



Fluorescenční hybridizace in situ (FISH) pozitivních hemokultur v systému BacT/ALERT 3D.

Holec V., Mrázek J., Jančová J., Kloudová A., Dobiášová S., Škapová T.
Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, Centrum MPI

ÚVOD

Fluorescenční hybridizací in situ (dále FISH) se detekují specifické sekvence na 16S a 23S rRNA u bakterií a 18S rRNA u kvasinek za pomoci fluorescenčně značených oligonukleotidových DNA-sond. Detekční limit těchto sond stanovený pro vzorky BAL je 10^3 CFU/ml (1).

Několik zahraničních studií srovnávalo metodu FISH s kulturační diagnostikou v hemokultivačních systémech BACTEC nebo BacT/ALERT (2,3,4,5). Naše pracoviště toto provedlo poprvé v rutinních laboratorních podmínkách ČR.

Práce byla provedena na základě smlouvy o zpracování srovnávací studie s firmou BioVendor, Laboratorní medicína a.s.

METODIKA

- Hemokultivace byla prováděna v systému BacT/ALERT 3D (bioMérieux) (obr.A), každá signál-positivní hemokultura byla mikroskopována dle Grama a kultivována standardním postupem. Dle mikroskopie byla vybrána sada sond SeaFAST®Sepsis (Seapro Theranostics International, BioVendor). Pro FISH bylo sterilně odebráno 0,5 ml hemokultury. Pro stanovení FISH byla hemokultura 10x naředěna v PBS (fosfátový pufr) a promíchána. Po 10 minutách byly nanесeny naředěné hemokultury na sklíčko (obr.B), po usušení byly vzorky fixovány v mikrovlnné troubě. Následovala permeabilizace buněk etanolem (obr.C), razantnější narušení buněčné stěny se provádí u G+ bakterií (navíc procedura s komponenty F a G). Po usušení se provedla hybridizace - nanесení hybridizační směsi na příslušné políčko, inkubace v hybridizační komůrce 90 minut při 48°C ve vodní lázni (obr.D). Nehybridizované sondy byly odstraněny promytím. Promývání probíhalo v promývací komůrce ve vodní lázni při 48°C po dobu 15 minut. Po promytí se připravil preparát pro mikroskopování - promytí v etanolu, usušení, přidání montovacího média, překrytí krycím sklíčkem. K mikroskopování byl použit mikroskop OLYMPUS BHT s fluorescenčním nádstavcem s filtry pro červenou a zelenou fluorescenci (sondy jsou značeny FITC, Cy3).
- Statistická účinnost použitých sond byla stanovena dle Ransohoffa a Feinsteina (6).

