



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Laboratoř růstových regulátorů**

**Přímá identifikace bakterií z hemokultur  
pomocí MALDI-TOF MS**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor: **Bc. Nikola Glosová**  
Studijní program: N1501 – Biologie  
Studijní obor: Experimentální biologie  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: **MUDr., Mgr. Kateřina Bogdanová, Ph.D.**

Termín odevzdání práce: 2021

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Nikola Glosová
Název práce	Přímá identifikace bakterií z hemokultur pomocí MALDI-TOF MS
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	MUDr., Mgr. Kateřina Bogdanová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021
Abstrakt	<p>Infekce krevního řečiště a sepse představují život ohrožující stav. Rozhodující pro přežití pacienta je rychlá identifikace etiologického agens, určení citlivosti a nasazení cílené antibiotické terapie. V současné době rostoucího počtu rezistentních kmenů bakterií má rychlé určení antimikrobní citlivosti obzvláště velký význam. V rámci diplomové práce byla otestována home-made metoda přímé identifikace bakteriálních kmenů z pozitivních hemokultur pomocí MALDI-TOF MS. Výsledky identifikace byly porovnány s referenčními diagnostickými postupy, jako jsou mikroskopie a identifikace z bakteriálních kultur izolovaných na kultivačních půdách. Dále byla otestována metoda rychlého stanovení antimikrobní citlivosti (RAST) a její porovnání s referenčním postupem stanovení citlivosti pomocí diluční mikrometody. Metoda přímé identifikace z pozitivních hemokultur pomocí MALDI-TOF MS doplněná metodou rychlého stanovení citlivosti na antibiotika (RAST) umožnila rychlejší získání potřebných výsledků v porovnání s referenčními metodami a je tak velkým přínosem, který zvyšuje pravděpodobnost úspěšné terapie pacientů v sepsi.</p>
Klíčová slova	Identifikace bakterií, MALDI-TOF MS, rychlé stanovení antibiotické citlivosti (RAST)
Počet stran	67
Počet příloh	0
Jazyk	Česky (Anglicky)

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Nikola Glosová
Title of thesis	Direct identification of bacteria in blood culture using MALDI-TOF MS
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	MUDr., Mgr. Kateřina Bogdanová, Ph.D.
The year of presentation	2021
Abstract	<p>Blood stream infections are life threatening. To ensure the best chance of patient's survival, the most vital are fast identification of pathogenic microorganism, antibiotic susceptibility testing and application of effective antibiotic therapy. With increasing antimicrobial resistance it is especially important to assess antimicrobial susceptibility. In the thesis, the rapid direct identification of bacteria from positive blood cultures was tested using MALDI-TOF MS. The results were compared to standard identification methods: microscopy and identification of bacterial cultures isolated on growth medium. Next, the rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) was performed and compared to standard broth microdilution method. The combination of direct identification from positive blood cultures together with rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) shortened time to results as compared to reference methods. As such, these methods show potential to increase likelihood of successful treatment of patients in sepsis.</p>
Keywords	Bacteria identification, MALDI-TOF MS, rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST)
Number of pages	67
Number of appendices	0
Language	Czech (English)

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Ráda bych poděkovala vedoucí diplomové práce MUDr., Mgr. Kateřině Bogdanové, Ph.D. za vedení, trpělivost, věnovaný čas a vysvětlení dané problematiky.

# Obsah

1. Úvod .....	8
2. Cíl práce.....	9
3. Teoretická část.....	10
3.1 Infekce krevního řečiště (IKR).....	10
3.1.1 Infekční endokarditida (IE).....	10
3.1.2 Katéetrová sepe .....	11
3.2 Sepse a septický šok .....	12
3.3 Mikrobiologická diagnostika infekcí krevního řečiště .....	13
3.3.1 Odběr krve pro kultivační vyšetření .....	13
3.3.2 Transport materiálu .....	15
3.3.3 Kultivace hemokultur .....	15
3.4 Manuální systémy .....	16
3.4.1 Dvoufázová (Castanedova) hemokultura.....	16
3.4.2 Klasická hemokultura .....	16
3.4.3 Hemokultura s detekčním systémem na základě tlaku plynu – Signal (Oxoid). ..	17
3.5 Automatizované systémy .....	17
3.5.1 Hemokultivační systém BacT/Alert .....	18
3.5.1.1 Hemokultivační lahvičky pro BacT/Alert .....	19
3.5.2 Hemokultivační systém Bactec.....	20
3.5.2.1 Hemokultivační lahvičky pro Bactec.....	20
3.6 Mikroskopie .....	21
3.6.1 Barvené preparáty.....	21
3.7 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS.....	22
3.7.1 MALDI matrice.....	23
3.7.2 Přímá identifikace bakterií z hemokultury pomocí MALDI-TOF MS.....	24
3.8 Stanovení antibiotické citlivosti .....	25
3.8.1 Difúzní testy .....	27
3.8.2 Diluční testy.....	27

3.9 Rychlé stanovení antimikrobní citlivosti (RAST) bakterií z pozitivních hemokultur..	28
4. Materiál a metody.....	30
4.1 Přístroje a vybavení .....	30
4.2 Použité chemikálie .....	30
4.3 Pracovní postup a kultivace mikroorganismů .....	31
4.4 Barvení podle Grama.....	31
4.4.1 Hodnocení preparátů.....	32
4.5 Zpracování pozitivních hemokultur pro identifikaci pomocí MALDI-TOF MS .....	32
4.6 Identifikace pomocí MALDI-TOF MS.....	33
4.6.1 Interpretace výsledků MALDI-TOF MS .....	34
4.7 Metoda rychlého stanovení antibiotické citlivosti (RAST) .....	34
4.7.1 Interpretační tabulky RAST a jejich použití .....	36
5. Výsledky.....	41
5.1 Přímá identifikace z hemokultur pomocí MALDI-TOF MS .....	41
5.2 Rychlé stanovení antimikrobní citlivosti (RAST) .....	45
6. Diskuze .....	56
7. Závěr.....	61
8. Seznam zkratk .....	62
9. Použitá literatura .....	63

# 1. Úvod

Lidské tělo obývá v průměru  $10^{11}$ - $10^{15}$  mikroorganismů, které jsou součástí běžné mikrobiální flóry. Bakterie a jiné mikroorganismy se vyskytují na povrchu lidské kůže, na ústních, střevních a ostatních slizničních površích (oko, urogenitální systém apod.) běžně nepředstavují pro imunokompetentního jedince riziko.

Za určitých okolností, jako jsou porušení povrchových bariér, snížení nespecifické a specifické imunitní odpovědi nebo při zhoršení celkového psychosomatického stavu člověka, se však tyto organismy mohou stát pro člověka zdrojem takzvaných endogenních infekcí. Jestliže jsou zdrojem infekce mikroorganismy z okolního prostředí, hovoříme o takzvaných exogenních infekcích.

Pokud se do krevního řečiště dostane velké množství bakterií, mohou vyvolat celkovou reakci organismu na infekci - sepsi, popřípadě až septický šok, nebo mohou být krví zaneseny do tkání různých orgánů a vyvolat lokální infekci (Lobovská, 2001).

Septický šok často vede až ke smrti pacienta, proto je nutná rychlá mikrobiologická identifikace etiologického agens, stanovení citlivosti a co nejdříve aplikovaná cílená antimikrobiální léčba. Tradiční mikrobiologické vyšetřovací metody jsou založeny na fenotypických a biochemických analýzách, které zahrnují mikroskopii, zdlouhavé kultivační procesy vyvolávajícího mikroorganismu, které jsou následovány dalšími metodami pro specifickou identifikaci (Beneš, 2009). V poslední době jsou některé analýzy nahrazeny nebo doplněny rychlejšími metodami, které umožní dřívější diagnostiku. Mezi tyto metody patří hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry). Je to rychlá technika, která umožňuje identifikaci mikroorganismů přímo z pozitivních hemokultur (La Scola a Raoult, 2009).

Při rostoucím počtu bakterií rezistentních na antibiotika je obzvláště důležitá rychlá stanovení citlivosti na antibiotika. Evropská komise pro stanovení antimikrobní citlivosti (EUCAST) vyvinula rychlou metodu stanovení antimikrobní citlivosti (RAST), s možností získání výsledků již po 4 až 6 hodinách v porovnání s 16 až 20 hodinami u klasické difúzní metody stanovení citlivosti (Jonasson et al., 2020; Åkerlund et al., 2020).

Díky zmíněným metodám přímé identifikace infekčního agens z pozitivních hemokultur pomocí MALDI-TOF MS a rychlého stanovení antimikrobní citlivosti (RAST) lze u pacienta v septickém stavu rychleji aplikovat cílenou antibiotickou terapii a podstatně tak zvýšit pravděpodobnosti přežití.



## 2. Cíl práce

1. Verifikovat spolehlivost home-made vypracované metodiky pro přímou identifikaci bakterií z pozitivních hemokultur pomocí MALDI-TOF MS
2. Srovnat výsledky mikroskopie a identifikace vykultivovaných bakterií s výsledky přímé identifikace z hemokultur pomocí MALDI-TOF MS
3. U vybraných bakteriálních kmenů určených přímou identifikací aplikovat metodu rychlého stanovení citlivosti na specifická antibiotika (RAST)
4. Zhodnotit potenciál a přínos přímé identifikace z pozitivních hemokultur pomocí MALDI-TOF MS a RAST metody

### 3. Teoretická část

#### 3.1 Infekce krevního řečiště (IKR)

K infekci krevního řečiště (IKR) dochází průnikem mikroorganismů přes povrchové bariéry, kůži a sliznice, následovaným jejich pomnožením v krvi. Tento stav je většinou provázen celkovými příznaky, jako jsou horečka, zimnice, třesavka a zvýšení zánětlivých parametrů, při rozvoji sepse dále dochází ke změnám tlaku. Po napadení infekčním agens organismus aktivuje přirozené a adaptivní mechanismy imunitního systému (Čermák et al., 2008).

IKR se mohou dělit do několika jednotek (Calandra et Cohen, 2005):

- Primární IKR (IKR neznámého původu) – je potvrzena pozitivní hemokulturou, zachycené infekční agens není kontaminací a zároveň není spojeno s jiným infekčním procesem, včetně infekce intravaskulárního katétru. Tato skupina tvoří v závislosti na jednotlivých studiích 5-30 % všech IKR.
- Sekundární IKR (kromě katéetrových IKR) – je rovněž potvrzena pozitivní hemokulturou, zachycené infekční agens není kontaminací a zdrojem IKR jsou infekce v jiném místě organismu. Nejčastěji se jedná o močové cesty, gastrointestinální trakt, dýchací cesty a jiné. Dominují zejména uroinfekce a pneumonie (Kolář et al., 2002). Nejvíce zastoupenými mikrobiálními druhy jsou gramnegativní tyčinky a enterokoky.
- Infekční endokarditida
- Katéetrová sepe

Skladba etiologických agens IKR se neustále mění, v 70. letech se nejčastěji uplatňovaly především kmeny *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* a *Staphylococcus aureus*. V současné době je zvýšená četnost koaguláza-negativních stafylokoků a enterokoků, pravděpodobně v souvislosti s větší invazivitou soudobé medicíny včetně zvýšeného používání umělých materiálů (katétry, endoprotézy, apod.) (Čermák et al., 2008; Jones et al., 1999; Jindrák, 2000; Hyánek et al., 2000).

##### 3.1.1 Infekční endokarditida (IE)

IE je život ohrožující onemocnění, které je způsobeno přítomností infikovaného trombu lokalizovaného na srdeční chlopni popřípadě na endokardu. Pro účinnou terapii je důležité její včasné zahájení. IE se dělí na endokarditidy, které postihují nativní chlopně (NVE – native valve endocarditis) a endokarditidy na chlopenních náhradách (PVE – prosthetic valve endocarditis). IE může probíhat v různých formách, jako akutní, subakutní nebo

chronická endokarditida. Akutní forma má náhlý začátek a probíhá pod obrazem sepse. Její průběh je těžký, rychlý a může dojít k destrukci dosud funkčních chlopní. Akutní forma vyžaduje téměř vždy chirurgický zákrok (Koukalová et al., 2011).

Nejčastějšími původci IE jsou běžně se vyskytující bakterie, ale může se jednat i o mykotické agens, dále rickettsie, chlamydie, spirochety, aktinomycety a mykobakterie. V 80-90 % se jedná o grampozitivní bakterie, zejména stafylokoky, streptokoky a enterokoky. U 5 až 24 % IE se nepodaří objasnit původce infekčního agens.

Projevy IE jsou dosti různorodé. Typicky se IE projeví horečkami, které jsou až u 90 % případů a mohou být doprovázen třesavkami a zimnicí. Dochází k embolizaci do kůže a spojivek. Nemocný při subakutním průběhu postupně chřadne, pociťuje slabost, trpí nechutenstvím a anemií. Často dochází k výraznému úbytku hmotnosti (Beneš et al., 2009; Havlík et al., 2002).

### 3.1.2 Katétrová sepse

Používání plastových intravaskulárních katétrů je nedílnou součástí moderní lékařské praxe, protože představují nezbytný cévní přístup, ale jejich aplikace je spojena s celou řadou nežádoucích komplikací (Raad et Hanna, 2002). Zavedení intravaskulárních katétrů zvyšuje riziko vzniku lokální infekce (tromboflebitidy, infekcí měkkých tkání v okolí katétru), IKR, septické trombózy, endokarditidy a jiných metastatických infekcí. Cévní katétrů jsou jednou z nejčastějších příčin infekcí vzniklých v souvislosti s poskytováním zdravotnické péče (Edgeworth et al., 1999).

Vznik katétrové infekce je závislý na typu použitého katétru, na frekvenci manipulace s katétre a na kondici pacienta.

Existují čtyři potenciální zdroje kolonizace katétru a katétrové sepse (Čermák et al., 2008):

- Kůže v místě vpichu – zdrojem je kolonizující mikroflóra, nejčastěji koagulaza-negativní stafylokoky. Bakterie migrují přes poškozený kožní kryt a způsobují kolonizaci intravaskulární části katétru. Jedná se o nejčastější zdroj katétrové infekce.
- Katétrový rozbočovač (hub) – z kontaminované mimotělní části katétru mohou bakterie migrovat podél vnitřního povrchu katétru až do krevního oběhu. Většinou se nevyskytují známky infekce v místě vpichu katétru.
- Hematogenní rozsev infekce – bakterie ze vzdáleného místa (dýchacích cest, gastrointestinálního traktu nebo močových cest) kolonizují cévní katetr.

- Kontaminace infuzního roztoku – byly popsány infekce v souvislosti s podáním kontaminované infuzí, převážně se jedná o parenterální výživné roztoky a lipidové emulze, které mohou podporovat růst bakterií a hub.

### 3.2 Sepse a septický šok

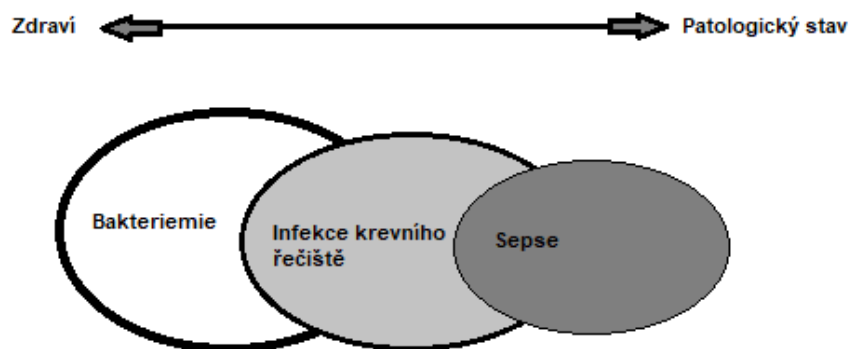
Sepse, nebo nověji septický syndrom, je klinický projev aberantní reakce imunitního systému na infekci. Představuje závažný stav charakterizovaný spuštěním kaskády patologických dějů, který bez terapeutického zásahu ohrozí život pacienta.

Sepse spadá pod skupinu syndromu systémové zánětlivé odpovědi (SIRS – systemic inflammatory response syndrome). Ve zkratce může být sepsa definovaná jako SIRS z infekčních příčin (obrázek 1) (Čermák et al., 2008). Z neinfekčních příčin může být zdrojem SIRS velký chirurgický zákrok, aseptická pankreatitida a podobné stavy. Klinická diagnóza SIRS, sepsa a septického šoku se opírá o přítomnost alespoň dvou diagnostických kritérií:

- Teplota těla vyšší nad 38 °C nebo pod 36 °C
- Srdeční sekvence nad 90 tepů/min
- Dechová frekvence nad 20/min nebo hypokapnie PaCO<sub>2</sub> pod 4,3 kPa (32 mm Hg)
- Počet leukocytů nad 12x10<sup>9</sup>/l nebo pod 4x10<sup>9</sup>/l nebo je přítomno více než 10 % jejich nezralých forem

Těžká sepsa je navíc spojena s hypotenzí, hypoperfúzí tkání nebo orgánovou dysfunkcí, popřípadě až multiorgánovým selháním (Beneš et al., 2009). Pokud pacient nereaguje na terapii hypotenze, splňuje kritéria pro diagnózu septického šoku. Při septickém šoku dojde k oběhové nedostatečnosti, která je způsobena vazodilatací vznikající na podkladě aktivace tvorby velkého množství oxidu dusnatého endotelem v přítomnosti endotoxinu gramnegativních bakterií (Rokyta et al., 2015).

Sepsa a septický šok je obávanou diagnózou s nejistou prognózou. Smrtnost se pohybuje kolem 30 % a v případě septického šoku přesahuje až 70 %. Prognóza závisí na obranyschopnosti pacienta a množství a virulenci infekčního mikroorganismu. Mezi rizikové faktory rozvoje sepsa patří například vyšší věk, těhotenství, některá onemocnění, úrazy, zavedené katétry a jiné (Havlík et al., 2002).



**Obrázek 1:** Vztah bakteriémie, infekce krevního řečiště a sepse (upraveno podle Čermák et al., 2008).

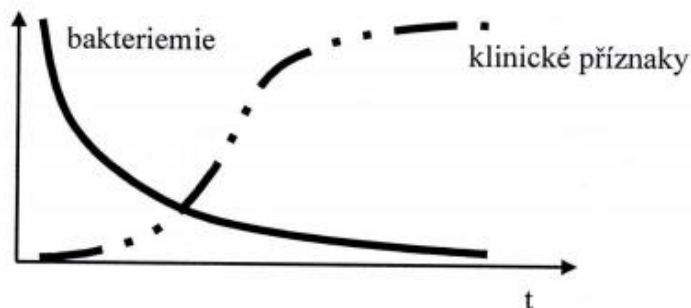
### 3.3 Mikrobiologická diagnostika infekcí krevního řečiště

#### 3.3.1 Odběr krve pro kultivační vyšetření

Obecně je pro přesnou diagnostiku infekčního agens nutné, aby byl správně provedený odběr adekvátního klinického materiálu se zajištěním rychlého transportu do mikrobiologické laboratoře (Koukalová et al., 2005). Pro mikrobiologické vyšetření jsou dána obecná pravidla pro správný odběr:

- Odběr dostatečného množství materiálu
- Provedení odběru za aseptických podmínek do sterilních odběrových nádob
- Co nejkratší transport do laboratoře
- Spolehlivé označení každého vzorku a vyplnění průvodního listu

Při podezření na infekci krevního řečiště se odebírá vzorek krve venepunkcí. Krev se aplikuje do speciálních lahviček s obsahem kultivačního media. Lahvičky mají nejen transportní, ale i kultivační funkci. Hovoříme o takzvaných hemokulturách. Aby se co nejvíce zvýšila pravděpodobnost záchytu etiologického agens a snížilo riziko kontaminace vzorku, je velice důležitá správná technika a načasování odběru hemokultur. Zde se nejvíce projeví zkušenosti ošetřujícího zdravotnického personálu. Hemokultury jsou odebírány u pacientů s podezřením na infekci cévního řečiště, pokud možno ještě před nasazením antibiotické terapie. Odběr hemokultury by měl provádět vyškolený zdravotnický personál (Juránková et al., 2011).



**Obrázek 2:** Obecný vztah mezi průběhem bakteriémie a klinickými příznaky (upraveno podle Koukalová et al., 2005).

Bakterie se mohou v cévním řečišti vyskytovat kontinuálně, nebo intermitentně. Nejvhodnější doba pro odběr při intermitentní IKR je při vzestupu teploty nebo při začátku třesavky. Klinik se těmito příznaky při odběrech řídí, protože se jedná o reakci pacienta na přítomnost bakterií v krevním oběhu. Záchyt agens je v tuto dobu nejpravděpodobnější (obrázek 2). V případě, že se u pacienta vyskytují kontinuální horečky (kontinuální bakteriémie), doporučuje se provést odběr alespoň tří párů hemokultur v průběhu 2 hodin s odstupem minimálně 15 minut. Pacient však nemusí pokaždé reagovat na infekční agens v oběhu teplotou. V takovém případě, pokud je vysloveno podezření na IKR, odebírají se hemokultury takzvaně za studena (u afebrilního pacienta).

Nejběžnějším způsobem odběru krve pro diagnostické účely je odběr venepunkcí z periferní žíly. K odběru mohou také sloužit intravenózní katétrů. Ty jsou však často zdrojem IKR, proto je mnoho autorů nedoporučuje (Čermák et al., 2008). Naopak, při podezření na katérovou sepsi nebo kolonizaci katétru, se doporučuje paralelní odběr venepunkcí a zároveň odběr ze suspektní kanyly. Pozitivní kultivace prokázaná ze vzorku odebraného přes katetr potvrdí jeho kolonizaci a nutnost výměny.

Hemokultivační lahvičky musí být před odběrem řádně připravené. Z vrchní části lahvičky se sloupne ochranný kryt a oblast perforačního septa se vydezinfikuje 70% isopropyl alkoholem. Po lokalizaci a palpaci vény je nutné dezinfikovat kůži v místě vpichu pro redukci množství kožní mikroflóry (Lamy, 2016; Juránková et al., 2011).

Na hemokulturách musí být řádně označen čas odběru a místo, ze kterého byla krev odebrána. U dětských pacientů se odebírá asi 5-10 ml krve, u novorozenců je možné odebrat jen 0,5-3 ml krve. U dospělých se odebírá 10-20 ml krve. Krev se odebírá do sterilní injekční stříkačky, a po výměně jehly se krev inokuluje do dvou kultivačních lahviček – jedna pro aerobní a druhá pro anaerobní kultivaci (v případě pediatrických kultivačních lahviček se inokuluje do jediné). Lahvičky obsahují výživný bujón a protisrážlivý prostředek. Pokud je odběr provede správně, a inokulace provedena rychle, je maximálně zachována životaschopnosti bakterií.

