

Sepsa grzybicza w chirurgii onkologicznej

Maria Szymankiewicz
Zakład Mikrobiologii, Centrum Onkologii im. prof. F. Łukaszczyka w
Bydgoszczy
03 Październik 2019, Elk

*SEPSA – zagrażająca życiu dysfunkcja narządów spowodowana niewłaściwą
(rozregulowaną) reakcją organizmu na zakażenie*

*Stan zagrażający życiu, który powstaje, gdy reakcja organizmu na zakażenie uszkodza
własne tkanki i narządy
JAMA, 23.02.2016*

*Europejskie Towarzystwo Intensywnej Terapii (European Society of Intensive Care
Medicine, ESICM)
Międzynarodowe Towarzystwo Intensywnej Terapii (Society of Critical Care Medicine,
SCCM)*

...In the last two years, more topics have been written about sepsis than in the former ten...

...The actual epidemiology of sepsis is currently unknown and extremely variable, since it will depend on what we are analyzing, from incidence or prevalence to mortality. The incidence of sepsis will depend on the definitions we make of it. Recently, these definitions have changed, with many controversies and we do not have any study that evaluated their impact on incidence...

Candel FJ et al. Current aspects in sepsis approach. Turning things around. Rev Esp Quimioter 2018 Aug; 31(4): 298–315

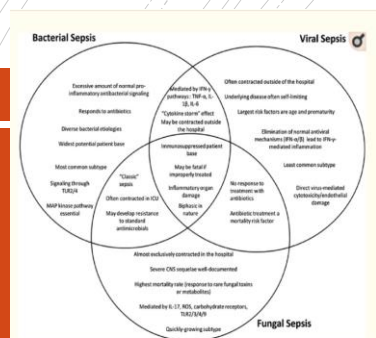


Figure 1.

A pictorial representation of the similarities and differences in mechanism, circumstances, and patient base between the three major types of pathogenic sepsis. The best-known mechanisms for each sepsis type are represented, although these molecules and mechanisms are not universal. CNS indicates central nervous system; IFN, interferon; IL, interleukin; ROS, reactive oxygen species; TLR, toll-like receptor; TNF, tumor necrosis factor.

Dolin HH et al. Microbiol Insights (2019), doi:10.1177/1178636118825081

Sepsa grzybicza

- Stanowi 17,5% przypadków sepsy w USA
- Śmiertelność sięga 40-60,0%
- 93,0% przypadków nabywanych w szpitalu, z czego 80,0% chorych otrzymuje wcześniejsze leczenie empiryczne
- Powikłania po sepsie grzybiczej - *Candida* i *Aspergillus* – nacieki w płucach - pogorszenie stanu we współistniejących chorobach (POCHP i astma)
- W leczeniu istotna ocena prawdopodobieństwa wystąpienia sepsy o określonej etiologii (typ sepsy), metody oparte na obserwacji, decyzje podejmowane przez multidyscyplinarne zespoły

medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2019.08.29.19080509>; this version posted September 1, 2019. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted medRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY 4.0 International license.

Sepsis in the era of data-driven medicine: personalizing risks, diagnoses, treatments and prognoses.

Liu^{1,2}, Patel^{1,2}, Janki^{2,3,4}, Johnson^{5,6,7}, Akse^{2,3,7}, Betman^{8,9}, Glicksberg^{2,3,7,8,9}, Tansik^{2,3,7}, Cortez^{2,3,7}, Andrew^{2,3,7}, Kasanika^{2,3,7}, Matheson^{2,3,7}, Subramanian^{2,3,7}, Duda^{2,3,7}, Shemer^{2,3,7}

Author information

Abstract

Sepsis is a series of clinical syndromes caused by the immunological response to infection. The clinical evidence for sepsis could typically attribute to bacterial infection or bacterial endotoxins, but infections due to viruses, fungi or parasites could also lead to sepsis. Regardless of the etiology, rapid clinical deterioration, prolonged stay in intensive care units and high risk for mortality correlate with the incidence of sepsis. Despite its prevalence and morbidity, improvement in sepsis outcomes has remained limited. In this comprehensive review, we summarize the current landscape of risk estimation, diagnosis, treatment and prognosis strategies in the setting of sepsis and discuss future challenges. We argue that the advent of modern technologies such as in-depth molecular profiling, biomedical big data and machine intelligence methods will augment the treatment and prevention of sepsis. The volume, variety, veracity and velocity of heterogeneous data generated as part of healthcare delivery and recent advances in biotechnology-driven therapeutics and companion diagnostics may provide a new wave of approaches to identify the most at risk sepsis patients and reduce the symptom burden in patients within shorter turnaround times. Developing novel therapies by leveraging modern drug discovery strategies including computational drug repurposing, cell and gene therapy, clustered regularly interspaced short palindromic repeats-based genetic editing systems, immunotherapy, microsome restoration, nanomaterial-based therapy and phage therapy may help to develop treatments to target sepsis. We also provide empirical evidence for potential new sepsis targets including FER and STARD3NL. Implementing data-driven methods that use real-time collection and analysis of clinical variables to track, track and treat sepsis-related adverse outcomes will be key. Understanding the root and cause of sepsis and its comorbid conditions that complicate treatment outcomes and lead to organ dysfunction may help to facilitate identification of most at risk patients and prevent further deterioration. To conclude, leveraging the advances in precision medicine, biomedical data science and translational bioinformatics approaches may help to develop better strategies to diagnose and treat sepsis in the next decade.

