se o automatizovaný mikrobiální detekční systém, který je určen pro detekci mikroorganismů z krevních vzorků a vzorků sterilních tělních tekutin. Dále se využívá k detekci mykobakterií a kvalitativnímu *in vitro* testování citlivosti na 5 základních antituberkulotik. Principem tohoto přístroje je měření změn tlaku v prostoru nad tekutým médiem obsahujícím vzorek. Spotřeba plynu (O₂) nebo

produkce plynu (CO₂ a jiné plyny) je přístrojem detekována jako růst organismu v médiu (Obr. 2). [17]

Pro přístroj VersaTREK® je výrobcem dodáváno několik typů kultivačních lahviček. VersaTREK REDOX 1 a 2 obsahují 80 ml média a umožňují použít až 10 ml vzorku krve. VersaTREK REDOX 1 médium zajišťuje výtěžnost aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů. VersaTREK REDOX 2 je značně obohacené médium, které je určené pro inaktivaci aminoglykosidových antibiotik (ATB) a zajišťuje růst anaerobů, fakultativních organismů a také některých aerobů. Dalším typem je VersaTREK REDOX 1 a 2 EZ Draw, které obsahují 40 ml kultivačního bujónu a je určena pro odběr 0,1 - 5 ml vzorku dospělých a dětských pacientů (Obr. 3).[18]

Bylo zkoumáno, zda může být ovlivněn čas detekce původce infekce při použití lahviček VersaTREK REDOX EZ Draw, z důvodu menšího objemu přidávané krve. Při tomto pokusu byly naočkovány 2 druhy hemokultivačních lahviček, VersaTREK REDOX 1 a VersaTREK REDOX 1 EZ Draw, různými kmeny mikroorganismů. Zjistilo se, že 13 z 15 naočkovaných kmenů bylo rychleji detekováno v lahvičkách, které obsahují 40 ml kultivačního bujónu a je sem inokulováno menší množství krve. Studie tedy prokázaly, že nižší objem krevního inokula neovlivnil čas detekce positivity. [19]



*Obr. 2 Automatický hemokultivační přístroj VersaTREK®
(výrobce TREK Diagnostic Systems) [20]*



*Obr. 3 Hemokultivační lahvičky s médiem pro přístroj VersaTrek®
(výrobce TREK Diagnostic Systems) [21]*

9.2.2 BD BACTEC™ FX

BD BACTEC™ FX je plně automatický systém pro detekci a kultivaci mikroorganismů ze vzorků krve a jiných sterilních tekutin, který vychází z původní řady BD BACTEC™ 9000. Tento přístroj využívá pokročilou fluorescenční technologii a umožňuje významné zkrácení času obsluhy přístroje pracovníkem. Každá hemokultivační lahvička obsahuje chemické činidlo, které detekuje zvýšení množství CO₂, které je vyprodukováno růstem mikroorganismů. Přístroj každých 10 minut monitoruje zvýšení fluorescence zjištěné pomocí čidla (Obr. 4). [3]

Výrobce nabízí široký rozsah kultivačních médií, která jsou určena pro aerobní, anaerobní kultivaci, speciální kultivační média pro kultivaci kvasinek a plísní či mykobakterií. V praxi bývá nejvíce využíváno lahviček Standard Aerobic/F a Standard Anaerobic/F pro kultivaci bakterií a plísní. Dále Plus Aerobic/F a Anaerobic/F, které navíc obsahují resin. Tyto lahvičky bývají doporučovány k odběru u pacientů s antimikrobiální terapií. Dalším využívaným typem lahviček jsou PEDS PLUS/F také s přídavkem resinu, pro vzorky pediatrických pacientů nebo jiných vzorků s malým objemem krve (Obr. 5). [22]



*Obr. 4: Automatický hemokultivační přístroj BD BACTEC™ FX
(výrobce Becton Dickinson Int.) [23]*



*Obr. 5 Hemokultivační lahvičky s různým typem média pro přístroj BD BACTEC™ FX
(výrobce Becton Dickinson Int.) [24]*

9.2.3 BacT/ALERT® 3D

Automatizovaný mikrobiální detekční systém, který slouží pro záchyt široké řady mikroorganismů, včetně bakterií, houbových organismů a mykobakterií (Obr. 6). Tento systém, dodávaný firmou BioMérieux, využívá několik typů hemokultivačních lahviček. Prvním typem jsou standardní média BACT/ALERT® SA a SN, která obsahují suplementovaný trypton sójový bujon. Druhým typem jsou média s neutralizací antimikrobiální aktivity pro záchyt růstově náročných mikroorganismů BACT/ALERT® FA, FN a PF Plus (Obr. 7). Tyto lahvičky obsahují navíc adsorpční polymerové kuličky. Třetím typem je lahvička s médiem pro kultivaci mykobakterií BACT/ALERT® MB.

Posledním typem lahvíček jsou BACT/ALERT® BPN a BPA lahvíčky pro kontrolu krevních destiček. Lahvičky jsou barevně odlišeny pro lepší orientaci uživatele. [14, 25]

Všechny lahvičky jsou vyrobeny z polykarbonátového materiálu, což zvyšuje bezpečnost práce v laboratoři, protože je eliminována možnost náhodného rozlití a potenciální expozice biologickému nebezpečí. Systém využívá kolorimetrickou technologii. Každá lahvička má na svém dně speciální senzor modrozelené barvy. V přítomnosti bakterií dochází k produkci CO₂ a změně pH. Vlivem změny pH dochází k barevné změně senzoru na dně lahvičky. Přístroj každých deset minut provádí měření a analyzuje změnu barvy senzoru z modrozelené na žlutou. Žluté zbarvení je pak vyhodnoceno přístrojem jako pozitivní detekce. [26]



*Obr. 6 Automatizovaný hemokultivační přístroj Bact/ALERT® 3D
(výrobce BioMérieux) [27]*



*Obr. 7 Hemokultivační lahvičky pro přístroj Bact/ALERT® 3D
barevně odlišené pro snadnější manipulaci uživatele (výrobce BioMérieux) [28]*

Pokud laboratoř stojí před náročnými výzvami jako je např. zpracování většího množství vzorků nebo potřeba efektivního využití lidských zdrojů, může zvolit inteligentní automatizovaný systém BacT/ALERT® VIRTUO© (Obr. 8). Tento systém využívá navíc posunovací pás, který dokáže pojmout až 40 lahvíček najednou. Součástí je také pokročilá robotika pro vkládání a vykládání lahvíček nebo inteligentní 360° snímání, kdy přístroj kontroluje i hladinu krve v lahvíčkách. [29]



Obr. 8 Hemokultivační přístroj BACT/ALERT® VIRTUO© s posuvným pásem a s automatickým systémem vkládání a vykládání hemokultivačních lahvíček (výrobce BioMérieux) [29]

9.3 Hemokultivační systémy a lahvíčky - srovnání

V České republice mají laboratoře možnost vybírat z několika typů automatizovaných mikrobiálních detekčních systémů. Tyto hemokultivační systémy pracují na různých principech, jak bylo popsáno výše. Společným znakem je však co nejrychlejší doba detekce pozitivních vzorků a usnadnění práce v laboratoři. Srovnávání samotných přístrojů je bezpředmětné.

