

Laboratorní diagnostika sepsy

S imunologií mezi obory, 28.3.2019



Francová I., Laboratoř klinické imunologie a
alergologie ÚLBLD VFN

Sepse (systémová zánětlivá odpověď)

Život ohrožující orgánová dysfunkce způsobená deregulovanou odpovědí hostitelského organismu na přítomnost infekce

Incidence 31 mil pacientů za rok, 1-2% všech hospitalizovaných pacientů, 25% pacientů ICU

Vysoká mortalita – 1/6 úmrtí

30-50 % všech úmrtí v nemocnicích, nejčastější příčina úmrtí na ICU

Narůstající incidence (komorbidity, stárnutí)

Dlouhodobé následky

Finanční náklady na léčbu sepse – až 5,2 % celkových výdajů na zdravotnictví ve vyspělých zemích (7,6 miliard EU v Evropě (2006), 24 miliard US (2007))

<https://www.mdcalc.com/qsofa-quick-sofa-score-sepsis>

ICU

INSTRUCTIONS
Use to predict mortality, NOT to diagnose sepsis, per 2017 Surviving Sepsis Guidelines.

When to Use ▾ Pearls/Pitfalls ▾ Why Use ▾

Altered mental status GCS <15	No	Yes
Respiratory rate ≥22	No	Yes
Systolic BP ≤100	No	Yes

2 points
qSOFA Score

High Risk
qSOFA Scores 2-3 are associated with a 3- to 14-fold increase in in-hospital mortality. Assess for evidence of organ dysfunction with blood testing including serum lactate and calculation of the full SOFA Score.

Patients meeting these qSOFA criteria should have infection considered even if it was previously not.

První definice seps (1991)

I Potvrzená/předpokládaná infekce

I Kritéria SIRS (dvě nebo více):

- I Tělesná teplota > 38 °C nebo < 36 °C
- I Srdeční frekvence > 90/min
- I Dechová frekvence > 20/min nebo PaCO₂ < 32 mm Hg (4,3 kPa)
- I Leukocytóza > 12 000/μl nebo leukopenie < 4 000/μl

Druhá definice seps (2001)

I Potvrzená/předpokládaná infekce

I Jedno či více z následujících kritérií:

- I Celkové příznaky
 - Horečka > 38,3 °C
 - Hypotermie < 36 °C
 - Srdeční frekvence > 90/min
 - Tachypnoe
 - Alterace vědomí
 - Viditelné státní pozitivní bilance
 - Hyperglykemie bez DM
- I Známky zánětu
 - Leukocytóza > 12 000/μl
 - Leukopenie < 4 000/μl
 - > 10 % nezralých forem
 - Vzestup CRP
 - Vzestup prokalcitoninu
- I Hemodynamika
 - Arteriální hypotenze
 - SvO₂ > 70 %
 - Srdeční index > 3,5 l/min/m²
- I Organové dysfunkce
 - Arteriální hypoxemie
 - Nově vzniklá oligurie
 - Vzestup koncentrace kreatininu o 44,2 μmol/l
 - Koagulopatie
 - Trombocytopenie
 - Ileus
 - Hyperbilirubinemie
- I Porucha tkáňové perfuze
 - Hyperlaktatemie > 1 mmol/l
 - Snižený kapilární refill nebo

Třetí definice seps (2016)

I Potvrzená/předpokládaná infekce

I Skóre SOFA (2 body a více):

- I Respirace/oxygenace (PaO₂/FIO₂)
- I Glasgow Coma Scale
- I Hypotenze (MAP < 65 mm Hg) či potřeba vazopresoru
- I Jaterní funkce (bilirubin)
- I Koagulopatie (trombocytopenie)
- I Renální funkce (koncentrace sérového kreatininu, oligo-/anurie)

I Screening dle qSOFA

- I Alterace stavu vědomí
- I STK < 100 mm Hg
- I Dechová frekvence > 22/min

Systemový zánět – infekční/neinfekční

SEPSE-1 definition

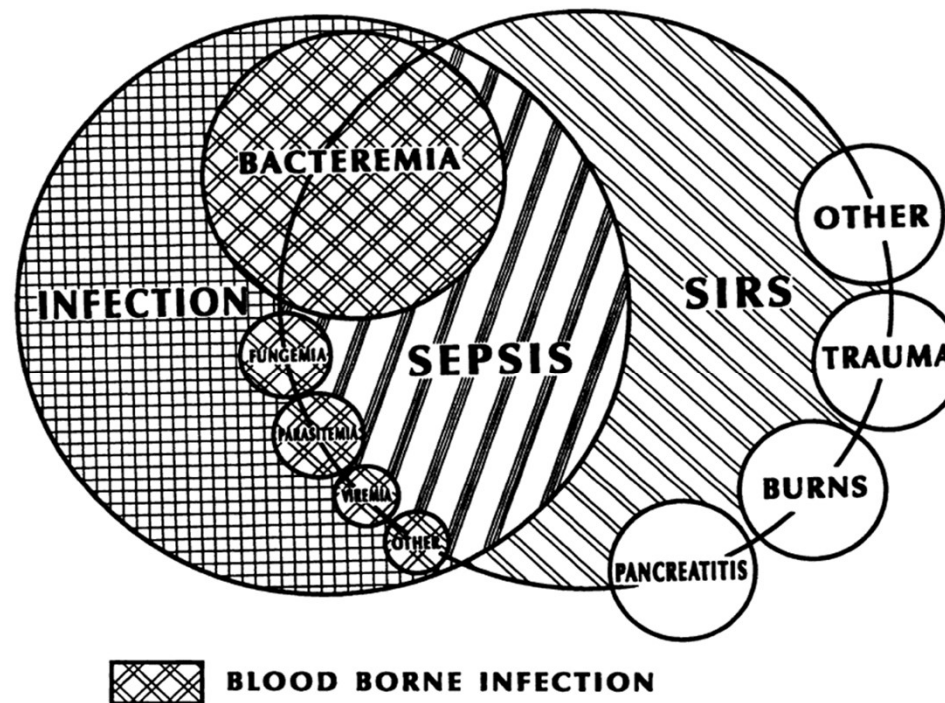


FIGURE 1. The interrelationship between systemic inflammatory response syndrome (SIRS), sepsis, and infection.