© The Author(s) 2019. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

Przebieg sepsy

Niezależnie od etiologii, następuje szybkie pogorszenie stanu chorego co wiąże się z przedłużonym pobytem na OIT i wysokim ryzykiem śmiertelności

Przyszłość to... możliwa personalizacja ryzyka/leczenia

Nowatorskie terapie, immunoterapia, odbudowa mikrobiomów, nanomateriały, terapia fagowa, wykorzystanie postępu w medycynie, naukach biomedycznych i bioinformatycznych

Jednak, przebieg sepsy, w zależności od etiologii (bakteryjna, Wirusowa, grzybicza) może być inny

Wykorzystanie wcześniejszych doświadczeń w leczeniu sepsy o różnej etiologii powinno zmniejszyć częstość występowania drobnoustrojów wielolekoopornych, zmniejszyć dysfunkcje narządów i poprawić wyniki leczenia

Aktualne problemy

Mało programów nadzorujących występowanie fungemii w innych grupach ryzyka niż chorzy z nowotworowymi chorobami hematologicznymi

Epidemiologia/lekowrażliwość

- Śmiertelność 30 - dniowa w kandydemii wynosi 30-50%
- Zmienia się rozkład gatunków *Candida*, pojawiają się nowe wielolekooporne gatunki (*Candida auris*)
- Zwiększa się udział gatunków posiadających naturalnie obniżoną wrażliwość na triazole (*Candida glabrata*)
- Pojawia się oporność na echinokandyny
- Coraz częstsza jednoczesna oporność na azole i echinokandyny
- Brak wytycznych o dużej sile zaleceń odnośnie terapii deeskalacyjnej (IDSA, ESCMID)

Czynniki ryzyka sepsy grzybiczej (1)

Choroba nowotworowa
zwiększa ryzyko sepsy 10 x
(30,0% zgonów szpitalnych z
powodu sepsy)

- Zabiegi operacyjne, często rozległe, z otwarciem przewodu pokarmowego, układu moczowego, splenektomia, zespolenia w obrębie jelita
- Stosowane linie naczyniowe
- Cewniki do pęcherza moczowego
- Żywnienie pozajelitowe
- Pobyt w OIT
- Choroby towarzyszące (przewlekła obturacyjna choroba płuc, cukrzyca, przewlekła niewydolność krążenia)
- Wiek (>50,0% przypadków sepsy po 65 r. ż.)

Czynniki ryzyka sepsy grzybiczej (2)

W przebiegu 2-45,0%
kandydemii
endogenne endophthalmitis

- Stany upośledzenia odporności (neutropenia, limfopenia, głównie dotycząca limfocytów - CD4+), zaburzenia odporności – choroba podstawowa, chemioterapia, radioterapia, kortykosteroidoterapia)
- Wcześniejsze leczenie antybiotykami szerokospektralnymi (zakłócenie równowagi w mikrobiomie jelitowym), przemieszczanie się grzybów przez uszkodzoną błonę śluzową do warstw podśluzówkowych naczyń krwionośnych i do otrzewnej

Pacjenci z nowotworem, kumulacja wielu czynników ryzyka – szczególnie chorzy po przeszczepach (komórek krwiotwórczych)

Czynniki ryzyka kandydozy wewnątrzbrzuszej

- Zabiegi operacyjne
- Martwicze zapalenie trzustki
- Perforacja jelita
- Nieszczelność zespołów
- Przeszczep narządowy

Najczęstsze źródło infekcji – uszkodzona śluzówka przewodu pokarmowego

Pacjenci innych oddziałów vs pacjenci OIT

wyższy wskaźnik
śmiertelności
wśród pacjentów
oddziałowych
(poza OIT) vs pacjenci OIT

Przyczyny

- pochodzenie sepsy (z zakażenia szpitalnego), co zapowiada gorsze rokowanie
- brak oczywistych/charakterystycznych objawów ogólnoustrojowych
- współistniejące stany, które zakłócają diagnozę
- oddziały nie są zaprojektowane na szybką opiekę medyczną (inne zasoby niż OIT)
- opóźnione rozpoznanie = opóźnione leczenie

Schorr C et al. *J Hosp Med* (2016), 11 Suppl 1:S32-39



Miejsce zakażenia

- Zakażenie w obrębie jamy brzusznej/miednicy
- Zakażenie dróg oddechowych (zapalenie płuc)
- Zakażenie dróg moczowych
- Zakażenie rany pooperacyjnej
- Odcewnikowe zakażenie krwi
- Zakażenia skóry i tkanek miękkich

Najczęstsza droga inwazji – błona śluzowa przewodu pokarmowego i dróg oddechowych (uszkodzenie ciągłości i funkcji błon śluzowych, Zaburzenia odpowiedzi komórkowej i humoralnej)

Udział poszczególnych miejsc zakażenia zależy od charakterystyki szpitala i organizacji systemu opieki zdrowotnej . Raport wskaźników częstości zakażeń/1000 dni z cewnikiem – ocena jakości funkcjonowania OIT

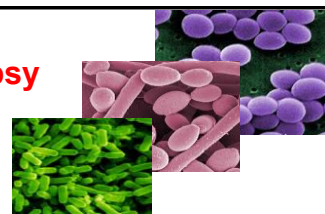
Materiał do badania

Materiał adekwatny do lokalizacji zakażenia i objawów klinicznych

Objętość próbki optymalna do zleconego badania -
zwiększenie szansy wykrycia czynnika sprawczego zakażenia

- Krew na posiew
- Końcówki cewników naczyniowych
- BAL (popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe)
- Biopłat, Aspirat
- Płyn mózgowo-rdzeniowy
- Płyn otrzewnowy
- Płyn opłucnowy
- Mocz
- Materiał z rany
- Materiał z ropnia (z podstawy ropienia)
- Wymaz z jamy ustnej/gardła (z miejsc zmienionych chorobowo)
- Wymaz z nosa (kanał nosowy)
- Materiał z oka (zeskrobiny z owrzodzenia rogówki), najlepiej bezpośredni posiew na podłoże
- Materiał z kanału szyjki macicy

