

Szepszis: klinikai laboratóriumi (mikrobiológiai) vonatkozások

Kristóf Katalin

Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet,
Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Laboratórium

INFECTION

SEPSIS

Bacteria

DNA Lipoproteins LPS
PGN Omp Fimbriae

Defensins

LBP
sCD14

COMPLEMENT SYSTEM

C5a

Endothelial cells

Neutrophils

Mast cells

Epithelial cells

Monocytes / macrophages

Lymphocytes

Tissue factor

TLR

Nod

Dendritic cells

Acute Phase Proteins

Peripheral Nervous system

Neuro-endocrine pathway

COAGULATION

APOPTOSIS

Pro inflammatory mediators
TNF, IL-1, NO...
INNATE IMMUNITY :
anti-infectious response

Anti-inflammatory mediators
IL-10, IL-1ra, sTNFR...

IMMUNITY :
immune depression

INFLAMMATION → MODERATE:
beneficial alarm signal

INFLAMMATION : down-regulation

SEVERE Deleterious effects

ORGAN DYSFUNCTION

INCREASED SUSCEPTIBILITY TO NOSOCOMIAL INFECTION

A szepszis mikrobiális háttere

a legtöbb szepszis lokális
infekcióként indul



A gazdaszervezet részéről

- nagy számú kolonizáló mikroba
- gazdaszervezet védekező
mechanizmusában defektus
- a szervezet védekező rendszere elleni
erős ellenállás a mikroba részéről
- mikrobiális termékek, melyek
elindítják a citokinek termelését
- ezen termékek eljutnak a szervezet
RES-éhez

- anatómiai barrierek
károsodása
- elhalt szövetek
- granulocytopenia, illetve
granulocytafunkció károsodása
- komplement defektusok
- immundeficienciák
- léphiány
- ...

A szepszis mikrobiális háttere

A) Gram(-) baktériumok endotoxinjának hatása

- keringésbe kerülő endotoxin (LPS) a plazmában, fehérjéhez kötődik (LBP)
- LBP mennyisége az infekció kezdetén 100-szorosára nőhet
- LPS-LBP komplex a Mo/M Φ sejtek külső részén található CD14 receptorhoz kötődik (\Rightarrow TNF termelés indul...)
- endotoxin kötő receptorokkal rendelkeznek a thrombocyták, a B lymphocyták és a PMN-ek is

B) Gram(+) baktériumok sejtfalának anyagai (proteoglycan, teicholsav)

C) Bakteriális termékek, extracelluláris enzimek, toxinok

- streptococcusok streptokinase-ja, streptolizin-O, *E. coli* α -hemolizinje, *P. aeruginosa* A toxinja, streptococcusok exotoxinja, staphylococcusok TSST-1-e

D) Candidák mannánja

- TNF ↑, IL-1 ↑ ⇒ láz
- PMN: lizin-bradykinin rendszer aktiválása ⇒ általános vazodilatáció, kapilláris permeabilitás fokozódása
- B ly ⇒ fokozott antitestválasz
- komplement-kaszád aktiválódása ⇒ vazodilatáció, PMN működésének gátlása, kapillárisok átteresztőképességének fokozódása
- nagy mennyiségben ⇒ hipotenzió, DIC
- véralvadásra hatás:
 - Hageman-faktor aktiválódásával intrinsic véralvadás beindítása
 - thrombocyták degranulációját elősegíti
 - PMN-ből kikerülő bázikus protein stabilizálja a fibrin rögöket

Diagnosztika

- klinikai (+ prediszponáló tényezők, alapbetegségek)
- laboratóriumi vizsgálatok
 - citokinek koncentrációja ↑
 - PCT } akut fázis reakciók
 - CRP }
 - kvalitatív vérkép (leukocytosis, toxikus granuláció)
 - eosinopenia
 - thrombocytopenia
 - SeFe ↓
 - Se anorganikus foszfát (↓ Gram(-) 70%, ↓ Gram(+) 20%)
 - hypalbuminaemia
 - enyhe proteinuria → anuria
 - respiratórikus alkalózis → metabolikus alkalózis
 - szénhidrát anyagcsere zavarát jelző paraméterek

Bacteraemia, fungaemia esetén javasolt mikrobiológiai vizsgálatok

– Hemokultúra (HK)

- Véramamfertőzést okozó mikroba azonosítása
- Antimikróbás érzékenységi tulajdonságának meghatározása
- Antimikróbás terápia segítése

- Megfelelően vett és feldolgozott HK eredménye szignifikánsan hat a beteg túlélési esélyeire
- Csökken az antimikróbás szerek túlzott használata
- Csökken a kórházban eltöltött idő
- Költség csökken

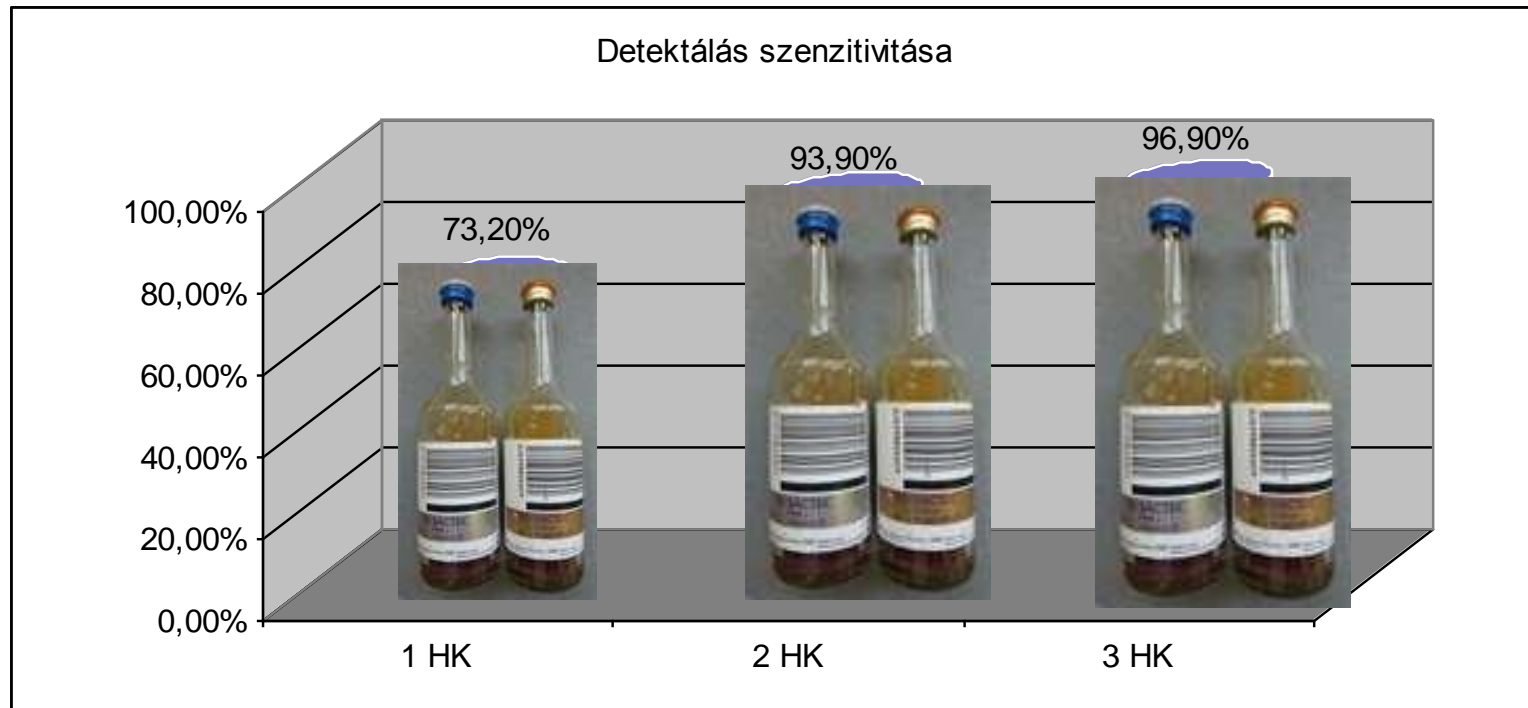
– Vér vétele véramamfertőzést okozó mikroba azonosítása céljából (un. direkt vizsgálatok)

- Az infekció etiológiai ágensének megtalálását, a HK-ból kitenyésztett mikrobák relevanciájának megítélését nagymértékben kiegészíti, alátámasztja, ha **párhuzamosan a fertőzés góciának megfelelő egyéb mikrobiológiai mintavétel/vizsgálat** is történik (pl. vizelet, alsó légúti váladék, eltávolított kanül, stb.)

Hemokultúra vizsgálatok száma

Franciaország	egy kórház (1350 ágy)	37203
USA	egy kórház (870 ágy)	36401
Svájc	egy kórház (1200 ágy)	38125
Magyarország (OEK „fehér könyv” adatai)		
1996	ÁNTSZ laboratóriumok	40224
	egyetemi-kórházi lab.	18067
2000	ÁNTSZ laboratóriumok	39864
	egyetemi-kórházi lab.	48351

Hemokultúra



Weinstein et al. Detection of bloodstream infection in adults: How many blood cultures are needed J Clin Microbiol 2007; 45:3546-3548

Eredményt befolyásolja:

- A vérminta vételének időzítése*
- A vérminta vételének módja és helye*
- A vérminta mennyisége*
- A mintavétel gyakorisága*
- A HK palackok megválasztása*
- A HK palackok tárolása, szállítása*

Total number of all pathogens recovered related to the volume of blood cultured.

Patient group	No. of patients, by volume of blood			
	10 mL	20 mL	30 mL	40 mL
No endocarditis	235	305	346	371
Endocarditis	13	14	14	14

NOTE. A total of 40 mL of blood was obtained within a 30-min period; 20 mL was obtained separately from each of 2 phlebotomies and distributed equally between 1 aerobic (BACTEC Plus Aerobic/F resin; Becton Dickinson) and 1 anaerobic (BACTEC Lytic/10 Anaerobic/F; Becton Dickinson) bottle.

Patient group	Percentage increase for all pathogens, by volume of blood					
	20 mL vs. 10 mL	30 mL vs. 10 mL	30 mL vs. 20 mL	40 mL vs. 10 mL	40 mL vs. 20 mL	40 mL vs. 30 mL
No endocarditis	29.8	47.2	13.4	57.9	21.6	7.2
Endocarditis	7.7	7.7	0	7.7	0	0

NOTE. A total of 40 mL of blood was obtained within a 30-min period; 20 mL was obtained separately from each of 2 phlebotomies and distributed equally between 1 aerobic (BACTEC Plus Aerobic/F resin; Becton Dickinson) and 1 anaerobic (BACTEC Lytic/10 Anaerobic/F; Becton Dickinson) bottle.

Cockerill F R et al. Clin Infect Dis. 2004;38:1724-1730

A vérminta mennyisége

Gyerekek

Testsúly (kg)	Beteg vérmennyisége	Javasolt vérmennyiség hemokultúra vizsgálathoz (ml)		Tenyésztett vérmennyiség (ml)	A beteg teljes vérmennyiségének hány százaléka
		1. minta	2. minta		
< 1.0	50 - 99	2		2	4
1.1 - 2	100 - 200	2	2	4	4
2.1 - 12.7	> 200	4	2	6	3
12.8 - 36.3	> 800	10	10	20	2.5
> 36.3	> 2 200	20 - 30	20 - 30	40 - 60	1.8 - 2.7

Kellogs et al. J Clin Microbiol. 2000; 38:2181-2185

Vérminta vételének ismételése

Mintavétel ismételése?

