

# Módszertani ajánlás

## A véráram infekciók mikrobiológiai diagnosztikájára

### 1. Bevezetés

A véráram normálisan nem tartalmaz élő baktériumokat/gombákat viszont tartalmaz számos antimikrobás hatású komponenst. A mikrobák extravasculáris (valamely fertőződött testtáj, a kolonizált bőr és nyálkahártyák sérülése), vagy intravasculáris (natív vagy műbillentyű, kanül) forrásból kerülnek a vérbe. A bakteriémia, ill. a fungémia fogalma baktériumok, ill. gombák jelenlétét jelenti a vérben, etiológiai szerepük megítélése a klinikus feladata. A bakteriémia, ill. fungémia lehet **átmeneti**, rövid ideig tartó, pl. kisebb sebészi beavatkozásokat, húgyúti katéterezést, vagy foghúzást, fogmosást követően jöhet létre. Extravasculáris infekciók esetében a bakteriémia, ill. fungémia **szakaszos**: a mikroorganizmusok időnként megjelennek a vérben, majd eltűnnek. Intravasculáris fertőző forrás esetén a mikroorganizmusok **folyamatosan** jelen vannak a vérpályában.

A vér tenyésztése a klinikai mikrobiológiai laboratórium egyik legfontosabb feladata. A bakteriémia, ill. fungémia kimutatásának igen nagy a klinikai jelentősége különösen egyes magas kockázatot jelentő fertőző megbetegedések diagnosztikájában. Számos esetben a pozitív eredmény közvetlenül a diagnózishoz vezet (pl. infektív endocarditis), míg más klinikai szituációban – amikor a kórokozó nehezen mutatható ki a fertőzés helyéről – a hemokultura (HK) pozitivitása közvetett módon bizonyítja bakteriális vagy gomba infekciót (pl. osteomyelitis).

Vérvétel HK vizsgálat céljára indokolt minden olyan esetben, amikor bakteriémiát, ill. fungémiát feltételezünk, vagy megkísérlünk kizárni:

- Lázás állapotban
  - Ismeretlen eredetű láz
  - Bakteriémia/fungémia gyanúja valamely kifejezett klinikai tünet alapján, ismert vagy feltételezett góccal kapcsolatosan (mint pl. meningitis, endocarditis, peritonitis, urosepsis, pneumónia, sebfertőzés, posztoperatív fertőzés, gyermekágyi láz, abscessus szisztémás infekcióra utaló tünetekkel, neutropeniás láz, intravasculáris és protetikusan eszközökkel kapcsolatos infekciók)
- Láz hiányában

- Minden olyan esetben, ha a beteg állapota instabil, és a háttérben infekció feltételezhető
- Idős betegek váratlan állapotromlása, tudatzavara
- Indokolatlan vérnyomásesés és/vagy tachypnoe
- Speciális betegcsoportok pl. immunszupprimált betegek, csecsemők hirtelen állapotromlása.

## **2. A vérminta vétele tenyésztésre**

### *A vérminta vételének időzítése (1-3)*

A vérminták vételére az antimikrobás kezelés megkezdése előtt kerüljön sor. Ha a beteg antimikrobás kezelésben részesül, a következő dózis beadása előtt kell vért venni, de ha a beteg állapota megengedi, ajánlott az antibiotikum terápia 1-2 napos felfüggesztése is. Ha ez nem lehetséges antibiotikum kötő gyantát tartalmazó palackot kell használni (lásd később). A vérminta vételére az az időpont a legalkalmasabb, amikor a mikroorganizmusok a legnagyobb valószínűséggel jelen vannak a vérben. Folyamatos bakteriémia, ill. fungémia esetén a mintavétel időpontja nem kritikus, a kórokozó kitenyésztésének jók az esélyei, bármikor vesszük a vért. Szakaszos bakteriémia, ill. fungémia esetén a mintavétel időpontját körültekintően kell megválasztani. Bizonyított, hogy a mikroorganizmusok a hidegrázás és a láz fellépése előtt körülbelül 30-90 perccel árasztják el a vérpályát (1). Következésképpen a HK-t a lázas epizód legkorábbi szakaszában kell venni, azaz a hidegrázás alatt, vagy a lázmenet kezdetén. A kórokozó kitenyésztésének esélye a láz csúcsának idején vett mintából a legkisebb (2, 3).

### *A vérminta vételének módja és helye (2, 3)*

- A tenyésztésre szánt vért az aseptikus technika és az eredményesség jelentősége miatt erre a feladatra kiképzett orvos vagy nővér vegye.
- A megfelelő kéz higiéné elvégzése után steril kesztyű használata kötelező a HK vételéhez.
- A HK palack védőkupakjának eltávolítása után a gumidugót 70%-os alkohollal, vagy más, alkalmas fertőtlenítő szerrel kell dezinficiálni a javasolt hatásidő szigorú betartásával!!
- A vérvétel helyének fertőtlenítésére elsősorban povidon iodin (Betadin) oldat ajánlott a kiválasztott hely jobb láthatósága érdekében. A povidon iodin-os fertőtlenítés után 70%-os

alkoholos lemosás alkalmazható. A bőrfelszín száradását követően végezhető el a vérvétel.

