

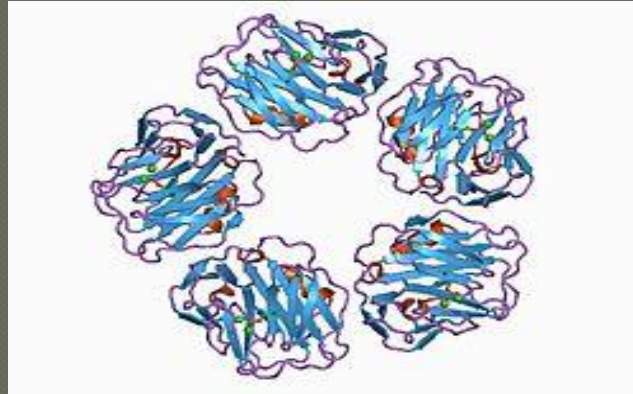
ΔΕΙΚΤΕΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ ΚΑΙ ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΖΗΤΗΣΗΣ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΣΤΙΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΙΜΙΕΣ

Σαλπικτής Ιωάννης
Ειδικός Παθολόγος
Επιμελητής
Κλινική SOS Ιατρών
ΕΥΡΩΚΛΙΝΙΚΗ ΑΘΗΝΩΝ

ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ

- ◎ **CRP (C- reactive protein)**
- ◎ Προκαλσιτονίνη (PCT)
- ◎ Αντιθρομβίνη III
- ◎ Κυτταροκίνες

C-Reactive Protein (CRP)



Η **CRP** είναι πρωτεΐνη (β-σφαιρίνη) που ανήκει στην οικογένεια των πενταξινών και αποτελείται από 5 υπομονάδες (πολυπεπτίδια) των 206 αμινοξέων που συνδέονται γύρω από ένα κεντρικό άξονα.

Κάθε μια υπομονάδα συνδέεται με τις υπόλοιπες με ιόντα **Ca**

Ιστορία-Ονοματολογία

Η πρωτεΐνη CRP ανακαλύφθηκε το 1930 από τους William Tillett και Thomas Francis οι οποίοι πρώτοι την προσδιόρισαν στον ορό ασθενών που έπασχαν από πνευμονοκοκκική πνευμονία, όπου η CRP ήταν συνδεδεμένη με τον C-πολυσακχαρίτη του κυτταρικού τοιχώματος του πνευμονιοκόκκου.

Ο ρόλος της

Ο ρόλος της CRP είναι να δεσμεύει τη φωσφοχολίνη που εκφράζεται στην επιφάνεια των νεκρών κυττάρων και των βακτηρίων και

- 1) Τροποποιεί το καταρράκτη του συμπληρώματος
- 2) Να ρυθμίζει τη βακτηριακή οψωνοποίηση και φαγοκυττάρωση εν όψει της λοίμωξης

CRP

C-reactive protein

- Ανήκει στις πρωτεΐνες οξείας φάσης
- Συντίθεται στο ήπαρ
- Παράγεται ως απάντηση στην ιστική βλάβη ως απάντηση στη δράση των κυτταροκινών (και κυρίως της IL-6 και IL-8), στη φλεγμονή, στη λοίμωξη και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις.
- Ανήκει στις **θετικές** πρωτεΐνες οξείας φάσης μαζί με το ινωδογόνο, το αμυλοειδές Α, πολλούς παράγοντες του συμπληρώματος, τη σερουλοπλασμίνη και την απτοσφαιρίνη

CRP

C-reactive protein

- ⊙ Θετικές λέγονται γιατί αυξάνουν τα επίπεδα του τους τουλάχιστον κατά 25% στην πορεία της οξείας αντίδρασης
- ⊙ **Αρνητικές** λέγονται αυτές των οποίων η συγκέντρωση ελαττώνεται τουλάχιστον κατά 25% στην πορεία της οξείας φάσης όπως η λευκωματίνη, η τρανσφερίνη και ο ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας (IGF)