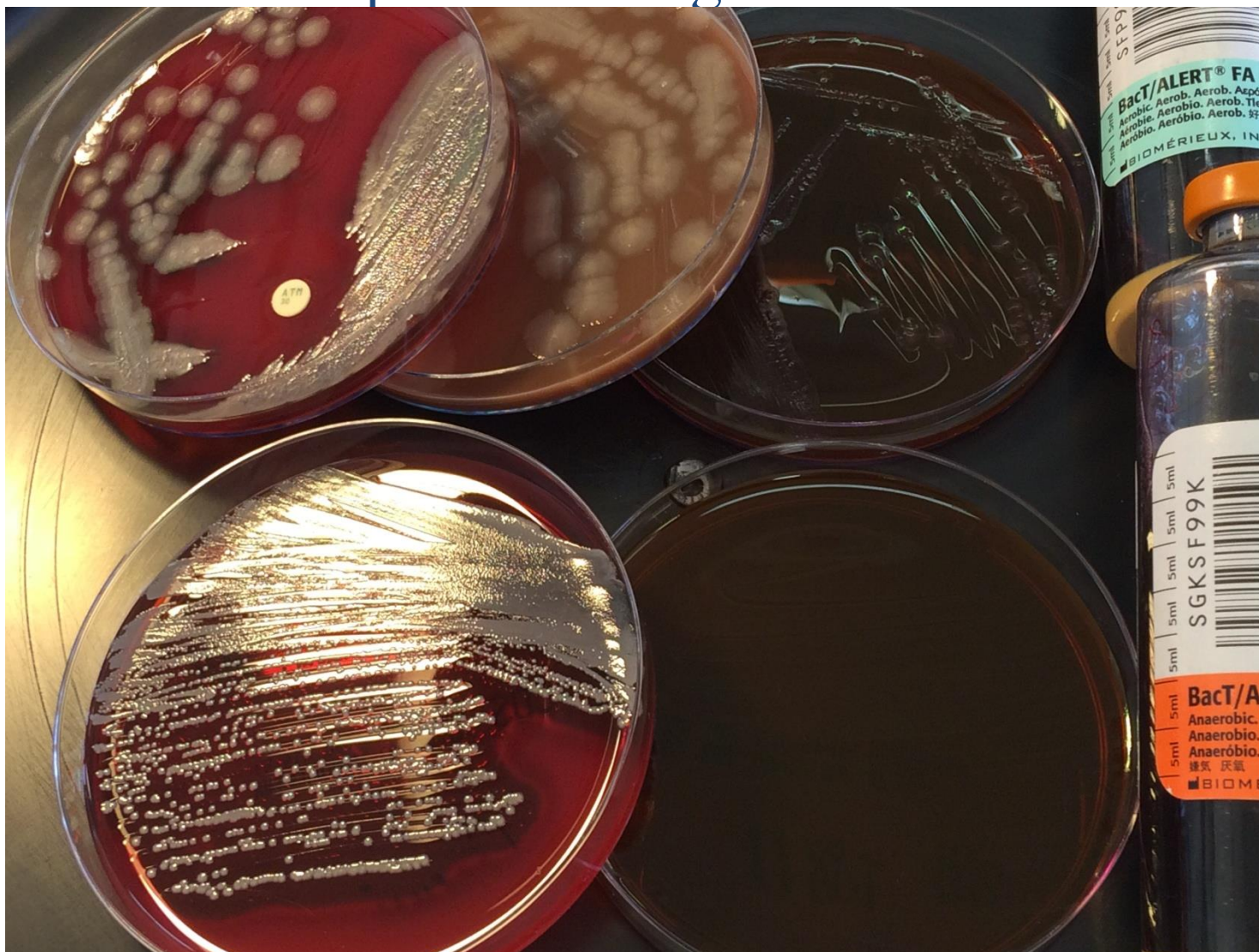
2-4 napon belül még adekvát kezelés esetén sem biztosan válik a vér sterillé

A fungaemiás/bacteriaemiás betegek gyógyulásának megítélése a klinikus feladata, un. „nyomonkövetéses” HK-k vétele nem szükséges, kivéve:

- **infektív endocarditisben** a kezelés követéséhez/vezetéséhez javasolt
- minden *Staphylococcus aureus* okozta bacteriaemia esetén, amikor is a 2-3 nap múlva ismételt HK esetleges ismételt pozitivitása jelezheti a komplikált *S. aureus* okozta véráramfertőzést, a terápia változtatásának szükségességét
- fungémia

Határozott klinikai gyanú, megfelelően vett HK 2 napon belül nem lesz pozitív

A HK palackok megválasztása



Aerob, anaerob palack
Speciális gombatáptalaj
antibiotikum inaktiváló anyagokat (aktív szén, gyanta) tartalmazó palackok használata
gyermekpalackok

A HK palackokba a vérminta beoltása

- Melyik palackot inokuláljuk először?
 - „Winged blood culture set” alkalmazásánál első 10 ml aerob palackba, a következő az anaerobba (maradékot aerob palackba)
 - Hagyományos módon vett vér anaerob palackba először, majd az aerobba
- Ha a levett vér mennyisége kevesebb?
 - Először aerob palackba juttassuk a szükséges mennyiséget, majd a maradékot az anaerobba



A HK palackok tárolása, szállítása

A HK palackokat – amennyiben mód van rá – azonnal küldjük a mikrobiológiai laboratóriumba, vagy szállításig tartjuk szobahőn.

- Preinkubáció fals negatív eredményt adhat
- Információ!

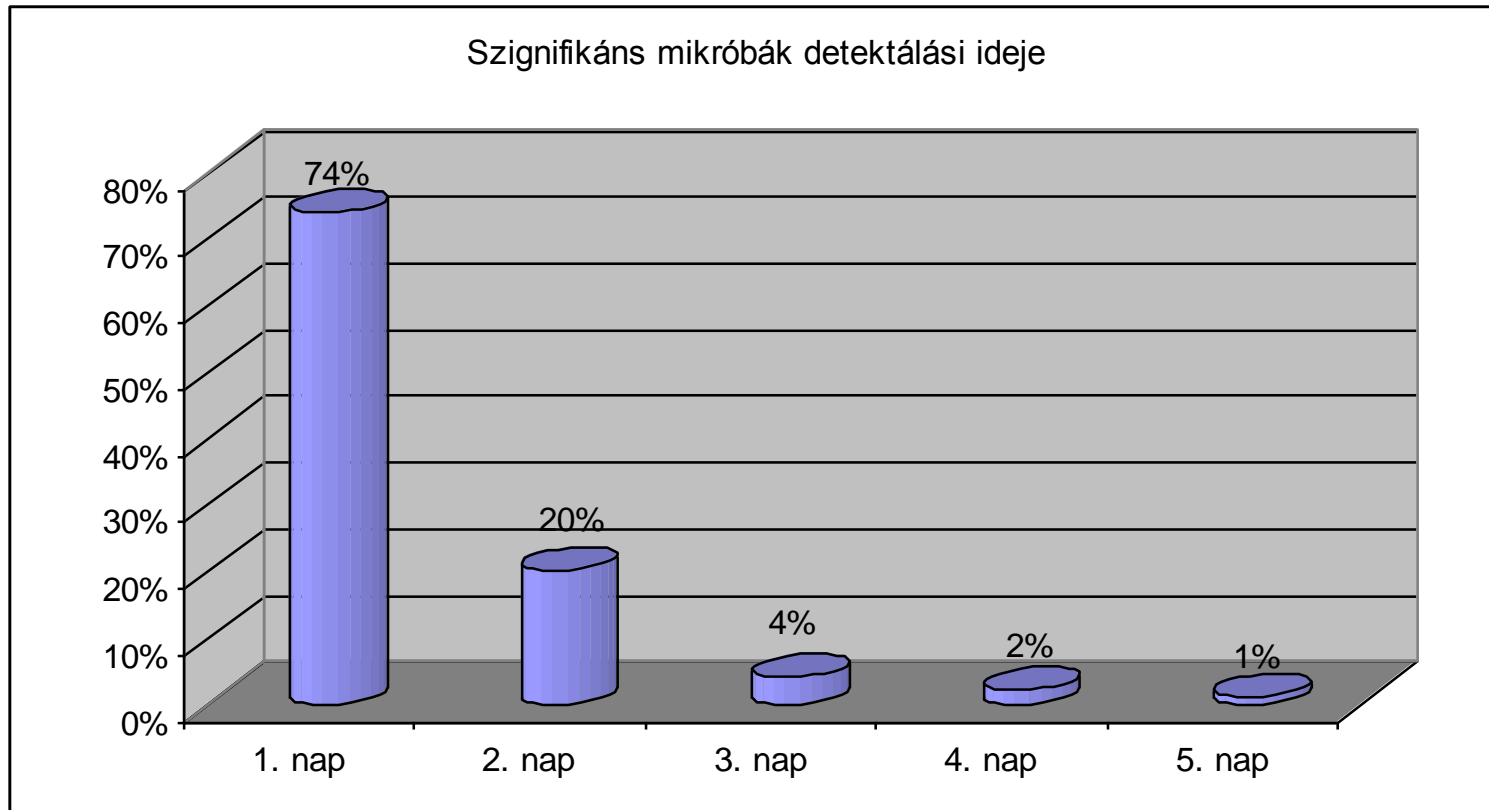
Tilos a HK palackokat hűtőbe tenni!

Automata hemokultúra rendszerek használata esetén különösen fontos, hogy a palackok még a növekedés megindulása előtt az automatába kerüljenek, mivel az automaták a növekedés során keletkezett CO₂ koncentrációjának változását képesek detektálni.

- laboratóriumba érkezéskor a minták alapos vizsgálata!

Vizsgálatok igazolják, hogy 10-14 órás szobahőn tárolás nem befolyásolja szignifikánsan a mikrobák tenyésztési esélyeit

A HK inkubálási ideje



- Bourbeau PP et al. J Clin Microbiol 2005;43:2506-2509

szokásos inkubálási ideje **5-7** nap

Relationship between incubation times for blood cultures (blood culture sets) and the detection of all bloodstream pathogens and all contaminating microorganisms.

Organism group	Incubation time, h													
	24		48		72		96		120		144		168	
	Patients without EC	Patients with EC	Patients without EC	Patients with EC	Patients without EC	Patients with EC	Patients without EC	Patients with EC	Patients without EC	Patients with EC	Patients without EC	Patients with EC	Patients without EC	Patients with EC
Pathogens and contaminating microorganisms	2343 (72.9)	144 (77.8)	534 (89.5)	26 (91.9)	175 (94.9)	8 (96.2)	92 (97.8)	1 (96.8)	47 (99.3)	2 (97.8)	21 (99.9)	4 (100)	3 (100)	...
Pathogens	2052 (76.5)	144 (77.8)	393 (91.2)	26 (91.9)	123 (95.8)	8 (96.2)	61 (98.1)	1 (96.8)	35 (99.4)	2 (97.8)	14 (99.9)	4 (100)	3 (100)	...
Contaminating microorganisms	291 (54.5)	...	141 (80.9)	...	52 (90.7)	...	31 (96.5)	...	12 (98.7)	...	7 (100)

NOTE. Data are absolute no. (cumulative %) of organisms isolated. EC, endocarditis.