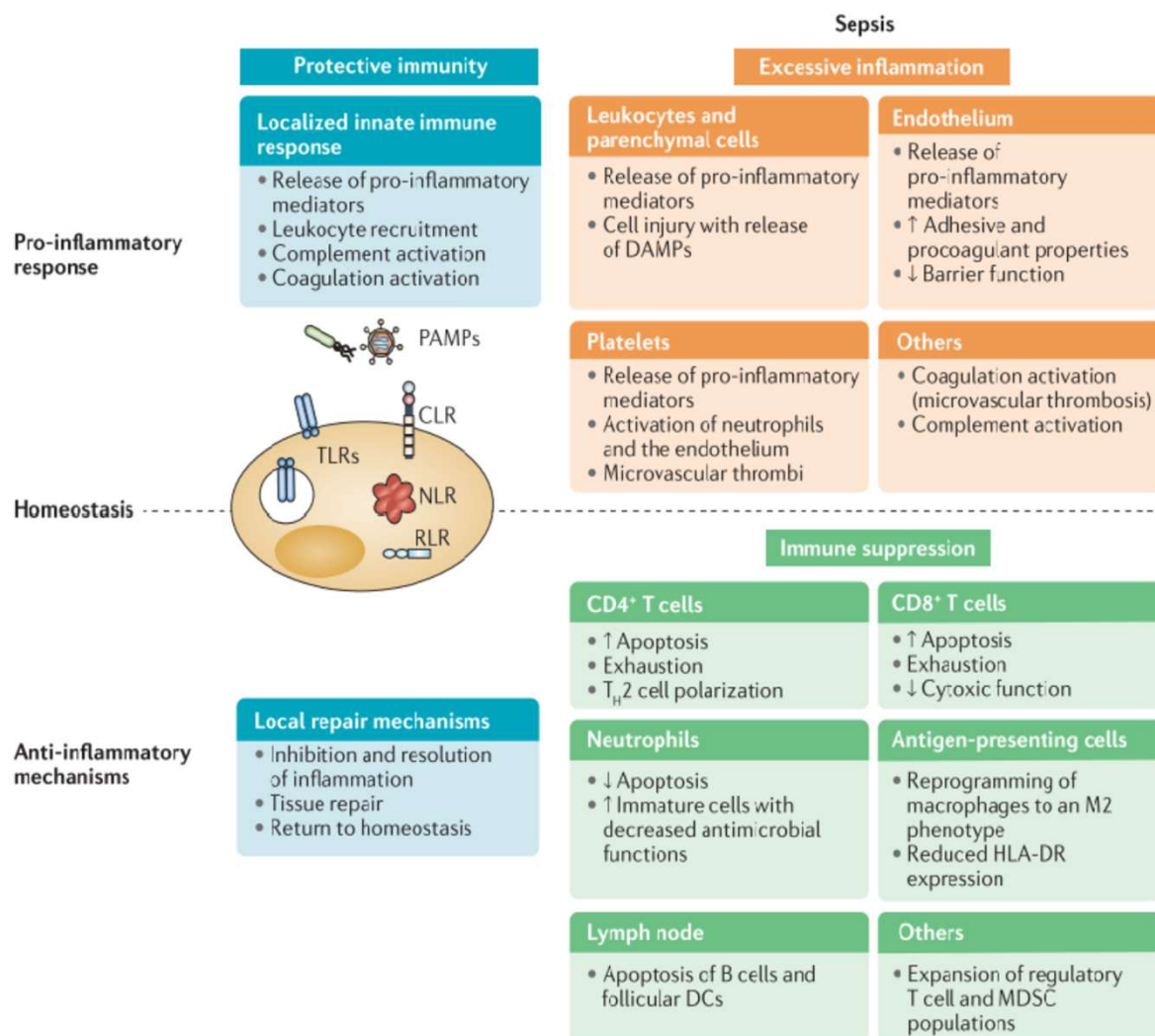
Chest 1992; 101:1644-55

Role imunitního systému

- Rozpoznání patogenu (PAMP vs PRR)
- Aktivace signalizačních drah – NFkB, NOD2...
- Sekrece mediátorů zánětu
- Fagocyty, leukocyty do místa zánětu, aktivace komplementového a koagulačního systému

Imunitní odpověď – regulovaná – návrat homeostázy

Imunitní odpověď – **neregulovaná**
systemová – přehnaná zánětlivá fáze SIRS
 následovaná fází CARS (compensatory antiinflammatory response syndrome) vede k imunoparalýze



Imunopatologie SIRS

PAMPs a DAMPs

Mediátory a biomarkery zánětlivé
odpovědi:

Cytokiny, chemokiny

Solubilní buněčné receptory

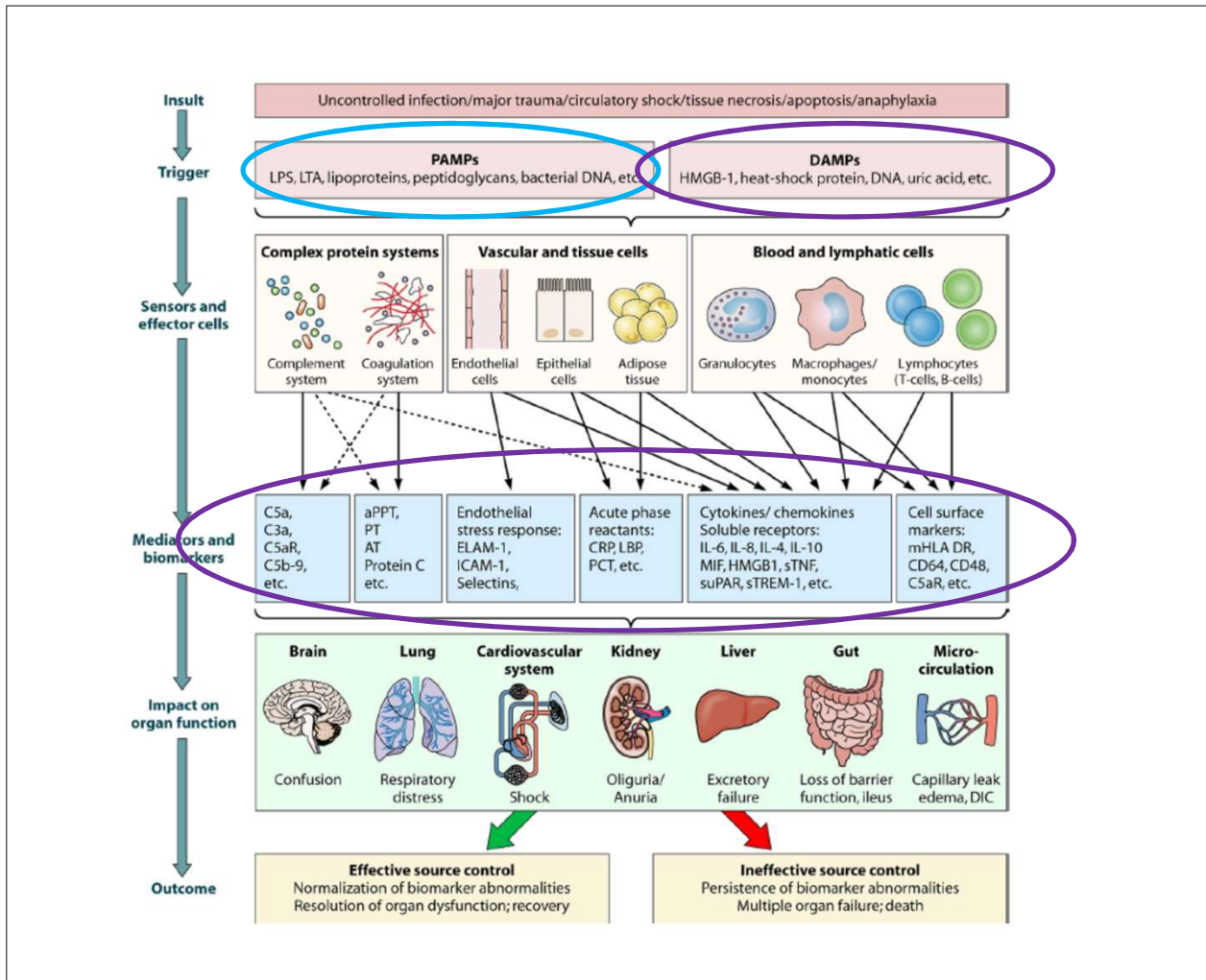
Aktivace komplementového systému

Aktivace koagulačního systému

Endoteliální poškození

Reaktanty akutní fáze

Buněčné povrchové markery



Hemokultura – zlatý standard

Zlatý standard - Hemokultura

jednoznačný průkaz při pozitivitě patogenního agens a přítomnosti klinického stavu

ALE!!!

Existuje kontaminace – pozitivní HK neznamena sepsi

Negativní hemokultura (30-50 %) nevylučuje sepsi

Časové zpoždění – 48-72 hod podle typu agens

Septifast – 4 hod, pouze pro určité patogeny a bez citlivosti

Role biomarkerů – co očekáváme?

Identifikace zánětu – co nejčasnější – ATB do 4 hod

Rozlišení SIRS neinfekční x sepse

Rozlišení etiologie - bakteriální, virová, mykotická, parazitární, G+/G-

Odhad tíže stavu, vývoj, prognóza, predikce komplikací

Průvodce ATB terapií

Přesnost a reprodukovatelnost stanovení

Statimového stanovení

Kvantitativní měření

Snadná interpretace výsledků (???)

Cenová dostupnost

Measures, markers, and mediators: Toward a staging system for clinical sepsis. A Report of the Fifth Toronto Sepsis Roundtable, Toronto, Ontario, Canada, October 25–26, 2000

John C. Marshall, MD; Jean-Louis Vincent, MD, PhD; Mitchell P. Fink, MD; Deborah J. Cook, MD, MSc; Gordon Rubenfeld, MD, MPH; Debra Foster, BSc, RN; Charles J. Fisher Jr; Eugen Faist, MD; Konrad Reinhart, MD

>100 potencionálních biomarkerů
Crit Care Med 2003

Category	Markers
Microbial products	Endotoxin Enterobacterial C Candida antigen Bacterial DNA
Physiologic parameters	Temperature Heart rate Cardiac index Respiratory rate
Hematopoietic cells	Neutrophils Monocytes
Cell surface markers	PMN, Monocyte CD11b Monocyte CD40 Monocyte CD63 Monocyte CD64 E-selectin sCD25 (IL-2R) sE-selectin sELAM-1 sTNF-R1 sTNF-R2 sCD14 sICAM-1
Soluble receptors	sCD25 (IL-2R) sE-selectin sELAM-1 sTNF-R1 sTNF-R2 sCD14 sICAM-1
Cytokines	IL-1 IL-2 IL-6 IL-8 IL-10 IL-18 TNF
Acute phase reactants	Lipopolysaccharide-binding protein Fibrinogen 1 anti-trypsin
Mediators of coagulation	Fibrin degradation products von Willebrand's factor Fibrinopeptide A PAI-1 TPA F1 + 2 Thrombin-antithrombin complexes D-dimers Thrombomodulin Platelet thrombospondin Procoagulant activity
Cellular processes	Lymphocyte apoptosis Neutrophil apoptosis Whole blood synthesis of TNF
Miscellaneous	Procalcitonin Nitric oxide, NO ₂ /NO ₃ Ceramide Lactate Cardiac troponin I Neopterin Carbohydrate-deficient transferrin Intestinal fatty acid binding protein Myeloperoxidase Elastase Lactoferrin Lipid peroxidation products Hydrogen peroxide Conjugated alenes

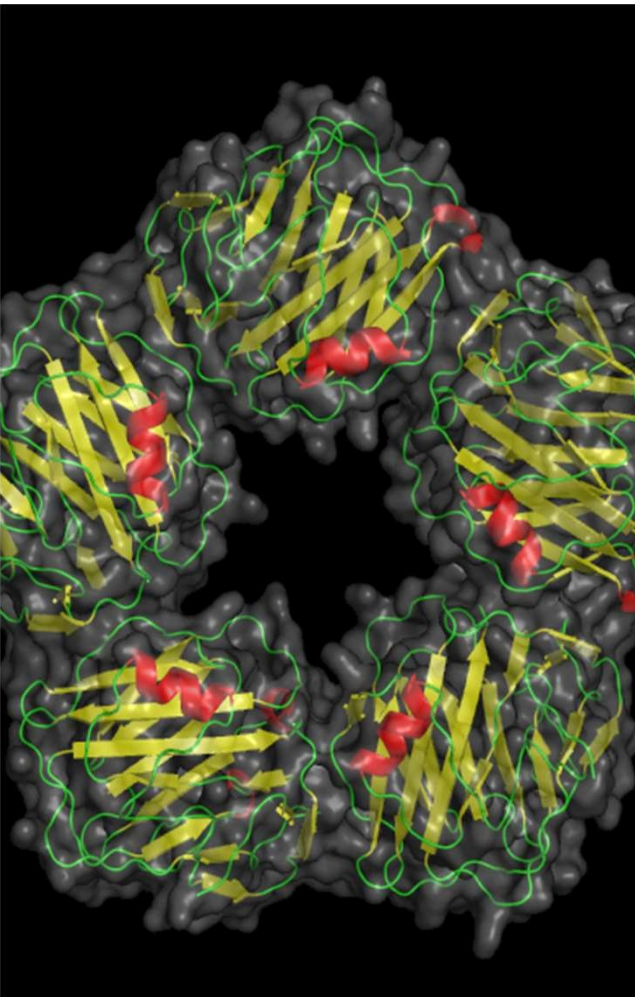
New Approaches to Sepsis: Molecular Diagnostics and Biomarkers
Konrad Reinhart,^a Michael Bauer,^{a,b} Niels C. Riedemann,^a and Christiane S. Hartog^{a,h}

>180 potencionálních biomarkerů
Clinical Microbiology Rewiev 2012

A jaké jsou současné možnosti?