Κλινική σημασία

- Η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) αποτελεί την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη πρωτεΐνη οξείας φάσης στην κλινική πράξη
- Η μέτρηση των επιπέδων της CRP μπορεί να βοηθήσει στη διαφορική διάγνωση μεταξύ φλεγμονωδών και μη φλεγμονωδών παθήσεων, στην παρακολούθηση της ενεργότητας διαφόρων νοσημάτων καθώς και στην πρόγνωση ορισμένων ασθενειών

Κλινική σημασία

- Ο χρόνος ημίσειας ζωής της είναι 19 ώρες και η κάθαρση της σε υγιείς και πάσχοντες είναι η ίδια.
- Ο χρόνος αυτός παραμένει σταθερός κάτω από κάθε συνθήκη. Ο μόνος παράγοντας που επηρεάζει τα επίπεδά της στον ορό είναι ο ρυθμός παραγωγής της από το ήπαρ.
- Η τιμές της **CRP** δεν έχουν ειδικότητα και είναι υψηλές σε διάφορα νοσήματα.
- Είναι ορθότερο να παρακολουθεί κανείς τη διακύμανση των επιπέδων της CRP η οποία αντανακλά την επιδείνωση ή την υποχώρηση της παθολογικής κατάστασης, παρά τις απόλυτες τιμές της.



CRP

- ◉ Συστηματικές λοιμώξεις (Ιογενείς και βακτηριακές)
- ◉ Τραύματα και μετά από χειρουργικές επεμβάσεις
- ◉ Αυτοάνοσα νοσήματα
- ◉ Φλεγμονώδη νοσήματα εντέρου
- ◉ Νεοπλάσματα
- ◉ Κοκκιωματώδεις νόσοι
- ◉ Σε κάθε συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση

CRP

C-reactive protein

- ⊙ Ανώτερο «φυσιολογικό» όριο 8-10 mg/L
- ⊙ CRP στις γυναίκες = $(\text{Ηλικία} + 30) / 5$
- ⊙ **CRP** στους άνδρες = $\text{Ηλικία} / 5$

ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ

- ◎ CRP (C- reactive protein)
- ◎ Προκαλσιτονίνη (PCT)
- ◎ Αντιθρομβίνη III
- ◎ Κυτταροκίνες

Προκαλσιτονίνη (PCT)

- ⊙ Η προκαλσιτονίνη είναι ένα προπεπτίδιο της καλσιτονίνης
- ⊙ Η καλσιτονίνη είναι η υπεύθυνη για την ομοιοστασία του ασβεστίου ορμόνη και παράγεται από τα κύτταρα C του θυροειδούς αδένου, όπου η προκαλσιτονίνη διασπάται σε καλσιτονίνη, κατακαλσίνη και ένα πρωτεϊνικό κατάλοιπο.

Προκαλσιτονίνη (PCT)

- Η διπλή λειτουργία της προκαλσιτονίνης ως πρόδρομο πεπτίδιο της ορμόνης καλσιτονίνη και ως κυτταροκίνη-διαμεσολαβητής, η οποία αυξάνεται σε συστηματικές βακτηριακές λοιμώξεις μαζί με άλλες κυτταροκίνες, οδήγησε στο χαρακτηρισμό της ως “ορμονοκίνη”.

Προκαλσιτονίνη (PCT)

- Σε υγιή άτομα, τα επίπεδα της προκαλσιτονίνης στο αίμα είναι $<0,1$ ng/MI
- Σε βακτηριακές καθώς και σε μυκητιασικές λοιμώξεις οι τιμές της προκαλσιτονίνης ανευρίσκονται αυξημένες σε άλλοτε άλλο βαθμό, εξαρτώμενες από τη σοβαρότητα της λοίμωξης.
- Σε σηπτικούς ασθενείς, τα επίπεδα της προκαλσιτονίνης μπορεί να αυξηθούν 5.000–10.000 φορές, ενώ τα επίπεδα της καλσιτονίνης παραμένουν μέσα στα φυσιολογικά όρια

Προκαλσιτονίνη (PCT)

