

CE-IVD LightCycler System

Real-time PCR - as flexible as you

are

power on



SeptiFast –
új lehetőség a sepsis diagnosztikában

Perkátai Katalin
Roche Molekuláris Diagnosztika és
alkalmazott kutatás

Sepszis diagnosztika



- Klinikai definíció:
 - testhőmérséklet $<36^{\circ}\text{C}$ vagy $>38^{\circ}\text{C}$
 - szívfrekvencia $>90/\text{perc}$
 - légzési frekvencia $>20/\text{perc}$, $\text{PaCO}_2 <32 \text{ Hgmm}$
 - fehérvérsejt szám $>12.000/\mu\text{l}$ vagy $<4.000/\mu\text{l}$, vagy több mint 10% éretlen alak
- Klinikai kémia: CRP, PCT, $\text{TNF-}\alpha$, IL-6
- Mikrobiológia:
 - haemokultura (szenzitivitás, specificitás, idő)
 - PCR (SeptiFast)

Nukleinsav célpontok baktériumok identifikálásához

- Virulencia gének
- toxin gének
- specifikus genom fragmentek
- 16S vagy 23S rDNS
- hsp65 gén
- gyrB gén
- 16S-23S rDNA spacer

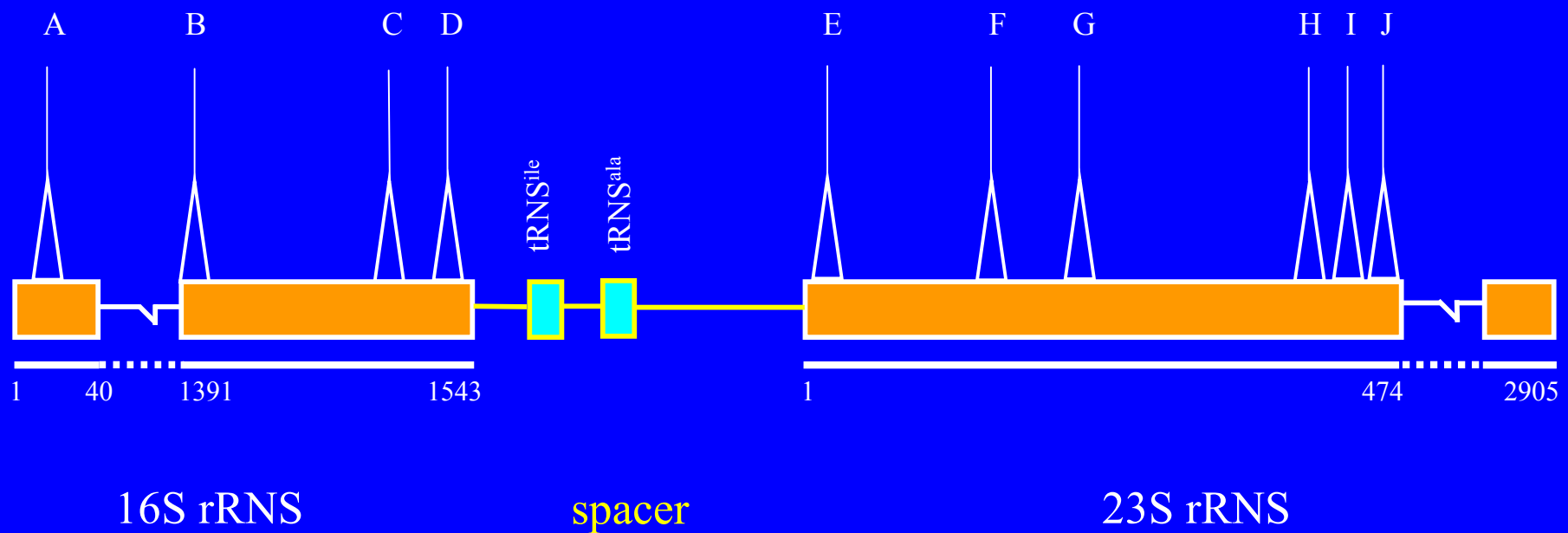
Ribosomális RNS operon

- Általános
- A transzkriptumok a riboszóma funkciójához nélkülözhetetlenek
- Többszörös kópiaszámban fordul elő
- struktúra : 16S-spacer-23S-spacer-5S
- tRNS gének a spaceren helyezkednek el