Kultivace v hemokulturách probíhá za aerobních a anaerobních podmínek. Touto kombinací se zajistí pokrytí širšího spektra možných infekčních agens. Někteří autoři považují za optimální variantu odběr tří typů hemokultur – 2x aerobní a 1x anaerobní, nebo 1x aerobní, 1x anaerobní a 1x mykotickou (speciální půda pro kultivaci kvasinek a plísní). Všechny odběry se musí přizpůsobit stavu pacienta a suspektnímu etiologickému agens (Juránková et al., 2011; Čermák et al., 2008).

Je vhodné, aby byl po odběru proveden i stěr z místa vpichu na kultivaci. Analýza stěru může vyloučit nebo potvrdit případnou kožní kontaminaci, především pro interpretaci nálezu koaguláza-negativních stafylokoků. V případě, že dojde k izolaci stejného fenotypu téhož druhu stafylokoků, včetně identických antibiogramů z hemokultury i kožního stěru, je kontaminace vysoce pravděpodobná.

### 3.3.2 Transport materiálu

Odebraný biologický materiál pro mikrobiologické vyšetření by měl být co nejrychleji transportován do laboratoře. Každé případné zdržení snižuje úspěšnost diagnostiky, zejména co se týká vzorků pro bakteriologické vyšetření. Pokud není možný okamžitý transport, tak se stěry/výtěry, hnis a hemokultury uchovávají při pokojové teplotě. Naopak moč, stolice na průkaz antigenu a toxinu *Clostridioides difficile* a krev na sérologická vyšetření se skladují při chladničkové teplotě (4-8 °C).

Období a podmínky transportu mikroorganismy nejlépe snášejí v tekutém materiálu a hemokulturách. V případě hemokultivačních lahvíček do automatických systémů Bactec a BacT/Alert výrobci garantují stabilitu vzorku v lahvičce po dobu 24 hodin při pokojové teplotě. Hemokultury je nutno chránit před přímým světlem po dobu transportu (Průša et al., 2012; Koukalová et al., 2013; Juránková et al., 2011).

### 3.3.3 Kultivace hemokultur

Kultivační techniky v mikrobiologii jsou známé již z historie, počínaje Kochem (1843-1910). Účelem kultivace biologického materiálu je průkaz životaschopných bakteriálních buněk v čistých kulturách, jejich identifikace a stanovení citlivosti nebo rezistence k antibiotikům. Medián doby pro dosažení pozitivita hemokultury je asi 15 hodin (Peralta et al., 2006; Afshari et al., 2012).

Vývoj metody hemokultivace má dlouhou historii. První zmínka o odběru krve od infikovaného pacienta publikovaná v roce 1869 doporučovala použití pijavic nebo naříznutí žíly (Hansen, 2016). Mezi první metody hemokultivace patřila metoda kultivačního koláče,

kde kultivačním médiem byla vlastní krev smíchaná s agarem a nalitá do Petriho misky. Ovšem tato metoda byla velmi zdlouhavá náchylná ke kontaminaci (Čermák et al., 2008).

Až do 90. let se pro záchyt bakterií z krevního řečiště používaly dva typy hemokultivačních nádobek. První z nich byly transportní nádoby pod názvem Hemotest I a Hemotest D, které obsahovaly jen protisrážlivé činidlo, a kultivačním substrátem byla samotná odebraná krev. Druhou možností byly nádoby s bifázickou (Castanedovou) kultivační půdou (Čermák et al., 2008). V průběhu 90. let byly postupně zavedeny automatizované kultivační systémy.

### 3.4 Manuální systémy

U manuálních systémů probíhá kultivace hemokultur v inkubátoru a výsledky se hodnotí vizuálně. Nevýhodou těchto systémů je velká pracnost a zvýšené riziko kontaminace.

#### 3.4.1 Dvoufázová (Castanedova) hemokultura

Systém se skládá z kombinace dvou kultivačních médií. Nádobka obsahuje tekuté kultivační médium (tekutá fáze) a pevné médium (agar), který je nalitý šikmo na stěně kultivační nádoby. V tekutém médiu dochází k pomnožení bakterií a nádoby se minimálně jednou denně nakloní, aby došlo k přelití tekutého média přes agar a inokulaci. Případná pozitivita se hodnotí vizuálně růstem bakteriálních kolonií na pevné fázi nebo zákalem či hemolýzou v tekutém kultivačním médiu. Tyto hemokultury není nutné přeočkovávat, proto je zde i nižší riziko kontaminace. Mezi nejrozšířenější systémy patří Hémoline (BioMérieux) z Francie a Septi-Chek ze Švýcarska. Tyto bifázické hemokultivační systémy užívají jako tekutá média například thioglykolátový bujon, trypto-sójový bujon, nebo trypto-sójový bujon s pryskyřicí, který má za funkci eliminaci antibiotik. Pevná fáze může obsahovat vrstvu čokoládového agaru, MacConkeyova agaru nebo sladinový agaru. U dospělých pacientů se 70 ml nádoba inokuluje 8-10 ml krve, pediatrické nádoby jsou o objemu 20 ml a inokulují se 1-3 ml krve (Čermák et al., 2008).

#### 3.4.2 Klasická hemokultura

Skleněné lahvičky obsahují pouze tekutou kultivační půdou. Hemokultury se vyrábí pro aerobní a anaerobní kultivaci se speciální atmosférou. Minimální objem jedné kultivační půdy je 50 ml. Poté co je hemokultivační lahvička inokulovaná a transportována do laboratoře, kultivuje se v termostatu 5 až 7 dní při  $35\pm 1$  °C. Po dobu kultivace se opakovaně sleduje vzhled kultivační půdy, pokud dojde k zakalení, vzorek je vyočkován na agar



a zároveň je provedena mikroskopie. Nevýhodou je krev obsažená v kultivační půdě, která ztěžuje hodnocení případného zákalu (Čermák et al., 2008).

### 3.4.3 Hemokultura s detekčním systémem na základě tlaku plynu – Signal (Oxoid)

V tomto případě je v hemokultivační lahvičce růst bakterií detekován pomocí změny tlaku plynu (CO<sub>2</sub>). Kultivační systém se skládá ze dvou částí, první je běžná hemokultivační lahvička, která je naplněna tekutým médiem. Tato lahvička je uzavřená pryžovou propichovací zátkou a inokuluje se běžným způsobem. Druhá lahvička je z plastového materiálu s dlouhou injekční jehlou a uzavřena víčkem. Metoda probíhá tak, že se v laboratoři obě lahvičky spojí a díky metabolismu rostoucích bakterií dojde k vytváření plynu, a tím se médium ze skleněné lahvičky vytlačuje přes jehlu do lahvičky plastové. Pozitivitu či negativitu je možné detekovat pouhým okem. Tato metoda je určena pro kultivaci aerobních nebo fakultativně anaerobních bakterií (Čermák et al., 2008).

## 3.5 Automatizované systémy

Základním principem automatizovaných systémů je detekce změn, které jsou způsobené růstem bakterií v kultivačním médiu. Vysoká citlivost senzorů a kontinuální měření výrazným způsobem zkracují čas detekce positivity. Tyto systémy v průběhu let nahrazovaly manuální systémy, omezila se opakovaná manipulace se vzorky a snížilo se riziko kontaminace.

Jako první se objevily automatické systémy Bactec a BacT/ALERT, které se i v současné době používají nejčastěji.

První systémy BACTEC využívaly pro detekci lahvičky s kultivačním médiem, který obsahoval látky značené radioizotopy <sup>14</sup>C. Množící se mikroorganismy při využívání substrátu produkovaly radioaktivní CO<sub>2</sub>, který byl detekován. Problémem byl samozřejmě radioaktivní odpad a tak byla v roce 1984 uvedena na trh nová generace Bactec přístrojů, která měřila CO<sub>2</sub> spektrofotometricky. Z hemokultivačních lahviček musel být pro měření CO<sub>2</sub> (radioizotopové i spektrofotometrické) jehlou odebrán vzorek plynu nad hladinou. Systém byl v tomto případě „otevřený“ a mnohem více náchylný na kontaminaci (Ryan et Murray, 1993).

O pár let později byl na trh uveden systém BacT/ALERT, který rovněž detekoval CO<sub>2</sub> produkovaný mikroorganismy při jejich metabolismu, ale na základě nepřímého měření změny pH. Na rozdíl od systému Bactec nevyžadoval systém BacT/ALERT pro detekci CO<sub>2</sub> odběr z kultivační lahvičky, což významně snížilo frekvenci kontaminace. Jednalo se o takzvaný „uzavřený“ systém (Ryan et Murray, 1993).

Neinvazivní, uzavřená metoda byla následně převzata i výrobcí systému Bactec a aplikována v přístroji BACTEC 9000 series, který měřil změnu pH na základě fluorescenčních indikátorů (Chamberland, 2018).

Systém BacT/ALERT jako první měřil změny produkce CO<sub>2</sub> kontinuálně. Jednalo se o přelomový okamžik v mikrobiologické diagnostice pozitivních hemokultur.

### 3.5.1 Hemokultivační systém BacT/Alert

Systém BacT/Alert představuje tepelně izolovaná a temperovaná skříň. Kultivační lahvičky se vzorky se vkládají do válcových otvorů (buňky), které jsou tvořeny z vodorovných kovových bloků. Během kultivace dochází k třepání. Každý blok je označen písmenem a jednotlivé pozice číslem. Uvnitř každé buňky je umístěna dioda, která emituje paprsek červeného světla na dno kultivační lahvičky a měřicí fotodioda (obrázek 3). Na dně kultivační lahvičky se nachází speciální indikátor na bázi tekutých emulzí reagující kolorimetricky na změnu pH.

Dioda vyhodnocuje pozitivitu nebo negativitu vzorku, měření probíhá každých 10 minut. Systém je vybaven autonomní jednotkou, která obsahuje řídicí elektroniku s pamětí a baterií, díky tomu je při výpadku elektrické energie schopen nepřetržité činnosti až po dobu 24 hodin, s výjimkou zahřívání a třepání lahviček. Celý přístroj je řízen osobním počítačem se zálohovaným zdrojem, snímačem čárového kódu lahviček a tiskárnou.

Získaná naměřená data jsou přepočítána na koncentraci CO<sub>2</sub>. Hodnotí se zvýšení produkce CO<sub>2</sub> oproti počátečnímu stavu a rychlost změny hladiny CO<sub>2</sub>. Na pozitivitu/negativitu vzorku upozorní kontrolky nad kultivačními bloky.

Systém BacT/Alert 120 umožňuje kultivaci s kapacitou 120 lahviček a BacT/Alert 240 kultivaci pro 240 lahviček. Každá skříň má možnost nastavení teploty, doporučená kultivační teplota je 35-37 °C. Jelikož tento systém nemá možnost chlazení a za chodu se přístroje zahřívají, nelze ho použít pro kultivaci vzorků při pokojové teplotě. Pro kultivaci hemokultur je doporučená doba 5-7 dní (Čermák et al., 2008).



**Obrázek 3:** Princip kolorimetrické detekce změny pH způsobené produkcí CO<sub>2</sub> množícími se bakteriemi v hemokultuře (upraveno podle Čermák et al., 2008).

### 3.5.1.1 Hemokultivační lahvičky pro BacT/Alert

Pro každý systém jsou vyráběny speciální hemokultivační lahvičky. Standardní kultivační lahvičky standard aerobic (SA) a standard anaerobic (SN), které v základu obsahují kasein natrávený pankreatickými enzymy, komplex aminokyselin a sacharidů, sójovou hmotu natrávenou papainem a polyanethol sulfonát sodný (SPS):

- BacT/Alert SA Standard aerobic – modrý uzávěr, objem média 40 ml s prostředím obohacným o CO<sub>2</sub> a O<sub>2</sub>.
- BacT/Alert SN Standard anaerobic – purpurový uzávěr, objem média 40 ml s přidavkem menadionu, heminu, redukčního agens a prostředí, které je obohaceno o CO<sub>2</sub> a N<sub>2</sub>.

Další typy lahviček obsahují média s adsorbčními polymery pro neutralizaci antimikrobní aktivity, určená pro záchyt růstově náročných mikroorganismů (FAN – Fastidious Antimicrobial Neutralization):

- BacT/Alert FA (FAN aerobic) – kvalitnější záchyt *Burkholderia* sp., kvasinek *Candida albicans* a *Cryptococcus neoformans*. Objem média je 40 ml s prostředím obohacným o O<sub>2</sub>.
- BacT/Alert FN (FAN anaerobic) – vyšší záchyt stafylokoků, enterobakterií a *Bacteroides fragilis*. Objem média je 40 ml, prostředí je obohaceno o N<sub>2</sub> a průměrný detekční čas je kratší.
- BacT/Alert PF (Pediatric FAN) – používány v pediatrii, prostředí je obohaceno O<sub>2</sub>. Objem média je 20 ml. Zmenšený objem média znamená zmenšený objem odebrané krve a tím snížení pravděpodobnosti záchytu.

Média pro detekci mykobakterií:

- BacT/Alert MP Mycobacteria – Objem 10 ml, médium je obohaceno o Middlebrookovu půdu s SPS a glycerolem. Detekuje a kultivuje mykobakterie.

### 3.5.2 Hemokultivační systém Bactec

Bactec má stejně navrženou temperovanou skříň, jakou má BacT/Alert. Systém funguje na fluorescenčním principu, dioda emituje světlo, které reaguje s fluoreskujícím materiálem v senzoru lahvičky. Senzor se rovněž nachází na spodní části kultivační lahvičky pod membránou selektivně propustnou pro CO<sub>2</sub>. Jestliže dojde k zvýšení koncentrace CO<sub>2</sub>, klesá hodnota pH, a tím klesá hladina fluorescence, která je měřena pomocí fotodiody. Systém Bactec se dále liší ve zpracování naměřených dat. V tomto případě se data zpracovávají v mikropočítači, který je umístěn v každém kultivačním bloku skříně. Díky tomu je možné kultivovat více variant kultivačních lahviček vedle sebe při rozdílných teplotách (Čermák et al., 2008).

#### 3.5.2.1 Hemokultivační lahvičky pro Bactec

Přístroje Bactec 9240, 9120 a 9050 používají stejné kultivační lahvičky (Becton Dickinson). Základem pro všechna kultivační média je hydrolyzovaná sójová půda s kaseinem, kvasnicový extrakt, výtažky ze zvířecích tkání, dextróza, sacharóza, fruktóza, menadion, pyridoxinhydrochlorid, arginin, hemin, thioly, citrát sodný, fosforečnan draselný a polyanethol sulfonát sodný (SPS). Ve svém portfoliu nabízí firma Becton široký rozsah kultivačních médií pro aerobní, anaerobní kultivaci, pediatrické a speciální kultivační média pro kultivaci kvasinek, plísní nebo mykobakterií:

- Bactec Standard Aerobic/F a Anaerobic/F – objem média je 25 ml, pro aerobní a anaerobní kultivaci bakterií a mykotických agens
- Bactec Plus Aerobic/F a Anaerobic/F – lahvička 25 ml s obsahem resinu (absorpční pryskyřice). Její použití je doporučováno u pacientů s antimikrobní léčbou. U stafylokoků a streptokoků došlo ke zkrácení detekčního času.
- Bactec Lytic/10 Anaerobic/F – lahvička o objemu 40 ml se zlepšenou výtěžností způsobené přítomnosti saponinu (menší počet falešně pozitivních a falešně negativních výsledků). Vykazuje vyšší záchyt klinicky významných mikroorganismů u pacientů bez ATB terapie.
- Bactec Peds Plus/F – lahvička 40 ml s obsahem resinu, pro vzorky pediatrických pacientů nebo jiných vzorků s malým objemem krve nebo sterilních tělních tekutin. Doporučováno u pacientů s antimikrobiální léčbou.
- Bactec Mycosis IS/F – lahvička 40 ml pro lepší selektivní izolaci kvasinek, hub a plísní u neutropenických pacientů, nebo pacientů s oslabenou imunitou.

- Bactec Myco/F Lytic Medium – lahvičky pro neselektivní izolaci mykobakterií a kvasinek u pacientů s HIV/AIDS. Používají se jako doplňkové médium k Plus Anaerobic/F mediu. Nevyžadují přidávání suplementů (Čermák et al., 2008).

## 3.6 Mikroskopie

Světelná mikroskopie je nedílnou součástí identifikace etiologických agens z pozitivních hemokultur. Hodnocení preparátu připraveného z pozitivní hemokultury barveného metodou Grama umožní přesnější zacílení antibiotické léčby, než je tomu u iniciální/empirické terapie infekcí krevního řečiště.

### 3.6.1 Barvené preparáty

Před každým barvením je potřeba provést fixaci preparátu k povrchu podložního mikroskopického skla. Fixace materiálu zajistí usmrcení mikrobů bez poškození jejich struktury, které tak snadněji přijímají barviva. Fixaci je možno provádět chemicky, například metanolem nebo formolem. Chemická fixace je šetrnější a zlepšuje výsledek barvení, tato metoda se nejčastěji používá při parazitologickém vyšetření. Nejužívanějším a nejjednodušším způsobem v mikrobiologické praxi je fixace teplem. Aby nedošlo k poškození materiálu na preparátu, nesmí teplota sklíčka při fixaci překročit 60-70 °C.

Barvené preparáty se zpravidla pozorují imerzním objektivem se zvětšením 1000x za použití imerzního oleje, který se nanese mezi vzorek a objektiv. Imerzní olej zvyšuje kontrast zobrazení a omezuje rušivé odrazy na krycím skle i objektivu.

Nejčastěji používanou barvicí techniku v mikrobiologii je barvení podle Grama. Metoda je využívána zejména v bakteriologii. Barvení podle Grama (Hans Christian Joachim Gram, 1884) umožňuje rozlišení bakterií na dvě základní skupiny: grampozitivní (v mikroskopu se jeví jako modrofialové) a gramnegativní (růžovočervené) bakterie. Některé bakterie nebo kvasinky mohou po barvení gramem jevit jako gramlabilní.

Různá barvitelnost úzce souvisí s rozdílnou stavbou buněčné stěny bakterií. Grampozitivní bakterie mají jednodušší a silnější stěnu složenou převážně z polysacharidů (peptidoglykan, teichoové kyseliny). V případě gramnegativních bakterií je stěna tvořena nejen polysacharidy (které jsou zastoupeny v mnohem menší míře než u grampozitivních bakterií), ale i lipidy a bílkoviny. Strukturální rozdíly buněčné stěny se odrážejí ve fyziologických vlastnostech obou skupin. Z klinického hlediska je zejména důležitá rozdílná citlivost na některá antibiotika.

Barvení dle Grama nám dále poskytuje informace o tvaru, velikosti a uspořádání bakterií, ale navíc také o buněčných strukturách v klinickém materiálu. Popisuje se

přítomnost a četnost buněk imunitního systému, zejména neutrofilů svědčících o akutním zánětu. Dále přítomnost buněk epitelu, který může odečítajícímu referovat kvalitu odebraného materiálu. Například materiál odebraný z dolních cest dýchacích by měl obsahovat pouze řasinkový epitel, pokud jsou v mikroskopu epitelie dlaždicové, došlo ke kontaminaci materiálem z dutiny ústní.

Mezi další barvicí techniky v mikrobiologii patří například monochromatické barvení. Metoda patří mezi jednoduché barvení, v praxi se využívá omezeně. Poskytuje základní informace o přítomných mikrobech (tvar, velikost a uspořádání). K barvení se používají barviva anilínová, především bazická a neutrální, například methylenová modř, safranin, karbolfuchsin a další.

Barvení podle Giemsy je vhodné zejména pro identifikaci buněčných struktur. Užívá se převážně v parazitologii nebo výjimečně i v bakteriologii při hodnocení mikroorganismů, které jsou špatně barvitelné podle Grama. Giemsovo barvivo obsahuje azur a eosin rozpuštěné ve směsi glycerinu a methanolu.

Barvení podle Ziehl-Neelsena je využíváno hlavně k barvení mykobakterií a některých bakterií obtížně barvitelných podle Grama. Tyto mikroorganismy obsahují ve své buněčné stěně velké množství lipidů, které brání prostupu běžných barviv. Je proto nutno použít koncentrovaná barviva, mořidla a vyšší teplotu (Juránková et al., 2011; Koukalová et al., 2013).

### 3.7 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS

Metoda MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem) poskytuje rychlý, levný (s výjimkou pořizovací ceny přístroje a softwaru) a spolehlivý nástroj pro identifikaci grampozitivních i gramnegativních bakterií a dalších mikroorganismů, na úrovni rodu a druhu na základě získaných hmotnostních spekter proteinů a jiných komponent a jejich porovnání s aktuální databází (Seng et al., 2009; Kostrzewa et Schubert, 2017).

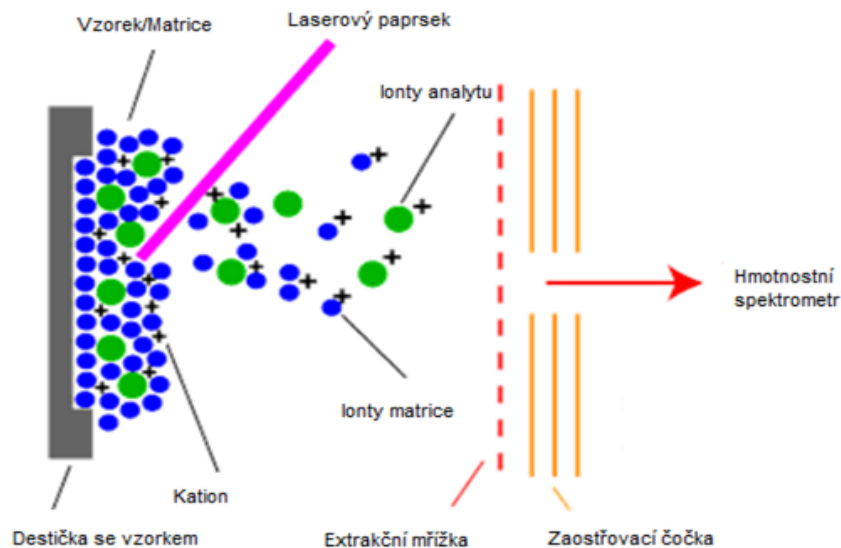
Obecným principem hmotnostní spektrometrie je produkce, separace a detekce iontů plynné fáze. Mezi klasické metody ionizace patří elektronový sprej (EI) a chemická ionizace (CI). Vedle klasických metod existuje MALDI 'měkká' ionizační technika, která umožňuje analýzu biomolekul (biopolymerů jako jsou proteiny, DNA, peptidy).