- Η αύξηση της προκαλσιτονίνης ανιχνεύεται ήδη εντός δύο ωρών μετά από την ενδοτοξιναιμία ή τη βακτηριαιμία και φθάνει στο μέγιστο σε 6–12 ώρες
- Σε λοιμώξεις που δεν προκαλούν την εμφάνιση του συνδρόμου της συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης, η προκαλσιτονίνη του ορού κατά κανόνα παραμένει σε σχετικά χαμηλά επίπεδα
- Αντιθέτως, σε λοιμώξεις που συνοδεύονται από το σύνδρομο της συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης η προκαλσιτονίνη είναι πολύ αυξημένη

Προκαλσιτονίνη (PCT)

Η προκαλσιτονίνη έχει τη μεγαλύτερη ευαισθησία (85%) και ειδικότητα (91%) για την επισήμανση των ασθενών με σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης που οφείλεται σε σήψη

Ασθενείς με επίπεδα προκαλσιτονίνης $\leq 0,5$ ng/mL είναι απίθανο να έχουν σοβαρή σήψη ή σηπτικό shock, ενώ επίπεδα > 2 ng/mL απαντώνται σε ασθενείς υψηλού κινδύνου για σηψαιμία ή σηπτικό shock.

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	PCT (NG/ML)	ΕΡΜΗΝΕΙΑ
I	< 0,5	Σοβαρή συστηματική βακτηριακή λοίμωξη απίθανη Σοβαρή σήψη απίθανη Τοπική λοίμωξη δεν μπορεί να αποκλεισθεί
II	0,5-2	Τοπική βακτηριακή ή ιογενής συστηματική πιθανή SIRS μη λοιμώδους αιτιολογίας Απίθανη παρουσία σήψης
II	2-10	Πιθανή συστηματική βακτηριακή, μυκητιασική λοίμωξη Τις περισσότερες περιπτώσεις σοβαρή σήψη Σπάνια μη «ειδική» άνοδος
IV	>10	Σήψη-σηπτικό shock πιθανό Ανεπάρκεια πολλαπλών οργάνων

Άλλες αιτίες αύξησης PCP

- ⊙ Τραύματα
- ⊙ Νευροενδοκρινείς όγκοι
- ⊙ Παγκρεατίτιδα
- ⊙ Εγκαύματα
- ⊙ Θερμοπληξία
- ⊙ Εμβολή μεσεντερίου
- ⊙ Καρδιογενές **shock**

ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ

- ◎ CRP (C- reactive protein)
- ◎ Προκαλσιτονίνη (PCT)
- ◎ Αντιθρομβίνη III
- ◎ Κυτταροκίνες

Αντιθρομβίνη III

- Η ATIII συντίθεται στο ήπαρ, ανευρίσκεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και κυκλοφορεί στο πλάσμα σε συγκέντρωση 0.2mg/ml
- Η κύρια δράση της συνίσταται στην αδρανοποίηση της θρομβίνης

Αντιθρομβίνη III

- Η ATIII είναι ένας καλός προγνωστικός δείκτης της έκβασης της σήψης. Ασθενείς με σοβαρή σήψη ή σηπτική καταπληξία παρουσιάζουν πρόιμη μείωση των επιπέδων της ATIII
- Μείωση των επιπέδων της ATIII πάνω από το 50% των φυσιολογικών τιμών συνεπάγεται σημαντικά υψηλό κίνδυνο θανάτου

Κυτταροκίνες

- Πρόκειται για γλυκοπρωτεΐνες που εκκρίνονται από μακροφάγα, μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα
- Έχουν περιορισμένη κλινική εφαρμογή λόγω του πολύ μικρού χρόνου ημίσειας ζωής (της τάξης των λίγων λεπτών) και της μικρής ειδικότητάς τους, αφού η παραγωγή τους επάγεται και από μη λοιμώδη ερεθίσματα (χειρουργικό τραύμα, αυτοάνοσα νοσήματα)

Κυτταροκίνες

- Οι πιο αντιπροσωπευτικές κυτταροκίνες που σχετίζονται με τη σήψη είναι ο παράγοντας νέκρωσης όγκου τύπου (TNF- α), η ιντερλευκίνη -1, -6, -8, -10 (IL-1, IL-6, IL-8 IL-10)

	ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ	ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ/ ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ
CRP	++	++	Οικονομική, χαμηλή ειδικότητα, βραδεία αντίδραση(>24h),
PCT	++++	+	Ταχεία αντίδραση (<24h), υψηλή ειδικότητα σε σοβαρή σήψη, δαπανηρή
Κυτταροκίνες	+	+++	Δαπανηρή, μικρός χρόνος ημίσειας ζωής, υψηλή διακύμανση, χαμηλή συσχέτιση με σοβαρότητα λοίμωξης
WBC	+	+++	Απλή εξέταση, υψηλή ευαισθησία, χαμηλή ειδικότητα
Θερμοκρασία	+	++++	Απλή εξέταση, υψηλή ευαισθησία, χαμηλή ειδικότητα

Άμεσο τεστ ανίχνευσης CRP



Κόστος

4 ευρώ ανά εξέταση

PCT

- ⊙ Δεν υπάρχει διαθέσιμο «γρήγορο» test για χρήση κατ'οίκον.
- ⊙ Υπάρχει το PCT-Q® (Brahms, Germany) που χρησιμοποιείται μόνο *in vitro* και που δίνει αποτελέσματα σε περίπου 50 λεπτά ως εξής:
(<0.5 ng/ml, 0.5 to 2 ng/ml, 2 to 10 ng/ml and >10 ng/ml)

Κόστος

65 ευρώ ανά εξέταση

Μοριακές τεχνικές διάγνωσης της σήψης και της μικροβιαιμίας

- ◉ Πρόκειται για νεότερες μεθόδους ανίχνευσης γενετικού υλικού παθογόνων μικροβίων με τη μέθοδο **real time PCR**.
- ◉ Το κιτ ανίχνευσης που χρησιμοποιείται είναι το **LightCycler SeptiFast test της Roche Molecular Systems**
- ◉ Η μέθοδος είναι σε θέση να αναγνωρίσει τη παρουσία γενετικού υλικού βακτηρίων και μυκήτων.

Μοριακές τεχνικές διάγνωσης της σήψης και της μικροβιαιμίας

Η εξέταση έχει ένδειξη σε σοβαρές λοιμώξεις απειλητικές για τη ζωή (σηπτικό shock), και σε ασθενείς που νοσηλεύονται σε ΜΕΘ όταν η απόφαση για στοχευμένη αντιβιοτική αγωγή έχει μεγάλη σημασία.

Septifast

- ◉ Ταχύτητα (μέρες γρηγορότερο από την παραδοσιακή ΚΑ)
- ◉ Ευαισθησία (περισσότερα θετικά δείγματα από τη ΚΑ)
- ◉ Ειδικότητα (λιγότερα επιμολυσμένα δείγματα)
- ◉ Πολυμικροβιακές λοιμώξεις (καλύτερο στην απομόνωση πολλαπλών μικροβίων)
- ◉ Συμμόρφωση της αντιβιοτικής θεραπείας σε ασθενείς που έχουν λάβει αντιβιοτικά.
- ◉ Απομόνωση μυκήτων

Septifast

- *Escherichia coli*
- *Klebsiella (pneumoniae / oxytoca)*
- *Serratia marcescens*
- *Enterobacter (cloacae / aerogenes)*
- *Proteus mirabilis*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Acinetobacter baumannii*
- *Stenotrophomonas maltophilia*

Septifast

- *Staphylococcus aureus*
- CoNS (Coagulase negative
- *Staphylococci: S. epidermidis, S. haemolyticus*)
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus spp. (S. pyogenes, S. agalactiae, S. mitis)*
- *Enterococcus faecium*
- *Enterococcus faecalis*

Μοριακές τεχνικές διάγνωσης της σήψης και της μικροβιαμίας

- *Candida albicans*
- *Candida tropicalis*
- *Candida parapsilosis*
- *Candida krusei*
- *Candida glabrata*
- *Aspergillus fumigatus*

Septifast

- Η εξέταση δίνει οριστικό αποτέλεσμα σε 5-6 ώρες.
- Το κόστος της είναι περίπου 300 δολάρια και στην Ελλάδα κοστολογείται περίπου στα 300 ευρώ.
- Γίνεται μόνο σε εξειδικευμένα κέντρα και προς το παρόν μόνο στο Πανεπιστήμιο Αθηνών στην έδρα της μικροβιολογίας.