- Cytokiny
 - Specifické markery
 - Nespecifické markery
 - Proteiny akutní fáze
 - Buněčné markery - KO
 - povrchové
- IL1, IL6, IL10, TNF
 - PCT, presepsin, C4, sérový kalprotektin
 - glu, krea, bil, laktát
 - CRP, albumin, prealbumin, fibrinogen, leukocyty – počet a diferenciace, imaturované granulocyty, NLR
 - CD 64 a CD11b na PMNs, HLA DR na monocytech, Treg – imunologické lab.

Crit Care Med 2003; 31:1560–1567)



CRP

nejčastěji indikovaný marker zánětu

vysoká senzitivita,

vysoká negativní prediktivní hodnota, při normálních hladinách je sepse nepravděpodobná,

diferencuje virovou od bakteriální etiologie (POCT),

ALE

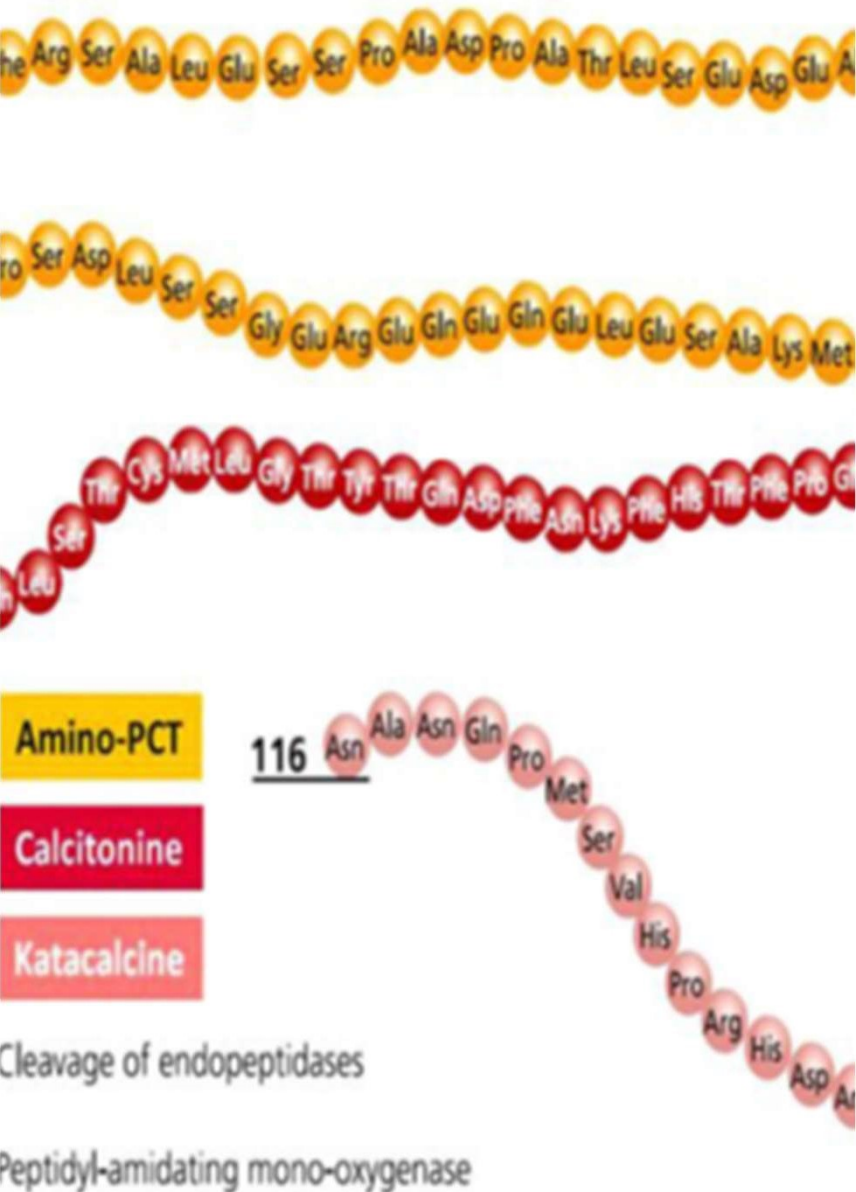
relativně pozdní nástup – 6 hod, maximum po 48 hod

nediferencuje tíži stavu,

nemá vztah k mortalitě,

nepřispívá k odlišení sepse a SIRS

nízká prediktivní hodnota při jaterním selhání



Prokalcitonin - PCT

Stimul k produkci- bakteriální toxiny - LPS, LTA , produkty buněčné destrukce, mediátory indukované imunitní odpovědí (IL1,IL6..)

Nástup do 2 hod, maximum po 48 hod- nejčastěji používaný marker **časně seps**

Při odlišení infekčního od neinfekčního systémového zánětu má na rozdíl od CRP vyšší senzitivitu - 88% vs. 75% i specificitu 81% vs. 67%

Hodnocení tíže stavu u bakteriálního zánětu.

Diferenciace etiologie inf.agens G- > G+ > fungi

Dynamika má vztah k prognóze

Pomáhá při indikaci a monitoraci ATB terapie

Pozor na neinfekční elevace (chirurgický výkon, hypoxie, rabdomyolýza)

Schopnost CRP a PCT diferencovat typ infekčního agens

Výsledky HK n=166	CRP	PCT
G+ sepse	119.00 (69.80;219.00)	0.81 (0.32;3.50)
G- sepse	129.90 (87;210)	8.90 (1.88;32.60)
mykotická	149 (128;152)	0.58 (0.35;0.73)

CRP vysoce senzitivní k zánětu obecně, specifita pro typ zánětu slabá

PCT na rozdíl od CRP může rozlišit G- od G+ a mykotické etiologie

Tyto poznatky mohou upřesnit antibiotickou léčbu ještě před získáním výsledků mikrobiologického vyšetření

