

## Diagnostyka mikrobiologiczna zakażeń krwi i sepsy w dobie narastającej oporności – znaczenie szybkich i nowoczesnych metod

### OPRACOWANIE:

**Katarzyna Semczuk**

Zakład Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej,  
Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”, Warszawa

### WSTĘP

Zakażenia krwi (*bloodstream infections*, BSI) i sepsa należą do najpoważniejszych wyzwań współczesnej medycyny oraz zdrowia publicznego. Według danych globalnych każdego roku sepsa dotyka około 49 milionów osób. Pomimo ogromnego postępu w leczeniu, śmiertelność wciąż pozostaje bardzo wysoka. W krajach rozwiniętych wynosi średnio 15–25%, natomiast w przypadku wstrząsu septycznego sięga nawet 30–40%. W krajach o niższym statusie ekonomicznym wartości te są jeszcze wyższe. Szacuje się, że sepsa może odpowiadać za co piąty zgon na świecie. Chorują osoby w każdym wieku, jednak największą zapadalność obserwuje się u noworodków, małych dzieci oraz osób starszych [1; 2].

Znaczna część zakażeń wiąże się z pobytem w placówkach ochrony zdrowia i określana jest jako zakażenia szpitalne (*healthcare-associated infections*, HAI). Szczególnie narażeni są pacjenci w stanie ciężkim, wymagający intensywnej opieki medycznej, terapii immunosupresyjnej lub leczenia inwazyjnego. Ważną kategorię stanowią zakażenia związane z dostępem

naczyniowym (*central line-associated bloodstream infections*, CLABSI), których w oddziałach intensywnej terapii w Europie notuje się średnio 3,7 na 1000 dni stosowania cewnika. Zakażenia te zwiększają ryzyko zgonu, a także wydłużają czas hospitalizacji i podnoszą koszty leczenia [3; 4].

Należy podkreślić, że dane te mogą być zaniżone ze względu na brak pełnego rejestru przypadków sepsy i kosztów leczenia. Tymczasem nawet połowa pacjentów po przebytej sepsie doświadcza powikłań fizycznych i psychicznych, co dodatkowo obciąża system ochrony zdrowia [5].

Kluczowym elementem leczenia jest natychmiastowe wdrożenie skutecznej antybiotykoterapii. Każda godzina opóźnienia w terapii zwiększa ryzyko zgonu o 7,6% u pacjentów we wstrząsie septycznym [6; 7]. Z tego powodu obowiązujące standardy zalecają szybkie empiryczne podanie antybiotyku o szerokim spektrum działania, równoległe z pobraniem materiałów do badań mikrobiologicznych, w tym obowiązkowo krwi na posiew. Po uzyskaniu wyników konieczne jest jak najszybsze przejście na terapię celowaną, co ogranicza ryzyko działań niepożądanych

i selekcji szczepów opornych. W praktyce klinicznej wybór terapii empirycznej opiera się na obrazie klinicznym i czynnikach ryzyka, jednak bywa nieadekwatny nawet u 40% pacjentów [8].

Oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe (*antimicrobial resistance*, AMR) stanowi kolejne poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego. Według opublikowanego w Lancet w 2022 r. wyników międzynarodowego badania przez tzw. grupę The AMR collaborators w 2019 roku z opornością na antybiotyki związanych było 4,95 miliona zgonów, z czego ponad 1 milion wynikał bezpośrednio z zakażeń wywołanych drobnoustrojami opornymi [9]. W Europie rocznie notuje się około 670 tysięcy takich zakażeń oraz około 33 tysiące zgonów. Raporty ECDC wskazują, że najczęściej izolowanymi patogenami z krwi są bakterie Gram-ujemne, takie jak *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*, a także Gram-dodatnie, m.in. *Staphylococcus aureus*. Coraz większym zagrożeniem są szczepy wielolekooporne (*multidrug-resistant*, MDR) oraz ekstremalnie lekooporne (*extensively drug-resistant*, XDR). Raport WHO z 2022 roku wykazał, że ponad 50% izolatów *K. pneumoniae* i *Acinetobacter spp.* odpowiedzialnych za szpitalne zakażenia krwi było opornych na podstawowe antybiotyki, a około 8% klinicznych izolatów *K. pneumoniae* z krwi wykazywało oporność na karbapenemy [3; 10; 11]. Wysoka częstość zakażeń wywołanych przez patogeny MDR/XDR przekłada się na gorsze rokowanie pacjentów i znacząco ogranicza dostępne możliwości terapeutyczne.

Diagnostyka mikrobiologiczna odgrywa kluczową rolę w rozpoznawaniu i leczeniu sepsy. Złotym standardem pozostają tradycyjne posiewy krwi, jednak ich ograniczeniem jest długi czas oczekiwania na wynik – zazwyczaj 48–72 godziny. W ostatnich latach dynamiczny rozwój nowoczesnych technologii diagnostycznych pozwala istotnie skrócić ten czas (*time-to-result*). Do takich metod należą: bezpośrednia identyfikacja patogenu z dodatniej butelki posiewu za pomocą spektrometrii masowej MALDI-TOF, multipleksowe panele PCR (*rapid multiplex molecular syndromic panels*, RMSP) oraz szybkie, fenotypowe metody oznaczania lekowrażliwości. Dzięki nim możliwe jest wcześniejsze wdrożenie terapii celowanej, co przekłada się na poprawę wyników leczenia i racjonalizację stosowania antybiotyków [7; 12; 13].

## ZNACZENIE DIAGNOSTYKI MIKROBIOLOGICZNEJ I ROLA ETAPU PRZEDANALITYCZNEGO

Mimo rozwoju nowych technologii, pobranie krwi na posiew wciąż pozostaje złotym standardem w diagnostyce zakażeń krwi i sepsy. Badanie to umożliwia identyfikację czynnika etiologicznego oraz określenie jego profilu lekowrażliwości, co stanowi podstawę wdrożenia skutecznej terapii celowanej i poprawy rokowania. Klasyczny proces obejmuje inkubację pobranej krwi, hodowlę na podłożach stałych, identyfikację i wykonanie antibiogramu, a jego czas trwania wynosi zazwyczaj 48–72 godziny [7; 12; 13; 14].

Międzynarodowe towarzystwa naukowe (m.in. Infectious Diseases Society of America – IDSA, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST, Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI, Surviving Sepsis Campaign 2021) podkreślają konieczność możliwie szybkiego pobrania krwi na posiew – najlepiej bezpośrednio po wystąpieniu pierwszych objawów sepsy i przed podaniem pierwszej dawki antybiotyku [7].

Skuteczność diagnostyki BSI i sepsy w ogromnym stopniu zależy od jakości etapu przedanalitycznego. Obejmuje on m.in.: wskazania do pobrania materiału, wybór miejsca i techniki wkłucia, odpowiednią objętość krwi, liczbę próbek, przestrzeganie zasad aseptyki oraz warunki transportu. Szacuje się, że błędy w tej fazie odpowiadają nawet za 60–70% niepowodzeń diagnostycznych. Do najczęstszych należą:

- pobranie próbki po antybiotykoterapii (ryzyko wyników fałszywie ujemnych),
- zbyt mała objętość krwi (obniżona czułość diagnostyczna),
- kontaminacja mikrobiotą skóry (wyniki fałszywie dodatnie).

Każdy z tych błędów może prowadzić do niepowodzeń diagnostycznych i terapeutycznych, opóźnień we wdrożeniu odpowiedniego leczenia oraz zwiększenia kosztów hospitalizacji [15; 16].

## LICZBA I OBJĘTOŚĆ PRÓBEK KRWI W DIAGNOSTYCE ZAKAŻEŃ KRWI

Czułość posiewu krwi zależy w dużej mierze od objętości pobranej próbki oraz liczby wykonanych posiewów. W bakteriemii stężenie drobnoustrojów we krwi jest zwykle bardzo niskie (1–10 CFU/ml). Dlatego każdy dodatkowy mililitr krwi istotnie zwiększa szansę izolacji patogenu. Wykazano, że zwiększenie objętości próbki o 1 ml przekłada się na około 3% wzrost prawdopodobieństwa uzyskania dodatniego wyniku [16; 17].

W praktyce klinicznej pobranie zbyt małej objętości krwi obniża czułość diagnostyczną, a przy objętości poniżej 0,5 ml szansa na wykrycie wymagających drobnoustrojów, takich jak *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* czy *Neisseria meningitidis*, jest dramatycznie niska. Pobrana krew w niewystarczającej objętości może zatem skutkować wynikiem fałszywie ujemnym.

Optymalizacja łącznej objętości i liczby butelek nie tylko zwiększa czułość diagnostyczną, ale także skraca czas do uzyskania sygnału dodatniego, przyspieszając dalszą diagnostykę.

Badania kliniczne wskazują, że:

- pobranie 20 ml krwi umożliwia wykrycie około 70% bakterii,
- zwiększenie objętości do 40 ml podnosi skuteczność o kolejne 15%,
- przy 60 ml czułość wzrasta o następne 10%,
- pobranie 80 ml (cztery próbki, osiem butelek) pozwala wykryć patogen w ponad 99% przypadków sepsy [18; 19; 20].

Równie istotnym elementem diagnostyki jest liczba pobranych próbek krwi. Pobranie co najmniej dwóch niezależnych zestawów – obejmujących butelkę tlenową i beztlenową – zwiększa wykrywalność bakterii oraz ułatwia odróżnienie zakażenia rzeczywistego od kontaminacji [21; 22]. Zgodnie z krajowymi i międzynarodowymi rekomendacjami, u dorosłych oraz dzieci o masie ciała >36,3 kg należy pobrać krew do co najmniej dwóch zestawów (łącznie cztery butelki: tlenowa i beztlenowa). W sytuacjach szczególnych, takich jak podejrzenie infekcyjnego zapalenia wsierdza czy gorączki o nieznannej etiologii, zaleca się pobranie trzech zestawów (sześć butelek). Takie postępowanie nie tylko zwiększa szansę izolacji patogenu, lecz także pozwala wiarygodnie odróżnić zakażenie rzeczywiste od kontaminacji, która jest częstą przyczyną wyników fałszywie dodatnich [18, 23].

U dzieci objętość próbki powinna być dostosowana do masy ciała i nie przekraczać 5% całkowitej objętości krwi krążącej. W praktyce u noworodków zwykle pobiera się 1–2 ml na butelkę [18; 19; 24].

Zgodnie z zaleceniami Infectious Diseases Society of America (IDSA) oraz European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), rekomenduje się pobranie co najmniej dwóch, a najlepiej trzech kompletów krwi na posiew z różnych miejsc (preferencyjnie dwóch różnych wkłuć), w krótkim odstępie czasu – optymalnie w ciągu 15–30 minut od wystąpienia

objawów sugerujących sepsę i przed podaniem antybiotyku [24; 25].

Zalecane objętości wynoszą:

- u dorosłych: 20–30 ml krwi na każdy komplet (zestaw dwóch butelek: tlenowa i beztlenowa),
- u dzieci: od 1 do 5 ml, zależnie od masy ciała (butelki tlenowe, pediatryczne) [19; 24; 27].

**Tabela 1.** Rekomendowana objętości pobierania krwi na posiew w zależności od masy ciała.

Masa ciała pacjenta (kg)	Zalecana objętość krwi na posiew (ml)		Całkowita objętość krwi na posiew	% całkowitej objętości krwi pacjenta
	Próbka 1	Próbka 2		
≤ 1	2	-	2	4
1,1 - 2	2	2	4	4
2,1 – 12,7	4	2	6	3
> 12,8 - 36	10	10	20	2,5
> 36	20-30	20-30	40-60	1,8 – 2,7

Kluczowe znaczenie dla jakości i wiarygodności wyników ma ściśle przestrzeganie zasad aseptyki podczas pobierania krwi. Właściwie przeprowadzona procedura powinna ograniczać częstość kontaminacji do poziomu 2–3% wszystkich posiewów. W praktyce klinicznej często przekracza ona 5%, co prowadzi do niepotrzebnych badań dodatkowych, nieuzasadnionej antybiotykoterapii oraz wydłużenia hospitalizacji. Szacuje się, że przy zaniedbaniach w fazie przedanalizycznej nawet połowa wyników dodatnich może wynikać z kontaminacji, co obniża wartość diagnostyczną badania i naraża pacjenta na niepotrzebną lub nieprawidłową terapię [16; 28].

Wytyczne European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) oraz ESCMID dodatkowo zalecają wdrażanie systematycznego monitoringu jakości pobierania krwi, obejmującego m.in. wskaźniki kontaminacji, czas do uzyskania sygnału dodatniego oraz liczbę pobranych próbek w przeliczeniu na 1000 hospitalizacji [3; 25].

**Optymalna liczba i objętość próbek krwi, pobranych zgodnie z zasadami aseptyki i rekomendacjami międzynarodowymi, warunkuje wysoką czułość diagnostyki sepsy, ogranicza ryzyko kontaminacji i pozwala na szybsze oraz trafniejsze decyzje terapeutyczne.**

## SYSTEMY AUTOMATYCZNE I RODZAJE BUTELEK DO POSIEWU KRWI

Współczesna diagnostyka mikrobiologiczna zakażeń krwi opiera się na zastosowaniu zautomatyzowanych systemów monitorowania wzrostu drobnoustrojów. Najczęściej wykorzystywane są: BD BACTEC (Becton Dickinson), BacT/ALERT (Biomerieux) oraz VersaTREK (Thermo Fisher). Systemy te umożliwiają ciągłe monitorowanie próbek i wykrywanie zmian metabolicznych, takich jak produkcja dwutlenku węgla, zmiany ciśnienia czy pH, a także automatyczne zgłaszanie sygnału dodatniego. Dzięki temu znacząco skracają czas do uzyskania informacji o wzroście (time to positivity, TTP) [27; 28].

Każdy z wymienionych systemów oferuje różne typy butelek dostosowanych do wieku pacjenta, wskazań klinicznych oraz rodzaju spodziewanych patogenów.