Zajímavé jsou studie, které se zaměřily na srovnání doby detekce pozitivních hemokultivačních lahvíček od různých výrobců. Hemokultivační lahvíčky Bactec Standard/F, Bactec Plus/F a Bact/Alert FA, SA byly ve stejnou dobu naočkovány shodnou bakteriální suspenzí. Všechny inokulované lahvíčky detekovaly bakteriální

patogeny a to i v případě malého množství inokulovaných bakterií. Avšak u lahvíček Bactec Plus/F byly dříve detekovány bakterie čeledi *Enterobacterales*. U lahvíček typu Bact/Alert FA pak byly dříve detekovány koaguláza-negativní stafylokoky. Největší rozdíl v době detekce byl zaznamenán u kmene *Pseudomonas stutzeri*. V lahvíčkách Bact/Alert FA byla detekce rychlejší až o 15 hodin než v lahvíčkách Bactec Plus Aerobic/F. [30, 31]

Při porovnávání lahvíček VersaTREK REDOX 1 a 2 a Bact/Alert SA a SN byly všechny lahvičky naplněny stejným objemem krve a zpracovány standardní metodou. V tomto případě nebyl detekován žádný významný rozdíl jak v době detekce tak i v počtu pozitivních lahvíček. Tyto dva systémy jsou srovnatelné pro záchyt bakteriálních a kvasinkových infekcí krevního řečiště. [33]

10. Možnosti identifikace původců infekce izolovaných z krve

V klinické mikrobiologii je spolehlivá identifikace mikroorganismů zcela klíčová. Ke konečné identifikaci se nejčastěji používá zjišťování biochemických a fyziologických vlastností bakterií. V posledních letech však prošly metody identifikace podstatným vývojem, který umožnil jejich urychlení a zkvalitnění. [34]

10.1 Biochemické testy

Tyto metody umožňují identifikaci mikrobů od skupinové identifikace přes identifikaci rodu a druhu až po vnitrodruhovou analýzu. Princip je u všech těchto testů shodný. Bakterii je nabídnut substrát a po určitém čase se zjišťuje, zda došlo k jeho přeměně na jinou chemickou látku, což se projeví ve většině případů barevnou změnou jamky vlivem indikátoru. V průběhu let se tyto metody vyvíjely. Od jednoduchých zkumavkových testů přes složité zkumavkové testy, ve kterých bylo možné vyhodnotit více biochemických reakcí najednou. [34]

V dnešní době jsou nejběžněji používané komerční testy v mikrotitračních destičkách, které si můžeme představit jako miniaturizovanou pestrou řadu zkumavek. Jednotlivé testy jsou nazvané podle skupin bakterií, které pomocí nich můžeme identifikovat (Obr. 9). Do jamek mikrotitrační destičky se kape nejčastěji 0,1 ml

bakteriální suspenze ve fyziologickém roztoku. Většina těchto testů se inkubuje 24 hodin při 37°C. Testy se poté odečítají okem nebo spektrofotometrem. [34]

Pro identifikaci je nutné mít vykultivovanou čistou bakteriální kulturu.



Obr. 9 ENTEROtest 24 - komerčně dodávaný set pro identifikaci enterobakterií (výrobce Erba Lachema) [35]

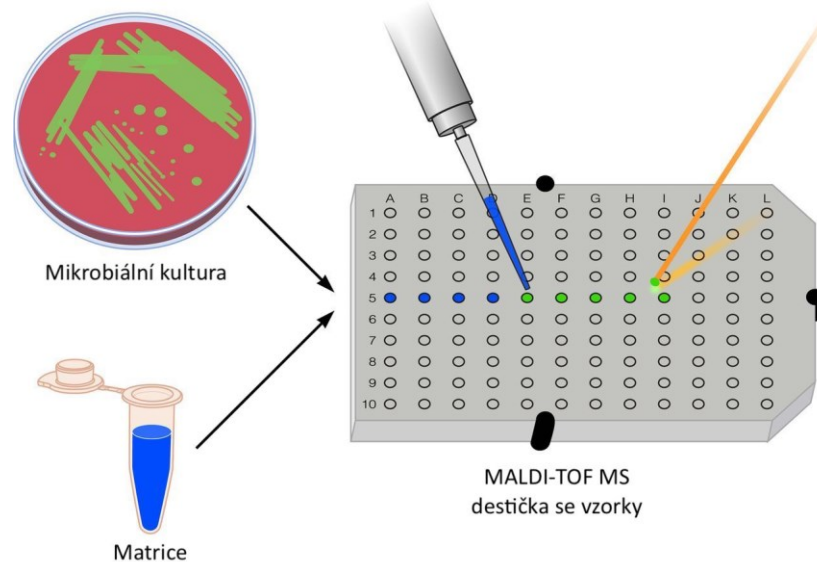
10.2 MALDI-TOF

V posledních deseti letech se začala metoda MALDI-TOF¹ hojně využívat k rychlé a spolehlivé identifikaci mikroorganismů. K identifikaci slouží vzorky mikroorganismů, které získáme kultivací na agarové půdě. Před vlastní analýzou je nutné vzorky upravit. Vzorky jsou nanášeny na povrch kovové destičky a následně se nechají vysušit na vzduchu (Obr. 10). Ke vzorku se nanese matrice (např. kyselina skořicová). Laser hmotnostního spektrometru ozáří směs vzorku a matrice, přičemž matrice pohltí UV záření a převede jej na tepelnou energii. Molekuly vzorku jsou ionizovány, vstupují do vakua v trubici detektoru, kde se pohybují rychlostí úměrnou jejich hmotnosti a náboje. Hmotnostní spektra získaná během analýzy jsou specifická pro každý testovaný mikroorganismus. Proteinové profily jsou porovnávány

¹ Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s analyzátozem doby letu)

s referenční databází kontrolních kmenů. Identifikace od nanesení na kovovou destičku až po výsledek trvá řádově minuty. [36, 37]

Tato technologie se využívá nejen k identifikaci mikroorganismů z čisté kultury, ale i k předběžnému určení bakterií z hemokultivačních lahvíček. [37]



Obr. 10 Příprava směsi vzorku a matrice a nanesení na kovovou destičku [38]

