

Επιβλέπουσα καθηγήτρια : Βιολέττα Καψιμάλη –Βαϊσπούλου

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- |   |   |
|---|---|
| <b>Βιολέττα Καψιμάλη –<br/>Βαϊσπούλου</b> | Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής<br>Μικροβιολογίας - Ανοσολογίας Λοιμώξεων,<br>Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών |
| <b>Βρυώνη Γεωργία</b>                     | Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας,<br>Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών                                     |
| <b>Κουτσιλιέρης Μιχάλης</b>               | Καθηγητής Πειραματικής Φυσιολογίας,<br>Ιατρική Σχολή, Εθνικό & Καποδιστριακό<br>Πανεπιστήμιο Αθηνών               |

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	σελ. 2-3
ΟΙ ΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΣΗΨΗΣ .....	σελ. 4-8
ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ – ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ .....	σελ. 9-12
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ - ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ .....	σελ. 13-26
ΔΙΑΓΝΩΣΗ .....	σελ. 27-53
Η ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΑΙΜΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ .....	σελ. 28
ΟΙ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	σελ. 32
I. ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΑΠΟ ΑΙΜΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ .....	σελ. 37
II. ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΑΠΕΥΘΕΙΑΣ ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ, ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΟΡΟΥ .....	σελ. 42
ΕΜΠΟΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΣΤΗ ΣΗΨΗ.....	σελ. 47
ΘΕΡΑΠΕΙΑ .....	σελ. 54-60
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	σελ. 61-71

## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Η σήψη αποτελεί ένα εξαιρετικά ετερογενές σύνδρομο που προκαλείται από τη μη ισορροπημένη απόκριση του ξενιστή σε μια λοίμωξη. Ο όρος «σήψη» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά πιθανότατα στα έπη του Ομήρου, τα οποία χρονολογούνται πριν από περισσότερα από 2.700 χρόνια (van der Poll, 2017). Έκτοτε η σήψη έχει περιγραφεί με πολλούς διαφορετικούς τρόπους: το 1000 π.Χ., ο Ισλαμιστής Ibn Sīnā την περιέγραψε ως αποσύνθεση του αίματος και των ιστών συνοδευόμενη από πυρετό (Hotchkiss, 2016), ενώ στη συνέχεια περιγράφηκε περαιτέρω από τους Boerhaave, von Liebig, Semmelweis, Pasteur, Lister, Lennhartz, και πιο πρόσφατα, από τον Bone. Η σήψη ορίστηκε κλινικά στις αρχές της δεκαετίας του 1990, όταν μια ομάδα ειδικών διατύπωσε τον πρώτο συναινετικό ορισμό της σήψης. Έτσι, το 1991 η σήψη ορίστηκε ως «οργανική δυσλειτουργία, απειλητική για τη ζωή του ασθενούς, η οποία προκαλείται από την απορρυθμισμένη απόκριση του ξενιστή στη λοίμωξη» (Singer, 2016) και η οποία αποτελεί σημαντική πηγή ανησυχίας για τη δημόσια υγεία, καθώς είναι η κύρια αιτία θανάτου από λοιμώξεις, ειδικά όταν αυτές δεν διαγνωστούν και δεν αντιμετωπιστούν έγκαιρα (Singer, 2016).

Το σύνδρομο της σήψης διαμορφώνεται από παράγοντες των παθογόνων μικροοργανισμών και του ξενιστή, όπως είναι το φύλο, η φυλή και άλλοι γενετικοί παράγοντες, η ηλικία, οι συννοσηρότητες του ξενιστή, το περιβάλλον, και έχει χαρακτηριστικά που εξελίσσονται με την πάροδο του χρόνου. Το χαρακτηριστικό εκείνο το οποίο διαφοροποιεί τη σήψη από τη λοίμωξη είναι η παρεκκλίνουσα ή διαταραγμένη απόκριση του ξενιστή και η παρουσία οργανικής δυσλειτουργίας. Αυτή η οργανική δυσλειτουργία δεν είναι πάντα φανερή και για το λόγο αυτό, η πιθανότητα ύπαρξής της θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη σε κάθε ασθενή που εμφανίζει μία λοίμωξη. Ο κλινικός και βιολογικός φαινότυπος της σήψης τροποποιείται από την αρχική ασθένεια, τις μακροχρόνιες συννοσηρότητες και τη φαρμακευτική αγωγή (Singer, 2016).

Στην κλινική πράξη, η οργανική δυσλειτουργία αναπαρίσταται με αύξηση 2 ή περισσότερων βαθμών του σκορ της κλίμακας SOFA (Sequential [Sepsis-related] Organ Failure Assessment), ενώ σχετίζεται με ενδονοσοκομειακή θνησιμότητα μεγαλύτερη του 10%. Η σηπτική καταπληξία ορίζεται ως ένα υποσύνολο της σήψης, το οποίο περιλαμβάνει ανωμαλίες σε κυκλοφορικό, κυτταρικό και μεταβολικό επίπεδο, οι οποίες σχετίζονται με μεγαλύτερο κίνδυνο θνησιμότητας συγκριτικά με την σήψη. Οι ασθενείς με σηπτική καταπληξία μπορούν να ταυτοποιηθούν κλινικά από την ύπαρξη της ανάγκης χορήγησης αντιπηκτικής αγωγής, έτσι ώστε η μέση αρτηριακή πίεση να διατηρηθεί σε επίπεδα 65 mmHg ή υψηλότερα, και επίπεδα γαλακτικού οξέος στον ορό υψηλότερα από 2 mmol/L (> 18 mg/dL) απουσία υποογκαιμίας. Ο συνδυασμός αυτός συνδέεται με ποσοστά ενδονοσοκομειακής θνησιμότητας υψηλότερα του 40% (Singer, 2016). Τα σημαντικότερα προαπαιτούμενα στοιχεία για την ευνοϊκή έκβαση των σηπτικών ασθενών είναι η κατάλληλη και έγκαιρη αντιβιοτική θεραπεία για την αποτελεσματική αντιμετώπιση της πρωτοπαθούς λοίμωξης και η έγκαιρη και στοχευμένη αναζωογόνηση (Zaccone, 2017). Η αναγνώριση του λοιμογόνου παράγοντα είναι ιδιαιτέρως σημαντική για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας και τη λήψη μέτρων πρόληψης της διασποράς του. Κατά την επιλογή της αντιμικροβιακής θεραπείας, οι κλινικοί ιατροί θα πρέπει να λαμβάνουν δείγματα καλλιέργειας (όπως αίμα, ούρα) πριν από την έναρξη της θεραπείας, λαμβάνοντας υπόψη τους το κλινικό περιβάλλον, το μικροβιολογικό ιστορικό του ασθενούς, την προηγούμενη έκθεση του σε αντιβιοτικά, την πιθανή πρόσφατη νοσηλεία του και την πιθανή ανθεκτικότητα των παθογόνων στα αντιβιοτικά. Η πρόωμη χορήγηση αντιβιοτικών έχει συνδεθεί με μειωμένη θνησιμότητα, ωστόσο δεν αντιπροσωπεύει τη συνήθη κλινική πρακτική. Επιπλέον, η αποτυχία της αρχικής θεραπείας σχετίζεται με αυξημένη θνησιμότητα (Zaccone, 2017).

## **ΟΙ ΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΣΗΨΗΣ**

Οι αρχικοί ορισμοί της σήψης εστίαζαν στην τότε επικρατούσα άποψη ότι η σήψη προκύπτει από το σύνδρομο της συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) του ξενιστή σε μία πρωτογενή λοίμωξη (Singer, 2016). Η σήψη, η οποία οδηγεί σε πολυοργανική δυσλειτουργία ονομάστηκε σοβαρή σήψη, η οποία με τη σειρά της μπορεί να οδηγήσει στην σηπτική καταπληξία, η οποία ορίζεται ως «εμμένουσα υπόταση επαγόμενη από τη σήψη παρά την έγκαιρη και στοχευμένη αιμοδυναμική αναζωογόνηση».

### **Η συνάντηση ομοφωνίας του 1991**

Μια συνάντηση ομοφωνίας το 1991 μεταξύ ειδικών του Αμερικανικού Κολλεγίου Ιατρών Θώρακος (American College of Chest Physicians, ACCP) και της Αμερικανικής Εταιρείας Εντατικής Θεραπείας (Society of Critical Care Medicine, SCCM) διατύπωσε τους ορισμούς της συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης, της σήψης, της σοβαρής σήψης, της σηπτικής καταπληξίας και της πολυοργανικής δυσλειτουργίας (Ποντίκης, 2015).

### **Οι ορισμοί της συνάντησης ομοφωνίας του 1991 (Ποντίκης, 2015)**

**Σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS):** Η κλινική απόκριση σε μία ποικιλία βλαπτικών καταστάσεων, η οποία περιλαμβάνει (χωρίς να περιορίζεται σε αυτά) τουλάχιστον δύο από τα εξής:

- θερμοκρασία σώματος  $> 38 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ή  $< 36 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,
- καρδιακή συχνότητα  $> 90$  παλμών/min,
- ταχύπνοια, εκδηλούμενη με αύξηση της αναπνευστικής συχνότητας  $> 20$  αναπνοών/min ή υπεραερισμός, οριζόμενος ως πτώση της  $\text{PaCO}_2$  του αρτηριακού αίματος  $< 32$  mmHg,
- ποσοτική ή ποιοτική διαταραχή των λευκών αιμοσφαιρίων υπό τη μορφή της λευκοκυττάρωσης ( $> 12.000/\text{mm}^3$ ), λευκοπενίας ( $< 4.000/\text{mm}^3$ ) ή αριστερής στροφής (άωρες μορφές  $> 10\%$ )

**Σήψη (Sepsis):** Η κλινική εκείνη κατάσταση κατά την οποία εκλύεται το σύνδρομο της συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης, ως απόκριση σε επιβεβαιωμένη λοιμώδη διαδικασία.

**Λοίμωξη (Infection):** Κλινικό σύνδρομο σχετιζόμενο με μικροβιακό παράγοντα και χαρακτηριζόμενο από την έκλυση φλεγμονώδους απάντησης, ως απόκριση στην παρουσία μικροοργανισμών ή τη διήθηση φυσιολογικά στείρων ιστών ή κοιλοτήτων.