Rodzaje butelek stosowanych w automatycznych systemach posiewu krwi:

- Standardowe butelki tlenowe i beztlenowe – stosowane rutynowo u dorosłych pacjentów.
- Butelki pediatryczne (np. BD Peds Plus/F, BacT/ALERT PF Plus) – przeznaczone dla dzieci i noworodków, wymagają mniejszych objętości krwi (1–3 ml). Podłoża w tych butelkach zawierają substancje neutralizujące antybiotyki, co zwiększa czułość badania przy niewielkiej objętości próbki.
- Butelki specjalistyczne – przeznaczone do diagnostyki grzybic (np. BD Mycosis IC/F) oraz prątków (np. MB BacT/ALERT). Zawierają podłoża o zmodyfikowanym składzie, dostosowane do specyficznych wymagań wzrostowych tych patogenów.
- Butelki z neutralizatorami antybiotyków (np. BacT/ALERT FA Plus, BD BACTEC Plus) – zawierają żywice lub inne substancje wiążące antybiotyki obecne we krwi, co zwiększa wykrywalność bakterii u pacjentów już poddanych leczeniu przeciwdrobnoustrojowemu.
- Butelki lityczne (np. BD Lytic/10 Anaerobic/F) – stosowane w diagnostyce drobnoustrojów wewnątrzkomórkowych, takich jak *Brucella* spp.

**Dobór odpowiednich butelek ma szczególne znaczenie w sytuacjach klinicznych, takich jak diagnostyka u dzieci, pacjentów z immunosupresją czy w trakcie antybiotykoterapii. Właściwy wybór zwiększa czułość diagnostyczną badania i umożliwia wcześniejsze rozpoczęcie adekwatnej terapii.**

**Tabela 2.** Przykładowe schematy pobierania krwi na posiew w zależności od masy ciała pacjenta – wybór odpowiednich butelek.

Pacjent /masa ciała	Całkowita objętość krwi do pobrania	Posiew 1	Posiew 2
< 1 kg	1,5-2 ml	Butelka pediatryczna	-
1,1 -2 kg	4 ml	Butelka pediatryczna	Butelka pediatryczna
2,1-12,7 kg	6 ml	Butelka pediatryczna lub tlenowa	Butelka pediatryczna lub tlenowa
12,8–36kg	20 ml	Butelka tlenowa lub pediatryczna i beztlenowa	Butelka tlenowa lub pediatryczna i/lub beztlenowa
> 36 kg	40-60 ml	Butelka tlenowa i beztlenowa	Butelka tlenowa i beztlenowa i do rozważenia mikologiczna

## TRANSPORT PRÓBEK – ZNACZENIE CZASU OD POBRANIA DO ROZPOCZĘCIA INKUBACJI

Czas do uzyskania sygnału dodatniego (time to positivity, TTP) to okres od umieszczenia butelki w systemie automatycznym do momentu wykrycia wzrostu drobnoustroju. Zgodnie z wytycznymi CLSI, krew po pobraniu wraz ze zleceniem powinna zostać przekazana do pracowni mikrobiologicznej w ciągu 2 godzin, a czas ten nie powinien przekraczać 4 godzin. Im później butelka z krwią trafi do analizatora, tym dłuższy będzie czas do sygnalizacji dodatniego wyniku, co może wydłużyć uzyskanie raportu nawet o 6–12 godzin [29].

Równie ważna jest temperatura transportu i przechowywania. Zbyt niska temperatura może prowadzić do zahamowania wzrostu bardziej wrażliwych bakterii, takich jak *N. meningitidis*, *H. influenzae* czy *S. pneumoniae* [16]. Producenci zwracają uwagę, że „preinkubacja” przed włączeniem do systemu może powodować przejście drobnoustrojów w fazę stacjonarną lub spadkową, co również może skutkować wynikiem fałszywie ujemnym. Nawet przedłużone przechowywanie w temperaturze pokojowej może 2–3-krotnie obniżyć czułość, szczególnie w przypadku bakterii wymagających, takich jak *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* czy *Campylobacter*. Opóźnienia przekraczające 12 godzin istotnie obniżają czułość posiewów i zwiększają ryzyko

wyników fałszywie ujemnych; szacuje się, że 2–5% próbek może w takiej sytuacji pozostać nierozpoznanych [26; 30; 31; 32; 33].

Krew pobraną na posiew u pacjenta z podejrzeniem sepsy należy traktować jako materiał priorytetowy i natychmiast przekazywać do laboratorium. Warto wdrażać rozwiązania logistyczne, które realnie skracają czas od pobrania do rozpoczęcia inkubacji. Skuteczne są m.in. systemy poczty pneumatycznej, organizacja dedykowanych środków transportu dla materiałów „na cito”, całodobowy dostęp do systemów inkubacji czy stosowanie satelitarnych inkubatorów. Takie rozwiązania ograniczają błędy wynikające z transportu, skracają TTP i przyspieszają raportowanie pierwszych wyników [26; 34; 35].

Z perspektywy klinicznej każdy dodatkowy kwadrans zwłoki w transporcie i rozpoczęciu inkubacji należy traktować jako czynnik obniżający wiarygodność diagnostyki i potencjalnie opóźniający wdrożenie terapii celowanej. Dlatego nadzór nad czasem i warunkami transportu powinien stanowić integralną część systemu jakości w diagnostyce mikrobiologicznej zakażeń krwi [23; 36].

### INKUBACJA W AUTOMATYCZNYCH SYSTEMACH POSIEWU KRWI – CZAS DO UZYSKANIA HODOWLI

Zautomatyzowane systemy do posiewu krwi działają w trybie ciągłego monitorowania butelek i sygnalizują dodatnią hodowlę natychmiast po wykryciu zmian parametrów fizykochemicznych zachodzących w podłożu. Standardowe protokoły inkubacji w większości systemów obejmują 5–7 dni. Większość klinicznie istotnych patogenów udaje się jednak wykryć w ciągu pierwszych 24–48 godzin – odpowiada to za 85,3–89,1% wszystkich dodatnich wyników. Ponad 95–98% butelek sygnalizuje wzrost w ciągu 72 godzin. Przedłużanie inkubacji powyżej 5 dni rzadko zwiększa odzysk ważnych patogenów i ma znaczenie głównie w przypadku podejrzenia drobnoustrojów wolnorosnących lub wymagających, takich jak gatunki z grupy HACEK, *Brucella* czy *Bartonella*. U dzieci wykrywalność wielu patogenów już w pierwszych 24 godzinach jest bardzo wysoka, co dodatkowo podkreśla znaczenie sprawnej organizacji pobrania, transportu i rozpoczęcia inkubacji [37; 38].

Czas do uzyskania sygnału dodatniego (TTP) często koreluje z mianem patogenu we krwi w chwili pobrania i może wspierać interpretację wyniku. Krótki TTP (<15–20 godzin) zwykle towarzyszy klinicznie istotnym zakażeniom, natomiast sygnał dodat-

ni pojawiający się po 48 godzinach częściej wskazuje na kontaminację mikrobiotą skóry, zwłaszcza gdy izoluje się gronkowce koagulazo-ujemne lub *Corynebacterium* spp. [16; 28; 39].

Parametr TTP bywa także pomocny w diagnostyce zakażeń związanych z dostępem naczyniowym. Różnica co najmniej dwóch godzin między czasem detekcji w próbce pobranej z cewnika, a czasem detekcji w próbce z krwi obwodowej może wskazywać na zakażenie związane z cewnikiem [40].

**W praktyce laboratoryjnej TTP należy jednak zawsze interpretować w kontekście liczby dodatnich próbek, rodzaju izolowanego drobnoustroju oraz obrazu klinicznego pacjenta. Sam czas sygnalizacji nie powinien być jedyną podstawą rozpoznania, ale stanowi wartościowy wskaźnik wspierający proces diagnostyczny.**

### ETAP ANALITYCZNY – PIERWSZE PROCEDURY PO DODATNIM SYGNALE

Po wykryciu dodatniego sygnału butelka z dodatnim posiewem powinna być niezwłocznie poddana dalszym procedurom diagnostycznym. Pierwsze czynności należy podjąć w ciągu maksymalnie 1 godziny od uzyskania informacji o dodatnim posiewie. Ten etap badania (analityczny) bezpośrednio wpływa na jakość wyniku identyfikacji czynnika etiologicznego i oznaczenia jego lekowrażliwości, co zależy zarówno od zastosowanych metod hodowlanych i molekularnych (dostępność sprzętu diagnostycznego), jak i od poziomu automatyzacji procesu oraz kompetencji personelu [28].

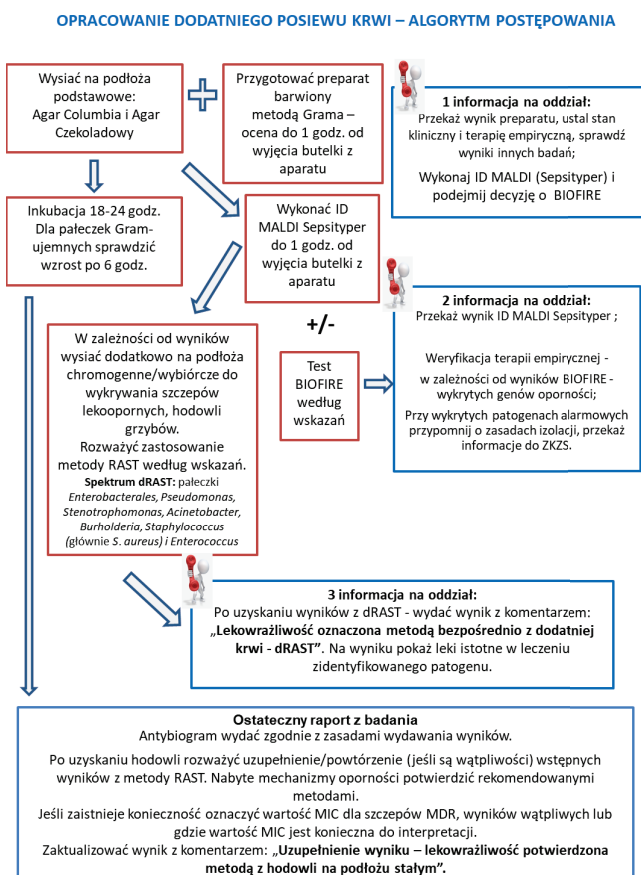
Diagnostyka zakażeń krwi od wielu dekad opiera się na klasycznych metodach mikrobiologicznych, wymagających uzyskania hodowli i dalszej identyfikacji gatunkowej, a następnie wykonania antybiogramu. Proces ten trwa zazwyczaj 24–72 godziny, co w przypadku pacjentów z sepsą stanowi poważne ograniczenie, ponieważ każda godzina opóźnienia we wdrożeniu skutecznej terapii zwiększa ryzyko zgonu.

Współczesne wytyczne zalecają stosowanie szybkich metod diagnostycznych, które umożliwiają wczesne wdrożenie odpowiedniego leczenia. Optymalnym rozwiązaniem jest łączenie klasycznych metod hodowlanych z nowoczesnymi technologiami wspomagającymi. Dobrą praktyką laboratoryjną jest opracowanie algorytmów diagnostycznych, które zapewniają wysoką jakość, powtarzalność i wiarygodność uzyskiwanych wyników. Algorytmy te powinny uwzględniać zarówno potrzeby pacjenta,

jak i sytuację epidemiologiczną szpitala oraz dostępne zasoby sprzętowe [7; 12; 40].

Pierwszym etapem badania pozostaje wykonanie posiewu na podłoża stałe w celu uzyskania czystej hodowli oraz przygotowanie preparatu mikroskopowego barwionego metodą Grama. Procedury te należy przeprowadzać zawsze, niezależnie od stosowania szybkich metod diagnostycznych.

**Rycina 1.** Przykładowy algorytm diagnostyczny opracowania dodatniego posiewu krwi z wykorzystaniem szybkich technologii.



## PREPARAT MIKROSKOPOWY – ROLA BARWIENIA GRAMA W DIAGNOSTYCE ZAKAŻEŃ KRWI

Wykonanie preparatu z dodatniej hodowli krwi jest pierwszym i najszybszym etapem diagnostyki mikrobiologicznej. Procedura ta pozostaje nieodzowna i rutynowa, wciąż stanowiąc podstawowy element diagnostyki posiewów krwi, a jej największą zaletą jest powszechna dostępność.

Barwienie Grama w ciągu kilkunastu–kilkudziesięciu minut pozwala określić podstawowe cechy morfologiczne i strukturalne drobnoustrojów – kształt i układ komórek (np. ziarniaki, pałeczki, gronkowce w skupiskach, paciorkowce w łańcuszkach), a także elementy morfotyczne grzybów drożdżopodob-

nych. Umożliwia również rozróżnienie bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Ocena preparatu stanowi punkt wyjścia do dalszych decyzji diagnostycznych i terapeutycznych. Wynik barwienia może istotnie wpłynąć na modyfikację antybiotykoterapii empirycznej i ukierunkować leczenie jeszcze przed uzyskaniem pełnych wyników identyfikacji [41].

W sytuacjach krytycznych, takich jak sepsa czy wstrząs septyczny, szybka odpowiedź laboratoryjna ma kluczowe znaczenie dla rokowania. W niektórych badaniach wykazano, że decyzje terapeutyczne oparte na barwieniu Grama przyspieszają deeskalację lub eskalację antybiotykoterapii, co poprawia wyniki leczenia i ogranicza rozwój oporności [7; 12; 41]. Choć ocena preparatu może sugerować etiologię, ma swoje ograniczenia – nie pozwala na jednoznaczną diagnozę gatunkową. Etapu tego nie należy jednak pomijać, a kluczowe pozostaje jak najszybsze raportowanie wyniku i bezpośrednia współpraca mikrobiologa z lekarzem prowadzącym, zlecającym badanie lub pełniącym dyżur.