Presepsin

Solubilní CD14 - sCD14ST = odštěpený N terminal fragment (ST subtype)= presepsin

Časný marker sepse – nástup do 1 hod, maximum po 3 hod

Vhodný marker pro doplnění k PCT, nenahrazuje, každý má vlastní limitace

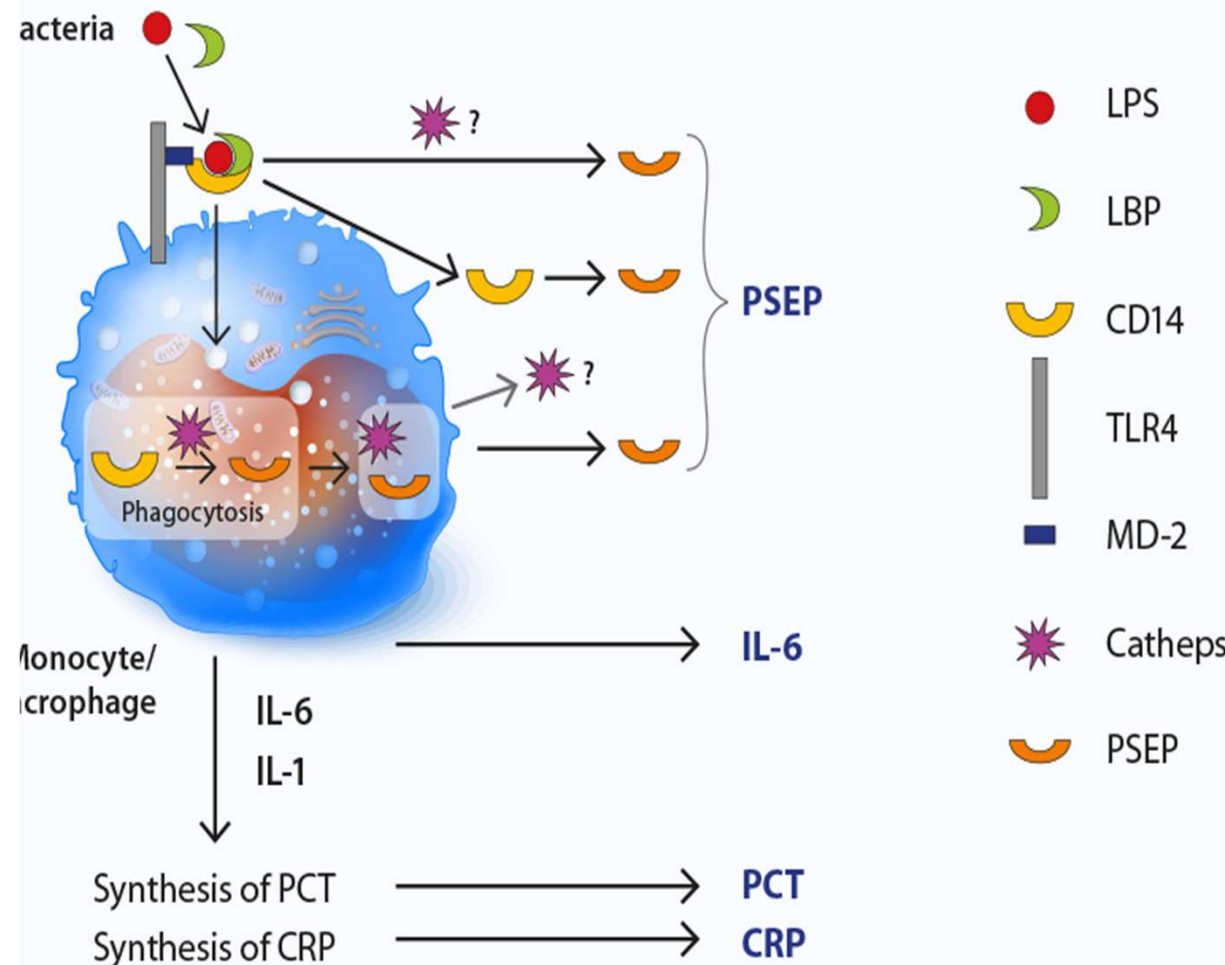
G- > G+ > kvasinky > vláknité houby > viry

Hladina roste s množstvím endotoxinu *ALBIOS study Masson et al, Intensive Care Med 2015*

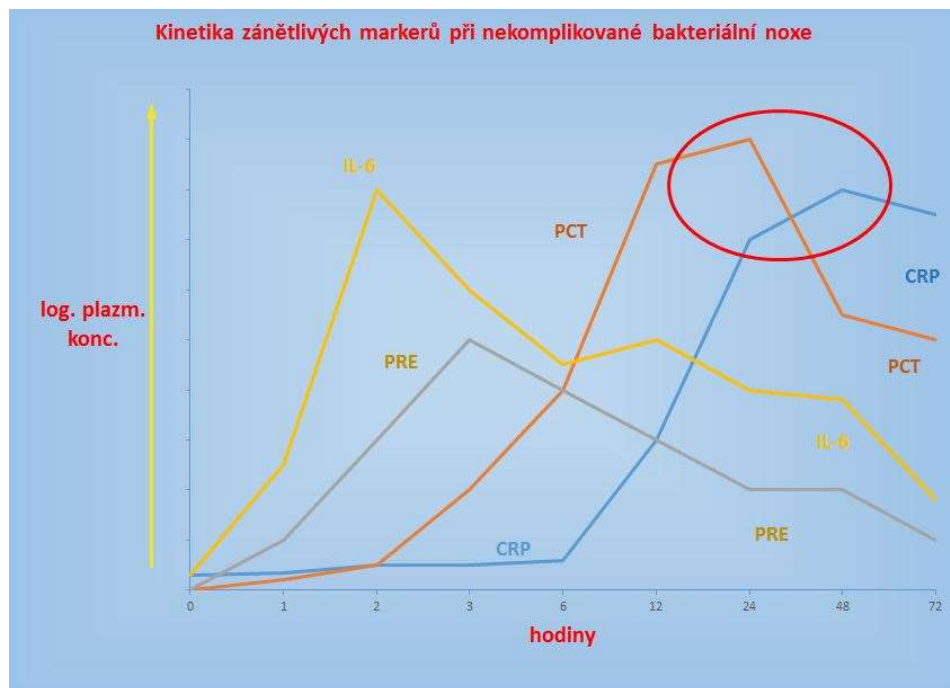
Diagnostický marker závažnosti sepse a predikce mortality *Spanuth, EuroMedLab 2011*

Diagnostika poporodní sepse *Pugni L:Presepsin Reference ranges of a New Sepsis Marker in Term and Preterm Neonates Plos One 2015*

Schematic production of Presepsin



oll-like-receptor; LPS: Lipopolysaccharides; LBP: LPS-binding protein; MD-2: Molecular dynar
Presepsin. *C. Chenevier-Gabeaux et al., 2015*