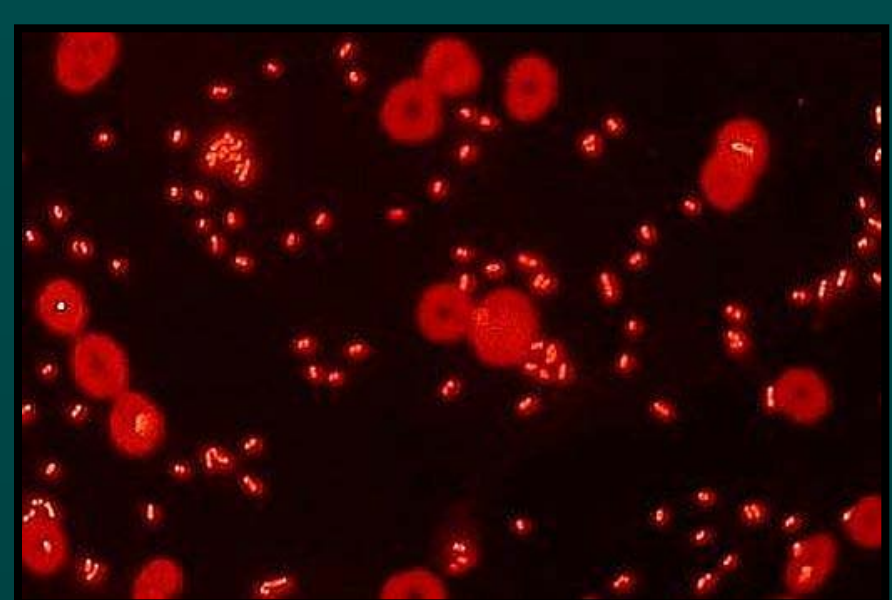
VÝSLEDKY

- Ze 181 signál-positivních hemokultur bylo izolováno 188 kmenů bakterií a kvasinek (87 stafylokoků, 12 streptokoků, 12 enterokoků, 42 G-fermentujících tyčků, 21 G- nefermentujících tyčků, 5 G+ aerobních tyčků a 9 kandid). Výsledku FISH bylo dosaženo do tří hodin od klasické mikroskopie pozitivní hemokultury.
- Pro každou sondu byla stanovena senzitivita (rozmezí 0,800 – 1,000), specifita (0,714-1,000), pozitivní (0,500-1,000) a negativní (0,833-0,862) prediktivní hodnota ve vztahu k výsledku kultivace a prevalenci - viz tabulka. Sondy s vysokou senzitivitou (0,953-1,000) i specifitou (0,979-1,000) diagnostikují tyto skupiny bakterií: eubakterie, *Enterobacteriaceae*, stafylokoky, streptokoky a enterokoky. V těchto skupinách hybridizovaly kromě níže uvedených druhů mj. druhy koagulázo-negativních stafylokoků (s převahou *S.epidermidis*, *S.hominis* a *S.haemolyticus*), beta-hemolytické streptokoky skupiny G, *S.mitis*, *S.bovis*, *S.salivarius*, *E.cloacae*, *P.mirabilis*, *K.oxytoca*, *S.marcescens*, *E.kobei*, *Salmonella* Enteritidis, komplex *A.baumannii*, *A.lwoffii*, *M.osloensis*, korynebakteria a *B.cereus*.
- S vysokou senzitivitou 1,000 a specifitou (0,980-1,000) diagnostikují do druhu bakterie *S.aureus*, *S.agalactiae*, *F.faecalis*, *E.faecium*, *P.aeruginosa*, *S.maltophilia*, *K.pneumoniae* a *B.cepacia* komplex. Individuální sonda 6a *E.coli* v soupravě nefungovala.
- Druhová identifikace kandid *C.albicans*, *C.tropicalis* a *C.parapsilosis* měla senzitivitu 0,8-1,000 a specifitu 0,714-1,000.
- Sondy pro *S.pyogenes*, *C.perfringens*, *S.pneumoniae*, shigely, *H.influenzae*, bakteroidy, prevotely, *C.dubliniensis* a *C.glabrata* nebyly do statistiky zahrnuty, protože ve sledovaném pozitivním souboru hemokultur tyto mikroorganismy nebyly kulturačně prokázány.