Wynik preparatu determinuje także dalsze decyzje diagnostyczne, wskazując, jakie metody zastosować w kolejnym etapie badań. Ma to szczególne znaczenie w sytuacjach mieszanej etiologii lub przy podejrzeniu kontaminacji próbki. Interpretacja powinna uwzględniać stan kliniczny pacjenta, wyniki badań ogólnych (w tym markerów zapalnych) oraz podejrzanego źródło zakażenia. W tym zakresie niezbędna jest ścisła współpraca klinicysty i mikrobiologa.

W wielu laboratoriach proces barwienia został zautomatyzowany. Automatyczne systemy pozwalają na standaryzację procedury, ograniczenie błędów wynikających z techniki manualnej, oszczędność czasu oraz poprawę bezpieczeństwa personelu poprzez zmniejszenie ekspozycji na odczynniki chemiczne.

Zgodnie z krajowymi zaleceniami preparat barwiony metodą Grama należy wykonać zawsze i z każdej butelki z dodatnim posiewem krwi. Wynik powinien być przekazany lekarzowi prowadzącemu, dyżurnemu lub zlecającemu badanie, a następnie należy podjąć kolejne czynności diagnostyczne. Cały etap powinien być zakończony w ciągu maksymalnie 2 godzin od stwierdzenia przez diagnostę laboratoryjnego dodatniego wyniku hodowli krwi [40].

**Barwienie Grama, mimo swoich ograniczeń, stanowi nieodzowny element diagnostyki sepsy – jego szybkie wykonanie i przekazanie wyniku w ścisłej współpracy mikrobiologa z klinicystą ma bezpośredni wpływ na decyzje terapeutyczne i rokowanie pacjenta.**

## IDENTYFIKACJA CZYNNIKA ETIOLOGICZNEGO – ROLA TECHNOLOGII MALDI-TOF MS I ZESTAWU MBT SEPSITYPER

W tradycyjnym podejściu do diagnostyki zakażeń krwi pełna identyfikacja drobnoustroju oraz oznaczenie jego lekowrażliwości są możliwe dopiero po uzyskaniu czystej hodowli na podłożach stałych, co wydłuża czas diagnostyki o kolejne 24–72 godziny, a w niektórych przypadkach nawet dłużej [28]. W stanach nagłych, takich jak sepsa, opóźnienie to może mieć poważne konsekwencje kliniczne, ponieważ każda godzina zwłoki we wdrożeniu adekwatnej terapii zwiększa ryzyko zgonu. Dlatego konieczne jest włączanie do diagnostyki nowoczesnych technologii, które realnie skracają czas uzyskania wyniku.

Przełomowym osiągnięciem w diagnostyce mikrobiologicznej było wprowadzenie spektrometrii masowej typu MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight). Metoda ta w krótkim czasie zrewolucjonizowała praktykę laboratoryjną, stając się w wielu ośrodkach złotym standardem identyfikacji drobnoustrojów [43]. Najczęściej stosowane platformy to MALDI Biotyper sirius (Bruker) oraz VITEK MS (Biomérieux). Oba systemy charakteryzują się wysoką, porównywalną skutecznością, zwykle przekraczającą 85–90% [42; 47].

Technologia MALDI-TOF identyfikuje drobnoustroje na podstawie ich unikalnego profilu białkowego. Próbką mikroorganizmu poddawana jest działaniu lasera, który jonizuje białka, a następnie analizuje ich czas przelotu w polu elektrycznym. Powstałe widmo masowe porównywane jest z biblioteką referencyjną, co pozwala w ciągu kilkunastu minut precyzyjnie określić gatunek drobnoustroju. Procedura jest prosta, wymaga minimalnego nakładu pracy i dodatkowego sprzętu, a koszt jednostkowy badania pozostaje niski w stosunku do korzyści klinicznych [42; 44].

W praktyce klinicznej spektrometria masowa jest stosowana do identyfikacji drobnoustrojów wyhodowanych na podłożach stałych z pojedynczych kolonii. Takie podejście umożliwia wiarygodną identyfikację nawet w przypadku hodowli mieszanych (jeśli widoczne są w hodowli odrębne kolonie). W określonych sytuacjach klinicznych identyfikacja do poziomu gatunku stanowi cenną wskazówkę przy wyborze właściwej terapii. W diagnostyce sepsy i innych ciężkich zakażeniach możliwe jest także wykorzystanie tzw. „podrostów” („early subcultures”) uzyskanych po 6-8, a nawet 3-4 godzinach inkubacji i poddanych identyfikacji MALDI-TOF MS. Metoda ta, określana również jako

„short-term subculture”, pozwala na wiarygodną identyfikację drobnoustrojów znacznie wcześniej niż w klasycznej hodowli [46; 47; 49]. Takie podejście przy braku innych narzędzi diagnostycznych skraca czas uzyskania informacji o etiologii zakażenia i wspiera szybsze decyzje terapeutyczne.

Szczególnym przełomem było opracowanie metody identyfikacji wykonanej bezpośrednio z butelki z dodatnim posiewem krwi bez konieczności oczekiwania na wzrost drobnoustrojów na podłożach stałych. Najlepiej poznaną i najpowszechniej stosowaną metodą jest Bruker’s MBT Sepsityper. Metoda ta, początkowo dostępna w wersji badawczej (RUO) od 2010 roku, została rozwinięta do formy certyfikowanego systemu IVD. Obecnie oferuje dwa protokoły przygotowania próbek: Rapid Workflow, umożliwiający uzyskanie wyniku już w ciągu 10–15 minut, oraz Standard Workflow, obejmujący etap ekstrakcji białek, który wydłuża analizę do około 30 minut, ale zapewnia wyższą jakość widma i większą skuteczność identyfikacji [44; 46]. Wybór protokołu zależy zwykle od rodzaju drobnoustroju oraz doświadczenia laboratorium.

Oba protokoły są kompatybilne z najczęściej stosowanymi systemami do hodowli krwi: BacT/ALERT (Biomérieux), BACTEC (BD) oraz VersaTREK (Thermo). Istotną zaletą Sepsityper jest również ekonomiczność – koszt pojedynczego badania jest znacząco niższy niż w przypadku paneli molekularnych, co czyni metodę szczególnie atrakcyjną w laboratoriach wykonujących dużą liczbę posiewów krwi.

Zastosowanie MBT Sepsityper pozwala istotnie skrócić czas do identyfikacji drobnoustroju (TTID) – w niektórych przypadkach nawet o 24–72 godziny w porównaniu z klasyczną diagnostyką, szczególnie gdy czynnikiem etiologicznym są drobnoustroje wymagające lub wolnorosnące [49; 50; 51].

W badaniach wykazano, że metoda ta charakteryzuje się bardzo wysoką efektywnością w przypadku bakterii Gram-ujemnych (>90%). Pałeczki Gram-ujemne, takie jak *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* czy *Stenotrophomonas maltophilia*, często odpowiadają za ciężkie zakażenia krwi, zwłaszcza u pacjentów oddziałów intensywnej terapii, dlatego ich szybka identyfikacja może przesądzać o powodzeniu terapii [52].

Identyfikacja bakterii Gram-dodatnich, zwłaszcza paciorkowców i gronkowców koagulazo-ujemnych, jest bardziej wymagająca, a skuteczność oceniana jest na 70–80%. Szczególną

ostrożność należy zachować w przypadku zakażeń wywołanych przez *S. pneumoniae*, który jako gatunek blisko spokrewniony z *Streptococcus mitis/oralis* jest trudny do jednoznacznego różnicowania.

W przypadku grzybów podstawowy protokół osiąga skuteczność na poziomie około 66%, jednak zastosowanie pełnej ekstrakcji pozwala zwiększyć ten wskaźnik do 89–90% [50; 52; 53].

**Tabela 3.** Wskazania do zastosowania testu MBT Sepsityper w diagnostyce zakażeń krwi.

Badanie **Sepsityper** zaleca się wykonać w sytuacjach:

Dodatni sygnał wzrostu w butelce posiewu krwi wymagający szybkiej identyfikacji patogenu (sepsa, wstrząs septyczny).

Pacjent w stanie ciężkim lub krytycznym (OIOM, oddziały onkohematologiczne, noworodki).

Zakażenia związane z cewnikiem, protezami lub urządzeniami medycznymi.

Konieczność wczesnego rozróżnienia zakażenia rzeczywistego od kontaminacji.

Podejrzenie udziału w zakażeniu drobnoustrojów wolnorosnących lub trudnych w hodowli.

Korzyści płynące z zastosowania MBT Sepsityper zostały szeroko udokumentowane w literaturze i potwierdzają jego znaczenie w diagnostyce ciężkich zakażeń krwi.

Rekomenduje się, aby wynik identyfikacji został przekazany lekarzowi maksymalnie w ciągu 2 godzin od wykrycia wzrostu w posiewie krwi. Dane kliniczne potwierdzają, że szybka identyfikacja z wykorzystaniem MBT Sepsityper umożliwia wcześniejszą weryfikację empirycznej antybiotykoterapii, co przekłada się zarówno na deeskalację leczenia, jak i szybsze wdrożenie terapii celowanej. W badaniu Clerc i wsp. zastosowanie MALDI-TOF MS pozwoliło na wczesne wdrożenie terapii celowanej u 42% pacjentów z bakterią wywołaną przez pałeczki Gram-ujemne, w porównaniu do 20% w grupie kontrolnej [53]. Z kolei Morgenthaler i Kostrzewa wskazali na korzyści w postaci redukcji stosowania antybiotyków szerokospektralnych oraz wcześniejszego przejścia do terapii celowanej [51].

W analizach wielośrodkowych wykazano, że czas do zmiany antybiotykoterapii skrócił się średnio o 17 godzin, a odpowiednie leczenie w ciągu pierwszych 24 godzin otrzymało więcej pacjentów. Efektem były m.in. krótsze hospitalizacje (o 2–3 dni) i niższe koszty leczenia. W analizie amerykańskiej wykazano

redukcję kosztów leczenia o 2439 USD na przypadek bakteriemii oraz skrócenie hospitalizacji średnio o jeden dzień (a nawet o 2,5 dnia na oddziale intensywnej terapii) [50; 55].

Doświadczenia szpitala Royal Bolton potwierdziły dodatkowe korzyści – wdrożenie Sepsitypera pozwoliło ograniczyć zużycie antybiotyków dożylnych o 33%, a doustnych o 35%.

W niektórych sytuacjach klinicznych informacja o identyfikacji konkretnego gatunku może bezpośrednio narzucać określone schematy terapeutyczne. Przykładem może być inwazyjne zakażenie wywołane przez *Streptococcus pyogenes* lub *S. maltophilia*. Zróżnicowanie gatunkowe *Enterococcus* stanowi również istotną wskazówkę do ukierunkowanej antybiotykoterapii. Identyfikacja *S. aureus* wymaga natychmiastowego poszukiwania źródła zakażenia i oceny wskazań, na przykład do usunięcia cewnika.

W zakażeniach związanych z cewnikiem lub w infekcyjnym zapaleniu wsierdza czynnikiem etiologicznym mogą być także gatunki trudno rosnące na tradycyjnych podłożach hodowlanych. Przykładem są *Granulicatella spp.* i *Abiotrophia spp.*, które odpowiadają za około 5–6% wszystkich przypadków infekcyjnego zapalenia wsierdza wywoływanych przez paciorkowce [56]. W takich sytuacjach metoda MBT Sepsityper stanowi bardzo cenne narzędzie diagnostyczne.

Pewnym ograniczeniem stosowania MBT Sepsityper jest identyfikacja w przypadku hodowli mieszanych. Doświadczenia wielu ośrodków wskazują, że w takich sytuacjach system zwykle identyfikuje jedynie dominujący szczep. W badaniach Scohy i wsp. identyfikację obu drobnoustrojów uzyskano w 34,3% analizowanych próbek mieszanych, a przynajmniej jednego w 51% przypadków – zwykle był to rzeczywisty patogen, a nie przypadkowa kontaminacja. Co istotne, u 14 pacjentów wykryto drobnoustroje, których nie udało się wyhodować metodami tradycyjnymi [57].

Metoda MBT Sepsityper znajduje również zastosowanie w szybkiej identyfikacji kontaminacji, które mogą prowadzić do błędnych decyzji terapeutycznych i niepotrzebnego stosowania antybiotyków. Identyfikacja mikrobioty skóry z pojedynczego posiewu, przy braku objawów sepsy i czynników ryzyka (np. brak cewnika), może umożliwić szybszą decyzję o odstąpieniu od leczenia [51; 54]. W badaniu Osthoff i wsp. szybka identyfikacja 126 kontaminacji pozwoliła na natychmiastowe wstrzymanie antybiotykoterapii. Zastosowanie MBT Sepsityper wpłynęło na

redukcję ekspozycji na niepotrzebne leczenie nawet o 2 dni oraz ograniczyło zużycie antybiotyków dożylnych o 30–40% [58; 59].

Szybka identyfikacja kontaminacji pozytywnie oddziałuje także na organizację dalszej diagnostyki i racjonalizację wykorzystania kolejnych narzędzi. To właśnie po uzyskaniu wyniku identyfikacji podejmowane są decyzje o wdrożeniu dalszych badań, takich jak testy PCR czy antybiogram metodą RAST, bądź – w przypadku stwierdzenia kontaminacji – o odstąpieniu od dalszej diagnostyki.

System Bruker MBT Sepsityper umożliwia identyfikację drobnoustrojów, nie dostarczając informacji o mechanizmach oporności. W odpowiedzi na tę potrzebę opracowano testy MBT STAR, które pozwalają na szybkie, fenotypowe wykrywanie wybranych mechanizmów oporności:

- MBT STAR-Carba IVD Assay – wykrywa aktywność karbapenemaz (KPC, NDM, VIM, OXA-48) poprzez analizę degradacji imipenemu po inkubacji z izolatami bakterii. Jest to test fenotypowy, wykonywany w czasie poniżej 30 minut, przeznaczony do czystych hodowli.
- MBT STAR-Cepha IVD – umożliwia detekcję hydrolizy cefalosporyn, typowo związanej z obecnością ESBL. Podobnie jak test Carba wymaga czystego izolatu, ale stanowi cenne uzupełnienie klasycznych metod oznaczania lekowrażliwości.