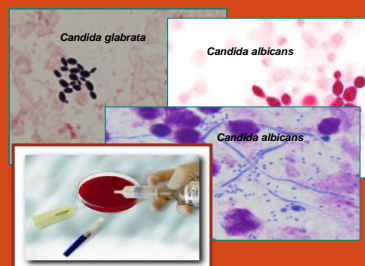
Wskaźnik śmiertelności w przypadku sepsy



Wskaźnik śmiertelności w przypadku sepsy jest miarą nieskutecznego leczenia, ale także po części miarą skuteczności diagnostyki mikrobiologicznej

Nieprawidłowa terapia antybiotykami 5-krotnie zwiększa ryzyko śmierci w sepsie

Mikroskopia/Hodowla



Ocena obecności grzybów

Mikroskopia

Barwienie metodą Grama

-Elementy morfotyczne, komórki pączkujące, strzępki, pseudostrzępki

Barwienie metodą pozytywno-negatywną (z tuszem)

-Tło preparatu czarne, komórki zabarwione, widoczne otoczki mukopolisacharydowe (*Cryptococcus spp.*)

Barwienie histopatologiczne

Mucykarmin

Wybarwia otoczki grzybów z rodzaju *Cryptococcus* na kolor różowoczerwony

Hematoksylina z eozyną

Wybarwia grzyby na kolor fioletowy, tkanki na kolor różowy

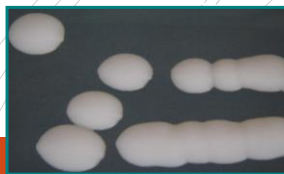
Hodowla

Podłoże Sabouraud, Podłoże Sabouraud + antybiotyki

Podłoże chromogenne

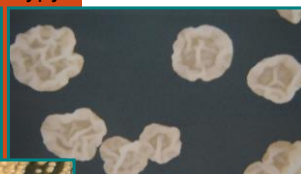
Dodatnie posiewy uzyskuje się tylko u 25-50,0% chorych z rozpoznaną fungemią

15



C. albicans - kolonie gładkie, białe, kremowe

C. parapsilosis – różne morfotypy



C. krusei - kolonie szorstkie – postrzępiony brzeg „mroz na szybie”



Malassezia furfur - kremowe, żółtawe, wypukłe lub trochę pomarszczone, lśniąca lub matowa, całobrzęgie lub o brzegu płatkowatym- grzyb lipofilny (żywienie pozajelitowe, założona sonda)

16

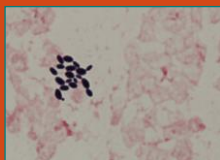
Candida glabrata (1)

Drobne komórki 1-4 um
Nie wytwarza pseudostrzępek
Asymiluje tylko glukozę i trehalozę
Wytwarza fosfolipazę i lipazę, adhezyny, tworzy biofilm, oporny na fagocytozę
Inwazyjny po przerwaniu barier anatomicznych

Candida glabrata wywołuje ok. 29,0% fungemii
Rozpowszechnienie zależne od obszaru geograficznego
-drugi najczęściej izolowany gatunek *Candida*, po *Candida albicans*, w Europie Północnej i Stanach Zjednoczonych
-W Azji na 3-4 miejscu

Zakażenia krwi wywołuje u osób starszych, chorych na cukrzycę, biorców przeszczepów
Filogenetycznie bliski *Saccharomyces cerevisiae*
Posiada 67 adhezyn umożliwiających adhezję do komórek gospodarza, adhezyny Epa6 i Epa7 uczestniczą w przyleganiu do komórek nabłonkowych i śródnabłonkowych

Kumar K et al. *Candida glabrata*: a lot more than meets the eye. *Microorganisms* (2019) 30(7), doi:10.3390/microorganisms7020039

Candida glabrata (2)

Wytwarza biofilm (zwarta, gęsta struktura komórek grzyba i macierzy pozakomórkowej składająca się z wysokiego poziomu białek i węglowodanów, w tym glukanu)

Wykazuje plastyczność fenotypową (również spontaniczne przechodzenie z formy regularnej w nieregularną)

Wysoce tolerancyjny na stres oksydacyjny
Zakażenia krwi po przerwaniu barier anatomicznych (perforacja, nieszczelność zespolenia, cewniki, uszkodzenie błony śluzowej)

Kumar K et al. Candida glabrata: a lot more than meets the eye. Microorganisms (2019) 30(7), doi:10.3390/microorganisms7020039

Candida glabrata (3)

Amfoterycyna B MIC ≤ 1 S, > 1 R
Anidulafungina MIC ≤ 0.064 S, > 0.064 R
Flukonazol MIC ≤ 0.002 S, > 32 R
Mikafungina MIC ≤ 0.032 S, > 0.032

Candida glabrata niska podatność na leki azolowe, narastająca oporność na echinokandyny. Naturalna wrażliwość na amfoterycynę B, 5-fluorocytozynę, echinokandyny

Oporność na echinokandyny wynika z mutacji w genach CgFKS1 i CgFKS2, które kodują syntazę 1,3- β -D- glukanu

Opisywano mutacje FKS, które korelowały z wyższymi wartościami MIC i niepowodzeniami terapeutycznymi

Możliwa przyczyna

- Odpowiedź na ekspozycję na echinokandyny
- Selekcja istniejących szczepów opornych
- Zmiany na poziomie molekularnym

Revero-Menendez O et al. Front Microbiol (2019), 10:1585, doi: 10.3389/fmicb.2019.01585

Candida glabrata (4)

Potwierdzono zdolność *Candida glabrata* do rozwijania oporności i nabywania różnych mutacji pod presją leku.

Wykazywano rozwijanie oporności na echinokandyne wśród chorych poddanych terapii tym lekiem (badania sekwencyjne).