Kinetika markerů zánětu

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

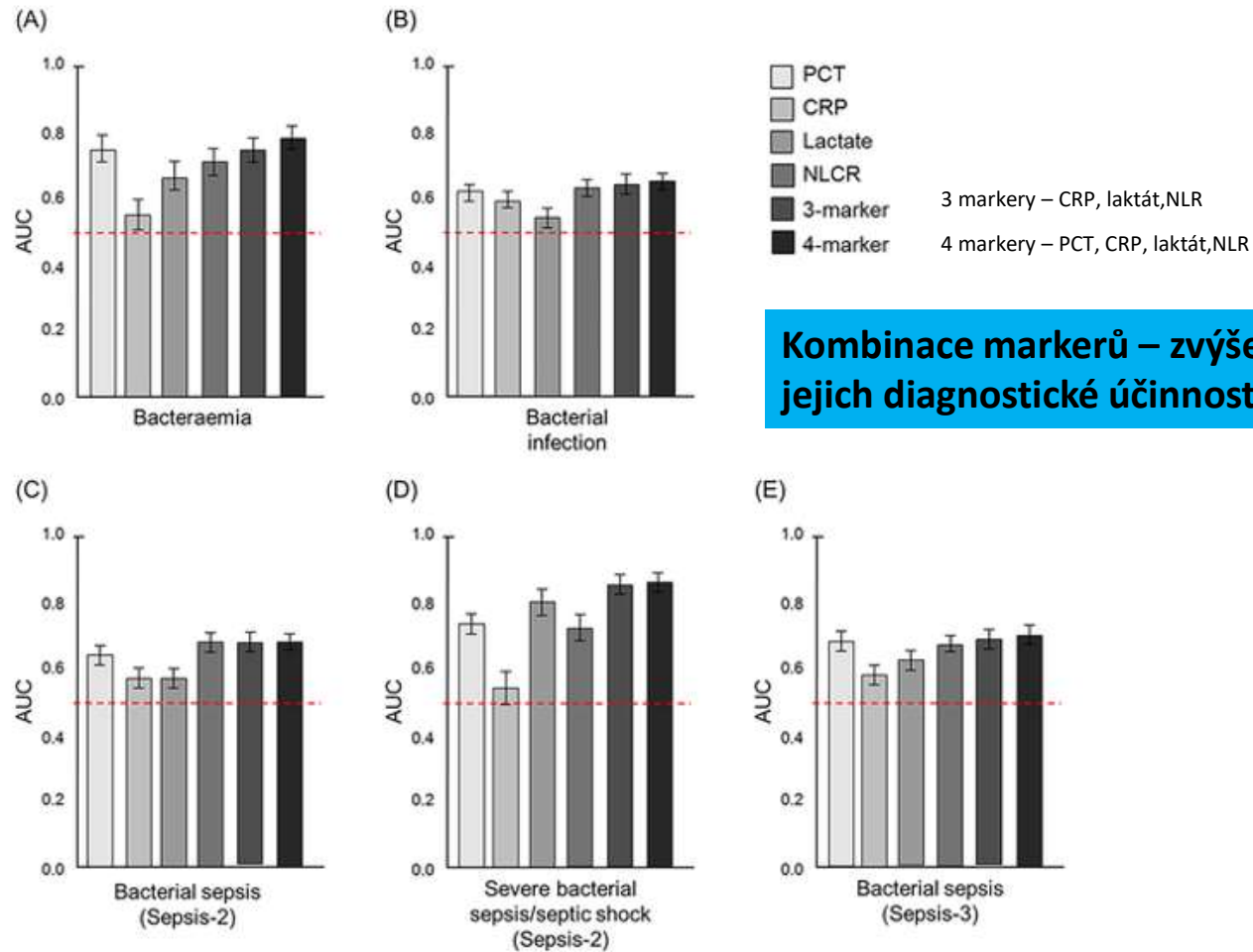
Time to Treatment and Mortality during Mandated Emergency Care for Sepsis

Christopher W. Seymour, M.D., Foster Gesten, M.D., Hallie C. Prescott, M.D.,

Zahájení vhodné ATB terapie během prvních 3 hodin rozvoje sepsis !!!
Každá hodina zdržení nasazení antibiotik zvyšuje mortalitu o 8 %
(Angus et al. N.Engl.J.Med. 2013)

Marker	Vzestup (hodiny)	maximum	biolog.poločas
CRP	4 – 6	36 - 48	19
PCT	2 - 3	8 - 24	22 - 26
Presepsin	do 1	3	4 - 5
IL - 6	0.5 - 1	2 - 5	2 - 6

Fig 4. AUC for the biomarkers evaluated in the present study.



Kombinace markerů – zvýšení jejich diagnostické účinnosti

Ljungström L, Pernestig AK, Jacobsson G, Andersson R, Usener B, et al. (2017) Diagnostic accuracy of procalcitonin, neutrophil-lymphocyte count ratio, C-reactive protein, and lactate in patients with suspected bacterial sepsis. PLOS ONE 12(7): e0181704.

Buněčné diagnostické markery systémového zánětu - KO

Celkový počet leukocytů – nespecifický – leukocytóza ($>12 \times 10^9/l$) i leukopenie ($<4 \times 10^9/l$)

Poměr neutrofilů a lymfocytů (NLR) prognostický marker (Záhorec 2001, Xuan Mediators of inflammation 2016)

% immaturovaných granulocytů - časný indikátor sepse, pozitivně koreluje s mortalitou. Diskriminuje neinfekční SIRS a sepsi v časně fázi 89% senzitivita, 76% specifita (Nierhaus Immunology 2013), prognostický faktor

Povrchové leukocytární markery – Flow Cytometry – CD64 na PMNs, CD11b na neutrofilech, HLA-DR na monocytech, TREM 1, Treg atd. – při interpretaci nutná znalost funkce jednotlivých markerů v imunopatologii sepse

CD64 – vysokoafinitní Fc γ RI

Fyziologické podmínky - nízká míra exprese na PMNs

Po rozpoznání patogenu působením prozánětlivých cytokinů prudký nárůst exprese na monocytech, neutrofilech až 10x

Nárůst exprese – zvýšení efektivity fagocytózy

Nástup 1 hodinu po invazi, intenzita exprese je závislá na výši stimulu cytokinů, hodnoty jsou v krvi stabilní 30 hodin. Po odeznění stimulu během 48 hodin klesá a do 7 dnů se vrací k normě

Vhodný marker pro odlišení sepse/SIRS

Expresce není ovlivněna imunosupresivní léčbou, hematologickou malignitou, neutropenií, HIV infekcí ani nezralostí organismu – novorozenecká sepe