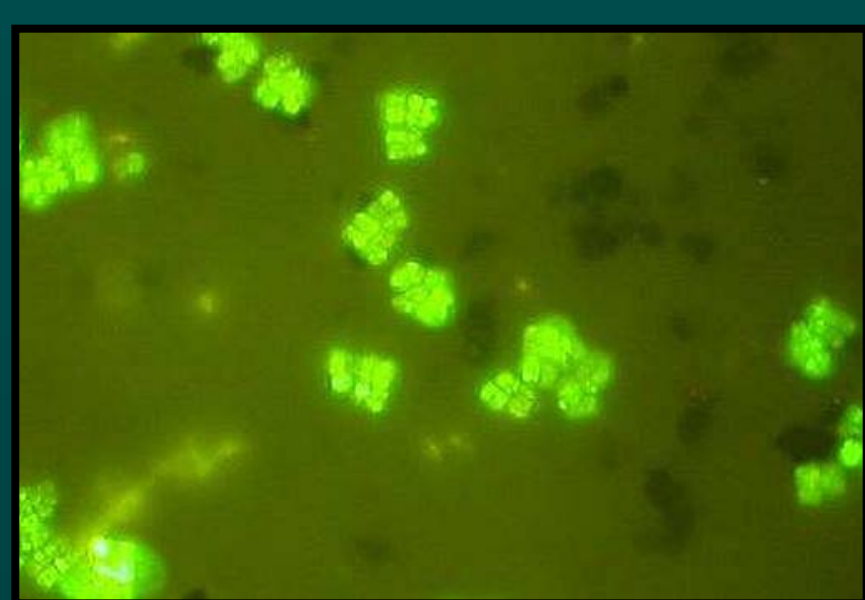
ZÁVĚR

- Výsledek sondy FISH je hotov do tří hodin po mikroskopii pozitivní hemokultury barvené dle Grama, což umožňuje ještě tentýž den upřesnit první diagnostickou informaci o možném původci sepse.
- Sondy s vysokou senzitivitou i specifitou diagnostikují v hemokulturách tyto skupiny bakterií: eubakterie, *Enterobacteriaceae*, stafylokoky, streptokoky a enterokoky.
- Umožňují předběžnou druhovou diferenciální diagnostiku důležitých původců sepsí ze skupiny G+ koků: *S.aureus*, *S.agalactiae*, *E.faecalis* a *E.faecium*. Ve skupině G-tyčků diagnostikují do druhu *K.pneumoniae*, z nefermentujících *P.aeruginosa*, *S.maltophilia* a *B.cepacia* komplex.
- Nutno revidovat sondu pro *E.coli*, protože je z hemokultur mezi G-fermentujícími tyčkami izolována nejčastěji.
- Multiplexový systém umožňuje paralelní testování více skupin patogenů najednou.
- FISH hemokultury musí být vždy doprovázena paralelní kultivací.
- Odečítání FISH vyžaduje zkušenost s fluorescenční mikroskopií, např. pro vyloučení autofluorescence (problém u kvasinek).
- Nutnost provádět interní kontrolu kvality šarží jednotlivých sond.
- Nutnost provádět interní kontroly hybridizace – pozitivní se sondou pro eubakterie. Doporučujeme zařadit i negativní (např. komplementární Non-EUB338) (1).
- Metoda FISH je rovněž vhodná i k rutinnímu použití. Její cena je adekvátní závažnosti vyšetřovaného klinického materiálu.

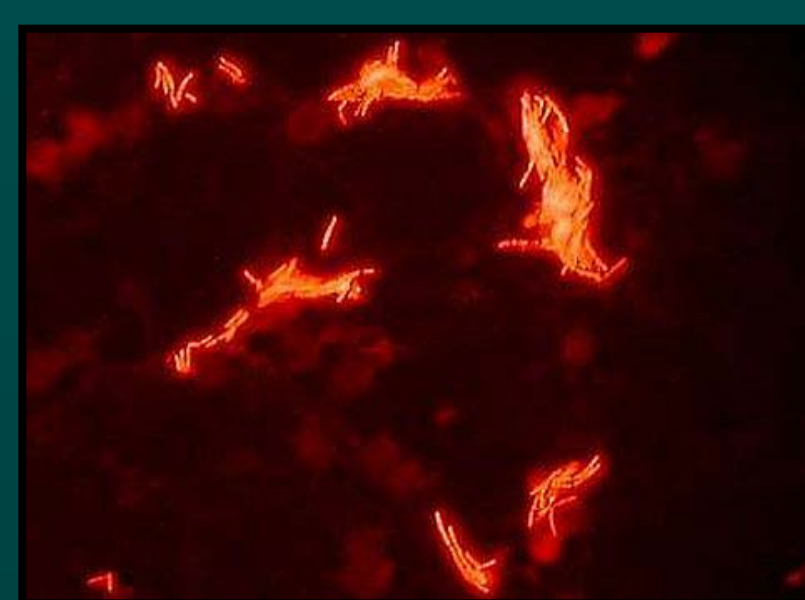
Příklady fluorescenčních obrazů:



