

# SeptiFast – test pro detekci původců sepse

L. Plíšková, R. Bolehovská,  
V. Hypiusová

## ÚVOD

Sepse je v současnosti významným celosvětovým problémem spojeným se vzrůstající incidencí a mortalitou. Mortalita jednoznačně koreluje s rozsahem orgánové dysfunkce a je problémem ve všech částech světa, dokonce i v zemích s vysokou úrovní zdravotní péče (mortalita u sepse je až 36 %, u těžké sepse až 52 % a u septického šoku až 82 %) (1, 2). Dle dostupných údajů je každý rok popsáno přes 18 milionů případů těžké sepse, jejíž incidence podle odhadů každoročně stoupá o 1,5 % (3). Pravděpodobné příčiny nárůstu jsou zejména stárnutí populace, zvyšující se počet pacientů s poruchou imunity a snížení citlivosti bakterií na antibiotika. Na celém světě na sepsi umírá denně 1 400 lidí a přibližně 10 % septických pacientů nedostává včasné cílenou antibiotickou (ATB) terapii, což zvyšuje mortalitu o 10 – 15 % (4, 5).

Sepsi je možné popsat jako systémovou zánětlivou odpověď organismu na přítomnost infekčního agens. Je pro ni charakteristická přítomnost septického ložiska, ze kterého dochází k rozsevu infekce, s projevy většinou periodické přítomnosti

patogenních agens v krvi, které je proto obtížné diagnostikovat a cíleně léčit. Včasný nálezn zdroj infekce a především identifikace jejího původce má proto zásadní význam pro volbu a rychlé zahájení cílené ATB terapie s cílem zabránit progresi sepse. Při diagnostice bakteriálních septis je v současné době zlatým standardem kultura vyšetření krve, které v některých případech může trvat 2 až 3 dny. Nejmodernějším diagnostickým postupem pro možné odhalení původce či více původců sepse jsou molekulárně biologické metody. Firma Roche uvedla v roce 2006 na trh první komerční CE – IVD test LightCycler® SeptiFast Test M<sup>GRADE</sup> pro detekci a identifikaci 20 nejčastějších původců septis, způsobujících přibližně 90 % všech případů (6).

## CHARAKTERISTIKA TESTU

SeptiFast test je in vitro test (CE - IVD) založený na amplifikaci nukleových kyselin a identifikaci DNA bakterií a hub obsažených v lidské krvi na přístroji LightCycler Instrument 2.0 pro real-time PCR. Test je prováděn ve třech PCR reakcích (100 µl) odděleně pro gram-negativní bakterie, gram-pozitivní bakterie a fungi, ve kterých dochází k amplifikaci DNA případných patogenů. Vzniklé PCR produkty jsou následně analyzovány pomocí analýzy teploty tání. V každé reakci je současně prováděna kontrola přítomnosti inhibitorů DNA polymerázy, což znevažuje vydání falešně negativního výsledku. Pomocí tohoto testu lze identifikovat 20 nejčastějších původců septis, uvedených v tabulce č. 1.

Tab. č. 1: Původci sepse, které je možné detekovat a identifikovat pomocí LightCycler® SeptiFast Testu.

gram-negativní bakterie	gram-pozitivní bakterie	fungi
Escherichia coli	Staphylococcus aureus	Candida albicans
Klebsiella (pneumoniae/oxytoca)	CoNS (koaguláza negativní stafylokoky)	Candida tropicalis
Serratia marcescens	Streptococcus pneumoniae	Candida parapsilosis
Enterobacter (cloacae/aerogenes)	Streptococcus spp.	Candida krusei
Proteus mirabilis	Enterococcus faecium	Candida glabrata
Pseudomonas aeruginosa	Enterococcus faecalis	Aspergillus fumigatus
Acinetobacter baumannii	---	---
Stenotrophomonas maltophilia	---	---