CD64 na neutrofilech

Časná diagnostika sepse - 8 studií (2008-2014) 1986 pts - pro časnou diagnostiku sepse AUC = 0,95

Diskriminuje **těžkou sepsi a septický šok od neinfekčního SIRS** s 89% senzitivitou a 96% specifitou (*Wang Critical Care 2015*)

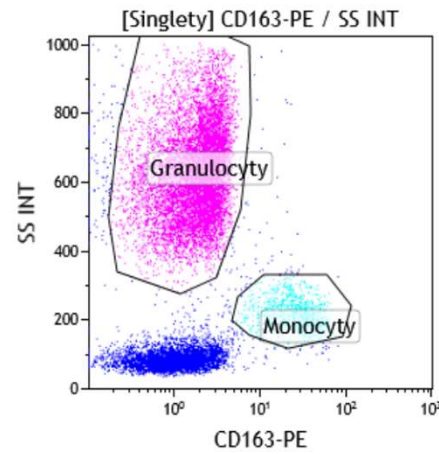
Při **sériovém měření** - pokles od 1. dne při adekvátní ATB terapii. Při nevhodné (rezistentní G- kmeny) perzistuje elevace hladin

Perzistující nízká exprese znaku během prvních 24 hodin hospitalizace – ukončení antimikrobiální léčby (*Hoffmann, Clin.Chem.Lab.Med. 2009*)

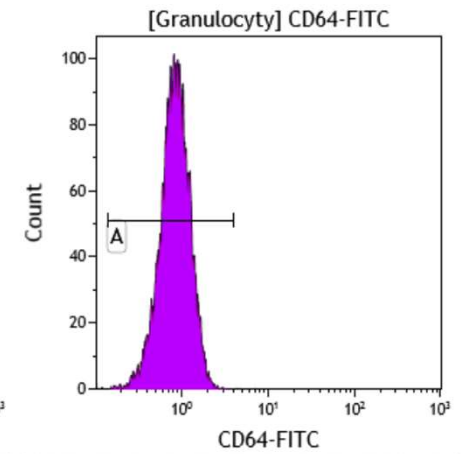
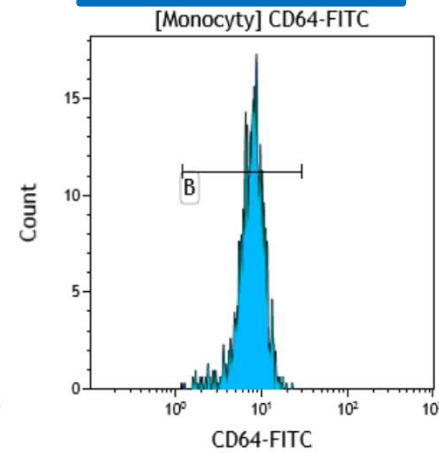
Standardně imunolog. stanovení – průtoková cytometrie

Možnost stanovení bed- side - Accelix CD64 (2016 Izrael)

CD64/monocyty
CD64/neutrofilly



Zdravá kontrola



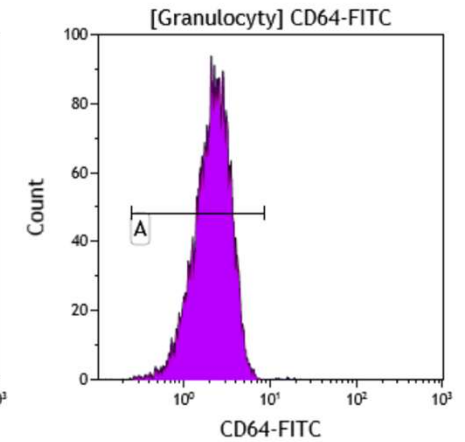
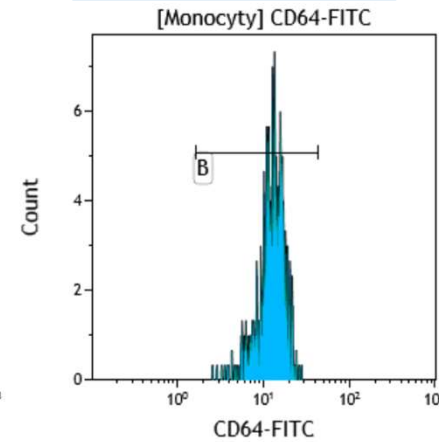
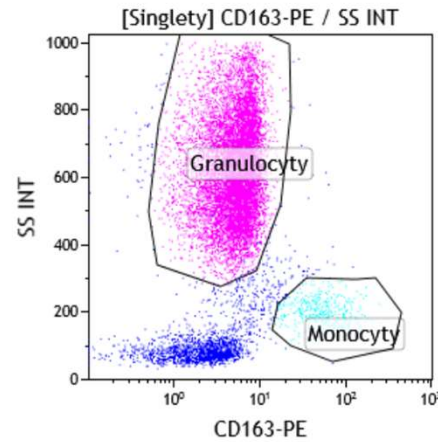
Gate X-A-Mean

All	8,03
B	8,03

Gate X-A-Mean

All	0,89
A	0,89

Septický pacient



Gate X-A-Mean

All	13,12
B	13,12

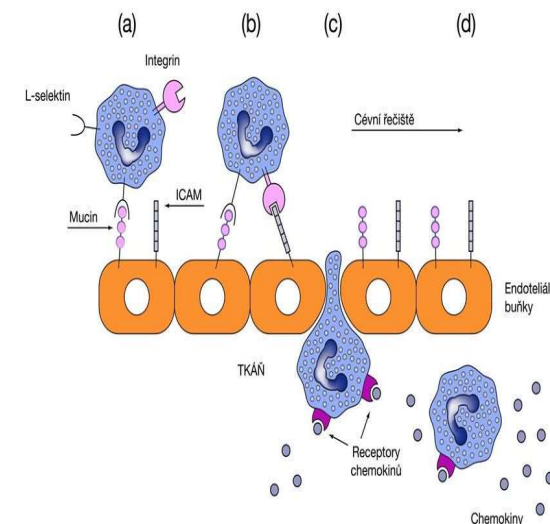
Gate X-A-Mean

All	2,37
A	2,35

CD11 β - α podjednotka β 2 integrinu CD11bCD18 (Mac-1, CR3)

fyziologické podmínky - nízká exprese na
inaktivních cirkulujících leukocytech

marker aktivace leukocytů, mediátor adheze,
diapedézy a kumulace v místě zánětu –
mnohonásobné zvýšení exprese