Z obserwacji własnych, pacjent lat 66, rak pęcherza moczowego, po cystoprostatektomii, fungemia wywołana *Candida glabrata* (MIC anidulafunginy < 0.006 mg/L (04.2019), szczep *Candida glabrata* izolowany z rany pooperacyjnej MIC anidulafunginy - 0,19 mg/L, MIC amfoterycyny B – 0.75 mg/L, z moczu MIC anidulafunginy - 0,19 mg/L, MIC amfoterycyny B - 0.75 mg/L, MIC mikafunginy - 0.94 mg/L (06/2019)

Revero-Menendez O et al. *Front Microbiol* (2019), 10:1585, doi: 10.3389/fmicb.2019.01585

Identyfikacja grzybów *Candida*



Identyfikacja

-Podłoża chromogenne (selektywno-różnicujące) zawierające substraty chromogenne, rozkładane przez enzymy, heksozaminidazę i fosfatazę alkaliczną
wstępna identyfikacja grzybów drożdżopodobnych

- Biochemiczne testy komercyjne do odczytu wizualnego
- Biochemiczne testy komercyjne do odczytu na analizatorach
- Spektrometria mas

Lekowrażliwość zgodnie z *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Antifungal Agents Breakpoint tables for interpretation of MICs, version 9.0, 2018-02-12*

Ocena wrażliwości grzybów *Candida*



Ocena wrażliwości

Testy paskowe E – test
 Paski gradientowe (MIC Test Strip)
 Płytki MIC-Strip wykorzystujące metodę seryjnych rozcieńczeń antybiotyku na mikro płytce
 Karty do analizatorów (breakpoints)

Candida albicans – amfoterycyna B, anidulafungina, mikafungina, flukonazol, itraconazol, posakonazol, worikonazol
Candida glabrata - anidulafungina, mikafungina, flukonazol,

Lekowrażliwość zgodnie z *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Antifungal Agents Breakpoint tables for interpretation of MICs, version 9.0, 2018-02-12*

Strategie leczenia przeciwgrzybiczego

Rodzaj leczenia	Wskazania
Leczenie profilaktyczne	Chorzy bez objawów, z grupy wysokiego ryzyka
Leczenie empiryczne	Chorzy z objawami klinicznymi, u których nie można wykluczyć zakażenia grzybiczego
Leczenie wyprzedzające	Chorzy z objawami klinicznymi i/lub wynikami badań sugerujących obecność zakażenia grzybiczego (zawężenie grupy chorych poddanych leczeniu przeciwgrzybiczemu)
Leczenie celowane	Chorzy z zakażeniem potwierdzony badaniami dodatkowymi

Strategie postępowania terapeutycznego (1)

Grupa leków	Zakres działania
Polieni - Amfoterycyna B - Amfoterycyna B liposomalna	<i>Candida</i> spp. , <i>Aspergillus</i> (bez <i>Aspergillus terreus</i>)
Azole - Flukonazol - Worykonazol - Pozakonazol	<i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> (działanie grzybobójcze) <i>Candida</i> (grzybostatyczne) <i>Candida krusei</i> (naturalna oporność na flukonazol) <i>Candida glabrata</i> (obniżona wrażliwość na flukonazol) <i>Candida auris</i> (86-100% opornych na flukonazol)
Echinokandyny - Kaspofungina - Anidulafungina - Mikafungina	<i>Candida</i> spp.

Terapia deeskalacyjna – zmiana z echinokandyny/amfoterycyny B na azole (flukonazol/worykonazol) lub zakończenie terapii empirycznej w ciągu 3-5 dni (IDSA) lub 10 dni od jej rozpoczęcia (ESCMID), fungemia – do 14 dni od uzyskania ujemnego posiewu krwi przy poprawie stanu klinicznego pacjenta

Strategie postępowania terapeutycznego (2)

Fungemia odcewnikowa – usunięcie cewnika centralnego, 14 - dniowa terapia, jeśli terapia deeskalacyjna to najpierw echinokandyny/amfoterycyna w postaci lipidowej, potem azole (jeśli szczep wrażliwy)


Ciężkie zakażenia i wcześniejsza ekspozycja na azole – rekomendacja, żeby stosować echinokandyny- kaspofungina, anidulafungina, mykafungina

Zakażenia o etiologii *Candida glabrata* – rekomendowane echinokandyny, w przypadku *Candida albicans* zaleca się zmianę echinokandyn na flukonazol, w fungemii wywołanej przez *Candida krusei* kontynuacja worykonazolem

U chorych w neutropenii zalecane echinokandyny lub lipidowa forma amfoterycyny B (alternatywnie flukonazol lub worykonazol w przypadku potwierdzenia wrażliwości)

Zakażenie o etiologii *Candida parapsilosis* rekomendowany flukonazol

Terapia deeskalacyjna – nie powoduje zwiększenia śmiertelności (na podstawie dostępnych badań)



Clinical Microbiology and Infection
Available online 10 April 2019
In Press, Corrected Proof

Original article
Microbiological diagnostics of bloodstream infections in Europe—an ESGBIES survey ☆

E.A. Idelevich¹, H. Seifert^{2,3}, M. Sundqvist⁴, L. Scudeller⁵, S. Amit⁶, A. Balode⁷, A. Bilozor⁸, P. Drevinek⁹, Z. Kocak Tufan¹⁰, A. Korog¹¹, B. Lamy¹², I. Mareković¹³, J. Miculevičienė¹⁴, M. Müller Premru¹⁵, A. Pascual¹⁶, S. Pourmaras¹⁷, V. Saegeman¹⁸, H.C. Schanheyder¹⁹ ... K. Becker¹, S. B.