Cockerill F R et al. *Clin Infect Dis.* 2004;38:1724-1730

A HK inkubálása

- A korábban speciális esetekben javasolt hosszabb inkubációs időt (*Brucella*, *Legionella*, az infektív endocarditis kórokozói közül a tápigényes HACEK csoport baktériumai (*Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, *Kingella*), ismeretlen eredetű láz esetén - 21 napos inkubációs idő) az újabb ajánlások nem javasolják. (Principles and Procedures for Blood Cultures; Approved Guideline. CLSI M47-A Vol. 27. No.17. 2007)
- Ha az inkubálási idő letelte után a hemokultúra palackok negatívak, és az infektív endocarditis gyanúja továbbra is fennáll, javasolt a palackok kioltása csokoládé táptalajra.
- A mycobacteriumok kitenyésztéséhez hosszabb inkubációs időre, 8 hétre van szükség. *M. xenopi* gyanú esetén 10 hét az ajánlott inkubációs idő.
- Immunszupprimált betegeknél megfontolandó a rutinszerűen alkalmazott 2 hetes inkubációs idő, gombainfekció gyanúja esetén 4 hét.

A növekedés detektálási ideje

N. of strains	Microorganism	Bactec TTD (h ' min)	Bact/Alert TTD (h ' min)
15	<i>E. coli</i>	9 '2	10 '46
15	<i>E. faecalis</i>	10 '25	12 '56
9	<i>H. influenzae</i>	12 '52	15 '08
10	<i>K. pneumoniae</i>	9 '10	11 '05
15	<i>P. aeruginosa</i>	13 '38	16 '28
10	<i>P. mirabilis</i>	11 '10	11 '58
10	<i>S. enterica</i>	9 '50	11 '43
15	<i>S. epidermidis</i>	17 '5	23 '20
15	<i>S. pneumoniae</i>	12 '17	15 '01
15	<i>S. aureus</i>	12 '19	14 '16
10	β -hemolytic streptococci	9 '40	12 '05
15	<i>Candida spp.</i>	29 '23	35 '11
11	<i>Bacteroides spp.</i>	28 '49	27 '55

[Use of simulated blood cultures for time to detection comparison between Bact/ALERT and BACTEC 9240 blood culture systems.](#)

Viganò EF, Vasconi E, Agrappi C, Clerici P.

Diagn Microbiol Infect Dis. 2002 Nov;44(3):235-40.

A növekedés detektálási ideje

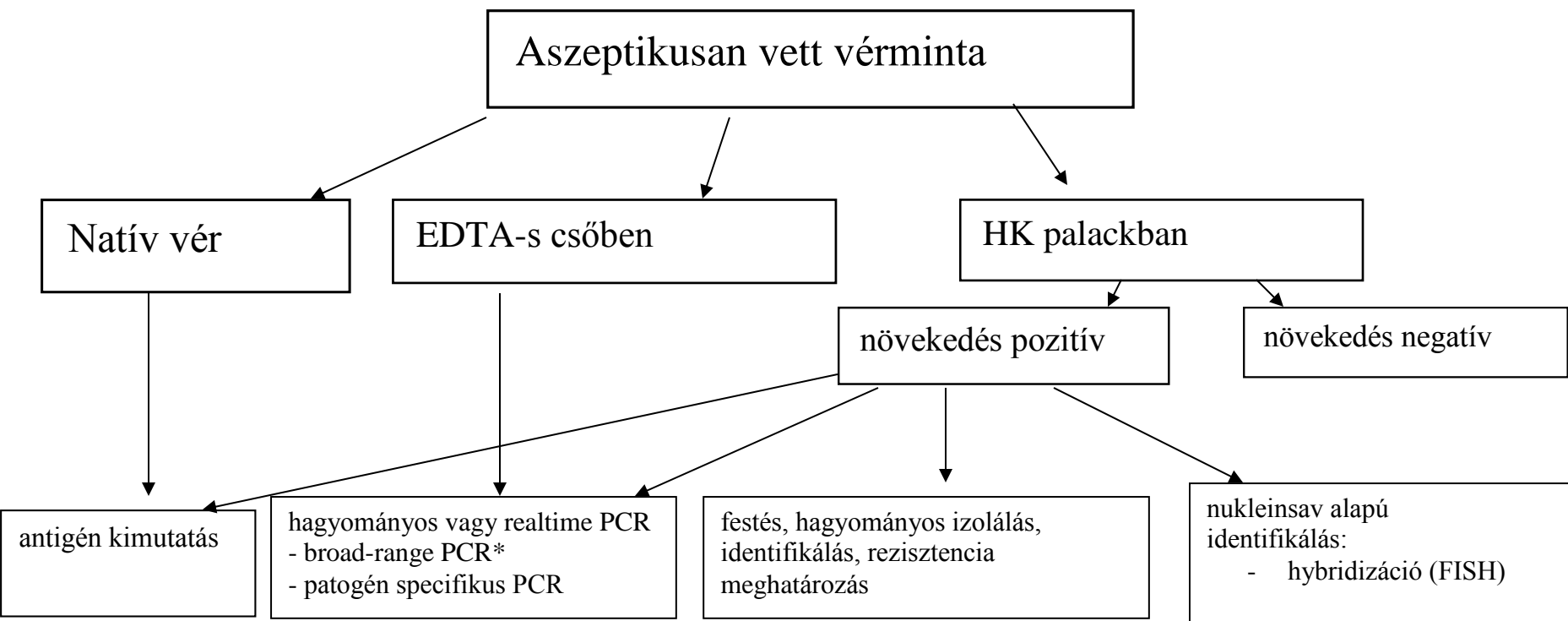
Strain	Cfu/ml	Bact/Alert (h'min)	Bactec (h'min)	Mycosis IC/F (h'min)
<i>C. albicans</i>	5	33'42	29'31	21'31
<i>C. albicans</i>	1	38'12	34'14	27'05
<i>C. albicans</i>	3	27	23'31	23
<i>C. albicans</i>	8	37'42	37'21	35'41
<i>C. albicans</i>	5	32'18	25'51	21
<i>C. albicans</i>	5	34'30	37'13	26'43
<i>C. krusei</i>	1	41'48	30'31	23'11
<i>C. krusei</i>	26	31'48	25'48	20'33
<i>C. parapsilosis</i>	1	39	34'21	32'41
<i>C. parapsilosis</i>	1	37'42	37'48	31'34
<i>C. parapsilosis</i>	16	35'30	32'11	28'31
<i>C. tropicalis</i>	40	30'48	26'28	21'47
Average		35	31'12	26

[Use of simulated blood cultures for time to detection comparison between Bact/ALERT and BACTEC 9240 blood culture systems.](#)

Viganò EF, Vasconi E, Agrappi C, Clerici P.

Diagn Microbiol Infect Dis. 2002 Nov;44(3):235-40.

A HK vizsgálat eredménye



Véráramfertőzések hagyományos és molekuláris diagnosztikája (Szakmai Irányelv - Mikrobiológiai szakmai kollégium)

A HK palackból közvetlenül végezhető vizsgálatok

- antigén kimutató módszerek
 - pl. *Streptococcus pneumoniae*, Lancefield típusoknak megfelelő streptococcusok (*S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *Enterococcus*), liquor diagnosztikájában használt antigén-tesztek (*N. meningitidis*, *H. influenzae/E.coli*)
- *S. aureus* azonosítás (koaguláz próba, latex-agglutináció)
- *C. albicans* „azonosítás” (csíratömlő-képzés)


- Alkalmazhatók kereskedelmi forgalomban kapható és/vagy megfelelően validált „home made” molekuláris vizsgálatok is.
 - FISH
 - Broad-range PCR és hibridizáció (egyres rezisztencia gének pl. *mecA*, *van*-gének meghatározására)

előnye, hogy az élő baktériumok identifikálása gyorsabb


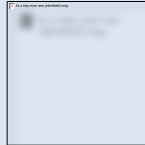
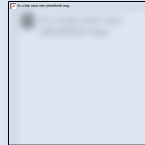
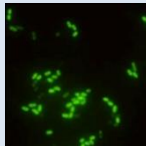
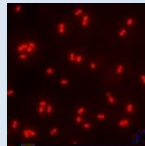
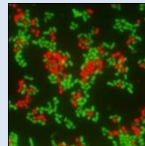
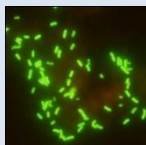

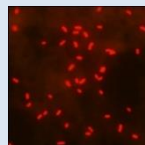
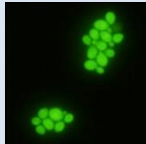
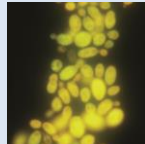
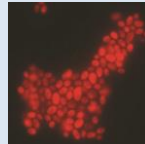
hátránya, hogy a kimutatás csak bizonyos patogénekre korlátozódik, az antibiotikum érzékenységi vizsgálat csak a szokásos módon kitenyésztett kórokozóval végezhető el

PNA FISH = Peptide Nucleic Acid Fluorescence In Situ Hybridization

Pozitív Hemokultúra
(8-12% Positive)



Gram festés

Gram festés	PNA FISH® 90 perc			
GPCC				~55%
GPCPC				~15%
GNR				~20%
Yeast				~5%