- A vérvétel helyét a fertőtlenítés után nem szabad kézzel érinteni.
- A kontamináció csökkentése érdekében törekedni kell a vakuténeres mintavételre (szárnyas tű, steril harang alkalmazásával közvetlenül a HK palackba történő mintavétel). Először az anaerob palackba történjen mintavétel!
- Vérvétel céljára az ép, perifériás vénák a legalkalmasabbak. Az intravasculáris kanülön átvett vér gyakran kontaminálódik a kanült kolonizáló baktériumokkal, ezért a kanülön keresztüli vérvétel nem ajánlott, mert a tenyésztés eredménye félrevezető lehet.
- Kanülinfekció gyanúja esetén viszont fontos, hogy a kanülön át (első két HK palack) és egy perifériás vénából is történjen vérvétel (második két palack) azonos időben azonos vérmennyiséggel. Kanülinfekciót igazol, ha a kanülön keresztül vett vérmintából ugyanazon mikroorganizmus nagyobb számban ( $\geq 5:1$  CFU) és/vagy  $\geq 2$  órával előbb tenyészik ki, mint a perifériás vénából vett HK-ból. Ha csak a kanülön keresztül vett HK pozitív, ez inkább a kanül kolonizációjára, vagy kontaminációra utal. Ha a kanülinfekció gyanúja miatt a kanül eltávolításra kerül, a kanül véget is ajánlott steril körülmények között tenyésztésre küldeni.

#### *A vérminta mennyiség (3, 4)*

Klinikailag szignifikáns bakteriémia esetén a felnőttek vérében keringő baktériumok száma többnyire csekély,  $<10$  telepképző egység/ml, míg gyermekeknél ennél több:  $>10$  telepképző egység/ml (4, 5). Ezért a kórokozó kitenyésztésének eredményessége nagymértékben függ a vérminta mennyiségétől. A beteg testsúlyától függően felnőtteknél a lázas epizódoként 2-3 vénapunkció során vett, alkalmanként 20-30 ml vér vétele javasolt. Újszülött, csecsemő és gyermekkorban a levett vér mennyisége függ a testtömegetől, életkortól. A levett vér mennyisége ne haladja meg a keringő vér 1%-át, újszülötteknél 0,5-2 ml, csecsemőknél 2-3 ml, kisgyermekeknél 3-5 ml, serdülőknél 10-20 ml vérminta vétele ajánlott (5).

#### *A mintavétel gyakorisága (1, 3, 5)*

Lokális infekció ismerete vagy gyanúja, ismeretlen eredetű láz esetén elegendő 2 vénapunkció alkalmával vett vér tenyésztése. Endocarditis gyanúja esetén az alacsony baktériumszám miatt legalább 3 mintavétel szükséges. Ugyancsak ajánlatos 3 alkalommal vért

venni antibiotikum kötő anyagot tartalmazó HK palackba, ha antibiotikum kezelésben részesül a beteg. Folyamatos láz esetén a 2-3 vérvétel 24 órán belül történjék, akár random módon. Ha az antibiotikum terápia megkezdése halaszthatatlan, a 2-3 mintavételre 20-30 perces időközönként kerüljön sor a terápia alkalmazása előtt különböző perifériás erek punkciójával. Ha az első napon vett HK-k negatívak, klinikai gyanú esetén a mintavétel megismétlése ajánlott a következő napon. Ha határozott klinikai gyanú és megfelelően vett HK-k 2 napon belül nem lesznek pozitívak, illetve különleges tenyésztési körülményeket igénylő mikroorganizmus által okozott infekció gyanúja áll fenn, az újabb mintavételt illetően konzultálni kell a mikrobiológussal. HK vizsgálattal igazolt *S. aureus* okozta endocarditis vagy fungémia esetén indokolt a terápia hatékonyságának követése újabb HK-k vételével, más esetekben, hacsak a beteg állapotának romlása nem követeli, nem szükséges az ún. „nyomonkövetés” mintavétel (5, 6).

#### *A HK palackok megválasztása (1, 3, 5)*

A tenyésztésre szánt vérmintát speciális, rendszerint kereskedelmi forgalomban kapható HK palackba kell venni. A laboratórium feladata, hogy az általa használt HK rendszerben használt palackokról és a szükséges vér mennyiségről tájékoztassa a klinikusokat. Az automata rendszereknél a palack túltöltése hamis pozitív eredményhez vezethet. Az egy vénapunkció során levett vérmennyiséget nem lehet egyetlen HK palackba juttatni. A vérminta táptalajban való hígulása biztosítja, hogy a vér saját antimikrobás anyagai és az esetlegesen alkalmazott antibiotikumok növekedést gátló hatása kiküszöbölhető legyen. Az optimális vér : táptalaj arány 1:5 és 1:10 között változik. Kereskedelmi forgalomban kapható palackok használatakor a gyártó által előírt vérmennyiséget kell a palackba engedni. A vér túlzott kihígulása sem előnyös, ezért a gyermekektől vett kis mennyiségű vért kevesebb táptalajt tartalmazó ”gyermekpalackba” kell venni. A palackok túltöltése a CO<sub>2</sub> termelés detektálásán alapuló rendszerekben álpozitív jelzéshez vezethet, amit a túl sok vérrel bevitt vörösvértestek által szállított CO<sub>2</sub> okoz.

