

ПРИНОС НА АВТОМАТИЗИРАНИТЕ СИСТЕМИ В МИКРОБИОЛОГИЧНАТА ЛАБОРАТОРИЯ ЗА БЪРЗА ДИАГНОСТИКА НА БАКТЕРИАЛЕН СЕПСИС

Радка Стоянова

*Лаборатория по микробиология, УМБАЛ „Св. Марина“,
Медицински университет – Варна*

APPLICATION OF AUTOMATED MICROBIAL IDENTIFICATION SYSTEMS FOR RAPID DIAGNOSIS OF BACTERIAL SEPSIS

Radka Stoyanova

Laboratory of Microbiology, St. Marina University Hospital, Medical University of Varna

РЕЗЮМЕ

Правилната диагноза на инфекциите на кръвния поток, особено при тежко болни и критични пациенти, е от решаващо значение за изхода от заболяването. С цел по-навременни и адекватни решения в съвременните условия е необходимо напълно да се автоматизира процесът на откриване, идентификация на микроорганизми и определение на антибиотична чувствителност, за да се ускори възстановяването на пациентите. Това е причината за изследване на хемокултури много клинични микробиологични лаборатории сега да използват напълно автоматизирана система за непрекъснато наблюдение със затворен цикъл за откриване на микробен растеж. В настоящата статия са разглеждани най-разпространените автоматизирани системи, използвани за микробиологично изследване на кръвни проби, заедно с техните основни принципи на действие и ефективност. Основно внимание е обърнато на предимствата на микробиологичните автоматизирани системи по отношение на печалбата на лабораторно време и коректност на получения резултат.

Ключови думи: микробна идентификация, хемокултура, автоматизация

ABSTRACT

Correct diagnosis of bloodstream infections is crucial for the disease's outcome, especially for critically ill individuals. To achieve more rapid and adequate decisions, it is important to have a fully automated process for microbial detection, identification, and antimicrobial susceptibility testing. Therefore, most clinical microbiology laboratories are currently using automated systems with continuous monitoring and a closed cycle for the detection of microbial growth. In the current review, we discuss the most popular automated systems used for microbiological testing of blood cultures and present the main principles behind their application and efficiency. The advantages of microbial automated systems are considered in regard to laboratory time management and the accuracy of obtained laboratory results.

Keywords: microbiological identification, blood cultures, automation

УВОД

Своевременното откриване на бактерии в кръвта на тежко болни и/или имуносупресирани пациенти е от критична важност за поставянето на точна и бърза диагноза за състоянието на пациента, провеждане на адекватното антибиотично лечение или неговата корекция при необходимост, което от своя страна е свързано с излекуване на пациента, намаляване продължителността на болничния му престой и разходите за болнично лечение.

Хемокултурелното изследване се смята за златен стандарт в диагностиката на инфекциите на кръвта. Конвенционалните методи за обработка на хемокултури отнемат много време до доказване наличието на бактерии във взетата кръвна проба, тяхната видова идентификация и определяне на чувствителност към антимикробни лекарствени средства. Това може да отнеме между 3–5 или повече дни, време, което е ценно за лечението на пациентите. В допълнение при мануалните методи на работа е по-голяма вероятността за получаване на фалшиво отрицателни резултати, което също се асоциира с повишен риск за състоянието на пациентите.

Ето защо въвеждането на автоматизирани системи, които да заменят мануалните методи на работа в дейността на микробиологичните лаборатории, е от особена важност за подобряване ефективността на работа и респективно качеството на здравната услуга, която лабораторията предлага.

В съвременните условия е налице необходимост напълно да се автоматизира процесът на детектиране, микробна идентификация и определяне на чувствителността към антимикробни лекарствени средства, за да се ускори оздравителният процес на пациентите.

ОБСЪЖДАНЕ

Понастоящем за целите на хемокултурелното изследване много клинични микробиологични лаборатории използват системи за автоматично инкубиране на хемокултури. Тези автоматизирани микробиологични системи, предназначени да откриват наличието на микроорганизми в кръвни проби и други нормално-стерилни течности, позволяват получаването на резултат в най-кратки срокове - от няколко часа до 3–5 дни в зависимост от конкретния микроорганизъм и неговите биологични характеристики.