16S-23S rDNS spacer tulajdonságai

- Általános
- A transzkriptumok a riboszóma funkciójához nélkülözhetetlenek
- Többszörös kópiaszámban fordul elő
- struktúra : 16S-spacer-23S-spacer-5S
- tRNS gének a spaceren helyezkednek el
- Csoport és/vagy species specifikus különbségeket hordoz

Konzervált területek az rRNS operonon belül

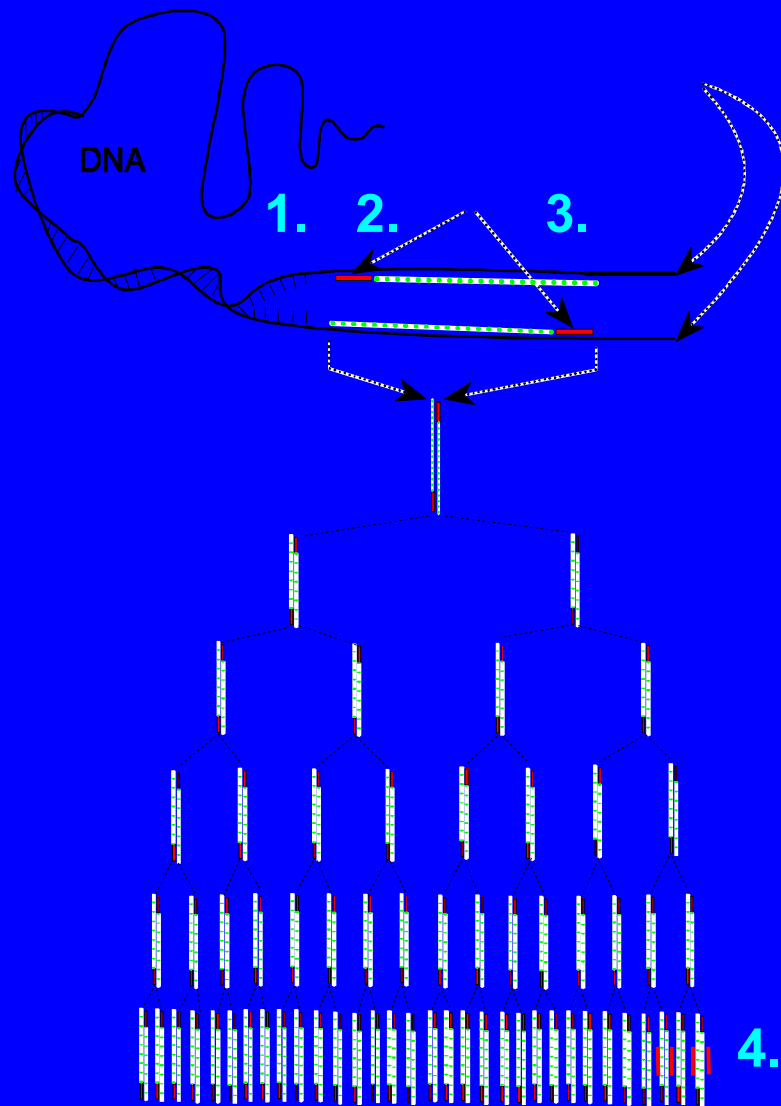


Gürtler et al., 1996

rDNS spacer nukleinsav szekvencia illesztés

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	
LMOB.SEQ	TAAGGAAAAGGAAACCTGTGAGTTTTCTTCTTCTCTATTGTTTCAGTTTTGAGAGGTTACTCTCTTTATGTCAGATAAAGTATGCAAGGCACTA--TGCT-TGAAGCATCGCGCCACTACATTTTGCAGGGCTATAGCTCAGCTGG														
LMOC.SEQ															
LMOF.SEQ															
LINB.SEQ	C.....G.....C.....AC.....G.....A.....														
LIVB.SEQ	C.....G.....AG.....C.....C.....G.GT--C-.TGG...AA.A.....A.....														
LSEB.SEQ	G.....G.....GT--C-.TGG...AA.A.....A.....														
LSEC.SEQ	T.....G.....G.....C.....GT--C-.TGG...AA.A.....A.....														
LWEB.SEQ	T.....G.....C.....TAC--C-.G.....A.T.....A.....														
LGRB.SEQ	T.....T.C.-T.....A.....C.C..TA..G.-A.....T..TAT.T.-T..-G.GCAGC.A.TC.G.AAA.T														
LGRC.SEQ	T.....T.C.-T.....A.....C.C..TA..G.-A.....T..TAT.T.-T..-G.GCAGC.A.TC.G.AAA.T														
LMUB.SEQ	T.....T.C.-T.....A.....C.C..TA..G.-A.....T..TAT.T.-T..-G.GCAGC.A.TC.G.AAA.T														
	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290
LMOB.SEQ	TTAGAGCGCACGCCTGATAAGCGTGAGGTCGATGGTTTCGAGTCCATTAGGCCCACTTTTCTTTCTGACATAAGAANAATACAAATAATCATA-CCCTTTTACGGGG-CCTTAGCTCAGCTGGCAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGA														
LMOC.SEQ	GC.....T.....T.....														