Show more
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.03.024> Get rights and content

Zarządzanie BSI na poziomie Laboratorium, w krajach europejskich

W ramach grup badawczych ESCMID przeprowadzono ankietę w 25 krajach europejskich, w 209 laboratoriach

Wyniki ankiety
1/3 laboratoriów wykonywała badania metodami klasycznymi, 2/3 laboratoriów stosowało szybkie techniki badawcze, ok. 42% laboratoriów deklarowało możliwość rozpoczęcia inkubacji butelek z krwią przez całą dobę, ale tylko 13,0% świadczyło usługi w systemie ciągłym, 24 h na dobę (identyfikacja)

Wniosek
Laboratoria wdrożyły szybkie techniki do identyfikacji czynników etiologicznych BSI, ale organizacja pracy (brak dostępności Laboratorium przez 24 h na dobę) powoduje, że obecnie stosowana praktyka jest częściowo zgodna z wymogami optymalnego zarządzania BSI




Sposoby komunikowania wyników



- Raportowanie wyników krytycznych w oparciu o wynik barwienia metodą Grama (<= 1h)
- Bezpośrednie (telefoniczne) zgłaszanie wyników szybkich testów molekularnych (<= 2h) lekarzom w celu zmiany terapii w oparciu o otrzymany wynik (lub personelowi medycznemu, np. pielęgniarkom)
- Raportowanie z Laboratoryjnego Systemu Informatycznego do Szpitalnego Systemu Informatycznego (LIS do HIS, transfer danych), stosowanie dodatkowego oznakowania, flagowanie

Journal List • Clin Biochem Rev • v.28(4) • 2007 Nov • PMC2282400



Clin Biochem Rev. 2007 Nov; 28(4): 179-194. PMID: 18392122

Laboratory Turnaround Time

Robert C Hawkins

• Author information • Copyright and License information Disclaimer

This article has been cited by other articles in PMC.

Abstract

Turnaround time (TAT) is one of the most noticeable signs of laboratory service and is often used as a key performance indicator of laboratory performance. This review summarises the literature regarding laboratory TAT, focusing on the different definitions, measures, expectations, published data, associations with clinical outcomes and approaches to improve TAT. It aims to provide a consolidated source of benchmarking data useful to the laboratory in setting TAT goals and to encourage introduction of TAT monitoring for continuous quality improvement. A 90% completion time (sample registration to result reporting) of <60 minutes for common laboratory tests is suggested as an initial goal for acceptable TAT.

Klasyczna mikrobiologia


- klasyczna mikrobiologia to ciągle „gold standard” w identyfikacji drobnoustrojów z krwi
- ze względu na ograniczenia techniki hodowlanej możliwe wyniki fałszywie ujemne (niski poziom fungemii, mniejsza objętość próbki, wcześniejsze leczenie antybiotykami, czułość metody)
- wyniki fałszywie dodatnie 2,15-3,67% (w zależności od instytucji), niepotrzebne leczenie
- wymaga wdrożenia terapii empirycznej
- istnieje ryzyko nie objęcia zakresem leczenia rzeczywistego czynnika etiologicznego zakażenia
- prowadzi do nadużywania antybiotyków szerokospektralnych, selekcji szczepów wielolekoopornych, zwiększa liczbę zakażeń *C. difficile*, reakcji alergicznych
- wydłuża czas hospitalizacji, zwiększa koszty leczenia

dłuższy czas oczekiwania na wynik = wyższy wskaźnik śmiertelności

TAT (turnaround time) dla posiewów krwi w klasycznej mikrobiologii wynosi od 2 do 5 dni

Analiza czasu od pobrania próbki do udostępnienia wyników, które są użyteczne w procesie leczenia

Średni czas do identyfikacji drobnoustroju (w dniach)



Identyfikacja/Wrażliwość	<i>S. aureus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida</i>
Preparat barwiony metodą Grama	1.09	1.04	0.92	2.23
Identyfikacja drobnoustroju	1.63	1.66	2.42	4.64
Wrażliwość	2.95	3.12	2.71	

Wyzwanie dla mikrobiologów, aby szukali sposobów na zmniejszenie opóźnień w raportowaniu wyników - rozwiązanie problemu komunikacji

Tabak P et al. Blood culture turnaround in U.S. acute care hospitals and implications for laboratory process optimization. *J Clin Microbiol* (2018),56(12):e00500-18. doi:10.1128/JCM.00500-18

Analiza czasu od pobrania próbki do udostępnienia wyników, które są użyteczne w procesie leczenia)



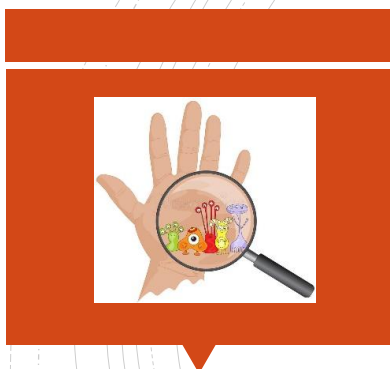
Wyzwanie dla mikrobiologów, aby szukali sposobów na zmniejszenie opóźnień w raportowaniu wyników - rozwiązanie problemu komunikacji

13 szpitali, USA, 165593 próbek krwi, okres prowadzenia badań 01.2015-06.2016, ID bez spektrometrii mas, 9,5% próbek dodatnich (wśród izolatów bakteryjnych 61,5% było Gram-dodatnich, 38,5% Gram-ujemnych, grzyby stanowiły 6,2% wszystkich izolatów)

Wniosek – Automatykacja laboratoriów i optymalizacja przepływu informacji odgrywają istotną rolę w skróceniu TAT, ale nie są w pełni wykorzystane przez laboratoria. Korzyści ze skrócenia TAT można osiągnąć poprzez nowoczesne technologie ale także poprzez modyfikację istniejącej komunikacji (słaby przepływ informacji w godz. 18.00-4.00).