**Βακτηραιμία (Bacteremia):** Η παρουσία βιώσιμων βακτηρίων σε καλλιέργεια αίματος.

**Σοβαρή σήψη (Severe sepsis):** Το κλινικό σύνδρομο κατά το οποίο η σηπτική διεργασία σχετίζεται με ανάπτυξη οργανικής δυσλειτουργίας (organ dysfunction) ή/και ιστικής υποάρδευσης (hypoperfusion) ή/και υπότασης σηπτικής αιτιολογίας (sepsis-induced hypotension). Οι διαταραχές της ιστικής άρδευσης περιλαμβάνουν γαλακτική οξέωση, ολιγουρία και οξείες μεταβολές του επιπέδου συνείδησης (χωρίς άλλη προφανή εξήγηση).

**Υπόταση σηπτικής αιτιολογίας (Sepsis-induced hypotension):** Πτώση της συστολικής αρτηριακής πίεσης κάτω των 90 mmHg, ή μείωση ίση ή μεγαλύτερη των 40 mm Hg από τη βασική τιμή (baseline), απουσία άλλης προφανούς αιτίας (π.χ. καρδιογενούς καταπληξίας).

**Σηπτική καταπληξία (Septic shock):** Κλινική υποομάδα της σοβαρής σήψης, κατά την οποία η υπόταση σηπτικής αιτιολογίας ανθίσταται στην επαρκή αναζωογόνηση με υγρά, συνδυαζόμενη ταυτόχρονα με διαταραχές της ιστικής άρδευσης ή/και οργανικές δυσλειτουργίες.

**Σύνδρομο πολυοργανικής δυσλειτουργίας (Multi-Organ Dysfunction Syndrome, MODS):** Η ανάδειξη της διαταραχής της οργανικής λειτουργίας στον βαρέως πάσχοντα ασθενή αποτελεί ένα σύνδρομο για το οποίο η προτεινόμενη ορολογία είναι «σύνδρομο πολυοργανικής δυσλειτουργίας». Ο όρος «δυσλειτουργία» αφορά εκείνο το φαινόμενο κατά το οποίο η υφιστάμενη (ή υπολειπόμενη) οργανική λειτουργία αδυνατεί να εξυπηρετήσει την ομοιόσταση.

## **Η συνάντηση ομοφωνίας του 2016**

Η σημαντική πρόοδος, η οποία είχε σημειωθεί τα τελευταία χρόνια στην κατανόηση της παθοβιολογίας της σήψης (τις μεταβολές στην λειτουργία των οργάνων, την μορφολογία, την κυτταρική βιολογία, την βιοχημεία, την ανοσολογία και την κυκλοφορία), στην διαχείριση και την επιδημιολογία της, δημιούργησε την ανάγκη επανεξέτασης των ορισμών της σήψης και της σηπτικής καταπληξίας (Singer, 2016). Αντιλαμβανόμενες την ύπαρξη της ανάγκης αυτής, η Ευρωπαϊκή Εταιρεία Εντατικής Ιατρικής και η Εταιρεία Εντατικής Θεραπείας δημιούργησαν τον Ιανουάριο του 2014 μια ομάδα εργασίας, η οποία περιελάμβανε ειδικούς αυξημένης φροντίδας και λοιμωδών νόσων, χειρουργούς και πνευμονολόγους. Κάθε μία από τις δύο εταιρίες όρισε έναν πρόεδρο, (Drs Deutschman και Singer), οι οποίοι με τη σειρά τους επέλεξαν τα μέλη της ομάδας βάση της επιστημονικής τους εξειδίκευσης στους τομείς της επιδημιολογίας της σήψης, των κλινικών δοκιμών και της βασικής ή μεταφραστικής έρευνας. Η ομάδα αυτή έκανε επαναλαμβανόμενες συναντήσεις και συζητήσεις από τον Ιανουάριο του 2014 μέχρι και τον Ιανουάριο του 2015. Οι έως τότε υπάρχοντες ορισμοί για την σήψη και την σηπτική καταπληξία επανεξετάστηκαν και επικαιροποιήθηκαν με τη βοήθεια μεγάλων ηλεκτρονικών βάσεων δεδομένων και ομάδων ασθενών (Singer, 2016).

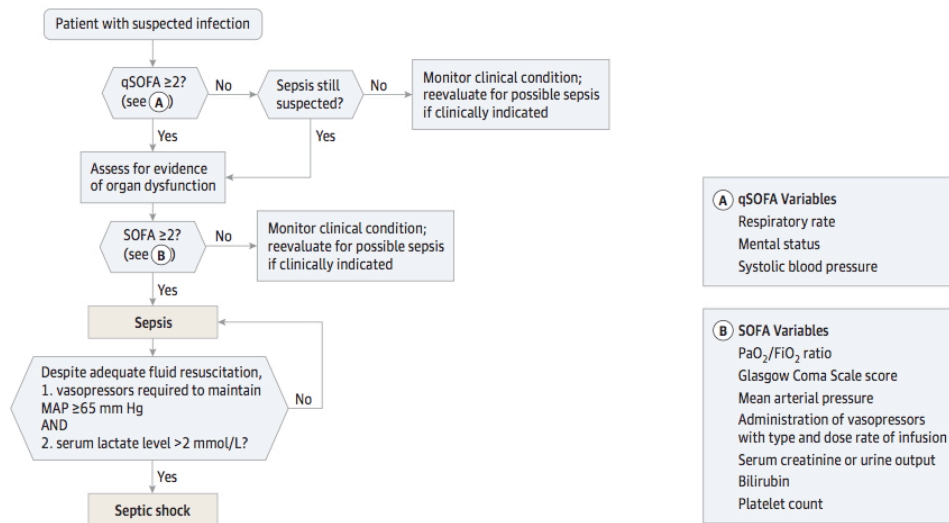
## **Οι ορισμοί της συνάντησης ομοφωνίας του 2016 (Singer, 2016)**

- Η σήψη ορίζεται ως μια οργανική δυσλειτουργία απειλητική για τη ζωή του ασθενούς, η οποία προκαλείται από την απορρυθμισμένη απόκριση του ξενιστή σε μία λοίμωξη.
- Η οργανική δυσλειτουργία μπορεί να ταυτοποιηθεί ως δριμεία μεταβολή στο συνολικό σκορ SOFA  $\geq 2$  βαθμούς, η οποία αποδίδεται στη λοίμωξη.
- Ως αρχική τιμή (baseline) του σκορ SOFA μπορεί να θεωρείται το 0, για τους ασθενείς εκείνους που δεν είναι γνωστό να εμφανίζουν προϋπάρχουσα οργανική ανεπάρκεια.

- Σκορ SOFA  $\geq 2$  αντικατοπτρίζει κίνδυνο θνησιμότητας περίπου 10% για έναν νοσοκομειακό πληθυσμό για τον οποίο υπάρχει υποψία φλεγμονής. Ακόμα και η κατάσταση των ασθενών με ήπια δυσλειτουργία μπορεί να επιδεινωθεί περαιτέρω, γεγονός το οποίο υπογραμμίζει την σοβαρότητα της κατάστασής καθώς και την ανάγκη για ταχεία και κατάλληλη παρέμβαση, στην περίπτωση που δεν έχει γίνει ήδη εισαγωγή τους.
- Με απλά λόγια, η σήψη αποτελεί μία κατάσταση που απειλεί τη ζωή του ασθενούς, η οποία προκύπτει όταν η απόκριση του οργανισμού σε μία λοίμωξη προκαλεί βλάβη στους ιστούς και τα όργανα του ίδιου του οργανισμού.
- Οι ασθενείς για τους οποίους υπάρχει υποψία λοίμωξης, οι οποίοι πιθανόν να έχουν παρατεταμένη παραμονή στην ΜΕΘ ή να αποβιώσουν στο νοσοκομείο μπορούν να ταυτοποιηθούν αμέσως από το qSOFA, δηλαδή, από την αλλοίωση της νοητικής τους κατάστασης, συστολική πίεση  $\leq 100$ mmHg ή αναπνευστικό ρυθμό  $\geq 22$ /λεπτό.
- Η σηπτική καταπληξία αποτελεί υποσύνολο της σήψης, κατά το οποίο, οι υποκείμενες ανωμαλίες στην κυκλοφορία και σε κυτταρικό/μεταβολικό επίπεδο είναι τόσο σοβαρές ώστε να αυξάνουν σημαντικά την θνησιμότητα των ασθενών.
- Η κλινική αναγνώριση ασθενών με σηπτική καταπληξία μπορεί να γίνει από την ανάγκη χορήγησης αγγειοσυσπαστικών παραγόντων για τη διατήρηση μέσης αρτηριακής πίεσης 65 mmHg ή μεγαλύτερης, και επίπεδο γαλακτικού στον ορό  $< 2$  mmol/L ( $>18$  mg/dL) απουσία υποογκαιμίας. Ο συνδυασμός αυτός συνδέεται με ποσοστά ενδονοσοκομειακής θνησιμότητας υψηλότερα από 40%.



Figure. Operationalization of Clinical Criteria Identifying Patients With Sepsis and Septic Shock



The baseline Sequential [Sepsis-related] Organ Failure Assessment (SOFA) score should be assumed to be zero unless the patient is known to have preexisting (acute or chronic) organ dysfunction before the onset of infection. qSOFA indicates quick SOFA; MAP, mean arterial pressure.