Μοριακές τεχνικές διάγνωσης της σήψης και της μικροβιαιμίας

Για περισσότερα από 100 χρόνια η καλλιέργεια αίματος αποτελούσε το **Gold standart** για την ανίχνευση των μη ιογενών παθογόνων στο αίμα.

Γιατί όμως η καλλιέργεια δεν είναι η απόλυτη εξέταση?

- ⊙ Γιατί χρειάζεται χρόνο αρκετών ημερών στις περισσότερες περιπτώσεις μέχρι να δώσει οριστικό αποτέλεσμα.
- ⊙ Μειωμένη ευαισθησία σε κλινικές περιπτώσεις σήψης
 - Φαγοκυττάρωσης των παθογόνων
 - Λήψη αντιβιοτικών κατά τη λήψη του δείγματος

Και κυρίως γιατί η σήψη δεν είναι συνώνυμη με τη μικροβιαίμια

ΒΑΚΤΗΡΙΑΙΜΙΑ

Παρουσία βακτηρίων στο αίμα που ανιχνεύονται με την καλλιέργεια αίματος

ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ

SIRS

- Οφείλεται σε διάφορους παράγοντες λοιμώδους ή μη αιτιολογίας και συνοδεύεται από την παρουσία δύο ή περισσότερων από τα πιο κάτω:

$\Theta > 38^{\circ}\text{C}$ ή $\Theta < 36^{\circ}\text{C}$,

σφύξεις $> 90/\text{min}$,

αναπνοές $> 20/\text{min}$

Λευκά $> 12.000/\text{mm}^3$ ή $< 4.000/\text{mm}^3$

ή άωρεςμορφές $> 10\%$

ΣΗΨΗ

Ορίζεται ως η συστηματική φλεγμονώδης αντίδραση SIRS με παρουσία λοίμωξης

Και γιατί εμείς να μη θεραπεύουμε εμπειρικά?

- Γιατί πολλές φορές ακόμα και τα ευρέως φάσματος αντιβιοτικά δεν αρκούν
- Αυξανόμενη αντοχή (**ESBL**, **MRSA**, **Vancomycin**)
- Αδύνατη η «προς τα κάτω» αναθεώρηση της αντιβιοτικής αγωγής
- Δεν έχουμε καμία πληροφορία για το παθογόνο-απουσία σχεδίου δράσης για τον ασθενή

Τι μας επείγει λοιπόν?