Автоматизирани микробиологични системи *Bactec* и *Bact Alert*

Хемокултурелното изследване е най-важното микробиологично изследване в лабораторната микробиологична практика. Автоматизирането на хемокултурния скрининг се използва вече повече от 30 години. Първата автоматизирана система *Bactec 460* (Becton, Dickinson and Company, USA) е въведена в употреба през 1970 г. в САЩ. В началото на 90-те години се създават системи, извършващи непрекъснат автоматичен мониторинг - *Bact Alert* (Marcy-l'Étoile, France) и *Bactec 9000* (Becton, Dickinson and Company, USA) през 1992 г. (3). Понастоящем в световен мащаб в микробиологичните лаборатории се използват предимно два вида системи за автоматично инкубиране на хемокултури - *Bactec* (BD, USA) и *Bact Alert* (BioMerieux, France). Принципът на работа на двата апарата е сходен и се свежда до постоянна инкубация, непрекъснат мониторинг и максимално бързо индикиране на положителните кръвни проби. Непрекъснатото наблюдение и детекция на микробния растеж се извършва с помощта на флуоресценция, колориметрия и отчитане отделянето на CO₂ като резултат от жизнената дейност на микроорганизмите. Сред основните предимства на автоматизираното инкубиране на хемокултури са високата точност и чувствителност на метода и сведените до минимум възможности за контаминация на пробите (3). Накратко, кръвната проба за изследване се поставя в специални, пластмасови флакони (елиминиращи риска от счупване или повреда), съдържащи течна хранителна среда. Съществуват и хранителни среди, съдържащи абсорбиращи полимерни гранули, които инактивират действието на антибиотиците. Това дава възможност за изследване на проби на пациенти, които към момента на тестването провеждат антибиотична терапия. За малки обем кръв (0.5ml) са разработени специално адаптирани хранителни среди, което позволява изследването на проби в минимални обеми като ликвор, други първично стерилни течности (перикарден, плеврален пунктат) или кръв в педиатричната популация пациенти. Флаконите с хранителна среда са съвместими с вакуумните системи за вземане на кръв, с което се избягва възможност за контаминация на пробите по време на пробовземането. Всеки флакон се поставя в отделна позиция в автоматичния инкубатор. В допълнение апаратите позволяват зареждане на флакони в системата по всяко време, както и на предварително инкубирани флакони. Изследването продължава без никаква ма-

нипулация от страна на лаборанта до момента, в който флаконът не се разпознае от апарата като положителен. Това спестява време и дава възможност за извършване на други професионални активности от медицинските специалисти. Заредените флакони се „четат“ от апарата индивидуално на всеки 10–15 минути. При установяване на белези на микробен растеж следва незабавно известяване чрез звуков и светлинен сигнал и индикиране позицията на положителната хемокултура (флакон) в апарата. Принципът на микробна детекция се основава на измерване на концентрацията на CO_2 във флакона, който си отделя в резултат на микробния метаболизъм. Отчитането се извършва чрез интегрирани в апарата сензори.

Колориметричният и флуоресцентният метод за детекция на позитивни хемокултури позволяват минимизиране броя на фалшиво отрицателните резултати, като средното време за откриване на микробен растеж е около 8–10 часа. Стандартният протокол за автоматично инкубиране на хемокултури е средно 5 дни (10–14 дни за гъбички), което означава, че в случаите, в които системата не детектира микробен растеж, кръвната проба ще бъде определена като негативна в края на инкубацията (на петия ден), като по този начин се избягва субективния фактор при отчитане на резултатите.

Откритите положителни хемокултури подлежат на допълнителна обработка за видова идентификация на микробния агент и определяне на неговата чувствителност към антимикробни лекарствени средства.

В обобщение системите за автоматично инкубиране на хемокултури значително намаляват времето до получаване на резултата, както и манипулациите с хранителни бульонни среди и кръвни проби са сведени до минимум, съответно и рискът от контаминация. Безспорни предимства са лесното обслужване на апаратите, свързано с минимално време за обучение, повишена производителност на труда, много нисък относителен дял на фалшиво положителни резултати и възможност за включване в лабораторната информационна система.

Автоматизирана микробиологична система Maldi TOF MS

За пациентите със сепсис е от критична важност освен бързото откриване на бактерии в кръвта, но и много бърза видова идентификация на инфекциозния агент. Според проучване на Mutters NT (2014) времето необходимо за микробна идентификация с използване на кла-

сическите методи е средно 2 дни от момента, в който медицинският лаборант започва обработката на положителната хемокултурелна проба (8). Това време може драматично да бъде съкратено чрез използване на автоматизирани системи за експресна микробна идентификация, основаващи се на MALDI TOF MS (Matrix assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry) (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Този метод се използва от няколко десетилетия в областта на химията, но в наши дни прилагането му в микробиологичната лабораторна практика се очертава като много бърз, точен и високочувствителен подход за микробна идентификация (над 98%) (7,8), който редица автори определят като революцията в сферата на клиничната микробиология.