Wszystkie wymienione rozwiązania mogą być stosowane w laboratoriach wyposażonych w technologię Bruker MALDI-TOF jako narzędzia wspierające szybką diagnostykę zakażeń krwi oraz racjonalizację antybiotykoterapii, zwłaszcza w warunkach wysokiej częstości występowania szczepów wielolekoopornych i braku innych technologii [61].

Choć instalacja systemu wiąże się z relatywnie wysokimi kosztami początkowymi, są one rekompensowane niskim kosztem pojedynczego oznaczenia MBT Sepsityper oraz istotnymi korzyściami klinicznymi wynikającymi ze skrócenia czasu diagnostyki i wdrożenia terapii celowanej.

**Podsumowując, zastosowanie MALDI-TOF MS z zestawem MBT Sepsityper umożliwia szybką, wiarygodną i ekonomicznie uzasadnioną identyfikację drobnoustrojów bezpośrednio z dodatknych posiewów krwi. Skrócenie czasu identyfikacji o kilkadziesiąt godzin w porównaniu z klasyczną diagnostyką pozwala na wcześniejsze wdrożenie terapii celowanej, zmniejsza śmiertelność, redukuje zużycie antybiotyków szerokospektralnych oraz obniża koszty leczenia, co czyni tę metodę jednym**

**z najważniejszych narzędzi współczesnej diagnostyki sepsy i walki z lekoopornością.**

### INNE SYSTEMY SPEKTROMETRII MASOWEJ W DIAGNOSTYCE MIKROBIOLOGICZNEJ

Drugą, obok Bruker, platformą wykorzystującą spektrometrię masową w diagnostyce mikrobiologicznej jest VITEK MS (Biomerieux). Istotnym atutem VITEK MS jest możliwość integracji z innymi rozwiązaniami Biomerieux, w szczególności z systemem do hodowli krwi BACT/ALERT VIRTUO oraz aparatem do oznaczania lekowrażliwości VITEK 2. Takie połączenie tworzy spójny ekosystem diagnostyczny, zapewniający płynny przepływ pracy w laboratorium, co znacząco usprawnia i przyspiesza diagnostykę ciężkich zakażeń, w tym sepsy.

W ostatnim czasie firma Biomerieux wprowadziła VITEK MS Blood Culture Kit (BC Kit) – zestaw odczynników przeznaczony do przygotowania próbek z butelek z dodatnim posiewem krwi. Zastosowanie tego rozwiązania umożliwia identyfikację patogenu w ciągu 30–45 minut od sygnału dodatniego, co w praktyce oznacza skrócenie procesu diagnostycznego nawet o 1–2 dni w porównaniu z metodami klasycznymi. Zestaw BC Kit został oficjalnie zwalidowany wyłącznie dla butelek systemu BACT/ALERT (Biomerieux) i jest ograniczony do kilku gatunków drobnoustrojów.

Na polskim rynku diagnostycznym dostępne są również inne rozwiązania oparte na technologii MALDI-TOF, w tym Autof MS 1000 (Autobio Diagnostics, Chiny). System ten, certyfikowany w Unii Europejskiej (CE-IVD), jest coraz częściej wdrażany w laboratoriach mikrobiologicznych jako alternatywa dla platform czołowych producentów. Autof MS 1000 wyróżnia się krótkim czasem analizy, rozbudowaną biblioteką widm obejmującą ponad 30 000 profili oraz opcją identyfikacji drobnoustrojów bezpośrednio z dodatknych posiewów krwi przy zastosowaniu dedykowanych protokołów oczyszczania [62].

Wybór konkretnego systemu zależy przede wszystkim od dotychczasowego wyposażenia laboratorium, wymagań w zakresie integracji z innymi urządzeniami, kosztów eksploatacji oraz preferencji.

### TESTY MOLEKULARNE W DIAGNOSTYCE ZAKAŻEŃ KRWI

Równoległe z rozwojem technologii spektrometrii mas coraz większe znaczenie w diagnostyce zakażeń krwi zyskują testy

molekularne. Większość dostępnych testów, opartych na technikach PCR, znajduje coraz szersze zastosowanie w algorytmach diagnostycznych ciężkich zakażeń, zwłaszcza w przypadku sepsy.

Oznaczenia wykonywane bezpośrednio z butelek z dodatnim posiewem krwi pozwalają na uzyskanie wyników już w ciągu 1–3 godzin, w zależności od zastosowanej metody. Oprócz identyfikacji najważniejszych patogenów testy te umożliwiają również detekcję istotnych genów oporności, co w warunkach narastającej antybiotykooporności — szczególnie w środowisku szpitalnym — ma zasadnicze znaczenie nie tylko dla optymalizacji terapii przeciwdrobnoustrojowej, ale także dla skutecznej kontroli zakażeń szpitalnych. Ich przewagą nad klasycznymi metodami fenotypowymi pozostaje zdecydowanie krótszy czas oczekiwania na wynik, co pozwala na szybsze podejmowanie decyzji terapeutycznych.

Spośród dostępnych w Polsce RMMSP (rapid multiplex molecular syndromic panels) najbardziej rozpowszechniony jest test BioFire. Panel Blood Culture Identification 2 (BCID2, Biomerieux) to zintegrowany system diagnostyczny oparty na technologii multiplex PCR. Umożliwia równoczesną identyfikację 33 patogenów odpowiedzialnych za zakażenia krwi — obejmujących bakterie Gram-dodatnie, Gram-ujemne oraz drożdże — a także detekcję 10 kluczowych genów oporności, takich jak *mecA/C*, *vanA/B*, *blaKPC*, *blaNDM*, *blaOXA-48*, *blaVIM* czy *blaIMP*. Panel BioFire BCID2 wyróżnia się prostotą obsługi, zamkniętą konstrukcją minimalizującą ryzyko kontaminacji oraz pełną automatyzacją, co umożliwia jego wdrożenie również w laboratoriach o ograniczonym doświadczeniu w diagnostyce molekularnej. Wynik uzyskuje się w ciągu 60–90 minut od momentu sygnału o dodatnim posiewie krwi, co oznacza przewagę czasową 24–48 godzin względem tradycyjnych metod mikrobiologicznych.

Test BioFire BCID2 charakteryzuje się bardzo wysoką czułością diagnostyczną we wszystkich głównych grupach drobnoustrojów odpowiedzialnych za zakażenia krwi. W przypadku bakterii Gram-ujemnych, takich jak *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* czy *Enterobacter cloacae* complex, czułość panelu oceniano na poziomie 99–100%, co potwierdzono w badaniach wielośrodkowych i metaanalizach [63; 64].

Równie wysoką skuteczność uzyskano w grupie bakterii Gram-dodatnich. *S. aureus*, *Enterococcus faecalis/faecium*, *S. pneumoniae* oraz *S. agalactiae* były identyfikowane z czułością sięgającą 97–100%, co stanowi istotną poprawę w porów-

naniu z wcześniejszą wersją testu (BCID1) [64; 65; 66].

Panel BCID2 skutecznie identyfikuje również grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Candida*, w tym *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* oraz *C. auris*, osiągając 100% czułości w badaniach walidacyjnych. Ponieważ klasyczne posiewy często opóźniają identyfikację *Candida* spp., zastosowanie panelu w tym obszarze ma szczególne znaczenie kliniczne. [63; 65]

Wysoką skuteczność odnotowano także w zakresie detekcji genów oporności. Markery takie jak *blaCTX-M*, *blaKPC*, *blaNDM*, *mecA/C-MREJ*, *vanA/B* czy *OXA-48-like* były wykrywane z czułością 97–100% [63; 66]. W badaniach wielośrodkowych potwierdzono również wysoką skuteczność panelu BCID2 w diagnostyce zakażeń mieszanych [64; 65].

Zakres panelu BCID2 jest zamknięty, co stanowi jego główne ograniczenie. Należy zachować ostrożność, stosując go jako jedyną metodę identyfikacji dodatniej hodowli krwi, ponieważ nie obejmuje on części istotnych drobnoustrojów. Przykładami są *Citrobacter* spp., *Morganella morganii*, *Burkholderia cepacia* complex oraz większość bakterii beztlenowych (poza *Bacteroides fragilis*). Panel nie identyfikuje również bakterii mikroaerofilnych, takich jak *Campylobacter* spp.

**Tabela 4.** Wskazania do zastosowania paneli multiplex PCR (np. BioFire BCID2) bezpośrednio z dodatniego posiewu krwi.

Badanie multiplex PCR zaleca się wykonać w sytuacjach:

Ciężki stan kliniczny pacjenta, w tym podejrzenie sepsy lub ZOMR.

Wysokie ryzyko zakażenia szczepem opornym:

- kolonizacja szczepem wielolekoopornym,
- zakażenie takim szczepem w ciągu ostatnich 6 miesięcy.

Potrzeba identyfikacji genów oporności, których obecność może wpłynąć na terapię lub działania epidemiologiczne (przy założeniu, że patogen należy do zakresu panelu).

Brak alternatywnych metod identyfikacji patogenu bezpośrednio z dodatniego posiewu krwi.

Wątpliwy lub ujemny wynik MALDI-TOF (Sepsityper).

Mieszana morfologia drobnoustrojów w preparacie Grama.

Ograniczenia dotyczą także detekcji mechanizmów oporności. Test nie wykrywa m.in. cefalosporynaz AmpC, dlatego w przypadku identyfikacji pałeczek będących naturalnymi pro-

ducentami tych enzymów należy zachować szczególną ostrożność przy podejmowaniu decyzji terapeutycznych. Dodatkowo panel nie obejmuje niektórych rzadziej występujących karbapenemaz, np. OXA-23 czy GES.

Wynik badania – obejmujący identyfikację patogenu oraz ewentualne wykrycie markerów oporności – powinien być niezwłocznie zatwierdzony przez diagnostę laboratoryjnego i automatycznie raportowany do systemu HIS (Hospital Information System), a następnie jak najszybciej przekazany telefonicznie lekarzowi prowadzącemu lub dyżurnemu.

W przypadkach, gdy wykrywane są dodatkowo geny oporności, wynik – poza standardowym raportem – powinien być niezwłocznie przekazany telefonicznie zespołowi kontroli zakażeń szpitalnych. Takie sytuacje wymagają zarówno interwencji zespołu kontroli zakażeń, jak i bezpośrednich konsultacji w zakresie dalszej antybiotykoterapii.

Optymalne wykorzystanie tej metody wymaga opracowania, we współpracy z zespołami ds. racjonalnej antybiotykoterapii, jasnych zasad interpretacji wyników oraz komentarzy, które ułatwią wybór właściwego leczenia [68].

Jak pokazują doświadczenia wielu ośrodków, szybkość raportowania wyników ma znaczenie tylko wtedy, gdy natychmiast podejmowane są odpowiednie działania – deeskalacja terapii w przypadku potwierdzenia patogenu wrażliwego lub eskalacja leczenia w razie wykrycia genów oporności. Największe korzyści w zakresie deeskalacji uzyskiwano jedynie wtedy, gdy wynik testu był wspierany interwencją zespołu ds. racjonalnej antybiotykoterapii (ASP), co podkreśla znaczenie ścisłej współpracy pomiędzy diagnostami a klinicystami [69].

W badaniu Piapan i wsp. obejmującym pacjentów z Gram-ujemną bakterią, odstawienie lub zamiana antybiotyków szerokospektralnych była możliwa u 45% chorych, najczęściej dotyczyło to karbapenemów oraz piperacyliny/tazobaktamu [70]. Podobne obserwacje przedstawili Doan i wsp., którzy wykazali skrócenie czasu stosowania antybiotyków szerokospektralnych średnio o 1,3 dnia [71]. Również Babady i wsp. wskazali, że szybkie rozpoznanie *S. aureus* metycylinowrażliwego (MSSA) pozwoliło na zmianę terapii z wankomycyny na cefazolinę, co przełożyło się na lepsze wyniki kliniczne i mniejsze ryzyko działań niepożądanych [72].

Zastosowanie testu BCID2 miało także istotny wpływ na długość hospitalizacji, szczególnie w oddziałach intensywnej tera-

pii. W badaniu Nieto i wsp. pacjenci z gorączką neutropeniczną diagnozowani przy użyciu BCID2 przebywali na OIOM średnio o 2,6 dnia krócej niż w grupie kontrolnej ( $p = 0,03$ ) [67]. Również Banerjee i wsp. odnotowali skrócenie pobytu na intensywnej terapii o 1,7 dnia, jednak efekt ten obserwowano wyłącznie w podgrupie pacjentów, u których decyzje kliniczne podejmowano niezwłocznie po uzyskaniu wyniku [69]. Wyniki te potwierdzono w nowszych badaniach wieloośrodkowych, m.in. Agrawal i wsp. oraz Kitagawa i wsp., którzy wykazali, że szybkie zastosowanie BCID2 wiązało się nie tylko z istotnie wcześniejszym wdrożeniem terapii celowanej, ale także redukcją śmiertelności [73; 74].

W kontekście śmiertelności dostępne dane pozostają niejednoznaczne. W badaniu Nieto i wsp. wykazano istotną redukcję 30-dniowej śmiertelności w grupie diagnozowanej z użyciem BCID2 – z 23,5% do 9,8% ( $p = 0,04$ ) [67]. W pracy Devrim i wsp., obejmującej populację pediatryczną z podejrzeniem sepsy, nie odnotowano zgonów w grupie badanej, podczas gdy w grupie kontrolnej zmarło troje dzieci [75]. Z kolei w badaniu Banerjee i wsp. różnice w śmiertelności nie osiągnęły istotności statystycznej [69]. Autorzy podkreślali, że realny wpływ testu na przeżywalność zależy nie tylko od jego wdrożenia, ale przede wszystkim od szybkości i adekwatności decyzji terapeutycznych podejmowanych na podstawie uzyskanych wyników. W tym kontekście Machado i wsp. zwrócili uwagę, że szczególnie w grupie pacjentów hematologicznych szybka diagnostyka molekularna może przekładać się na istotną poprawę rokowania [76].

