

Aplikace molekulárně – biologických postupů v časně detekci sepsy

Mgr. Jana Ždychová, Ph.D.

IKEM – PLM - LLG



Sepse je častou příčinou úmrtí během hospitalizace.

Včasné nasazení odpovídající ATB terapie je významným faktorem pro snížení úmrtnosti, doby hospitalizace a celkových nákladů v souvislosti se sepsí.

Identifikace SEPSE

SIRS

- Tělesná teplota $<36\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo $>38\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Tepová frekvence $> 90\text{ tepů/ min}$
- Dechová frekvence $>20\text{ dechů/ min}$
nebo $\text{PaCO}_2 < 4,3\text{ kPa}$
- Počet leukocytů $< 4000\text{ b/ } \mu\text{l}$ nebo
 $> 12\ 000\text{ buněk/ } \mu\text{l}$ nebo $> 10\%$ nezralých forem

SEPSE

- Příznaky SIRS + průkaz patogena

RYCHLOST

Molekulární diagnostika
septických stavů představuje pro
rutinní molekulární diagnostiku
obrovskou výzvu

Hemokultivace

- + Zlatý standard
- + Vysoká citlivost
- Časová náročnost (dny)
- Falešně negativní výsledky po předchozím nasazení ATB, nutriční nároky mikroba a jeho viabilita

Metody nezávislé na kultivaci

- + Rychlost (hodiny)
- + Nezávislé na viabilitě mikroorganismu a jeho nutričních nárocích
- Nutnost správného odběru a jeho načasování
- Nižší analytická senzitivita
- Nebezpečí kontaminace
- Problematická interpretace

Přehled využívaných molekulárně-biologických metod pro detekci bakterií

Metoda je nejčastěji založena na PCR :

- Specifická PCR = multiplex RT-PCR
- Širokospektrá PCR
- Nested PCR
- Technika High resolution melting
- Technologie mikročipů
- Spojení metody PCR a hmotnostní spektrometrie (PCR-ESI/MS)

Současné možnosti detekce septických patogenů (komerční výrobci)

• Detekce přímo z primárních vzorků (plná krev, plasma...)

1/ **Magicplex Sepsis Real Time test** (Seegene)

Princip: Multiplex RT-PCR.

Systém detekuje více než 90 patogenů + rezistence. Bez izolace cca ca za 3 hodiny.

2/ **SeptiFast** (Roche)

Princip: Multiplex RT-PCR

Systém detekuje 25 patogenů. I s izolací za 4,5-6 hodin (podle druhu použité izolace)

3/ **SepsiTest** (Molzym)

Princip: Univerzální RT-PCR + sekvenování.

Systém detekuje cca 345 bakterií a hub. K detekci je ale třeba doba delší než 8 hodin (i s izolací).

4/ **Hybcell Bacteria DNA xA a Hybcell Fungi DNA xA** (Anagnostics)

Princip: univerzální PCR + compact sequencing na chipu. I s izolací za 8 hodin (podle druhu použité izolace)

5/ **Bactereamia 16 well** (Aus Diagnostics)

Princip: Nested PCR

Systém detekuje 15 patogenů a rezistencí. I s izolací za 4,5-6 hodin (podle druhu použité izolace)

Správný odběr a načasování

- Patogen musí být ve vzorku přítomen v minimálním množství
- Bakteriémie je dynamický proces. K uvolňování bakterií dochází v časových intervalech s různě dlouhým obdobím klidu

!!! Načasování odběru krve je velmi důležité !!!