Doporučenými postupy je z izolovaných mikrobiálních kultur, popřípadě i přímo z klinických materiálů, připravený buněčný extrakt, který je v přístroji ozářen laserem o vlnové délce 337 nm, po dobu 4 ns. Matrice překrývající vzorek má za úkol zprostředkovat přenos energie, kdy excitované molekuly matrice za vysokého tlaku ionizují molekuly

analytu, a rovněž ochrání biomolekuly před přímým působením laseru a nežádoucím štěpením. Vzniklé ionty v plynné fázi postupují přes silné elektrické pole do vakuové trubice hmotnostního analyzátoru, který je založen na detekci doby letu částic (TOF – Time of Flight). V detektoru se ionizované částice pohybují rychlostí, která odpovídá jejich hmotnosti a náboji ( $m/z$ ). Čím jsou částice lehčí, či více nabitě, tím dříve dorazí k detektoru. Detektor je napojen na počítač, kde jsou data pomocí softwaru zpracována (obrázek 4). Každý rod, druh nebo kmen má své charakteristické spektrum, tzv. fingerprint. Identifikace mikroorganismů spočívá ve srovnání proteinového spektra izolátů se spektry referenčních kmenů v databázi MALDI Biotyper (Takeda et al., 1991; Bursová et al., 2014).

Zavedení této vysoce spolehlivé a přesné druhové identifikace bylo pro laboratorní diagnostiku zásadním přínosem. Díky výhodám MALDI-TOF MS se méně používají dříve běžné biochemické testy, které mají časovou prodlevu (Nyč et Bubeníček, 2015). Urychlení diagnostiky etiologických agens má nezpochybnitelný přínos pro časnější nasazení adekvátní terapie u pacientů se závažným infekčním onemocněním (Morgenthaler a Kostrzewa, 2015).

Mezi hlavní výrobce identifikačních přístrojů na bázi principu MALDI-TOF MS patří firmy Bruker a Shimadzu.



**Obrázek 4:** Schéma hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpční a ionizační matricí za účasti matrice s průletovým analyzátozem (upraveno podle Gates, 2014).

### 3.7.1 MALDI matrice

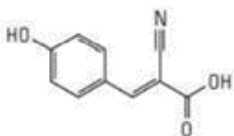
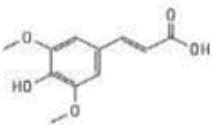
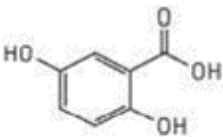
Volba matrice je jedním z nejdůležitějších parametrů, který dokáže ovlivnit kvalitu spektra a následnou identifikaci. Druh zvolené matrice závisí na studovaném vzorku. Matrice má za

úkol absorbovat energii z laseru a zajistit homogenní krystalizaci s analytem přenesením náboje na analyt.

Matrice jsou typicky zastoupeny slabými organickými kyselinami s aromatickým jádrem, například deriváty kyseliny skořicové a benzoové. Mezi nejčastěji používané matrice patří  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (HCCA), 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová kyselina (SA) a 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (DHB) (tabulka 1).

Pro analýzu se používají směsi těchto kyselin s rozpouštědly, jako jsou acetonitril, aceton, kyselina mravenčí nebo kyselina trifluoroctová a vodou (Carbonelle et al., 2010; Petersson, 2011; Lay et al., 2000).

**Tabulka 1:** Matrice MALDI-TOF MS.

Matrice	Strukturní vzorec	Analyzované molekuly
<p><b>HCCA</b>  <math>\alpha</math>-kyano-4-hydroxyskořicová kyselina</p>		peptidy
<p><b>SA</b>  3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová kyselina</p>		proteiny, polymery
<p><b>DHB</b>  2,5-dihydroxybenzoová kyselina</p>		peptidy, proteiny, lipidy, nukleové kyseliny, sacharidy

### 3.7.2 Přímá identifikace bakterií z hemokultury pomocí MALDI-TOF MS

Sepse patří mezi nejčastější příčinu úmrtí s odhadovanou incidencí až 19 milionů lidí ročně na celém světě (Adhikari et al., 2010). U pacientů v sepsi je nutno podat antibiotickou léčbu co nejrychleji - šance na přežití u pacientů s neléčenou sepsí klesá každou hodinu (Kumar et al., 2006). Na základě těchto faktů v roce 2012 Vek et al. ve své studii popsali možnost využití přímé identifikace z pozitivních hemokultur pomocí MALDI-TOF MS. Díky této metodě došlo ke zkrácení času potřebného k identifikaci mikroorganismů v průměru o 28,8 hodin a současně u 11,3 % pacientů byla podána vhodná antibiotická terapie do 24 hodin (Vlek et al., 2012).

Pro laboratorní průkaz původce sepse, jsou hemokultury zásadní. Pozitivní hemokultura je podrobena barvení podle Grama a mikroskopicky hodnocena. Dále je prováděna kultivace na kultivačních médiích, která trvá dle standardního postupu 18±2 h.



Izolované mikroorganismy se za účelem identifikace podrobí biochemickým testům, PCR metodě, popřípadě MALDI-TOF MS a otestuje se jejich citlivost na vybrané antimikrobní přípravky.

Kompletní identifikace pomalu rostoucích kultivačně náročných mikroorganismů trvá obvykle déle než 72 hodin v případě bakterií, ale u některých mykotických agens je to i více než 60 hodin. Přímá identifikace z hemokultur umožňuje diagnostiku v rozpětí 12-24 hodin od odebrání hemokultury v závislosti na bakteriální hustotě v krvi pacienta a typu mikroba.

Pro přímou diagnostiku patogenů z pozitivních hemokultur byla vyvinuta řada home-made metod, které se liší ve svém přístupu k odstranění interferujících buněčných složek (pacientovi buňky přítomné v odebrané krvi). Ferroni et al. ve své práci využili saponin a kyselinu trifluoroctovou, kde saponin rozpouští krevní buňky a uvolňuje intracelulární patogeny a zároveň nenarušuje mikrobiální membránu (Ferroni et al., 2010). V jiné práci je pro lýzu krevních buněk použitý chlorid amonný (Prod'hom et al., 2010; Sogawa et al., 2011). Většina metod zahrnuje opakované centrifugace vzorku hemokultury, které se střídají s promýváním vzniklých pelet.

Některé firmy už nabízejí pro zpracování vzorku z pozitivní hemokultury za účelem identifikace pomocí MALDI-TOF MS komerční kity, například MALDI-SepsiTyper Kit (Bruker Daltonics, Germany). Použití těchto komerčních kitů bylo popsáno v několika studiích (Kok et al., 2011; Meex et al., 2012; Schieffer et al., 2014).

Většina studií zabývajících se přímou diagnostikou z pozitivních hemokultur udává velice úspěšnou identifikaci při použití home-made metod adaptovaných dle potřeb jednotlivých pracovišť. V případě bakterií byly ve většině případů zaznamenány lepší výsledky přímé identifikace u gramnegativních ve srovnání s grampozitivními bakteriemi (La Scola et Raoult, 2009; Moussaoui et al., 2010; Christner et al., 2010; Ferroni et al., 2010).

### 3.8 Stanovení antibiotické citlivosti

Infekční nemoci jsou nejčastěji léčeny antibiotiky. Podáním antibiotik dojde k inhibici růstu mikroorganismů nebo k jejich usmrcení na povrchu nebo uvnitř těla hostitele. Antibiotika jsou přípravky proti bakteriím, antivirotika proti virům, antimykotika proti mikromycetám a antiparazitika proti parazitům

V současné době se antibiotika stávají velmi ohroženými léčivými přípravky, zejména kvůli rezistenci bakterií vzniklé ve spojitosti s jejich nadužíváním, proto je nutné je podávat uvážlivě. Rezistence je buď vrozenou vlastností (primární rezistence) a je společná pro všechny kmeny daného bakteriálního druhu, nebo získaná (sekundární), vznikající na

základě selekčního tlaku antibiotika (nejčastěji mutací) nebo získáním genu pro rezistenci (Rozsypal, 2015).

Úspěch antibiotické léčby u septického pacienta záleží na rychlosti podání účinného antimikrobního přípravku. Podle Kumarovy studie z roku 2006, každá hodina odkladu podání antibiotika zvyšuje smrtelnost u sepse o 7,6 % (Kumar et al., 2006). V případě sepsí se upřednostňují rychleji působící baktericidní přípravky. Mezi antibiotika nejčastěji používaná při sepsi patří:

1. Antibiotika působící proti buněčné stěně bakterií
  - Beta-laktamová antibiotika – zejména peniciliny, cefalosporiny a karbapenemy. Tyto antibiotika zabraňují množení bakterií pomocí inhibice syntézy jejich buněčné stěny. Patří mezi nejčastěji používaná antibiotika pro léčbu sepse kvůli své netoxičnosti, vysoké účinnosti a širokému spektru působení. Závažným nežádoucím účinkem mohou být alergické reakce pacientů. Problémem je zvyšující se výskyt bakterií rezistentních na beta-laktamy.
  - Glykopeptidová antibiotika – zejména vankomycin a teikoplanin. Jejich účinek je v porovnání s beta-laktamy relativně pomalý a působí pouze na grampozitivní bakterie (gramnegativní bakterie jsou přirozeně rezistentní). Jejich výhodou je vzácný vznik rezistence. Nejčastěji jsou podávány u infekcí způsobenými grampozitivními bakteriemi rezistentními na beta-laktamy (MRSA-methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*), nebo jako iniciální (empirická) terapie s nutností pokrytí širokého spektra grampozitivních bakterií (infekční endokarditidy, febrilní neutropenie).
2. Antibiotika působící na buněčnou membránu bakterií
  - Aminoglykosidy – například gentamicin a amikacin. Aminoglykosidy kromě cytoplasmatické membrány působí ještě na ribozomální úrovni (inhibice proteosyntézy). Jejich hlavní nevýhodou jsou ototoxicita a nefrotoxicita a omezený průnik do tkání. Předností jsou rychlé baktericidní působení a synergie s některými antibiotiky – například beta-laktamy. Používají se hlavně ve dvou situacích:
    - a) když je potřeba rychle snížit bakteriální nálož (akutní grampozitivní nebo gramnegativní sepsi).
    - b) když je potřeba posílit účinek stěnového antibiotika proti rezistentní bakterii, například u enterokokové infekční endokarditidy nebo pseudomonádová urosepsi (Beneš, 2018).

Stanovení citlivosti bakteriálního původce *in vitro* je nezbytným krokem cílené antibiototerapie. Pro stanovení citlivosti jsou používány metody difúzní a diluční.

### 3.8.1 Difúzní testy

Difúzní testy jsou převážně kvalitativní, udávají informaci o citlivosti nebo rezistenci bakterie k danému antibiotiku. Tato metoda je založena na postupném uvolňování antibiotika z vhodného nosiče do agarové půdy, která je inokulovaná vyšetřovaným mikroorganismem. Pokud je bakterie citlivá na dané antibiotikum, dojde k vzniku inhibiční zóny (Koukalová et al., 2009).

- Difúzní agarová (disková) metoda – jedná se o metodu kvalitativní, získáme informaci o citlivosti/rezistenci na dané antibiotikum. Zdrojem antibiotika je disk z filtračního papíru impregnovaný jeho přesným množstvím. Během inkubace vznikají kolem disku zóny inhibice růstu. Po změření se jejich průměr porovná s definovanými kritérii citlivosti/rezistence, která jsou specifická pro každé antibiotikum a bakteriální kmen.
- E-test – jedná se o difúzní metodu kvantitativní. Zdrojem antibiotika je plastický proužek obsahující exponenciálně rostoucí koncentrace. Umožňuje stanovit minimální inhibiční koncentraci (MIC), což je nejmenší koncentrace antibiotika inhibující růst mikroba. Hodnota MIC se porovná s definovanými kritérii (breakpointy), která jsou, stejně jako u diskových testů, specifická pro jednotlivá antibiotika a bakteriální druhy. Nezáskáme pouze informaci o citlivosti bakterie na antibiotikum, ale také míru citlivosti na dané antibiotikum (jak blízko se hodnota MIC nachází u hodnoty breakpointu).

### 3.8.2 Diluční testy

Diluční testy jsou kvantitativní. Test je založen na odstupňovaných koncentracích antibiotika v tekutých médiích (test zkumavkový, diluční mikrometoda), nebo tuhých kultivačních půdách (test agarový). Stejně jako u E-testu se stanovuje hodnota MIC (minimální inhibiční koncentrace), která ukazuje i míru citlivosti na konkrétní antibiotikum. Každé antibiotikum a bakteriální kmen má jinou hraniční koncentraci (tzv. breakpoint) definující citlivost/rezistenci (Kutálková et al., 2013).

Dilučními testy lze stanovit i hodnotu MBC (minimální baktericidní koncentrace). Představuje nejmenší koncentraci látky, která je potřebná k usmrcení mikroorganismu. MBC se někdy rovná MIC, nebo může být i mnohonásobně vyšší.

- Diluční mikrometoda se provádí se v jamkách mikrotitrační destičky, která obsahuje nejčastěji 96 jamek (8x12). Na jedno bakteriálním kmeni se v tomto případě testuje citlivost ke 12 antibiotikům. Kmeny s hodnotou MIC shodnou nebo nižší, než je

hraniční hodnota koncentrace, se označí jako citlivé k danému antibiotiku. Pokud je MIC bakterie vyšší, než je hraniční hodnota, je bakterie vyhodnocena jako rezistentní.

- Při agarové diluční metodě je připravena sada kultivačních agarů s rostoucí koncentrací jednoho antibiotika. Na jednu kultivační plotnu může být vyočkováno více bakteriálních kmenů, v závislosti na technice a velikosti půdy, až několik desítek. Hodnota MIC se odečítá po inkubaci jako nejnižší koncentrace antibiotika inhibující růst.

### 3.9 Rychlé stanovení antimikrobní citlivosti (RAST) bakterií z pozitivních hemokultur

U septických pacientů v kritickém stavu je nezbytné co nejrychlejší identifikace etiologického agens a určení citlivosti na antibiotika. Zejména v současné době, kdy dochází k nárůstu výskytu rezistentních a multirezistentních bakterií, je identifikace rezistence na antibiotika následovaná úpravou iniciální terapie na cílenou antibiotickou terapii faktor, který může rozhodnout, zda pacient život ohrožující infekci přežije.

Přímá identifikace agens z pozitivních hemokultur pomocí MALDI-TOF MS umožní ošetřujícímu lékaři upravit antibiotickou terapii na základě znalosti přirozených rezistencí vyvolávajícího agens. Bohužel neposkytuje informaci o získaných rezistencích. Společnost EUCAST (Evropská komise pro testování antimikrobní citlivosti) vyvinula v roce 2019 metodu pro rychlé stanovení antimikrobní citlivosti (rapid antimicrobial susceptibility testing - RAST) u vybraných bakterií přímo z pozitivních hemokultur. Při vývoji této metody si EUCAST kladl za cíle:

- Aby metoda byla aplikovatelná pro nejčastější etiologická agens vyvolávající infekce cévního řečiště.
- Aby bylo možno hodnotit citlivost v co nejkratším časovém intervalu od potvrzení pozitivního nálezu v hemokultivační lahvičce.
- Aby materiály potřebné k provedení této metody byly součástí standardní výbavy mikrobiologické laboratoře.
- Aby metoda byla snadno proveditelná a kontrolovatelná.
- Aby postup a interpretace byly volně dostupné na stránkách společnosti EUCAST.

Velice důležitý je fakt, že při vývoji této metody a při sestavení interpretačních kritérií pro jednotlivá antibiotika EUCAST zohlednil jednak použité materiály (hemokultivační lahvičky, kultivační půdy, antibiotické disky - vše od různých dodavatelů) a také čas mezi pozitivitou hemokultury a časem vlastního provedení stanovení citlivosti (pokud je pozitivita

hemokultury stanovena přístrojem mimo standardní pracovní dobu laboratoře a její zpracování proběhne později).

Aby se zamezilo falešné citlivosti/rezistenci s ohledem na výše uvedenou variabilitu v metodice prováděné v jednotlivých mikrobiologických laboratořích, zavedl EUCAST hodnotu ATU (oblast technické nejistoty), která se nachází v oblasti mezi potvrzenou citlivostí (C) a potvrzenou rezistencí (R) na testované antibiotikum, a která odečítajícím pracovníkovi zabrání v případné chybné interpretaci.

Metoda RAST je modifikovaná disková difúzní metoda, která se odečítá za 4, 6 a 8 hodin, tj. v tentýž den, kdy je hemokultivační lahvička označena za pozitivní. Pro daný bakteriální druh a konkrétní antibiotikum jsou modifikovány specifické hraniční hodnoty inhibičních zón po 4, 6 a 8 hodinách (velikost zón se může s dobou odečítání měnit).

K současnému datu je metoda RAST vypracována pouze pro 8 bakteriálních druhů, které se nejčastěji vyskytují jako etiologická agens infekcí krevního řečiště (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* a *Streptococcus pneumoniae*) a vybraná antibiotika. Kombinace metody přímé identifikace pomocí MALDI-TOF MS s metodou rychlého stanovení citlivosti lze zkrátit mikrobiologické vyšetření pozitivních hemokultur v řádu o dny.

## 4. Materiál a metody

### 4.1 Přístroje a vybavení

V experimentální části diplomové práce byly použity následující přístroje a software:

- automatický hemokultivační systém BACTEC (Bruker)
- centrifuga (Fischer Scientific)
- mikrocentrifuga (BOECO Germany)
- inkubátor CO<sub>2</sub> (Sanyo)
- inkubátor (BMT)
- MALDI-TOF hmotnostní spektrometr Microflex LT Systém (Bruker)
- software MALDI Biotyper
- mikroskop (Olympus)
- PC s programem Envis LIMS
- Bunsenův kahan (WLD-TEC GmbH)

V experimentální části diplomové práce bylo použito následující vybavení laboratoře a plasty:

- automatické pipety a příslušné sterilní špičky 0,5-10 µl, 1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl (Eppendorf)
- MALDI destička MSP 96 z leštěné oceli (Bruker)
- mikrodestička 96 jamek (Gamedium)
- mikroskopická skla (VWR)
- plastová zkumavka 15 ml (Gamedium)
- mikrozukavky typu Eppendorf o objemu 1,5 ml (Eppendorf)
- sterilní bakteriologické kličky (VWR)
- sterilní injekční jehly (BRAUN)
- sterilní injekční stříkačky (BRAUN)
- stojánky na mikrozukavky (P-LAB)

### 4.2 Použité chemikálie

- acetonitril (Sigma Aldrich)
- ATB disky (Biorad)

- barvicí roztoky na barvení preparátů dle Grama
  - o acetonalkohol (Chemicals Unlimited)
  - o krystalová violet (Sigma Aldrich)
  - o Lugolův roztok (VWR)
  - o safranin (Sigma Alrich)
- destilovaná voda
- dezinfekční prostředek (Verkon)
- ethanol (Erba Lachema)
- fyziologický roztok (Trios)
- kultivační půdy (Trios)
  - o Mueller-Hinton agar (MH)
  - o Mueller-Hinton agar s koňskou krví (Mueller-Hinton Fastidious, MH-F)
- kyselina mravenčí (Sigma Aldrich)
- matrice -  $\alpha$ -kyano- $\gamma$ -hydroxyskořicová kyselina (Sigma Aldrich)

#### 4.3 Pracovní postup a kultivace mikroorganismů

Po příjmu biologického materiálu v laboratoři byly vzorky – hemokultivační lahvičky se vzorkem krve od pacienta se suspektní infekcí krevního řečiště – překontrolovány a bylo jim přiděleno číslo vyšetření vygenerované systémem. Takto označené lahvičky byly vloženy do automatického hemokultivačního systému BACTEC, ve kterém probíhala kultivace do případného zaznamenání metabolické aktivity uvnitř lahvičky, nebo maximálně po dobu 5 dnů při teplotě  $35\pm 1$  °C.

Pokud byla hemokultura i po 5 dnech negativní, byla označena automatickým systémem příslušným světelným signálem, vyjmuta z přístroje a negativní výsledek zaznamenán do laboratorního systému.

V případě positivity byly hemokultury rovněž systémem označeny příslušným světelným signálem. Navíc byla pozitivita ohlášena zvukovým signálem, aby bylo zajištěno co nejrychlejší zpracování příslušnými metodami pro identifikaci bakterií a předání informace ošetřujícímu klinickému personálu.

#### 4.4 Barvení podle Grama

Prvním krokem v identifikaci bakteriálního agens bylo provedení barvení dle Grama. Vrchní část hemokultivační lahvičky s propichovacím septem byla důkladně vydezinfikována, aby se zabránilo kontaminaci materiálu, a septum bylo perforováno jehlou s nasazenou injekční stříkačkou o objemu 5 ml, do které se nasál vzorek krve. Kapka krve se rozetřela na sterilní

podložní sklo na plochu zhruba 1 x 2 cm a nechala se důkladně zaschnout. Poté byla provedena tepelná fixace preparátu nad Bunsenovým kahanem.

Takto připravený preparát byl obarven barvicí technikou podle Grama (tabulka 2). Preparát byl položen na barvicí misku a převrstven krystalovou violetí po dobu 20 s. Následně byla barva nahnutím preparátu slita a poté byl na povrch preparátu nanesen Lugolův roztok rovněž po dobu 20 s. Preparát se znovu nahnul stejným směrem a oplachován acetonalkoholem, do odbarvení po dobu maximálně 20 s. Dále byl celý preparát opláchnut vodou a dobarven safraninem po dobu 1 minuty. Nakonec byl preparát znovu opláchnut vodou a osušen filtračním papírem.

**Tabulka 2:** Přehled postupu barvení podle Grama.

Pořadí	Chemikálie	Čas
1.	krystalová violet	20 s
2.	Lugolův roztok	20 s
3.	acetonalkohol	20 s
4.	oplach vodou	
5.	safranin	1 min
6.	oplach vodou	

#### 4.4.1 Hodnocení preparátů

Preparát se prohlížel za použití imerzního objektivu při zvětšení 1000x. Hodnotila se barva bakterií, jejich tvar a uspořádání. Grampozitivní bakterie byly zbarveny modře a gramnegativní červeně. Výsledek Gramova barvení se zaznamenal do laboratorního informačního systému a byl rovněž telefonicky nahlášen na oddělení ošetřujícímu personálu.