Przy wykonywaniu testów multiplex PCR warto zwrócić uwagę na zjawisko określane jako *gene-only detection*, polegające na detekcji genu oporności bez równoczesnej identyfikacji patogenu. Opisywano m.in. przypadki wykrycia genu *mecA/C-MREJ*, odpowiedzialnego za oporność na metycylinę, bez identyfikacji *S. aureus*, a także sytuacje związane z genami *blaCTX-M* czy *vanA/B* [64; 65; 67]. Z klinicznego punktu widzenia może to prowadzić do fałszywego zakwalifikowania izolatu jako MRSA, ESBL lub VRE, zwłaszcza jeśli wynik nie zostanie właściwie skorelowany z obrazem klinicznym i dalszą diagnostyką.

Możliwe przyczyny takiej sytuacji obejmują obecność patogenu spoza panelu, zbyt niski poziom bakterii w próbce (poniżej progu wykrywalności identyfikacyjnej), kolonizację – np. *Staphylococcus epidermidis* niosącego gen *mecA* – lub obecność resztkowego DNA po zneutralizowanych komórkach. Warto również

podkreślić, że detekcja genu nie zawsze jednoznacznie przekłada się na fenotypową oporność. Dlatego interpretacja wyników BCID2 powinna odbywać się z pełną świadomością ograniczeń testu i w ścisłej korelacji z obrazem klinicznym oraz wynikami klasycznych metod diagnostycznych [68].

Wyniki badań PCR należy traktować jako narzędzie wspomagające podejmowanie szybkich decyzji klinicznych, jednak ostateczna weryfikacja skuteczności terapii musi być zawsze uzupełniona klasycznym antybiogramem (AST), który pozostaje złotym standardem oceny wrażliwości na antybiotyki. Błędna interpretacja zjawiska *gene-only detection* może prowadzić do nieuzasadnionej eskalacji terapii antybiotykowej, zwiększając ryzyko działań niepożądanych i selekcji szczepów opornych.

Pewnym ograniczeniem paneli PCR są wysokie koszty, dlatego szczególnie istotne jest ich racjonalne wykorzystanie. W tym celu należy opracować jasne zasady kwalifikacji pacjentów do badania oraz reguły interpretacji wyników, powiązane zarówno ze schematami leczenia, jak i procedurami kontroli zakażeń. Zgodnie z zaleceniami polskiej grupy ekspertów, wykonanie testu należy rozważyć przede wszystkim u pacjentów w ciężkim stanie klinicznym – z podejrzeniem sepsy lub wstrząsu septycznego – a także przy podejrzeniu zakażenia ośrodkowego układu nerwowego (ZOMR), u chorych obarczonych wysokim ryzykiem infekcji wielolekoopornych oraz u osób z wywiadem kolonizacji lub zakażenia szczepami lekoopornymi. Dodatkowym wskazaniem do zastosowania testu są sytuacje, gdy wynik identyfikacji metodą MBT Sepsityper pozostaje niejednoznaczny lub niedostępny, a barwienie metodą Grama sugeruje zakażenie mieszane. Czynnikiem decydującym o szybkim wdrożeniu tej metody może być również sytuacja epidemiologiczna wymagająca pilnej identyfikacji i kontroli szczepów wielolekoopornych, takich jak MRSA, VRE, KPC czy NDM [41].

**Test BioFire BCID2 stanowi nowoczesne narzędzie diagnostyczne, które dzięki szybkości, prostocie i wysokiej skuteczności identyfikacji patogenów oraz genów oporności istotnie wspiera optymalizację terapii przeciwdrobnoustrojowej i kontrolę zakażeń szpitalnych.**

### ROZWÓJ TESTÓW RMMSP W DIAGNOSTYCE SEPSY

Wprowadzenie testów RMMSP (rapid multiplex molecular syndromic panels) z dodatnich posiewów krwi do standardu diagnostycznego sepsy i bakteriemii przynosi wymierne ko-

rzyści kliniczne, epidemiologiczne i ekonomiczne. Szczególnie w ośrodkach z dużym udziałem szczepów opornych, takich jak MRSA, VRE czy KPC/NDM, stanowią one nieodzowny element diagnostyki w dobie kryzysu antybiotykowego.

Rozwój technik molekularnych skutkuje coraz szerszą dostępnością tego typu narzędzi. Jednym z przykładów jest system eazyplex (Amplex Diagnostics), oparty na technologii izotermicznej amplifikacji DNA (LAMP), który pozwala na uzyskanie wyniku już w ciągu 30 minut od izolacji próbki z dodatniej butelki. Panele dostępne w systemie umożliwiają szybką detekcję kluczowych genów oporności, takich jak *blaKPC*, *blaNDM*, *blaOXA-48*, *blaVIM*, *blaIMP*, *CTX-M*, a także *mecA/C* i *vanA/B*. W odróżnieniu od bardziej złożonych systemów (np. BioFire), test ten nie identyfikuje patogenu, lecz jedynie mechanizmy oporności, przez co pełni funkcję uzupełniającą wobec szybkiej identyfikacji metodą MALDI-TOF. System eazyplex oferuje również panele dedykowane diagnostyce innych postaci zakażeń, w tym OUN (ośrodkowy układ nerwowy). Do zalet tego testu należą nie tylko szybkość, ale także prostota wykonania, niskie wymagania sprzętowe i możliwość wdrożenia w laboratoriach o średnim stopniu referencyjności.

Co raz częściej wdrażane są również rozwiązania, które umożliwiają detekcję patogenów nie tylko z dodatnich hodowli, ale także bezpośrednio z krwi pełnej. Przykładem jest Bioeksen Sepsis Panel (Bioeksen Ar-Ge Technologies), obecnie dostępny w Europie i Polsce w fazie pilotażowej. Obejmuje on szeroki zakres podstawowych patogenów Gram-dodatnich, Gram-ujemnych i grzybów drożdżopodobnych, a także genów oporności: *mecA/C*, *vanA/B*, *blaKPC*, *blaNDM*, *blaOXA-48*, *blaVIM*, *blaIMP*. Czas uzyskania wyniku wynosi około 90–120 minut.

Innym przykładem takich rozwiązań są min. SeptiFast / SeptiFast LightCycler (Roche) oparty na metodzie multiplex PCR lub T2Bacteria / T2Candida (T2 Biosystems, USA), w którym detekcja odbywa się metodą rezonansu magnetycznego T2 (T2MR) połączonego z identyfikacją DNA po amplifikacji PCR i wiązaniu z nanocząstkami (system do niedawna był dostępny w również Polsce - obecnie wstrzymano dostawy testów). W wysokospecjalistycznych ośrodkach wykorzystywane są również metody sekwencjonowania DNA w czasie rzeczywistym i analiza metagenomiczna z pełnej krwi. Większość tego typu technologii jest nadal w fazie badań klinicznych, wymaga wyspecjalizowanego

laboratorium i jest bardzo kosztowna.

## ZNACZENIE SZYBKICH PANELI MOLEKULARNYCH RMMSP W NOWOCZESNEJ DIAGNOSTYCE

W ostatnich latach szybkie panele molekularne typu RMMSP zyskały szczególne znaczenie w diagnostyce różnych postaci zakażeń — nie tylko bakteriemii i sepsy, lecz także zapaleń płuc czy zakażeń ośrodkowego układu nerwowego. Eksperci podkreślają, że narzędzia te nie zastępują klasycznej mikrobiologii opartej na hodowli, lecz powinny pełnić funkcję uzupełniającą i wspierającą proces diagnostyczny. Kluczowa pozostaje właściwa interpretacja wyników, która powinna być powierzona doświadczonemu mikrobiologowi klinicznemu w ramach szeroko rozumianego programu *diagnostic stewardship* [68].

RMMSP powinny być wdrażane jako element nowoczesnych algorytmów diagnostycznych, z uwzględnieniem kosztów, ograniczeń i lokalnej sytuacji epidemiologicznej. Ich największą wartością pozostaje krótszy czas do rozpoznania oraz możliwość detekcji markerów oporności, co wspiera racjonalizację antybiotykoterapii, obniża śmiertelność i poprawia bezpieczeństwo pacjentów, zwłaszcza gdy wyniki są natychmiast integrowane z interwencjami zespołów AMS. Skuteczność tego podejścia zależy od organizacji pracy: szybkie przekazanie raportu, natychmiastowa konsultacja mikrobiologiczna oraz spójność zaleceń antybiotykowych z polityką szpitalną i aktualną epidemiologią zakażeń.

## SZYBKE METODY OZNACZANIA LEKOWRAŻLIWOŚCI (RAST) W DIAGNOSTYCE ZAKAŻEŃ KRWI

Kolejnym etapem w algorytmie diagnostyki mikrobiologicznej zakażeń, po uzyskaniu identyfikacji czynnika etiologicznego, jest oznaczenie jego lekowrażliwości, czyli wykonanie antybiogramu. W ostatnich latach także w tym obszarze dokonał się istotny postęp technologiczny, umożliwiający przeprowadzenie oznaczeń bezpośrednio z butelek z dodatnim posiewem krwi, bez konieczności oczekiwania na wzrost hodowli na podłożach stałych. Pozwala to zaoszczędzić kolejne kilkanaście godzin.

Obecnie dostępnych jest kilka metod RAST (Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing) – od manualnej metody krążkowo-dyfuzyjnej opracowanej przez EUCAST, po komercyjne systemy automatyczne. Wszystkie umożliwiają uzyskanie wyników w czasie 4–8 godzin od detekcji wzrostu w butelce.

Eksperci podkreślają, że w leczeniu sepsy kluczowy jest czas – każda godzina opóźnienia we wdrożeniu skutecznej antybiotykoterapii zwiększa ryzyko zgonu. Zastosowanie RAST pozwala skrócić czas do wdrożenia terapii celowanej nawet o 24–48 godzin w porównaniu z klasyczną mikrobiologią. Dzięki temu możliwe jest szybsze zredukowanie lub zmiana antybiotykoterapii, co zmniejsza ryzyko rozwoju oporności i powikłań. Z tego względu wdrożenie szybkich metod oznaczania lekowrażliwości uznaje się za kluczowy element diagnostyki zakażeń krwi i sepsy.

**Tabela 5.** Wskazania do wykorzystania metody RAST (np. dRAST) do oznaczania lekowrażliwości bezpośrednio z butelki z dodatnim posiewem krwi.

Badanie RAST zaleca się wykonać:

dla pacjentów w ciężkim stanie klinicznym, immunosupresją lub hospitalizowanych w OIT,

w zakażeniach wywołanych drobnoustrojami o istotnym znaczeniu klinicznym (*Enterobacterales*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*)

przy konieczności wczesnej eskalacji lub deeskalacji terapii po wstępnej identyfikacji (np. MALDI-TOF, BCID2),

przy podejrzeniu obecności mechanizmów oporności (ESBL, KPC, NDM, MRSA, VRE),

w ramach programu AMS – dla szybkiej optymalizacji antybiotykoterapii.

Metoda EUCAST Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing (RAST) została opracowana przez EUCAST jako fenotypowe, szybkie badanie lekowrażliwości bezpośrednio z butelki z dodatnim posiewem krwi. Jest to zmodyfikowana wersja klasycznej metody dyfuzyjno-krążkowej, która dzięki skróconemu czasowi inkubacji (odczyty po 4, 6, 8 godzinach) pozwala znacznie szybciej uzyskać wyniki w porównaniu z tradycyjnym antybiogramem, wymagającym 18–24 godzin inkubacji [77]. Metoda ta nie wymaga dodatkowego sprzętu ani kosztownych technologii i może być wdrożona w każdym laboratorium mikrobiologicznym. Wymaga jednak ścisłego przestrzegania protokołów EUCAST, szczególnie w zakresie czasu inkubacji (odczyt tylko po 4/6/8 h – nie później!) oraz odczytu stref zahamowania wzrostu (inna interpretacja niż w klasycznym AST). Ma również pewne ograniczenia – nie może być zastosowana do wszystkich drobnoustrojów [77].

W wielu publikacjach potwierdzono jej wiarygodność i zgodność na poziomie 96–98% w porównaniu z metodami klasycznymi, zwłaszcza dla pałeczek Gram-ujemnych, przy niskim odsetku błędów krytycznych (<2%). Potwierdzono również skuteczność w wykrywaniu mechanizmów typu ESBL oraz karbapenemaz [78; 79].

W wielu ośrodkach RAST EUCAST wdrażany jest w sposób selektywny – dla wybranych drobnoustrojów i antybiotyków o kluczowym znaczeniu klinicznym (np. ceftriakson, meropenem, piperacylina/tazobaktam). W jednym z badań wykazano, że dzięki zastosowaniu RAST możliwa była modyfikacja antybiotykoterapii u blisko 80% pacjentów, głównie poprzez de-eskalację. Metoda ta pozwoliła na redukcję stosowania karbapenemów oraz skrócenie czasu raportowania wyników średnio o 41,5 godziny [80].

Metoda EUCAST RAST jest wiarygodna, tania i możliwa do włączenia w rutynową diagnostykę mikrobiologiczną, co może poprawić rokowanie pacjentów i wspierać politykę antybiotykową.

Dużym wsparciem w diagnostyce sepsy są komercyjne systemy zamknięte umożliwiające oznaczanie lekowrażliwości w trybie RAST. Jednym z najbardziej rozpowszechnionych jest QuantaMatrix dRAST (QMAC-dRAST, *direct Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing*). Jest to zautomatyzowany system fenotypowy, który pozwala na bezpośrednie oznaczanie lekowrażliwości bakterii z dodatnich posiewów krwi. Wykorzystuje on technologię mikroprzepływową oraz obrazowanie mikroskopowe wzrostu bakterii w obecności antybiotyków, co umożliwia uzyskanie wyników w ciągu 5–7 godzin, podczas gdy klasyczne metody (mikrorozcieńczenia w bulionie, systemy automatyczne VITEK 2 i Phoenix) wymagają zwykle 24–48 godzin [81; 82].