**Εικόνα 1. Ως αρχική τιμή (baseline) στην κλίμακα του σκορ SOFA θεωρείται το 0, εκτός αν ο ασθενής παρουσιάζει προϋπάρχουσα (οξεία ή χρόνια) οργανική δυσλειτουργία πριν από την έναρξη της λοίμωξης (Πηγή: Singer *et al.*, 2016).**

## **ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ - ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ**

Θεωρητικά, κάθε μικροοργανισμός, ξεκινώντας από οποιαδήποτε εστία, είναι σε θέση να προκαλέσει την εμφάνιση του σηπτικού συνδρόμου (Ποντίκης, 2015). Ωστόσο, η συχνότερη εστία της λοίμωξης, ειδικά στον χώρο της εντατικής θεραπείας, είναι το αναπνευστικό σύστημα, που ενέχεται σε περισσότερες από τα 2/3 των περιπτώσεων. Σε ποσοστό έως και 40% των σηπτικών επεισοδίων, δεν εντοπίζεται συγκεκριμένος βακτηριακός παράγοντας, ενώ, όταν αυτό συμβαίνει, συνήθη απομονούμενα παθογόνα είναι στελέχη κολοβακτηριδίου ή άλλων εντεροβακτηριακών, και ψευδομονάδας, ενώ μεταξύ των Gram θετικών, έντονη είναι η εκπροσώπηση του χρυσίζοντος σταφυλόκοκκου. Στη σύγχρονη εποχή, και ειδικά στους ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, έχει αυξηθεί σημαντικά η επίπτωση της σήψης μυκητιακής αιτιολογίας (κυρίως από στελέχη *Candida spp*), ενώ η πανδημία της γρίπης από το στέλεχος A(H1N1)pdm09 ανέδειξε και τον ρόλο των ιών στην παθογένεια της σήψης.

### **Επιδημιολογία**

Παρά την αυξημένη θνησιμότητα που προκαλεί η σήψη, δεν υπάρχουν πλήρη επιδημιολογικά στοιχεία σε παγκόσμιο επίπεδο (Hotchkiss, 2016). Στοιχεία που προέρχονται από χώρες υψηλού εισοδήματος δείχνουν πως κάθε χρόνο σημειώνονται 31,5 εκατομμύρια περιστατικά σήψης και 19,4 εκατομμύρια περιστατικά σοβαρής σήψης σε όλο τον κόσμο, τα οποία ευθύνονται για 5,3 εκατομμύρια θανάτους. Οι αριθμοί αυτοί υπολογίζονται προσεγγιστικά, καθώς τα στοιχεία για την συχνότητα και τη θνησιμότητα της σήψης στις χώρες χαμηλού και μέσου εισοδήματος είναι ανεπαρκή. Επιπλέον, η σήψη δεν συμπεριλαμβάνεται στην αναφορά της Παγκόσμιας Νοσοεπιβάρυνσης που δημοσιεύεται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) και την Παγκόσμια Τράπεζα, οι οποίοι παρακολουθούν τη συχνότητα εμφάνισης των σημαντικότερων ασθενειών στον κόσμο, τη θνησιμότητα που αυτές προκαλούν και τους παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με αυτές (Hotchkiss, 2016).

Δεδομένου του υψηλού επιπολασμού των λοιμωδών νοσημάτων που συνδέονται με υψηλό κίνδυνο σήψης και σηψαιμίας (HIV, μη τυφοειδής σαλμονέλλωση, πνευμονιόκοκκος κ.α.), στις περιοχές όπου εμφανίζονται αυτές οι ασθένειες αναμένεται και το φορτίο της σήψης να είναι υψηλό (Hotchkiss, 2016). Πράγματι, το 2013, οι λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος κατείχαν τη δεύτερη θέση ανάμεσα στις κύριες αιτίες χρόνων ζωής σε συνθήκες αναπηρίας και ευθύνονταν για περισσότερους από 2,5 εκατομμύρια θανάτους σε όλο τον κόσμο, σημαντικό ποσοστό των οποίων οφειλόταν στην σήψη. Παρομοίως, η ελονοσία και οι ιϊκές λοιμώξεις, όπως ο δάγγειος πυρετός, αποτελούν κύριες αιτίες συστηματικών λοιμώξεων σε χώρες χαμηλού και μέσου εισοδήματος με την πλειοψηφία των θανάτων που προκαλούνται από αυτές να αποδίδονται στην σήψη.

Τρέχουσες επιδημιολογικές μελέτες σε χώρες υψηλού εισοδήματος αναφέρουν υψηλά ποσοστά περιστατικών σήψης, τα οποία θεραπεύονται σε νοσοκομεία- από 194 περιστατικά ανά 100.000 κατοίκους στην Αυστραλία το 2003 (Sundararajan, 2005), έως 580 περιστατικά ανά 100.000 κατοίκους στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής το 2006 (Seymour, 2010). Στην Γερμανία, ο αριθμός των περιστατικών σήψης που αντιμετωπίστηκαν στα νοσοκομεία από το 2007 έως το 2013 αυξήθηκε από 256 σε 335 ανά 100.000 κατοίκους, ενώ το ποσοστό των ασθενών με σοβαρή σήψη αυξήθηκε από 27% σε 41% (Fleischmann, 2016). Επιπλέον, προοπτικές και αναδρομικές επιδημιολογικές μελέτες που έγιναν σε χώρες υψηλού εισοδήματος παρουσιάζουν στοιχεία για την επίπτωση, τον σημειακό επιπολασμό, τον επιπολασμό περιόδου και την θνησιμότητα της σήψης- κάποιες από αυτές δείχνουν μια δραματική αύξηση στην εμφάνιση των περιστατικών σήψης (Hotchkiss, 2016). Η ερμηνεία των ευρημάτων αυτών ωστόσο δεν είναι εφικτή, καθώς πολλές από τις μελέτες αυτές χρησιμοποιούν διαφορετικές μεθόδους και διαφορετικούς ορισμούς για την σήψη, συμπεριλαμβανομένων των συναινετικών κριτηρίων του 1991 ή παραγώγων της Διεθνούς Στατιστικής Ταξινόμησης Νοσημάτων και Συναφών Προβλημάτων Υγείας (ICD) (Hotchkiss, 2016).

Πράγματι, πολλές βάσεις δεδομένων χρησιμοποίησαν τα κριτήρια του 1991 με αποτέλεσμα η λοίμωξη (η οποία τυπικά χαρακτηρίζεται από πυρετό,

ταχυκαρδία και μεταβολή του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων) και η σήψη να συγχέονται. Αντίστοιχα, ο επιπολασμός της ασθένειας μπορεί να διαφέρει σημαντικά ανάλογα με τους όρους που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση της κλινικής σήψης. Έτσι, μία μελέτη η οποία συνέκρινε τέσσερις διαφορετικές μεθόδους αξιολόγησης της σήψης χρησιμοποιώντας τις ίδιες βάσεις δεδομένων είχε σαν αποτέλεσμα ο επιπολασμός της σήψης να διαφέρει περισσότερο από τρεις φορές ανάμεσα στις διαφορετικές μεθόδους (Gaieski, 2013).

Επιπλέον, η αυξημένη συχνότητα εμφάνισης σηψαιμίας σε ορισμένα συστήματα υγειονομικής περίθαλψης μπορεί να οφείλεται στην αυξημένη ευαισθητοποίηση των επαγγελματιών υγείας, την πρόωπη αναγνώριση του συνδρόμου, την εφαρμογή πρόωπης αναζωογόνησης, την πρόοδο της εντατικής θεραπείας (Ποντίκης, 2015) ή/και την ύπαρξη οικονομικών κινήτρων για αυξημένη χρηματική αποζημίωση από την καταγραφή ασθενών με σήψη. Με τον τρόπο αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί η δραματική αύξηση του αριθμού των περιπτώσεων σήψης, τα οποία σχετίζονται με μειωμένα ποσοστά θνησιμότητας σε χώρες υψηλού εισοδήματος. Κεντρικό ρόλο στην εξέλιξη αυτή έχει και η γήρανση του πληθυσμού, καθώς είναι κοινά αποδεκτό ότι η επίπτωση της σήψης είναι αρκετές φορές υψηλότερη στους ηλικιωμένους ασθενείς (Ποντίκης, 2015).

Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν μελέτες, οι οποίες δείχνουν ότι, στα πρακτικά των νοσοκομείων, η σηψαιμία, η σήψη και η σοβαρή σήψη μπορεί να μην καταγράφονται σωστά ή ακόμα και καθόλου (Rhee, 2014, Whittaker, 2013). Ακόμα, υπάρχει μια συνεχής διαμάχη για την ακρίβεια με την οποία γίνεται η καταγραφή των περιστατικών σήψης, ιδιαίτερα όταν αυτά δεν είναι ιδιαίτερα σοβαρά. Επιπλέον, στις μελέτες που γίνονται συμπεριλαμβάνονται μόνο ασθενείς οι οποίοι νοσηλεύονται, ενώ στην πραγματικότητα ένας σημαντικός αριθμός ασθενών βιώνει τη σήψη εκτός νοσοκομείου (McPherson, 2013). Ως εκ τούτου, υπάρχει έντονη ανησυχία πως τα πρόσφατα επιδημιολογικά δεδομένα από τις χώρες υψηλού εισοδήματος δεν αντικατοπτρίζουν το πραγματικό φορτίο της σήψης (Hotchkiss, 2016).

## Θνησιμότητα

Οι εκτιμήσεις για τα περιστατικά σήψης που συνδέονται με ενδονοσοκομειακή θνησιμότητα είναι συγκεχυμένες (Hotchkiss, 2016). Από το 1999 έως το 2009, η θνησιμότητα που αποδίδεται στη σήψη φαίνεται να έχει μειωθεί βάσει στοιχείων που προέρχονται από πιστοποιητικά θανάτου και βάσεις δεδομένων νοσοκομείων.

Ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις, ειδικά σε ασθενείς με χρόνιες ασθένειες, όπως ο καρκίνος, η συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια και η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, το επίσημο πιστοποιητικό θανάτου αναφέρει συχνά την βασική νόσο και όχι την άμεση αιτία θανάτου (σήψη), γεγονός το οποίο συμβάλει στην λανθασμένη εκτίμηση της θνησιμότητας που προκαλείται από τη σήψη. Τα στοιχεία από την Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία, ειδικότερα, δείχνουν ότι τα συνολικά ποσοστά θνησιμότητας που οφείλονται στη σήψη μειώνονται. Αν και τα ποσοστά των ασθενών με σήψη που πεθαίνουν στο νοσοκομείο φθίνουν, οι Martin *et al.* (2003) και Gaieski *et al.* (2013) έδειξαν ότι τα συνολικά ποσοστά θνησιμότητας τείνουν να αυξάνονται, λόγω της αύξησης του αριθμού των ασθενών με σήψη. Το αν μειώνεται και η θνησιμότητα που προκαλείται από το σηπτικό σοκ δεν είναι ξεκάθαρο. Οι Kaukonen *et al.* (2014) ανέφεραν ότι η θνησιμότητα από την σηπτική καταπληξία έχει μειωθεί σε ποσοστά συγκρίσιμα με εκείνα της σήψης, βάσει στοιχείων από τις βάσεις δεδομένων τους. Ωστόσο, μια σύντομη ανάλυση δεδομένων από τυχαίοποιημένες ελεγχόμενες μελέτες (Hotchkiss, 2016) έδειξε ότι αν και η θνησιμότητα από την σηπτική καταπληξία μειώνεται, αυτό συμβαίνει με βραδύτερο ρυθμό από ότι για τη σήψη. Το πρόβλημα, εν μέρει, είναι ότι τα ποσοστά θνησιμότητας από την σηπτική καταπληξία ποικίλλουν δραματικά ανάλογα με την εξειδίκευση και την εμπειρία του εκάστοτε θεραπευτικού κέντρου. Σε κάποιες χώρες, η θνησιμότητα από την σηπτική καταπληξία πλησιάζει ακόμη και το 50%, ενώ σε άλλες, η θνησιμότητα φθάνει στο 20-30%. Η συνολική μείωση της θνησιμότητας της νοσοκομειακής σήψης, και ενδεχομένως της σηπτικής καταπληξίας, είναι ενθαρρυντική. Ωστόσο, το γεγονός ότι η συχνότητα εμφάνισης της σήψης αυξάνεται χωρίς η συνολική

θνησιμότητα να βελτιώνεται σημαντικά αντικατοπτρίζει το μέγεθος της πρόκλησης (Hotchkiss, 2016).

## **ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ - ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ**

Μελετώντας τη θεραπεία της σήψης καταλαβαίνει κανείς πως έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στην κατανόηση της ανθρώπινης παθοφυσιολογίας και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ξενιστή και μικροοργανισμών (Hotchkiss, 2016). Αρχικά η έρευνα για την θεραπεία της σήψης επικεντρωνόταν στον εκάστοτε μικροοργανισμό και την παθογένειά του. Κατά την δεκαετία του '80, με την βοήθεια της μοριακής κλωνοποίησης και της αλληλούχισης των γονιδίων φλεγμονής του ανθρώπου, οι μελέτες άρχισαν να εστιάζουν λιγότερο στην παθογένεια του μικροοργανισμού και περισσότερο στην απόκριση του ξενιστή και του παθογόνου. Η ανακάλυψη του τρόπου με τον οποίο ο ξενιστής διαχωρίζει το «ίδιο» από το «μη ίδιο» και η εισαγωγή της «υπόθεσης κινδύνου» (Matzinger, 1994) βοήθησαν σε μεγάλο βαθμό στην κατανόηση της σήψης και της παθογένειάς της (Hotchkiss, 2016). Η υπόθεση κινδύνου υποστηρίζει ότι το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα αναγνωρίζει μικροβιακά πρότυπα και κυτταρικά προϊόντα του ξενιστή σαν «σήματα κινδύνου» μικροβιακής εισβολής ή ιστικής βλάβης. Ωστόσο, η έως τώρα έρευνα έχει δείξει πως η εξέλιξη της σήψης είναι πολύ πιο πολύπλοκη από την φλεγμονή ή την αναγνώριση ενός προτύπου του μικροβίου ή του ξενιστή. Η σήψη επιδρά στους ιστούς του ενδοθηλίου και την μικροκυκλοφορία, τους πρωτογενείς και δευτερογενείς ιστούς του ανοσοποιητικού συστήματος, την πήξη, τους ιστούς του παρεγχύματος, ενώ επιπλέον, προκαλεί νευρολογικές διαταραχές που επηρεάζουν άμεσα τα κύτταρα της μικρογλοίας και τους νευρώνες (Deutschman, 2014, Levi, 2013, Opal, 2015, White, 2013).

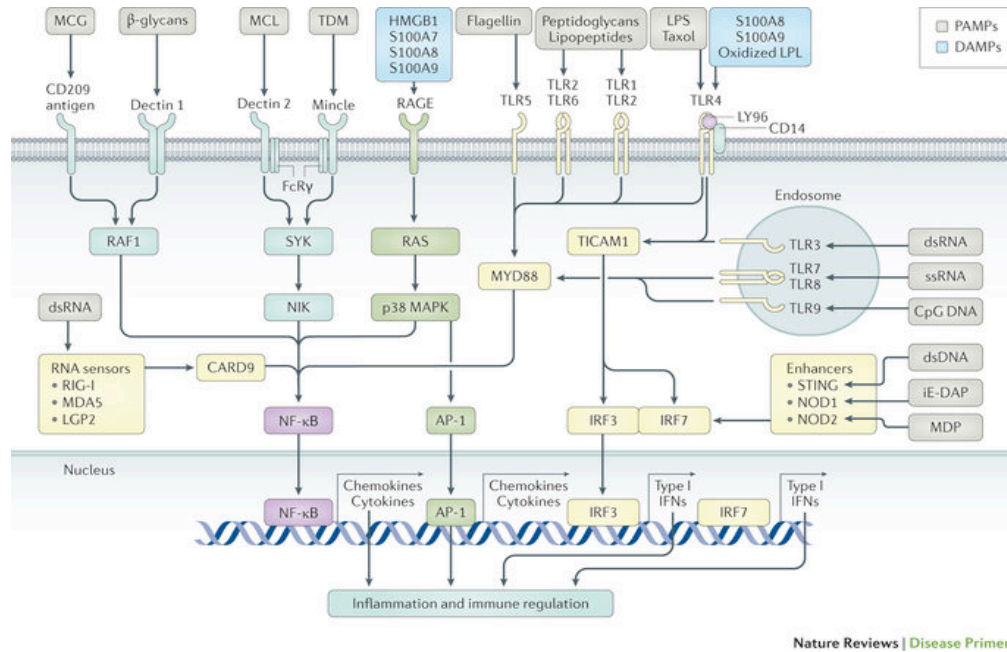
### **(i) Φλεγμονή**

Η σήψη είναι μια φλεγμονώδης ασθένεια που προκαλείται από την ενεργοποίηση του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος (Hotchkiss, 2016). Δύο βασικά ευρήματα χαρακτηρίζουν την έμφυτη ανοσολογική απόκριση κατά τη σήψη.

Το πρώτο εύρημα είναι ότι αυτή εμφανίζεται μετά την ταυτόχρονη αναγνώριση πολλαπλών μικροβιακών προϊόντων που προέρχονται από λοίμωξη και ενδογενών σημάτων κινδύνου που προέρχονται από το συμπλήρωμα και συγκεκριμένους υποδοχείς επιφάνειας κυττάρων, βασικός ρόλος των οποίων είναι η ανοσοεπιτήρηση. Τα κύτταρα αυτά είναι ανοσοποιητικά, επιθηλιακά και ενδοθηλιακά και βρίσκονται σε σημεία όπου μπορούν να ελέγχουν συνεχώς το τοπικό περιβάλλον. Η δέσμευση αμφότερων των Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) ή των Damage-associated molecular patterns (DAMPs) από το συμπλήρωμα, τους Toll-like Receptors (TLRs), τους NOD-like Receptors, τους RIG-like Receptors, τη λεκτίνη συνδεόμενη με μαννόζη και τους υποδοχείς καθαριστές (scavenger receptors), μεταξύ άλλων, επάγει ένα σύνθετο ενδοκυττάριο σύστημα μεταγωγής σήματος με πλεοναστικές και συμπληρωματικές δραστηριότητες (Tang, 2012).

Το δεύτερο βασικό εύρημα στη σήψη είναι ότι η ενεργοποίηση αυτών των μονοπατιών πολλαπλής σηματοδότησης οδηγεί τελικά στην έκφραση αρκετών κοινών γονιδίων ανάμεσα στη φλεγμονή, την επίκτητη ανοσία και τον κυτταρικό μεταβολισμό. Δηλαδή η αναγνώριση πολλών διαφορετικών συστατικών βακτηριδίων, ιών και μυκήτων, καθώς και προϊόντων του ξενιστή μετά από ιστική βλάβη, οδηγεί στην συνάθροιση προ-φλεγμονωδών ενδιάμεσων που με τη σειρά τους οδηγούν στη φωσφορυλίωση των MAP κινασών, των Janus κινασών (JAKs) ή των STATs και του κυτταροπλασματικού μεταγραφικού παράγοντα NF-κB (Nuclear Factor-κB), αλλά και άλλων μορίων. Αυτά τα ενδιάμεσα μόρια επάγουν την έκφραση των πρώιμων γονιδίων ενεργοποίησης. Συνολικά, τα δύο αυτά χαρακτηριστικά της έμφυτης ανοσίας εξασφαλίζουν ένα κοινό πρότυπο απόκρισης, η ένταση και η κατεύθυνση του οποίου ρυθμίζονται με λεπτό τρόπο από το επίπεδο και την ποικιλία του ρεπερτορίου των PAMPs και DAMPs και των ενεργοποιημένων μονοπατιών σηματοδότησης. Αυτή η

συμπληρωματική φύση των μονοπατιών εξηγεί την αλληλεπικαλυπτόμενη, αλλά μοναδική πρώιμη φλεγμονώδη απόκριση σε κοινές λοιμώξεις από Gram-αρνητικά, Gram-θετικά βακτήρια, μύκητες, ιούς και ιστική βλάβη (Hotchkiss, 2016).