Az egy mintának számító, egy vénapunkció során nyert vért a mennyiségtől függően tehát több palackba kell levenni (elosztani). Mivel olyan táptalaj nincs, amely valamennyi szoba jövő baktérium növekedési igényét kielégítené, célszerű a vért egy aerob és egy anaerob baktériumok tenyésztésére szolgáló palackba elosztani, annak ellenére, hogy anaerob bakterémiával csak ritkán kell számolni. Az anaerob palackok tápanyagokban gazdag táptalajában számos fakultatív anaerob baktérium is jobban növekszik (pl. streptococcusok). A gombák általában jól növekednek a baktériumok tenyésztésére szolgáló aerob HK

táptalajokban, de egyes esetekben szükség lehet speciális gombatáptalajt tartalmazó palackok használatára is. A mycobacteriumok tenyésztésére szintén speciális táptalajt tartalmazó palackok vannak forgalomban. Antibiotikum terápiában részesülő betegeknél célszerű az antibiotikum inaktiváló anyagokat (aktív szén, gyanta) tartalmazó palackok használata. Speciális „lízis” palackokat érdemes használni intracelluláris kórokozók okozta szepszis gyanúja esetén (pl. *Brucella* spp). Egyes hemokultúra rendszerekben az aerob palackokat egy erre a célra szolgáló tüvel beoltás előtt levegőztetni kell (2, 3, 6).

#### *A beoltott HK palackok tárolása, szállítása (2, 5)*

A HK palackokat – amennyiben mód van rá – azonnal küldjük a mikrobiológiai laboratóriumba, vagy a hagyományos palackokat transzportálásig helyezzük 37 °C-os termosztátba, ha van rá lehetőség. Ha a laboratórium HK automatát használ ajánlott a palackokat szobahőn tárolni beküldésig. A beoltott HK palackokat nem szabad hűtve tárolni !! Automata hemokultúra rendszerek használata esetén különösen fontos, hogy a palackok még a baktériumok / gombák növekedésének megindulása előtt az automatába kerüljenek, mivel egyes automaták (pl. BACTEC, Becton-Dickinson, Cockeysville, USA) csak a növekedés során keletkezett CO<sub>2</sub> koncentrációjának változását képesek detektálni, nem jelzik a palack pozitivitását, ha abban már az automatán kívül elszaporodtak a mikroorganizmusok. Fontos, hogy a beérkező HK palackokat a mikrobiológiai laboratóriumban gondosan megvizsgálják és a növekedés látható jele, a táptalaj zavarosodása esetén a palackokat már ne tegyék az automatába, hanem mint pozitív jelzést adó palackot azonnal fel kell dolgozni a laboratóriumban használt módszereket alkalmazva. Fontos továbbá, hogy a mintavevő jelezze a vizsgálati kérőlapon a mintavétel pontos idejét amiből következtethetünk hogy mennyi időt volt a palack úton !!!

### **3. A vérminták tenyésztése**

#### *A HK palackok inkubálása (3, 6)*

Legtöbb esetben a HK palackokat 5-7 napig inkubáljuk 35-37°C-on. A több napos inkubációs időre csak a pozitív HK-k mintegy 10-20%-a miatt van szükség, mivel a pozitív palackok rendszerint már a tenyésztés első 24-48 órájában pozitívnak bizonyulnak, még a hagyományos detektálási módszerekkel is. Ennél hosszabb inkubációs időre, a HACEK csoport baktériumai (*Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, *Kingella*) és a fonalas gombák gyanúja esetén lehet szükség. Ismeretlen eredetű láz esetén is ajánlott a meghosszabbított inkubációs idő. Immunszupprimált betegeknél megfontolandó a

rutinszerűen alkalmazott 2 hetes inkubációs idő, gomba infekció gyanúja esetén esetleg ennél hosszabb időre is szükség lehet. A mycobacteriumok kitenyészéséhez még hosszabb inkubációs időre, 8 hétre van szükség, de a *M. xenopi* gyanú esetén 10 hétig ajánlott inkubálni a speciális mycobacterium palackokat.

Számos HK rendszerben a palackok rázatása az inkubálás alatt elősegíti az aerob baktériumok és a gombák szaporodását, ugyanakkor nem befolyásolja az anaerob baktériumok szaporodását.

#### *A növekedés detektálása (1, 3, 7)*

A növekedés detektálásának módszere attól függ, hogy a laboratórium milyen hemokultúra rendszert alkalmaz.

- Hagyományos, folyékony táptalajt tartalmazó palackokból meghatározott időközönként (az 1., 3. és az utolsó napon) ún. „vak” kioltásokat kell végezni, függetlenül attól, hogy a folyékony táptalajban mutatkoznak-e a szaporodás jelei. A hagyományos aerob palackoknál a meghatározott időközönkénti kioltás véres (V) és csokoládé (CS) agarra történik, gombainfekció gyanúja esetén szilárd Sabouraud (SAB) táptalajra is. Az anaerob palackokból aerob módon inkubált V, Cs és az anaerob baktériumok növekedési igényeinek megfelelő, anaerob módon inkubált, anaerob V táptalajra kell oltani.
- A folyékony és szilárd táptalajt is tartalmazó, ún. bifázisos palackoknál, valamint a szilárd táptalajlemezeket feltétként tartalmazó palackoknál a folyékony fázissal naponta be kell „oltani” a szilárd fázist. A folyékony táptalaj zavarosodása mellett a szilárd táptalajon megjelenő telepek jelzik a növekedést.
- Az automata hemokultúra rendszerek (BACTEC, Becton Dickinson, Cockeysville, USA; BacT/Alert, bioMérieux, Franciaország) a baktériumok szaporodásakor keletkező CO<sub>2</sub> mennyiségének folyamatos monitorozásán alapulnak. Ha a CO<sub>2</sub> koncentráció elér egy bizonyos értéket, az automata hang- és fényjelzést ad. A CO<sub>2</sub> detektálásának előnye, hogy a szaporodás jóval előbb (esetenként néhány órán belül) észlelhető, mint a hagyományos módszereknél, ugyanakkor a palackok munka- és anyagigényes, a kontamináció veszélyével járó „vak” kioltását feleslegessé teszi. A CO<sub>2</sub> detektálásán alapuló rendszereknél csak a pozitív jelzést adó palackokból kell az előbbieket szerint kioltani. Az inkubációs idő lejártakor nem kell ún. „terminális” kioltást végezni. A pozitív palackból végzett Gram-festés eredménye segítheti a szubkultúra készítésére használt táptalajok megválasztását, pl. Gram-negatív baktérium esetén eozin-metilénkék (EM), sarjadzó gomba esetén kromogén szubsztrátot tartalmazó gomba táptalaj (Chromagar), vegyes