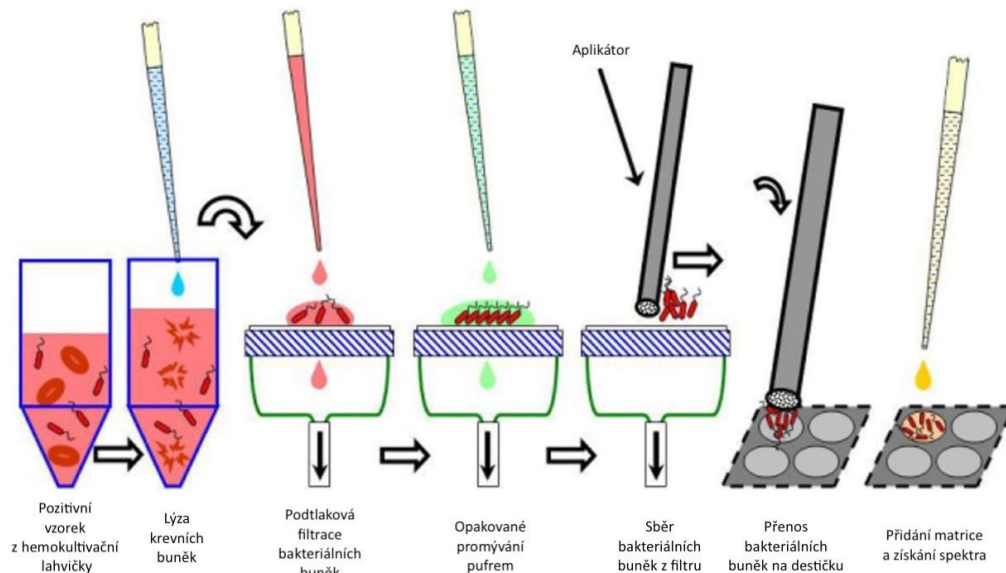
10.2.1 Přímá identifikace z hemokultivační lahvičky

System MALDI TOF umožňuje přímou identifikaci, je třeba však materiál pro analýzu připravit. Bakteriální buňky mohou být v pozitivní hemokultuře v příliš zředěném a velkém objemu. Kápnutí této směsi přímo na destičku k identifikaci nevede, protože při analýze na MALDI interferují krevní proteiny i další složky živného média z lahvičky. [39, 40]

Jeden z postupů zahrnuje podtlakovou filtraci na bakteriálním filtru za současné lýzy krvinek, vysokorychlostní centrifugace a opakovaném promývání pufrem (Obr. 11). Na filtru nakonec zůstanou pouze bakteriální buňky, které lze použít pro analýzu na MALDI TOF. Tento proces je však poměrně drahý a zdlouhavý. Další postup je založen na běžném vyočkování pozitivní hemokultury na agarovou půdu a při běžné kultivaci při 37°C je možné u některých druhů mikroorganismů za 4 - 5 hodin vidět na misce mikrokolonie, které na nátěr na destičku stačí. Tento proces je delší než předchozí, ale méně pracný a nenákladný. Příčinou nezdaru může být směsná kultura, nepřítomnost

typových kmenů v databázi a nebo genetická heterogenita uvnitř rodového komplexu. Je nutné s tímto počítat a pro identifikaci popřípadě zvolit jinou metodu. [40, 41, 42]

Příprava vzorku



Obr. 11 Příprava vzorku pro identifikaci mikroorganismu přímo z hemokultivační lahvičky metodou MALDI-TOF [43]

10.3 Systém Vitek® 2

Jedná se o kompaktní automatizovaný přístroj, který slouží nejen k identifikaci mikroorganismů, ale také stanovení citlivosti (Obr. 12). Optický systém zachycuje bakteriální růst a metabolické změny. Měřením se získávají hodnoty fluorescence, zákalu a kolorimetrické signály. K analýze se využívají tenké plastové karty dodávané komerčně. Jamky v těchto kartách obsahují buď ATB, pro stanovení citlivosti a nebo různé substráty pro identifikaci mikroorganismů. [44]

Během přípravy vzorků pro analýzu na přístroji Vitek®2 připravujeme inokulum z čisté narostlé kultury sběrem kolonií z plotny a suspendujeme v solném roztoku. Plastové karty se spolu s bakteriální suspenzí vloží do kazety, kterou umístíme do přístroje. Zde je karta a vzorek propojeny pomocí čárového kódu. Přístroj VITEK poskytuje výsledky již za 5 - 8 hodin. [45]

Systém VITEK potřebuje pro identifikaci čistou kulturu, takže přímá identifikace z pozitivní hemokultury není možná. [46]



Obr. 12 Systém Vitek® 2 pro identifikaci mikroorganismů a určení citlivosti na antibiotika (výrobce BioMérieux) [45]

10.4 FilmArray® Blood Culture Identification Panel

Jedná se o kvalitativní multiplexní diagnostický test *in vitro* na bázi nukleových kyselin, který se využívá v systémech FilmArray (Obr. 13). Tento systém umožňuje pomocí polymerázové řetězové reakce detekci a identifikaci nukleových kyselin mnoha druhů bakterií a kvasinek. Analýza pomocí FilmArray Blood Culture Identification Panel (BCID Panel) se provádí přímo na vzorcích hemokultur. Výsledky jsou určeny k interpretaci ve spojení s výsledky Gramova barvení. [47]

Pomocí tohoto testu lze identifikovat následující gram-pozitivní bakterie, gram-negativní bakterie a kvasinky: *Enterococcus* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* spp., *Acinetobacter baumannii*, komplex bakterií čeledi *Enterobacterales*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* a *Candida krusei*. Rovněž tento test umožňuje analýzy pro průkaz rezistence k methicilinu, vankomycinu a karbapenemům.

Tento test je indikován jako pomůcka při diagnostice specifických původců bakterémie a fungémie. Výsledky je však nutné posuzovat v kontextu dalších klinických a laboratorních nálezů. Pozitivní výsledky nevylučují souběžnou infekci organismy, které test FilmArray BCID Panel nepokrývá. [47]



Obr. 13 FilmArray systém pro identifikaci mikroorganismů na bázi nukleových kyselin
(výrobce Bio-fire) [48]

11. Stanovení citlivosti na antibiotika

Pro stanovení citlivosti se využívá diskový difúzní test, což je standardní metoda. Antibiotikum, kterým je napuštěný papírový disk, difunduje na povrch naočkované agarové půdy. Přítomné bakterie se množí a v blízkosti disku se, vlivem antibiotika, nemnoží, pokud vykazují k danému ATB citlivost. Po kultivaci 18-24 hodin při 37°C odečítáme zóny kolem disků a zjišťujeme zda citlivost kmene odpovídá *break-pointu* (hraniční koncentraci). Průměry inhibičních zón odpovídajících *break-pointům* jednotlivých skupin antibiotik a bakterií. Jsou standardizovány ve formě tabulek. Výsledek je interpretován jako kmen citlivý (C, standardní dávkovací režim), citlivý (I, zvýšená expozice) nebo rezistentní (R) k danému ATB. [49]

Na velikost zóny má vliv např. také tloušťka půdy, antibiotické disky či rychlost množení kmene. Půda se do misky vylévá do výšky 4,0 +/- 0,5 mm. Používané antibiotické disky musí být vždy před datem expirace a dbá se na uložení při správné teplotě. Vlivem nesprávného skladování, při vyšších teplotách než uvádí výrobce, může docházet k degradaci ATB a následnému ovlivnění velikosti zón citlivosti. K přesnějšímu stanovení citlivosti slouží kvantitativní stanovení minimální inhibiční koncentrace v mikrotitračních destičkách nebo E-test. Tyto metody se používají pro stanovení citlivosti z čisté bakteriální kultury. [49]