Nature Reviews | Disease Primers

**Εικόνα 2.** Οι υποδοχείς κυτταρικής επιφανείας και οι ενδοκυτταρικοί υποδοχείς που εμπλέκονται στην αναγνώριση μικροβιακών προϊόντων και ενδογενών σημάτων κινδύνου (αλαρμίνες). Η σήψη αρχίζει με την αναγνώριση των Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) από τον ξενιστή και χαρακτηρίζεται από την ενεργοποίηση φλεγμονωδών σηματοδοτικών μονοπατιών. Ένας μεγάλος αριθμός υποδοχέων είναι διαθέσιμος για την ανίχνευση των PAMPs ή των Damage-associated molecular patterns (DAMPs), μερικά παραδείγματα των οποίων απεικονίζονται εδώ. Τα PAMPs και τα DAMPs μπορεί να είναι γλυκοπρωτεΐνες του μικροβίου ή του ξενιστή, λιποπρωτεΐνες και νουκλεϊνικά οξέα. (Πηγή: Hotchkiss *et al.*, 2016)

## (ii) Γονίδια πρώιμης ενεργοποίησης

Η πυρηνική μετατόπιση του NF-κB και η ενεργοποίηση του εκκινητή του, επάγουν την έκφραση πολλαπλών γονιδίων πρώιμης ενεργοποίησης, συμπεριλαμβανομένων κυτταροκινών, που σχετίζονται με την φλεγμονή (όπως ο Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων (TNF), οι ιντερλευκίνες (IL) -1, -12, -18, και οι ιντερφερόνες τύπου I (IFNs) (Hotchkiss, 2016). Οι κυτταροκίνες αυτές επάγουν έναν καταρράκτη άλλων φλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών (όπως οι ιντερλευκίνες -6 και -8, η ιντερφερόνη γ (IFNγ), οι CC-chemokine ligand 2 (CCL2),



CCL3 and CXC-chemokine ligand 10 (CXCL10)), καθώς επίσης την πόλωση και την καταστολή συστατικών της επίκτητης ανοσίας. Η ενεργοποίηση αυτών των δικτύων φλεγμονής ξεκινά μέσα σε λίγα λεπτά μετά την αναγνώριση των PAMPs ή DAMPs, χάρη στην ύπαρξη δεξαμενών προσχηματισμένων ανενεργών και ενεργών κυτταροκινών (Hotchkiss, 2016).

Ταυτόχρονα, η ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων της φυσικής ανοσίας, η ενεργοποίηση του συμπληρώματος και η παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών επιδρούν σημαντικά στην πήξη, το αγγειακό και λεμφικό ενδοθήλιο, και έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση σελεκτινών και μορίων προσκόλλησης. Η μεταβολή της έκφρασης διαφόρων προπηκτικών και αντιπηκτικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένης της θρομβομοντουλίνης, του παράγοντα ιστού, του παράγοντα von Willebrand, του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου 1 (PAI 1) και της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C, έχει ως αποτέλεσμα τη μετάβαση του ενδοθηλίου από μια αντιθρομβωτική κατάσταση (φυσιολογική κατάσταση) σε μια προπηκτική κατάσταση (κατά τη σήψη). Οι προ-φλεγμονώδεις πρωτεάσες επάγουν την ενδοκυττάρωση της αγγειακής ενδοθηλιακής (VE) -καδερίνης οδηγώντας στην απώλεια των ενδοθηλιακών αποφρακτικών συνδέσεων και την αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα (Parikh, 2013).

### **(iii) Ο άξονας του υποδοχέα C5a-C5a**

Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος θεωρείται ένα από τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της σήψης και ξεκινά αμέσως μετά την έκθεση σε PAMPs και DAMPs (Hotchkiss, 2016). Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος οδηγεί στη δημιουργία πεπτιδίων συμπληρώματος (δηλαδή, C3a και C5a). Το C5a έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα από τα πιο δραστικά φλεγμονώδη πεπτίδια που παράγονται κατά τη διάρκεια της σήψης κι ένα από τα ισχυρότερα χημειοελκτικά για τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα. Στα ουδετερόφιλα, το C5a προκαλεί οξειδωτική έκρηξη που οδηγεί στη δημιουργία δραστικών ριζών οξυγόνου και την απελευθέρωση κοκκωδών ενζύμων, τα οποία πιστεύεται ότι εμπλέκονται σημαντικά στη φλεγμονώδη βλάβη των ιστών. Επιπλέον, το C5a είναι διεγερτικό για τη σύνθεση και την απελευθέρωση

προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών, ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Οι μηχανισμοί αυτοί πιστεύεται ότι συμβάλλουν στη αγγειοδιαστολή, τη βλάβη των ιστών και την οργανική ανεπάρκεια σε περιπτώσεις οξείας φλεγμονής. Ο πιθανός ρόλος της C5a κατά τη σήψη έχει συνδεθεί με τη δυσλειτουργία των ουδετερόφιλων, την απόπτωση των λεμφοειδών κυττάρων, την επιδείνωση της συστηματικής φλεγμονής, την καρδιομυοπάθεια, την διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη και επιπλοκές που σχετίζονται με την πολυοργανική ανεπάρκεια (Parikh, 2013). Η απενεργοποίηση του πεπτιδίου C5a σε πειραματικά μοντέλα σήψης έχει αποδειχθεί ωφέλιμη από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες. Για παράδειγμα, η αναστολή της δράσης του πεπτιδίου C5a με πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιού σε ένα μοντέλο σήψης που επάγεται με έγχυση ζώντων βακτηρίων *Escherichia coli*, εξασθένησε σημαντικά τα συμπτώματα της οξείας πνευμονικής βλάβης και της ανεπάρκειας που προκαλεί η οξεία σήψη (Parikh, 2013).

Επιπλέον, οι σοβαρές φλεγμονώδεις αποκρίσεις και η οργανική βλάβη που προκαλείται κατά τη διάρκεια των ιϊκών λοιμώξεων από τους H5N1 και H1N1 έχουν συνδεθεί με την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και ιδιαίτερα την υπερπαραγωγή του C5a. Έτσι, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που αναπτύχθηκε έναντι του ανθρώπινου πεπτιδίου C5a εξασθένησε σημαντικά την πνευμονική βλάβη που προκλήθηκε από τον H7N9 σε μη ανθρώπινα πρωτεύοντα, μειώνοντας το ιϊκό φορτίο και τα επίπεδα αρκετών διαφορετικών κυτταροκινών (Sun, 2015).

#### **(iv) Ανοσοκαταστολή**

Αν και η πρώιμη συστηματική φλεγμονώδης απόκριση θεωρείται χαρακτηριστικό γνώρισμα της σήψης, η ανοσοκαταστολή λαμβάνει χώρα τόσο νωρίς όσο και αργά κατά την απόκριση του ξενιστή στην σήψη (Hotchkiss, 2016). Οι ασθενείς που καταφέρνουν να ξεπεράσουν την σήψη έχουν συχνά «protracted clinical trajectories» και παρουσιάζουν τόσο χρόνια ανοσοκαταστολή όσο και φλεγμονή. Αυτό το εύρημα έχει πρόσφατα ονομαστεί εμμένον σύνδρομο φλεγμονής/ανοσοκαταστολής και καταβολισμού (persistent inflammation, immunosuppression, and catabolism syndrome, PICS). Η

σχετιζόμενη με το PICS φλεγμονή χαρακτηρίζεται από σημαντικά αυξημένες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης C (πρωτεΐνη οξείας φάσης), ουδετεροφιλία και απελευθέρωση ανώριμων μυελοειδών κυττάρων.

Σε αντίθεση με την άμεση φλεγμονώδη απόκριση η οποία θεωρείται ότι προέρχεται κατά κύριο λόγο από PAMPs και DAMPs, η αιτιολογία πίσω από την εμμένουσα φλεγμονή είναι άγνωστη. Εναλλακτικές εξηγήσεις για τον τρόπο με τον οποίο εξελίσσεται το PICS είναι οι ευκαιριακές λοιμώξεις, όπως είναι η ιϊκή επανενεργοποίηση (Walton, 2014), οι αλλαγές στο σύνολο του μικροβιώματος του ξενιστή και οι δευτερεύουσες μηχανικές βλάβες στον μηχανικό αερισμό (ventilation) ή την τοποθέτηση καθετήρα (Hotchkiss, 2016).

Σε σύγκριση με τα άτομα ελέγχου χωρίς σήψη, οι ασθενείς με σήψη έχουν αυξημένα ποσοστά επανενεργοποίησης λανθανόντων ιών, με το ιϊκό DNA να ανιχνεύεται στο αίμα του 42% των ασθενών με σήψη (μόνο το 5% των ασθενών με κρίσιμη νόσο χωρίς σηψαιμία έχουν ανιχνεύσιμο ιϊκό DNA). Η μελέτη των Hotchkiss *et al.* (1999) επιβεβαίωσε την ανοσοκαταστολή των ασθενών με σήψη, με εμμένουσες εστίες λοίμωξης και μικροαποστήματα που εντοπίστηκαν στο 80% των περιπτώσεων.

Οι αλλαγές στην επίκτητη ανοσία ως απάντηση στην σήψη είναι βαθιές. Η λεμφοπενία, ο ανώριμος φαινότυπος ουδετερόφιλων (πολυμορφοπύρηνων), η έλλειψη της παραγωγής φλεγμονωδών κυτταροκινών από μονοκύτταρα και της παρουσίασης αντιγόνου καθώς και οι αυξημένοι αριθμοί κυττάρων καταστολής που προέρχονται από neutrophil-like myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) στην κυκλοφορία αποτελούν κοινές συνέπειες της σήψης (Cuenca, 2011). Τα ανώριμα μυελοειδή κύτταρα στην κυκλοφορία έχουν ελαττωματική αντιμικροβιακή δραστηριότητα, η οποία χαρακτηρίζεται από μειωμένη έκφραση μορίων προσκόλλησης και μειωμένο σχηματισμό εξωκυτταρικών «παγίδων» (δίκτυα εξωκυτταρικών ινών που αποτελούνται από χρωματίνη, DNA και κοκκώδεις πρωτεΐνες), οι οποίες συλλαμβάνουν παθογόνους παράγοντες. Τόσο τα ανώριμα ουδετερόφιλα του αίματος όσο και τα MDSCs εκκρίνουν πολλαπλές αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, συμπεριλαμβανομένων των IL-10 και του μετασχηματιστικού αυξητικού παράγοντα β (TGFβ), οι οποίες καταστέλλουν περαιτέρω την ανοσολογική λειτουργία (Hotchkiss, 2016)

Επιπλέον, η σήψη προκαλεί την απώλεια της έκφρασης του ενεργοποιημένου μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας τάξης II (activating major histocompatibility complex, MHC class II μορίου HLA DR (human leukocyte antigen-antigen D related) από τα επαγγελματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, όπως τα δενδριτικά κύτταρα και τα μακροφάγα. Η απώλεια του μορίου HLA DR από τα κυκλοφορούντα αντιγονο-παρουσιαστικά κύτταρα συσχετίζεται με την μειωμένη απόκρισή τους και την αποτυχία των μονοκυττάρων να ανακτήσουν τα επίπεδα των HLA DR (Hotchkiss, 2016).