- Je rozumné, aby molekulárně diagnostické metody kopírovaly mikrobiologická schémata indikace a odběru vzorků = především by měly být splněna kritéria SIRS

Senzitivita a spolehlivost

- Kultivační metody
 - + Citlivější
 - Nižší spolehlivost – závislost na viabilitě, ATB terapii, nutričních nárocích patogena
- Metody nezávislé na kultivaci
 - Nižší citlivost (cca 1000x méně citlivé v porovnání s kultivací)
 - + Vysoká spolehlivost nad úrovní analytické citlivosti

Zvýšení citlivosti PCR metod

- **Zakoncentrování vzorku během izolace NK**
= zvýšení objemu izolovaného primárního vzorku + snížení elučního objemu
- **Zacílení do multikopiových sekvencí**
= detekce ribosomální RNA (několik tisíc ribosomů/ buňka)

= detekce fungal ribosomal rDNA complex (40-80 repetitivních sekvencí na haploidní genom)

Falešně pozitivní výsledky

Z důvodu detekce „mrtvých“ patogenů v organismu. I když mrtvé mikroorganismy a jejich DNA jsou z krevního oběhu rychle eliminovány.

Řešení: selektivní izolace mikrobiální DNA – eliminace falešně pozitivních výsledků z důvodu detekce „mrtvých“ patogenů v organismu.

Falešně pozitivní výsledky

Exogenní kontaminace

= Nukleové kyseliny bakterií a hub nás obklopují.
Je nutno zajistit sterilitu celého procesu a důsledně používat negativní kontroly

Interpretace pozitivního výsledku a především neobvyklých nálezů musí být provedena v kontextu možné exogenní kontaminace!

Úskalí interpretace výsledků

- Hemokultivace: Primárně jsou detekovány mikroorganismy, které **se snadno kultivují**
 - Molekulární diagnostika: Primárně jsou detekovány mikroorganismy, kterých **je ve vzorku více**
- = Jde o dva různé pohledy na stanovení téhož vzorku. Získané výsledky tak mohou být velmi odlišné, přičemž oba jsou však správné

Závěr

- Molekulární diagnostika není lepší nebo horší než jiné diagnostické metody
- Při jejím využití hraje velmi důležitou roli správná interpretace výsledků, kde svou nezastupitelnou roli má mezioborová spolupráce

Zkušenosti IKEM se systémem High Plex 384

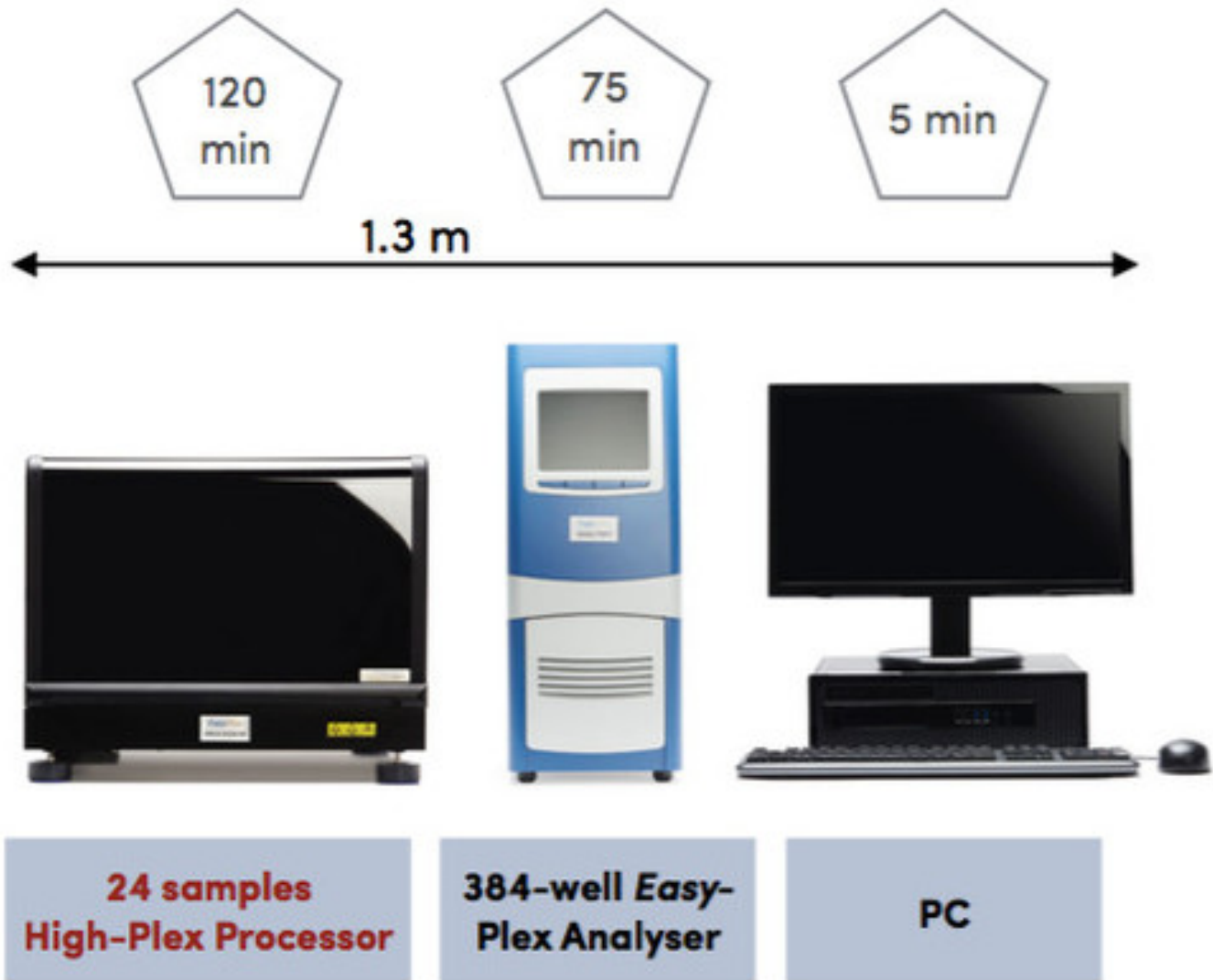
- Výrobce: Aus Diagnostics (Austrálie)
- Automatizovaný systém k provádění vysoce multiplexních reakcí pro detekci patogenů z různých primárních vzorků technologií Multiplex Tandem PCR