LMOF.SEQ	CG.AG..A...TTC...TTA..TT.C...TA														
LINB.SEQ	G.....C.....TG.ATA.-.TA...A														
LIVB.SEQ	G.....C.....TTG..C.-T...A...A														
LSEB.SEQ	G.....C.....TTG..C.-T...A...A														
LSEC.SEQ	C..AG..A...AT..T..TT...C..A														
LWEB.SEQ	A.....TC.TT..TATC...T														
LGRB.SEQ	A.....TC.TT..TATC...T														
LGRC.SEQ	A.....TC.TT..TATC...T														
LMUB.SEQ	A.....TC.TT..TATC...T														
	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	
LMOB.SEQ	GGTCAGCGGTTTCGATCCCGCTAGGCTCCACCAAAATTGTTCTTTGAACCTAGATAAGAAAGTTAGTAAGTTAGCATA--GATAATTTAT-TATTTATGACACAAGTAACCGAGAATCATCTGAAAGTGAATCTTTTCATCTGATTGGA														
LMOC.SEQ															
LMOF.SEQ	G.....														
LINB.SEQ															
LIVB.SEQ	--A...GG..A..C.....														
LSEB.SEQ	--AG...G..A..AC.....														
LSEC.SEQ	--AG...G..A..AC.....														
LWEB.SEQ	--G..A.....														
LGRB.SEQ	T..C..AGT...A..C..G..A.....A..A.....CG...-														
LGRC.SEQ	T..C..AGT...A..C..G..A.....A..A.....CG...-														
LMUB.SEQ	T..C..AGT...A..C..G..A.....A..A.....CG...-														
	440	450	460	470	480	490									
LMOB.SEQ	AGTA-TCATCGCTGATACGGAAATCAGAAAAACAACCTTTACTTCGTAGTAAGTAAATT														
LMOC.SEQ	T.....														
LMOF.SEQ															
LINB.SEQ	C.....														
LIVB.SEQ	A.....A.C.....														
LSEB.SEQ	C...-.....A.C...T.....AC.....														
LSEC.SEQ	C...-.....A.C...T.....AC.....														
LWEB.SEQ	CA.CG..T.....T.....														
LGRB.SEQ	...GG.....C..C.G..GA..C...AG.....GCAA.C.-C.....														
LGRC.SEQ	...GG.....C..C.G..GA..C...AG.....GCAA.C.-C.....														
LMUB.SEQ	...GG.....C..C.G..GA..C...AG.....GCAA.C.-C.....														