Ο χρόνος έναρξης της κατάλληλης
αντιβιοτικής αγωγής

Μελέτες

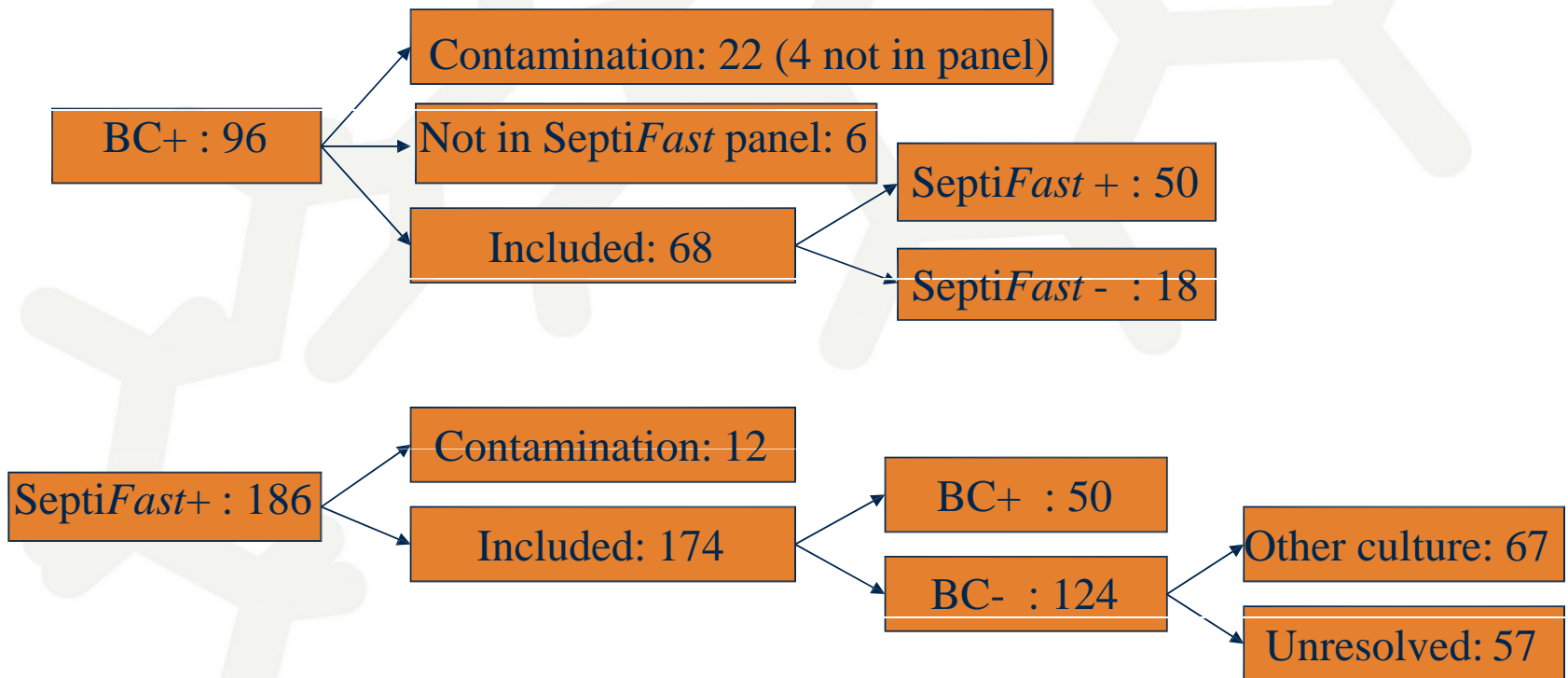
Σε μεγάλη αναδρομική μελέτη που αφορούσε 14 ΜΕΘ, 10 νοσοκομείων Αμερικής και Καναδά με 2735 ασθενείς με σηπτικό **shock** βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έναρξης κατάλληλης αντιβιοτικής αγωγής και επιβίωσης των ασθενών αυτών.

Μελέτες

- Οι ασθενείς που έλαβαν άμεσα κατάλληλη αντιβιοτική αγωγή παρουσίασαν επιβίωση της τάξης του 78%
- Για κάθε ώρα που αργούσε η χορήγηση κατάλληλης αντιβιοτικής σε εγκατεστημένο σηπτικό **shock** η συνολική επιβίωση υποχωρούσε κατά 7,8%
- Μόνο το 50% των ασθενών με σηπτικό **shock** έλαβαν κατάλληλη αντιβιοτική αγωγή μέσα σε 6 ώρες από τη διάγνωση.

Σύγκριση καλλιέργειας (BC) - Septifast

558 episodes with corresponding BC and SeptiFast
176 episodes with one or both systems positive



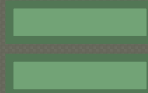
Αναζήτηση της αλήθειας

- ◉ Εμπιστευόμαστε όλα τα αποτελέσματα του **Septifast**? («φιλική» προς τη μέθοδο αλήθεια)

- ◉ Εμπιστευόμαστε τα αποτελέσματα του **Septifast** που επιβεβαιώθηκαν με καλλιέργεια («αποδεκτή» αλήθεια)