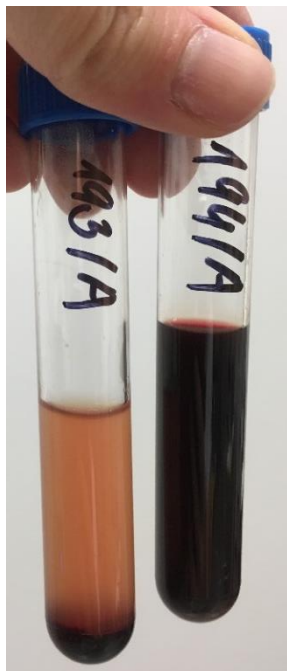
Na základě mikroskopického nálezu byla krev z hemokultivační lahvičky rozočkována na povrch příslušného kultivačního média a po zaschnutí byla aplikována vhodně zvolena sestava antibiotik pro rychlé testování citlivostí přímou diskovou difúzní metodou (RAST).

#### 4.5 Zpracování pozitivních hemokultur pro identifikaci pomocí MALDI-TOF MS

Z pozitivní hemokultury bylo pipetou odebráno 6 ml krve a přeneseno do 15 ml sterilní plastové zkumavky. Tato zkumavka s krví byla centrifugována při 1500 rpm po dobu 5 minut. Po centrifugaci (obrázek 5) bylo 1400  $\mu$ l supernatantu přeneseno do 1,5 ml mikrozkušavky a centrifugováno při 12000 rpm po dobu 1 minuty. Následně byl pipetou pečlivě odstraněn supernatant, který dále nebyl potřebný. K peletě bylo přidáno 300  $\mu$ l



destilované H<sub>2</sub>O a 900 µl 96% ethanolu. Peleta byla pečlivě promíchána (obrázek 6) a vzorek byl znovu centrifugován při 12000 rpm po dobu 1 minuty. Znovu byl pečlivě odstraněn supernatant a k peletě (obrázek 6) byl přidán acetonitril a koncentrovaná kyselina mravenčí v poměru 1:1 o objemu 5µl:5µl. Peleta byla důkladně promíchána a naposledy centrifugována při 12000 rpm po dobu 1 minuty. Supernatant byl použit pro následnou identifikaci pomocí MALDI-TOF MS.



**Obrázek 5:** Zkumavky s krví odebranou z pozitivních hemokultivačních lahviček (odebráno z aerobní a anaerobní hemokultury, vzorek patřil jednomu pacientovi). Zkumavky jsou vyfoceny po centrifugaci při 1500 rpm po dobu 5 minut – vlevo: vzorek z aerobní hemokultivační lahvičky (nehemolytický), v supernatantu lze vidět zákal způsobený bakteriálním růstem, v peletě jsou sedimentované erythrocyty; vpravo: vzorek odebraný z anaerobní hemokultivační lahvičky (hemolytický).



**Obrázek 6:** Mikrozkumavka 1,5 ml – v levé části je zkumavka s rozmíchanou peletou ve směsi s 300 µl H<sub>2</sub>O a 900 µl 96% ethanolu před centrifugací. V pravé části je zkumavka po centrifugaci, supernatant byl odstraněn, v dolní části zkumavky viditelná peleta.

#### 4.6 Identifikace pomocí MALDI-TOF MS

Ze vzorku zpracované hemokultury byl odebrán 1 µl, který byl nanesen na políčko MALDI destičky. Pro každý vzorek byla použita nová špička, aby nedošlo ke kontaminaci. Poté co vzorek na destičce zaschnul, byl převrstven 1 µl matrice. Jako matrice byla použita α-kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (HCCA). Po úplném zaschnutí vzorků byla MALDI

destička vložena do přístroje Microflex LT od firmy Bruker, kde bylo provedeno měření hmotnostních spekter.

#### 4.6.1 Interpretace výsledků MALDI-TOF MS

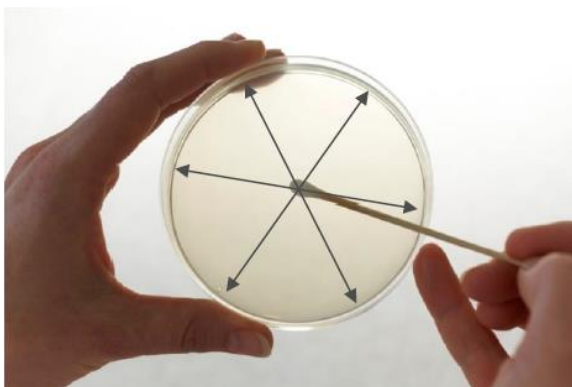
Software Biolyper (Bruker) porovnal získaná hmotnostní spektra s aktuální databází a na základě tohoto srovnání sestavil seznam možných druhových a rodových identifikací s přiřazeným skóre spolehlivosti identifikace. Firma Bruker Daltonics uvádí pro metodu MALDI-TOF MS doporučené mezní hodnoty skóre pro identifikaci mikroorganismů (tabulka 3). Hodnota skóre  $\geq 2,00$  udává spolehlivou identifikaci mikroorganismu na úrovni druhu. Skóre v rozmezí 1,70 – 1,99 znamená spolehlivou identifikaci na úrovni rodu. V případě, že je hodnota nižší než 1,70, se jedná o nespolehlivou identifikaci. Pokud nebylo na plochu MALDI destičky nanášeno dostatečné množství materiálu, popřípadě pokud nebyl vzorek překryt matricí, nemusí se v průběhu měření zobrazit hmotnostní spektra – software poté vyhodnotí měření jako „žádné píky nenalezeny“.

**Tabulka 3:** MALDI-TOF MS hodnoty skóre.

Rozmezí hodnot skóre	Interpretace	Vyhodnocení identifikace	Barevné označení
2,00 – 3,00	rod identifikován s jistotou, druh pravděpodobně	spolehlivá	Zelená
1,70 – 1,99	pravděpodobná identifikace na úrovni rodu	pravděpodobná	Žlutá
0,00 – 1,69	nespolehlivá identifikace	nespolehlivá	Červená

#### 4.7 Metoda rychlého stanovení antibiotické citlivosti (RAST)

150  $\mu$ l krve z pozitivní hemokultury bylo rozočkováno na povrch kultivačního agaru sterilním vatovým tampónem v 6 směrech (obrázek 7). Po zaschnutí byly na povrch aplikovány antibiotické (ATB) disky. V tabulce 7 jsou uvedeny použité antibiotika, jejich zkratky a obsah antibiotického disku. Typ kultivačního agaru a konkrétní antibiotika byla zvolena na základě vyhodnocení Gramova barvení.



**Obrázek 7:** Očkování pozitivní hemokultury na povrch MH kultivačního agaru v 6 směrech pomocí sterilního vatového tamponu

- V případě gramnegativních tyček byla hemokultura vyočkována na povrch dvou vytemperovaných MH (Muller-Hinton) agarů. Na zaschnutý povrch agarů byly poté aplikovány následné ATB disky: na první HM agar disky ampicilinu (AMP), cefuroximu (CRX), amoxicilinu v kombinaci s kyselinou klavulanovou (AMC), cefotaximu (CTX), gentamicinu (GEN), kotrimoxazolu (COT) a ciprofloxacinu (CIP); na druhý MH agar disky piperacilinu v kombinaci s tazobaktamem (PPT), meropenemu (MER), amikacinu (AMI), tigeciklinu (TIG) a ceftazidimu (CTZ). Na povrch plotny bylo poznačeno číslo hemokultury a čas aplikace disků. Poté byly plotny umístěny do inkubátoru a inkubovány při  $35\pm 1$  °C.
- Pokud byly pod mikroskopem identifikovány grampozitivní koky v hloučcích byla hemokultura vyočkována na povrch vytemperovaného MH agaru, na který byly aplikovány ATB disky: cefoxitin (CXT), erytromycin (ERY), klindamycin (CLI), kotrimoxazol (COT), ciprofloxacín (CIP), gentamicin (GEN) a tetracyklin (TET). Na povrch plotny bylo zaznačeno číslo hemokultury a čas aplikace disků. Plotna byla následně umístěna do inkubátoru a inkubována při  $35\pm 1$  °C.
- Pokud byly identifikovány grampozitivní koky v řetězcích/ve dvojicích byla hemokultura vyočkována na povrch vytemperovaného MH agaru a na povrch MH agaru s koňskou krví (MH-F). Na povrch MH agaru byly aplikovány ATB disky: ampicilin (AMP), vankomycin (VAN), gentamicin – vysokodávkovaný (HL-GEN), tigecyklin (TIG), linezolid (LNZ) a nitrofurantoin (FUR). Na povrch MH-F agaru byly aplikovány ATB disky: oxacilin (OXA), erytromycin (ERY), klindamycin (CLI), kotrimoxazol (COT), tetracyklin (TET), levofloxacin (LEV), vankomycin (VAN) a penicilin G (PEN). Povrch plotny byl označen číslem hemokultury a čas aplikace disků. Poté byla plotna MH umístěna do inkubátoru a inkubována při  $35\pm 1$  °C. Plotna MH-F byla umístěna do inkubátoru s 5% CO<sub>2</sub> a inkubována při  $35\pm 1$  °C.

**Tabulka 4:** Seznam a obsah ATB disků.

Antibiotikum	Zkratka	Obsah (µg)
amikacin	AMI	30
amoxicilin/kyselina klavulanová	AMC	20/10
ampicilin	AMP	2
cefotaxim	CTX	30
cefuroxim	CRX	30
ciprofloxacín	CIP	5
erytromycin	ERY	15
gentamicin	GEN	10
klindamycin	CLI	2
kotrimoxazol (trimethoprim/sulfamethoxazol)	COT	1,25/23,75
levofloxacin	LEV	5
linezolid	LNZ	10
meropenem	MER	10
nitrofurantoin	FUR	100
oxacilin	OXA	1
penicilin G	PEN	1 jednotka
piperacilin/tazobaktam	PPT	30/6
tetracyklin	TET	30
tigecyklin	TIG	15
vankomycin	VAN	5
vysokodávkovaný gentamicin	HL-GEN	30

V případě standardního postupu stanovení citlivosti pomocí diskové difúzní metody byly velikosti inhibičních zón hodnoceny po 18±2 hodinách inkubace u všech ATB disků a výsledek byl zaznamenán do laboratorního systému (LIMS). U metody rychlého stanovení antibiotické citlivosti (RAST) byla hodnocena velikost inhibičních zón pouze kolem vybraných antibiotických disků (viz. 4.7.1 Interpretační tabulky RAST a jejich použití) po 4 a 6 hodinách inkubace. V rámci diplomové práce byla hodnocena pouze vybraná antibiotika definovaná pro metodu RAST.

#### 4.7.1 Interpretační tabulky RAST a jejich použití

Interpretační tabulky (tabulka 5, 7-13) pro vyhodnocení metody byly převzaty z dokumentace EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti). Dle doporučení byla tato metoda aplikována pouze na vybrané kmeny bakterií: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*,

*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*.

**Tabulka 5:** Vzor interpretační tabulky – převzato z dokumentace EUCAST. Uvedené hodnoty jsou velikosti inhibičních zón (mm) kolem antibiotických disků a-g v časech 4, 6 a 8 hodin.

Antibiotikum	4 hodiny			6 hodin			8 hodin		
	C ≥	ATU	R <	C ≥	ATU	R <	C ≥	ATU	R <
a	17	14-16	14	18	15-17	15	18	15-17	15
b	15	12-14	12	16	14-15	14	17	15-16	15
c	18	15-17	15	17	15-16	15	17	15-16	15
d	50 <sup>1</sup>	14-15	14	50 <sup>1</sup>	15-16	15	50 <sup>1</sup>	16-17	16
e	- <sup>2</sup>	≥13	13	16	14-15	14	16	14-15	14
f	14	12-13	12	14	12-13	12	14	12-13	12
g	13	≤12	- <sup>2</sup>	13	10-12	10	13	10-12	10

**C** - bakteriální kmen je citlivý při standardním dávkování; **ATU** - oblast technické nejistoty (nelze s jistotou říct, zda je bakterie na dané antibiotikum citlivá nebo rezistentní); **R** - bakteriální kmen je rezistentní na dané antibiotikum; **50<sup>1</sup>** - průměr inhibiční zóny, pro kterou je kritérium C (citlivý při standardním dávkování) stanoveno na ≥ 50 mm je EUCASTem vytvořena úmyslně, aby se zabránilo pod-dávkování antibiotika. Pokud se hodnota inhibiční zóny nachází mezi hodnotou ATU a S, je doporučeno označit kmen jako I - citlivý při zvýšeném dávkování (Susceptible, increased exposure); **-<sup>2</sup>** - citlivost/rezistence (C/R) nemůže být v daný čas dle doporučení EUCAST definována.

V přesně definovaný čas od nasazení antibiotických disků na naočkovaný kultivační agar byla pomocí kalibrovaného pravítka změřena velikost inhibičních zón kolem antibiotických disků v mm. Zóny se měřily v intervalu 4 a 6 hodin (v intervalu 8 hodin se měření z technických důvodů neprovádělo) s výjimkou *Pseudomonas aeruginosa*, kde se citlivost hodnotila pouze v čase 6 hodin. Bylo důležité dodržovat přesný čas měření, protože interpretační kritéria jsou na tyto časy vázaná. Inkubační doby a kultivační agary pro jednotlivé kmeny jsou uvedeny v tabulce 6.

Získané hodnoty se porovnály s hodnotami v interpretačních tabulkách pro jednotlivé bakteriální kmeny (tabulky 7-13).

**Tabulka 6:** Inkubační podmínky pro stanovení antimikrobiální citlivosti dle EUCAST.

Bakteriální kmen	Časy měření	Medium	Inkubace
<i>Escherichia coli</i>	4, 6 a 8 hodin	MH	35 ± 1 °C
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4, 6 a 8 hodin	MH	35 ± 1 °C
<i>Acinetobacter baumannii</i>	4, 6 a 8 hodin	MH	35 ± 1 °C
<i>Staphylococcus aureus</i>	4, 6 a 8 hodin	MH	35 ± 1 °C
<i>Enterococcus faecalis</i>	4, 6 a 8 hodin	MH	35 ± 1 °C
<i>Enterococcus faecium</i>	4, 6 a 8 hodin	MH	35 ± 1 °C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 a 8 hodin	MH	35 ± 1 °C

Pokud byla velikost inhibiční zóny větší nebo rovna hodnotě C (hraniční koncentrace, tzv. breakpoint), interpretovalo se dané antibiotikum jako citlivé při standardním doporučeném dávkování (ošetřující lékař, popřípadě konzultující klinický mikrobiolog se řídí podle doporučeného dávkování pro jednotlivá antibiotika). Pokud byla

změřená hodnota menší než hodnota R, byla bakterie na dané antibiotikum rezistentní. Pokud změřená hodnota spadala do tzv. ATU rozmezí (do oblasti technické nejistoty), nebylo možno definovat, zda je na antibiotikum bakterie citlivá nebo rezistentní.

U rodů *Pseudomonas* a *Acinetobacter* stanovil EUCAST hraniční koncentrace (breakpointy) některých antibiotik úmyslně mimo rozsah testovacích koncentrací daného antibiotika – v tabulce 9 a 10 se jedná o hodnotu  $C \geq 50$  mm. Pokud velikost změřené inhibiční zóny spadala do oblasti mezi ATU a C, interpretovalo se antibiotikum jako citlivé při zvýšeném dávkování (I). Ze strany EUCAST se jedná o úmysl zabránit kategorizaci C – citlivý při standardním dávkování a zdůraznění potřeby vysokého dávkování antibiotika při terapii.

U některých antibiotik nebyly v určitých časových intervalech dle dokumentace EUCAST definovány hraniční koncentrace (v tabulce 10-13 použito označení -), nebylo tedy možné stanovit citlivost nebo rezistenci.

**Tabulka 7:** *Escherichia coli* – tabulka interpretačních kritérií na základě průměru inhibiční zóny (mm) v jednotlivých časech měření.

Antibiotikum (obsah µg)	4 hodiny			6 hodin			8 hodin		
	C ≥	ATU	R <	C ≥	ATU	R <	C ≥	ATU	R <
PPT (30/6)	17	14-16	14	18	15-17	15	18	15-17	15
CTZ (10)	15	12-14	12	16	14-15	14	17	15-16	15
MER (10)	18	15-17	15	17	15-16	15	17	15-16	15
CIP (5)	17	14-16	14	20	17-19	17	20	17-19	17
AMI (30)	15	13-14	13	15	13-14	13	15	13-14	13
GEN (10)	14	12-13	12	14	12-13	12	14	12-13	12
COT (1.25/23.75)	12	10-11	10	14	12-13	12	14	12-13	12

**C** - bakteriální kmen je citlivý při standardním dávkování; **ATU** - oblast technické nejistoty (nelze s jistotou říct, zda je bakterie na dané antibiotikum citlivá nebo rezistentní); **R** - bakteriální kmen je rezistentní na dané antibiotikum; **PPT** – piperacilin/tazobaktam; **CTZ** – ceftazidim; **MER** – meropenem, **CIP** – ciprofloxacín; **AMI** – amikacin, **GEN** – gentamicin; **COT** – kotrimoxazol (trimetoprim/sulfametoxazol)

**Tabulka 8:** *Klebsiella pneumoniae* – tabulka interpretačních kritérií na základě průměru inhibiční zóny (mm) v jednotlivých časech měření.

Antibiotikum (obsah µg)	4 hodiny			6 hodin			8 hodin		
	C ≥	ATU	R <	C ≥	ATU	R <	C ≥	ATU	R <
PPT (30/6)	15	13-14	13	16	14-15	14	16	14-15	14
CTZ (10)	15	13-14	13	16	14-15	14	16	14-15	14
MER (10)	15	13-14	13	17	15-16	15	17	15-16	15
CIP (5)	18	15-17	15	18	15-17	15	19	16-18	16
AMI (30)	15	13-14	13	14	12-13	12	15	13-14	13
GEN (10)	14	12-13	12	14	12-13	12	13	11-12	11
COT (1.25/23.75)	11	9-10	9	11	9-10	9	11	9-10	9

**C** - bakteriální kmen je citlivý při standardním dávkování; **ATU** - oblast technické nejistoty (nelze s jistotou říct, zda je bakterie na dané antibiotikum citlivá nebo rezistentní); **R** - bakteriální kmen je rezistentní na dané antibiotikum; **PPT** – piperacilin/tazobaktam; **CTZ** – ceftazidim; **MER** – meropenem, **CIP** – ciprofloxacín; **AMI** – amikacin, **GEN** – gentamicin; **COT** – kotrimoxazol (trimetoprim/sulfametoxazol)

**Tabulka 9:** *Pseudomonas aeruginosa* – tabulka interpretačních kritérií na základě průměru inhibiční zóny (mm) v jednotlivých časech měření.

Antibiotikum (obsah µg)	6 hodin			8 hodin		
	C ≥	ATU	R <	C ≥	ATU	R <
PPT (30/6)	50 <sup>1</sup>	13-15	13	50 <sup>1</sup>	14-16	14
CTZ (10)	50 <sup>1</sup>	12-14	12	50 <sup>1</sup>	13-15	13
MER (10)	16	14-15	14	16	14-15	14
CIP (5)	50 <sup>1</sup>	17-18	17	50 <sup>1</sup>	20-21	20
AMI (30)	16	14-15	14	16	14-15	14

**C** - bakteriální kmen je citlivý při standardním dávkování; **ATU** - oblast technické nejistoty (nelze s jistotou říct, zda je bakterie na dané antibiotikum citlivá nebo rezistentní); **R** - bakteriální kmen je rezistentní na dané antibiotikum; **50<sup>1</sup>** - průměr inhibiční zóny, pro kterou je kritérium C (citlivý při standardním dávkování) stanoveno na ≥ 50 mm je EUCASTem vytvořena úmyslně, aby se zabránilo pod-dávkování antibiotika. Pokud se hodnota inhibiční zóny nachází mezi hodnotou ATU a S, je doporučeno označit kmen jako I - citlivý při zvýšeném dávkování (Susceptible, increased exposure); **PPT** – piperacilin/tazobaktam; **CTZ** – ceftazidim; **MER** – meropenem, **CIP** – ciprofloxacín; **AMI** – amikacín

**Tabulka 10:** *Acinetobacter baumannii* – tabulka interpretačních kritérií na základě průměru inhibiční zóny (mm) v jednotlivých časech měření.

Antibiotikum (obsah µg)	4 hodiny			6 hodin			8 hodin		
	C ≥	ATU	R <	C ≥	ATU	R <	C ≥	ATU	R <
MER (10)	15	12-14	12	17	15-16	15	18	16-17	16
CIP (5)	50 <sup>1</sup>	14-15	14	50 <sup>1</sup>	15-16	15	50 <sup>1</sup>	16-17	16
AMI (30)	- <sup>2</sup>	≥13	13	16	14-15	14	16	14-15	14
GEN (10)	14	12-13	12	14	12-13	12	15	13-14	13
COT (1.25/23.75)	13	≤12	- <sup>2</sup>	13	10-12	10	13	10-12	10

**C** - bakteriální kmen je citlivý při standardním dávkování; **ATU** - oblast technické nejistoty (nelze s jistotou říct, zda je bakterie na dané antibiotikum citlivá nebo rezistentní); **R** - bakteriální kmen je rezistentní na dané antibiotikum; **50<sup>1</sup>** - průměr inhibiční zóny, pro kterou je kritérium C (citlivý při standardním dávkování) stanoveno na ≥ 50 mm je EUCASTem vytvořena úmyslně, aby se zabránilo pod-dávkování antibiotika. Pokud se hodnota inhibiční zóny nachází mezi hodnotou ATU a S, je doporučeno označit kmen jako I - citlivý při zvýšeném dávkování (Susceptible, increased exposure); **-<sup>2</sup>** - citlivost/rezistence (C/R) nemůže být v daný čas dle doporučení EUCAST definována; **MER** – meropenem, **CIP** – ciprofloxacín; **AMI** – amikacín, **GEN** – gentamicin; **COT** – kotrimoxazol (trimetoprim/sulfametoxazol)

**Tabulka 11:** *Staphylococcus aureus* – tabulka interpretačních kritérií na základě průměru inhibiční zóny (mm) v jednotlivých časech měření.