Jellemző Nukleinsav szakasz felsokszorozása, PCR



1. A nukleinsav izolátum kettős szálú DNS termékének denaturálása hővel

2. Annealing, rövid, mesterséges nukleinsav darabok (**Primerek**) bekötődése a megfelelő, specifikus DNS szakaszra

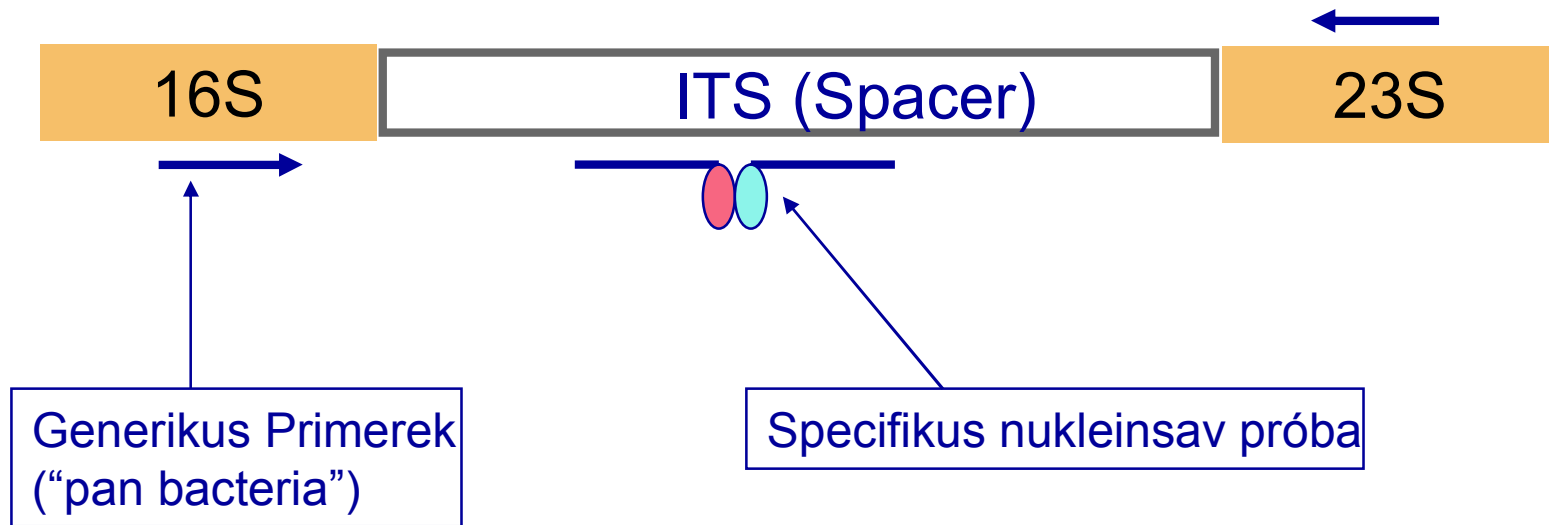
3. Láncosszabítás(**de novo synthesis**) a Taq-Polymerase enzim meghosszabítja a bekötődött primereket

4. Detektálás specifikus, mesterséges nukleinsav darabokkal a PCR-t követően (AMPLICOR, COBAS AMPLICOR) vagy a PCR alatt ciklusról ciklusra (LighCycler, COBAS TAQMAN48)