System dedykowany jest najczęstszym patogenom odpowiedzialnym za sepsę, takim jak *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. aureus* oraz *Enterococcus spp.*. Panele obejmują kluczowe antybiotyki stosowane w terapii zakażeń krwi, m.in. karbapenemy, cefalosporyny, glikopeptydy, linezolid czy piperacylinę/tazobaktam. Interpretacja wyników odbywa się zgodnie z zaleceniami EUCAST, wspierana przez system ekspercki. Aparat dRAST jest kompatybilny z butelkami większości systemów do posiewu krwi (BACTEC, BacT/ALERT) oraz ma możliwość integracji z systemem LIS, co czyni go praktycznym rozwiązaniem dla laboratoriów szpitalnych [83].

W licznych badaniach klinicznych potwierdzono wysoką zgodność wyników dRAST z metodami referencyjnymi. Strauss i wsp. analizując 227 izolatów z dodatnich posiewów krwi (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis*) uzyskali zgodność 97,4% dla pałeczek Gram-ujemnych i 95,8% dla ziarenkowców Gram-dodatnich, przy bardzo niskim odsetku fałszywych wyników wrażliwości (VME <1%). Średni czas do uzyskania antybiogramu wynosił jedynie 5,3 godziny [84]. Podobne rezultaty przedstawili Rosselin i wsp. którzy dla 250 próbek dodatnich posiewów krwi odnotowali zgodność w zakresie 91–95% w zależności od grupy patogenów, a mediana czasu do wyniku wynosiła 6,7 godziny [81]. Morecchiato i wsp. po analizie 100 szczepów stwierdzili ogólną zgodność na poziomie 92,5% w porównaniu z referencyjną metodą mikrorozcieńczeń w bulionie. Choć w około 16% przypadków wartości MIC różniły się od uzyskanych metodą referencyjną, nie miało to wpływu na kategoryzację kliniczną, a tym samym na decyzje terapeutyczne. Średni czas uzyskania wyniku wynosił 6 godzin [82].

System QMAC-dRAST wykazuje także wysoką wiarygodność w wykrywaniu kluczowych mechanizmów oporności. Badania potwierdzają jego skuteczność w identyfikacji fenotypu ESBL u pałeczek Gram-ujemnych oraz w detekcji oporności na karbapenemy u szczepów *K. pneumoniae* i *Acinetobacter spp.* [82]. Wysoką czułość i swoistość (87,5–100%) uzyskano także w klasyfikacji szczepów MRSA i VRE, przy bardzo niskim odsetku błędów krytycznych. [81; 85; 86]. Dzięki temu dRAST umożliwia szybkie rozpoznanie najistotniejszych mechanizmów oporności nawet w sytuacji, gdy diagnostyka nie jest wspierana testami molekularnymi (PCR).

Największą zaletą systemu jest jego bezpośredni wpływ na politykę antybiotykową. Wyniki dostępne jeszcze tego samego dnia umożliwiają ograniczenie stosowania leków o szerokim spektrum (karbapenemy, glikopeptydy), wspierając racjonalną terapię celowaną. Doświadczenia wielu ośrodków wskazują, że zastosowanie QMAC-dRAST przyspiesza wdrożenie terapii celowanej, skraca hospitalizację i zmniejsza ryzyko niepotrzebnej ekspozycji na antybiotyki o szerokim spektrum działania. Badanie Kim T.Y. i wsp. wykazało, że wdrożenie dRAST do algorytmu diagnostycznego pozwoliło skrócić czas do modyfikacji terapii średnio o 21,6 godziny, zmniejszyć stosowanie antybiotyków szerokospektralnych oraz zwiększyć zgodność terapii z lokalnymi wytycznymi AMS (78% vs. 62% przed wdrożeniem) [87].

Do ograniczeń systemu należy brak możliwości samodzielnej identyfikacji drobnoustrojów, która musi być prowadzona równoległe – na przykład metodą Sepsityper, PCR lub MALDI-TOF po uzyskaniu wzrostu na podłożach stałych. Ponadto dRAST nie pozwala na oznaczanie lekowrażliwości paciorkowców, bakterii beztlenowych ani grzybów. Istotną barierą pozostaje także koszt badania, wyższy niż w przypadku klasycznych metod AST.

Choć wdrożenie dRAST wymaga inwestycji w sprzęt oraz szkolenie personelu, rosnąca liczba ośrodków – również w Polsce – potwierdza, że korzyści kliniczne przewyższają te ograniczenia. Przy właściwej integracji z algorytmem diagnostycznym, zwłaszcza w połączeniu z szybką identyfikacją metodą MALDI-TOF, system ten może stać się kluczowym elementem nowoczesnej diagnostyki sepsy, realnie wspierając decyzje kliniczne i racjonalizację antybiotykoterapii.

Kolejnym systemem automatycznym, który może być wsparciem w metodach RAST jest VITEK REVEAL (Biomérieux). Jest to nowoczesny, zautomatyzowany system fenotypowego oznaczania lekowrażliwości, który wykorzystuje mikroskopię cyfrową w czasie rzeczywistym i algorytmy analizy wzrostu bakterii w obecności antybiotyków, co pozwala na uzyskanie wyników w ciągu 4–7 godzin od sygnału dodatniego. Stanowi to istotne skrócenie w porównaniu z tradycyjnymi metodami (24–48 godzin) i jest najszybszą dostępną metodą RAST [88]. Działanie systemu VITEK REVEAL wymaga spełnienia określonych parametrów technicznych. Analiza możliwa jest tylko przy odpowiednim poziomie inokulum, gwarantującym prawidłową ocenę mikroskopową wzrostu bakterii w obecności antybiotyków. Obecnie system obsługuje przede wszystkim pałeczki Gram-ujemne, a jego skuteczność w odniesieniu do Gram-dodatnich i innych drobnoustrojów jest przedmiotem dalszej walidacji. Test przeznaczony jest do pracy z dodatnimi butelkami posiewów krwi, przede wszystkim z systemu BacT/ALERT (Biomérieux), z którymi został zwalidowany. Najbardziej sprawdzi się w laboratoriach, które już posiadają infrastrukturę bioMérieux (np. VITEK 2, VITEK MS, BacT/ALERT).

W badaniach klinicznych system wykazał bardzo wysoką zgodność z metodami referencyjnymi. Snyder i wsp. raportowali całkowitą zgodność dla >96% dla pałeczek Gram-ujemnych (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*), przy bardzo niskim odsetku błędów krytycznych VMEs <1%, a średni czas uzyskania pełnego raportu AST wyniósł 5,5 godziny. Wyniki mogły zostać wykorzystane do wczesnych decyzji terapeutycznych w ponad 90% przy-

padków [88]. Podobne obserwacje przedstawili Shalom i wsp., którzy oceniali VITEK REVEAL w porównaniu z systemem VITEK 2 dla szczepów produkujących karbapenemazy (NDM) i *A. baumannii*. Uzyskano bardzo dobrą zgodność z klasycznym AST, przy jednoczesnym znacznym skróceniu czasu otrzymania do raportu z badania [89].

VITEK REVEAL stanowi obiecujące narzędzie w diagnostyce sepsy wywołanej przez pałeczki Gram-ujemne. Pozwala na szybkie i wiarygodne oznaczenie lekowrażliwości bez konieczności izolacji szczepu. Wysoka zgodność z metodami referencyjnymi, niska częstość błędów krytycznych i istotne skrócenie czasu do uzyskania wyniku wskazują, że system ten może znacząco wspierać decyzje terapeutyczne, przyspieszać wdrożenie terapii celowanej oraz wzmacniać programy racjonalnej antybiotykoterapii.

W kategorii technologii wspomagających szybką diagnostykę sepsy warto wspomnieć o jednym z najlepiej przebadanych narzędzi jakim jest Accelerate Pheno System (Accelerate Diagnostics, Inc.). Jest to w pełni zautomatyzowane urządzenie umożliwiające równoczesne wykonanie identyfikacji drobnoustroju (ID) i fenotypowego oznaczenia lekowrażliwości (AST) bezpośrednio z butelki z dodatnim posiewem krwi. System łączy technologię fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) do identyfikacji patogenów z analizą morfokinetyczną komórek (Morphokinetic Cellular Analysis – MKA), która ocenia wzrost bakterii w obecności antybiotyków w czasie rzeczywistym. Pełny raport ID + AST dostępny jest w czasie 6,5–7 godzin [90]. Zakres wykrywanych patogenów obejmuje najczęstsze pałeczki Gram-ujemne (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*), ziarenkowce Gram-dodatnie (*S. aureus*, *E. faecalis*, *S. pneumoniae*) oraz wybrane grzyby drożdżopodobne (*C. albicans*). Panel leków pozwala na oznaczenie wrażliwości m.in. na karbapenemy, cefalosporyny, glikopeptydy i aminoglikozydy. W metaanalizie Simner i wsp. system wykazał ≥95% zgodności kategoryjnej (CA) z metodami referencyjnymi (mikrorozcieńczenia w bulionie, VITEK 2), przy bardzo niskim odsetku błędów krytycznych (VME <1,5%) [90].

Wpływ kliniczny Accelerate Pheno został potwierdzony również w wielu badaniach. Marsilio i wsp. oraz Timbrook i wsp. wykazali, że wdrożenie systemu skracało średni czas do modyfikacji terapii przeciwdrobnoustrojowej o 24–36 godzin w porównaniu z algorytmem konwencjonalnym oraz umożliwiało wdrożenie terapii celowanej średnio 10–15 godzin szybciej. Zastosowanie systemu wiązało się także ze zmniejszeniem zużycia karbape-

nemów i antybiotyków o szerokim spektrum oraz – w niektórych ośrodkach – z obniżeniem śmiertelności w przebiegu sepsy o 10–20% i skróceniem hospitalizacji o 1–3 dni. Efekty te były szczególnie widoczne tam, gdzie wyniki były bezpośrednio wykorzystywane przez zespoły *Antimicrobial Stewardship* (AMS) [91; 92; 93].

Ograniczenia Accelerate Pheno obejmują wysoki koszt zakupu i eksploatacji, konieczność przeszkolenia personelu oraz zamknięty panel ID/AST, który nie obejmuje wszystkich drobnoustrojów (np. *S. maltophilia* i niektórych rzadkich gatunków pałeczek *Enterobacterales*) [93].

Mimo kosztów i ograniczeń panelu, jego wartość kliniczna została wielokrotnie potwierdzona w badaniach wieloośrodkowych i metaanalizach, co czyni go kluczowym elementem nowoczesnej diagnostyki zakażeń krwi. Może zatem stanowić wsparcie w laboratoriach, które nie mają innych metod z zakresu szybkiej diagnostyki mikrobiologicznej (MALDI TOF, PCR).

Wyniki uzyskane metodą RAST, np. przy użyciu systemów takich jak dRAST, cechują się wysoką wiarygodnością i w więk-

szości przypadków nie wymagają dodatkowego potwierdzenia, jeśli nie budzą wątpliwości. Powinny być one niezwłocznie przekazywane lekarzowi prowadzącemu, dyżurnemu lub zlecającemu badanie, aby umożliwić szybkie podjęcie decyzji terapeutycznych. Powtórne oznaczenie jest zalecane jedynie w sytuacjach nietypowych – przy wykryciu rzadkich fenotypów oporności, uzyskaniu wartości w zakresie ATU (area of technical uncertainty) lub w przypadku braku korelacji z genotypem oporności. W takich sytuacjach możliwe jest uzupełnienie wyniku badaniem klasycznym z izolatu hodowlanego, z obowiązkiem przekazania informacji o korekcie lekarzowi [41].

Natomiast komitet EUCAST dla metody RAST zaleca potwierdzenie wyników pełnym badaniem AST z wyhodowanego izolatu. Dodatkowo, gdy strefy zahamowania wzrostu znajdują się w obszarze niepewności, wynik nie powinien być interpretowany ani raportowany. Zgodnie z zaleceniami EUCAST wszystkie wyniki RAST powinny być jednoznacznie oznaczane jako „wstępne” lub „na podstawie RAST”, aby odróżnić je od końcowego antybiogramu [77].

**Tabela 6.** Porównanie metod klasycznej diagnostyki mikrobiologicznej i szybkich metod w diagnostyce zakażeń krwi.

Metoda diagnostyczna	Czas uzyskania wyniku	Zakres zastosowania	Zalety	Ograniczenia
Klasyczna mikrobiologia (hodowla na podłożach stałych + identyfikacja + AST)	24–72 godz.	Złoty standard diagnostyki, pełna identyfikacja i lekowrażliwość.	Wysoka wiarygodność, możliwość wykonania antybiogramu i oznaczenia wartości MIC (minimalne stężenia antybiotyków hamujące wzrost drobnoustrojów).	Długi czas oczekiwania, ograniczona użyteczność w terapii empirycznej.
MALDI-TOF z zestawem MBT Sepsityper	30–60 min od sygnału o dodatnim posiewie krwi	Bezpośrednia identyfikacja z dodatnich posiewów krwi.	Znaczne skrócenie TTID, niskie koszty, szeroka biblioteka widm, znaczący wpływ na antybiotykoterapię empiryczną.	Trudności przy mieszanych hodowlach, mniejsza skuteczność dla ziarenkowców Gram(+), grzybów drożdżopodobnych.
Testy molekularne (multiplex PCR – RMMSP)	1–3 godz. od sygnału o dodatnim posiewie krwi	Identyfikacja patogenów i genów oporności z dodatnich posiewów krwi.	Szybki wynik ID, detekcja mechanizmów oporności, znaczący wpływ na antybiotykoterapię empiryczną.	Wysoki koszt, zamknięty panel drobnoustrojów i mechanizmów oporności.
Testy RAST (Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing)	4–8 godz. od sygnału o dodatnim posiewie krwi	Szybkie oznaczenie lekowrażliwości bezpośrednio z dodatnich posiewów krwi.	Przyspieszenie decyzji terapeutycznych, wybór terapii celowanej.	Ograniczona dostępność automatyzacji, wymaga doświadczenia.