11.1 Rychlé vyšetření antimikrobní citlivosti přímo z hemokultivačních lahviček

Metoda rychlého vyšetření antimikrobní citlivosti přímo z hemokultivační lahvičky (RAST, *Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing*) je založena na standardní diskové difúzní metodě EUCAST, ale s upraveným inokulem, zkrácenou dobou inkubace a upravenými pokyny pro odečítání. Metodu RAST lze provádět v rozmezí 0 - 18 hodin po pozitivní signalizaci lahviček. [50]

Přímo z pozitivní hemokultivační lahvičky se na každou agarovou plotnu přenese 100 - 150 µl neředěného bujónu a jemně se rozetře. Plotna se poklade disky a inkubuje se podle pokynů. Inhibiční zóny se poté odečítají v intervalu 4, 6 a/nebo 8 hodin (Tab. 1). Po 8 hodinách se již plotny neinkubují a neodečítají. [50]

Inhibiční zóny by se měly odečítat pouze tehdy, zda je růst splývavý a okraje zón jsou zřetelně viditelné. Plotny se odečítají manuálně. Plotna se naklání tak, aby byl rozeznatelný ostrý okraj zóny. Pro interpretaci průměru zón se používají Tabulky breakpointů EUCAST RAST, nikoliv běžné tabulky. [50]

Tab. 1 Podmínky inkubace ploten pro vyšetření antibiotické citlivosti [49]

Druh	Doba inkubace	Půda	Prostředí
<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i>	4, 6 a 8 hodin	MH agar	35 ± 1°C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4 a 8 hodin	MH agar	35 ± 1°C
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4, 6 a 8 hodin	MH-F agar	35 ± 1°C, 4-6% CO ₂

12. Základní pracovní postup

Na Oddělení lékařské mikrobiologie v Nemocnici Boskovice s.r.o. je využíván mikrobiální detekční systém Bact/ALERT® 3D 60, který je kompatibilní s kulturačními lahvíčkami BACT/ALERT dodávané firmou Biomérieux (Francie).

V laboratoři jsou běžně dostupné lahvičky typu BACT/ALERT aerobic SA a anaerobic SN, které jsou určeny pro pacienty bez antibiotické léčby. Tyto lahvičky obsahují standardní médium, které je složeno ze suplementovaného trypton sójového bujónu. Dalším typem je BACT/ALERT aerobic FA a anaerobic FN. Tyto lahvičky jsou naopak určeny pro pacienty, u kterých již byla zahájena ATB terapie. Médium uvnitř lahvíček obsahuje navíc adsorpční polymerové kuličky, které pomáhají neutralizovat antimikrobiální aktivitu a zlepšit záchyt růstově náročných mikroorganismů. Posledním typem lahvičky je BACT/ALERT pediatric, která slouží pro malé množství krve (děti, pacienti se špatným žilním vstupem).

12.1 Příjem hemokultur

Hemokultivační lahvičky jsou přijaty do laboratoře spolu s průvodními listy. Vzorky jsou na úseku příjmu vždy přezkoumány, zda se shodují údaje na štítcích lahvíček a na průvodních listech a je zaznamenáno datum a doba příjmu laboratoří. Hemokultury jsou od výrobce označeny čárovým kódem. Laborant nejprve sejme štítek s částí čárového kódu, který nalepí na žádanku. Tato část je využita k případnému dohledání informací o hemokultuře. Zbytek čárového kódu na lahvičce slouží pro následné zavedení hemokultury do hemokultivačního přístroje. Vzorky jsou zadány do laboratorního informačního systému (LIS) a opatřeny pořadovým číslem.

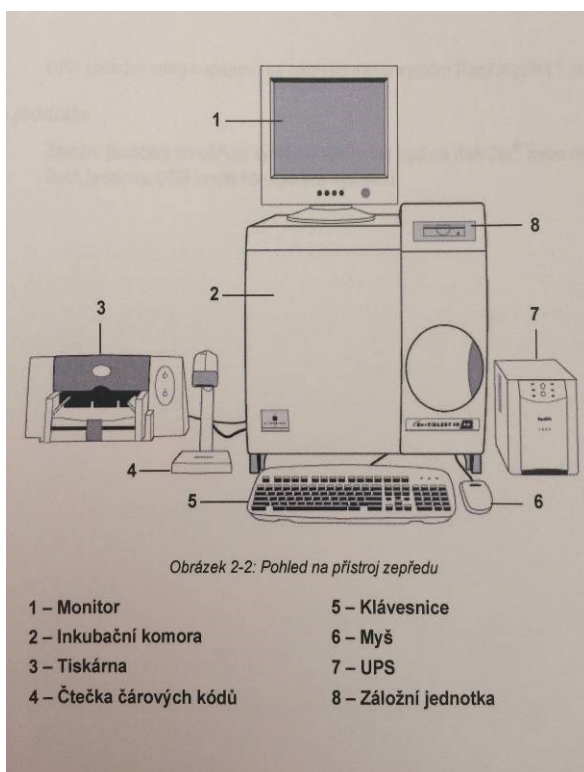
Kompletní sada hemokultur obsahuje tři lahvičky. První dvě jsou odebrány z jednoho místa vpichu při zaznamenaném vzestupu tělesné teploty. Druhý odběr se provádí půl hodiny po prvním odběru z jiného místa. Na průvodním listu by měl být uveden nejen čas odběru, ale také místo, odkud byl odběr proveden.

Spolu s hemokulturami jsou do laboratoře přijímány také stěry před hemokulturou, které jsou často důležité pro správnou interpretaci výsledků.

12.2 Hemokultivační přístroj BacT/ALERT® 3D 60

12.2.1 Popis přístroje

Tento přístroj obsahuje inkubační komoru, monitor, klávesnici, UPS, tiskárnu, čtečku čárových kódů a myš (Obr. 14). Dvířka na přední straně vedou do inkubační komory. Inkubační komora je temperována na 37°C a obsahuje buňky pro jednotlivé lahvičky.



Obr. 14 Hemokultivační přístroj BACT/ALERT® 3D 60
(Uživatelský manuál dodávaný výrobcem BioMérieux)

12.3 Závádění lahviček

Hemokultivační přístroj je připojen na počítač s laboratorním informačním systémem. Odtud jsou převedeny všechny důležité informace o vzorku a není nutné je zadávat ručně. Načte se pouze čárový kód na lahvičce a zadá pořadové číslo. Poté je možné lahvičky podle uživatelského manuálu vkládat do přístroje (Obr. 15, 16).