Рутинните микробиологични техники за видова идентификация се базират главно на тестове, доказващи биохимичната активност на микроорганизмите, на микроскопско изследване и интерпретиране на някои фенотипни характеристики на патогените. Този стандартен подход изисква експертиза и време за изпълнение.

Технологията MALDI TOF MS позволява точна идентификация на голям брой микробни видове (над 3500) при необходимо време за идентификация от няколко минути до час, като използва много малко количество биомаса (7).

В основата на този метод стои мас спектрофотометрията на микробните протеини, специално на консервативните, каквито са рибозомалните протеини. Получените от анализа спектри се сравняват на принципа „пръстов отпечатък“ с наличните в базата данни на апарата такива. Видовата идентификация на едни изолат отнема по-малко от две минути. MALDI TOF MS анализът протича в два етапа: 1. Подготовка на пробата; 2. Микробна идентификация (5). Общо необходимото време за това е около 30 мин. За сравнение времето необходимо за видовата идентификация при конвенционалните методи е между 24 и 48 часа. Експресната видова идентификация чрез MALDI TOF значимо съкращава времето за цялото микробиологично изследване. MALDI TOF дава възможност още преди финализиране на резултата от изпитване на чувствителността към антибиотици да се назначи етиотропно лечение само на базата на резултата от идентификацията.

Този метод позволява и идентификация на микробния патоген директно от клиничен материал, т.е., без да е извършена изолация на патогена в твърда хранителна среда. Тази възможност е

от изключително значение при диагностиката на септични състояния, защото позволява идентификация директно от кръвната проба, детектирана като положителна от системата за автоматична инкубация на хемокултури, като е необходима само една допълнителна стъпка на екстрахиране преди процеса на идентификация. Така става възможно още по-ранното идентифициране, а оттук и възможността да се оптимизира провежданата антибиотична терапия при конкретния пациент (2,8). Пример за такъв продукт е Sepsityper (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

MALDI TOF методът използва много малко количество бактериална маса, единични микробни колонии, без необходимост от амплификация, използване на селективни хранителни среди или други предварителни стъпки за подготовка на пробите, свързани с разход на време, сложност на процедурата и негативно повлияване върху качеството на крайния резултат. Чрез допълнителна стъпка на екстракция методът може да се използва и за видова идентификация на гъбички (7).

Други предимства са високата точност и специфичност на метода, ниската себестойност на изследването, незначителната необходимост от поддръжка на апарата и възможността за постоянно обогатяване на базата данни. Поради ниските разходи за консумативи и краткото време за получаване на резултат тази технология може значително да подобри качеството и производителността на микробиологичната лаборатория, но в същото време тя изисква висока първоначална инвестиция за оборудването и необходимост от оценка на придобитите компетентности на медицинския персонал и създаване на възможност за тяхното надграждане с подходящи форми на обучение.

MALDI TOF MS може да бъде комбиниран и внедрен като допълнителен модул в системите за тотална лабораторна автоматизация (BD Kiestra (САЩ); Soran (Италия) и Beckman Coulter с DxA5000 (САЩ) + i2a Diagnostics с Recitals (Франция). Това би осигурило допълнително намаляване на времето за изпълнение в сравнение с ползване на двете системи поотделно.

Проучване, което сравнява времето за видова идентификация от положителни хемокултури по конвенционалния метод и това при комбиниране на BD Kiestra (Becton, Dickinson and Company, USA) и MALDI TOF MS, съобщава за съкращаване на времето с 30.6 часа при автоматизирания подход (6,8). Според друго изследване внедряването на пълна лабораторна автомати-

зация и комбинирането ѝ с MALDI TOF води до 20% намаляване на еквивалентите на пълен работен ден, т. е. позволява на медицинския персонал да извършва 25% повече тествания за един работен ден (9). Същото проучване съобщава, че експресното идентифициране на микроорганизми от хемокултури води и до намаляване на времето до получаване на резултат, което е свързано с намаляване на продължителност на престоя в интензивните болнични структури, както и на 30-дневна смъртност (9,10).