Tabak P et al. Blood culture turnaround in U.S. acute care hospitals and implications for laboratory process optimization. J Clin Microbiol (2018),56(12):e00500-18.doi:10.1128/JCM.00500-18

Uzupełnienie metod klasycznych



Szybka identyfikacja patogenów z krwi (bezpośrednia Identyfikacja drobnoustrojów z bulionów z dodatnim posiewem krwi)

- Multiplex-PCR
- Spektrometria mas (MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry)
- Candida QuickFISH (badania naukowe)

Korzyści z szybkiej identyfikacji

- Zmniejsza śmiertelność
- Skracza czas pobytu w szpitalu
- Zmniejsza zużycie antybiotyków

Wartość posiewów krwi podkreślają obserwacje, że często terapia empiryczna jest niewłaściwa a realizacja strategii szybkiej identyfikacji może obniżyć koszty opieki nad pacjentem i ukierunkować leczenie

Metody molekularne

- skracają TAT
 - identyfikacja bezpośrednio z krwi lub dodatkowo hodowli płynnej (krótki czas identyfikacji, ominięcie etapu hodowli/izolacji)
 - umożliwiają jednoczasową identyfikację wielu potencjalnych patogenów
 - wysoka czułość i specyficzność
 - możliwość wykrycia minimalnych ilości poszukiwanego odcinka DNA
 - wyższa wykrywalność w porównaniu z hodowlą
 - ograniczenie ryzyka kontaminacji
 - szybkie, łatwe wykonanie w Laboratorium
- ale**
- występują reakcje fałszywie dodatnie
 - istnieje możliwość interferencji
 - inhibitory polimerazy – wyniki fałszywie ujemne
 - reakcje krzyżowe
 - w leukopenii, neutropenii – wyniki fałszywie ujemne

Rev Esp Quimioter. 2018 Aug; 31(4): 298-315.
Published online 2018 Sep 26.

PMCID: PMC6172679
PMID: 29939972
Language: English | Spanish

Current aspects in sepsis approach. Turning things around
Francisco Javier Candel,²⁰ Marcio Borges Sá,² Sylvia Beida,³ Germán Bou,⁴ José Luis Del Pozo,⁵ Oriol Estrada,⁶ Ricard Ferrer,⁷ Juan González del Castillo,⁸ Agustín Julián-Jiménez,⁹ Ignacio Martín-Loeches,¹⁰ Emilio Masada,¹¹ Mayra Mateos,¹² Paula Ramirez,¹³ José Tomás Ramos,¹⁴ Jordi Rello,¹⁵ Borja Suberviola,¹⁶ Alejandro Suárez de la Rica,¹⁷ and Pablo Vidal¹⁸

Clinical Microbiology Reviews

Emerging Technologies for Molecular Diagnosis of Sepsis
Mridu Sinha,^a Julieta Japs,^b Hannah Mack,^c Todd P. Coleman,^d Shelley M. Lawrence,^{e,f,g} Stephanie E. Friley^{h,i}

Clinical Microbiology Reviews (2018), 31(2) e00089-17

Komercyjnie dostępne systemy do identyfikacji grzybów bezpośrednio z próbek krwi (techniki PCR+sekwencjonowanie DNA, real-time PCR, multiplex PCR, multiplex real-time PCR, PCR/ESI-MS, multiplex PCR + paramagnetyczne nanocząsteczki i kombinacje metod). Grzyby wykrywane są w testach: Sepsi Test Molzym, SeptiFast, MagicPlex, VYOOSIRS-Lab, PLEX-ID, T2/min. 5 gatunków Candida

Certyfikat IVD, walidacja, na poziomie Laboratorium weryfikacja

Rev Esp Quimioter. 2018 Aug; 31(4): 298-315.
Published online 2018 Sep 26.

PMCID: PMC6172679
PMID: 29939972
Language: English | Spanish

Current aspects in sepsis approach. Turning things around
Francisco Javier Candel,²⁰ Marcio Borges Sá,² Sylvia Beida,³ Germán Bou,⁴ José Luis Del Pozo,⁵ Oriol Estrada,⁶ Ricard Ferrer,⁷ Juan González del Castillo,⁸ Agustín Julián-Jiménez,⁹ Ignacio Martín-Loeches,¹⁰ Emilio Masada,¹¹ Mayra Mateos,¹² Paula Ramirez,¹³ José Tomás Ramos,¹⁴ Jordi Rello,¹⁵ Borja Suberviola,¹⁶ Alejandro Suárez de la Rica,¹⁷ and Pablo Vidal¹⁸

Clinical Microbiology Reviews

Emerging Technologies for Molecular Diagnosis of Sepsis
Mridu Sinha,^a Julieta Japs,^b Hannah Mack,^c Todd P. Coleman,^d Shelley M. Lawrence,^{e,f,g} Stephanie E. Friley^{h,i}

Clinical Microbiology Reviews (2018), 31(2) e00089-17

Szybka diagnostyka zagrażających życiu zakażeń

Organisms Detected:	
Enterococcus	
Enterobacteriaceae	
Escherichia coli	
Klebsiella oxytoca	

Applicable Antimicrobial Resistance Genes:
 KPC - Not Detected
 vanA2 - Not Detected
 vanA2 - Not Detected

WARNING: A Not Detected result for the KPC gene does not indicate susceptibility to resistance to carbapenems by mechanisms other than carrying the KPC gene.