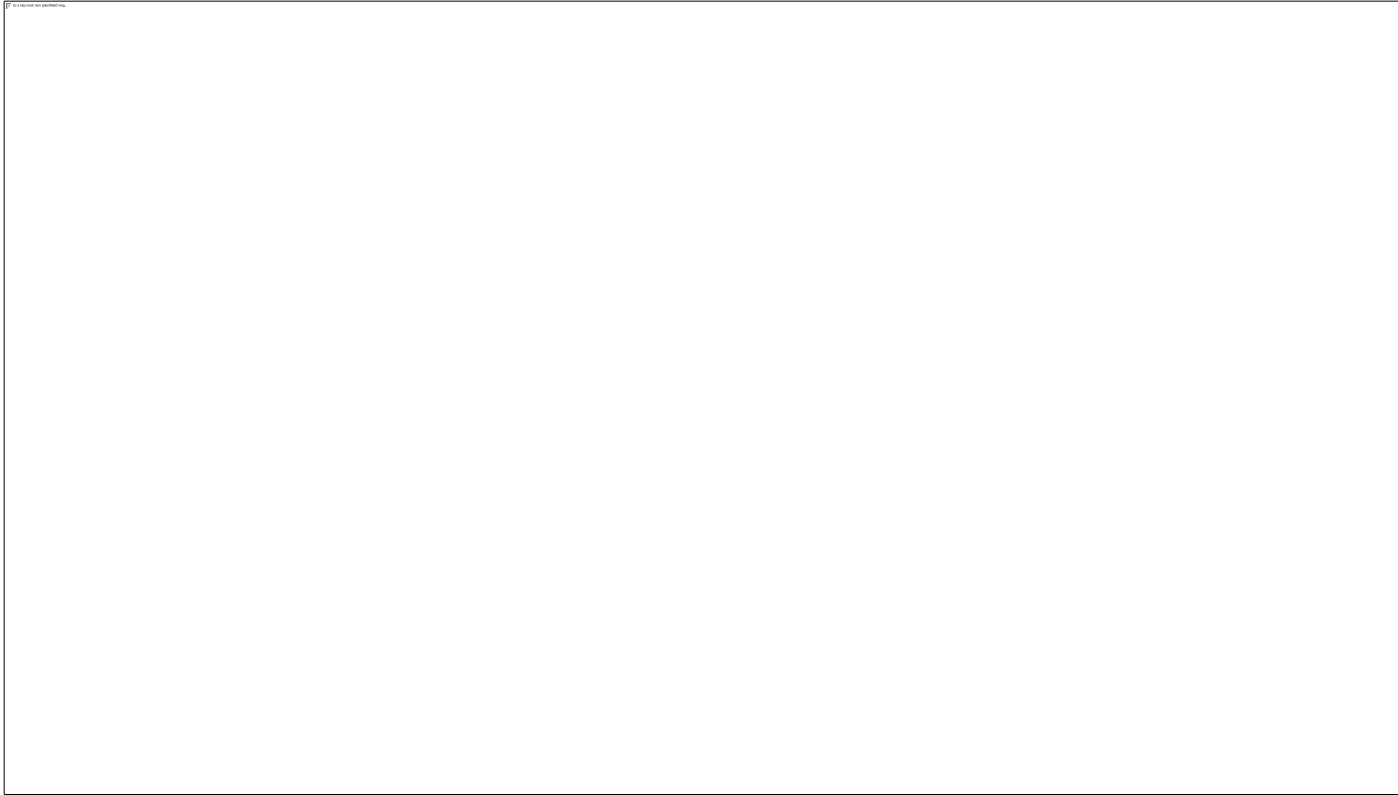
Assay	Manufacturer	Salient feature(s)	Detectable pathogens	Detection limit (CFU/ml)	Turnaround time (h)
Performed on positive blood culture bottles					
PNA-FISH	AdvanDX, Woburn, MA	Fluorescence-based hybridization with PNA probes	Different pathogen-specific kits available	NA	3
Hyplex BloodScreen	BAG, Lich, Germany	Multiplex PCR with subsequent hybridization on an ELISA plate	10 different pathogens and <i>mecA</i> gene	NA	3
Prove-it Sepsis	Mobidiag, Helsinki, Finland	Multiplex PCR with subsequent hybridization on a microarray	50 different pathogens and <i>mecA</i> gene	NA	3
Performed directly on whole blood					
SepsiTest	Molzym, Bremen, Germany	Broad-range PCR with subsequent sequencing	>300 different pathogens	20-40 for <i>S. aureus</i>	8 - 12
Vyoo	SIRS-Lab, Jena, Germany	Multiplex PCR with subsequent gel electrophoresis	>40 different pathogens and <i>mecA</i> , <i>vanA</i> , <i>vanB</i> , <i>vanC</i> , and <i>blaSHV</i> genes	3-10	8
LightCycler SeptiFast Test	Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ	Multiplex real-time PCR	25 different pathogens	3-30	6

Mancini et al. (Clin Microbiol Rev. 2010)

**Pozitív
hemokultúra =>
1 óra múlva
eredmény**

A HK palackból közvetlenül végezhető vizsgálatok

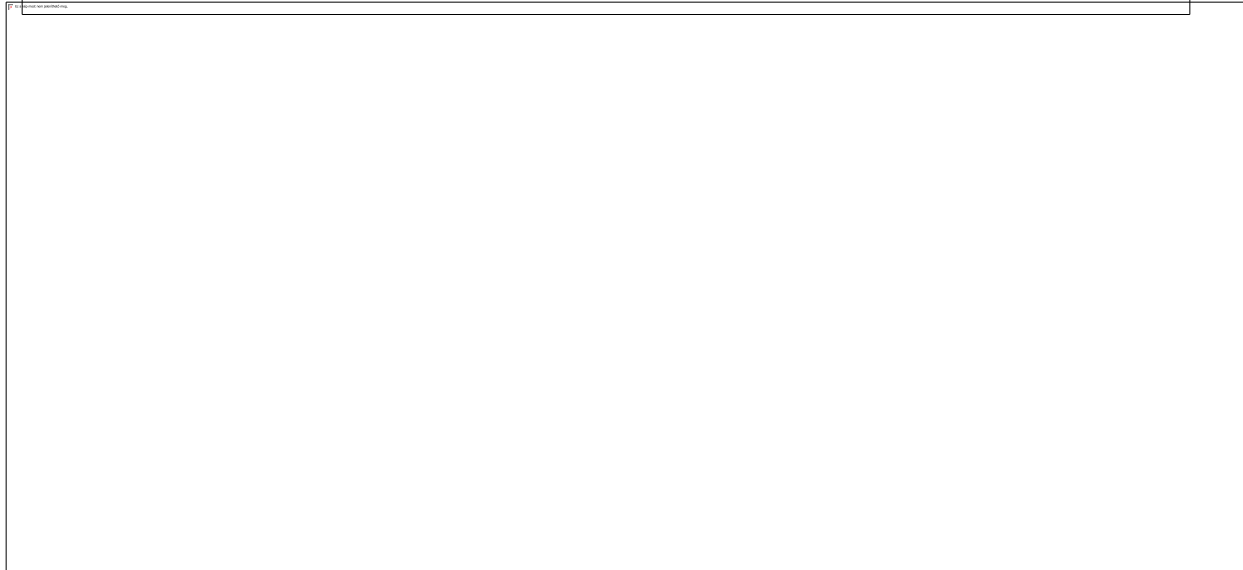
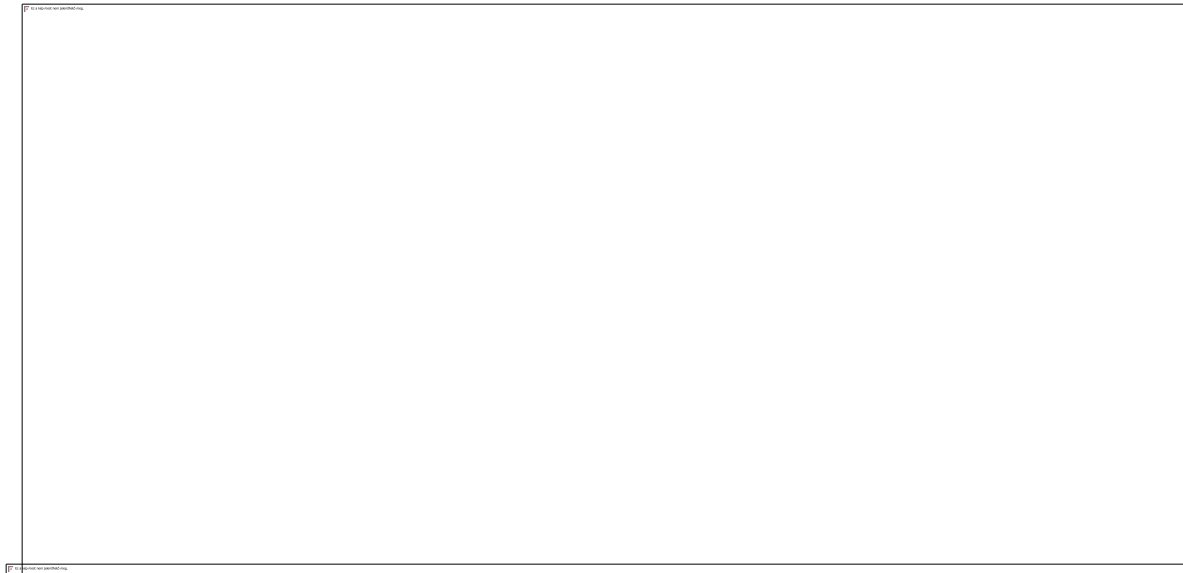
Automata/félautomata rendszerekkel identifikáló és érzékenységi vizsgálatok indítása



G. Gherardi et al. / Diagnostic Microbiology and Infectious Disease (2012)

-139 monobakteriális HK vizsgálata:

- **100% ill. 92.3%-a a Gram-negatívoknak volt beazonosítható**
- **75% ill. 43.75%-a a Gram-pozitívoknak**

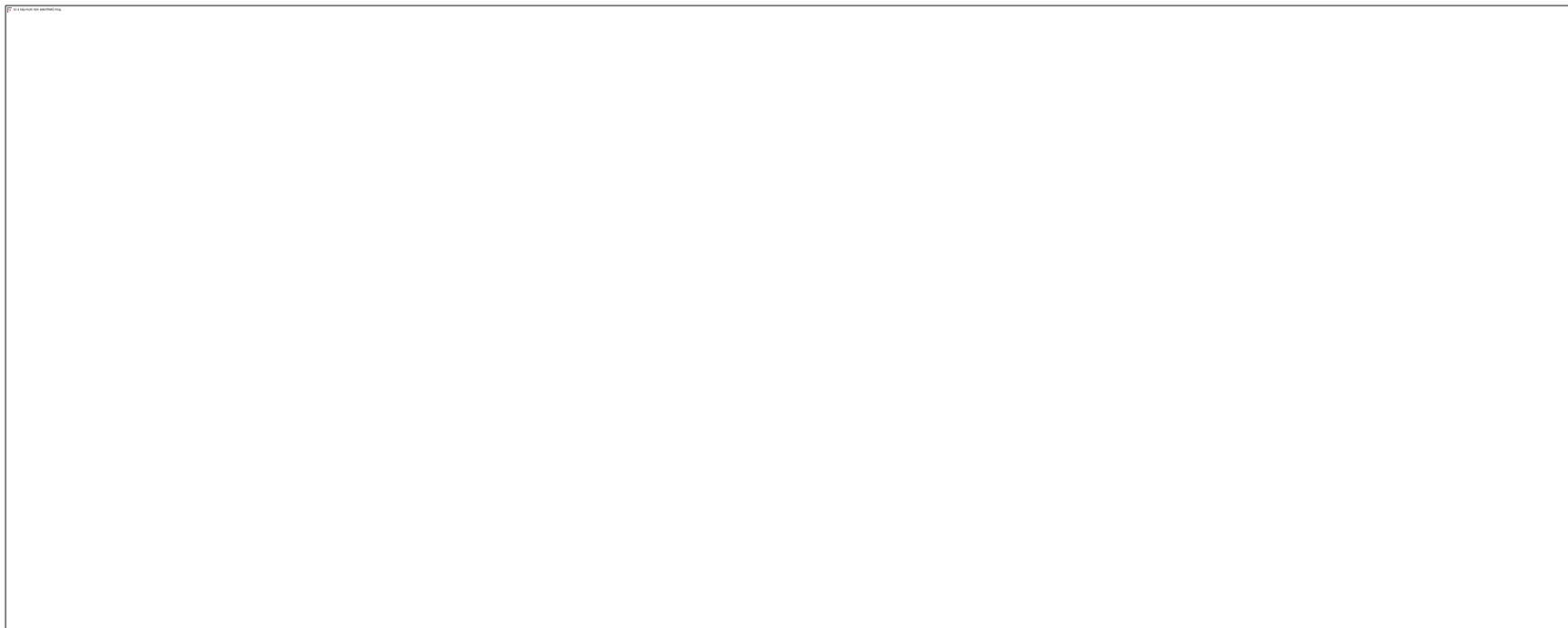


Antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok korrekt eredményt adtak:

- 99% ill. 96,7%-ban a Gram-negatívaknál

- 96.2% ill. 99.5% Gram pozitívaknál

Speciális rezisztencia tulajdonságú mikróbák érzékenységi vizsgálata



G. Gherardi et al.2012. 4. táblázat

MALDI-TOF + „Direkt érzékenységi vizsgálat”

[J Infect.](#) 2013 Apr 3. pii: S0163-4453(13)00070-4. doi: 10.1016/j.jinf.2013.03.014. [Epub ahead of print]

Evaluation of combined use of MALDI-TOF and Xpert® MRSA/SA BC assay for the direct detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* from positive blood culture bottles.