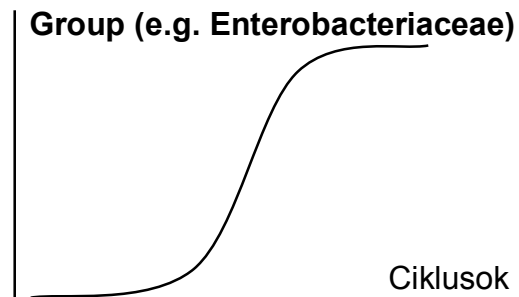
Spacer Technológia



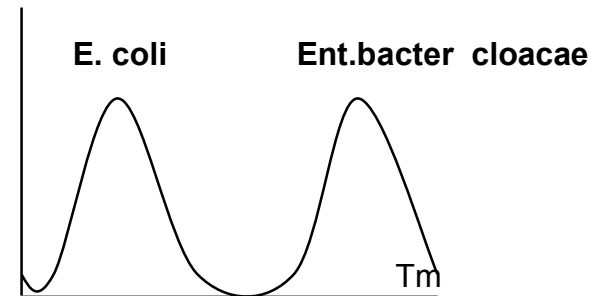
Diagnostics



Amplifikációs görbe

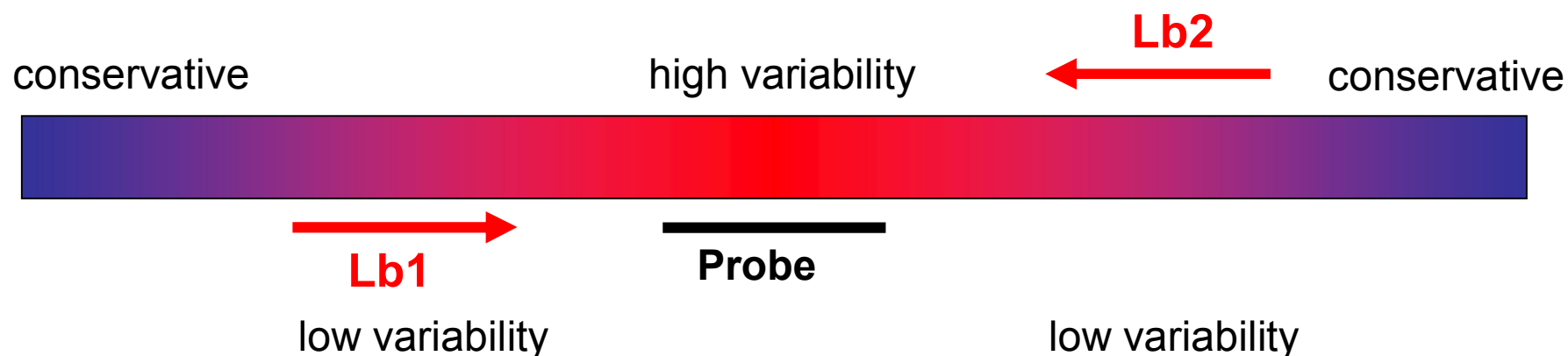


Olvadásponnt analízis



PCR technikával felsokszorozott jellemző nukleinsav szakasz

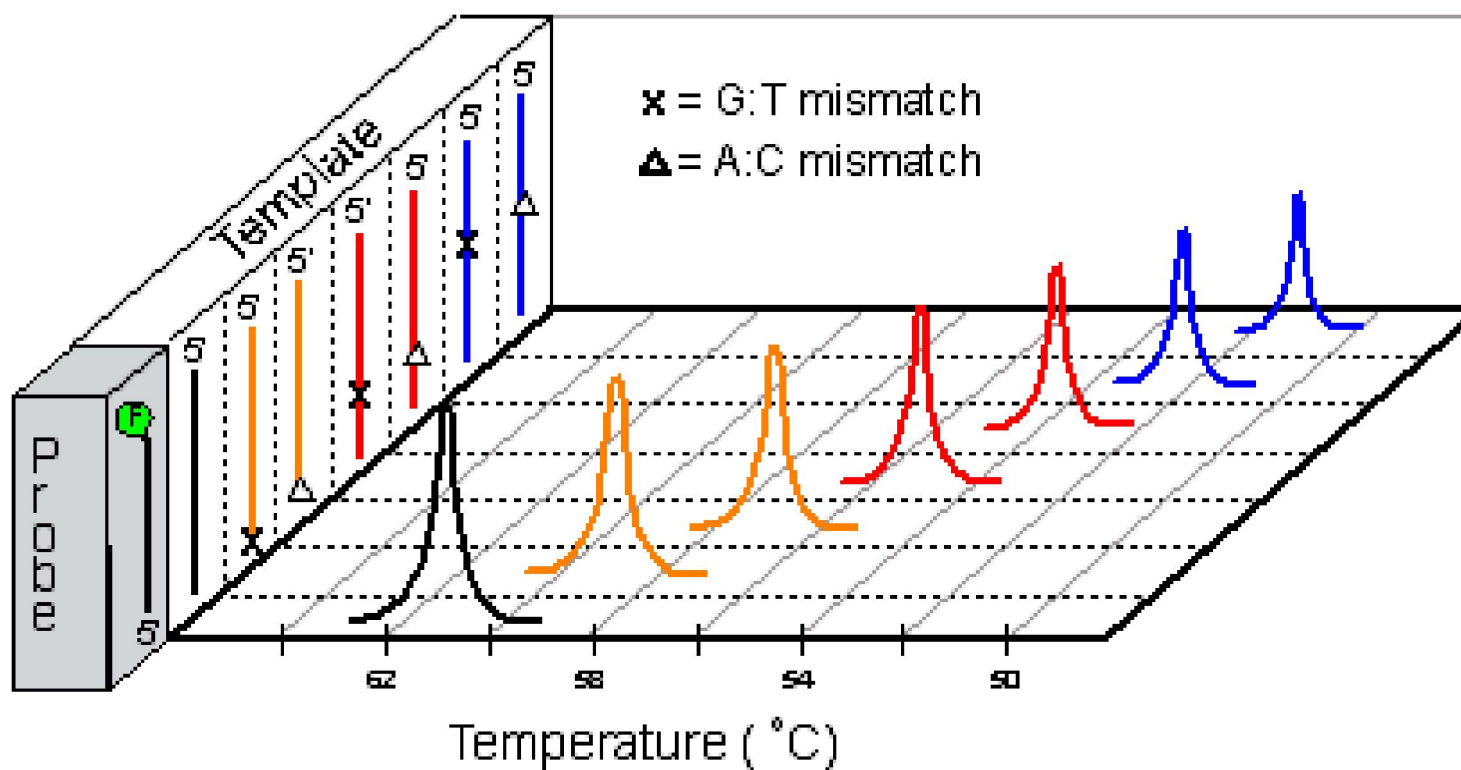
A specifikus nukleinsav próba lehetőséget ad a PCR végén a keletkező jellemző termék rögzítésére és elválasztására, másrészt valós idejű technika alkalmazása esetén a PCR során keletkező termékek mennyiségének és minőségének folyamatos követésére.