Antibiotikum (obsah µg)	4 hodiny			6 hodin			8 hodin		
	C ≥	ATU	R <	C ≥	ATU	R <	C ≥	ATU	R <
GEN (10)	14	12-13	12	15	13-14	13	16	14-15	14
CLI (2)	16	≤15	- <sup>2</sup>	19	16-18	16	19	16-18	16

**C** - bakteriální kmen je citlivý při standardním dávkování; **ATU** - oblast technické nejistoty (nelze s jistotou říct, zda je bakterie na dané antibiotikum citlivá nebo rezistentní); **R** - bakteriální kmen je rezistentní na dané antibiotikum; **-<sup>2</sup>** - citlivost/rezistence (C/R) nemůže být v daný čas dle doporučení EUCAST definována; **GEN** – gentamicin; **CLI** - klindamycin

**Tabulka 12:** *Enterococcus faecalis* – tabulka interpretačních kritérií na základě průměru inhibiční zóny (mm) v jednotlivých časech měření.

Antibiotikum (obsah µg)	4 hodiny			6 hodin			8 hodin		
	C ≥	ATU	R <	C ≥	ATU	R <	C ≥	ATU	R <
AMP (2)	9	≤8	- <sup>2</sup>	9	≤8	- <sup>2</sup>	9	≤8	- <sup>2</sup>
VAN (5)	- <sup>2</sup>	≥10	10	- <sup>2</sup>	≥10	10	- <sup>2</sup>	≥10	10
LNZ (10)	17	14-16	14	17	14-16	14	17	14-16	14

**C** - bakteriální kmen je citlivý při standardním dávkování; **ATU** - oblast technické nejistoty (nelze s jistotou říct, zda je bakterie na dané antibiotikum citlivá nebo rezistentní); **R** - bakteriální kmen je rezistentní na dané antibiotikum; **-<sup>2</sup>** - citlivost/rezistence (C/R) nemůže být v daný čas dle doporučení EUCAST definována; **AMP** – ampicilin; **VAN** – vankomycin; **LNZ** – linezolid

**Tabulka 13:** *Enterococcus faecium* – tabulka interpretačních kritérií na základě průměru inhibiční zóny (mm) v jednotlivých časech měření.

Antibiotikum (obsah µg)	4 hodiny			6 hodin			8 hodin		
	C ≥	ATU	R <	C ≥	ATU	R <	C ≥	ATU	R <
VAN (5)	- <sup>2</sup>	≥12	12	- <sup>2</sup>	≥13	13	- <sup>2</sup>	≥13	13
LNZ (10)	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>	20	17-19	17	19	17-18	17

**C** - bakteriální kmen je citlivý při standardním dávkování; **ATU** - oblast technické nejistoty (nelze s jistotou říct, zda je bakterie na dané antibiotikum citlivá nebo rezistentní); **R** - bakteriální kmen je rezistentní na dané antibiotikum; -<sup>2</sup> - citlivost/rezistence (C/R) nemůže být v daný čas dle doporučení EUCAST definována; **VAN** – vankomycin; **LNZ** - linezolid

Výsledky citlivosti získané pomocí metody RAST byly porovnány s výsledky získanými referenční metodou – stanovení citlivosti na antibiotika pomocí diluční bujónové mikrometody (stanovení MIC). Data byla dohledána v laboratorním informačním systému (LIMS). Výsledky citlivosti stanovené referenční metodou byly jednotně srovnány s výsledky RAST po 6 hodinách inkubace, jelikož u některých bakteriálních kmenů, zejména u grampozitivních bakterií, nebylo možné po 4 hodinách odečíst velikost inhibičních zón pro slabý nárůst na kultivačním agaru.

Dále byl v rámci vyhodnocení metody RAST sledován výskyt a) velmi závažných chyb – bakterie byla pomocí metody RAST vyhodnocena jako citlivá na dané antibiotikum, ale pomocí referenční metody stanovením MIC byla vyhodnocena jako rezistentní; b) závažných chyb – bakterie byla pomocí metody RAST vyhodnocena jako rezistentní, ale pomocí referenční metody byla vyhodnocena jako citlivá.



## 5. Výsledky

### 5.1 Přímá identifikace z hemokultur pomocí MALDI-TOF MS

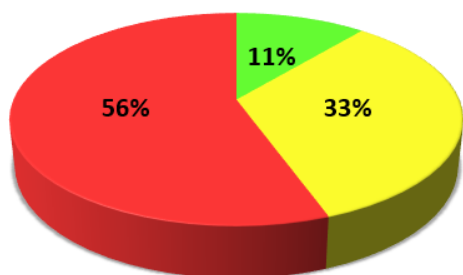
Celkem byla provedena identifikace ze 169 pozitivních hemokultur, a to identifikace přímá s využitím home-made metody a identifikace z kultur získaných klasickým postupem izolací na kultivačních půdách. Identifikace byla provedena pomocí analýzy MALDI-TOF MS s využitím softwaru MALDI Biotyper. Na základě identifikačního skóre pak byla identifikace bakteriálního kmene označena jako spolehlivá (identifikace na úrovni druhu), pravděpodobná (identifikace na úrovni rodu) a nespolehlivá (bakteriální agens se nepodařilo identifikovat). Mezi skupinou identifikovanou z hemokultur a skupinou identifikovanou z kultur bylo provedeno porovnání spolehlivosti identifikace (obrázky 8–12).

Bakterie identifikované z pozitivních hemokultur a kultur izolovaných na kultivačních půdách byly rozděleny do pěti skupin – *Streptococcus* (grampozitivní koky v řetězcích), *Staphylococcus* (grampozitivní koky v hloučcích), *Enterococcus* (grampozitivní koky v řetězcích), fermentující gramnegativní bakterie (enterobakterie) a nefermentující gramnegativní bakterie.

#### Rod *Streptococcus* (grampozitivní koky v řetězcích)

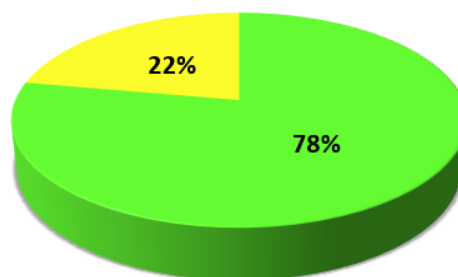
Z celkového počtu analytů patřilo 5,33 % (9/169) do rodu *Streptococcus* (obrázek 8). Identifikace přímo z hemokultur byla spolehlivá (identifikace na úrovni druhu) v 11 % (1/9), pravděpodobná (identifikace na úrovni rodu) ve 33 % (3/9) a nespolehlivá v 56 % (5/9). Oproti tomu identifikace z kultur byla mnohem úspěšnější – spolehlivá v 78 % (7/9) a pravděpodobná v 22 % (2/9).

***Streptococcus* - identifikace z hemokultur**



■ SPOLEHLIVÁ ■ PRAVDĚPODOBNÁ ■ NESPOLEHLIVÁ

***Streptococcus* - identifikace z kultur**



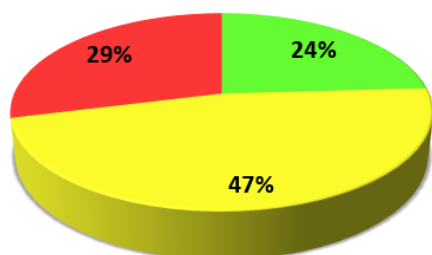
■ SPOLEHLIVÁ ■ PRAVDĚPODOBNÁ

**Obrázek 8:** Na obrázku je zobrazeno porovnání identifikace bakterií rodu *Streptococcus* pomocí MALDI-TOF MS přímo z hemokultur a z kultivovaných bakterií. Na základě identifikačního skóre jsou analyty klasifikovány jako určené spolehlivě (na úrovni druhu), pravděpodobně (na úrovni rodu) a nespolehlivě (bakteriální agens se nepodařilo určit).

### Rod *Staphylococcus* (grampozitivní koky v hloučcích)

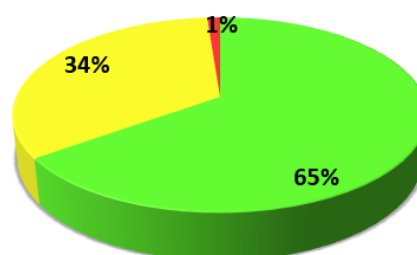
Z celkového počtu analytů bylo 49,11 % (83/19) z rodu *Staphylococcus* (obrázek 9). Identifikace z hemokultur byla spolehlivá v 24 % (20/83), pravděpodobná v 47 % (39/83) a nespolehlivá v 29 % (24/83). V případě určení bakterií z kultur byla identifikace spolehlivá v 65 % (54/83), pravděpodobná v 34 % (28/83) a nespolehlivá v 1 % (1/83).

**Staphylococcus - identifikace z hemokultur**



■ SPOLEHLIVÁ ■ PRAVDĚPODOBNÁ ■ NESPOLEHLIVÁ

**Staphylococcus - identifikace z kultur**



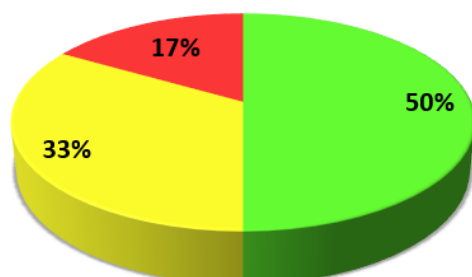
■ SPOLEHLIVÁ ■ PRAVDĚPODOBNÁ ■ NESPOLEHLIVÁ

**Obrázek 9:** Na obrázku je zobrazeno porovnání identifikace bakterií rodu *Staphylococcus* pomocí MALDI-TOF MS přímo z hemokultur a z kultivovaných bakterií. Na základě identifikačního skóre jsou analyty klasifikovány jako určené spolehlivě (na úrovni druhu), pravděpodobně (na úrovni rodu) a nespolehlivě (bakteriální agens se nepodařilo určit).

### Rod *Enterococcus* (grampozitivní koky v řetězcích)

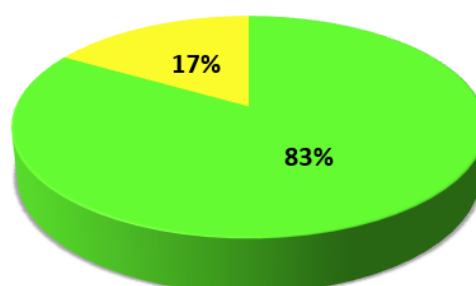
Rod *Enterococcus* byl zastoupen v 3,55 % (6/169) z celkového počtu analytů (obrázek 10). V 50 % (3/6) byla identifikace analytů přímo z hemokultury vyhodnocena jako spolehlivá, v 33 % (2/6) jako pravděpodobná a nespolehlivá v 17 % (1/6). V porovnání s přímou identifikací, byla identifikace bakterií z kultur spolehlivá v 83 % (5/6) a pravděpodobná v 17 % (1/6).

**Enterococcus - identifikace z hemokultur**



■ SPOLEHLIVÁ ■ PRAVDĚPODOBNÁ ■ NESPOLEHLIVÁ

**Enterococcus - identifikace z kultur**



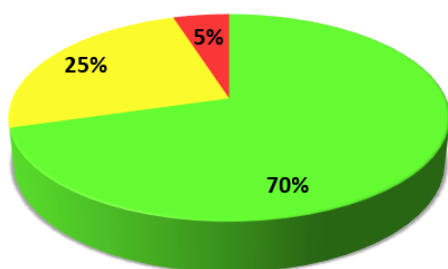
■ SPOLEHLIVÁ ■ PRAVDĚPODOBNÁ

**Obrázek 10:** Na obrázku je zobrazeno porovnání identifikace bakterií rodu *Enterococcus* pomocí MALDI-TOF MS přímo z hemokultur a z kultivovaných bakterií. Na základě identifikačního skóre jsou analyty klasifikovány jako určené spolehlivě (na úrovni druhu), pravděpodobně (na úrovni rodu) a nespolehlivě (bakteriální agens se nepodařilo určit).

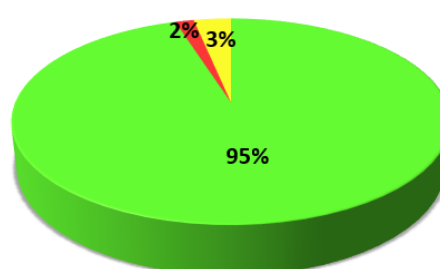
### Fermentující gramnegativní bakterie (enterobakterie)

Fermentující gramnegativní bakterie (obrázek 11) byly v testované skupině zahrnuty v 36,09 % (61/169). Provedená identifikace přímo z hemokultur byla spolehlivá (na úrovni druhu) v 70 % (43/61), pravděpodobná (na úrovni rodu) v 25 % (15/61) a nespolehlivá (analyt se nepodařilo určit) v 5 % (3/61). V případě analýzy z kultur byla identifikace definována jako spolehlivá v 95 % (58/61), pravděpodobná ve 2 % (1/61) a nespolehlivá ve 3 % (2/61).

Fermentující tyčinky - identifikace z hemokultur



Fermentující tyčinky - identifikace z kultur



■ SPOLEHLIVÁ ■ PRAVDĚPODOBNÁ ■ NESPOLEHLIVÁ

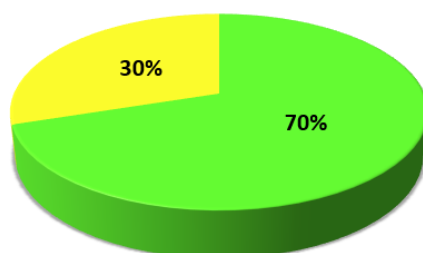
■ SPOLEHLIVÁ ■ PRAVDĚPODOBNÁ ■ NESPOLEHLIVÁ

**Obrázek 11:** Na obrázku je zobrazeno porovnání identifikace gramnegativních fermentujících bakterií (enterobakterií) pomocí MALDI-TOF MS přímo z hemokultur a z kultivovaných bakterií. Na základě identifikačního skóre jsou analyty klasifikovány jako určené spolehlivě (na úrovni druhu), pravděpodobně (na úrovni rodu) a nespolehlivě (bakteriální agens se nepodařilo určit).

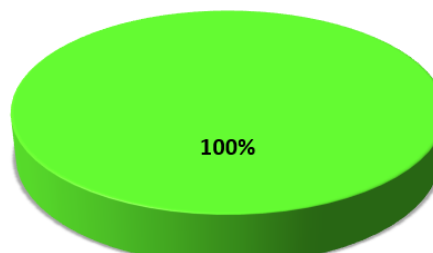
### Nefermentující gramnegativní bakterie

Poslední skupinu představovaly nefermentující gramnegativní bakterie, které byly zastoupeny v 5,92 % (10/169) z celkového počtu analytů (obrázek 12). Provedená identifikace bakterií přímo z hemokultur byla spolehlivá v 70 % (7/10) a pravděpodobná v 30 % (3/10). Naproti tomu identifikace z kultury byla spolehlivá ve 100 % (10/10).

Nefermentující tyčinky - identifikace z hemokultur



Nefermentující tyčinky - identifikace z kultur



■ SPOLEHLIVÁ ■ PRAVDĚPODOBNÁ

■ SPOLEHLIVÁ

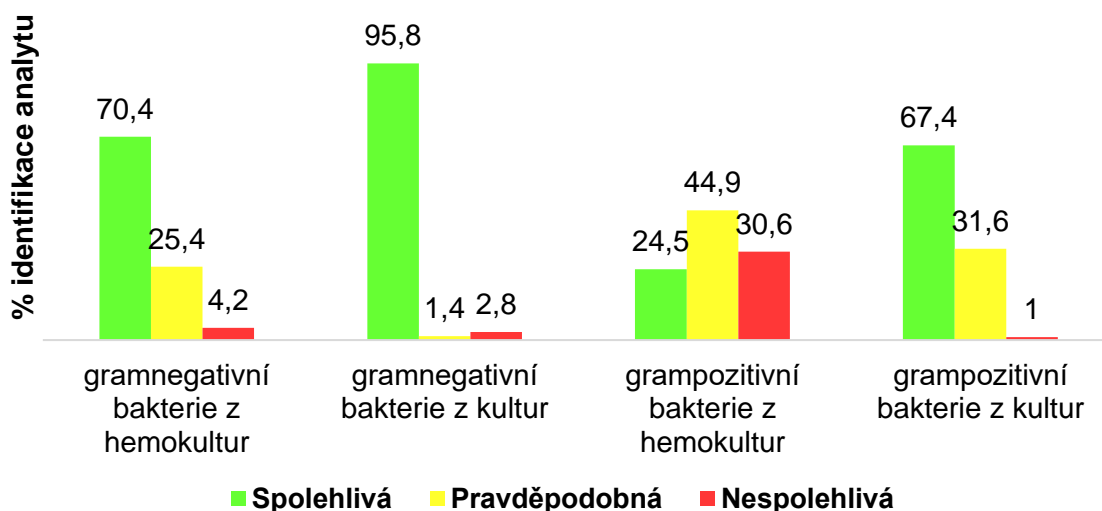
**Obrázek 12:** Na obrázku je zobrazeno porovnání identifikace gramnegativních nefermentujících bakterií (enterobakterií) pomocí MALDI-TOF MS přímo z hemokultur a z kultivovaných bakterií. Na základě identifikačního skóre jsou analyty klasifikovány jako určené spolehlivě (na úrovni druhu) a pravděpodobně (na úrovni rodu).

Na obrázku 13 je zobrazeno celkové procento spolehlivých (na úrovni druhu) a pravděpodobných (na úrovni rodu) identifikací a procento neúspěšných identifikací. Porovnány jsou skupiny grampozitivních a gramnegativních bakterií a identifikace provedené pomocí MALDI-TOF MS přímo z pozitivních hemokultivačních lahvíček versus identifikace z vykultivovaných bakteriálních izolátů. Vyšší procento úspěšné identifikace bylo zaznamenáno u gramnegativních bakterií, a to v obou případech, bakterií identifikovaných přímo z pozitivních hemokultur a bakterií identifikovaných z kultury. V obou případech se podařilo identifikovat více než 95 % analytů, konkrétně u hemokultur spolehlivě (na úroveň druhu) se podařilo identifikovat 70,4 % a pravděpodobně (na úroveň rodu) 25,4 %. U izolovaných kultur byla identifikace spolehlivá (druh) celkem v 95,8 % a pravděpodobná (rod) v 1,4 %.

U grampozitivních bakterií se z hemokultur podařilo identifikovat celkem 69,4 %, na úrovni druhu 24,5 % a na úrovni rodu 44,9 %. Při identifikaci z kultur se podařilo určit 99 % analytů, spolehlivě 67,4 % a pravděpodobně 31,6 %.

Přímá identifikace z hemokultur má menší podíl spolehlivé identifikace na úrovni druhu, než je tomu v případě identifikace z izolovaných kultur, přesto lze tuto metodu považovat za spolehlivou a doporučit ji do běžného provozu laboratoře.

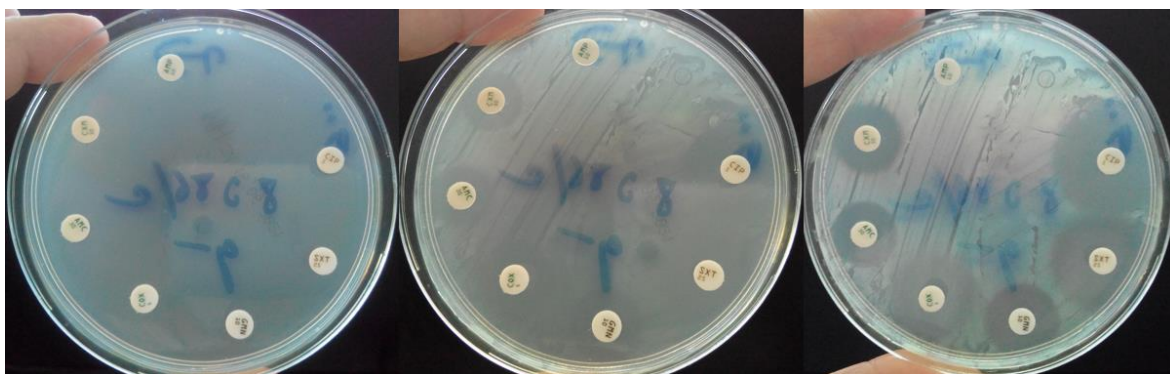
### Identifikace bakterií pomocí MALDI-TOF MS



**Obrázek 13:** Celkové vyhodnocení procenta identifikace grampozitivních a gramnegativních bakterií pomocí MALDI-TOF MS z pozitivních hemokultur a z bakteriálních kultur izolovaných na kultivačních půdách. Na základě identifikačního skóre je identifikace analytů klasifikována jako spolehlivá (určení na úrovni druhu), pravděpodobná (určení na úrovni rodu) a nespolehlivá (bakteriální agens se nepodařilo určit).

## 5.2 Rychlé stanovení antimikrobní citlivosti (RAST)

Na základě identifikace MALDI-TOF MS byla u bakteriálních kmenů *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium* provedena metoda rychlého stanovení antimikrobní citlivosti (RAST) dle doporučeného postupu Evropské komise pro stanovení antimikrobní citlivosti (EUCAST). V rámci metody byl proveden odečet velikosti inhibičních zón na kultivačním agaru po 4 a/nebo po 6 hodinách (obrázky 14 -16). Podle interpretačních kritérií doporučených pro metodu RAST (EUCAST) byly následně jednotlivé bakteriální kmeny vyhodnoceny jako rezistentní nebo citlivé na testované antibiotikum, popřípadě uzavřeny jako neinterpretovatelné (oblast technické nejistoty – ATU).

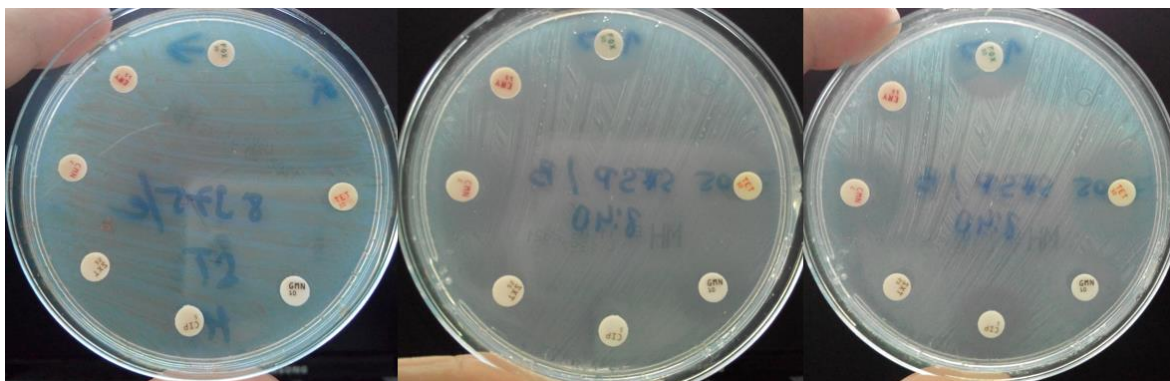


**Obrázek 14:** Vznik inhibičních zón kolem aplikovaných ATB disků v čase 0, 4 a 6 hodin u enterobakterie *Escherichia coli* na Mueller-Hinton agaru. V této sestavě jsou následující ATB disky (od horní části plotny dále proti směru hodinových ručiček) **AMP** – ampicilin; **CRX** – cefuroxim; **AMC** – amoxicilin/kyselina klavulanová; **CTX** – cefotaxim; **GEN** – gentamicin; **COT** – kotrimoxazol (trimetoprim/sulfametoxazol); **CIP** – ciprofloxacin.