Podle údajů výrobce se test vyznačuje vysokou specifitou a citlivostí. Další výhodou je značná rychlost vyšetření (do 6 hodin od dodání materiálu do laboratoře) i u pomalu rostoucích patogenů, a tím v případě pozitivního záchytu možnost včasného zahájení cílené ATB terapie. Rychlé stanovení infekčního agens má zásadní význam pro volbu správného léčebného

postupu a pro prognózu pacienta. Významná je i možnost záchytu mykotických a polymikrobiálních infekcí (současný záchyt většinou 2 – 3 původců), který je u hemokultivací velice obtížný. Nezbytnou podmínkou při provádění testu je použití M-GRADE kvality chemikálií a spotřebního materiálu, zajišťující ochranu před kontaminací

oportunními mikroorganismy (např. koaguláza negativními stafylokoky). Samozřejmostí je práce v laminárním boxu, který je důkladně dekontaminován roztokem chlornanu sodného a následně vysvícen UV světlem (6).

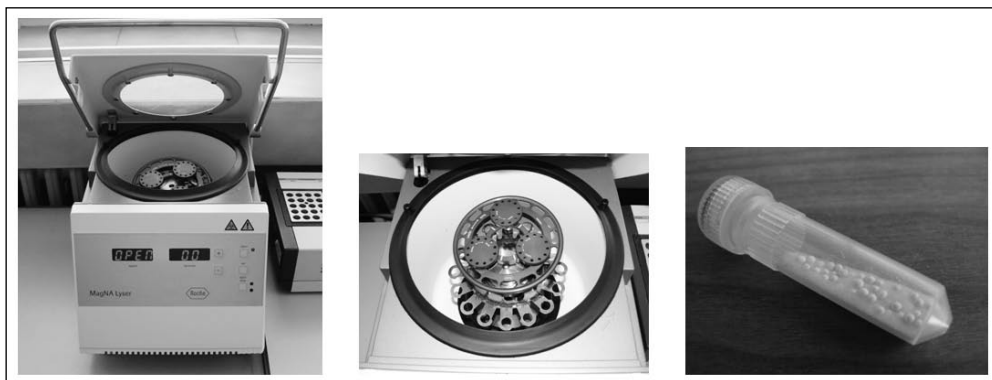
## METODA

LightCycler® SeptiFast test se skládá ze tří hlavních pracovních procesů. Prvním je extrakce DNA, založená na mechanické lýze vzorku a následném přečištění izolované DNA. Druhým je amplifikace cílové DNA pomocí real-time PCR za využití hybridizačních sond a třetím procesem je softwarová identifikace jednotlivých druhů mikroorganismů a ověření správnosti průběhu PCR pomocí přítomných kontrol.

Pro extrakci DNA se používá 1,5 ml nesrážlivé krve (K-EDTA), která musí být transportována a uchová-

vána při teplotě  $-15$  až  $-25$  °C nebo při teplotě 2 až 8 °C po dobu maximálně 3 dnů nebo při teplotě 15 – 25 °C po dobu 4 hodin. Mechanická lýza vzorků krve je prováděna pomocí soupravy SeptiFast Lys Kitu a přístroje MagNA Lyser (obr. č. 1). Hrubý lýzát, získaný mechanickou lýzou pomocí skleněných partikulí (obr. č. 1), je inkubován za zvýšené teploty spolu s proteázou a chaotropním pufrům. Po přidání vnitřní kontroly a vazebného pufru je směs přenesena na kolony, na jejichž povrch se DNA specificky váže. Nenavázané substance jsou odstraněny dvěma vymývacími procesy. Vlastní DNA je eluována elučním činidlem z kolony za zvýšené teploty. Eluát je možné uchovávat při teplotě  $-15$  až  $-25$  °C maximálně 30 dnů nebo při teplotě 2 až 8 °C po dobu maximálně 8 dnů nebo při teplotě 15 – 25 °C po dobu 4 hodin (6).

