

Naše zkušenosti s testem SeptiFast

R. Bolehovská, L. Plíšková, S. Plíšek, V. Hypiuseová, J. Maňák, E. Havel, J. Cerman, P. Žák, M. Solař

ÚVOD

Test LightCycler® SeptiFast MGRADE, zavedený na světový trh v roce 2006, slouží k in vitro amplifikaci přítomné bakteriální nebo houbové DNA pomocí real-time PCR. Následná analýza teploty tání vzniklých produktů umožňuje identifikaci DNA 20 nejčastějších mikroorganismů způsobujících až 90 % septických stavů (1). Hlavním cílem naší pilotní studie bylo porovnání výsledků získaných metodou SeptiFast s výsledky hemokultivací jako „zlatého standardu“ pro diagnostiku krevních sepsí. Porovnání mělo být provedeno na vzorcích odebraných ve stejnou dobu, ale při vyhodnocení jsme přistoupili ještě k tzv. klinickému zhodnocení, kdy jsme brali v úvahu výsledky hemokultivací odebraných v časovém rozmezí +/- 2 dny od odběru vzorku pro test SeptiFast. Klinické zhodnocení by s velkou pravděpodobností odpovídalo přístupu lékaře k výsledkům v rámci diagnostiky sepsy.

VÝSLEDKY

V období od 12. 4. - 22. 6. 2006 a 25. 2. - 1. 8. 2007 (tj. 8 měsíců) jsme vyšetřili 86 vzorků od 67 pacientů - 34 mužů (51 %) a 33 žen (49 %). Průměrný věk pacientů byl 53 let (rozmezí 1 rok - 84 let), s mediánem 59 let. Vzorky byly odebrány od pacientů s podezřením na počínající sepsi a s velmi různorodými diagnózami (celkem 42). Nejčastějším vyšetřovaným materiálem byla nesrážlivá krev (79

vzorků), v podmínkách laboratoře bylo provedení testu dále rozšířeno i na jiné materiály (likvor, cévní katétr a moč).

Pomocí tohoto testu byly v našem souboru vzorků zjištěny následující výsledky: 36 vzorků (42 %) bylo negativních a 24 vzorků (28 %) bylo pozitivních. Nejčastěji byly detekovány gram-negativní (G-) bakterie, a to 22x. Z toho *Klebsiella (pneumoniae)/oxytoca* 6x, *Pseudomonas aeruginosa* 5x, *Enterobacter (cloacae/aerogenes)* 4x, *Stenotrophomonas maltophilia* 4x a *Escherichia coli* 3x. Gram-pozitivní (G+) bakterie byly detekovány 7x, z toho *Staphylococcus aureus* 2x, *Streptococcus pneumoniae* 2x a 1x byly zjištěny *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* a koaguláza-negativní stafylokoky. Fungální původci (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*) byly zjištěny ve 2 případech. U 7 vzorků (8 %) byla zjištěna přítomnost více původců sepsy. Velkým problémem bylo vysoké procento inhibic DNA polymerázy zjištěné u 26 vzorků (30 %). U 7 vzorků, tj. v 8 %, se jednalo o inhibici PCR pro všechny reakce (G+, G- bakterie i fungi), u 19 vzorků (22 %) byla prokázána inhibice v PCR reakcích pouze pro G- nebo fungi. Z iniciativy výrobce testu došlo k úpravě extrakčního postupu snížením vstupního množství nesrážlivé krve z původních 3 ml na 1,5 ml, které mělo vést ke snížení počtu pozorovaných inhibic (1).

Odběr ve stejném časovém intervalu pro hemokultivaci a test SeptiFast byl proveden pouze v 72 %, tj. bylo odebráno 62 hemokultur oproti 86 vzorkům krve pro test SeptiFast. Tyto odběry byly použity pro přímé analytické zhodnocení výsledků. Pro klinické zhodnocení byly použity odběry hemokultur (celkem 86 vzorků) z období okolo dne odběru pro test SeptiFast. Celkové výsledky jednotlivých metod jsou shrnuty v tabulce č. 1.

Tab. č. 1: Celkové porovnání výsledků získaných testem SeptiFast a hemokultivací.

celkem 86 vzorků	hemokultivace pozitivní; n = 13	hemokultivace negativní; n = 49	hemokultivace neprovedena; n = 24
PCR pozitivní; n = 24	7	11	6
PCR negativní; n = 36	1	22	13
PCR inhibice; n = 26	5	16	5

pozn.: n... celkový počet

ANALYTICKÉ ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Analytické zhodnocení výsledků bylo provedeno pouze u 62 vzorků vyšetřených jak testem SeptiFast, tak hemokultivačně ve stejný den. Vzájemné porovnání obou metod je shrnuto v tabulce č.