**Obrázek 15:** Vznik inhibičních zón kolem aplikovaných ATB disků v čase 0, 4 a 6 hodin u enterobakterie *Escherichia coli* na Mueller-Hinton agaru. V této sestavě jsou následující ATB disky (od horní části plotny dále proti směru hodinových ručiček a nakonec uprostřed) **PPT** – piperacilin/tazobaktam; **MER** – meropenem; **AMI** – amikacin; **TIG** – tigecyklin; **CTZ** – ceftazidim.





**Obrázek 16:** Vznik inhibičních zón kolem ATB disků v čase 0, 4 a 6 hodin u bakterie *Staphylococcus aureus* na Mueller-Hinton agaru. V sestavě jsou aplikovány ATB disky (od horní části plotny proti směru hodinových ručiček) - **CXT** – cefoxitim; **ERY** – erytromycin; **CLI** – klindamycin; **COT** – kotrimoxazol (trimetoprim/sulfametoxazol); **CIP** – ciprofloxacín; **GEN** – gentamicin; **TET** – tetracyklin.

Inhibiční zóny kolem nasazených sestav ATB disků bylo možné ve většině případů odečítat již po 4 hodinách, ale jelikož je nutné, aby byly zóny zřetelně čitelné, byl v některých případech proveden odečet až po 6 hodinách kultivace.

Výsledky získané metodou RAST byly poté porovnány s výsledky MIC (minimální inhibiční koncentrace) získanými referenční metodou stanovení citlivosti (diluční mikrometodou) a jejich interpretací. Hodnoty MIC a jejich interpretace byly vyhledány v laboratorním informačním systému (LIMS). Dále byl v rámci metody RAST hodnocen výskyt velmi závažných chyb (metodou RAST stanovená citlivost na antibiotikum vs. referenční metodou výsledek uzavřen jako rezistentní na dané antibiotikum) a výskyt závažných chyb (metodou RAST stanovená rezistence vs. referenční metodou stanovená citlivost na antibiotikum).

### ***Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae***

Pomocí metody RAST bylo vyhodnoceno 10 kmenů *Escherichia coli* (tabulka 14 a 15) a 10 kmenů *Klebsiella pneumoniae* (tabulka 16 a 17), u každého kmene byla testována citlivost u 7 antibiotik. Celkem bylo tedy provedeno 280 testů. U všech kmenů bylo možno hodnotit velikost inhibičních zón u všech testovaných antibiotik již po 4 hodinách inkubace (280/280). Po 4 hodinách inkubace byla hodnota ATU (oblast technické nejistoty, bakteriální kmen nelze kategorizovat jako citlivý/rezistentní na dané antibiotikum) zaznamenána v 8,5 % (24/280), po 6 hodinách ve 4,2 % (12/280).

Ve čtyřech případech (1,4 %) byla po 4 hodinách kultivace zaznamenána závažná chyba – kmen byl pomocí metody RAST odečten jako rezistentní na dané antibiotikum, ale podle referenční metody stanovení citlivosti (MIC) byl stanoven jako citlivý na dané antibiotiku. Po 6 hodinách kultivace již tato chyba nebyla zaznamenána.

Ani v jednom případě nebyla zaznamenána velmi závažná chyba (antibiotikum je pomocí metody RAST definované jako citlivé, ale metodou diluční jako rezistentní) po 4 ani po 6 hodinách kultivace.

**Tabulka 14:** *Escherichia coli* kmen č. 1-5. V tabulce jsou uvedeny průměry inhibičních zón (mm) a jejich interpretace stanovené pomocí metody RAST. Dále je uvedena hodnota MIC (včetně interpretace), která je stanovena standardním postupem za použití diluční mikrometody, a její porovnání s výsledky získanými metodou RAST.

Kmen č.	Antibiotikum (obsah µg)	RAST			MIC (mg/l)	Shoda MIC/RAST
		4 hodiny	6 hodin	8 hodin		
1 8687/C	PPT (30/6)	14/ATU	16-17/ATU	NH	4/C	nelze
	CTZ (10)	10/R	18-19/C	NH	0,2/C	ano
	MER (10)	20/C	25/C	NH	≤0,1/C	ano
	CIP (5)	17/C	25/C	NH	≤0,03/C	ano
	AMI (30)	14/ATU	17-18/C	NH	2/C	ano
	GEN (10)	14/C	17/C	NH	2/C	ano
	COT (1,25/23,75)	0/R	0/R	NH	>256/R	ano
2 5102/A	PPT (30/6)	0/R	0/R	NH	>128/R	ano
	CTZ (10)	15-16/C	18-19/C	NH	≤0,125/C	ano
	MER (10)	21-22/C	24/C	NH	≤0,125/C	ano
	CIP (5)	0/R	0/R	NH	4/R	ano
	AMI (30)	11-12/R	11/R	NH	32/R	ano
	GEN (10)	13/ATU	13/ATU	NH	1/C	nelze
	COT (1,25/23,75)	15/C	20/C	NH	≤8/C	ano
3 2321/A	PPT (30/6)	0/R	0/R	NH	>128/R	ano
	CTZ (10)	15-16/C	18-19/C	NH	≤0,125/C	ano
	MER (10)	21-22/C	24/C	NH	≤0,125/C	ano
	CIP (5)	0/R	0/R	NH	4/R	ano
	AMI (30)	11-12/R	11/R	NH	32/R	ano
	GEN (10)	13/ATU	13/ATU	NH	1/C	nelze
	COT (1,25/23,75)	15/C	20/C	NH	≤8/C	ano
4 4441/C	PPT (30/6)	15/ATU	15/ATU	NH	32/R	nelze
	CTZ (10)	9/R	9,5/R	NH	>16/R	ano
	MER (10)	21/C	23/C	NH	≤0,1/C	ano
	CIP (5)	0/R	0/R	NH	>4/R	ano
	AMI (30)	16/C	17/C	NH	1/C	ano
	GEN (10)	17/C	20/C	NH	0,2/C	ano
	COT (1,25/23,75)	0/R	15/ATU	NH	8/C	nelze
5 8051/A	PPT (30/6)	14-15/ATU	15-16/ATU	NH	2/C	nelze
	CTZ (10)	15/C	17/C	NH	≤0,125/C	ano
	MER (10)	18/C	20/C	NH	≤0,06/C	ano
	CIP (5)	19/C	22/C	NH	≤0,06/C	ano
	AMI (30)	16/C	15-16/C	NH	2/C	ano
	GEN (10)	15/C	15-16/C	NH	1/C	ano
	COT (1,25/23,75)	16/C	17-18/C	NH	≤2/C	ano

**RAST** – rychlé stanovení antimikrobní citlivosti; **MIC** – minimální inhibiční koncentrace; **C** - bakteriální kmen je citlivý při standardním dávkování; **ATU** - oblast technické nejistoty (nelze s jistotou říct, zda je bakterie na dané antibiotikum citlivá nebo rezistentní); **R** - bakteriální kmen je rezistentní na dané antibiotikum; **NH** – nebylo hodnoceno; **nelze** – pomocí metody RAST nebylo možné u testovaného kmene jednoznačně určit, zda je na dané antibiotikum citlivý, nebo rezistentní, nelze se tudíž vyjádřit, zda se jedná/nejedná o shodu s metodou stanovení MIC; **PPT** – piperacilin/tazobaktam; **CTZ** – ceftazidim; **MER** – meropenem, **CIP** – ciprofloxacín; **AMI** – amikacin, **GEN** – gentamicin; **COT** – kotrimoxazol (trimetoprim/sulfametoxazol)

**Tabulka 15:** *Escherichia coli* kmen č. 6-10. V tabulce jsou uvedeny průměry inhibičních zón (mm) a jejich interpretace stanovené pomocí metody RAST. Dále je uvedena hodnota MIC (včetně interpretace), která je stanovena standardním postupem za použití diluční mikrometody, a její porovnání s výsledky získanými metodou RAST.

Kmen č.	Antibiotikum (obsah µg)	RAST			MIC (mg/l)	Shoda MIC/RAST
		4 hodiny	6 hodin	8 hodin		
6 19835/B	PPT (30/6)	0/R	16-17/ATU	NH	≤1/C	nelze
	CTZ (10)	12-13/ATU	17/C	NH	≤0,1/C	ano
	MER (10)	18-19/C	23/C	NH	≤0,1/C	ano
	CIP (5)	17/C	23/C	NH	≤0,03/C	ano
	AMI (30)	13-14/ATU	16/C	NH	1/C	ano
	GEN (10)	14/C	16-17/C	NH	0,5/C	ano
	COT (1,25/23,75)	16/C	20/C	NH	≤2/C	ano
7 19112/B	PPT (30/6)	15-16/ATU	18/C	NH	≤1/C	ano
	CTZ (10)	14/ATU	17-18/C	NH	≤0,1/C	ano
	MER (10)	25/C	25-26/C	NH	≤0,1/C	ano
	CIP (5)	20/C	24-25/C	NH	≤0,06/C	ano
	AMI (30)	15/C	15/C	NH	4/C	ano
	GEN (10)	15/C	16/C	NH	0,5/C	ano
	COT (1,25/23,75)	22/C	25/C	NH	≤2/C	ano
8 20668/C	PPT (30/6)	14/ATU	18/C	NH	≤1/C	ano
	CTZ (10)	15/C	21/C	NH	≤0,1/C	ano
	MER (10)	21/C	26/C	NH	≤0,1/C	ano
	CIP (5)	10/R	11/R	NH	>8/R	ano
	AMI (30)	15-16/C	18/C	NH	≤1/C	ano
	GEN (10)	15/C	18/C	NH	1/C	ano
	COT (1,25/23,75)	0/R	0/R	NH	>256/R	ano
9 17490/B	PPT (30/6)	0/R	0/R	NH	>256/R	ano
	CTZ (10)	10/R	12/R	NH	8/R	ano
	MER (10)	20/C	22/C	NH	≤0,1/C	ano
	CIP (5)	0/R	0/R	NH	>8/R	ano
	AMI (30)	10/R	10/R	NH	>24/R	ano
	GEN (10)	15/C	15/C	NH	1/C	ano
	COT (1,25/23,75)	17/C	20/C	NH	≤2/C	ano
10 18796/C	PPT (30/6)	16/ATU	18/C	NH	≤1/C	ano
	CTZ (10)	18/C	20/C	NH	≤0,1/C	ano
	MER (10)	23/C	24/C	NH	≤0,1/C	ano
	CIP (5)	23/C	25/C	NH	≤0,06/C	ano
	AMI (30)	16/C	17/C	NH	8/C	ano
	GEN (10)	15/C	17/C	NH	1/C	ano
	COT (1,25/23,75)	14/C	18/C	NH	8/C	ano

**RAST** – rychlé stanovení antimikrobní citlivosti; **MIC** – minimální inhibiční koncentrace; **C** - bakteriální kmen je citlivý při standardním dávkování; **ATU** - oblast technické nejistoty (nelze s jistotou říct, zda je bakterie na dané antibiotikum citlivá nebo rezistentní); **R** - bakteriální kmen je rezistentní na dané antibiotikum; **NH** – nebylo hodnoceno; **nelze** – pomocí metody RAST nebylo možné u testovaného kmene jednoznačně určit, zda je na dané antibiotikum citlivý, nebo rezistentní, nelze se tudíž vyjádřit, zda se jedná/nejedná o shodu s metodou stanovení MIC; **PPT** – piperacilin/tazobaktam; **CTZ** – ceftazidim; **MER** – meropenem, **CIP** – ciprofloxacín; **AMI** – amikacin, **GEN** – gentamicin; **COT** – kotrimoxazol (trimetoprim/sulfametoxazol)



**Tabulka 16:** *Klebsiella pneumoniae* kmen č. 1-5. V tabulce jsou uvedeny průměry inhibičních zón (mm) a jejich interpretace stanovené pomocí metody RAST. Dále je uvedena hodnota MIC (včetně interpretace), která je stanovena standardním postupem za použití diluční mikrometody, a její porovnání s výsledky získanými metodou RAST.

Kmen č.	Antibiotikum (obsah µg)	RAST			MIC (mg/l)	Shoda MIC/RAST
		4 hodiny	6 hodin	8 hodin		
1 15666/B	PPT (30/6)	8/R	12/R	NH	64/R	ano
	CTZ (10)	13-14/ATU	17/C	NH	0,25/C	ano
	MER (10)	12/R	18-19/C	NH	≤0,125/C	ano
	CIP (5)	0/R	0/R	NH	>4/R	ano
	AMI (30)	14/ATU	16/C	NH	8/C	ano
	GEN (10)	15/C	15/C	NH	≤1/C	ano
	COT (1,25/23,75)	0/R	0/R	NH	>256/R	ano
2 7418/A	PPT (30/6)	8/R	NH	NH	>128/R	ano
	CTZ (10)	0/R	NH	NH	>16/R	ano
	MER (10)	19/C	NH	NH	0,125/C	ano
	CIP (5)	12/R	NH	NH	>16/R	ano
	AMI (30)	15/C	NH	NH	4/C	ano
	GEN (10)	0/R	NH	NH	>64/R	ano
	COT (1,25/23,75)	0/R	NH	NH	>256/R	ano
3 8338/C	PPT (30/6)	14/ATU	14/ATU	NH	2/C	nelze
	CTZ (10)	15/C	16/C	NH	≤0,125/C	ano
	MER (10)	15/C	17/C	NH	≤0,125/C	ano
	CIP (5)	14/R	15/ATU	NH	1/R	nelze
	AMI (30)	15/C	15/C	NH	1/C	ano
	GEN (10)	15/C	16/C	NH	≤0,25/C	ano
	COT (1,25/23,75)	0/R	0/R	NH	>256/R	ano
4 18285/A	PPT (30/6)	10/R	11-12/R	NH	32/R	ano
	CTZ (10)	9/R	9/R	NH	>16/R	ano
	MER (10)	14/ATU	17-18/C	NH	≤0,125/C	ano
	CIP (5)	13/R	12/R	NH	>4/R	ano
	AMI (30)	14/ATU	15/C	NH	4/C	ano
	GEN (10)	0/R	0/R	NH	128/R	ano
	COT (1,25/23,75)	0/R	0/R	NH	>256/R	ano
5 18982	PPT (30/6)	14/ATU	14/ATU	NH	2/C	nelze
	CTZ (10)	15/C	16/C	NH	≤0,125/C	ano
	MER (10)	13/ATU	18-19/C	NH	≤0,125/C	ano
	CIP (5)	20/C	20/C	NH	≤0,06/C	ano
	AMI (30)	15/C	15/C	NH	≤0,5/C	ano
	GEN (10)	14-15/C	15/C	NH	≤0,5/C	ano
	COT (1,25/23,75)	16-17/C	20/C	NH	≤2/C	ano

**RAST** – rychlé stanovení antimikrobní citlivosti; **MIC** – minimální inhibiční koncentrace; **C** - bakteriální kmen je citlivý při standardním dávkování; **ATU** - oblast technické nejistoty (nelze s jistotou říct, zda je bakterie na dané antibiotikum citlivá nebo rezistentní); **R** - bakteriální kmen je rezistentní na dané antibiotikum; **NH** – nebylo hodnoceno; **nelze** – pomocí metody RAST nebylo možné u testovaného kmene jednoznačně určit, zda je na dané antibiotikum citlivý, nebo rezistentní, nelze se tudíž vyjádřit, zda se jedná/nejedná o shodu s metodou stanovení MIC; **PPT** – piperacilin/tazobaktam; **CTZ** – ceftazidim; **MER** – meropenem, **CIP** – ciprofloxacín; **AMI** – amikacin, **GEN** – gentamicin; **COT** – kotrimoxazol (trimetoprim/sulfametoxazol)

**Tabulka 17:** *Klebsiella pneumoniae* kmen č. 6-10. V tabulce jsou uvedeny průměry inhibičních zón (mm) a jejich interpretace stanovené pomocí metody RAST. Dále je uvedena hodnota MIC (včetně interpretace), která je stanovena standardním postupem za použití diluční mikrometody, a její porovnání s výsledky získanými metodou RAST.

Kmen č.	Antibiotikum (obsah µg)	RAST			MIC (mg/l)	Shoda MIC/RAST
		4 hodiny	6 hodin	8 hodin		
6 301/B	PPT (30/6)	15/C	17/C	NH	2/C	ano
	CTZ (10)	15/C	18/C	NH	≤0,125/C	ano
	MER (10)	15/C	19/C	NH	≤0,125/C	ano
	CIP (5)	20/C	20/C	NH	≤0,03/C	ano
	AMI (30)	15/C	15/C	NH	≤0,5/C	ano
	GEN (10)	15/C	15/C	NH	≤0,125/C	ano
	COT (1,25/23,75)	20/C	20/C	NH	≤2/C	ano
7 1362/C	PPT (30/6)	0/R	0/R	NH	32/R	ano
	CTZ (10)	0/R	0/R	NH	>16/R	ano
	MER (10)	15/C	18-20/C	NH	≤0,125/C	ano
	CIP (5)	12-13/R	12-13/R	NH	>4/R	ano
	AMI (30)	14/ATU	16/C	NH	2/C	ano
	GEN (10)	0/R	0/R	NH	>16/R	ano
	COT (1,25/23,75)	0/R	0/R	NH	>256/R	ano
8 1452/C	PPT (30/6)	0/R	0/R	NH	32/R	ano
	CTZ (10)	13/ATU	13/R	NH	>16/R	ano
	MER (10)	17-18/C	19/C	NH	≤0,125/C	ano
	CIP (5)	13/R	13/R	NH	>4/R	ano
	AMI (30)	15/C	15/C	NH	2/C	ano
	GEN (10)	0/R	0/R	NH	>16/R	ano
	COT (1,25/23,75)	0/R	0/R	NH	>256/R	ano
9 3740/A	PPT (30/6)	14/ATU	15/ATU	NH	2/C	nelze
	CTZ (10)	16/C	16/C	NH	≤0,125/C	ano
	MER (10)	17-18/C	18/C	NH	≤0,125/C	ano
	CIP (5)	20/C	22/C	NH	≤0,03/C	ano
	AMI (30)	16/C	17/C	NH	1/C	ano
	GEN (10)	17/C	18/C	NH	0,5/C	ano
	COT (1,25/23,75)	0/R	0/R	NH	>256/R	ano
10 4405/C	PPT (30/6)	14/ATU	14/ATU	NH	4/C	nelze
	CTZ (10)	15/C	16/C	NH	≤0,125/C	ano
	MER (10)	15/C	17/C	NH	≤0,125/C	ano
	CIP (5)	18/C	20/C	NH	≤0,03/C	ano
	AMI (30)	14/ATU	14/C	NH	≤0,5/C	ano
	GEN (10)	14/C	14/C	NH	1/C	ano
	COT (1,25/23,75)	15/C	17/C	NH	≤2/C	ano

**RAST** – rychlé stanovení antimikrobní citlivosti; **MIC** – minimální inhibiční koncentrace; **C** - bakteriální kmen je citlivý při standardním dávkování; **ATU** - oblast technické nejistoty (nelze s jistotou říct, zda je bakterie na dané antibiotikum citlivá nebo rezistentní); **R** - bakteriální kmen je rezistentní na dané antibiotikum; **NH** – nebylo hodnoceno; **nelze** – pomocí metody RAST nebylo možné u testovaného kmene jednoznačně určit, zda je na dané antibiotikum citlivý, nebo rezistentní, nelze se tudíž vyjádřit, zda se jedná/nejedná o shodu s metodou stanovení MIC; **PPT** – piperacilin/tazobaktam; **CTZ** – ceftazidim; **MER** – meropenem, **CIP** – ciprofloxacín; **AMI** – amikacin, **GEN** – gentamicin; **COT** – kotrimoxazol (trimetoprim/sulfametoxazol)

### ***Pseudomonas aeruginosa***

Celkem bylo metodou RAST otestováno 5 antibiotik u 5 kmenů *Pseudomonas aeruginosa* – celkem 25 testů (tabulka 18). Tento kmen byl jako jediný hodnocen ve shodě s doporučeným postupem EUCAST až po 6 hodinách inkubace. V 28 % (7/25) nebylo možné kategorizovat výsledky citlivosti (velikost inhibiční zóny se nacházela v rozmezí ATU). V 60 % (15/25) se výsledky RAST shodovaly s výsledky stanovení citlivosti

referenční metodou a ve 12 % (3/25) došlo k výskytu závažné chyby (metodou RAST stanovená rezistence na antibiotikum, referenční metodou stanovená citlivost).

**Tabulka 18:** *Pseudomonas aeruginosa* kmen č. 1-5. V tabulce jsou uvedeny průměry inhibičních zón (mm) a jejich interpretace stanovené pomocí metody RAST. Dále je uvedena hodnota MIC (včetně interpretace), která je stanovena standardním postupem za použití diluční mikrometody, a její porovnání s výsledky získanými metodou RAST.