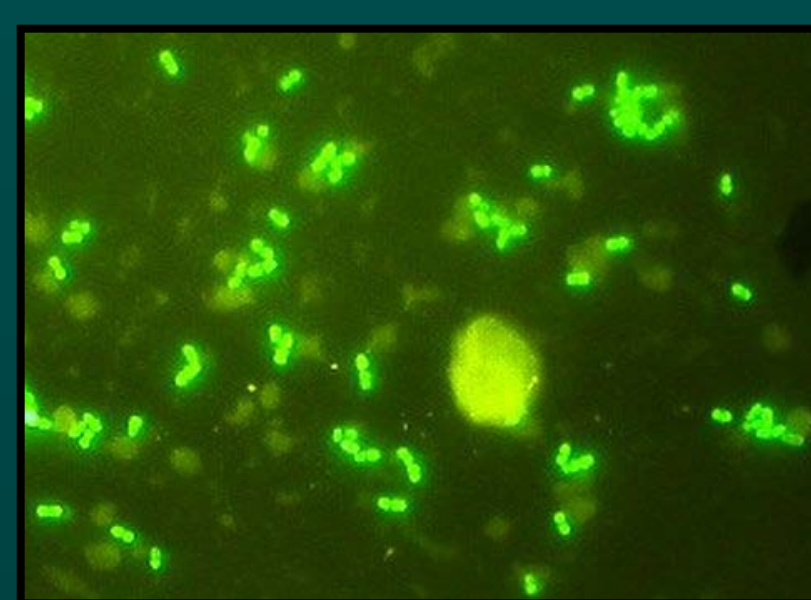
Pseudomonas aeruginosa



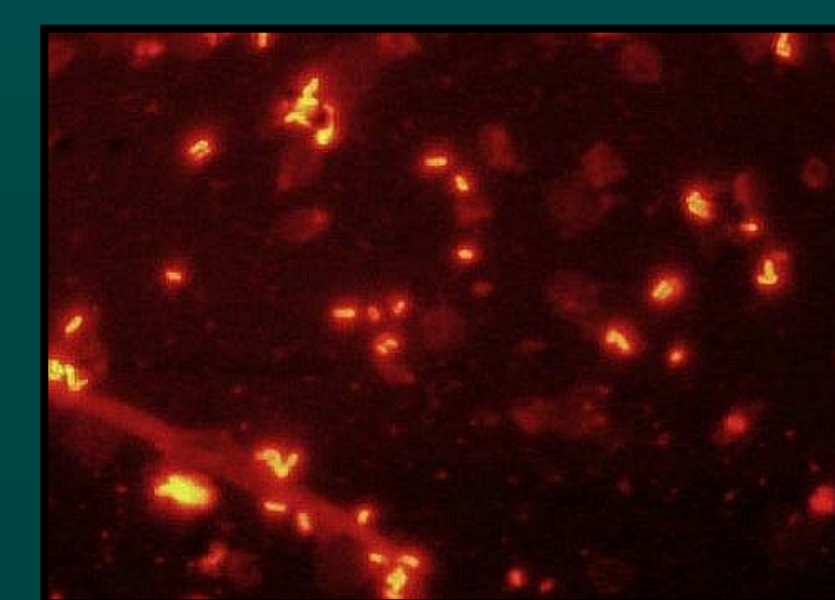
Staphylococcus aureus



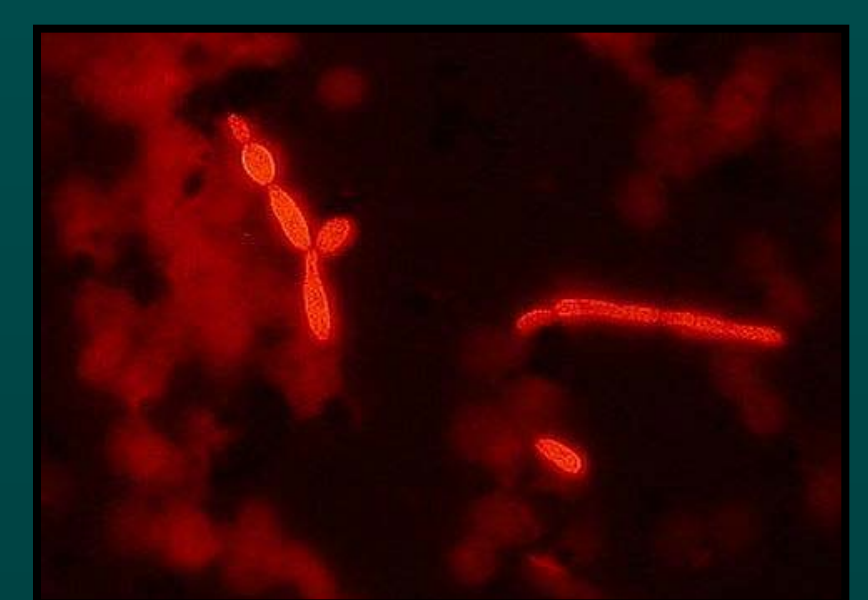
Burkholderia cepacia komplex



Streptococcus agalactiae



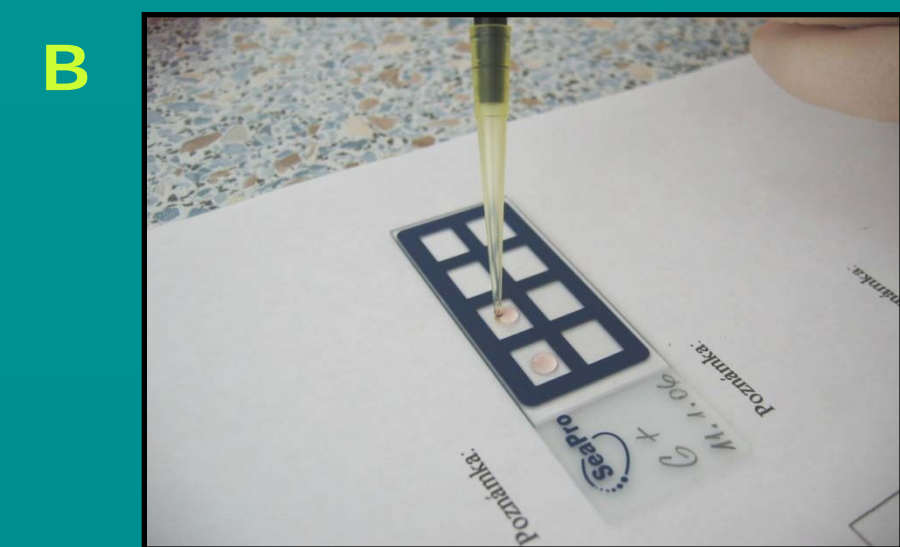
Klebsiella pneumoniae



Candida albicans

LITERATURA

- Juretschko S. et al.: Applications of fluorescence in situ hybridization in diagnostic microbiology. In: Pershing D.H. et al., Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, ASM Press, 2004, p.3-18
- Kempf V.A.J. et al.: Fluorescent in situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures, J.of Clin.Microbiol.,2000,2: 830-838
- Kempf V.A.J. et al.: Rapid identification of pathogens in blood, Ann.of Int.Medicine, 2000,4: 330-331
- Jansen G.J. et al.: Rapid identification of bacteria in blood cultures by using fluorescently labeled oligonucleotide probes, J.of Clin.Microbiol., 2000, 2:814-817
- Peters R.P.H. et al: Shorter time to identification of pathogens in positive blood cultures by FISH in routine practice, 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI, 2005, vol.11, suppl. 2, p.35
- Ransohoff D.F. and Feinstein A.R.: Problems of spectrum and bias in evaluating the efficacy of diagnostic tests, N.Engl.J.Med, 1978, 299:926-930