## ETAP POANALITYCZNY – WŁAŚCIWA INTERPRETACJA WYNIKU

Wprowadzenie nowoczesnych technologii diagnostycznych w sepsie ma sens jedynie wtedy, gdy uzyskany wynik jest w sposób czytelny i niezwłoczny przekazywany klinicystom.

Istotnym elementem nowoczesnej diagnostyki jest wdrażanie elektronicznych systemów raportowania i automatycznych alertów, które umożliwiają szybsze podejmowanie decyzji klinicznych. Na tym etapie kluczową rolę odgrywa część poanalityczna. Wynik powinien być czytelny, zrozumiały i opatrzony komentarzem adekwatnym do izolowanego czynnika etiologicznego oraz wykrytych mechanizmów oporności. Raport powinien uwzględniać najważniejsze w danej sytuacji antybiotyki, a kaskadowe prezentowanie antybiogramów stanowi ważny element polityki antybiotykowej szpitala. Prezentacja wyników powinna być oparta na zaleceniach ekspertów, ale także wypracowana lokalnie – we współpracy z zespołami zarządzającymi antybiotykami (AMS), z uwzględnieniem sytuacji epidemiologicznej oraz profilu pacjentów. Ostatecznie to właśnie odpowiednia interpretacja wyniku, osadzona w kontekście klinicznym i epidemiologicznym, decyduje o jego rzeczywistej wartości [41; 94; 95].

Opracowanie algorytmów diagnostycznych, dostosowanych do dostępnych narzędzi i potrzeb danej jednostki, pozwala nie tylko na racjonalizację kosztów badań, ale także na ujednoczenie zasad pracy laboratoriów co realnie podnosi standard świadczonych usług.

Diagnostyka mikrobiologiczna powinna stanowić bezpośrednie wsparcie kliniki, a kluczowe znaczenie ma ścisła współpraca diagnostów z lekarzami prowadzącymi. Elastyczna organizacja pracy laboratorium, system dyżurów umożliwiający szybkie wydanie wyniku oraz kontakt telefoniczny znacząco poprawiają komunikację. Dodatkowym wsparciem jest zintegrowany system informatyczny, który łączy wszystkie urządzenia i przesyła dane do HIS, zapewniając płynność i bezpieczeństwo raportowania.

Sposób raportowania wyników, czyli etap poanalityczny, ma bezpośredni wpływ na proces leczenia pacjenta. Tylko dzięki ścisłej współpracy mikrobiologa z zespołem klinicznym możliwe jest szybkie i właściwe wykorzystanie nowych technologii dla dobra chorego – poprzez wczesne wdrożenie terapii celowanej, racjonalne zarządzanie antybiotykami i skuteczną ochronę dostępnych opcji terapeutycznych w erze narastającej oporności [94; 95].

**Szybki wynik ma wartość tylko wtedy, gdy jest zrozumiały i prowadzi do właściwej terapii.**

## PODSUMOWANIE

Diagnostyka mikrobiologiczna zakażeń krwi i sepsy w dobie narastającej oporności drobnoustrojów wymaga kompleksowego podejścia obejmującego wszystkie etapy badania. Kluczowe znaczenie ma wysoka jakość etapu przedanalitycznego (prawidłowy moment i technika pobrania krwi, objętość próbki), jak najszybsze rozpoczęcie badania (szybki transport w odpowiednich warunkach), zastosowanie systemów automatycznych i odpowiednich butelek, szybka interpretacja preparatu mikroskopowego oraz wykorzystanie nowoczesnych metod identyfikacji (MALDI-TOF, panele PCR). Dopełnieniem są szybkie metody oznaczania lekowrażliwości, które pozwalają skrócić czas uzyskania wyniku z kilku dni do kilku godzin. Tylko takie zintegrowane postępowanie umożliwia skuteczne leczenie pacjenta z sepsą oraz realną kontrolę narastania lekooporności.

Znaczenie szybkiej diagnostyki jest szczególnie widoczne w Polsce, gdzie – podobnie jak w wielu krajach Europy – obserwuje się niepokojące trendy epidemiologiczne. Śmiertelność pacjentów OIT z sepsą sięga około 25%, a wśród patogenów krwi coraz częściej wykrywa się szczepy wielooporne: *K. pneumoniae* z karbapenemazami KPC i NDM, *E. coli* oporną na cefalosporyny i fluorochinolony czy *E. faecium* oporne na wankomycynę (VRE). [96].

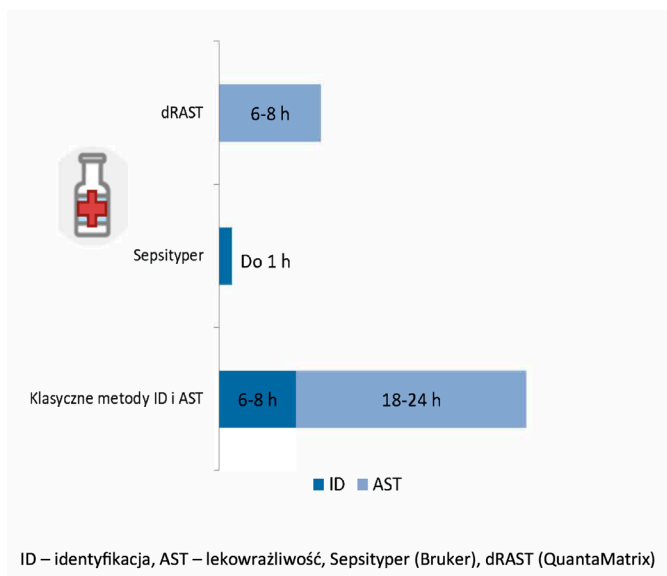
Korzyści z wdrożenia nowoczesnych technologii do diagnostyki ciężkich zakażeń są wielowymiarowe: wcześniejsze wdrożenie terapii celowanej, obniżenie śmiertelności i ryzyka powikłań, ograniczenie stosowania antybiotyków szerokospektralnych, zapobieganie transmisji szczepów alarmowych. Dzięki mniejszemu zużyciu drogich leków rezerwowych, krótszym pobytom na oddziałach intensywnej terapii można uzyskać realną redukcję kosztów hospitalizacji.

Warto pamiętać, że ważną rolę w tym procesie odgrywa także przygotowanie i doskonalenie personelu pobierającego krew na posiew. Badania wykazują, że szkolenia, audyty i informacja zwrotna mogą zredukować odsetek kontaminacji nawet o połowę [18]. Przekłada się to na większą wiarygodność wyników, ograniczenie niepotrzebnej antybiotykoterapii i realne oszczędności.

Podsumowując, tylko inwestycja w każdy etap diagnostyki – od pobrania materiału, przez automatyczne systemy hodowli i szybkie metody ID/AST, po właściwą interpretację wyników – zapewnia skuteczną walkę z sepsą i narastającą opornością drobnoustrojów. To podejście, oparte na współpracy laborato-

riów z zespołami klinicznymi i AMS, stanowi nie tylko gwarancję lepszego rokowania pacjenta, ale i długofalową strategię ochrony zdrowia publicznego.

**Rycina 2.** Porównanie czasu uzyskania wyniku identyfikacji i lekowrażliwości z dodatniego posiewu krwi przy wykorzystaniu konwencjonalnych metod i wybranych nowoczesnych technik diagnostycznych. (ID – identyfikacja, AST – lekowrażliwość, Sepsityper (Bruker), dRAST (QuantaMatrix))



## Piśmiennictwo

- Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 2020;395(10219):200–211.
- La Via L, Sangiorgio G, Stefani S, Marino A, Nunnari G, Cocuzza S, et al. The global burden of sepsis and septic shock. *Epidemiologia*. 2024;5(3):456–478.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Healthcare-associated infections: bloodstream infections. Annual Epidemiological Report 2024. Stockholm: ECDC; 2024.
- Centers for Disease Control and Prevention. NHSN Healthcare-Associated Infections Progress Report: CLABSI metrics. Atlanta (GA): CDC; 2023.
- Giamarellos-Bourboulis EJ, Zinkernagel AS, De Robertis E, Azoulay E, De Luca D. Sepsis: a call for inclusion in the work plan of the European Centre for Disease Prevention and Control. *Intensive Care Med*. 2023;49(9):1138–1142.
- Kumar A, Roberts D, Wood KE, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med*. 2006;34(6):1589–1596.
- Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Med*. 2021;47(11):1181–1247.
- Retamar P, Portillo MM, López-Prieto MD, Rodríguez-López F, de Cueto M, García MV, et al. Impact of inadequate empirical therapy on the mortality of patients with bloodstream infections: a propensity score-based analysis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(1):472–478.
- Murray CJL, Naghavi M, Ikuta K, Sharara F, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* 2022;400 (10358):2221–2248.

*Dzięki 31. Finałowi Wielkiej Orkiestry Świątecznej Pomocy polskie laboratoria mikrobiologiczne zostały wyposażone w nowoczesne narzędzia umożliwiające szybką diagnostykę zakażeń krwi i sepsy. Pozyskany sprzęt otworzył możliwość szerokiego stosowania zarówno metod fenotypowych, jak i molekularnych, które skracają czas uzyskania wyników identyfikacji drobnoustrojów i oznaczenia lekowrażliwości z kilku dni do zaledwie kilku godzin.*

*W 2024 roku polska grupa ekspertów opublikowała zalecenia dotyczące racjonalnego wykorzystania tych technologii. Podkreślono w nich konieczność włączania szybkich metod do rutynowych algorytmów diagnostycznych oraz zapewnienia możliwie najszybszego raportowania wyników identyfikacji, lekowrażliwości i mechanizmów oporności. Takie podejście umożliwi wcześniejsze wdrożenie terapii celowanej, ogranicza stosowanie antybiotyków o szerokim spektrum działania i wspiera walkę z narastającym problemem oporności drobnoustrojów.*

- WHO 2022. Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report: 2022.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals: Annual Epidemiological Report for 2023. Stockholm: ECDC; 2023.
- Doern GV, Carroll KC. Practical guidance for clinical microbiology laboratories: blood cultures. *Clin Microbiol Rev*. 2020;33(1):e00009-19.
- Sambri V. The role of rapid and advanced microbiological methods in critical care: 2025 Emanuele Russo Delphi consensus. *Clin Microbiol Infect*. 2025. Epub ahead of print.
- Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Crit Care Med*. 2017;45(3):486–552.
- Patel R, et al. Preanalytical variables in blood culture diagnostics. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(2):e00034-18.
- Hall KK, Lyman JA. Updated review of blood culture contamination. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(4):788–802.
- Fabre V, Carroll KC, Cosgrove SE. Blood culture utilization in the hospital setting: a call for diagnostic stewardship. *J Clin Microbiol*. 2022;60(3):e01005-21.
- Bouza E, Sousa D, Rodríguez-Crèixems M, Lechuz JG, Muñoz P. Is the volume of blood cultured still a significant factor in the diagnosis of bloodstream infections? *J Clin Microbiol*. 2007;45(9):2765–2769.
- Lamy B, Dargère S, Arendrup MC, Parienti JJ, Tattevin P. How to optimize the use of blood cultures for the diagnosis of bloodstream infections? *Clin Microbiol Infect*. 2016;22(4):301–307.
- Lee A, Mirrett S, Reller LB, Weinstein MP. Detection of bloodstream infections in adults: how many blood cultures are needed? *J Clin Microbiol*. 2007;45 (11):3546–3548.
- Davies S, Marfuggi RA, Bright RA, Brozak S, Osterholm M. Changing the