Kmen č.	Antibiotikum (obsah µg)	RAST		MIC (mg/l)	Shoda MIC/RAST
		6 hodin	8 hodin		
1 3826/B	PPT (30/6)	20/I	NH	4/I	ano
	CTZ (10)	14/ATU	NH	1/I	nelze
	MER (10)	20/C	NH	0,25/C	ano
	CIP (5)	23/I	NH	≤0,06/I	ano
	AMI (30)	16/C	NH	1/C	ano
2 18290/A	PPT (30/6)	18/I	NH	4/I	ano
	CTZ (10)	20/I	NH	1/I	ano
	MER (10)	20/C	NH	1/C	ano
	CIP (5)	20/I	NH	≤0,125/I	ano
	AMI (30)	20/C	NH	1/C	ano
3 18091/C	PPT (30/6)	15/ATU	NH	1/I	nelze
	CTZ (10)	12-13/ATU	NH	1/I	nelze
	MER (10)	17-19/C	NH	0,125/C	ano
	CIP (5)	23/I	NH	0,125/I	ano
	AMI (30)	15/ATU	NH	1/C	nelze
4 17528	PPT (30/6)	0/R	NH	4/I	ne
	CTZ (10)	15/I	NH	1/I	ano
	MER (10)	15/ATU	NH	0,25/C	nelze
	CIP (5)	23/I	NH	≤0,125/I	ano
	AMI (30)	19/C	NH	1/C	ano
5 18367	PPT (30/6)	0/R	NH	16/I	ne
	CTZ (10)	0/R	NH	4/I	ne
	MER (10)	0/R	NH	>16/R	ano
	CIP (5)	17-18/ATU	NH	0,5/I	nelze
	AMI (30)	15/ATU	NH	2/C	nelze

**RAST** – rychlé stanovení antimikrobní citlivosti; **MIC** – minimální inhibiční koncentrace; **C** - bakteriální kmen je citlivý při standardním dávkování; **I** - citlivý při zvýšeném dávkování (Susceptible, increased exposure); **ATU** - oblast technické nejistoty (nelze s jistotou říct, zda je bakterie na dané antibiotikum citlivá nebo rezistentní); **R** - bakteriální kmen je rezistentní na dané antibiotikum; **NH** – nebylo hodnoceno; **nelze** – pomocí metody RAST nebylo možné u testovaného kmene jednoznačně určit, zda je na dané antibiotikum citlivý, nebo rezistentní, nelze se tudíž vyjádřit, zda se jedná/nejedná o shodu s metodou stanovení MIC; **PPT** – piperacilin/tazobaktam; **CTZ** – ceftazidim; **MER** – meropenem, **CIP** – ciprofloxacin; **AMI** – amikacin.

### ***Acinetobacter baumannii***

V rámci studie byly v hemokulturách zachyceny celkem 3 kmeny *Acinetobacter baumannii*, u kterých byla metodou RAST stanovena citlivost na 5 antibiotik – celkem 15 testů (tabulka 19). V 67 % bylo možné odečíst citlivost již po 4 hodinách (10/15), po 6 hodinách již bylo možné odečíst citlivost všech testovaných antibiotik. Hodnota ATU byla zaznamenána po 4 hodinách ve 13 % (2 antibiotika), po 6 hodinách bylo možné provést kategorizaci u všech testovaných antibiotik (15/15).

Ani v jednom případě nebyly zaznamenány závažné nebo velmi závažné chyby v porovnání s referenční metodou.

**Tabulka 19:** *Acinetobacter baumannii* kmen č. 1-3. V tabulce jsou uvedeny průměry inhibičních zón (mm) a jejich interpretace stanovené pomocí metody RAST. Dále je uvedena hodnota MIC (včetně interpretace), která je stanovena standardním postupem za použití diluční mikrometody, a její porovnání s výsledky získanými metodou RAST.

Kmen č.	Antibiotikum (obsah µg)	RAST			MIC (mg/l)	Shoda MIC/RAST
		4 hodiny	6 hodin	8 hodin		
1 18944/C	MER (10)	15/C	17/C	NH	≤0,125/C	ano
	CIP (5)	16/I	20-21/I	NH	0,125/I	ano
	AMI (30)	15/- <sup>1</sup>	16/C	NH	8/C	ano
	GEN (10)	14-15/C	16-17/C	NH	2/C	ano
	COT (1,25/23,75)	20/C	23-24/C	NH	≤2/C	ano
2 823/C	MER (10)	NH	20/C	NH	≤0,125/C	ano
	CIP (5)	NH	24/I	NH	0,06/I	ano
	AMI (30)	NH	19/C	NH	2/C	ano
	GEN (10)	NH	18-19/C	NH	4/C	ano
	COT (1,25/23,75)	NH	17-18/C	NH	4/C	ano
3 3825/C	MER (10)	15/C	18/C	NH	0,25/C	ano
	CIP (5)	20/I	22/I	NH	0,125/I	ano
	AMI (30)	15/- <sup>1</sup>	19/C	NH	4/C	ano
	GEN (10)	16/C	18-19/C	NH	2/C	ano
	COT (1,25/23,75)	16/C	18/C	NH	4/C	ano

**RAST** – rychle stanovení antimikrobní citlivosti; **MIC** – minimální inhibiční koncentrace; **C** - bakteriální kmen je citlivý při standardním dávkování; **I** - citlivý při zvýšeném dávkování (Susceptible, increased exposure); **-<sup>1</sup>** citlivost/rezistence (C/R) nemůže být v daný čas dle doporučení EUCAST definována; **ATU** - oblast technické nejistoty (nelze s jistotou říct, zda je bakterie na dané antibiotikum citlivá nebo rezistentní); **R** - bakteriální kmen je rezistentní na dané antibiotikum; **NH** – nebylo hodnoceno; **nelze** – pomocí metody RAST nebylo možné u testovaného kmene jednoznačně určit, zda je na dané antibiotikum citlivý, nebo rezistentní, nelze se tudíž vyjádřit, zda se jedná/nejedná o shodu s metodou stanovení MIC; **MER** – meropenem, **CIP** – ciprofloxacin; **AMI** – amikacin, **GEN** – gentamicin; **COT** – kotrimoxazol (trimetoprim/sulfametoxazol)

### ***Staphylococcus aureus***

Celkem bylo provedeno 20 testů – testováno 10 bakteriálních kmenů a 2 antibiotika (tabulka 20). Po 4 hodinách inkubace nebylo pro slabý růst na kultivačním agaru možno odečíst velikost inhibičních zón v 50 % (10/20) a v 5 % (1/20) nebylo možné výsledek kategorizovat (ATU). Po 6 hodinách bylo možné odečíst všechny testy, v 15 % bez možnosti interpretace (ATU).

V 10 % (2/20) byly zaznamenána velmi závažná chyba – pomocí metody RAST odečtená citlivost na antibiotikum byla v konečném výsledku uzavřena jako rezistentní. V tomto případě se jednalo antibiotikum klindamycin (CLI), u kterého byla fenotypově prokázána tzv. indukibilní rezistence na toto antibiotikum (informace získána z laboratorního informačního systému LIMS).

**Tabulka 20:** *Staphylococcus aureus* kmen č. 1-10. V tabulce jsou uvedeny průměry inhibičních zón (mm) a jejich interpretace stanovené pomocí metody RAST. Dále je uvedena hodnota MIC (včetně interpretace), která je stanovena standardním postupem za použití diluční mikrometody, a její porovnání s výsledky získanými metodou RAST.

Kmen č.	Antibiotikum (obsah µg)	RAST			MIC (mg/l)	Shoda MIC/RAST
		4 hodiny	6 hodin	8 hodin		
1	GEN (10)	NH	15/C	NH	0,25/C	ano
2072/A	CLI (2)	NH	20/C	NH	1/R	ne (ind)
2	GEN (10)	15/C	16/C	NH	0,5/C	ano
3707/A	CLI (2)	19-20/C	20/C	NH	0,125/C	ano
3	GEN (10)	12/ATU	16-17/C	NH	0,5/C	ano
4382/A	CLI (2)	17/C	19/C	NH	0,125/C	ano
4	GEN (10)	15/C	16/C	NH	1/C	ano
5109/B	CLI (2)	16-17/C	20/C	NH	0,25/C	ano
5	GEN (10)	15/C	18/C	NH	1/C	ano
7205/B	CLI (2)	18/C	20/C	NH	0,5/R	ne (ind)
6	GEN (10)	NH	15/C	NH	1/C	ano
7282/B	CLI (2)	NH	18/ATU	NH	0,06/C	nelze
7	GEN (10)	NH	20/C	NH	≤0,125/C	ano
8950/B	CLI (2)	NH	22/C	NH	≤0,06/C	ano
8	GEN (10)	16/C	16/C	NH	0,25/C	ano
20499/C	CLI (2)	20/C	20/C	NH	≤0,06/C	ano
9	GEN (10)	NH	18/C	NH	0,25/C	ano
20604/C	CLI (2)	NH	22/C	NH	≤0,06/C	ano
10	GEN (10)	NH	14/ATU	NH	≤0,125/C	nelze
19229/A	CLI (2)	NH	17/ATU	NH	≤0,06/C	nelze

**RAST** – rychlé stanovení antimikrobní citlivosti; **MIC** – minimální inhibiční koncentrace; **C** - bakteriální kmen je citlivý při standardním dávkování; **-<sup>1</sup>** citlivost/rezistence (C/R) nemůže být v daný čas dle doporučení EUCAST definována; **ATU** - oblast technické nejistoty (nelze s jistotou říct, zda je bakterie na dané antibiotikum citlivá nebo rezistentní); **R** - bakteriální kmen je rezistentní na dané antibiotikum; **NH** – nebylo hodnoceno; **nelze** – pomocí metody RAST nebylo možné u testovaného kmene jednoznačně určit, zda je na dané antibiotikum citlivý, nebo rezistentní, nelze se tudíž vyjádřit, zda se jedná/hejdná o shodu s metodou stanovení MIC; **ind** – po 24 hodinách inkubace u daného kmene prokázána indukibilní rezistence ke klindamycinu **GEN** – gentamicin; **CLI** – clindamycin.

### ***Enterococcus faecalis***

V rámci práce byly vyhodnoceny 3 kmeny a jejich citlivost na 3 antibiotika – celkem 9 testů (tabulka 21). Po 4 hodinách nebylo možné pro nedostatečný růst provést hodnocení u 44,4 % (4/9). Po 6 hodinách byly inhibiční zóny již dostatečně čitelné pro hodnocení - v jednom případě u linezolidu (LNZ) nebylo možné interpretovat výsledek jako citlivý/rezistentní, protože hodnota inhibiční zóny spadala do kategorie ATU. V souladu s doporučením EUCAST nebylo u vankomycinu (VAN) možno v žádném časovém intervalu kategorizovat výsledek jako citlivý - u tohoto antibiotika lze pouze vyslovit podezření na rezistenci při velikosti inhibiční zóny menší než 10 mm. U žádného kmene však rezistence na vankomycin nebyla potvrzena.

Ani v jednom případě nebyla zaznamenána závažná nebo velmi závažná chyba.

**Tabulka 21:** *Enterococcus faecalis* kmen č. 1-3. V tabulce jsou uvedeny průměry inhibičních zón (mm) a jejich interpretace stanovené pomocí metody RAST. Dále je uvedena hodnota MIC (včetně interpretace), která je stanovena standardním postupem za použití diluční mikrometody, a její porovnání s výsledky získanými metodou RAST.

Kmen č.	Antibiotikum (obsah µg)	RAST			MIC (mg/l)	Shoda MIC/RAST
		4 hodiny	6 hodin	8 hodin		
1 2032/B	AMP (2)	NH	9/C	NH	2/C	ano
	VAN (5)	NH	12/- <sup>1</sup>	NH	1/C	nelze
	LNZ (10)	NH	15/ATU	NH	0,5/C	nelze
2 6748/A	AMP (2)	10/C	12/C	NH	2/C	ano
	VAN (5)	12/- <sup>1</sup>	12/- <sup>1</sup>	NH	≤0,5/C	nelze
	LNZ (10)	20/C	20/C	NH	1/C	ano
3 7070/A	AMP (2)	10/C	12/C	NH	2/C	ano
	VAN (5)	12/- <sup>1</sup>	12/- <sup>1</sup>	NH	≤0,5/C	nelze
	LNZ (10)	NH	20/C	NH	1,5/C	ano

**RAST** – rychlé stanovení antimikrobní citlivosti; **MIC** – minimální inhibiční koncentrace; **C** - bakteriální kmen je citlivý při standardním dávkování; **-<sup>1</sup>** citlivost/rezistence (C/R) nemůže být v daný čas dle doporučení EUCAST definována; **ATU** - oblast technické nejistoty (nelze s jistotou říct, zda je bakterie na dané antibiotikum citlivá nebo rezistentní); **R** - bakteriální kmen je rezistentní na dané antibiotikum; **NH** – nebylo hodnoceno; **nelze** – pomocí metody RAST nebylo možné u testovaného kmene jednoznačně určit, zda je na dané antibiotikum citlivý, nebo rezistentní, nelze se tudíž vyjádřit, zda se jedná/nejedná o shodu s metodou stanovení MIC; **AMP** – ampicilin; **VAN** – vankomycin; **LNZ** – linezolid.

### ***Enterococcus faecium***

Pomocí metody rast byly otestovány 2 antibiotika u 5 kmenů – bylo provedeno 10 testů (tabulka 22). Po 4 hodinách nebylo pro slabý růst na kultivačním agaru možno vyhodnotit žádný test. Po 6 hodinách do kategorie ATU spadal jeden test (linezolid). Stejně jako v případě *Enterococcus faecalis*, nebylo možné u *Enterococcus faecium* kategorizovat vankomycin jako citlivý. Rovněž zde však u žádného kmene nebyla v konečném výsledku potvrzena rezistence na vankomycin.

Ani v jednom případě nebyla zaznamenána závažná nebo velmi závažná chyba.

**Tabulka 22:** *Enterococcus faecium* kmen č. 1-5. V tabulce jsou uvedeny průměry inhibičních zón (mm) a jejich interpretace stanovené pomocí metody RAST. Dále je uvedena hodnota MIC (včetně interpretace), která je stanovena standardním postupem za použití diluční mikrometody, a její porovnání s výsledky získanými metodou RAST.

Kmen č.	Antibiotikum (obsah µg)	RAST			MIC (mg/l)	Shoda MIC/RAST
		4 hodiny	6 hodin	8 hodin		
1	VAN (5)	NH	15/- <sup>1</sup>	NH	≤0,5/C	nelze
3943/A	LNZ (10)	NH	20/C	NH	0,5/C	ano
2	VAN (5)	NH	14/- <sup>1</sup>	NH	≤0,5/C	nelze
19503/C	LNZ (10)	NH	17/ATU	NH	1/C	nelze
3	VAN (5)	NH	14/- <sup>1</sup>	NH	0,5/C	nelze
5337/C	LNZ (10)	NH	20/C	NH	1/C	ano
4	VAN (5)	NH	14-15/- <sup>1</sup>	NH	0,5/C	nelze
4982/A	LNZ (10)	NH	20/C	NH	0,5/C	ano
5	VAN (5)	NH	15/- <sup>1</sup>	NH	≤0,25/C	nelze
4963/A	LNZ (10)	NH	20/C	NH	1,5/C	ano

**RAST** – rychlé stanovení antimikrobní citlivosti; **MIC** – minimální inhibiční koncentrace; **C** - bakteriální kmen je citlivý při standardním dávkování; **-<sup>1</sup>** citlivost/rezistence (C/R) nemůže být v daný čas dle doporučení EUCAST definována; **ATU** - oblast technické nejistoty (nelze s jistotou říct, zda je bakterie na dané antibiotikum citlivá nebo rezistentní); **R** - bakteriální kmen je rezistentní na dané antibiotikum; **NH** – nebylo hodnoceno; **nelze** – pomocí metody RAST nebylo možné u testovaného kmene jednoznačně určit, zda je na dané antibiotikum citlivý, nebo rezistentní, nelze se tudíž vyjádřit, zda se jedná/hejdná o shodu s metodou stanovení MIC; **VAN** – vankomycin; **LNZ** – linezolid.

Lze shrnout, že u gramnegativních bakterií lze s výjimkou *Pseudomonas aeruginosa* odečíst výsledky již po 4 hodinách, u grampozitivních bakterií spíše až po 6 hodinách. S přihlédnutím k hodnotám, které nelze kategorizovat (ATU) je spolehlivější odečet až po 6 hodinách, stejně tak je po 6 hodinách menší výskyt závažných chyb. Dále by se mělo postupovat s opatrností v případě interpretace klindamycinu u *S. aureus* – může se zde vyskytnout velmi závažná chyba z důvodu fenotypově potvrzené inducibilní rezistence na toto antibiotikum. V případě vankomycinu lze spolehlivě kategorizovat pouze rezistenci, ale ne citlivost.

## 6. Diskuze

Infekce krevního řečiště a sepse představují život ohrožující stavy a jedním z klíčových faktorů, který zvyšuje pravděpodobnost přežití pacienta, je rychlá identifikace etiologického agens, určení citlivosti na antibiotika a podání cílené antibiotické terapie. Jako velice slibná metoda rychlého určení mikroorganismů z pozitivních hemokultivačních lahvíček se jeví využití systému MALDI-TOF MS.

Během několika posledních let výrazně vzrostlo využití metody MALDI-TOF MS. Tato metoda umožnila rychlejší identifikaci jak grampozitivních, tak gramnegativních bakterií izolovaných z klinického materiálu na kulturačních médiích a nově i přímo z klinického materiálu, například z moče, nebo právě z pozitivních hemokultur (La Scola et Raoult, 2009; Ferreira et al., 2010; Fothergill et al., 2013). Pokud porovnáme potřebný čas k identifikaci, při klasickém postupu, který zahrnuje kultivaci bakteriálního agens a identifikaci pomocí biochemických metod, dostaneme se do časového horizontu 24 hodin pro rychle rostoucí fakultativně anaerobní bakterie, 48 hodin pro anaerobní bakterie a v případě, že se jedná o pomalu rostoucí, kulturačně náročné bakterie, je čas potřebný k identifikaci mnohem delší. Aplikace izolačních metod a použití MALDI-TOF MS umožní určit bakterii v biologickém materiálu, pokud se připočte čas potřebný ke zpracování vzorku, v řádu desítek minut.

V současné době jsou již k dostání komerční soupravy, které umožní rychlou izolaci a přípravu vzorku z klinického materiálu pro identifikaci pomocí MALDI-TOF MS, např. MALDI-Sepsityper Kit (Bruker Daltonics Bremen, Germany). Použití těchto komerčních kitů bylo popsáno v několika studiích (Kok et al., 2011; Meex et al., 2012; Schieffer et al., 2014), avšak jejich nevýhodou může být vyšší cena.

V rámci této práce bylo s využitím home-made metody provedeno zpracování vzorků ze 169 pozitivních hemokultur a provedena jejich identifikace za pomoci MALDI-TOF MS.

Při vyhodnocení výsledků identifikace bylo dodrženo doporučení výrobce softwaru (MALDI Biotyper). Identifikační skóre  $\geq 2,0$  znamenalo pravděpodobnou identifikaci na úrovni druhu, skóre v rozmezí 1,7 – 1,99 na úrovni rodu, a v případě skóre  $<1,7$  byl výsledek uzavřen jako nespolehlivá identifikace. V některých studiích však při identifikacích z pozitivních hemokultur snížili autoři hodnotu skóre spolehlivé identifikace. Například, pro spolehlivou identifikaci na úrovni druhu byla použita hraniční hodnota identifikačního skóre 1,6 a na úrovni rodu dokonce hodnota 1,4 (Moussaoui et al., 2010; Martiny et al., 2012), výsledkem byl až o 5 % vyšší počet identifikovaných bakterií. Správnost identifikace z hemokultur byla v těchto studiích potvrzena identifikací z bakteriální kultury.

Ze 169 námi analyzovaných hemokultur obsahovalo 98 grampozitivní koky (rody *Staphylococcus*, *Streptococcus* a *Enterococcus*). Z této skupiny se pomocí přímé



identifikace podařilo určit celkem 69,4 %, na úrovni druhu 24,5 % (identifikační skóre  $\geq 2$ ) a na úrovni rodu 44,9 % (identifikační skóre 1,7 – 1,99). Třetinu izolátů se určit nepodařilo (identifikační skóre  $< 1,7$ ). Vyšší úspěch identifikace jsme zaznamenali v případě rodů *Staphylococcus* a *Enterococcus* v porovnání s úspěšností identifikace u rodu *Streptococcus*, kdy se nepodařilo určit více než 56 % kmenů. Podobné výsledky zaznamenaly i jiné práce. V práci od autorů Morgenthaler et Kostrzeva 2015 se poukazuje na problém v identifikaci pomocí MALDI-TOF u viridujících streptokoků – *Streptococcus mitis* byl systémem pokaždé určen jako primárně patogenní *Streptococcus pneumoniae*, který představuje pro pacienta mnohem vyšší riziko.

Problém s menší úspěšností identifikace v případě grampozitivních bakterií není zatím zcela objasněn. Jedním z příčin může být silná buněčná stěna, která snižuje výtěžnost proteinů potřebných pro dobrou identifikaci, nebo pomalejší růst v hemokultuře, kvůli kterému se získá menší množství materiálu pro identifikaci. Dalším problémem může být výskyt pouzdra na povrchu bakterií, jak gramnegativních, tak grampozitivních (Christner, 2010; Saffert et al., 2012; Morgenthaler et Kostrzeva, 2015; Hou et al., 2019).

V případě gramnegativních fermentujících a nefermentujících bakterií byla provedena identifikace ze 71 pozitivních hemokultur. Na úrovni druhu ( $\geq 2,0$ ) bylo správně identifikováno 70,4 %, na úrovni rodu (1,7 – 1,99) bylo správně identifikováno 25,4 %. Celkem se tedy podařilo identifikovat 95,8 % gramnegativních bakterií. Podobné výsledky s úspěšnou identifikací gramnegativních bakterií v porovnání s grampozitivními byly zaznamenány v celé řadě jiných studií (La Scola, 2009; Juiz et al., 2012; Martiny et al., 2013; Morgenthaler et al., 2015).

Vyšší pravděpodobnost v úspěšnosti identifikace je ovlivněna i jinými faktory. Čím vyšší je koncentrace bakterií v hemokultuře, tím lépe jsou vyhodnocena spektra a tím vyšší je identifikační skóre (Christner et al., 2010; Tarabová et Bardoň, 2016). Koncentraci bakterií značně ovlivní doba od positivity, zaznamenaná automatickým kultivačním systémem. Pokud je hemokultura označena za pozitivní a je poté hned zpracována, může obsahovat menší koncentraci bakterií než hemokultura, která byla označena za pozitivní po pracovní době a byla zpracována až po několika hodinách.

Závažné je i zjištění, že ze 169 analytů patřilo 27,8 % do skupiny koaguláza negativních stafylokoků, a z toho většinu (55,3 %) představoval *Staphylococcus epidermidis*. Tyto stafylokoky představují normální součást kožní mikroflóry a nejsou za normálních okolností patogenní pro lidský organismus. Ve většině případů je příčinou izolace koaguláza negativních stafylokoků z hemokultur kontaminace z kůže pacienta, proto je nutné dbát na aseptické podmínky při odběru.