Автоматизирани микробиологични системи на принципа на PCR - GeneXpert и Molecular Mouse

Друго предимство на автоматизирани системи е възможността за бързо определяне на антибиотична резистентност на идентифицираните бактериални изолати. Понастоящем използването на молекулярно-генетични методи за доказване на механизмите на микробна резистентност все повече навлиза в съвременната микробиологична лабораторна практика. Пример за такива автоматизирани системи са GeneXpert (Cepheid, USA) и Molecular Mouse sepsis panel на фирма AliFaxl, Italy. Това са системи, които извършват едновременно екстракция, амплификация и детекция на генетичния продукт в един апарат, без да е необходима намесата на потребителя, при елиминиране на възможността за замърсяване на околните помещения. Самостоятелният режим на работа намалява ръчния труд и сложността на молекулярните изследвания, без да са необходими експертиза и опит в молекулярната диагностика. Използвайки Multiplex Real Time PCR (Polymerase Chain Reaction), тези системи позволяват извършване на бърза диагностика на инфекции, включително и с доказване на гени, медиращи антибиотична резистентност в рамките на 30–60 минути (1).

ИЗВОДИ

1. Септичните усложнения продължават и днес да са сред основните проблеми на общественото здраве въпреки изключително големия напредък на медицината от последните десетилетия. Инфекциите на кръвта и днес представляват сериозна заплаха за човешкия живот като водеща причина за заболяемост и смъртност и една от най-скъпите причини за хоспитализация (4).
2. Своевременното диагностициране на бактериален сепсис, откриване и идентифициране на бактериалния причинител и определяне на антибиотична резистентност пести вре-

ме, средства, ресурс и спасява човешки живот. Това налага все по-мощно внедряване и използване в практиката на съществуващите автоматизирани лабораторни системи за работа.

3. В комбинация с обслужване от квалифициран персонал, с придобити компетентности за работа с високотехнологична апаратура, се гарантира нужната бързина, точност, надеждност и качество на предоставените резултати.

Times in the Clinical Microbiology Laboratory: a Retrospective Analysis, J Clin Microbiol. 2017;56(1):e01242-17. doi: 10.1128/JCM.01242-17. PMID: 29118171; PMCID: PMC5744220.

10. Walker T, Dumadag S, Lee CJ, Lee SH, Bender JM, Cupo AJ, et al. Clinical Impact of Laboratory Implementation of Verigene BC-GN Microarray-Based Assay for Detection of Gram-Negative Bacteria in Positive Blood Culture, J Clin Microbiol. 2016;54(7):1789-1796. doi: 10.1128/JCM.00376-16. Epub 2016 Apr 20. PMID: 27098961; PMCID: PMC4922078.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дмитриева, Н. В., Агинова, В. В., Петухова, И. Н., Григорьевская, З. В., Багирова, Н. С. Автоматизация микробиологической лаборатории – путь к снижению летальности онкологических больных, Злокачественные опухоли. 2020; 3s1:49–3.
2. Припутневич, Т. В., Мелкумян, А. Р., Бурменская, О. В., Непша, О. С., Никитина, И. В., Любасовская, Л. А., et al. Использование методов MALDI-TOF масс-спектрометрии и количественной ПЦР для быстрой диагностики септических состояний, Лабораторная диагностика. 2014; том I: №1.
3. Синяк, М. Ю. Автоматизация микробиологических исследований, ЗАО «Лабораторная диагностика», 2003.
4. Стоева, Т. Антибиотична резистентност на най-честите причинители на бактериемии и леталитет, свързан с тях. Дисертационен труд, МУ Варна. 2023
5. Якупова, А. Ф., Коломникова, Е. А., Каппарова, А. Х., Маннанова, Л. Р., Усманова, Р. Х. Современные методы диагностики в бактериологической лаборатории. Журнал “Научный лидер”, 2022; 16 (61).
6. Antonios K, Croxatto A, Culbreath K. Current State of Laboratory Automation in Clinical Microbiology Laboratory. Clin Chem. 2021; 68(1):99-114.
7. De Carolis E, Vell A, Vaccaro L, Torelli R, Spanu T, Fiori B, et al. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. J Infect Dev Ctries. 2014; 8(9):1081-1088. doi:10.3855/jidc.3623.
8. Mutters NT, Hodiament CJ, de Jong MD, Overmeijer HP, van den Boogaard M, Visser CE. Performance of Kiestra total laboratory automation combined with MS in clinical microbiology practice, Ann Lab Med. 2014 Mar;34(2):111-7. doi: 10.3343/alm.2014.34.2.111. Epub 2014 Feb 13. PMID: 24624346; PMCID: PMC3948823.
9. Theparee T, Das S, Thomson RB Jr. Total Laboratory Automation and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Improve Turnaround

Радка Стоянова
Лаборатория по микробиология
УМБАЛ „Св. Марина“
бул. „Хр. Смирненски“ 1
Варна, 9000
e-mail: r.stoianova71@abv.bg