Obr. 15 Načítání čárového kódu u hemokultivačních lahvíček



Obr. 16 Vkládání hemokultivačních lahvíček do inkubační komory

12.4 Doba kultivace v hemokultivačním přístroji

Standardně probíhá kultivace 7 dnů. Pokud je výsledek negativní, po 7 dnech hlásí přístroj negativní vzorky, ty jsou převedeny do LIS a odpovědný vysokoškolský pracovník (VŠ) uzavře vyšetření jako negativní. Lahvička se vyjme z přístroje a je likvidována jako infekční odpad. Pokud přístroj vyhodnotí vzorek jako pozitivní, alarm hlásí pozitivní vzorek. Může se tak stát kdykoliv v průběhu 7 dnů. V tomto případě je výsledek také převeden do LIS, lahvička je vyjmuta a dále zpracována.

12.5 Pozitivní vzorek - zpracování

12.5.1 Mikroskopie

Prvním krokem je zhotovení mikroskopického preparátu, který je obarven dle Grama. Toto barvení patří mezi základní diagnostické barvení, které nám pomůže odhalit, zda se v hemokultuře nachází grampozitivní, gramnegativní či kvasinkovité mikroorganismy. S hemokulturami pracujeme v laminárním boxu. Zátka hemokultivační lahvičky se postříká dezinfekčním prostředkem a nechá zaschnout. Poté se pomocí sterilní jehly a stříkačky odebere krev a zhotoví se mikroskopický preparát (Obr. 17). Ten se následně se obarví. VŠ odpovědný za vyšetření mikroskopický nález okamžitě hlásí na dané oddělení ošetřujícímu lékaři a po konzultaci rozhodne o dalším postupu kultivace (sestava kultivačních půd, sestavy testování citlivosti ATB).



Obr. 17 Zhotovení mikroskopického preparátu

12.5.2 Vyočkování lahviček

Část obsahu lahvičky se nasaje do sterilní injekční stříkačky a na každou očkovanou plotnu se umístí kapka vzorku, vše se pak rozočkuje standardním postupem. Na Oddělení lékařské mikrobiologie se při vyočkování používá vždy krevní agar s čarou *Staphylococcus pseudintermedius* a diskem Bacitracinu (Obr. 18). Stafylokoková čára a disk s bacitracinem umožňuje záchyt kultivačně náročných

bakterií např. *Haemophilus* spp. nebo pomůže odclonit gram-pozitivní bakterie při směsných kulturách.



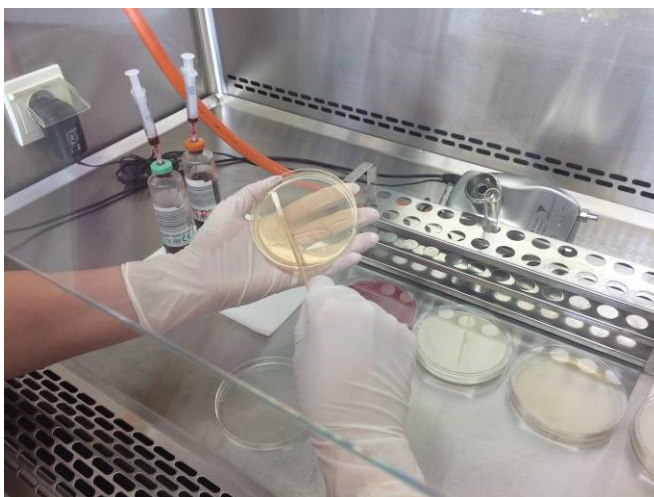
Obr. 18 Očkování krevního agaru

12.5.3 Stanovení citlivosti

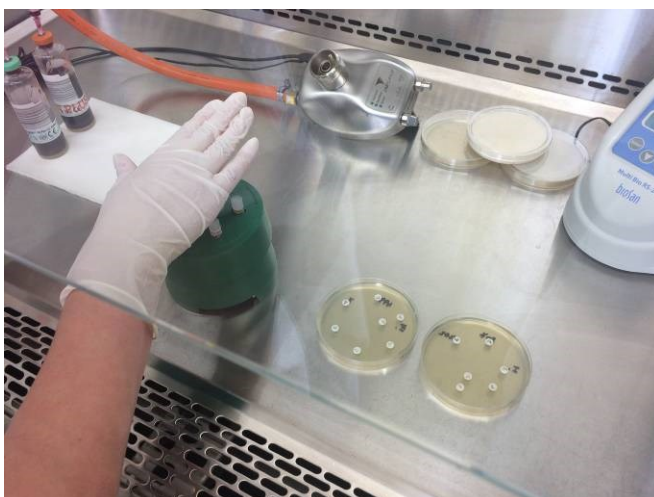
Při velké kvantitě inokula může být disková metoda nepřesná a proto je nutné na ni nahlížet pouze jako na předběžnou.

Pro stanovení předběžné citlivosti diskovou difúzní metodou se využívá nestandardní postup. Jedna kapka vzorku se umístí na plotnu Mueller Hinton agaru (MH agar) a sterilním vatovým tamponem namočeným ve fyziologickém roztoku se provede očkování roztěrem (Obr. 19). Antibiotické disky klademe na pevnou půdu (obr.20). Plotny jsou inkubovány při 37°C 18-24 hodin a poté jsou odečítány výsledky. Kultivací přímo z lahvičky nelze dodržet stupeň McFarlandovy zákalové stupnice, který by měl být 0,5 - 1, protože nevíme, jak moc se bakterie v médiu pomnožily.

V případě nárůstu čisté kultury z hemokultivační lahvičky, nám tento postup umožňuje podat za 24 hodin předběžný výsledek citlivosti na ATB.



Obr. 19 Inokulace vzorku na MH agar



Obr. 20 Dávkování ATB disků pomocí dispenzoru

K přesnému stanovení minimální inhibiční koncentrace slouží komerčně dodávaná souprava MIC firmou Erba Lachema (Česká republika). Jedná se o mikrodiluční metodu založenou na rehydrataci ATB v jamkách pomocí komerčně dodávaného suspenzního média a přidání bakteriální suspenze. Do každé jamky se pipetuje 0,1 ml média. Toto vyšetření je možné provádět z čisté bakteriální kultury (obr.21).



Obr. 21 Ukázka komerčně dodávaných souprav pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (výrobce Erba Lachema)

12.5.4 Identifikace bakterií

K dourčení bakterií se využívají komerčně dodávané testy od firmy Erba Lachema s.r.o. (Česká republika) (Obr. 22). Jednotlivé testy jsou pojmenovány podle skupin bakterií, pro které lze tyto testy použít. Od výrobce dojde plastový rámeček zaplněný destičkami s jamkami. Pro tyto testy je nutné mít čistou bakteriální kulturu, ze které se připraví suspenze zpravidla ve fyziologickém roztoku. Suspenze musí mít předepsaný obsah bakterií, který je určen tzv. optickou denzitou [34].

Pomocí automatické pipety je suspenze pipetována do mikrotitrační destičky, zpravidla o objemu 100 μ l. Některé testy se poté ještě převrství sterilním parafínovým olejem. Destičky jsou označeny laboratorním číslem a nechají se inkubovat 18 - 24 hodin při 37°C.