Η σήψη προκαλεί επίσης την αύξηση της έκφρασης του προσδέτη PDL1, τόσο στα κύτταρα του στρώματος, όσο και στα επαγγελματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Ο προσδέτης αυτός δεσμεύεται στον υποδοχέα PD1 που εκφράζεται από τα T κύτταρα, καταστέλλοντας περαιτέρω τη λειτουργία τους. Ο συνδυασμός της αυξημένης επιφανειακής έκφρασης των ανασταλτικών προσδετών των T κυττάρων από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, η έλλειψη ενεργοποίησης των MHC μορίων τάξης II και η αυξημένη παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών μετατοπίζει τον φαινότυπο T κυττάρων προς έναν ανοσοκατασταλτικό φαινότυπο (TH2), αυξάνει την κατασταλτική δραστηριότητα των ρυθμιστικών T κυττάρων και προκαλεί ευρεία ανεργία των T κυττάρων (έλλειψη αντίδρασης) (Hotchkiss, 2016).

Ακόμα, οι ασθενείς με σήψη εμφανίζουν σημαντική αποπτωτική απώλεια T-λεμφοκυττάρων, B-λεμφοκυττάρων και δενδριτικών κυττάρων, παρατήρηση η οποία έχει γίνει και σε ζωικά μοντέλα σήψης. Η αποπτωτική απώλεια των λεμφοκυττάρων είναι άμεσα ανοσοκατασταλτική, συμβάλλοντας στη λεμφοπενία που παρατηρείται σε ασθενείς με σοβαρή σήψη. Ο βαθμός απόπτωσης των λεμφοκυττάρων συσχετίζεται με τη σοβαρότητα της σηψαιμίας και η εμμένουσα λεμφοπενία προβλέπει τη θνησιμότητα από τη σήψη (Coopersmith, 2003).

Τα αποπτωτικά κύτταρα καταστέλλουν επίσης την ανοσολογική λειτουργία αλληλεπιδρώντας με άλλα λευκοκύτταρα. Για παράδειγμα, η φαγοκυττάρωση των αποπτωτικών λεμφοκυττάρων προκαλεί την απελευθέρωση αντιφλεγμονωδών κυτοκινών όπως η IL-10 και ο TGFβ από μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα. Η διαδικασία αυτή καταστέλλει επίσης την παραγωγή

προφλεγμονωδών κυτταροκινών στο επίπεδο της γονιδιακής μεταγραφής, συμβάλλοντας έτσι στην παράλυση της έμφυτης φλεγμονώδους απόκρισης στη σήψη. Συνεπώς, οι φαρμακολογικοί ή γενετικοί χειρισμοί που μειώνουν την απόπτωση που προκαλείται από σηπτικές καταστάσεις βελτιώνουν το λειτουργικό αποτέλεσμα απόπτωσης που προκαλεί η σήψη. Η επόμενη γενιά θεραπειών που αξιολογούνται για σήψη στοχεύει τόσο την απόπτωση των λεμφοκυττάρων όσο και την ανοσοκαταστολή που επάγεται από το σηπτικό σοκ. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών αναμένονται με ανυπομονησία (Hotchkiss, 2016).

### **(v) Δυσλειτουργία του ενδοθηλιακού φραγμού**

Η λειτουργία του ενδοθηλιακού φραγμού αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της απόκρισης κατά την σήψη (Hotchkiss, 2016). Ένας συνεχής ενδοθηλιακός φραγμός επικαλύπτει το αγγειακό σύστημα και διαχωρίζει την υγρή φάση του διαμερίσματος του αίματος από τους ιστούς. Υπό κανονικές συνθήκες, το ενδοθήλιο χρησιμεύει ως αντιπηκτική επιφάνεια που ρυθμίζει τη ροή αερίων, νερού, διαλυμένων ουσιών, ορμονών, λιπιδίων, πρωτεϊνών και πλήθους άλλων μακρομορίων μέσα στη μικροκυκλοφορία. Η σήψη πλέον θεωρείται δυσλειτουργία των αλληλεπιδρώντων κυκλωμάτων δικτύων επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων που διατηρούν την ομοιόσταση υπό φυσιολογικές συνθήκες. Έτσι, η δυσλειτουργία του ενδοθηλιακού φραγμού αποτελεί ένα θεμελιώδες παθοφυσιολογικό γεγονός το οποίο συναντάται νωρίς στη σηψαιμία και ειδικότερα το σηπτικό σοκ. Το όριο μεταξύ του αίματος και του ενδιάμεσου ιστού είναι εξαιρετικά διαδραστικό και δυναμικό τόσο στην υγεία όσο και στην ασθένεια, με το ενδοθηλιακό κύτταρο να αποτελεί τον κύριο ρυθμιστικό κυτταρικό τύπο.

Η ακεραιότητα του ενδοθηλίου διατηρείται με την βοήθεια του κυτταροσκελετού (ακτίνη), τα ενδοκυτταρικά μόρια προσκόλλησης (αποφρακτικές συνδέσεις) και μια σειρά υποστηρικτικών πρωτεϊνών. Στην σήψη, οι δομές αυτές διαρρηγνύονται, κυρίως σε απόκριση της προσκόλλησης αιμοπεταλίων και ουδετερόφιλων, της απελευθέρωσης φλεγμονωδών μεσολαβητών και τοξικών οξειδωτικών. Σε συνδυασμό με την αυξημένη

έκφραση σελεκτινών και ιντεγκρινών, η δέσμευση των λευκοκυττάρων στην ενδοθηλιακή επιφάνεια έχει ως αποτέλεσμα τη διαρροή αγγειακού υγρού και τη μετανάστευση λευκοκυττάρων κατά μήκος του ενδοθηλιακού φραγμού που έχει υποστεί ρήξη (Hotchkiss, 2016). Το γεγονός αυτό παρέχει επίσης την δυνατότητα να συμβεί πολυμερισμός του κολλαγόνου και θρόμβωση. Αν και αυτές οι αποκρίσεις επιτρέπουν στα αιμοπετάλια και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού να φθάσουν σε σημεία του ιστού σε απόκριση κάποιου τραύματος ή κάποιας εντοπισμένης μόλυνσης, η σήψη παράγει γενικευμένες, εκτεταμένες και παρατεταμένες αντιδράσεις που μπορεί να οδηγήσουν σε σημαντικό τραυματισμό του ιστού (Hotchkiss, 2016).

Επιπλέον, ο γλυκοκάλυκας είναι ένα στρώμα από γλυκοπρωτεΐνη και πολυσακχαρίτη που καλύπτει το ενδοθήλιο και υποστηρίζει την αντιπηκτική κατάσταση και διατηρεί τις αποφρακτικές συνδέσεις. Η σήψη μεταβάλλει τη συνοχή του γλυκοκάλυκα, η οποία επίσης αυξάνει την ενδοθηλιακή διαπερατότητα (Chelazzi, 2015). Στην σήψη, ο γλυκοκάλυκας αποτελεί στόχο των μεσολαβητών της φλεγμονής και των λευκοκυττάρων καθώς περιέχει υποδοχείς ενδοθηλιακούς υποδοχείς επιφανείας. Η ευρέως διαδεδομένη παρουσία του γλυκοκάλυκα στην οργανική μικροκυκλοφορία μπορεί να εξηγήσει την ενδοθηλιακή ενεργοποίηση και τη βλάβη των ιστών που βρίσκονται μακριά από την αρχική θέση της λοίμωξης μέσω αυτής της συστηματικής απελευθέρωσης κυτταροκινών και άλλων διαμεσολαβητών φλεγμονής κατά τη σήψης. Η βλάβη του γλυκοκάλυκα που προκαλείται από την φλεγμονή συμβάλλει στην οξεία νεφρική βλάβη, την αναπνευστική ανεπάρκεια και την ηπατική δυσλειτουργία.

### **(vi) Πήξη**

Η σήψη και το σηπτικό σοκ οδηγούν σε μία σε υπερπηκτική κατάσταση, η οποία χαρακτηρίζεται από μικροαγγειακούς θρόμβους, εναπόθεση φιβρίνης, σχηματισμό εξωκυττάρων ουδετεροφιλικών δικτύων (neutrophil extracellular traps, NETs) και βλάβη του ενδοθηλίου (Hotchkiss, 2016). Οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες καθώς και άλλοι μεσολαβητές, όπως ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων και η καθεψίνη G, στοχεύουν το ενδοθήλιο και τα αιμοπετάλια. Η

ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μπορεί από μόνη της να ενισχύσει τόσο την πήξη όσο και την φλεγμονώδη απόκριση με το σχηματισμό συσσωματωμάτων που μπορούν να ενεργοποιήσουν την απελευθέρωση θρομβίνης. Η θρομβίνη είναι μια πρωτεάση σερίνης που δημιουργεί διασυνδέσεις μεταξύ μορίων ινώδους, ενώ καταλύει και πολλές άλλες αντιδράσεις που σχετίζονται με την πήξη. Αυτές οι διασυνδέσεις μεταξύ μορίων ινώδους, μαζί με αιμοπετάλια, παρέχουν δομική ακεραιότητα κατά τον σχηματισμό των θρόμβων.