[Romero-Gómez MP](#), [Muñoz-Velez M](#), [Gómez-Gil R](#), [Mingorance J](#).

[Rapid identification of bacteria and yeasts from positive-blood-culture bottles by using a lysis-filtration method and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrum analysis with the SARAMIS database.](#)

Fothergill A, Kasinathan V, Hyman J, Walsh J, Drake T, Wang YF.

J Clin Microbiol. 2013 Mar;51(3):805-9. doi: 10.1128/JCM.02326-12. Epub 2012 Dec 19.

[Impact of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry on the Clinical Management of Patients With Gram-negative Bacteremia: A Prospective Observational Study.](#)

Clerc O, Prod'hom G, Vogne C, Bizzini A, Calandra T, Greub G.

Clin Infect Dis. 2013 Apr;56(8):1101-7. doi: 10.1093/cid/cis1204. Epub 2012 Dec 21.

[Identification and susceptibility testing of microorganism by direct inoculation from positive blood culture bottles by combining MALDI-TOF and Vitek-2 Compact is rapid and effective.](#)

Romero-Gómez MP, Gómez-Gil R, Paño-Pardo JR, Mingorance J.

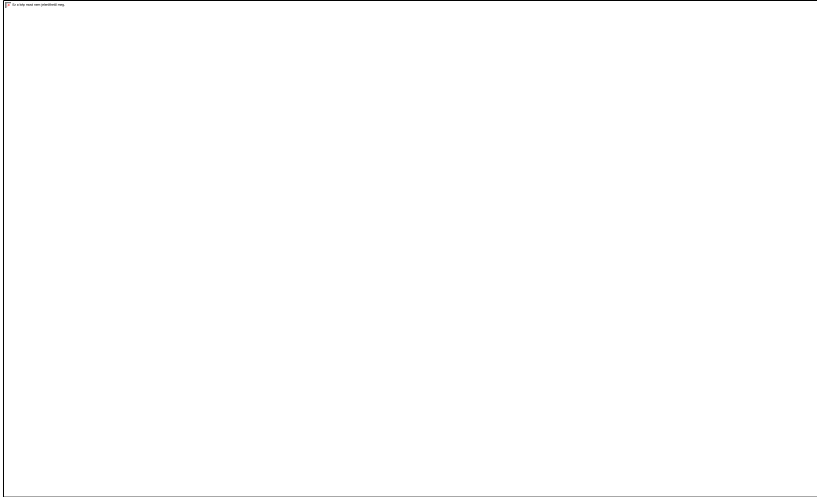
J Infect. 2012 Dec;65(6):513-20. doi: 10.1016/j.jinf.2012.08.013. Epub 2012 Aug 30.

[Identification of blood culture isolates directly from positive blood cultures by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and a commercial extraction system: analysis of performance, cost, and turnaround time.](#)

Lagacé-Wiens PR, Adam HJ, Karlowsky JA, Nichol KA, Pang PF, Guenther J, Webb AA, Miller C, Alfa MJ.

J Clin Microbiol. 2012 Oct;50(10):3324-8. doi: 10.1128/JCM.01479-12. Epub 2012 Aug 8.

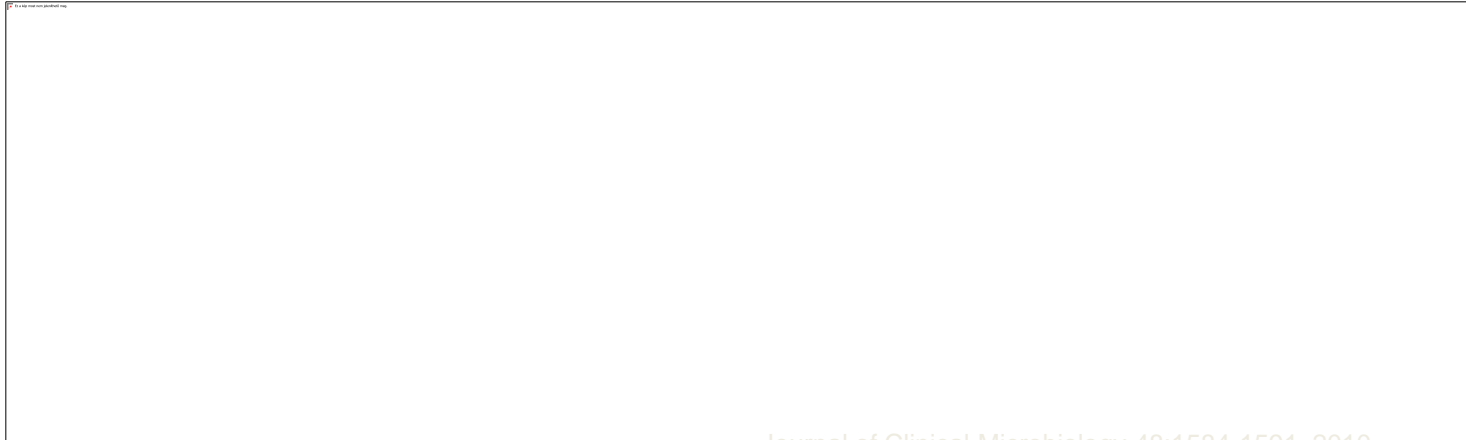
MALDI-TOF MS alkalmazási lehetőségei – Hemokultúra



Journal of Clinical Microbiology 51;805-809, 2013

Szeeparálás

- Különböző protokollok
- lízis/centrifugálás

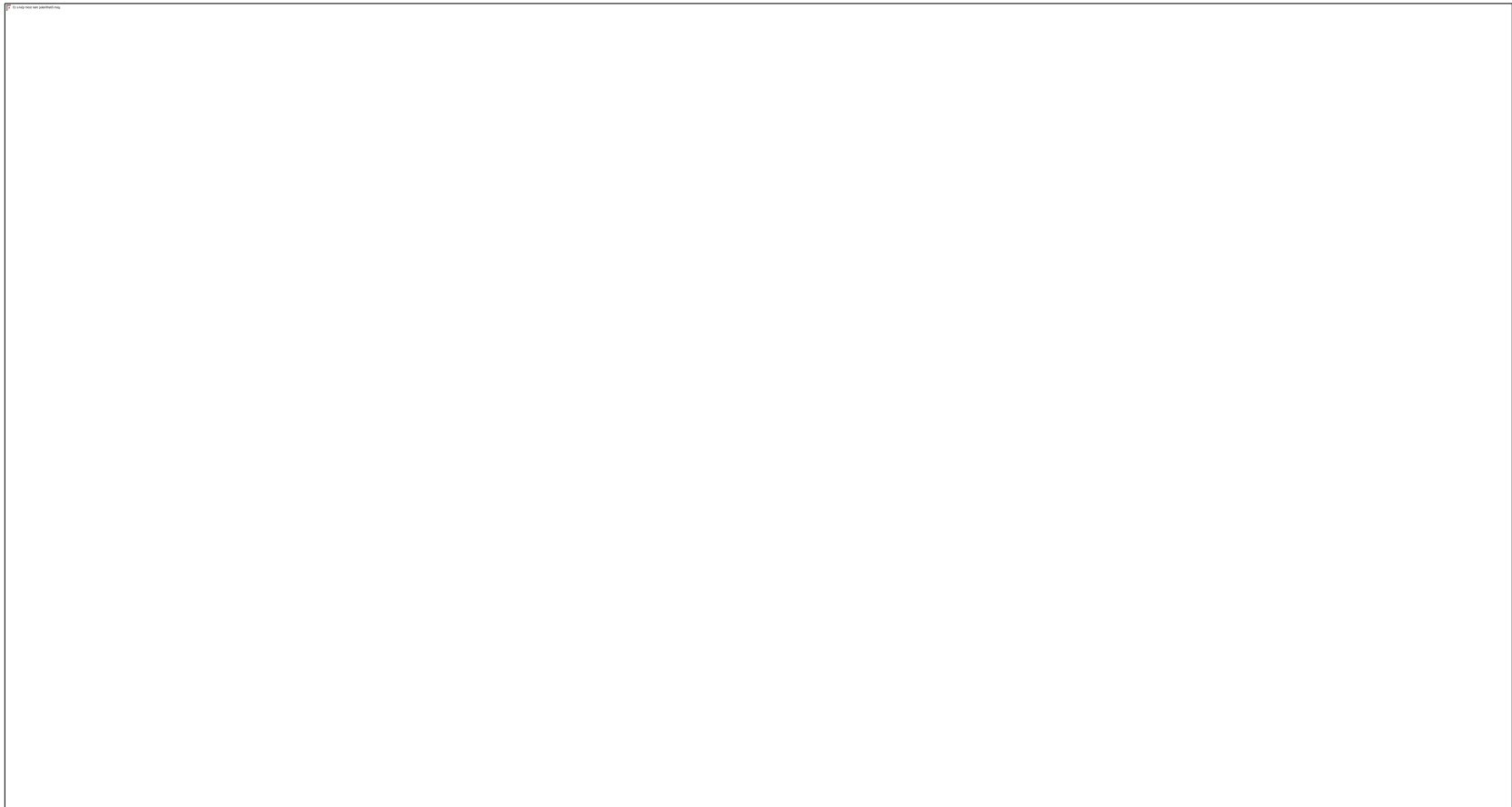


Journal of Clinical Microbiology 48;1504-1504, 2010

Bruker
Sepsityper
Kit

MALDI-TOF MS – Hemokultúra

- Probléma
 - A vérmintában lévő humán fehérjék interferál(hat)nak a bakteriális és gomba proteinekkal – el kell távolítani
 - Szükséges baktérium mennyiség: $\sim 10^7$ /mL
 - Polimikróbás fertőzés - Gram kenet?/ technika fejlesztése
 - Hemokultúrás palack széntartalma
- Jó eredmények
 - 80-96 %-ban korrekt eredmény
 - Kevésbé jó sarjadzó gombák, bizonyos gram-pozitív baktériumok esetén
 - Genus-szintű azonosítás (cut-off < 2 elfogadása)



IDŐ!

Outcome	Preintervention Cohort (n = 100)	Intervention Cohort (n = 101)	P
Hospital length of stay	11.9 ± 9.3	9.3 ± 7.6	.01
Hospital length of stay after BSI onset	9.9 ± 7.1	8.1 ± 6.4	.01
ICU length of stay	7.3 ± 8.5	6.3 ± 8.7	.05
ICU length of stay after BSI onset	6.1 ± 6	4.9 ± 6.7	.09



Egyéb lehetőségek

- Mikróbák direkt kimutatása egyéb klinikai mintából
 - vizelet
 - liquor
- Mikróbák azonosítása speciális dúsítókból
 - pl. salmonella
- Antibiotikum rezisztencia mechanizmusok
FENOTÍPUSOS
AZONOSÍTÁSA
 - β -laktamázok
 - karbapenemázok
- Speciális rezisztenciával rendelkező mikróbák azonosítása – „klonalitás” alapján
 - MRSA
 - B. fragilis
 - C. difficile

A HK vizsgálat érzékenysége és fajlagossága

Az érzékenységet alapvetően a véráram infekció természete szabja meg

- A HK pozitivitása
 - pl. endocarditisben 53-99%,
 - *S. pneumoniae* pneumoniában 25-30%,
 - neutropeniás betegek lázas epizódjában 10-20%,
 - hasúri fertőzésekben 30-40%
- Az érzékenységet az egy napon vett vérminták számának növelésével lehet maximalizálni úgy, hogy vénapunkciónként legkevesebb 10 ml vért vesznek.
-
- A 24 órán belül történt 2-3 vérvételt követően végzett további meggondolatlan HK ismétlések csak jelentéktelen mértékben növelik a pozitivitást, viszont munka- és költségigényesek, ezért nem ajánlott

A HK eredményének interpretálása

Szignifikáns

Staphylococcus aureus

Enterobacteriaceae spp.