baktérium és gomba tenyészet esetén szelektív SAB táptalajra is érdemes kioltani a HK-t a mielőbbi előzetes diagnózis érdekében. Mycobacteriumok esetében speciális mycobacterium táptalajra kell kioltást végezni a speciális HK palackból.

- Előfordulhat, hogy a vérben lévő baktérium szaporodásnak indul, a pozitív jelzést adó HK-ból készült kenetben látható is, de mégsem tenyészik ki a szubkultúrában. A *Streptococcus pneumoniae* pl. a tápanyagokban gazdag HK táptalajokban igen jól szaporodik, de ugyanakkor autolizáló enzimjeit is nagyobb mennyiségben termeli, aminek következtében el is pusztul. A baktérium antigénjei azonban az antigéndetektáló tesztek valamelyikével kimutathatóak. Gondolni kell arra is, hogy a B<sub>6</sub> dependens streptococcusok szaporodnak a pyridoxalt is tartalmazó HK táptalajokban, de nem nőnek a streptococcusok tenyésztésére alkalmas szokásos táptalajokon. A szubkultúra nyeréséhez ilyenkor pyridoxallal kiegészített táptalajt, vagy olyan V lemezt kell használni, amelyre kioltás után *Staphylococcus* tenyészetet szélesztünk, amely biztosítja a szükséges pyridoxalt.
- Ha a CO<sub>2</sub> detektáláson alapuló rendszereknél pozitív jelzést adó HK-ból készített kenetben baktérium nem látható, végezzük el a szokásos kioltást és helyezük vissza a palackot az automata inkubátorába. Ellenőrizzük a szaporodási görbét, ha pozitívnak tűnik, ismételjük meg a mikroszkópos vizsgálatot.
- Szintén a baktériumok szaporodásakor keletkező CO<sub>2</sub> jelzi a növekedést egy olyan rendszerben (Signal, Oxoid, Basingstoke, UK), amelyben a termelődött CO<sub>2</sub> a palackban túlnyomást előidézve egy, a táptalajba vezetett tűn keresztül a palackhoz csatlakoztatott detektáló feltétbe nyomja a vér-táptalaj elegyet. A folyadék megjelenése a feltétben szabad szemmel is könnyen észlelhető. Ennek a rendszernek hátránya a hamis pozitív jelzések nagy aránya és az *Acinetobacter* spp., a *Pseudomonas* spp., a gombák, a *Haemophilus influenzae* és a *Neisseria meningitidis* gyenge detektálása (8).

#### **4. A pozitív jelzést adó HK palackból történő további vizsgálatok lehetősége**

*Közvetlenül a pozitív jelzést adó HK palackból végezhető hagyományos vizsgálatok (3, 6, 9, 10)*

- A közvetlen vizsgálatokkal kapott részeredményeket, amennyiben informatívak, mielőbb közölni kell a klinikussal. Az értesítés módját, időpontját, az értesített személy nevét dokumentálni kell.

- A hagyományos HK palackokból "vakon" végzett mikroszkópos vizsgálatnak nincs értelme, azonban a szaporodásra utaló jelek esetén haladéktalanul mikroszkópos vizsgálatokat kell végezni. A CO<sub>2</sub> detektáláson alapuló automata rendszereknél a pozitív jelzést adó palackokból natív fáziskontraszt, metilénkék, vagy acridin orange festett kenetet, illetve Gram-festett kenetet kell mikroszkóposon vizsgálni. *Mycobacterium* gyanúja esetén a speciális mycobacteriumok tenyésztésére szolgáló palackból saválló festést kell végezni. A különböző festési eljárások segíthetik a mikroorganizmus detektálását, morfológiájuk jobb megítélését a pozitív HK-ban, de csak kiegészíthetik és nem helyettesíthetik a Gram-festést.
- A HK palackban tenyésző baktériumok közvetlen identifikálása néhány kórokozó (pl. *Streptococcus pneumoniae* vagy *Staphylococcus aureus*) gyanúja esetében megkísérelhető a kereskedelemben kapható direkt antigén kimutató módszerekkel (9).
- Pozitív jelzést adó HK palackból nyert centrifugált baktérium szuszpenzióból megkísérelhető a kórokozó azonosítása automata identifikáló kitékkel (pl. VITEK, Phoenix), amennyiben a mikroszkópos kép monobakteriális infekcióra utal.
- Gyári kittel (Sepsityper Brucker Daltonik Németország) vagy "in-house" szeparálási módszerrel a vérszövetek oldását követően, a baktérium sejtek centrifugálásával és mosásával olyan tiszta baktérium üledék érhető el, mely alkalmas a matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) identifikáló módszer alkalmazására közvetlenül a pozitív HK-ból. (9-12). A módszerrel egy órán belül az esetek jelentős részében species diagnózis adható. Polimikróbás infekció esetén az alkalmazott rendszertől függően a domináló kórokozó vagy akár a párhuzamosan jelenlévő baktériumok species szintű diagnózisa is megtörténhet (9).