- culture of blood culture. *Lancet*. 2024;404(10462):1503–1505.
22. Hagiya H, Fukushima S, Iio K. Have positive blood culture bottles been left unnoticed? Addressing this issue as important as the shortage of blood culture bottles. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2025;46(6):661–663.
  23. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Principles and Procedures for Blood Cultures; Approved Guideline (M47-A). CLSI, Wayne, PA; 2014.
  24. Huber S, Hetzer B, Crazzolaro R, Orth-Höller D. The correct blood volume for paediatric blood cultures: a conundrum? *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(2):168–173.
  25. Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, Carroll KC, Chapin KC, Cohen S, et al. Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2024 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). *Clin Infect Dis*. 2024;79(2):e65–e156. doi:10.1093/cid/ciae328
  26. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). ESCMID guidelines for blood culture sampling, processing and reporting. *Clin Microbiol Infect*. 2023;29(4):421–436.
  27. Wilson ML, Weinstein MP, Reller LB. Laboratory detection of bacteremia and fungemia. *Infect Dis Clin North Am*. 2021;35(2):197–217.
  28. Doern GV, Carroll KC, Diekema DJ, Garey KW, Rupp ME, Weinstein MP. Practical guidance for clinical microbiology laboratories: Implementing a blood culture contamination reduction program. *Clin Infect Dis*. 2020;70(8):1652–1658.
  29. Seegmüller, I. et al. Effects of delayed entry of blood culture bottles into incubation systems. *J Clin Microbiol*, 2016;54 (5), 1388–1391.
  30. Sautter RL, Bills AR, Lang DL, Ruschell G, Heiter BJ, Bourbeau PP. Effects of delayed entry of bottles into the BACTEC 9240 blood culture system. *J Clin Microbiol*. 2006;44(4):1245–1249.
  31. Adamik B, Zieliński S, Kübler A. Blood culture diagnostics in sepsis: A review of pre-analytical errors and their clinical consequences. *Anaesthesiol Intensive Ther*. 2021;53(3):237–244.
  32. BD Diagnostics. BACTEC FX and BACTEC 9000 Series Blood Culture Systems: Instructions for Use. Sparks, MD: Becton, Dickinson and Company; 2022.
  33. Biomérieux. BACT/ALERT® VIRTUO User Manual. Marcy-l'Étoile: bioMérieux; 2022.
  34. Miller, J.M. et al. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory. *Clin Infect Dis*, 67(6), e1–e94.
  35. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 30 czerwca 2025 r. w sprawie standardów jakości dla laboratoriów. *Dz.U.* 2025 poz. 961;
  36. Baron EJ, Scott JD, Tompkins LS. Prolonged incubation and extensive subculturing do not increase recovery of clinically significant microorganisms from standard automated blood cultures. *Clin Infect Dis*. 2005;41(11):1677–1680
  37. Lambregts MMC, Bernards AT, van der Beek MT, Visser LG, de Boer MGJ. Time to positivity of blood cultures supports early re-evaluation of empiric broad-spectrum antimicrobial therapy. *PLoS One*. 2019;14(7):e0218800.
  38. Weinstein MP. Blood culture contamination: persistence of an old problem. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(4):655–658.
  39. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Healthcare-associated infections: bloodstream infections, ECDC surveillance protocol version 6.0. Stockholm: ECDC; 2023.
  40. Dzierżanowska-Fangrat K., Deptuła A., Durnaś B., Podsiadły E., Semczuk K, Żukaowska A. Zalecenia grupy ekspertów dotyczące diagnostyki zakażeń krwi w laboratoriach mikrobiologicznych w Polsce uwzględniające dostępność nowych technologii. 2024.
  41. Stone RB, Steele JC Jr. Impact of reporting gram stain results from blood cultures on the selection of antimicrobial agents. *Am J Clin Pathol*. 2009 Jul;132(1):5-6.
  42. Buchan B. W., Ledebner N. A. (2013). Advances in identification of clinical yeast isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(5), 1359–1366.
  43. Patel, R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clin Chem*, 2015; 61(1), 100–111.
  44. Bruker Corporation. Bruker introduces CE-marked IVD MALDI Sepsityper solution for rapid identification directly from positive blood cultures. 27 Apr 2015.
  45. Fitts, E.C., Dent, E.A., & Burd, E.M. Validation of short culture method for rapid bacterial identification of blood cultures via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2024; 79 (Supplement 1), i9–i15.
  46. Verroken A, Defourny L, le Polain de Waroux O, Belkhir L, Laterre PF, Delmée M, Glupczynski Y. Clinical impact of MALDI-TOF MS identification and rapid susceptibility testing on adequate antimicrobial treatment in sepsis with positive blood cultures. *PLoS One*. 2016;11(5):e0156299.
  47. Bosserman RE, Tarlton NJ, Alvarado K, Roemmich B, Yarbrough ML. Performance and workflow comparison of the VITEK MS PRIME and Bruker Biotyper MALDI-TOF MS systems. *J Clin Microbiol*. 2025;63(8):e0021125.
  48. Leli C, Cenci E, Cardaccia A, Moretti A, D'Alò F, Pagliochini R, et al. Rapid identification of bacterial and fungal pathogens from positive blood cultures by MALDI-TOF MS. *Int J Med Microbiol*. 2013 May;303(4):205–209.
  49. Peri AM, Cichero P, Farina C, Vailati F, Pini B, Arena F, Luzzaro F. Rapid microbiological diagnosis of bloodstream infections in the molecular and MALDI-TOF era: current evidence and future perspectives. *Diagnostics (Basel)*. 2024;14(2):202.
  50. Schubert S, Weinert K, Wagner C, Gunzl B, Wieser A, Maier T, Kostrzewa M. Novel, improved sample preparation for rapid, direct identification from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2011;49(8):3222–3227.
  51. Morgenthaler J.J., Kostrzewa M. (2015). Rapid identification of pathogens in positive blood culture by MALDI-TOF mass spectrometry. *International Journal of Medical Microbiology*, 305(8):821–828.
  52. Martiny D, Busson L, Wybo I, El Haj RA, Dediste A, Vandenberg O. Comparison of two methods for the direct identification of bacteria from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34(3):397–406.
  53. Clerc, O., et al. (2014). Impact of MALDI-TOF on the clinical management of Gram-negative bacteremia: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis*, 59(8), 1247–1255.
  54. Idelevich, E. A., et al. (2014). Rapid identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF MS significantly accelerates diagnostics. *Int J Antimicrob Agents*, 44(1), 68–73.
  55. Spanu T, Posteraro B, Fiori B, D'Inzeo T, Campoli S, Ruggeri A, et al. Direct MALDI-TOF mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of bloodstream infections: a cost-benefit analysis. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(8):1001–1008.
  56. Ishikawa J, Kawai Y, Matsumura Y, Yamamoto M, Seki M. Characteristics and outcomes of infective endocarditis caused by *Granulicatella* and *Abiotrophia* species: a systematic review and analysis of 76 cases. *J Infect Chemother*. 2020;26(6):561–568.
  57. Scohy A. et al. (2018). Evaluation of the Bruker® MBT Sepsityper IVD module for the identification of polymicrobial blood cultures with MALDI-TOF MS. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 37:2145–2152.)
  58. Osthoff M, Gürtler N, Bassetti S, Balestra G, Marsch S, Pargger H, Weisser M. Impact of MALDI-TOF MS-based identification directly from positive blood cultures on patient management: a controlled clinical trial. *Clin Microbiol Infect*. 2017;23(2):78–85.
  59. Messacar K, Hurst AL, Child J, Campbell K, Palmer C, Hamilton S, et al. Clinical impact and provider acceptability of real-time antimicrobial stewardship decision support for rapid diagnostics in children with positive blood cultures. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2017;6(3):267–274.
  60. Lapin A, Burnham CD, Ford BA, Klinker KP, Campbell K, Fouts DE, et al. Impact of rapid diagnostic testing and antimicrobial stewardship intervention on antibiotic use and clinical outcomes in bloodstream

- infections: a multicenter evaluation. *Clin Infect Dis*. 2023;76(5):958–968.
61. Idelevich, E. A., Sparbier, K., Kostrzewa, M., & Becker, K. Rapid detection of antibiotic resistance by MALDI-TOF mass spectrometry using the MBT-ASTRA approach. *Journal of Clinical Microbiology*, 2018, 56(4), e00067-18
  62. Zhou, M., et al. (2019). Evaluation of Autof MS 1000 for identification of clinical bacterial isolates: comparison with Bruker Biotyper and VITEK MS. *Front Microbiol*, 10, 1510.
  63. Peri AM, D'Arezzo S, Lanzafame M, Posteraro B, De Angelis G, Spanu T. Diagnostic accuracy and clinical impact of the BioFire® FilmArray® BCID2 Panel for bloodstream infections: a systematic review and meta-analysis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:1024392.
  64. Berinson B, Both A, Christner M, et al. Usefulness of BioFire FilmArray BCID2 for blood culture processing in clinical practice. *J Clin Med*. 2021;10(24):5863.
  65. Rhoads DD, Sintchenko V, Pantanowitz L, Cockerill FR, Kibbey T, Pogorzelska-Maziarz M, et al. Multicenter evaluation of the BioFire Blood Culture Identification 2 (BCID2) Panel for the rapid identification of pathogens and antimicrobial resistance genes directly from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol*. 2023;61(2):e01518-22.
  66. Leli C, Moretti A, Cardaccia A, et al. Performance of BioFire Blood Culture Identification 2 Panel (BCID2) for the detection of bloodstream pathogens and their associated resistance markers: a systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy studies. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2024;108(2):115295.
  67. Nieto-Rodríguez JA, Robles-Marhuenda Á, Ortega A, et al. Rapid molecular identification with BioFire BCID2 reduces time to pathogen-directed therapy in febrile neutropenia. *Infect Dis Ther*. 2023;12(4):1687-1701.
  68. Candeli M, Spanu T, Sanguinetti M, Posteraro B. Diagnostic stewardship and rapid molecular testing in bloodstream infections: integrating microbiology and antimicrobial stewardship for optimal patient management. *Clin Microbiol Infect*. 2024;30(2):145–153.
  69. Banerjee R, Komarow L, Virk A, et al. Randomized trial of rapid multiplex PCR-based blood culture identification and antibiotic stewardship intervention. *Clin Infect Dis*. 2020;71(6):e122-e129.
  70. Piapan L, Bussini L, Giacobbe DR, et al. Impact of BCID2 implementation on antibiotic de-escalation in Gram-negative bloodstream infections. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2022;11(1):45.
  71. Doan Q, Enns EA, Kus JV, et al. Molecular rapid diagnostic testing and hospital infection control: impact of BCID2 implementation. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2020;41(10):1208-1215.
  72. Babady NE, Buckwalter SP, Rhoads DD, Slechta ES, Bankowski MJ, Fabre V, et al. Impact of rapid identification of *Staphylococcus aureus* and determination of methicillin resistance directly from positive blood cultures using molecular and mass spectrometry methods. *J Clin Microbiol*. 2018;56(4):e01832-17.
  73. Agrawal A, Reddy S, Zhang L, Dingle T, Banerjee R. Clinical impact of rapid molecular blood culture identification using the BioFire BCID2 Panel: a multicenter prospective study. *Clin Infect Dis*. 2025;80(3):456–465.
  74. Kitagawa H, Takahashi Y, Nakamura M, Sato K, Matsumoto T, Yamamoto N, et al. Effectiveness of the BioFire Blood Culture Identification 2 (BCID2) Panel in the management of bloodstream infections: results from a Japanese multicenter implementation study. *Front Cell Infect Microbiol*. 2025;15:1372849.
  75. Devrim I, Kara A, Düzgöl M, et al. The impact of the BIOFIRE® Blood Culture Identification 2 panel on antimicrobial treatment of children with suspected systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Eur J Pediatr*. 2023;182(5):1853-1863.
  76. Machado M, Bergas A, de Egea GL, et al. Effectiveness of the BioFire FilmArray for the rapid detection of bloodstream infection in haematological patients with febrile neutropenia (the ONFIRE study). *BMJ Open*. 2025;15(6):e101040. doi:10.1136/bmjopen-2024-101040.
  77. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from positive blood culture bottles, version 3.0, 2023. Växjö, Sweden: EUCAST; 2023. Available from: [https://www.eucast.org/rapid\\_ast\\_in\\_blood\\_cultures](https://www.eucast.org/rapid_ast_in_blood_cultures).
  78. Akerlund A, Karlsson S, Grundström C, Olesen B, Johansson Å, Nilsson LE, et al. EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) in blood cultures: European multi-center evaluation of accuracy and reproducibility. *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(11):1532–1538.
  79. Tian S, Li Y, Zhang W, Xu L, Chen H, Wang X, et al. Clinical evaluation of the EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from positive blood cultures in a Chinese tertiary hospital. *Front Cell Infect Microbiol*. 2025;15:1364827.
  80. Özgen Top N, Gürbüz Y, Akgün S, Karahasan Yagci A. Implementation of the EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) method and its clinical impact on antimicrobial therapy optimization. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2024;109(1):116218.
  81. Rosselin G, et al. Evaluation of the QMAC-dRAST system for rapid antimicrobial susceptibility testing directly from positive blood cultures. *Microorganisms*. 2022;10(6):1212. doi:10.3390/microorganisms10061212
  82. Morecchiato F, et al. Diagnostic accuracy of the QMAC-dRAST system for rapid AST directly from positive blood cultures compared with broth microdilution. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2024;110(3):116217. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2024.116217
  83. dRASTTM, direct & Rapid Antimicrobial Susceptibility Test. <https://www.quantamatrix.com/drast/>
  84. Strauss C, et al. Rapid antimicrobial susceptibility testing with the QMAC-dRAST system: performance compared with standard methods. *J Microbiol Methods*. 2024;214:106949. doi:10.1016/j.mimet.2023.106949
  85. Ponderand J, et al. Integrating QMAC-dRAST into clinical workflows: performance, cost-effectiveness and stewardship implications. *JAC Antimicrob Resist*. 2024;6(5):dkae202. doi:10.1093/jacamr/dkae202.
  86. Wong W, et al. Accuracy of the QMAC-dRAST system for the detection of MRSA and VRE in bloodstream infections. *Microbiol Spectr*. 2022;10(3):e00334-22.
  87. Kim TY, et al. Clinical impact of implementing the QMAC-dRAST system for rapid antimicrobial susceptibility testing in patients with bloodstream infections. *J Clin Lab Anal*. 2024;38(4):e25043.
  88. Snyder A, Rivard KR, Brown C, Rhoads DD, McElvania E. Clinical evaluation of the VITEK REVEAL rapid antimicrobial susceptibility testing system directly from positive blood cultures. *J Clin Microbiol*. 2025;63(1):e01523-24.
  89. Shalom J, Torres A, Peterson E, Buehler K, Rivard KR, McElvania E. Evaluation of the VITEK REVEAL rapid antimicrobial susceptibility system for detection of carbapenem-resistant Enterobacterales and Acinetobacter spp. directly from positive blood cultures. *Front Cell Infect Microbiol*. 2025;15:1372019.
  90. Simner PJ, Ahmad A, Carroll KC, Rhoads DD, Humphries RM. Multicenter evaluation of the Accelerate PhenoTest BC kit for rapid identification and antimicrobial susceptibility testing of pathogens from positive blood cultures. *J Clin Microbiol*. 2024;62(3):e01542-23.
  91. Marsilio R, Pasticci MB, Timar K, Morroni G, Mencacci A. Clinical impact of the Accelerate PhenoTest BC system on antimicrobial therapy optimization in bloodstream infections: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2022;75(9):1624–1636.
  92. Timbrook TT, Morton JB, McConeghy KW, Caffrey AR, Mylonakis E, LaPlante KL. The effect of molecular rapid diagnostic testing on clinical outcomes in bloodstream infections: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2020;71(9):2080–2090.
  93. Marschal, M. et al. (2021). Evaluation of the Accelerate Pheno system for rapid identification and antimicrobial susceptibility testing from positive blood cultures. *J Clin Microbiol*, 59(2).
  94. Rodríguez-Baño J, Gutiérrez-Gutiérrez B, Tacconelli E, et al. Implementing antimicrobial stewardship in the era of rapid diagnostics: challenges and opportunities. *Clin Infect Dis*. 2023;77(2):267–275.
  95. Dzierżanowska-Fangrat K. i wsp. Zasady prezentowania wyników lekowrażliwości bakterii na leki przeciwdrobnoustrojowe – propozycje dla mikrobiologicznych laboratoriów diagnostycznych. Warszawa 2025