Επιπλέον, οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες μπορούν να προάγουν την πήξη στοχεύοντας το ενδοθήλιο και προκαλώντας ενδοθηλιακή βλάβη (Hotchkiss, 2016). Το κατεστραμμένο ενδοθήλιο και η έκθεση του υποκείμενου κολλαγόνου ενεργοποιούν τον παράγοντα von Willebrand, που ενεργοποιεί περαιτέρω την συνάθροιση των αιμοπεταλίων και το σχηματισμό ινώδους. Τα αιμοπετάλια μπορεί επίσης να προκαλέσουν φλεγμονή ενεργοποιώντας τα δενδριτικά κύτταρα.

Το ενεργοποιημένο ενδοθήλιο επίσης αυξάνει την έκφραση του ιστικού παράγοντα (tissue factor), ο οποίος δρά άμεσα στον παράγοντα VII, οδηγώντας στο σχηματισμό συμπλόκων παράγοντα του ιστικού παράγοντα -παράγοντα VIIa τα οποία μετατρέπουν τον παράγοντα X στον παράγοντα Xa, με αποτέλεσμα την δημιουργία θρομβίνης, απόθεση ινώδους, σχηματισμό θρόμβου, σύνθεση βραδυκινίνης και ενεργοποίηση του συμπληρώματος. Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος ενισχύει με τη σειρά της τον σχηματισμό θρόμβου μέσω της απελευθέρωσης μικροκυστιδίων από τα κύτταρα. Τα μικροκυτίδια αυτά από τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα περιέχουν επιπρόσθετο παράγοντα ιστού, ενισχύοντας έτσι περαιτέρω τη φλεγμονή και τη θρόμβωση. Η απόθεση συμπληρώματος στα ερυθροκύτταρα προκαλεί αιμόλυση και την απελευθέρωση μικροκυστιδίων από τα ερυθροκύτταρα, τα οποία είναι προθρομβωτικά. Η προκύπτουσα αλληλεπίδραση μεταξύ του παράγοντα ιστών και του παράγοντα VIIa ενισχύει τη φλεγμονώδη διαδικασία και οδηγεί σε απόθεση ινώδους στο ενδοθήλιο. Η εναπόθεση μικρών θρόμβων, ειδικά στην μικροκυκλοφορία, οδηγεί σε μειωμένη διάχυση και σχηματισμό θρόμβων. Συνεπώς, η πήξη αυξάνει την φλεγμονή κυρίως μέσω της επαγόμενης από τη θρομβίνη έκκρισης προφλεγμονωδών κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων (Riewald, 2003).

Τα ενδογενή αντιπηκτικά που αναστέλλουν διαφορετικά τμήματα του καταρράκτη της πήξης (αναστέλλοντας έτσι τον σχηματισμό θρόμβων) υποεκφράζονται από τις ίδιες διαδικασίες που οδηγούν στην υπερ-έκφραση του ιστικού παράγοντα (Hotchkiss, 2016). Ταυτόχρονα, η ινωδολύση μειώνεται δραματικά. Αυξημένα επίπεδα PAII αναστέλλουν τόσο τον ενεργοποιητή πλασμινογόνου ιστού (tPA) όσο και τον ενεργοποιητή πλασμινογόνου ουροκινάσης (uPA). Αυτή η δυσλειτουργία του δικτύου PAI 1-t-PA-u PA έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της συγκέντρωσης της πλασμίνης, η οποία απαιτείται για τη διάλυση των ενδοαγγειακών θρόμβων ινώδους. Η παραγωγή θρομβίνης και η δέσμευσή της στη θρομβομοντουλίνη ενεργοποιούν τον αναστολέα ινωδολύσης - μειώνοντας περαιτέρω της παραγωγή πλασμίνης. Τελικά, αυτή η διαταραχή στην πήξη μπορεί να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτη αιμορραγία. Το γεγονός αυτό μπορεί να φαίνεται αντικρουόμενο με τα παραπάνω δεδομένα σχετικά με την υπερπηκτικότητα και την απόθεση ινώδους που προκαλεί η σήψη, αλλά η διαδικασία αυτή θεωρείται πως εμφανίζεται δευτερευόντως μετά από τη θρομβοπενία εκ κατανάλωσης και την εξάντληση των παραγόντων πήξης.

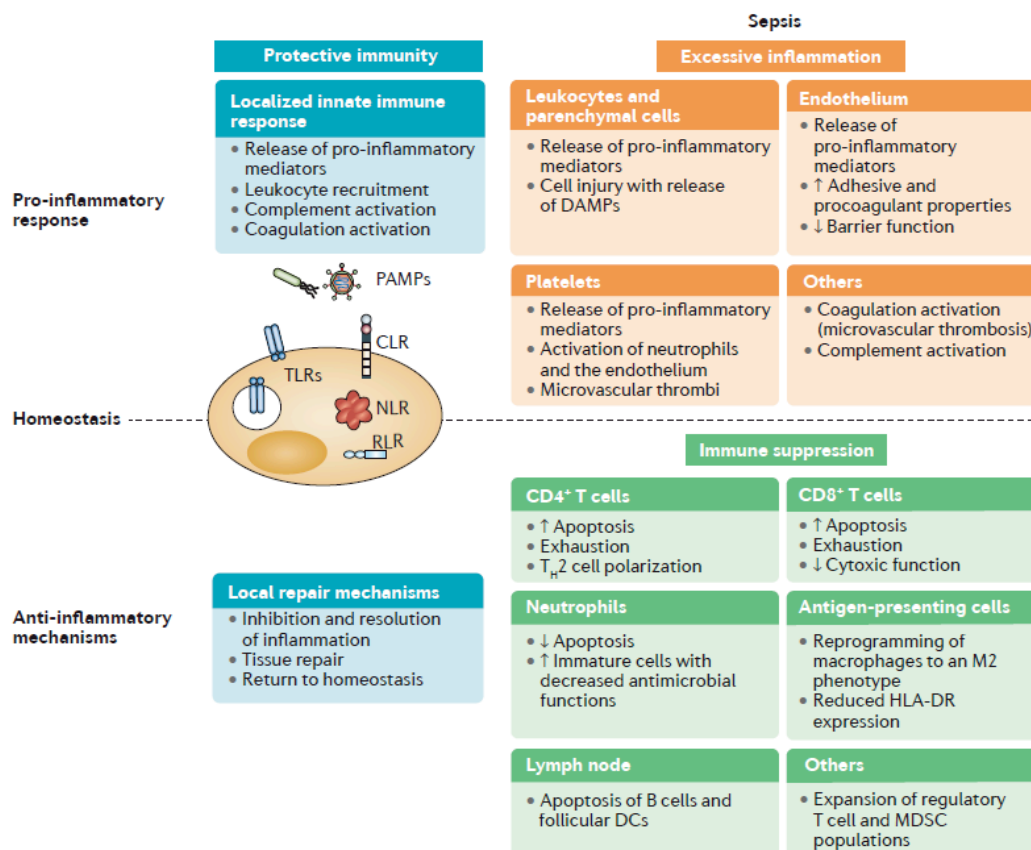
### **(vii) Σχηματισμός θρόμβου**

Η φλεγμονή και η πήξη είναι στενά συνδεδεμένοι μεταξύ τους αμυντικοί μηχανισμοί μετά από τραυματισμό και αυτο-ενισχύονται με συν-διέγερση (Hotchkiss, 2016). Σε αντιοξειδωτική κατάσταση (υγεία), τα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν εκφράζουν μόρια προσκόλλησης, τα οποία προσδένονται σε λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια, αυτό όμως συμβαίνει κατά τη σήψη σε απόκριση της πρώιμης φλεγμονώδους απόκρισης κι έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της πήξης. Το τοπικό περιβάλλον κυτταροκινών σε αυτό το στάδιο φλεγμονής επάγει υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας για μυελοειδή κύτταρα, λεμφοκύτταρα και αιμοπετάλια. Τα αιμοπετάλια προσδένονται στους κλώνους ινώδους και παρέχουν μια έτοιμη πηγή P-σελεκτίνης για την πρόσδεση ουδετερόφιλων. Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα παράγουν NET τα οποία παρέχουν ένα «ικρίωμα» για περαιτέρω σχηματισμό θρόμβων και έτσι η διαδικασία αυτή αυτο-ενισχύεται (Levi, 2013, 2010). Αυτή η συνεργατική



αλληλεπίδραση χρησιμεύει στην απομόνωση των σημείων με βλάβη, περιορίζοντας τον κίνδυνο λοίμωξης (Hotchkiss, 2016).

Ο θρόμβος χρησιμεύει επίσης στην αποφυγή της απώλειας αίματος σφραγίζοντας το «ελάττωμα» στο αγγειακό σύστημα. Ο ταυτόχρονος σχηματισμός θρόμβου και η ενεργοποίηση της έμφυτης ανοσίας βοηθούν σημαντικά στην επιβίωση του ασθενούς όταν η περιοχή της βλάβης είναι περιορισμένη. Αντίθετα, στην περίπτωση γενικευμένης ενεργοποίησης της πήξης και της φλεγμονής σε ολόκληρο τον ξενιστή, όπως κατά τη διάρκεια του DIC, οι συνέπειες μπορεί να είναι καταστροφικές και να οδηγήσουν σε θανατηφόρα σηπτική καταπληξία (Hotchkiss, 2016).