#### *A pozitív HK palackból izolált baktériumok és gombák identifikálása (3,6)*

A szubkultúrákból mielőbb (kellő növekedés esetén a reggel kioltott lemezekről esetleg aznap délután) el kell kezdeni a kitenyészett baktériumok, sarjadzó gombák identifikálását a hagyományos módszerekkel. Ha egyazon sorozat palackjaiból morfológiailag azonos baktérium vagy gomba tenyészik, elegendő az egyik tenyészet további vizsgálata. A klinikailag szignifikáns izolátumokat a lehető legpontosabban kell meghatározni, a törzseket fenn kell tartani és meg kell őrizni (a tároló kapacitástól függően fél-egy évig). Az identifikálás előzetes-, rész- és végleges eredményéről a beküldőt szóban vagy írásban mielőbb tájékoztatni kell. A szóbeli közlést a munkalapon dokumentálni kell.



A MALDI-TOF MS módszer elterjedése forradalmasította és jelentősen meggyorsította a szepszis kórokozójának azonosítását is, hiszen a szokványos szepszis kórokozók mellett a rendszerek (Biotyper, Bruker Daltonic és a VITEK MS, bioMérieux), adatbázisuktól függően, a baktériumok és sarjadzógombák igen széles körének azonosítását képesek elvégezni. Szemben a hagyományos és miniatürizált, automatizált biokémiai rendszerekkel, az MS alapú species azonosítás igen kis biomassza esetén is sikeresen elvégezhető. Így a pozitív HK kioltások 18-24 óráig inkubált lemezeiről, vagy a mindössze néhány óráig inkubált lemezekről (2-6 óra) az azonosítás elvégezhető (9, 13).

Egyes, a fenti módszerekkel nem azonosítható, de klinikailag releváns izolátumok 16S rRNS gén szekvencia analízissel, vagy teljes genom szekvenálással történő azonosítása ritka vagy új kórokozók szepszisben játszott szerepét igazolhatja (10).

#### *A HK-ból izolált baktériumok és gombák antibiotikum érzékenységének vizsgálata (3, 6)*

A klinikailag releváns izolátumok antibiotikum érzékenységét az EUCAST érvényben lévő ajánlása alapján kell meghatározni. Tekintettel a véráram fertőzések súlyosságára, törekedni kell a minél gyorsabb és pontosabb érzékenység/rezisztencia meghatározásra. A korongdiffúziós érzékenységi vizsgálat elvégezhető közvetlenül a pozitív jelzést adó HK-palackból is, az eredmény azonban csak tájékoztató jellegű: a vizsgálatot a kitenyészett izolátummal meg kell ismételni. Bizonyos esetekben a minimális gátló koncentráció (MIC) érték meghatározás segíti a súlyos állapotban lévő beteg helyes antibiotikum terápiáját (pl. streptococcusok okozta endocarditis).

### **5. Molekuláris mikrobiológiai módszerek a véráramfertőzések diagnosztikájában**

A kiterjedt módszerfejlesztések ellenére még nem sikerült megfogalmazni általános alapelveket arról, hogy a molekuláris (DNS alapú, és egyéb) mikrobiológiai módszerek beillesztése a véráramfertőzések mikrobiológiai diagnosztikájába milyen módon javíthatja az antimikrobás kezelés hatékonyságát, szélesebb értelemben milyen módon támogatja a beteggel kapcsolatos döntéseket. Azonban szűk, speciális esetkörben egy-egy molekuláris mikrobiológiai módszernek lehet valós döntéstámogató indikációja, amennyiben helyi alkalmazási protokoll kitér legalább az esetdefinícióra, a vizsgálat időzítésére, az eredményközléshez szükséges időigényre, az adott módszer által lefedett mikrobiológiai spektrumra, a diagnosztikus érzékenységre és fajlagosságra, valamint tipikus eredmények interpretálási lehetőségeire a beteggel kapcsolatos döntéshozatalban. (A mikrobiológus és a

klinikus együttműködésével valósulhat meg ilyen protokoll). A jelen módszertani ajánlás nem nevesít kereskedelmi forgalomban kapható molekuláris mikrobiológiai tesztek, azok megtalálhatók a szakirodalomban (7, 8, 10).