Při odečítání výsledků se hodnotí změna barvy jednotlivých jamek pomocí barevné škály, která je součástí manuálu dodávaného výrobce. U některých reakcí je nutné před odečtem přikápnout určité činidlo. Poté se testy odečítají okem a jsou zapisovány do počítače. Zde jsou vyhodnoceny pomocí softwaru Erba Expert dodávaného firmou Erba Lachema s.r.o. (Česká republika).



Obr. 22 Ukázka identifikačních mikrotitračních testů
(výrobce Erba Lachema)

12.6 Interpretace a vydávání výsledků

V naprosté většině případů, pokud se skutečně jedná o infekci krevního řečiště, je pomocí hemokultivace dosaženo pozitivních výsledků do 48 hodin, většinou ale již za 24 hodin. Pouze někteří vzácní původci infekcí jako např. *Haemophilus* spp., *Campylobacter* spp. nebo anaerobní bakterie, některé kvasinky a jiné mykotické organismy mohou být zachyceny za déle než 48 hodin. Na základě nálezu, jeho kvantifikace pro odlišení kontaminace VŠ rozhoduje o interpretaci a případném dalším doplnění komentářů.

Předběžný pozitivní výsledek je možné vydat za 24 hodin po pozitivitě vzorku, v případě biochemického dourčení kmene, stanovení konečné citlivosti, případně MIC je vydáván výsledek za 48 hodin. Určení původce septického stavu je nezbytné pro adekvátní antibiotickou léčbu a má zásadní význam z hlediska prognózy konkrétního pacienta.

13. Závěr

V této bakalářské práci byly popsány současné možnosti hemokultivačních technik a s nimi spojená identifikace mikroorganismů a stanovení antibiotické citlivosti. Infekce krevního řečiště, které se mohou vyvinout v sepse, patří i dnes, v době moderní medicíny, ke stavům s vysokou mortalitou. Snaha o neustálé zlepšování hemokultivačních technik je tedy na místě.

Vývoj automatizovaných hemokultivačních systémů znamenal jistě velký pokrok a v současné době bychom tyto automatizované mikrobiální detekční systémy našli téměř v každé laboratoři. Výhodou těchto systémů je nejen usnadnění práce v laboratoři, ale také rychlejší doba detekce pozitivních vzorků. V dnešní době je na trhu několik typů automatizovaných hemokultivačních systémů a rozhodovacím aspektem pořízení bývá většinou cena systému a hemokultivačních lahvíček.

Při zpracovávání pozitivních vzorků je důležitá nejen identifikace původce infekce, ale také stanovení antimikrobní citlivosti, což má pro lékaře a pro pacienta zásadní význam. Metody identifikace prodělaly v posledních letech asi největší vývoj. Zlomovým bodem je využití analyzátorů MALDI-TOF a VITEK®2, které dokážou identifikovat mikroorganismy v řádu několika hodin. Nevýhodou, nejvíce asi pro malé laboratoře, je vysoká pořizovací cena. Proto najdeme stále velký počet laboratoří, kde se využívají klasické biochemické testy. Z praxe je však často zřejmé, že pro lékaře je důležitější stanovení antibiotické citlivosti, aby mohla být zahájena adekvátní antibiotická léčba. Standardní metody stanovení citlivosti na ATB jako diskový difúzní test nebo mikrodiluční inhibiční koncentrace pracují s čistou narostlou kulturou, takže výsledky testů je možné získat za 24 - 48 hodin.

V roce 2018 vydal EUCAST novou metodiku pro rychlé vyšetření antimikrobní citlivosti přímo z hemokultivačních lahvíček (RAST). Tato metoda může být pro laboratoře velkým přínosem. Je ale zřejmé, že to budou pouze ty laboratoře, které jsou vybaveny analyzátořem typu MALDI-TOF pro rychlou identifikaci mikroorganismů v řádu několika hodin. Nevýhodou by se zde mohlo zdát, že je tato metoda zatím standardizována pro malý počet mikroorganismů.

Hlavním úskalím se tedy jeví přístrojová vybavenost laboratoře. Řada menších laboratoří, kam se řadí i Oddělení lékařské mikrobiologie v Nemocnici Boskovice, je stále odkázána na používání klasických komerčně dodávaných mikrotitračních testů s délkou kultivace 18 - 24 hodin a s tím souvisí i prodloužená doba odezvy pro vydání výsledků.

14. Použité zkratky

ATB	antibiotikum
BCID Panel	Blood Culture Identification Panel, identifikace z hemokultury
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Evropská společnost pro testování antimikrobní citlivosti
IKR	infekce krevního řečiště
LIS	laboratorní informační systém
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization Time of Flight, hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s analyzátozem doby letu
MH agar	Mueller-Hinton agar
MH-F agar	Mueller-Hinton agar s koňskou krví
MIC	minimum inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace
RAST	Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing, rychlé testování antimikrobní citlivosti
SOFA	Sequential/Sepsis-related Organ Failure Assessment, skórovací systém k hodnocení závažnosti zánětlivé odpovědi organismu na zátěž
VŠ	vysokoškolský pracovník

16. Seznam obrázků

Obr. 1 Manuální hemokultivační systém Signal™ Blood Culture systém (výrobce Oxoid, Thermo Scientific) V levé části je znázorněna pozitivní hemokultivační lahvička s vytlačeným médiem vlivem produkce CO ₂ , v pravé části je znázorněna hemokultivační lahvička před inokulací [16]	15
Obr. 2 Automatický hemokultivační přístroj VersaTREK® (výrobce TREK Diagnostic Systems) [20].....	16
Obr. 3 Hemokultivační lahvičky s médiem pro přístroj VersaTrek® (výrobce TREK Diagnostic Systems) [21].....	17
Obr. 4: Automatický hemokultivační přístroj BD BACTEC™ FX (výrobce Becton Dickinson Int.) [23].....	18
Obr. 5 Hemokultivační lahvičky s různým typem média pro přístroj BD BACTEC™ FX (výrobce Becton Dickinson Int.) [24]	18
Obr. 6 Automatizovaný hemokultivační přístroj BacT/ALERT® 3D (výrobce BioMérieux) [27].....	19
Obr. 7 Hemokultivační lahvičky pro přístroj BacT/ALERT®3D barevně odlišené pro snadnější manipulaci uživatele (Výrobce BioMérieux) [28]	19
Obr. 8 Hemokultivační přístroj BACT/ALERT® VIRTUO© s posuvným pásem a s automatickým systémem vkládání a vykládání hemokultivačních lahviček (výrobce BioMérieux) [29]	20
Obr. 9 ENTEROtest 24 - komerčně dodávaný set pro identifikaci enterobakterií (výrobce Erba Lachema) [35]	22
Obr. 10 Příprava směsi vzorku a matrice a nanesení na kovovou destičku [38]	23
Obr. 11 Příprava vzorku pro identifikaci mikroorganismu přímo z hemokultivační lahvičky metodou MALDI-TOF [43].....	24
Obr. 12 Systém Vitek® 2 pro identifikaci mikroorganismů a určení citlivosti na antibiotika (výrobce BioMérieux) [45].....	25
Obr. 13 FilmArray systém pro identifikaci mikroorganismů na bázi nukleových kyselin (výrobce Bio-fire) [48].....	26
Obr. 14 Hemokultivační přístroj BACT/ALERT® 3D 60 (Uživatelský manuál dodávaný výrobcem BioMérieux)	29