Nukleinsav próba bekötése



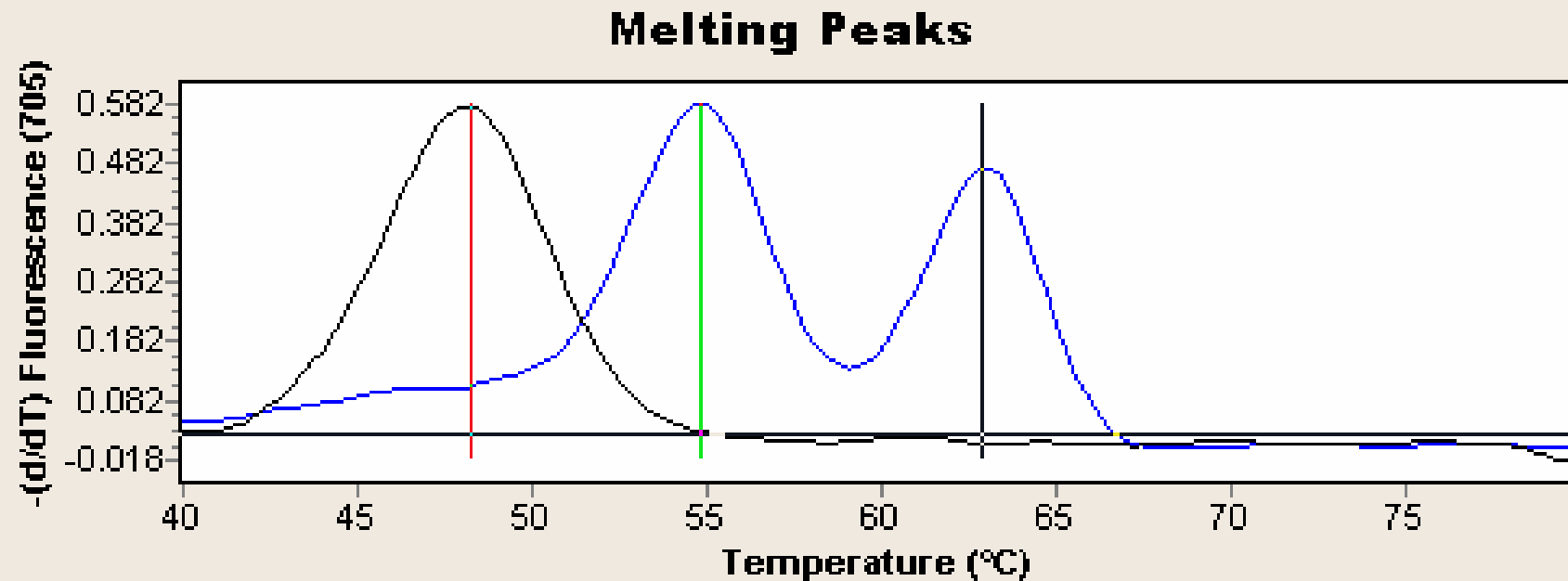
Diagnostics



Olvadáspont analízis



Diagnostics



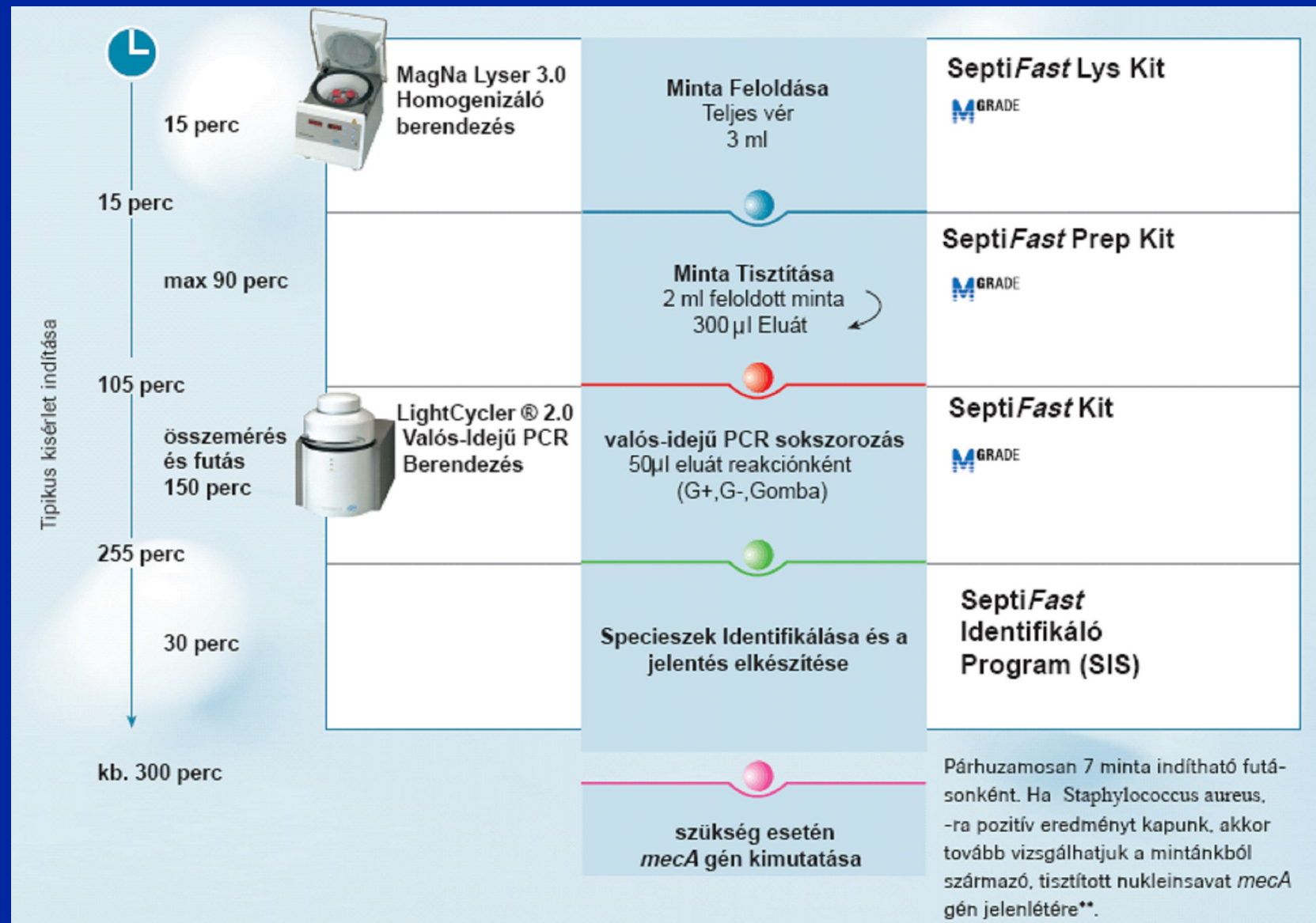
☒	Tm 1	48.25	☒	Tm 3	62.89	☐	Tm 5
☒	Tm 2	54.83	☐	Tm 4		☐	Tm 6
☒	Baseline	0.027					



Munkafolyamat



Diagnostics



Fertőzés kimutatása 6 órán belül



Minta

Teljes Vér (EDTA)

Minta Előkészítés

Lízis, Nukleinsav kivonás

PCR Analízis

Gram (-)

- *Escherichia coli*
- *Klebsiella (pneumoniae, oxyt.)*
- *Serratia marcescens*
- *Enterobacter (cloacae, aerog.)*
- *Proteus mirabilis*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Acinetobacter baumannii*
- *Stenotrophomonas maltophilia*

Gram (+)

- *Staphylococcus aureus*
- CoNS
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus spp.*
- *Enterococcus faecium*
- *Enterococcus faecalis*

Fungi

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

MRSA (mecA)