A molekuláris mikrobiológiai vizsgálatok közismert előnyeinek megfogalmazásakor figyelembe kell venni az alábbi általános érvényű korlátokat is:

- Szepszis gyanúja esetén az empirikus antimikrobás kezelést haladéktalanul el kell indítani. A molekuláris vizsgálatok indikációjának felállításához elsősorban azt kell figyelembe venni, hogy nyújt-e lényeges információt a beteg további kezeléséhez és időben ad-e releváns információt. Az antimikrobás terápia klinikai sikeressége/sikertelensége általában az indítástól számított ~48 óra eltelte után ítéltető meg, így fontos hogy a molekuláris mikrobiológiai eredményközlés ezelőtt történjen meg (*akkor is, ha ügyeleti időszakban indították a terápiát*) !
- A molekuláris vizsgálatok többsége a mikrobiális DNS azonosításán alapul. Mivel elpusztult mikrobákból keringésbe jutó genomiális DNS hosszan perzisztálhat, a mikrobiális DNS kimutatása ("DNAemia") csak valószínűsíti, de nem igazolja élő szaporodó mikroba jelenlétét a szervezetben és a mikroba anatómiai forrása, lokalizációja sem állapítható meg teljes bizonyossággal.
- Terápia követésére, sikerességének megítélésére nem használhatók a molekuláris mikrobiológiai módszerek.
- Az antibiotikum érzékenység/rezisztencia vizsgálata csak egyes rezisztencia gének kimutatására korlátozódik.
- Néhány teszt olyan mikrobiális antigéneket mutat ki a keringésben, amelyek viszonylag jól követik egyes szisztémás, ill. invazív, extravasculáris fertőzések megjelenését és lezajlását. A mikrobiális targetek korlátozott száma miatt ezek a vizsgálatok szűkített indikációs körrel, célzottan alkalmazhatók.

*A vérmintából történő közvetlen mikroba kimutatás (tenyésztéstől független vizsgálatok) (7, 10)*

Az idetartozó eljárások előnye (1. táblázat), hogy a vér tenyésztéses vizsgálatánál gyorsabb és időben tervezhető eredményekhez vezethetnek. Nem befolyásolja a mintavétel idején alkalmazott antibiotikum terápia, egyes tesztekben mennyiségi meghatározásra is van lehetőség. Legáltalánosabb igény, hogy a HK vizsgálatokkal összemérhető, széles kórokozó spektrumú azonosító eljárások álljanak rendelkezésre, azonban összehasonlító klinikai

tanulmányok és a mögöttes munkahipotézisek hiányában ma még nem látszik helyük, szerepük a kezelési algoritmusokban, valamint az sem, hogy egyszeri vagy többszöri mintavételt igényelnének-e (7). Mivel a tenyésztési eredményekkel gyakran nem egyeznek, és esetenként ellentmondásba is kerülnek velük, inkább csak kiegészíthetnék, de valószínűleg nem válthatják le a tenyésztésen alapuló HK vizsgálatokat.

Előremutató eljárásoknak lehet tekinteni azokat, amelyek stabil antimikrobás érzékenységgel jellemezhető, ill. nem vagy nehezen tenyészthető mikrobákat (*Coxiella*, *Bartonella*, *Aspergillus*) azonosítanak. Jellemzően olyan vizsgálatok tartoznak ide, melyek a mikrobák szűk körét tudják detektálni, meglehetősen szűk indikációs körrel.

### 1. Táblázat. Vérmintából történő közvetlen mikroba kimutatás molekuláris mikrobiológiai módszerekkel (*tenyésztéstől független vizsgálatok*)

Módszer	Fontos előny (+) /Fontos korlát (-)	Az eredmény alapján történő antimikrobás terápia lehetősége
<b>Széles spektrumú multiplex PCR + detektálás</b>		
Gram +: 6 - >100 spp Gram -: 8 - >100 spp	+: tipikus kórokozókat lefedí -: tenyésztéssel nem egyező eredmények	általában NEM
gomba: 5 - >10 spp	+: fogékony rizikócsoportok célzott vizsgálata	species szintű identifikálás esetén igen
<b>Nem v. nehezen tenyészthető mikrobák monoplex/oligoplex PCR detektálása</b>		
	+: célzott vizsgálat -: szűk indikációs kör	species szintű identifikálás esetén igen
<b>PCR amplifikálás + mágneses rezonancia detektálás</b>		
Gram +: 2 spp Gram - : 4 spp	-: szűk spektrum	általában NEM
Candida: 5 spp	+: fogékony rizikócsoportok célzott vizsgálata	species szintű identifikálás esetén igen
<b>Szérum mintára is validált meningitis antigén tesztek</b>		
	+: egyszerű, gyors -: igen szűk indikációs kör	a pozitív eredményhez hatékony empirikus terápia társítható
<b>Béta-D-glukán és galaktomannán antigének kimutatása</b>		
	+: fogékony rizikócsoportok célzott vizsgálata -: mérsékelt klinikai szenzitivitás	az empirikus terápia antifungális kiegészítését indikálja

*Pozitív HK palackból történő közvetlen mikroba kimutatás molekuláris mikrobiológiai módszerekkel (10)*

Technikailag megbízható tesztek tartoznak ide, azonban Gram-festett hemokultúra kenet és direkt MALDI-TOF MS analízisen kívül (lásd előbb) nem lehet általános szabályokat megfogalmazni arról, hogy milyen indikációs területen térül meg használatuk a mikrobák azonosítása területén (10), illetve az egyes eljárásokban szereplő rezisztencia gének vizsgálata hogyan hasznosítható a betegellátásban (2. Táblázat).

A legtöbb betegcsoportban a HK-k kis százalékában szaporodnak fel olyan mikroorganizmusok (baktériumok/gombák), amelyeket stabil antimikrobás érzékenység jellemez. A helyi epidemiológiai viszonyok alapján valamely rezisztenciagén kimutatása így csak kis mértékben befolyásolhatja a kezelési algoritmust.