Obr. 15 Načítání čárového kódu u hemokultivačních lahviček	30
Obr. 16 Vkládání hemokultivačních lahviček do inkubační komory.....	30
Obr. 17 Zhotovení mikroskopického preparátu	31
Obr. 18 Očkování krevního agaru	32
Obr. 19 Inokulace vzorku na MH agar	33
Obr. 20 Dávkování ATB disků pomocí dispenzoru	33
Obr. 21 Ukázka komerčně dodávaných souprav pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (výrobce Erba Lachema)	34
Obr. 22 Ukázka identifikačních mikrotitračních testů (výrobce Erba Lachema)	35

17. Seznam tabulek

Tab. 1 Podmínky inkubace ploten pro vyšetření antibiotické citlivosti.....	27
--	----

18. Seznam literatury

- [1] ROZSYPAL, H., HOLUB, M., KOSÁKOVÁ, M. *Infekční nemoci ve standardní a intenzivní péči*. Praha: Univerzita Karlova, 2013. ISBN 978-80-246-2917-5.
- [2] Anesteziologie a intenzivní medicína: Definice sepse 2016 (Sepsis-3) [online]. 2016, 2016(5) [cit. 2019-04-04]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/anesteziologie-intenzivni-medicina/2016-5/definice-sepse-2016-sepsis-3-59644>
- [3] ČERMÁK, P. *et al. Mikrobiologická diagnostika infekcí krevního řečiště*. Praha: Maxdorf, 2008. Jessenius. ISBN 978-80-7345-142-4.
- [4] MARTINEZ, RM., WOLK, DM. Bloodstream Infections. *Diagnostic Microbiology of the Immunocompromised Host, Second Edition* [online]. American Society of Microbiology, 2016, , 653-689 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1128/microbiolspec.DMIH2-0031-2016. ISBN 9781555819033. Dostupné z: <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555819040.chap25>
- [5] WILLIAM, A. Blood Culture Systems: From Patient to Result. *Sepsis - An Ongoing and Significant Challenge* [online]. InTech, 2012, 2012-10-03 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.5772/50139. ISBN 978-953-51-0780-4. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/sepsis-an-ongoing-and-significant-challenge/blood-culture-patient-to-result-systems-from-patient-to-result>
- [6] VOTAVA, M., ONDROVČÍK, P. *Vybrané kapitoly z klinické mikrobiologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2002. ISBN 80-210-1805-4.
- [7] CAMPION, W., KULLBERG, B., ARENDRUP, M. Invasive Candidiasis. *New England Journal of Medicine* [online]. 2015, 373(15), 1445-1456 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1056/NEJMra1315399. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1315399>
- [8] PEUTHERER, J., SLACK, R., GREENWOOD, D. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Vyd. 1., čes. Praha: Grada, 1999. ISBN 80-716-9365-0.
- [9] SINGER, M., DEUTSCHMAN, C., SEYMOUR, CH. *et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. *JAMA* [online]. 2016, 315(8) [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1001/jama.2016.0287. ISSN 0098-7484.

Dostupné

z: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2016.0287>

- [10] VINCENT, JL., CANTRAINE, F., MORENO, R. *et al.* Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. *Critical care medicine* [online]. 1998 [cit. 2019-04-06]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9824069>
- [11] MÁČA, J., SKLIENKA, P., REIMER, P. *et al.* Nová definice sepse (sepsis-3): cíle, přednosti a kontroverze. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie*. 2018, 2018(1), 36 - 43.
- [12] WISPLINGHOFF, H., BISCHOFF, T., TALLENT SM. *et al.* Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2004, 39(3), 309-317 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1086/421946. ISSN 1058-4838. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/421946>
- [13] *Národní standardní vyšetřovací postup: Základní mikrobiologické vyšetření hemokultur metodou mikroskopickou a kultivační v automatickém hemokultivačním systému* [online]. Praha: MUDr. Josef Scharfen, CSc., 2014 [cit. 2019-04-02]. Dostupné z: http://www.splm.cz/dokumenty/NSVP_6_navrh1.pdf
- [14] BioMérieux, Inc., Příbalový leták k hemokultivačním lahvičkám Bact/ALERT®, Distributor: BioMérieux, France, verze: 03/2016
- [15] Signal Blood Culture System. In: *Www.oxid.cz: Thermo Fisher Scientific* [online]. Brno: Oxoid, 2001 [cit. 2019-04-03]. Dostupné z: http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=BC0100&c=UK&lang=EN
- [16] *Bacteriology and Mycology* [online]. 2010 [cit. 2019-04-08]. Dostupné z: http://people.upei.ca/jlewis/html/2a_demo.html
- [17] Magellan, *Příručka uživatele k hemokultivačnímu přístroji VersaTREK®*, TREK Diagnostic Systems, Distributor: BioVendor - Laboratorní medicína a.s., Česká republika 2018.

- [18] Příbalový leták k hemokultivačním lahvičkám VersaTREK®, TREK Diagnostic Systems, Distributor: BioVendor - Laboratorní diagnostika a.s., verze: L-TDST012-8, 2010-02
- [19] SAMUEL, P., PIMENTEL J., TIBBETTS, RJ. *et al.* Comparison of time to positivity of the VersaTREK® REDOX 80-mL and the REDOX EZ draw 40-mL blood culture bottles for common bacterial bloodstream pathogens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* [online]. 2011, 71(2), 101-105 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.06.001. ISSN 07328893. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732889311002203>
- [20] VersaTREK™ Instrument Accessories [online]. [cit. 2019-04-08]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/6420-30>
- [21] VersaTREK™, REDOX™ Media [online]. [cit. 2019-04-08]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/7102-44>
- [22] Příbalový leták k hemokultivačním lahvičkám BD Bactec FX, Becton Dickinson Int. verze: 12/2016
- [23] BD BACTEC™ FX Instruments [online]. [cit. 2019-04-09]. Dostupné z: <https://www.bd.com/en-uk/products/diagnostics-systems/blood-culture-systems/bactec-fx-system>
- [24] www.fishersci.com: BDTM BACTECTM Media [online]. [cit. 2019-05-06]. Dostupné z: <https://www.fishersci.com/shop/products/bd-bactec-media-lytic-10-anaerobic-f-bactec-lytic-10-anaerobic-f-medium-50-pk/23032513>
- [25] BioMérieux, *Uživatelská příručka Bact/ALERT 3D*, 01/2010
- [26] THORPE, TC *et al.* Bact/ALERT: Automated Colorimetric Microbial Detection System. *J Clin Micro* 1990. 28(7), 1608 - 1612
- [27] www.biomerieux.com: BACT/ALERT® 3D mikrobiální detekční systémy [online]. [cit. 2019-05-06]. Dostupné z: <https://www.biomerieux.cz/produkty/bactalertr-3d-mikrobialni-detekcni-systemy>
- [28] www.biomerieux-usa.com: BACT/ALERT® Culture Media [online]. [cit. 2019-05-06]. Dostupné z: <https://www.biomerieux-usa.com/bact-alert-culture-media>