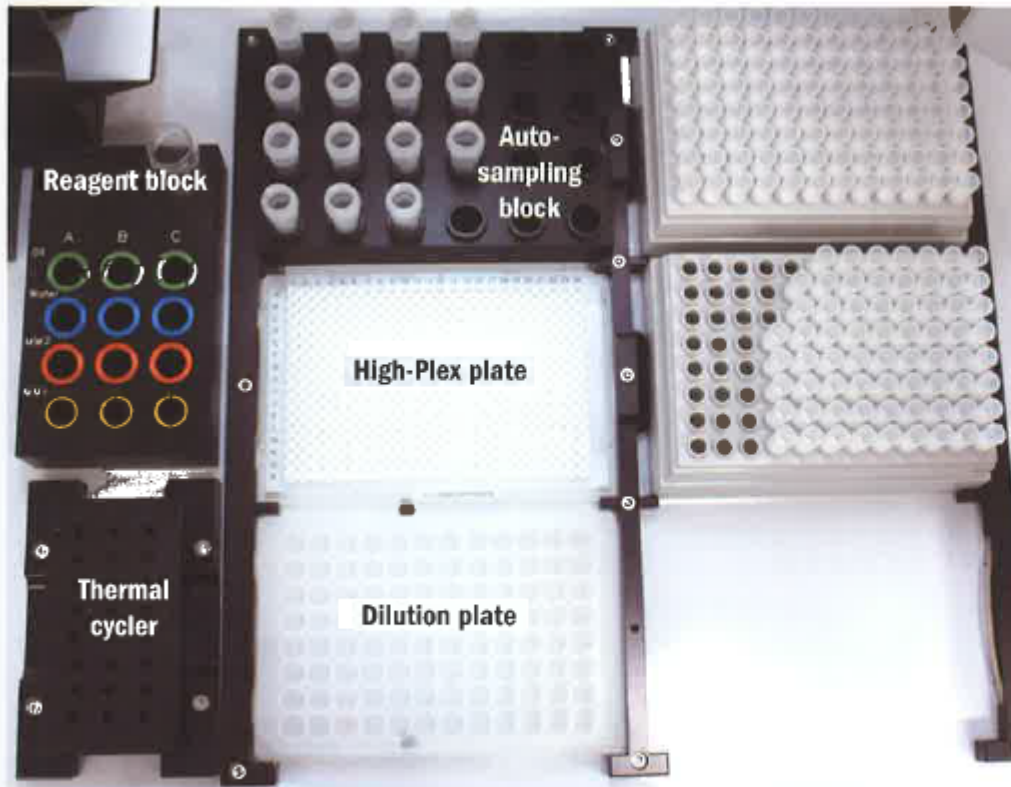
- + Vysoce multiplexní analýza široké škály patogenů a rezistencí
- + Certifikace CE/ IVD
- + Uživatelsky velmi příjemný
- + Systém kontrol a verifikace dat
- + Možnost relativní kvantifikace
- + Široký výběr „ready to use“ souprav nebo i možnost vytvoření soupravy zcela na přání uživatele