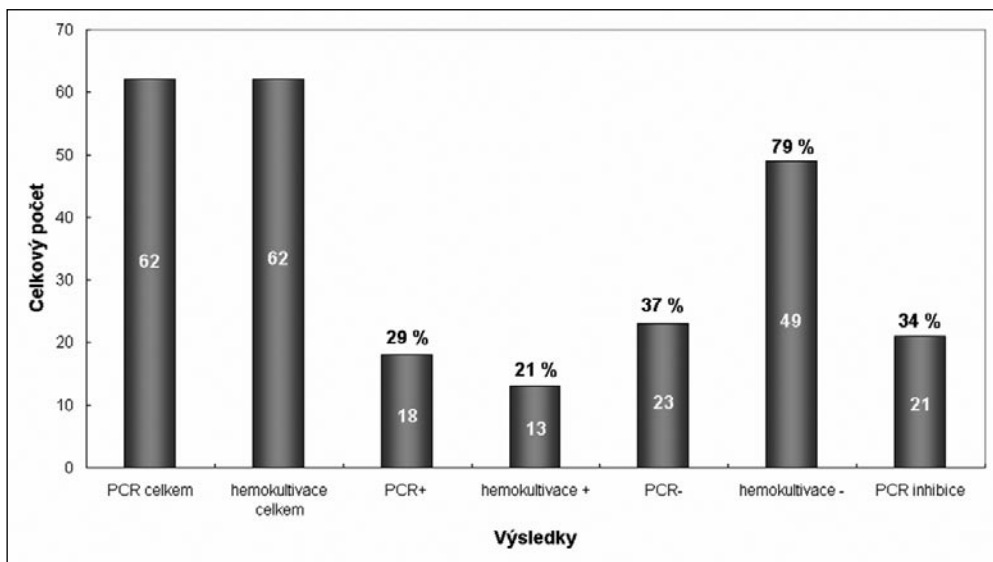
2. Počet všech vzorků pro jednotlivá vyšetření včetně získaných výsledků a jejich procentuální zastoupení shrnuje graf č. 1. Pomocí molekulární biologického vyšetření bylo sedmkrát prokázáno více původců současně, v případě hemokultivace pouze jedenkrát.

Tab. č. 2: Vzájemné porovnání jednotlivých výsledků získaných testem SeptiFast a hemokultivací ve stejný den odběru.

celkem 62 vzorků	hemokultivace pozitivní; n = 13	hemokultivace negativní; n = 49
PCR pozitivní; n = 18	7	11
PCR negativní; n = 23	1	22
PCR inhibice; n = 21	5	16

pozn.: n... celkový počet

Graf č. 1: Zhodnocení výsledků PCR (SeptiFast) a hemokultivace ve stejný den odběru. Absolutní počet vzorků u jednotlivé metody a daného výsledku je uveden uvnitř sloupce, procentuální počet z celkového počtu je uveden nad sloupcem.



KLINICKÉ ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Pro klinické zhodnocení jsme brali v úvahu i výsledky hemokultivací odebraných v časovém rozmezí +/- 2 dny od odběru vzorku pro test SeptiFast. Porovnání tak bylo možné rozšířit na větší soubor vzorků (celkem 86).

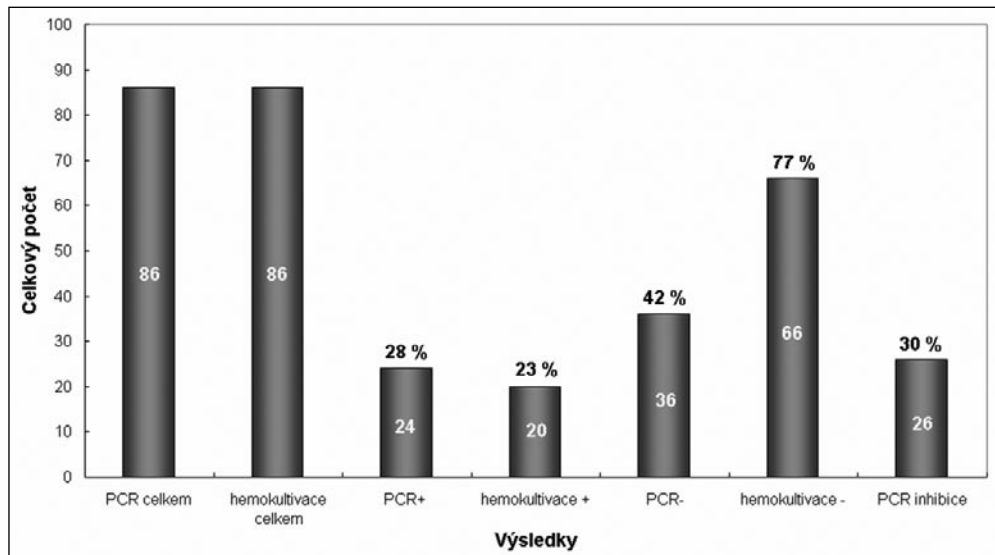
Porovnání výsledků obou metod je shrnuto v tabulce č. 3. Počet všech vzorků pro jednotlivá vyšetření a získané výsledky včetně procentuálního zastoupení shrnuje graf č. 2. Polymikrobiální záchyt byl v tomto případě shodný s analytickým zhodnocením (viz graf č. 3).