Marker časně sepsy novorozenců (EONS) – vysoká specifita a PPV (99-100 %), koreluje s tíží stavu, prognostický marker (*Nupponen et al, Pediatrics 2001*)

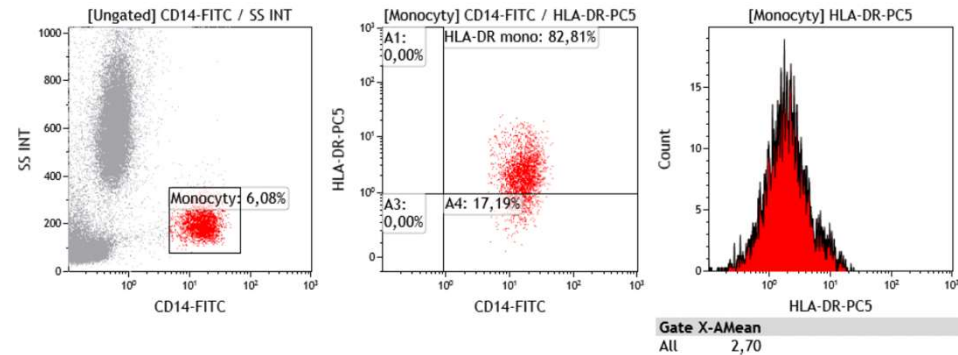
V kombinaci s CRP vysoká senzitivita a NPV (*Adib et al, Iran J.Allergy Asthma Immunol. 2007*)

Exprese HLA-DR na monocytech

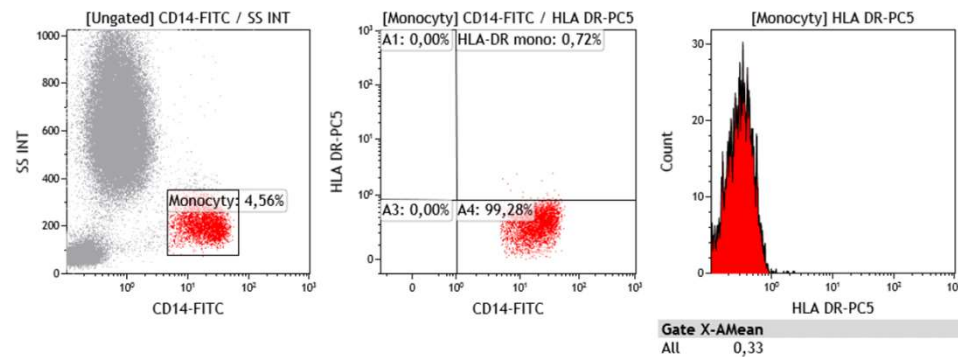
Snížení – marker imunoprese a imunoparalýzy
Pokles HLA molekul II. třídy

- snížená kapacita monocytů při prezentaci antigenů CD4+ buňkám
- snížená schopnost syntézy prozánětlivých mediátorů

Zdravá kontrola



Septický pacient



HLA-DR na monocytech

Prognostický marker tíže klinického stavu a přežití pacienta (*Drewry, Crit.Care 2016*)

Zvýšené riziko vzniku nozokomiální infekce

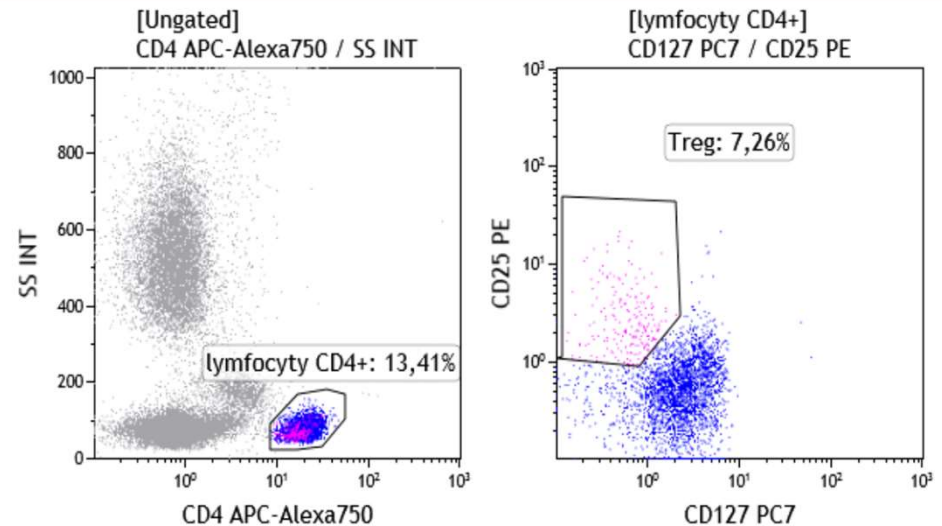
Fatální prognóza – dlouhodobý nebo opětovný pokles HLA-DR na monocytech – **sledování dynamiky exprese markeru**

Treg – regulační T lymfocyty

Populace CD3+ pomocných T ly – povchové znaky CD25+, intracelulární FOXP3+

Regulace imunitní odpovědi – suprese:

- přímá cytotoxicita
- inhibice tvorby prozánětlivých cytokinů
- sekrece antiinflamatorních cytokinů TGF β a IL-10



V sepsi nárůst relativních i absolutních počtů Treg

Přetrvávající vysoké hodnoty – špatná prognóza

Sledování dynamiky – prognóza přežití (Chen, World J Emerg Med. 2015)

Role biomarkerů – co nabízíme?

Identifikace zánětu – co nejčasnější

CD11b, CD64, IL-6, Presepsin, PCT, CRP

Rozlišení SIRS neinfekční x sepse

CD64, PCT, Pres, CRP

Rozlišení etiologie - bakteriální, virová, mykotická, parazitární, G+/G-

PCT, Pres, CD64, CRP

Odhad tíže stavu, vývoj, prognóza, predikce komplikací

PCT, Pres, HLA-DR/monocyty, Treg, CRP

Průvodce ATB terapií

PCT, CD64, CRP

Závěrem

Pro prognózu pacienta v sepsi je zásadní včasná diagnóza. Neexistuje **univerzální marker**, je třeba kombinovat stávající, a tak se zvyšuje diagnostická i prognostická výtěžnost.

Indikovat marker s vědomím jeho patofyziologie, uvědomit si jeho limitace. Posuzovat nejen absolutní hodnotu, ale zejména dynamiku markeru.

Rychlá a přesná mikrobiolog. identifikace + vysoce specifické a senzitivní lab. markery + nezbytné zhodnocení v klinickém kontextu (klin.mikrobiolog, biochemik, imunolog, ošetřující lékař).

Diagnostika sepse je multioborová záležitost s nutností spolupráce.