**2. Táblázat. Pozitív HK palackból történő közvetlen mikroba kimutatás molekuláris mikrobiológiai módszerekkel**

Módszer	Fontos előny (+) /fontos korlát (-)	Az eredmény alapján történő antimikrobás terápia lehetősége
<b>FISH</b>		
Gram +: ~4 spp Gram -: ~4 spp	+: viszonylag gyors -: kevés többlet információ	csékély mértékben
<i>Candida</i> : 5 spp	+: fogékony rizikócsoportok célzott vizsgálata	species szintű identifikálás esetén igen
<b>Microarray</b>		
Gram +: 12 - >20 spp Gram -: 9 - >20 spp	+: tipikus kórokozókat és egyes rezisztencia gének vizsgálat -: kevés adat állrendelkezésre	csékély mértékben
gomba: akár 13 spp	+: fogékony rizikócsoportok célzott vizsgálata	species szintű identifikálás esetén igen
<b>Filmarray (PCR array)</b>		
Gram +: 8 - 12 spp Gram -: 11 spp	+: gyors, automatizált és egyes rezisztencia gének vizsgálat -: szűk mikrobiális spektrum	csékély mértékben
<i>Candida</i> : 5 spp	+: fogékony rizikócsoportok célzott vizsgálata	species szintű identifikálás esetén igen
<b><i>S. aureus</i>/MRSA célzott vizsgálat</b>	+: gyors -: szűk indikációs kör	helyi viszonyoktól függ

## 6. A HK tenyésztéses vizsgálat eredményének interpretálása (3, 6, 14)

### *Negatív eredmény:*

Ha a megválasztott inkubációs idő lejártá után a HK palackban nincs bizonyítható növekedés a vizsgálat eredménye negatív. A leleten az áll: **aerob és/vagy anaerob baktérium, gomba, *Mycobacterium* nem detektálható és/vagy nem tenyésztett ki.**

### *Pozitív eredmény:*

Ha a kontamináció lehetősége kizárható és több párhuzamos HK palackból ugyan az a baktérium/gomba tenyésztett ki rövid inkubációs időn belül, a species név, valamint az antibiotikum rezisztencia megadásával minél hamarabb közölni kell a klinikussal a HK tenyésztés eredményét. **A leleten jelezni kell HK tenyésztés pozitív eredményét, a pozitívvá válás időtartamát, a species nevét és a rezisztencia vizsgálat eredményét. Előzetes részeredmény kiadása is javasolt.** Leggyakoribb szepszis kórokozók: *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, de számos egyéb, aerob vagy anaerob baktérium vagy gomba lehet a szepszis kórokozója. Fontos, hogy bizonyos alapbetegségek esetén, illetve immunkárosodott betegekben ritkán előforduló mikroba is okozhat szepszist és izolálható lehet HK-ból.

### *Feltételezhető HK kontamináció eredménye:*

A pozitív HK vizsgálatok közel egyharmada esetében el kell dönteni, hogy kontaminánsról vagy valódi szepszis kórokozóról van-e szó. Az aszepszis szigorú betartása mellett végzett mintavétel esetén is kontaminálódhat a HK palack a környezetből vagy a bőflórából származó mikroorganizmussal. Az esetek nagy részében kontaminánsnak tekinthetők a koaguláz-negatív staphylococcusok, *Micrococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Propionibacterium* spp. és *Bacillus* spp. **A leleten jelezni kell, hogy a párhuzamosan levett HK palackok közül hányból tenyésztett ki és milyen inkubációs idő után a baktérium és hogy kórokozó szerepe kérdéses.**

Ha a koaguláz-negatív staphylococcusok, vagy az  $\alpha$ -hemolizáló streptococcusok csak a  $\geq 2$  palackból álló sorozat egyetlen palackjából tenyésznek ki, nagy a valószínűsége annak, hogy az izolátum kontamináns különösen, ha hosszú inkubációs idő után válik pozitívvá a palack. Önkényesen azonban nem tarthatjuk kontaminánsnak az  $\alpha$ -hemolizáló streptococcusokat, ha csak egyetlen palackból tenyésznek ki. Ilyenkor újabb HK vétele ajánlott. Ha  $\geq 2$  palack pozitív, az  $\alpha$ -hemolizáló *Streptococcus* nagyobb valószínűséggel tartható szignifikánsnak (14).

## 7. A HK vizsgálat érzékenysége és fajlagossága (3)

A HK egy olyan mikrobiológiai vizsgálat, amelynek eredménye rendkívüli mértékben függ a klinikus magatartásától, hozzáállásától (a steril mintavételi technika alkalmazásától, a HK vétel időzítésétől, a vérminta mennyiségének és a palackok számának megválasztásától), valamint a klinikai kép megítélésétől (a bakteriémia/fungémia, ill. szepszis valószínűségének becslésétől, az etiológiai ágens feltételezésének helyességétől, az eredmény interpretálásától). Mivel nincs független „arany standard”, amelyhez viszonyítva értékelni lehetne a vizsgálat érzékenységét és fajlagosságát, csak becslésekre hagyatkozhatunk.