«φιλική» προς τη μέθοδο αλήθεια

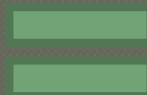
- ◉ Όλα τα θετικά που δεν ήταν επιμολυσμένα 174 ή
- ◉ Αρνητικά **septifast** με θετική καλλιέργεια 18 ή
- ◉ Θετική καλλιέργεια αλλά με στέλεχος εκτός πάνελ μεθόδου 6



- ◉ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ BC 37%
- ◉ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ SEPTIFAST 88%

«αποδεκτή» αλήθεια

- Θετικά και με τις δύο μεθόδους **50**
- Θετικά με **septifast** αρνητικά με **BC** αλλά επιβεβαίωση από άλλες καλλιέργειες **67**
- Θετικές μη επιμολυσμένες καλλιέργειες με αρνητικό **septifast** **18**
- Θετική καλλιέργεια με στέλεχος που δεν περιλαμβάνεται στο πάνελ **6**



- ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ **BC** **53%**
- ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ **Septifast** **83%**

Τέλεια τεχνολογία.....

Τότε που είναι το πρόβλημα?

ΚΟΣΤΟΣ

- BC \$ 40
- Septifast \$ 300 +
- Δεν πρέπει να συγκρίνουμε μια ακριβή μοριακή εξέταση με μια φθηνή καλλιέργεια αίματος
- Θα πρέπει να συγκρίνουμε το κόστος μιας φθηνής μοριακής εξέτασης με την ακριβή παράταση της διάρκειας παραμονής στη ΜΕΘ

Μειονεκτήματα μεθόδου

- Δεν δίνει στοιχεία για τις ευαισθησίες των παθογόνων που απομονώνει.
- Χρειάζεται συγκριτικά «μεγαλύτερο» μικροβιακό φορτίο σε σχέση με τη παραδοσιακή καλλιέργεια αίματος (30–100 CFU/ml έναντι 1 CFU/ml) όταν το μέσο φορτίο στη σήψη είναι 10 cfu/ml
- Η παρουσία του ανθρώπινου DNA που μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα

Ποια είναι η επιστημονικά τεκμηριωμένη αλήθεια

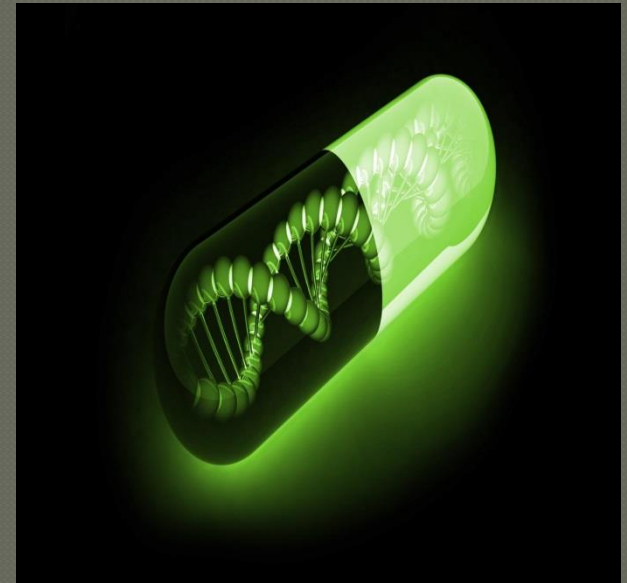
- Το **septicfast** θετικοποιείται λίγο συχνότερα από τη καλλιέργεια αίματος.
- Το **septicfast** υπερτερεί σαφώς στην απομόνωση παθογόνων σε ασθενείς που έχουν λάβει αντιβιοτικά
- Το **septicfast** και η καλλιέργεια αίματος να θεωρούνται εξετάσεις που συμπληρώνουν η μια την άλλη.
- Η καλλιέργεια αίματος ακόμη και σήμερα θεωρείται ο ακρογωνιαίος λίθος στη διάγνωση των μικροβιαμιών

Bacteremia VS DNAemia

Χρειάζονται περισσότερες μελέτες ώστε να αποδειχθεί η κλινική χρησιμότητα του
Septifast

J Clin Microbiol. Oct 2010; 48(10): 3510–3516.

Bacteremia VS DNAemia



Σας ευχαριστώ