- [29] www.biomeriex.cz: BACT/ALERT® Virtuo© [online]. [cit. 2019-05-06]. Dostupné z: <https://www.biomerieux.cz/produkty/bactalertr-virtuoc>
- [30] JACOBS, M., MAZZULLI, T., HAZEN, KC. *et al.* Multicenter Clinical Evaluation of BacT/Alert Virtuo Blood Culture System. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2017, 55(8), 2413-2421 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1128/JCM.00307-17. ISSN 0095-1137. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.00307-17>
- [31] ČERMÁK, P., SEDLÁKOVÁ, P., MEJSTRÍKOVÁ, L. *et al.* Growth and detection of aerobic bacterial pathogens in BacT/Alert FA, BacT/Alert SA, Bactec Plus Aerobic/F and Bactec Standard Aerobic/F. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství* [online]. 2006 [cit. 2019-05-06]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16958021>
- [32] MINASSIAN, A., NEWNHAM, R., KALIMERIS, E. *et al.* Use of an automated blood culture system (BD BACTEC™) for diagnosis of prosthetic joint infections: easy and fast. *BMC Infectious Diseases* [online]. 2014, 14(1) [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1186/1471-2334-14-233. ISSN 1471-2334. Dostupné z: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-14-233>
- [33] MIRRETT, S., HANSON, K., RELLER, L. Controlled Clinical Comparison of VersaTREK and BacT/ALERT Blood Culture Systems. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2007, 45(2), 299-302 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1128/JCM.01697-06. ISSN 0095-1137. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.01697-06>
- [34] VOTAVA, M. *et al.* *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010. ISBN 978-80-86850-04-8.
- [35] www.erbalachema.cz: ENTEROtest 24 [online]. [cit. 2019-05-07]. Dostupné z: <https://www.erbalachema.com/en/products-and-solutions/microbiology/mikrolatest-and-sensilatest/>
- [36] JANG, KS., KIM, HY. Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications. *Journal of Microbiology* [online]. 2018, 56(4), 209-216 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1007/s12275-018-7457-0. ISSN 1225-8873. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12275-018-7457-0>

- [37] MALDI TOF - špičková technologie pro mikrobiologii 21. století. *MEDILA BULLETIN* [online]. 2015, (03) [cit. 2019-05-07]. Dostupné z: http://www.medila.cz/website/download/bulletin/medila_bull_3_2015_KOMPLET.pdf/showFile.php?fileId=248
- [38] CLARK, AE., KALETA, EJ., ARORA, A. *et al.* Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2013, 26(3), 547-603 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1128/CMR.00072-12. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.00072-12>
- [39] CARLSSON, S., ALTUN, O., ULLBERG, M. *et al.* Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by MALDI-TOF MS following short-term incubation on solid media. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 2015, 64(11), 1346-1352 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1099/jmm.0.000168. ISSN 0022-2615. Dostupné z: <http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.000168>
- [40] FARON, M., BUCHAN B., LEDEBOER, N. *et al.* Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Use with Positive Blood Cultures: Methodology, Performance, and Optimization. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2017, 55(12), 3328-3338 [cit. 2019-04-25]. DOI: 10.1128/JCM.00868-17. ISSN 0095-1137. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.00868-17>
- [41] FEBBRARO, F., RODIO, D., PUGGIONI, G. *et al.* MALDI-TOF MS Versus VITEK®2: Comparison of Systems for the Identification of Microorganisms Responsible for Bacteremia. *Current Microbiology* [online]. 2016, 73(6), 843-850 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1007/s00284-016-1121-x. ISSN 0343-8651. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-016-1121-x>
- [42] LING, G., LIYAN, Y., QIANG, Z. *et al.* Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification. *Journal of Thoracic disease* [online]. 2014(5) [cit. 2019-04-24]. Dostupné z: <http://jtd.amegroups.com/article/view/2351/html>

- [43] FOTHERGILL, A., KASINATHAN, V., HYMAN, J. *et al.* Rapid Identification of Bacteria and Yeasts from Positive-Blood-Culture Bottles by Using a Lysis-Filtration Method and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrum Analysis with the SARAMIS Database. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2013, 51(3), 805-809 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1128/JCM.02326-12. ISSN 0095-1137. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.02326-12>
- [44] LING, W., TAM, P., LIU, ZK. *et al.* Evaluation of VITEK 2 Rapid Identification and Susceptibility Testing System against Gram-Negative Clinical Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2001, 39(8), 2964-2966 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1128/JCM.39.8.2964-2966.2001. ISSN 0095-1137. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.39.8.2964-2966.2001>
- [45] www.biomerieux.cz: VITEK 2 [online]. [cit. 2019-05-05]. Dostupné z: <https://www.biomerieux.cz/produkty/vitekr-2>
- [46] HA, J., HONG, SK., HAN, GH. *et al.* Same-Day Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria in Positive Blood Culture Broths Using Short-Term Incubation on Solid Medium with the MicroFlex LT, Vitek-MS, and Vitek2 Systems. *Annals of Laboratory Medicine* [online]. 2018, , 235-241 [cit. 2019-05-06]. Dostupné z: <https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.3343/alm.2018.38.3.235>
- [47] SALIMNIA, H., FAIRFAX, M., LEPHART, PR. *et al.* Evaluation of the FilmArray Blood Culture Identification Panel: Results of a Multicenter Controlled Trial. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2016, 54(3), 687-698 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1128/JCM.01679-15. ISSN 0095-1137. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.01679-15>
- [48] BIO-FIRE: FilmArray® Blood Culture System [online]. [cit. 2019-05-05]. Dostupné z: <https://www.biofire.com/>
- [49] Disková difúzní metoda EUCAST pro vyšetřování citlivosti k antibiotikům. www.szu.cz [online]. 2017 [cit. 2019-05-06]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/Diskova_metoda/EUCAST_Diskova_difuze_Obrazky_v_6.0.pdf

- [50] Metoda - Rychlé vyšetření antimikrobní citlivosti EUCAST (RAST*) přímo z pozitivních hemokultivačních lahviček. www.szu.cz [online]. 2019 [cit. 2019-05-07]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/RAST/Rychle_vysetreni_citlivosti_primo_z_pozitivnich_hemokultivacnich_lahvicek_EUCAST_v.1.0.pdf
- [51] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. [cit. 2019-05-06]. Dostupné z: <http://www.eucast.org>.