Parametry testu Bacteraemia 16 well

Bacteraemia (16-well), Catalogue number: 22411, Version: 01

#	Gene Symbol	Description	Inclusivity
1	Staphylococcus	Staphylococcus spp.	Includes <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> and <i>S. haemolyticus</i>
2	Streptococcus	Streptococcus specific gene	
3	S.aureus	Staphylococcus aureus	Including all strains
4	mecA	Methicillin-resistance gene	
5	S.pneumo	Streptococcus pneumoniae	Includes serotypes 2, 3, 6B, 7F, 11A, 12, 14, 19A, 19, 23F, 29
6	S.pyogenes	Streptococcus pyogenes	
7	GBS	Streptococcus agalactiae	Includes all strains
8	Enterococcus	Enterococcus spp.	
9	E.coli	E.coli (beta-glucuronidase gene)	all serotypes, possibly reduced sensitivity for o145:H28
10	P.aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa	
11	Klebsiella spp	Klebsiella spp	
12	Enterobacteriaceae	Enterobacteriaceae	
13	P.mirabilis	Proteus mirabilis	
14	S.marcescens	Serratia marcescens	
15	C.freundii	Citrobacter freundii	Includes known isolates
16	SPIKE	Artificial sequence for assay control	

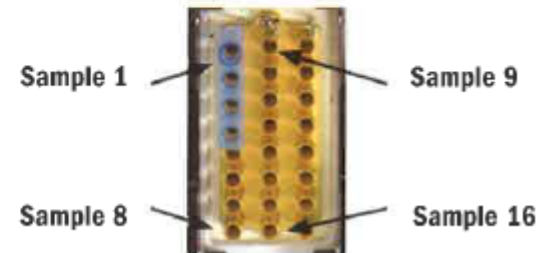




Autosampling block sample order



Thermal cycler layout



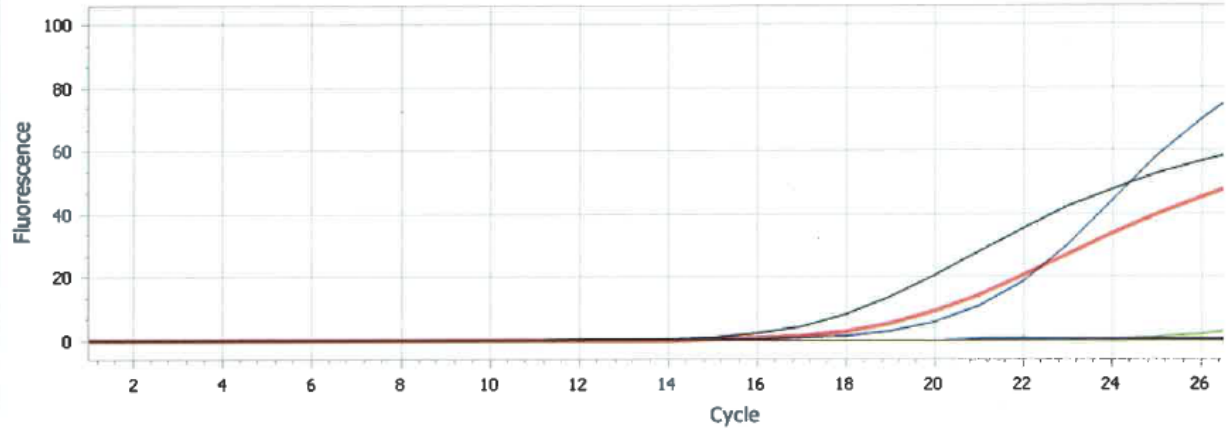