**Obr. č. 1: Přístroj MagNA Lyser a jeho vnitřní rotor, zkumavka se skleněnými partikullemi.**



Amplifikace cílové DNA pomocí real-time PCR s využitím hybridizačních sond probíhá ve třech samostatných multiplex reakcích pro gram-pozitivní bakterie, pro gram-negativní bakterie a pro fungi. Jako optimální cílový region je použit ITS (Internal Transcribed Spacer) region z bakteriálního a fungálního genomu, dovolující vysoce senzitivní detekci a druhovou diferenciaci během jednoho kroku. ITS je lokalizována mezi 16S a 23S rDNA u všech gram-pozitivních a gram-negativních bakterií a mezi 18S a 5,8S rDNA sekvencí u hub. Pro snížení rizika kontaminace produkty předchozích PCR je použit enzym AmpErase (uracil-N-glykosyláza). Produkty PCR jsou detekovány na základě fluorescence hybridizačních sond, která je snímána ve čtyřech ze šesti detekčních kanálů přístroje LightCycler 2.0 (obr. č. 2). Po dokončení amplifikace je provedena vysoce specifická analýza teploty tání produktů (obr. č. 2), která umožňuje rozlišení jednotlivých patogenů v dílčích reakcích. Teploty tání vzorků a kontrol jsou vyhodnoceny automaticky pomocí SeptiFast Identification

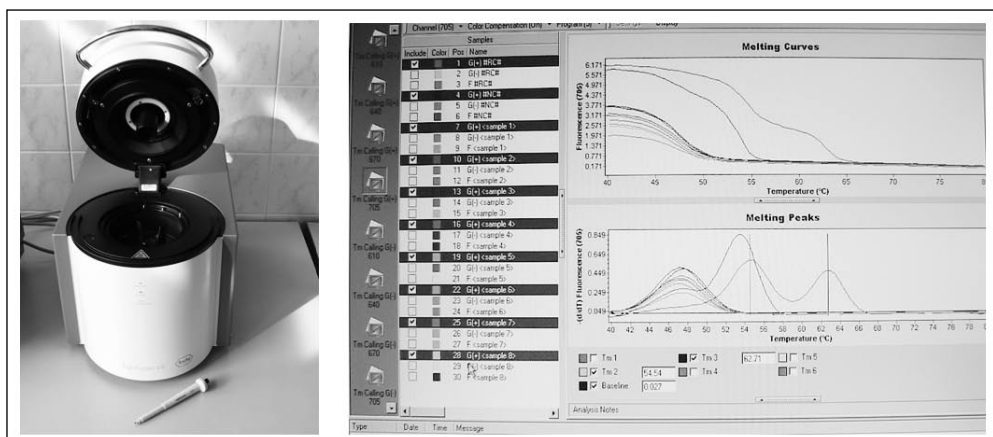
Software a zároveň je vytvořen konečný report pro analyzované vzorky (obr. č. 3). Případně nízké koncentrace koaguláza negativních stafylokoků a streptokoků, vnesené jako kontaminace při zpracování vzorku, nejsou vyhodnoceny jako pozitivita (6).

## ANALYTICKÉ A KLINICKÉ PARAMETRY TESTU

Analytická senzitivita byla testována u všech detekovatelných druhů v koncentracích 100, 30 a 3 CFU/ml v EDTA krvi. Minimální senzitivita 30 CFU/ml byla zjištěna pro všechny druhy s výjimkou koaguláza negativních stafylokoků (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*), *Streptococcus spp.* (*Streptococcus agalactiae* a *Streptococcus pyogenes*) a *Candida glabrata*, kde je citlivost 100 CFU/ml. Specifita a citlivost testu byla zjištěna na souboru 1 548 klinických izolátů s výsledkem 98,8 % a 98,7 % (6).

Pro správnou funkčnost testu se doporučuje krev obsahující 1.106 až 3.107 leukocytů/ml.

Obr. č. 2: Přístroj LightCycler 2.0 a ukázka analýzy teploty tání vzniklých produktů.



Obr. č. 3: Ukázka výsledkového reportu.