Tab. č. 3: Vzájemné porovnání výsledků získaných pomocí testu SeptiFast a hemokultivací.

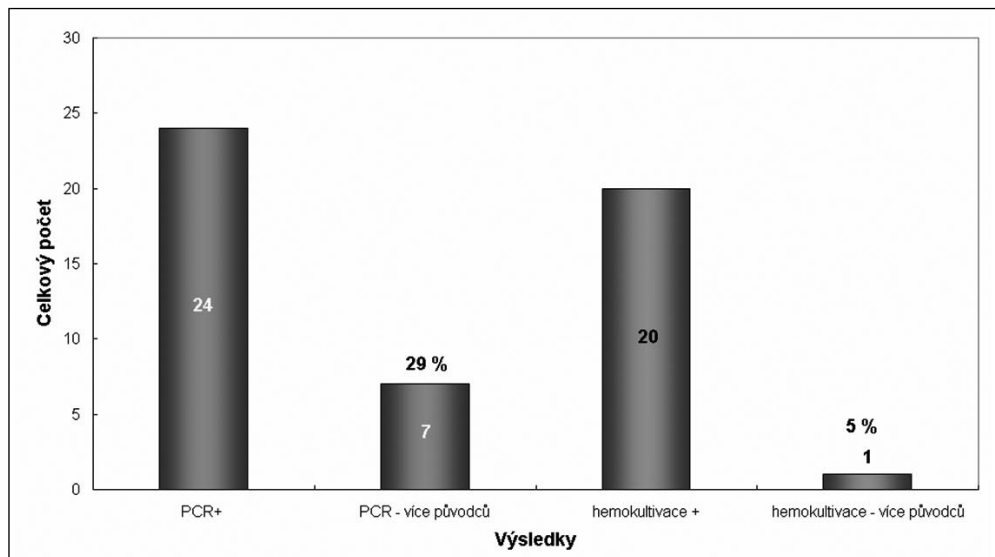
celkem 86 vzorků	hemokultivace pozitivní; n = 20	hemokultivace negativní; n = 66
PCR pozitivní; n = 24	11	13
PCR negativní; n = 36	3	33
PCR inhibice; n = 26	6	20

pozn.: n.... celkový počet, 1 x neshoda v původci sepse mezi PCR a hemokulturou

Graf č. 2: Klinické zhodnocení výsledků PCR (SeptiFast) a hemokultivací. Absolutní počet vzorků u jednotlivé metody a daného výsledku je uveden uvnitř sloupce, procentuální počet z celkového počtu je uveden nad sloupcem.



Graf č. 3: Celkový počet pozitivních PCR a hemokultivací, včetně počtu vzorků s detekcí více původců současně.



ZÁVĚR

Shoda výsledků obou metod byla při analytickém zhodnocení zjištěna u 29 vzorků (47 %), z toho u 7 pozitivit (11%) a 22 negativit (36 %). Neshoda byla pozorována u 12 vzorků, z toho při pozitivitě PCR byla v 11 případech hemokultivace negativní a při pozitivitě hemokultivace byla PCR negativní pouze v jednom případě. Z celkového počtu 62

hodnocených vzorků byla nalezena inhibice v 21 vzorcích. Tyto vzorky nelze použít pro vzájemné zhodnocení.

Při klinickém zhodnocení 86 výsledků dvou odlišných přístupů – hemokultivace a PCR techniky pro přímou diagnostiku původců sepsi byla nalezena shoda v 44 případech (51 %), z toho u 11 pozitivit (13 %) a 33 negativit (38 %). Neshoda výsledků byla pozorována

v 16 případech (19 %), z toho při pozitivitě PCR byla ve 13 případech hemokultivace vždy negativní a při pozitivitě hemokultivace byla PCR negativní ve 3 případech. Nečekaně vysoké procento inhibovaných PCR reakcí (26, tj. 30 %) značně komplikuje rutinní použití testu SeptiFast v časné diagnostice sepsí. Naprosto klíčové pro využití testu v diagnostice sepsí je snížení počtu inhibic na standardní úroveň (do 4 %). Určitou nadějí by mohla být validace jiné extrakční techniky než doporučuje výrobce kitu.

Porovnání výsledků testu SeptiFast a hemokultivace potvrzuje předpoklad, že test umožňuje lepší detekci zejména polymikrobiálních infekcí krevního řečiště

a fungálních původců, které jsou u hemokultivací značně obtížné. Významným přínosem testu SeptiFast je rychlost vyšetření, kdy je možné do 6 hodin po dodání vzorku do laboratoře identifikovat až 90 % nejčastějších původců sepsí.

LITERATURA

1. Materiály poskytnuté firmou Roche Diagn. (pracovní návod a webové stránky firmy Roche <http://www.roche-diagnostics.cz/>).