Pseudomonas aeruginosa

Streptococcus pneumoniae

Streptococcus A és B csoport

Haemophilus influenzae

Neisseria meningitidis

Listeria monocytogenes

Salmonella spp.

HACEK csoport

Anaerob Gram-negatív baktériumok

Clostridium spp.

Candida spp.

Az esetek egy részében szignifikáns

- Enterococcusok 80%
- *Streptococcus* α -hemolizáló 40-60%
- *Staphylococcus* koaguláz-negatív 20-40%

Általában kontamináns

- *Staphylococcus* koaguláz-negatív
- *Micrococcus* spp.
- *Corynebacterium* spp.
- *Propionibacterium* spp.
- *Bacillus* spp.

A HK fajlagosságát a hamis pozitív izolátumok aránya határozza meg

- Az otthon szerzett infekciókban a valódi kórokozók és a kontaminánsok spektruma jól elkülöníthető.
- A nozokómiális infekciókban, az immunszupprimált betegek infekcióiban olyan baktériumok lehetnek valódi kórokozók, amelyek az „egészségesekben” (immuncompetens személyekben) kontaminánsnak minősülnek.
- A fajlagosság javításának legfontosabb módja a mintavételi előírások, kiemelten az aszepszis szigorú betartása, valamint annak megkövetelése, hogy többszörös mintavétel történjék olyan véráram fertőzésben, amelyben a lehetséges kórokozók és a lehetséges kontaminánsok ugyanazok (pl kanüllel, műanyag eszközzel kapcsolatos infekciók, neutropeniás láz).

Két-három vénapunkció során nyert HK rendszerint elegendő a véráram infekció bizonyítására vagy kizárására, egyetlen vérminta azonban elégtelen.

Nem tenyésztéses vizsgálatok

- Antigenkimutatás natív vérből megkísérelhető *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*/*Escherichia coli* K1, *Streptococcus agalactiae*, *Haemophilus influenzae* gyanúja esetén a liquordiagnosztikában használatos antigenkimutató kittel
- Molekuláris biológiai technikák
 - Species-specifikus real-time kvantitatív PCR a *Neisseria meningitidis* DNS-kimutatására
 - broad-range real-time PCR: Gram-pozitív, Gram-negatív baktériumok és gombák kimutatására (a csoportokon belül a klinikailag legfontosabb speciestek), egyes rezisztencia gének pl. *mecA*, *van*-gének meghatározására

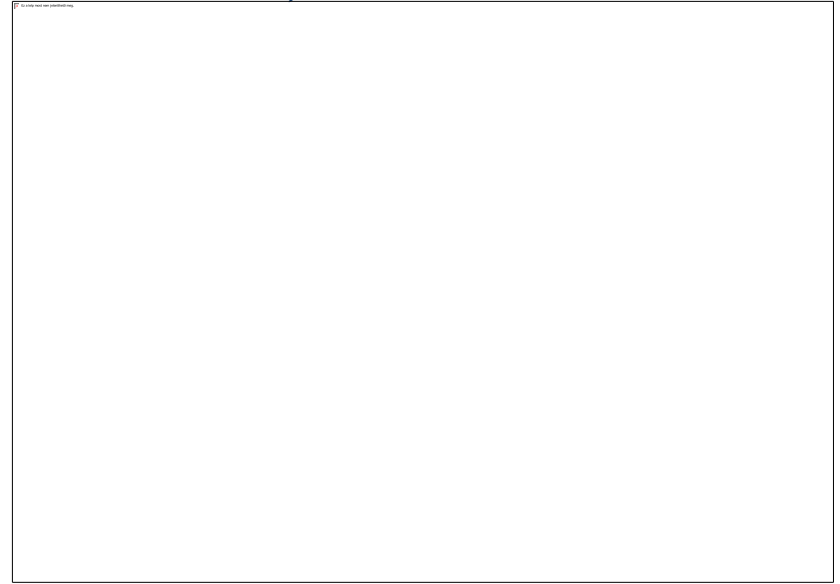
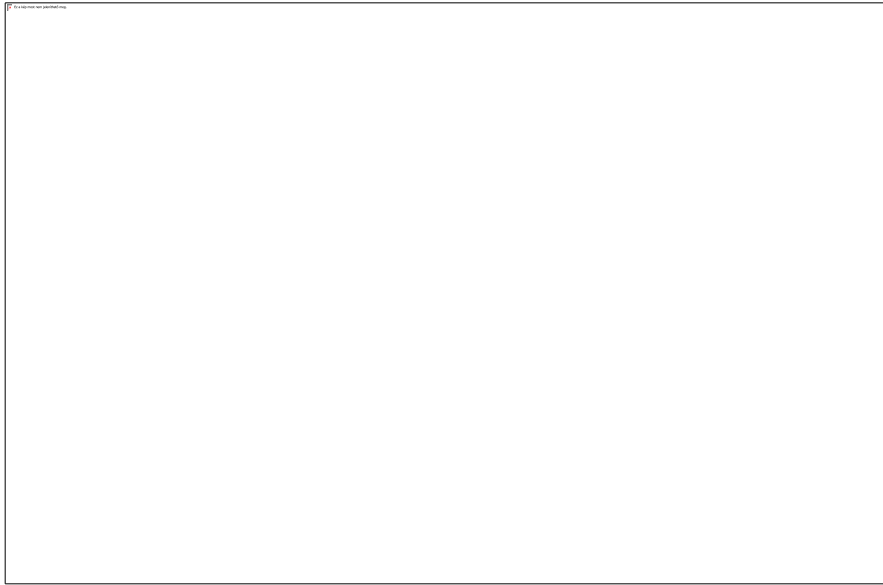
Előny:

detektálás gyors,
nem befolyásolja a mintavétel idején alkalmazott antibiotikum terápia,
mennyiségi meghatározásra is van lehetőség

Hátránya:

nem élő baktériumot, hanem csupán bakteriális DNS-t mutatunk ki,
az antibiotikum érzékenység/rezisztencia vizsgálata csak egyes rezisztencia gének kimutatására korlátozódik,
a minta kontaminálódásával számolni kell,
zavaró lehet a háttér bakteriális DNS a vérben

Alsó légúti minták (BAL, EA, PSB) - Gram kenet



- Is the Gram Stain Useful in the Microbiologic Diagnosis of VAP? A Meta-analysis (O'Horo et al. CID 2012)
- **Szenzitivitás : 0.79** (95% confidence interval [CI], .77–0.81; $P < .0001$)
 - **Specificitás : 0.75** (95% CI, .73–.78; $P < .0001$).
 - **NPV : 91%**
 - **PVV : 40%**
 - Tenyésztés = kenet (Cohen's Kappa statistic (κ); 0.31–0.60 mérsékelt egyezés)
 - Gram-pozitív baktérium \Rightarrow 0.42
 - Gram-negatív baktérium \Rightarrow 0,34

Alsó légúti minták (BAL, EA, PSB) - Gram kenet

Citológiai értékelés (FVS, LHS, bronchus-hámsejtek)

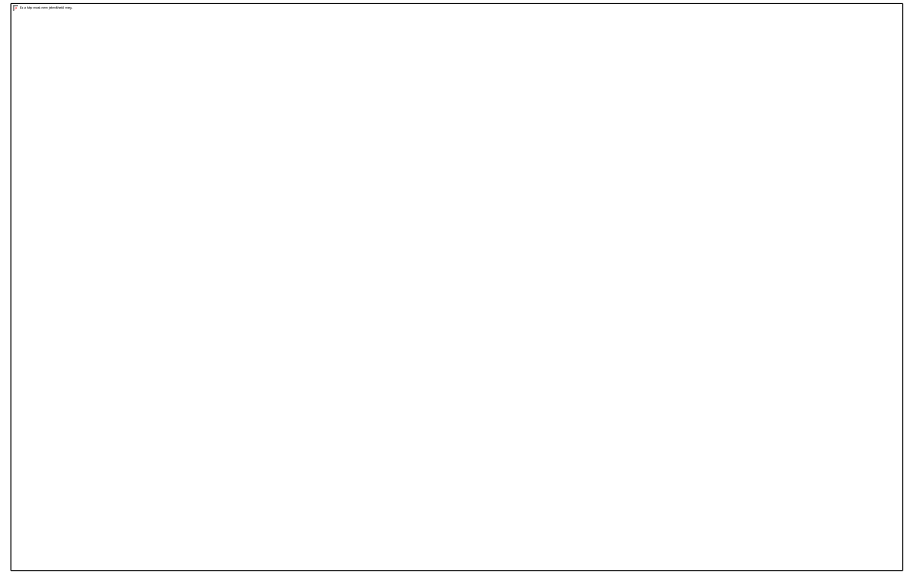
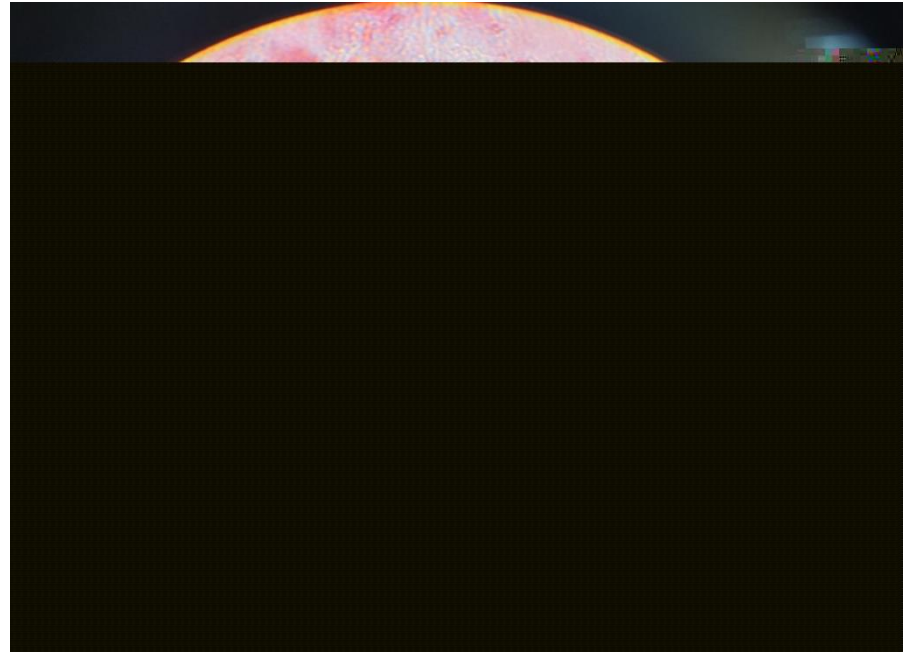
Bakteriológiai értékelés (Gram negatív/pozitív, morfológia)

Szenzitivitás: (10^3), 10^4 CFU/ml

Specifitás:

Oropharyngeális flóra kontamináció
Antibiotikum-kezelés

Klinikusi (végleges) döntés
=> Tenyésztés eredménye alapján



Alsó légúti minták (BAL, EA, PSB) - Tenyésztés

- **Kvantitatív eredmény +/- kontamináció kérdése**

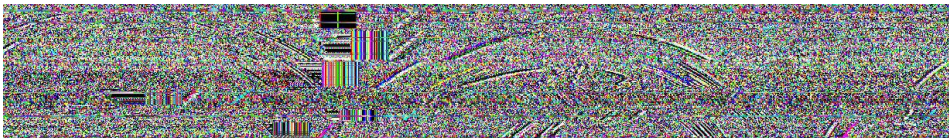
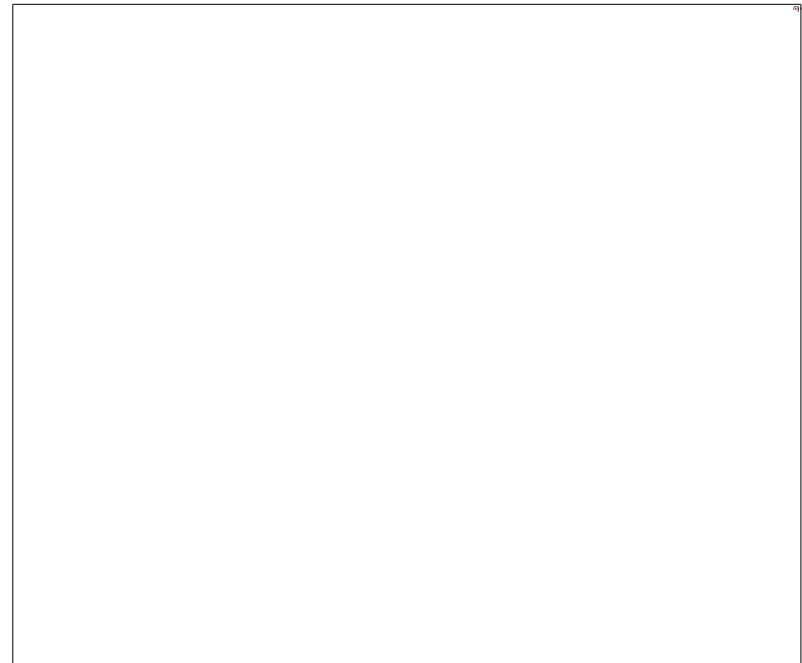
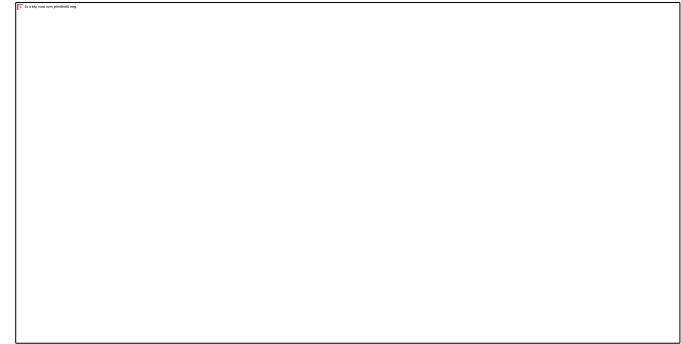
Köpet (endotracheális tubus): $> 10^5$ (10^7) CFU/ml

BAL : $\geq 10^4$ CFU/ml

PSB : $\geq 10^3$ CFU/ml

- Befolyásoló tényezők:

- Antibiotikum-terápia
- Mikróbák biológiai tulajdonságai
(24 – 48 (72) h tenyésztési idő)



Mikróba identifikálás

Hagyományos tesztek (virulencia faktorok, biokémiai tulajdonságok): percek-napok

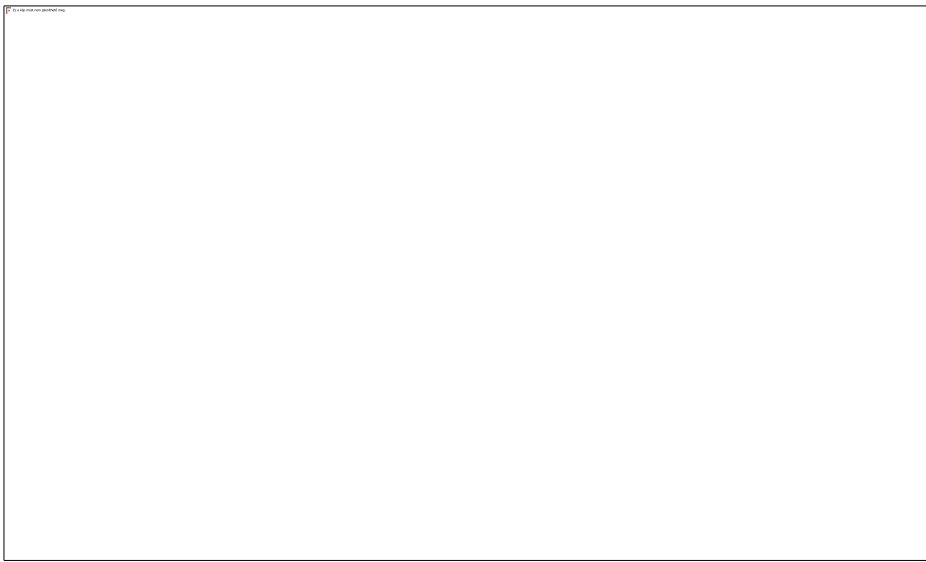
MALDI-TOF MS
(matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry) : percek

Kórokozó ismerete = intrinsic rezisztencia tulajdonság ismerete

Kórokozó mikroba ismerete => intrinsic rezisztencia + helyi
epidemiológiai adatok ismerete alapján terápia



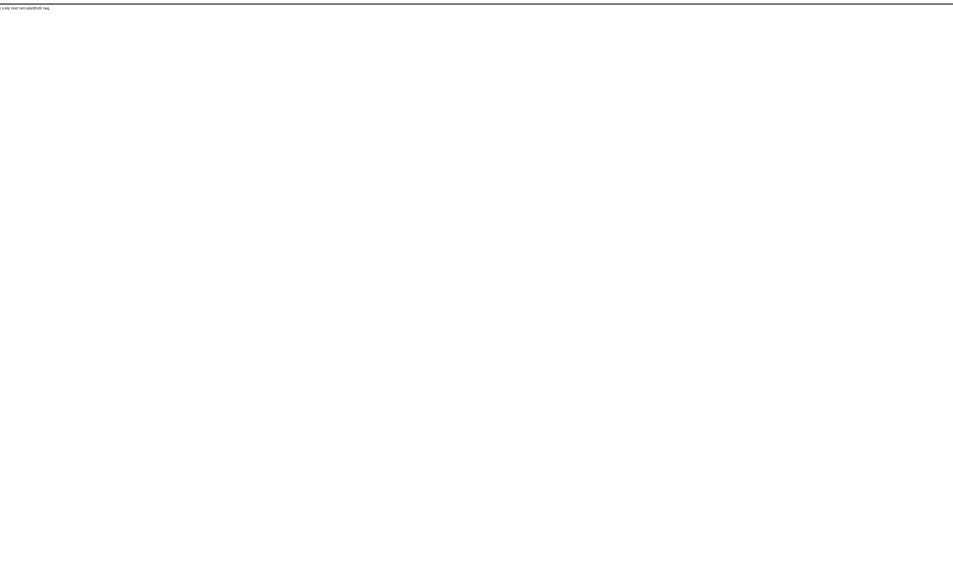
Alsólégúti mintákból izolált patogének gyakorisága
– intenzív osztály/nem intenzív osztály, területi betegeknél
(LMI KMDL, 2015)



Staphylococcus aureus – ok érzékenysége (%)



Enterobacteriaceae fajok érzékenysége (%)



Pseudomonas aeruginosa izolátumok (É %)



Streptococcus pneumoniae izolátumok (É %)

POCT vizsgálatok

Jelen: Agglutinációs, immun-kromatogén vizsgálatok

Jövő: RT amplifikáción alapuló, un. cartridge-based tesztek

- Mikróba, mint antigén kimutatásán alapuló tesztek
 - Módszer: agglutináció, immunokromatográfia
 - Példák: *Adenovírus*, *rotavírus*, *Influenza A,B*, *RSV*, *L. pneumophila 1*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *Plasmodium spp.*, *C. difficile*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Cryptococcus neoformans*, *H. capsulatum*
- Eredményt befolyásolja
 - mintavétel (tünetek megjelenéséhez képest mikor történik, milyen mennyiségű)
 - a teszt szenzitivitása
 - a beteg életkora

Malaria P.f. RDT Results

NEGATIVE RESULTS



POSITIVE RESULTS



INVALID RESULTS *



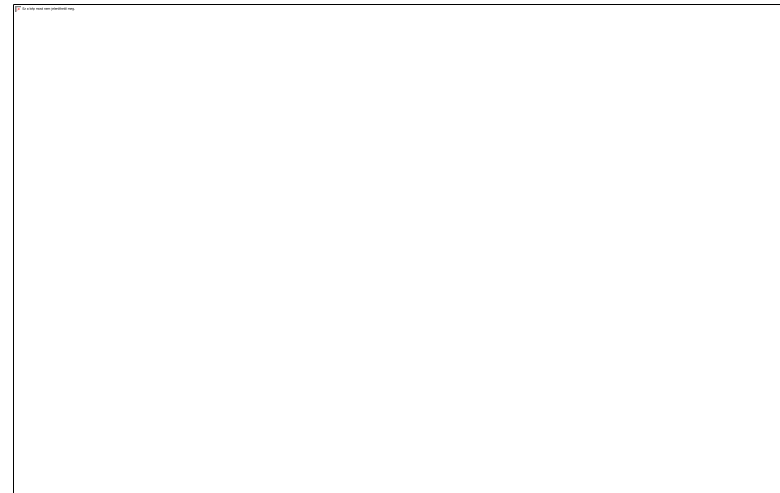
Wait 15 minutes
before reading
results.

* No Control Lines (repeat tests)

Streptococcus pneumoniae „gyorsteszt” – vizeletből (20 perc)

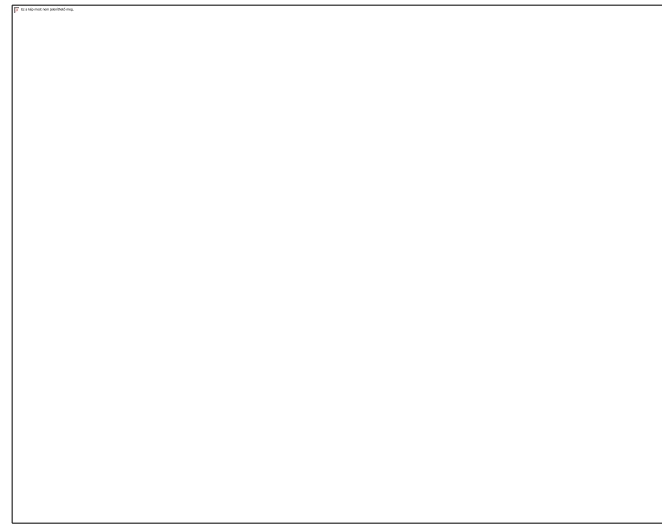
- *S. pneumoniae* (minden szerotípus) sejtfalában lévő C poliszaccharidot mutatja ki
 - **Szenzitivitás: 36-86%** (szeptikémiában magasabb)
 - **Specificitás: 89-95 %**
 - Negatív eredmény nem zárja ki a fertőzést

 - < 5 év nem javasolt (hordozó)
 - Vakcina után 2 napig pozitív (>5 nap)
 - Atb.kezeltekre nem validáltak
- a tesztek (3 napig +?)