U pacientů v těžké sepsi je důležité co nejvíce zkrátit dobu od nasazení iniciační terapie do aplikace cílené terapie, zejména v současné době, kdy dochází k nárůstu

výskytu patogenů rezistentních na antimikrobní přípravky. Proto je nezbytné v co nejkratším časovém intervalu identifikovat bakterii infikující krevní řečiště a určit její citlivost na antibiotika (Kumar et al., 2006; Hombach et al., 2017).

V průběhu let byla navržena a vyzkoušena celá řada způsobů, jak urychlit stanovení citlivosti na antibiotika, od velmi jednoduchých založených vizuálním hodnocení bakteriálního růstu ve formě zákalu ve zkumavce v přítomnosti antibiotika (Schneerson, 1954), použití krátké inkubace u diskové difúzní metody a hodnocení vytvořených inhibičních zón (Barry et al., 1973), až po velmi moderní metody založených na buněčné analýze, kdy se pomocí digitálního mikroskopu a počítačového softwaru hodnotí odpověď bakterie na přítomnosti antibiotika (Descours et al., 2018).

V současné době existuje jen velmi omezené množství komerčně vyráběných kitů pro rychlé stanovení antimikrobní citlivosti. Většinou vyžadují delší čas provedení, jsou kapacitně omezené a drahé (Idelevich et Becker, 2019; van Belkum et al., 2019; Charnot-Katsikas et al., 2018; Pancholi et al., 2018) a řada společností je v přípravě komerčních kitů pro rychlé stanovení antibiotické citlivosti z pozitivních hemokultur teprve ve fázi vývoje.

Rychlá detekce rezistence může být provedena rovněž pomocí různých genetických metod nebo pomocí testů, které zjišťují přítomnost degradačních produktů konkrétního antibiotika. Detekce produktů degradace může být provedena pomocí MALDI-TOF MS (Burckhardt et Zimmermann, 2011). Všechny výše zmíněné metody mohou být velice rychlé (v rozmezí 15 minut až jedné hodiny), ale v porovnání s fenotypovou metodou stanovení citlivosti na antibiotika/stanovení rezistence na antibiotika, mají závažná omezení. Přítomnost genu rezistence neznamená, že dojde k jeho expresi a naopak, negativní výsledek nemusí znamenat citlivost na testované antibiotikum, protože se mohou uplatňovat jiné mechanismy rezistence. Například rezistence ke karbapenemu nemusí být způsobena aktivací genu pro karbapenemázu – enzymu, který štěpí toto antibiotikum – ale na základě změny propustnosti cytoplazmatické membrány nebo působením efluxních pump (Chalhoub et al., 2016; Culbreath et al., 2015; Idelevich et al., 2016; Dien Bard et Lee, 2018).

Pomocí metody RAST (rychlé stanovení antimikrobní citlivosti) navržené Evropskou komisí pro stanovení antimikrobní citlivosti (EUCAST) je možné stanovit předběžnou citlivost na vybraná antibiotika u skupin bakterií, které jsou nejčastěji zodpovědné za sepsi již za 4, popřípadě 6 hodin od positivity hemokultury. Velkou výhodou této metody je její nenáročnost, protože vyžaduje pouze standardní vybavení mikrobiologické laboratoře: kultivační agar, antibiotické disky pro stanovení citlivosti pomocí difúzní metody a inkubátor (Jonasson et al., 2020).

Cílem práce bylo otestovat metodu RAST podle pracovního postupu EUCAST, ohodnotit její proveditelnost a spolehlivost v porovnání se standardní referenční metodou stanovení citlivosti pomocí dilučních mikrotestů (MIC).

Celkem bylo na 7 bakteriálních kmenech (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*) identifikovaných z pozitivních hemokultivačních lahvíček provedeno 359 diskových difúzních testů stanovení antimikrobní citlivosti. Odečet inhibičních zón v okolí antibiotických disků a kategorizace citlivosti/rezistence/nejistoty probíhal po 4 a 6 hodinách inkubace.

Po 4 hodinách inkubace bylo možno z celkového počtu provedených testů hodnotit a kategorizovat jako citlivý/rezistentní 84,4 %. Po 6 hodinách inkubace se jednalo již o 93,3 % hodnotitelných testů se zařazením výsledků do kategorií citlivý/rezistentní. Výsledky se zhruba shodují s výsledky dosaženými ve studiích prováděných v celkem 55 laboratořích v severní a jižní Evropě (Åkerlund et al., 2020). Celkem bylo ve studii provedeno na 1151 bakteriálních izolátech více než 20 tisíc testů stanovení antimikrobní citlivosti metodou RAST. V časových intervalech 4, 6 a 8 hodin byly laboratoře schopné odečíst a hodnotit 88 %, 96 % a 99 % citlivostí pro jednotlivé intervaly.

Z hlediska výskytu chyb při porovnání výsledků RAST a referenční metody stanovení citlivosti, byla v naší studii zachycena velmi závažná chyba (podle metody RAST byla bakterie definována jako citlivá na dané antibiotikum, ale podle referenční metody byla uzavřena jako rezistentní) v 0,3 % po 4 hodinách inkubace a v 0,6 % po 6 hodinách inkubace. Ve výše zmíněné studii (Åkerlund et al., 2020) se jednalo o 0,2 % a 0,4 % po 4 a 6 hodinách inkubace. Podobný výsledek byl zaznamenán v případě závažné chyby (metoda RAST vyhodnotí bakterii jako rezistentní na antibiotikum a referenční metoda jako citlivou) – 1,1 % po 4 a 0,83 % po 6 hodinách v naší práci, a 2,1 % po 4 a 1,1 % po 6 hodinách ve studii (Åkerlund et al., 2020).

Velmi závažná chyba se vyskytla u dvou kmenů *Staphylococcus aureus* v případě antibiotika klindamycin, které bylo metodou RAST vyhodnoceno jako citlivé a referenční metodou jako rezistentní. V tomto případě se ale jednalo o tzv. indukibilní typ rezistence na antibiotikum. Bakterie je nosičem genu *erm*, který je zodpovědný za rezistenci proti antibiotikům skupiny MLS<sub>B</sub> (makrolidy, linkosamidy, streptograminy skupiny B) a tento gen může být exprimován konstitutivně, nebo jak tomu bylo v případě výše zmíněných dvou kmenů *S. aureus*, se jedná o indukibilní aktivaci genu. Klindamycin je slabý induktor, a naopak erytromycin je silným induktorem. Antibiotické disky s erytromycinem a klindamycinem se položí na naočkovaný kultivační agar vedle sebe a erytromycin indukuje aktivaci genu pro rezistenci, která se projeví deformací inhibiční zóny tvaru D

v okolí klindamycinu (Urbášková et al., 2015). Tento typ rezistence nebylo možné hodnotit po 4 ani po 6 hodinách, proto došlo v tomto případě k výskytu velmi závažné chyby.

Na základě této práce lze hodnotit metodu rychlého stanovení antimikrobní citlivosti navržené společností EUCAST za velice dobře proveditelnou, levnou a spolehlivou. Z klinického hlediska je rychlé určení bakteriálního druhu pomocí MALDI-TOF MS v pozitivní hemokultury a rychlé stanovení antibiotické citlivosti pomocí metody RAST nezpochybnitelným přínosem, které snižuje mortalitu a morbiditu a zvyšuje pravděpodobnost přežití pacienta v septickém stavu.

## 7. Závěr

Teoretická část diplomové práce se zabývala infekcí krevního řečiště a její mikrobiologickou diagnostikou. Byly popsány základní postupy hemokultivace, skládající se z odběru krve, transportu v hemokultivačních lahvičkách a systémů, které jsou pro kultivaci hemokultur používány. Byly popsány standardní postupy diagnostiky a stanovení citlivosti infekčních agens v pozitivních hemokulturách a postupy rychlé diagnostiky a stanovení citlivosti – přímá identifikace pomocí MALDI-TOF MS a metody RAST.

Cílem diplomové práce bylo porovnání přímé identifikace etiologických agens z pozitivních hemokultur a metody rychlého stanovení antimikrobní citlivosti s klasickými metodami, které zahrnovaly izolaci bakteriálního agens kultivací vzorku odebraného z pozitivních hemokultur a stanovení citlivosti izolovaného bakteriálního kmene pomocí diluční mikrometody.

Kombinace metody přímé identifikace z pozitivních hemokultur pomocí MALDI TOF MS s metodou rychlého stanovení citlivosti umožnila v porovnání se standardními metodami výrazně rychlejší získání výsledků, které mají vysoký potenciál využití v cílené antibiotické terapii pacienta s infekcí krevního řečiště. Bylo prokázáno, že tyto rychlé metody jsou materiálově nenáročné, snadno proveditelné, a protože byly v naprosté většině výsledky získané rychlými metodami shodné s výsledky získanými referenčními metodami, lze je označit i za spolehlivé.

## 8. Seznam zkratek

ATB	antibiotikum/antibiotický
ATU	Area of technical uncertainty (oblast technické nejistoty)
CI	chemická ionizace
DHB	2,5-dihydroxybenzoová kyselina
EI	elektronový sprej
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FA	FAN - Fastidious Antimicrobial Neutralization aerobic
FN	FAN - Fastidious Antimicrobial Neutralization anaerobic
HCCA	$\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina
IKR	Infekce krevního řečiště
IE	infekční endokarditida
MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry; hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem
MB	mycobacteria blood
MH	Mueller-Hinton
MH-F	Mueller-Hinton Fastidious (Mueller Hinton s koňskou krví)
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
NVE	native valve endokarditis; endokarditida nativní chlopně
PE	pediatric
PVE	prosthetic valve endokarditis; endokarditida chlopenních náhrad
RAST	rapid antimicrobial susceptibility testing (rychlé testování antimikrobní citlivosti)
SA	3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová kyselina
SA	standard aerobic
SIRS	systemic inflammatory response syndrome; syndrom systémové zánětové odpovědi
SN	standard anaerobic
SOP	standartní operační postup
SPS	polyanetholsulfonát sodný
SW	sowtware

## 9. Použitá literatura

- Afshari A., Schrenzel J., Ieven M., Harbarth S. (2012) Bench-to-bedside review: Rapid molecular diagnostics for bloodstream infection—a new frontier? *Critical Care* **16**(3), 222.
- Åkerlund A., Jonasson E., Matuschek E., Serrander L., Sundqvist M., Kahlmeter G. (2020) The RAST Study Group, EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) in blood cultures: validation in 55 European laboratories, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **75**(11), 3230–3238.
- Barry A. L., Joyce L. J., Adams A. P., Benner E. J. (1973) Rapid determination of antimicrobial susceptibility for urgent clinical situations. *Am J Clin Pathol* **59**, 693-699.
- Beneš J., Bartošová D., Beran J., Černý Z., Dostál V. (2009) *Infekční lékařství*. 1. vyd. Praha: Galén.
- Beneš J. (2018) *Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití*. Praha: Grada.
- Bursová Š., Dušková M., Necidová L., Karpíšková R., Myšková P. (2014) *Mikrobiologické laboratorní metody*. 1. vyd. Brno: Ústav hygieny a technologie mléka. Fakulta veterinární hygieny a ekologie. Veterinární a farmaceutická univerzita.
- Calandra T., Cohen J. (2005) The International Sepsis Forum Consensus Conference on Definitions of Infection in the Intensive Care Unit. *Critical Care Medicine* **33**(7), 1538-1548.
- Carbonnelle E., Mesquita C., Bille E., Day N., Dauphin B., Beretti JL., Ferroni A., Gutmann L., Nassif X. (2011) MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry* **44**(1), 104-109.
- Culbreath K., Petti C. A. (2015) Balancing enthusiasm for innovative technologies with optimizing value: an approach to adopt new laboratory tests for infectious diseases using bloodstream infections as exemplar. *Open Forum Infect Dis* **2**, (75).
- Čermák P., Čermáková Z., Voxová B. (2008) *Mikrobiologická diagnostika infekcí krevního řečiště*. Praha: Maxdorf.
- Descours G., Desmurs L., Hoang T. L. T., Ibranosyan M., Baume M., Ranc A. G., et al. (2018) Evaluation of the Accelerate Pheno™ system for rapid identification and antimicrobial susceptibility testing of Gram-negative bacteria in bloodstream infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **37**, 1573-1583.
- Dien Bard J., Lee F. (2018) Why can't we just use PCR? The role of genotypic versus phenotypic testing for antimicrobial resistance testing. *Clin Microbiol News* **40**, 87-95.
- Edgeworth J. D., Treacher D. F., Eykyn S. J. (1999) A 25-year study of nosocomial bacteremia in an adult intensive care unit. *Crit Care Med* **27**, 1421- 1428.

- Ferreira L., Sánchez-Juanes F., González-Avila M., Cembrero-Fuciños D., Herrero-Hernández A., González-Buitrago JM., Muñoz-Bellido JL. (2010) Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* **48**:2110–2115
- Ferroni A., Suarez S., Beretti JL, Dauphin B., Bille E., Meyer J., Bougnoux M. E., Alanio A., Berche P., Nassif X. (2010) Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* **48**(5), 1542–1548.
- Fothergill A., Kasinathan V., Hyman J., Walsh J., Drake T., Wang Y. F. (2013) 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. *J Clin Microbiol* **51**, 805–809.
- Gates P. (2014) Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI). Dostupné z: <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/theory.html>; Staženo 20.01.2021
- Hansen G. T. (2016) "Laboratory Blood Cultures: Past, Present, and Future". *Clinical Microbiology Newsletter* **38**(15), 119–128.
- Hombach M., Jetter M., Blöchliger N., et al. (2017) Fully automated disc diffusion for rapid antibiotic susceptibility test results: a proof-of-principle study. *J Antimicrob Chemother* **72**, 1659–68.
- Hou TS., Chiang-Ni C., Teng SH. (2019) Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical mikrobiology. *Journal of Food and Drug Analysis* **27**, 404-414.
- Hyánek T., Jindrák V., Kavka B., Vaniš V. (2000) První zkušenosti s monitorováním katérových infekcí na ARO Nemocnice Na Homolce: *Klin Mikrobiol Inf Lék* **6**, 189-92.
- Christner M., Rohde H., Wolters M., Sobottka I., Wegscheider K., Aepfelbacher M. (2010) Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by use of matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry fingerprinting. *J Clin Microbiol* **48**(5), 1584–1591.
- Chalhoub H., Saenz Y., Rodriguez-Villalobos H., Denis O., Kahl B. C., Tulkens P. M., et al. (2016) High-level resistance to meropenem in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the absence of carbapenemases: role of active efflux and porin alterations. *Int J Antimicrob Agents* **48**, 740-743.
- Chamberland R. R. (2018) Chapter 4 in Dunne, WM & Burnham, CAD eds. sec. "History"; "Bactec 9000 Series Studies".
- Charnot-Katsikas A., Tesic V., Love N., et al. (2018) Use of the Accelerate Pheno System for identification and antimicrobial susceptibility testing of pathogens in positive blood cultures and impact on time to results and workflow. *J Clin Microbiol* **56**, 1166–17.



- Idelevich E. A., Becker K. (2019) How to accelerate antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect* **25**, 1347–55.
- Idelevich E. A., Becker K. (2016) Identification and susceptibility testing from shortly incubated cultures accelerate blood culture diagnostics at no cost. *Clin Infect Dis* **62**, 268-269.
- Jindrák V. (2000) Nozokomiální infekce a současná medicína. *Klin Mikrobiol Inf Lék* **6**, 166-71.
- Jonasson E., Matuschek E., Kahlmeter G. (2020) The EUCAST rapid diffusion method for antimicrobial susceptibility testing directly from positive blood culture bottles. *J Antimicrob Chemother* **75**, 968-978.
- Jones R. N., Low D. E., Pfaller M. A. (1999) Epidemiologic trends in nosocomial and community-acquired infections due to antibiotic-resistant gram-positive bacteria: the role of streptogramins and other newer compounds. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **33**(2), 101-112.
- Juiz P. M., Almela M., Melcion C., Campo I., Esteban C., Pitart C., Marco F., Vila J. (2012) A comparative study of two different methods of sample preparation for positive blood cultures for the rapid identification of bacteria using MALDI-TOF MS. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **31**(7), 1353-1358.
- Juránková J. (2011) Klinická mikrobiologie v laboratorní praxi: bakalářský obor Zdravotní laborant. Brno: Masarykova univerzita.
- Kok J., Thomas L. C., Olma T., Chen S. C., Iredell J. R. (2011) Identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption/ionization Sepsityper™ and time of flight mass spectrometry. *PLoS One* **6**(8), 23285.
- Kolář M., Látal T., Čermák P. (2002) Frekvence gramnegativních patogenů u infekcí krevního řečiště a jejich rezistence k antibiotikům v České republice. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství* **8**(2), 61-67.
- Koukalová D. (2013) Praktická cvičení z lékařské mikrobiologie II. 3. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci.
- Kumar A., Roberts D., Wood K. E., Light B., Parrillo J. E., Sharma S., Suppes R., Feinstein D., Zanotti S., Taiberg L., Gurka D., Kumar A., Cheang M. (2006) Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Critical Care Medicine* **34**(6), 1589–1596.
- La Scola B., Raoult D. (2009) Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One* **4**(11), 8041.

- Lamy B., Dargère S., Arendrup M. C., Parienti J. J., Tattevin P. (2016) How to Optimize the Use of Blood Cultures for the Diagnosis of Bloodstream Infections? A State-of-the Art. *Frontiers in Microbiology* **12**(7), 697
- Lay J. O., Dare D., Pasch H. (2000) MALDI-TOF mass spectrometry and bacterial taxonomy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **19**(8), 81-95.
- Lobovská A. (2001) Infekční nemoci. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. Praha: Karolinum.
- Martiny D., Dediste A., Vandenberg O. (2012) Comparison of an in-house method and the commercial Sepsityper™ kit for bacterial identification directly from positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption-ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **31**(9), 2269–2281.
- Meex C., Neuville F., Descy J., Huynen P., Hayette MP., De Mol P., Melin P. (2012) Direct identification of bacteria from BacT/ALERT anaerobic positive blood cultures by MALDI-TOF MS: MALDI Sepsityper kit versus an in-house saponin method for bacterial extraction. *J Med Microbiol* **61**(11), 1511–1516.
- Morgenthaler N. G., Kostrzewa M. (2015) Rapid Identification of Pathogens in Positive Blood Culture of Patients with Sepsis: Review and Meta-Analysis of the Performance of the Sepsityper Kit. *International Journal of Microbiol* 1–10.
- Moussaoui W., Jaulhac B., Hoffmann A. M., Ludes B., Kostrzewa M., Riegel P., Prévost G. (2010) Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. *Clinical Microbiology and Infect* **16**(11), 1631–1638.
- Nyč O., Bubeníček K. (2015) MALDI TOF – Špičková technologie pro mikrobiologii 21. století *Královéhradecký laboratorní Bulletin* **3**, 1-2.
- Pancholi P., Carroll K. C., Buchan B., et al. (2018) Multicenter evaluation of the Accelerate PhenoTest BC Kit for rapid identification and phenotypic antimicrobial susceptibility testing using morphokinetic cellular analysis. *J Clin Microbiol* **56**, 1329–17.
- Peralta G., Rodríguez-Lera M. J., Garrido J. C., Ansorena L., Roiz M. P. (2006) Time to positivity in blood cultures of adults with *Streptococcus pneumoniae* bacteremia. *BMC Infect Dis* **6**(79).
- Petersson A. (2011) MALDI-TOF as a Tool for Rapid Species Identification from Blood Culture Vials. PhD Thesis. Linnæus University. Dept. of Clinical Microbiology. Supervisor Sunqvist M.
- Prod'hom G., Bizzini A., Durussel C., Bille J., Greub G. (2010) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. *J Clin Microbiol* **48**(4), 1481–1483.

- Raad I., Hanna H. (2002) Intravascular catheter-related infections: new horizons and recent advances. *Archives of Internal Medicine* **162**(8), 871-878.
- Ryan M. R., Murray P. R. (1993) "Historical evolution of automated blood culture systems". *Clinical Microbiology Newsletter* **15**(14), 105–108.
- Rokyta R. (2015) Fyziologie a patologická fyziologie: pro klinickou praxi. Praha: Grada Publishing.
- Saffert R. T., Cunningham S. A., Mandrekar J., Patel R. (2012) Comparison of three preparatory methods for detection of bacteremia by MALDI-TOF mass spektrometry. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **73**, 21-26.
- Seng P., Drancourt M., Gourié F., La Scola B., Fournier P. E., Rolain J. M., Raoult D. (2009) Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Infectious Diseases* **49**(4), 543–551.
- Schieffer K. M., Tan K. E., Stamper P. D., Somogyi A., Andrea S. B., Wakefield T., Romagnoli M., Chapin K. C., Wokl D. M., Carroll K. C. (2014) Multicenter evaluation of the Sepsityper™ extraction kit and MALDI-TOF MS for direct identification of positive blood culture isolates using the BD BACTECTM FX and VersaTREK(®) diagnostic blood culture systems. *J Appl Microbiol* **116**(4), 934–941.
- Schneerson S. S. (1954) A simple rapid disk-tube method for determination of bacterial sensitivity to antibiotics. *Antibiot Chemother (Northfield)* **4**, 125-132.
- Sogawa K., Watanabe M., Sato K., Segawa S., Ishii C., Miyabe A., Murata S., Saito T., Nomura F. (2011) Use of the MALDI BioTyper system with MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of microorganisms. *Anal Bioanal Chem* **400**(7), 1905–1911.
- Tarabová R., Bardoň J. (2016) Využití metody MALDI-TOF MS k přímé identifikaci bakterií z klinického materiálu. *Klin Mikrobiol Infekč Lék* **22**(4):161–165.
- Urbášková P., Jakubů V., Melter O. (2015) Streptokoky – průkaz fenotypu rezistence k antibiotikům ze skupiny makrolidů, linkosamindu a streptograminuB. SZÚ. Dostupné z: <http://www.szu.cz/streptokoky-prukaz-fenotypu-rezistence-k-antibiotikum-ze>; Staženo 7. 5. 2021.
- van Belkum A., Bachmann T., Lüdke G., et al. (2019) Developmental roadmap for antimicrobial susceptibility testing systems. *Nat Rev Microbiol* **17**, 51–62.
- Vlek A., Bonten M., Boel C. (2012) Direct matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry improves appropriateness of antibiotic treatment of bacteremia. *PLoS One* **7**(3), 32589.