Sample: 1

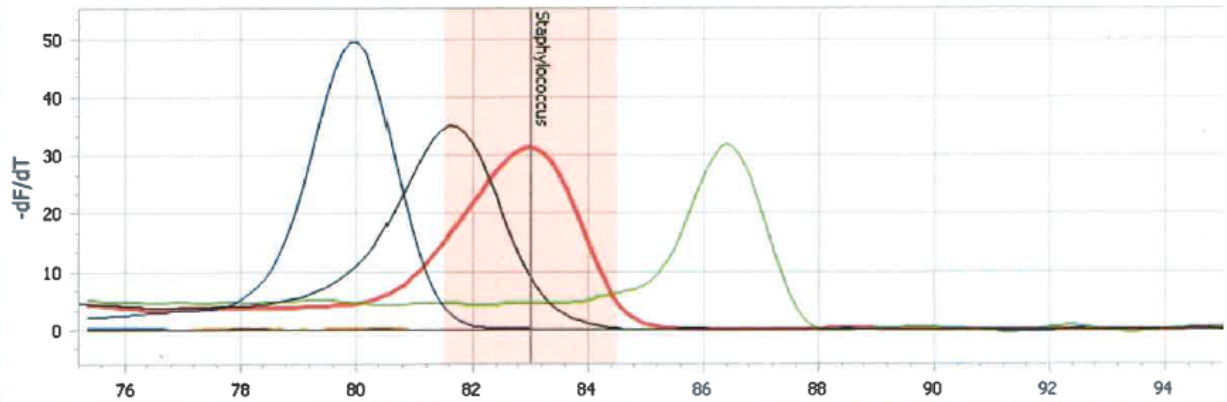


Gene	Call	Concentration
<i>Staphylococcus</i>	Present	4,962
Strep	Present (Low)	
<i>S.aureus</i>	Present	938
<i>mecA</i>		
<i>S.pneumo</i>		
<i>S.pyogenes</i>		
GBS		
Enterococcus		
<i>E.coli</i>		
<i>P.aeruginosa</i>		
pan-Klebsiella		
Enterobacteriac...		
<i>P.mirabilis</i>		
<i>S.marcescens</i>		
<i>C.freundii</i>		
SPIKE	Present	10,000

Cycling Curves



Melt Curves



System Aus Diagnostics na IKEM

- Od léta 2016
- Otestováno 17 pacientů – celkem testováno 24 vzorků (krev, plasma, sputum, drény...)

Celkem 24 vzorků

- Pozitivních Aus Diagnostics.....18
- Pozitivní mikrobiologie.....12

- Negativní Aus Diagnostics + pozitivní mikrobiologie.....1
(výsledek z jiné nemocnice)
- Pozitivní Aus Diagnostics + negativní mikrobiologie.....7

Výhody x Nevýhody

+ Rychlá detekce

- Inhibice PCR (heparin, léky, neznámé faktory)

+ Výběr z „ready to use“ souprav
nebo možnost individualizace

- DNA mrtvých mikroorganismů

+ Stanovení z řady primárních
vzorků

+ Pozitivita i po nasazení ATB
(x Hemokultivace)

+ Systém nevyužívá sondy =
je relativně levný (patogen již od
cca 50 Kč)

DĚKUJI ZA POZORNOST!