SeptiFast Identification Software 1.1.0.35 8/24/2007 16:02:32 page 1 of 1

Imported LC-File: Sepsis 270406  
 Last modified date: 4/27/2006 15:43:56  
 Operator: Pathology  
 LC Instrument-ID: LC\_15287  
 LCS Version: LCS4 4.0.5.415  
 Macro: SeptiFast\_1\_0\_04469046001  
 CCC File Name: SeptiFast\_CCC\_080317-01

Specimen	Assay	Data	Results	Flags	Comment
SeptiFast sample 1	G(+)	ch705 153.56 h0 82	E. faecium		
	G(-)	ch670 182.33 h0 71	S. maltophilia		
SeptiFast sample 2	G(+)	ch610 158.02 h0 09	A. fumigatus		
	G(-)				
SeptiFast sample 3	G(+)	ch640 155.07 h0 14	C. albicans		
	G(-)	ch670 151.09 h0 07	E. coli		
SeptiFast sample 4	G(+)				
	G(-)				
SeptiFast sample 5	G(+)	ch640 157.03 h0 22	K. pneumoniae/oxytoca		
	G(-)				
SeptiFast sample 6	G(+)				
	G(-)				
SeptiFast sample 7	G(+)				
	G(-)				
SeptiFast sample 8	G(+)	ch640 156.54 h0 45	K. pneumoniae/oxytoca		
	G(-)				

Run Flags: [Empty table]

Assay Flags: [Empty table]

Legend: X : invalid, 6 : no analyte detected

## MRSA

Při zjištění pozitivitu DNA pro *Staphylococcus aureus* je možné provést testování *mecA* rezistence pomocí doplňkového kitu LightCycler SeptiFast *mecA* Kit M<sup>GRADE</sup>.

## DALŠÍ MOŽNOSTI MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ DIAGNOSTIKY

Diagnostika založená na detekci nukleových kyselin má velký potenciál pro svoji vysokou senzitivitu a možnost specifické detekce a identifikace patogenů. Velice časté je využití sekvencí z konzervativních oblastí bakterií a hub pro design broad-range PCR primerů a sond, ale i pro DNA sekvenaci. Jako univerzální konzervativní oblasti se dnes často využívají 16S a 23S ribozomální RNA geny. Pro rozlišení bakteriálních a houbových druhů jsou však výhodnější ITS oblasti, například oblast lokalizovaná mezi 16S

a 23S rRNA geny u všech gram-pozitivních a gram-negativních bakterií a oblast mezi 18S a 5,8S rRNA geny u všech hub. Výhodou využití ITS oblasti je nejen vyšší analytická senzitivita ale, oproti ribozomální RNA, i vyšší druhová specifita (7, 8).

Další možností je využití cílených specifických genů pro identifikaci jednotlivých bakterií a hub v oddělených PCR reakcích, avšak tento postup je velice metodicky a finančně náročný. Možné je také provedení sekvenční analýzy produktů z předcházející PCR s univerzálními primery. Tato metodika není vhodná vzhledem ke své časové náročnosti pro rychlou diagnostiku potřebnou v diagnostice sepsí.

## LITERATURA

- Černý V, Kula R, Novák I, Cvachovec K: Sepsis v intenzivní péči (2. vyd.). MAXDORF 2005, kap. 2.4. ISBN 80-7345-054-2.

2. Das UN: Critical advances in septicemia and septic shock. *Crit Care* 2000 4 290 – 296.
3. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR: Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001 29(7) 1303-10.
4. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992 101(6) 1644-55.
5. Lyseng-Williamson KA, Perry CM: Drotrecogin alfa (activated). *Drugs* 2002 62(4) 617-30.
6. Materiály poskytnuté firmou Roche Diagn. (pracovní návod a webové stránky firmy Roche <http://www.roche-diagnostics.cz/>).
7. Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D: PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microb* 1994 32(2) 335-351.
8. Daffonchio D, Cherif A, Brusetti L, Rizzi A, Mora D, Boudabous A, Borin S: Nature of polymorphisms in 16S-23S rRNA gene intergenic transcribed spacer fingerprinting of *Bacillus* and related genera. *Appl Environ Microbiol* 2003 69(9) 5128-5137.