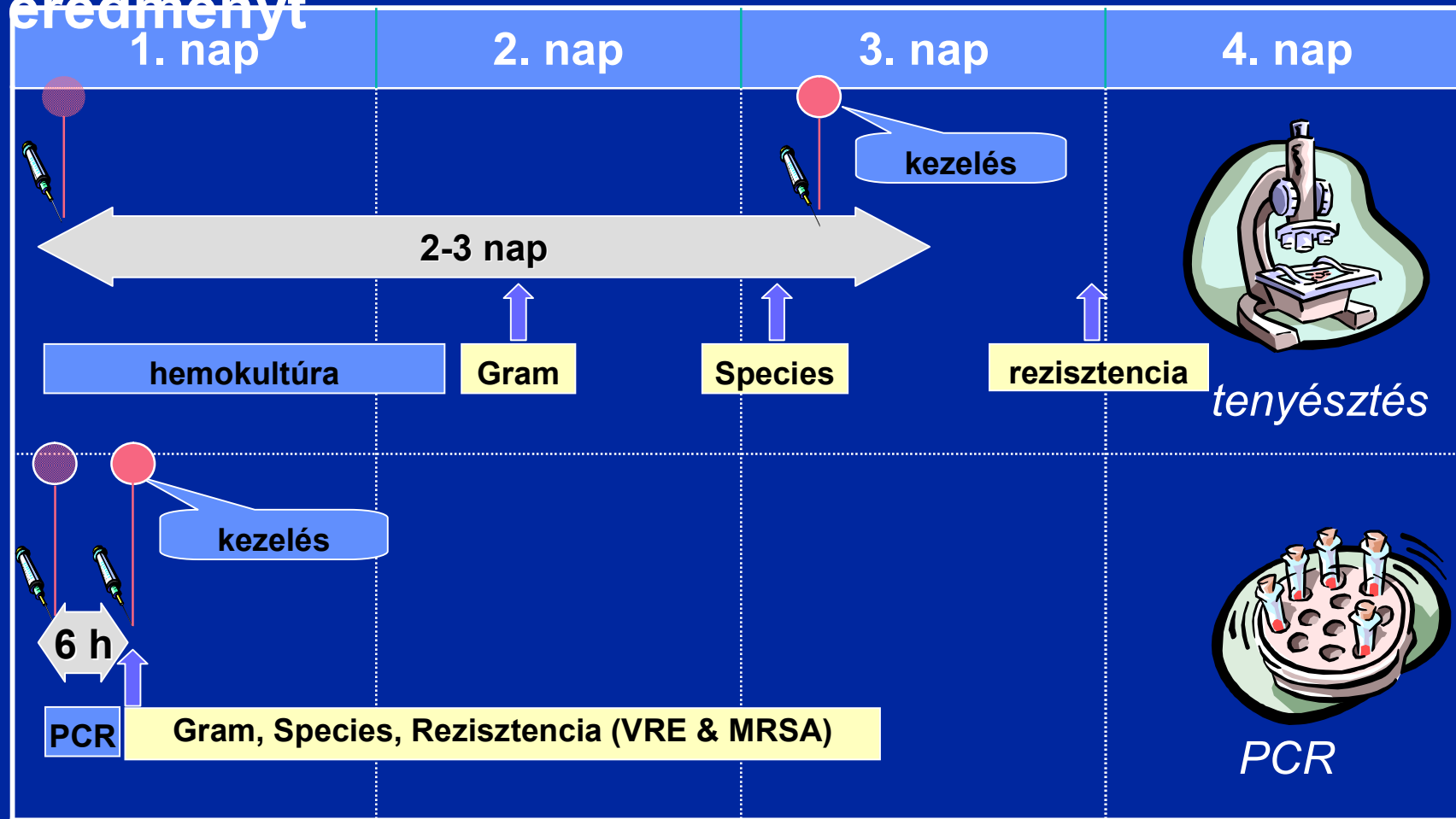
VRE (van A, B)

Hagyományos és Molekuláris Diagnosztika összehasonlítása

A PCR korábban ad használható eredményt



Diagnostics



A PCR felgyorsítja a mikrobiológiát



Példa: Szepszis az intenzív terápiás osztályon

Várható előny:

- hatékonyabb antibiotikum terápia
- Enyhébb lefolyású szepszis
- Nozokomiális patogének rezisztenciája csökkenhet

A beteg

szempontjából:

- A komplikációk kialakulásának kisebb veszélye

Gazdasági előnyök:

- Rövidebb tartózkodási idő *
- Jobb versenyképesség (lower DRG case cost; improved infection statistics)
- Az ágyak jobb kihasználtsága

* 26% had incorrect initial “empiric” antibiotic therapy, with 3,1 additional ICU days on average:

Source: M.H.Kollef et al, Inadequate Antimicrobial Treatment of Infections, CHEST 1999, 115:462-474