Result Summary - Interpretations	
Antimicrobial Resistance Genes	
Not Detected	KPC (carbapenem-resistance gene)
Not Detected	mecA (methicillin-resistance gene)
Not Detected	vanA2 (vancomycin-resistance genes)
Gram Positive Bacteria	
✓ Detected	Enterococcus
Not Detected	Listeria monocytogenes
Not Detected	Staphylococcus
Not Detected	Staphylococcus aureus
Not Detected	Streptococcus
Not Detected	Streptococcus pneumoniae (Group B)
Not Detected	Streptococcus
Not Detected	Streptococcus
Not Detected	Acinetobacter baumannii
✓ Detected	Enterobacteriaceae
Not Detected	Enterobacter
✓ Detected	Escherichia coli
✓ Detected	Klebsiella oxytoca







Simple:
Only 2 minutes of hands-on time

Easy:
No precise pipetting required

Fast:
Run time of about 1 hour



Idaho Technology Inc. FilmArray[®] Blood Culture ID Panel Information Sheet




The FilmArray[®] User-Friendly Multiplex PCR

The FilmArray[®] Blood Culture ID Panel (BCID2) tests for 23 different bacterial species. The FilmArray[®] technology allows for a simplified process of identifying bacteria from a blood culture. The FilmArray[®] technology allows for a simplified process of identifying bacteria from a blood culture. The FilmArray[®] technology allows for a simplified process of identifying bacteria from a blood culture.

- Simple: 2 minutes of hands-on time
- Easy: No precise pipetting or counting required
- Fast: Turnaround time of about 1 hour
- Comprehensive: 23 target BCID panel

Film Array – Blood Culture Identification Panel (BCID), BioFire Diagnostics



Zalety testu

Czas otrzymania wyniku – 1h, wysoka czułość, identyfikacja grzybów bezpośrednio z pozytywnych hodowli płynnych

Wykrywa najczęstsze czynniki etiologiczne: *C.albicans*, *C.glabrata*, *C. krusei*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis* (odpowiedzialne za 92,0% zakażeń). W projekcji, Panel BCID2, *C. auris*, *C.neoformans* /*C.gattii*

Wady testu

Wykrywa ograniczoną liczbę gatunków

Nie określa żywotności grzybów (wykrywa materiał genetyczny obecny w hodowli)

Wykrywa materiał genetyczny obecny w bulionie, nie pochodzący z badanej próbki

Film Array – Blood Culture Identification Panel (BCID), BioFire Diagnostics



Inne ograniczenia

Test należy wykonać w ciągu 8 godzin od stwierdzenia dodatniego wyniku posiewu krwi (stężenie drobnoustrojów w próbkach)

Specyficzność analityczna (reaktywność krzyżowa)

Możliwa reaktywność krzyżowa pomiędzy *C.albicans* i *C.dubliniensis* oraz *C.parapsilosis* i *C.multigemmis*

Przegląd 16 prac z lat 1990-2011

Dot. znaczenia testów diagnostycznych stosowanych w sepsie w odniesieniu do czasu wdrożenia terapii celowanej i poprawy innych wyników (śmiertelność)

Raportowanie

Ocena trzech stosowanych praktyk diagnostycznych (molekularna, fenotypowa, barwienie) /Siła dowodów sugestywna, każda z analizowanych praktyk może poprawić oceniane wyniki

Kwalifikacje personelu Laboratorium

Wskaźniki jakości (% dodatnich posiewów krwi, % posiewów skontaminowanych, % butelek z optymalną ilością krwi, średni czas transportu, średni TAT)

Niezależnie od przyjętych praktyk diagnostycznych, informacja o wyniku szybkich testów diagnostycznych może być jednakowo przydatna (MRSA, MSSA, *Candida*, *Enterococcus*)

Szybkie testy molekularne bez bezpośredniej komunikacji nie są znacząco „lepsze” niż szybkie metody fenotypowe, natomiast znacznie poprawiają wskaźniki śmiertelności jeśli połączy się testy molekularne i bezpośrednią komunikację

Buehler et al. Clin Microbiol Rev (2016) 29:59-103

Metody serologiczne

(mannan-Ag, anty-mannan-Ab, 1,3- β - D-glukan - BDG)

Wykrywanie antygenów - monitorowanie przebiegu zakażenia grzybiczego

Wykrywanie przeciwciał - monitorowanie statusu immunologicznego pacjenta i ocena typu zakażenia (pierwotne/wtórne)

wyniki fałszywie dodatnie

- podobieństwo antygenowe między bakteriami a grzybami
- używanie błon celulozowych w hemodializie, wacików z gazy podczas zabiegów
- leczenie pacjenta preparatami immunologicznymi (albuminy, globuliny)

wyniki fałszywie ujemne

- u osób z obniżoną odpornością organizm może nie wytworzyć wykrywalnej odpowiedzi immunologicznej
- obecność w płynach ustrojowych enzymu – glukanaza – powodujący rozkład 1,3- β - D-glukanu, brak standaryzacji metody w odniesieniu do płynów ustrojowych

Konieczne jest odniesienie otrzymanych wyników do obrazu klinicznego i wyników innych badań przeprowadzonych u danego pacjenta, w kandydozie inwazyjnej obecność mannan-Ag stwierdzono w 40,0% przypadków, a przeciwciał w 53,0%. Przy wykrywaniu obu markerów czułość i swoistość wzrasta. Najwyższa czułość w przypadku *C.albicans* i *C.glabrata*, niska w przypadku *C.parapsilosis* i *C. guilliermondii*. BDG - najniższa czułość dla *C.parapsilosis*.

Metody serologiczne

CAGTA , *Candida albicans* germ tube antibody

Wykrywa przeciwciała skierowane przeciwko antygenom pseudostrzępek, które są wytwarzane podczas kontaktu ze składnikami surowicy, co świadczy o przenikaniu grzybów do łożyska naczyniowego

Wdrożenie diagnostyki kompleksowej, tj. wykrywanie 1,3- β -D-glukanu i równoczesne badanie przeciwciał CAGTA zwiększa swoistość diagnostyczną do 96,0%.

Kompleksowa diagnostyka serologiczna to także zwiększenie ujemnej i dodatniej wartości predykcyjnej inwazyjnej kandydozy u pacjentów z neutropenią.