Az érzékenységet alapvetően a véráram infekció természete szabja meg. A HK pozitivitása pl. endocarditisben 53-99%, *S. pneumoniae* okozta pneumóniában 25-30%, neutropeniás betegek lázas epizódjában 10-20%, hasúri fertőzésekben 30-40% a különböző irodalmi adatok alapján. Az érzékenységet az egy napon vett vérminták számának növelésével lehet növelni úgy, hogy vénapunkciónként legkevesebb 10 ml vért vesznek. A 24 órán belül történt 2-3 vérvételt követően végzett további, meggondolatlan vérvételekkel csak jelentéktelen mértékben lehet növelni a HK vizsgálatok pozitivitását, viszont munka- és költségigényesek, ezért nem ajánlott (15).

A HK fajlagosságát a hamis pozitív vizsgálatok aránya határozza meg. A kontaminánsok interpretálása bizonyos mértékig függ a beteg jellemzőitől. Az otthon szerzett infekciókban a valódi kórokozók és a kontaminánsok spektruma jól elkülöníthető. A nozokómiális infekciókban, és az immunszupprimált betegek infekcióiban azonban olyan baktériumok lehetnek valódi kórokozók, amelyek az „egészségesekben” (immunkompetens személyekben) kontaminánsnak minősülnek. A fajlagosság javításának leghatékonyabb módja a mintavételi előírások, az aszepszis szigorú betartása, valamint annak megkövetelése, hogy többszörös mintavétel történjék olyan véráram fertőzésben, amelyben a lehetséges kórokozók és a lehetséges kontaminánsok ugyanazok (pl. kanüllel, műanyag eszközzel kapcsolatos infekciók, vagy a neutropeniás láz). Két-három vénapunkció során nyert HK rendszerint elegendő a véráram fertőzés bizonyítására vagy kizárására, egyetlen vérminta egy vagy két palackba elosztva azonban nem elégséges!!

### **Irodalom:**

1. Wilson HL. (szerk.): Clinics in Laboratory Medicine – Blood Cultures. Vol. 14. W. B. Saunders Co., Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo 1994.

2. Lamy B, Ferroni A, Henning C, Cattoen C, Laudat P. How to: accreditation of blood cultures proceedings. A clinical microbiology approach for adding value to patient's care. *Clin Microbiol Infect* 24: 956-963 (2018)
3. Wilson ML, Weinstein MP, Reller LB. Laboratory detection of bacteremia and fungemia. In *Manual of Clinical Microbiology* 11. Edition. pp. 15-28. ASM Press, Washington D.C., 2015.
4. Arpi, M., Bentzon, M.W., Jensen, J., Frederiksen, W.: Importance of blood volume cultured in the detection of bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Inf Dis* 8, 838-842 (1989).
5. Leber A.L. (szerk.) *Clinical Microbiology Procedures Handbook* 4th edition: Blood Cultures; General detection and interpretation. 3.4. (2016)
6. Czirák, É. (szerk.): *Klinikai és Járványügyi Bakteriológia. Kézikönyv*. Melania, Budapest, 1999.
7. Opota O, Croxatto A, Prod'hom G, Greub G: Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art. *Clin Microbiol Infect* 21: 313-322 (2015)
8. Peters RPH, Agtmael MA, Danner SA, Savelkoul PHM, Vandembroucke-Grauls CMJE.: New developments in the diagnosis of bloodstream infections. *The Lancet Inf. Dis* 4:751-760 (2004).
9. Dubourg G., Lamy B., Ruimy R. Rapid phenotypic methods to improve the diagnosis of bacterial blood stream infections: meeting the challenge to reduce the time to result. *Clin Microbiol Infect* 24: 935-943 (2018)
10. Peker N., Couto N., Sinha B., Rossen J.W. Diagnosis of bloodstream infections from positive blood cultures and directly from the blood samples: recent developments in molecular approaches. *Clin Microbiol Infect* 24: 944-955 (2018)
11. Huang YL, Sun QL, Li JP, Hu YY, Zhou HW, Zhang R. Evaluation of an in-house MALDI-TOF MS rapid diagnostic method for direct identification of micro-organisms from blood cultures. *J Med Microbiol*. 2018 Nov 12. doi: 10.1099/jmm.0.000866
12. Di Gaudio F, Indelicato S, Indelicato S, Tricoli MR, Stampone G, Bongiorno D. Improvement of a rapid direct blood culture microbial identification protocol using MALDI-TOF MS and performance comparison with Sepsityper kit. *J Microbiol Methods* 155:1-7 (2018).
13. Altun O, Botero-Kleiven S, Carlson S, Ullberg M, Ozenci V. Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottled by MALDI-TOF MS following short-term incubation on solid media. *J. med Microbiol* 64:1346-1352 (2015)

14. Barenfanger, J.: Improving the clinical utility of microbiology data: an update. Clin Microbiol Newsl 25: 1-7 (2003).

15. Tabriz MS, Riederer K, Baran JJ, Khatib R: Repeating blood cultures during hospital stay: practice pattern at a teaching hospital and a proposal for guidelines. Clin Microbiol Infect 10: 624-627 (2004)

2018, December

Készült az Orvosi Mikrobiológiai Szakmai Kollégium 2008 december 31-ig érvényes Egészségügyi Minisztériumi szakmai protokoll alapján. A Módszertani ajánlás aktualizálása a Klinikai és Járványügyi Mikrobiológiai Tanács jóváhagyásával Nagy Erzsébet vezetésével történt. Az aktualizálásban részt vettek: Kristóf Katalin és Kónya József.