Tab.: Statistická účinnost diagnostického testu

sonda	mikroorganismus	SEN	SPE	PPH	NPH	F
1a	<i>Staphylococcus sp.</i>	0.953	1	1	0.862	0.775
1b	<i>S.aureus</i>	1	1	1	1	0.18
2a	<i>S.agalactiae</i>	1	1	1	1	0.047
3a	<i>Streptococcus sp.</i>	0.917	0.979	0.846	0.989	0.111
3b	<i>Enterococcus sp.</i>	1	1	1	1	0.111
4a	<i>E.faecalis</i>	1	1	1	1	0.167
4b	<i>E.faecium</i>	1	1	1	1	0.071
6a	<i>E.coli</i>					0.3 nefunguje
7b	<i>Paeruginosa</i>	1	1	1	1	0.164
8a	<i>S.maltophilia</i>	1	1	1	1	0.032
8b	<i>K.pneumoniae</i>	1	0.98	0.917	1	0.177
9a	<i>Eubacteria</i>	1	1	1	1	0.959
9b	<i>Enterobacteriaceae</i>	1	0.968	1	1	0.575
10b	<i>C.albicans</i>	0.8	1	1	0.833	0.5
11b	<i>C.tropicalis</i>	1	0.714	0.5	1	0.222
12b	<i>C.parapsilosis</i>	1	0.857	0.667	1	0.222
13	<i>B.cepacia</i> komplex	1	1	1	1	0.091

Sonda = dle panelu seaFAST®Sepsis

SEN = senzitivita (když je kultivace pozitivní, s jakou pravděpodobností je pozitivní sonda?)

SPE = specifita (když není kultivace pozitivní, s jakou pravděpodobností je negativní sonda?)

PPH = pozitivní prediktivní hodnota (když je sonda pozitivní, s jakou pravděpodobností je pozitivní kultivace?)

NPH = negativní prediktivní hodnota (když je sonda negativní, s jakou pravděpodobností je negativní kultivace?)

F = četnost výskytu jevu, prevalence (6)