Inne techniki

T2 (T2MR) – nanodiagnostyka i rezonans magnetyczny

- próbki krwi pełnej
- średni czas identyfikacji 4,4 h
- czułość 91,0%
- specyficzność *C.glabrata/krusei* 99,9%, *C.parapsilosis* 99,3%
- dolna granica wykrywalności 1-5 CFU/ml

Markery przydatne w diagnostyce sepsy grzybiczej

Prokalcytonina w surowicy

- 48 chorych, w tym 17 chorych z kandydemią, poziom prokalcytoniny niższy w przypadku kandydemii niż w przypadku bakteriemii, odpowiednio 0,71 (0,5-1,1) i 12,9 (2,6-81,2) ng/ml
Martini et al. 2010

- 18 pacjentów z kandydemią, 31 pacjentów z mieszaną etiologią BSI, 151 z bakterią, poziom prokalcytoniny w przypadku kandydemii 0,99 (0,86-1,34), mieszane BSI 4,76 (2,98-6,08), w bakteriemii 16,75 (7,65-50,5) ng/ml
Cortegiani et al. 2014

- 65 pacjentów z kandydemią, 815 pacjentów z bakterią wywołaną Gram(-), 948 pacjentów z bakterią wywołaną Gram (+), badania wielośrodkowe, poziom prokalcytoniny w przypadku kandydemii 4,7(2-14), mieszane BSI 4,76 (2,98-6,08), w bakteriemii wywołanej Gram (-) 26 (7,7-63,1), w bakteriemii wywołanej Gram (+) 7,1 (2,0-23,3) ng/ml
Thomas-Ruddel et al. 2018

Prokalcytonina nie powinna być stosowana jako samodzielne narzędzie do diagnostyki różnicowej kandydemii i bakteriemii, ze względu na ograniczone dowody potwierdzające jej przydatność. Wczesna diagnostyka kandydemii – PCT w powiązaniu z innymi biomarkerami i testami diagnostycznymi (innymi niż hodowlane)

beta D-glukan, punkt odcięcia ≥ 80 pg/ml + PCT punkt odcięcia < 2 ng/ml- wyższe PPV lub PCT (8,06 ng/ml) + CRP (116 mg/L) + IL-6 (186,5 pg/ml) - wyższa czułość i swoistość

Cortegiani et al. (2019) Critical Care, 23(190), doi.org/10.1186/s13054-019-2481-y

Badanie prospektywne, CANDIPOP, 2010-2011, 29 szpitali, Hiszpania

30-dniowa obserwacja kandydemii, chorzy ≥ 16 r.ż., guzy łebe (I grupa), nowotwory układu krwiotwórczego (II grupa), pierwszy epizod kandydemii

238 epizodów kandydemii, w tym 195 (82,5%) wśród pacjentów z guzami litymi narządów, 43 (18,0%) pacjentów z nowotworami układu krwiotwórczego

Pacjenci z guzami litymi (I): starsi, częściej otrzymywali żywienie pozajelitowe i mieli zabieg chirurgiczny w ciągu ostatnich 3 miesięcy, pacjenci hematologiczni (II) częściej otrzymywali chemioterapię lub kortykosteroidy i mieli neutropenię lub zapalenie błony śluzowej

Kandydemia powodowana przez *non-albicans* w grupie I – 55,6%, w grupie II – 71,1%. *Candida*. Ok.28,0% izolatów *Candida* nie wykazywało wrażliwości na flukonazol, 1% *Candida albicans* i 4,0% *Candida tropicalis* było średnio-opornych lub opornych na flukonazol. Oporność na echinokandyny sporadyczna (1 szczep *Candida tropicalis* i 1 szczep *Candida glabrata*, zmiany w genach FKS1 i FKS2)

Najczęstsze źródło zakażenia w obu grupach (onkologia vs. hematologia) – cewnik centralny (odpowiednio 36,4% i 37,2%). Śmiertelność ogółem: 12,2% w 7 dniu i 31,5% w 30 dniu, bez istotnych różnic między grupami. Usunięcie cewnika w ciągu pierwszych 48 h po rozpoznaniu i odpowiednia terapia zmniejszała śmiertelność w badanych grupach pacjentów.

Puig-Asensio M et al. Clin Microbiol Infect (2015) 21(5):491.e1-10.doi:10.1016/j.cmi.2014.12.027.Epub 2015 Jan 14

Dystrybucja gatunków
Candida w fungemii

- Rejon geograficzny
- Grupa chorych
- Czynniki ryzyka
- Organizacja opieki zdrowotnej
- Stosowana profilaktyka

Podsumowanie

Zachorowalność i śmiertelność w kandydemii są trudne do zmierzenia (ze względu na niedoszacowanie)

Obecne wytyczne jako leczenie empiryczne pierwszego rzutu zalecają stosowanie echinokandyn, flukonazol jest akceptowany tylko w wybranych grupach pacjentów. Przez wiele lat lekiem z wyboru był flukonazol, co prawdopodobnie wpłynęło na zmniejszenie częstości występowania *Candida albicans* w kandydemiach i wzrost *Candida non-albicans*

W terapii empirycznej należy uwzględniać lokalny rozkład gatunków, zwłaszcza występowanie *Candida glabrata*.

Na udział poszczególnych gatunków ma wpływ czas ekspozycji na leki przeciwgrzybicze

Pojawienie się *Candida auris* jest nowym wyzwaniem w leczeniu fungemii

Nowoczesne techniki badawcze, omijające hodowle, znacznie skracają czas identyfikacji czynników etiologicznych wywołujących kandydemie a zastosowanie biomarkerów może być przydatne w rozpoznaniu wczesnej kandydemii

Pomimo stosowania echinokandyn w profilaktyce, ogólnie śmiertelność jednak nie maleje

Bassetti M et al. (2018), 73 Suppl 1:i14-i25, doi: 10.1093/jac/dkx445

Dziękuję za uwagę