Legionella pneumophila

„gyorsteszt” – vizeletből



- **1. szerotípust** mutatja ki (80-95%)
(némi keresztreakció van a többi szerotípussal is, ill. más Legionella fajjal)
- A betegek 80 %-ánál lesz a vizeletben excretált Ag
- **Szenzitivitás: 55.5-66.6% - 86.6-91.6% (cf. vizelet)**
 - Minél súlyosabb állapotú a beteg, annál magasabb
- **Specificitás: > 99 %**
- Negatív eredmény nem zárja ki a fertőzést
 - Első 5 nap negatív lehet! – ismétlés harmadik napon a szenzitivitást 10%-al növeli
- Adekvát terápia mellett/után is napokig/hetekig pozitív lehet (~ 2hét)
- Pozitív eredmény = jelenlegi fertőzés (nem biztosan akut)

Molekuláris vizsgálatok – tenyésztés helyett

Molekuláris, nukleinsav alapú tesztek főleg a **virológiában** terjedtek el

- Immundeficiens betegek
(enterovírus meningitis, HSV, EBV, HHV6, CMV fertőzés)
- RSV (labil)
- Coronavírus (nem tenyészthető)
- Variola (veszélyes)
- Dengue vírus
- Fajon belüli azonosítás (pl. HIV-1-n belüli min. mutációk igazolása; HPV 16,18)
- Terápia alkalmazhatóságához igazolni azon betegeket, akiknél sikerre lehet számítani (pl. maraviroc)
- Rezisztencia vizsgálat nem rutin, de van rá lehetőség
 - Ganciclovir R
- Kvantitatív mérés => beteg követésére alkalmas (betegség aktivitása, progresszió, terápia nyomonkövetése)
 - Multiplex assay-k (RT-PCR) – légúti vírusfertőzések

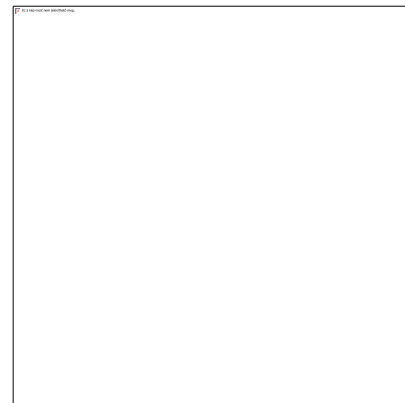
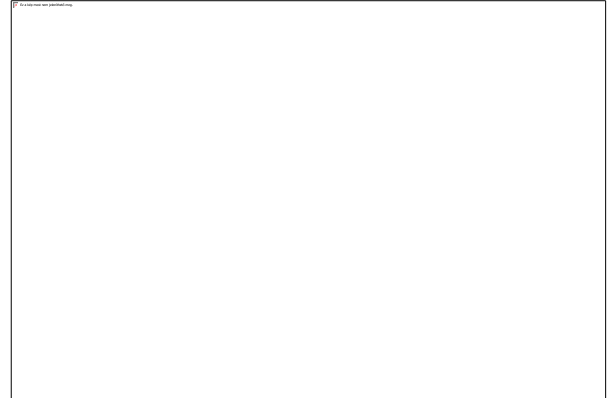


Vírusfertőzések diagnosztikai lehetőségei

- Felnőttek CAP : ~ 30%
- Gyermekek CAP: ~ 70%
- Primer, vagy szekunder (bakteriális) pneumonia

- Respiratory syncytial virus
- Influenza A és B vírus
- Parainfluenza vírus
- Adenovírus...

- Diagnosztika:
 - Antigénkimutatás: IF, EIA, immunkromatográfiás (szensitivitás:50->90%)
 - Tenyésztés
 - Antitestek kimutatása
 - PCR (főleg immunledáltak)



Molekuláris vizsgálatok – tenyésztés helyett

Validált molekuláris biológiai technikák bakteriológiában

- Species-specifikus real-time kvantitatív PCR, broad-range real-time PCR korábban nem azonosított mikrobák azonosítási lehetősége (pl. *Tropheryma whipplei*)
 - Nehezen tenyésztethető (vagy hosszú tenyésztési idejű) mikrobák azonosítása (pl. *Chlamydia trachomatis*, Mycobacteriumok, Legionella pneumophila)
 - „Kritikus” kórokozók pl. *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*
 - Diagnosztikai specificitást növelő hatás pl. *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*
- Előny: gyors, nem befolyásolja a mintavétel idején alkalmazott antibiotikum terápia, mennyiségi meghatározásra is van lehetőség,
 - Hátránya: nem élő baktériumot, hanem csupán bakteriális DNS-t mutatunk ki, az antibiotikum érzékenység/rezisztencia vizsgálata csak egyes rezisztencia gének kimutatására korlátozódik, a minta kontaminálódásával számolni kell, zavaró lehet a háttér, ha változik a target fals eredményt kapunk

Infekció specifikus multiplex PCR-k száma folyamatosan bővül

Néhány példa

módszer	gyártó	Klinikai minta	Elérhetőség
GI-panel	Luminex	Széklet, vér	Igen
Septi-fast	Roche	Vér	Igen
Unyvero	Curetis	Légúti minta	Fejlesztés alatt
Film array	Idaho	Légúti minta	Igen
Magicplex	Seegene	vér	igen

A szepszis etiológiája:

emelkednek a rezisztens kórokozók által okozott
infekciók mind a nozokomiális, mind a közösségben
szerzettek esetében

MRSA

MRSE

PRSP

VRE

ESBL

multirezisztens *Pseudomonas aeruginosa*(**MRPAE**)

multirezisztens *Acinetobacter* (**MACI**)

multirezisztens *Stenotrophomonas maltophilia*(**MRST**)

CRE

Antibiotikum érzékenységi vizsgálat (AST) - kivitelezése és interpretálása döntő lehet

- **Korongdiffúzió**

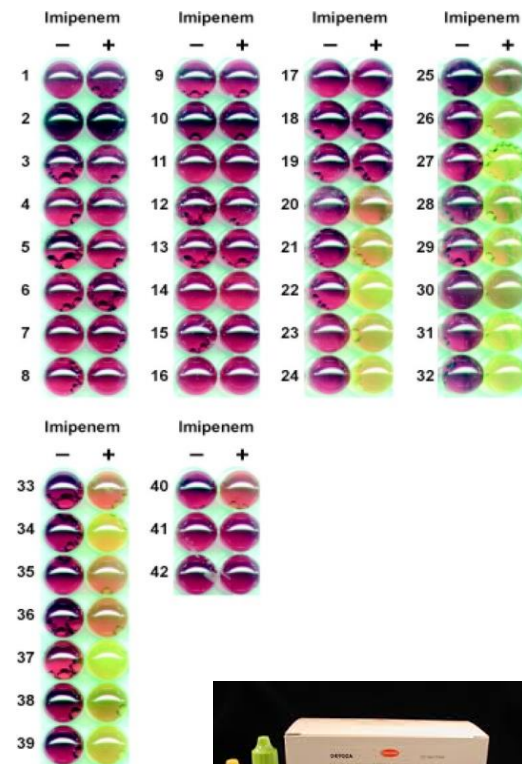
- 16-20 (44) h, nem minden mikroba vizsgálható
- É – MÉ – R

- **MIC érték meghatározása, interpretálása**

- 16-20 (44) h
- Antibiotikum dozírozás befolyásolása?
- Egyedi antibiotikum-terápia „vezetés”

- **Szerzett rezisztencia-tulajdonság fenotípusos szűrése/igazolása**

- Kiegészítő tesztek alkalmazása
 - Inhibitoros vizsgálatok (+ 1 nap)
 - β -laktám antibiotikumok bontására képes enzimek direkt kimutatása (nitrocefin, β -lacta teszt, Carba-NP teszt, MALDI-TOF MS, CIM teszt) (3 h – 16 h)



Molekuláris vizsgálatok rezisztencia gének kimutatására – tenyésztés helyett /mellett

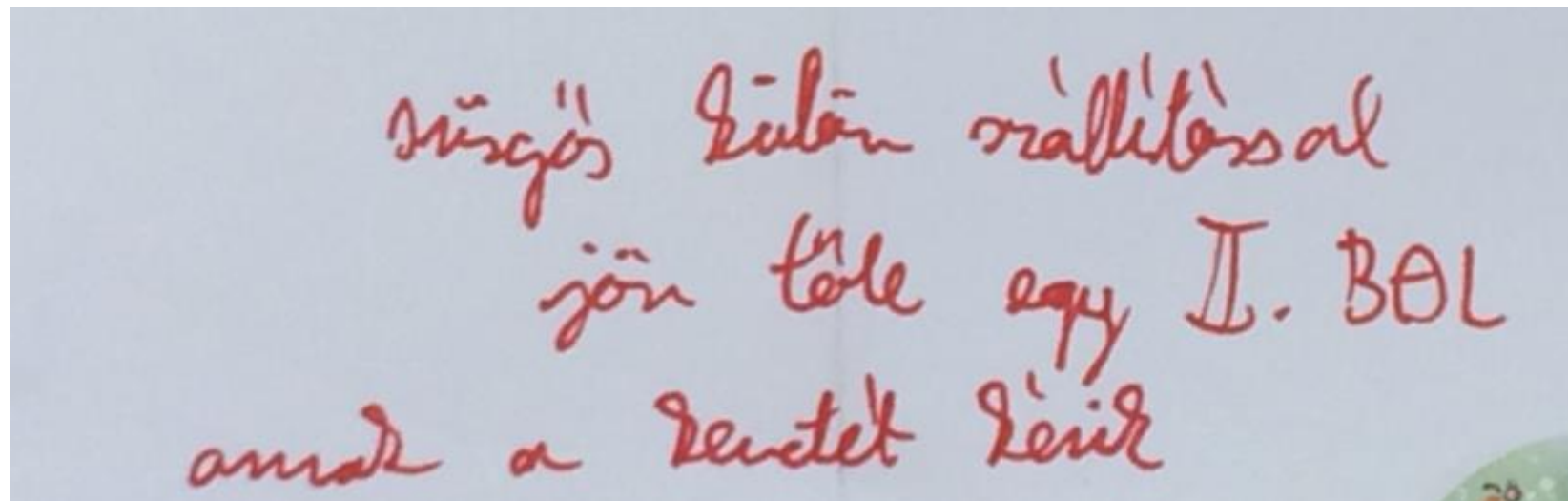
- Rezisztencia gének direkt detektálása lehetséges, ha „biztos” összefüggés van a gén jelenléte és a fenotípusos rezisztencia között
 - Pl. *mecA*, *vanA*, *vanB*
 - ? *bla*_{TEM}
- Kivételes, problémát jelentő rezisztencia gének kimutatása lehet cél
 - Standard terápia nem fog működni
 - Kórházhygiénés, járványügyi szempontból jelentős
 - CRE
 - MRSA
 - VRE
 - ESBL
- Individuális kezelésben nagyobb a jelentősége, mint az atb stewardship-ben
- Kromoszomális rezisztencia gének kapcsolhatók az identifikáláshoz, plazmidosak nem
 - Nem steril helyről származó klinikai minta fals eredményt adhat
- /párhuzamos vizsgálat az egyéb laboratóriumi vizsgálatokkal – laborköltséget növeli – a költségcsökkentő hatás máshol jelentkezik/

Terápia negatív molekuláris eredményen nem alapulhat



"The results of your tests were negative. Get lost!"

Legfontosabb => információcsere



Köszönöm a figyelmet!