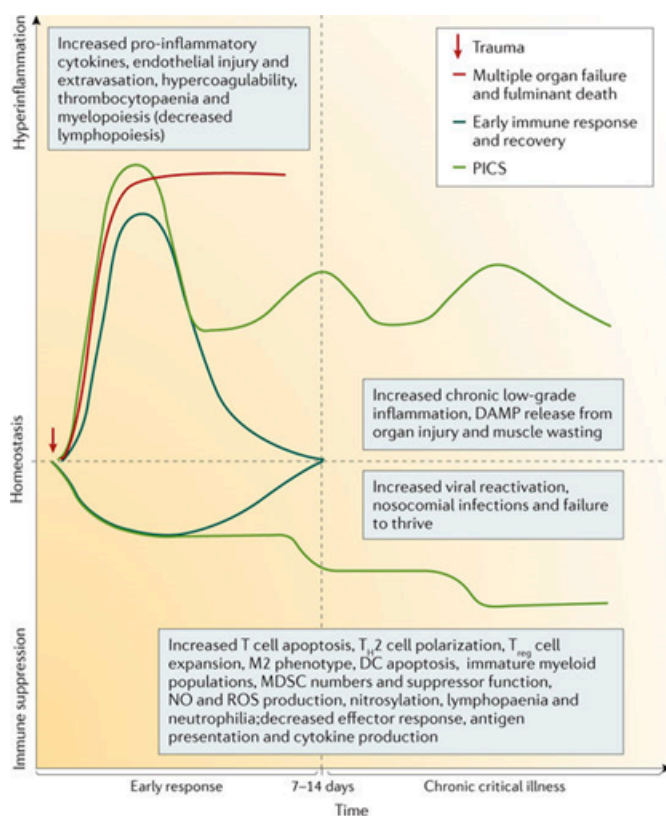


**Εικόνα 3. Η απόκριση του ξενιστή κατά τη λοίμωξη και κατά τη διάρκεια της σήψης.** Μετά τη λοίμωξη, το εισβάλλον παθογόνο αντιμετωπίζει το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα (αριστερά "προστατευτική ανοσία"). Κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα λευκοκύτταρα και τα παρεγχυματικά κύτταρα, εμπλέκονται στην πρώιμη τοπική ανοσοαπόκριση σε παθογόνους παράγοντες. Τα κύτταρα αυτά αντιλαμβάνονται την παρουσία των παθογόνων αναγνωρίζοντας μόρια PAMPs μέσω μιας ποικιλίας υποδοχέων κυτταρικής επιφάνειας και ενδοκυττάρων

υποδοχέων, συμπεριλαμβανομένων των TLRs, NLRs, RLRs και των υποδοχέων λεκτίνης τύπου C (CLR). Στις περισσότερες περιπτώσεις, το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα είναι αποτελεσματικό, επιτυγχάνοντας μια προστατευτική και ισορροπημένη ανταπόκριση στις λοιμώξεις. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εξάλειψη του παθογόνου μέσω μιας ποικιλίας προ-φλεγμονωδών αντιδράσεων, όπως είναι η απελευθέρωση κυτοκινών και χημειοκινών, η στρατολόγηση των φαγοκυττάρων και η τοπική ενεργοποίηση του συμπληρώματος και των συστημάτων της πήξης. Τα γεγονότα αυτά ακολουθούνται από επιστροφή στην ομοιόσταση, η οποία προκαλείται από αντισταθμιστικούς μηχανισμούς που στοχεύουν στον περιορισμό της αρχικής φλεγμονής και την αποτροπή της ιστικής βλάβης. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια κάποιων λοιμώξεων, ο παθογόνος οργανισμός επικρατεί και καταφέρει να πολλαπλασιαστεί παρά την ενεργοποίηση της ανοσοαπόκρισης. Το φαινόμενο αυτό οδηγεί σε βλάβη του ξενιστή (δεξιά). Η απόκριση του ξενιστή κατά τη σήψη χαρακτηρίζεται από ταυτόχρονη εκτεταμένη φλεγμονή (επάνω δεξιά) και ανοσοκαταστολή (κάτω δεξιά). Η εκτεταμένη φλεγμονή, η οποία προκαλείται τουλάχιστον εν μέρει από την απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών από διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους και την ενεργοποίηση των συστημάτων της πήξης και του συμπληρώματος και το αγγειακό ενδοθήλιο, χαρακτηρίζεται από κυτταρική βλάβη, οργανική βλάβη, δυσλειτουργία και καταβολισμό. Η ανοσοκαταστολή περιλαμβάνει τόσο το προσαρμοστικό όσο και το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα, και χαρακτηρίζεται από την απόπτωση των T και B κυττάρων, των δενδριτικών κυττάρων (DCs), την εξάντληση των T κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό πληθυσμών T ρυθμιστικών κυττάρων και προερχομένων από τον μυελό κατασταλτικών κυττάρων και τον επαναπρογραμματισμό αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων που έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση HLA-DR και τη μειωμένη ικανότητα τους να παράγουν προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (Πηγή: van der Poll *et al.*, 2017)

### **viii) Επίδραση σε οργανικά συστήματα**

Τα συμπτώματα της σήψης είναι ποικίλα και εξαρτώνται από τα συγκεκριμένα οργανικά συστήματα που αυτή επηρεάζει (Hotchkiss, 2016). Έξι τύποι οργανικής δυσλειτουργίας κυριαρχούν στη σήψη: η νευρολογική (αλλοιωμένη πνευματική κατάσταση), η πνευμονική (με υποξαιμία), η καρδιαγγειακή (σοκ), η νεφρική (ολιγοουρία ή / αυξημένη συγκέντρωση κρεατινίνης), η αιματολογική (μειωμένος αριθμός αιμοπεταλίων) και η ηπατική (υπερχολερυθριναιμία).



#### Εικόνα 4. Το τρέχον εννοιολογικό μοντέλο των αποτελεσμάτων της σήψης.

Πρωτοδιατυπώθηκε από τους Bone *et al.* τη δεκαετία του 1990, κι έχει εξελιχθεί ώστε να αντικατοπτρίζει τις ταυτόχρονες φλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές αντιδράσεις, καθώς επίσης και την παρατήρηση ότι λιγότεροι ασθενείς πεθαίνουν στην πρώιμη περίοδο λόγω της προηγούμενης αναγνώρισης και την καλύτερη εφαρμογή των κλινικών πρακτικών. Η επιτυχής ανάνηψη είναι συχνότερη, και οι ασθενείς αναρρώνουν επαρκώς, ώστε να εξέλθουν από τη ΜΕΘ και το νοσοκομείο (μπλε γραμμές). Μερικοί ασθενείς

εμφανίζουν έντονη πρόωρη φλεγμονώδη αντίδραση σε σήματα του παθογόνου ή σήματα κινδύνου, η οποία οδηγεί σε πολυοργανική ανεπάρκεια και θάνατο (κόκκινη γραμμή). Άλλοι ασθενείς επιβιώνουν μετά την πρώιμη φλεγμονώδη απόκριση, αλλά παρουσιάζουν χρόνια κρίσιμη ασθένεια (πράσινες γραμμές) που χαρακτηρίζεται από εμμένουσα φλεγμονή, ανοσοκαταστολή και σύνδρομο καταβολισμού (PICS), επανενεργοποίηση λανθανουσών ιογενών λοιμώξεων, νοσοκομειακών λοιμώξεων και μακροχρόνια λειτουργική και γνωστική έκπτωση. (Πηγή: Hotchkiss *et al.*, 2016)

## ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Όλες οι διαφορετικές μορφές σήψης συνδέονται με βακτηριαμία (ή μυκηταιμία) (Mancini, 2010). Αντίθετα, η βακτηριαμία και η μυκηταιμία δεν προκαλούν πάντα σήψη.

Η βακτηριαμία κατηγοριοποιείται σε παροδική, διαλείπουσα ή συνεχή. Η παροδική μορφή, η οποία διαρκεί λίγα λεπτά ή λίγες ώρες, συνδέεται με διεργασίες σε ανατομικές θέσεις οι οποίες έχουν αποικιστεί από φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα (π.χ. μετά από κολονοσκόπηση, διαδερμικό καθετηριασμό ή εξαγωγή δοντιών) ή τον έλεγχο εντοπισμένων θέσεων λοίμωξης (π.χ. δοθιήνες). Η διαλείπουσα βακτηριαμία συνδέεται με λοιμώξεις σε κλειστά σημεία, όπως είναι τα αποστήματα, ή εστιακές λοιμώξεις, όπως η πνευμονία και η οστεομυελίτιδα. Η συγκεκριμένη μορφή βακτηριαμίας ορίζεται ως ένα σύνολο επαναλαμβανόμενων επεισοδίων βακτηριαμίας από τον ίδιο μικροοργανισμό, ο οποίος ανιχνεύεται περιοδικά στο αίμα και επανεμφανίζεται στο αρχικό σημείο της λοίμωξης. Τέλος, η εμμένουσα βακτηριαμία χαμηλής έντασης σχετίζεται με μια ενδοαγγειακή εστία λοίμωξης, όπως η λοιμώδης ενδοκαρδίτιδα. Σε αυτήν την περίπτωση το μικροβιακό φορτίο μπορεί να είναι χαμηλό, ίσο με 1 CFU/ml, κάνοντας την διάγνωση δύσκολη.

Εάν η βακτηριαμία (ή η μυκηταιμία) δεν ελεγχθούν σωστά, οι προαναφερθείσες συνθήκες μπορεί να οδηγήσουν στην ανάπτυξη σήψης. Το σηπτικό σύνδρομο μπορεί να ποικίλει από το συστηματικό σύνδρομο φλεγμονώδους απόκρισης (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) μέχρι το σύνδρομο πολλαπλής οργανικής δυσλειτουργίας (multiple-organ-dysfunction syndrome, MODS). Τα διαφορετικά στάδια της σήψης είναι η σήψη, η σοβαρή σήψη και η σηπτική καταπληξία. Η σηψαιμία ταυτοποιείται κλινικά σε έναν ασθενή όταν αυτός παρουσιάζει τουλάχιστον δύο από τα κριτήρια του SIRS και υπάρχει ένδειξη συστηματικής λοίμωξης. Η σήψη θεωρείται σοβαρή όταν χαρακτηρίζεται από συστηματική υπόταση ή ιστική υποαιμάτωση και οργανική δυσλειτουργία. Η σηπτική καταπληξία αποτελεί επιπλοκή της σοβαρής σήψης

και ορίζεται ως υπόταση η οποία προκαλείται από τη σήψη και δεν ανταποκρίνεται στην επαρκή χορήγηση υγρών (Bone, 1992, Levy, 2003).

Οι πρόσφατα δημοσιευμένες οδηγίες για τη διαχείριση της σοβαρής σήψης και της σηπτικής καταπληξίας συστήνουν (Mancini, 2010): (α) την άμεση χορήγηση εμπειρικής αντιβιοτικής θεραπείας ευρέως φάσματος εντός μίας ώρας από την διάγνωση, β) τη λήψη αίματος για καλλιέργεια, αν είναι δυνατόν, πριν από την έναρξη της θεραπείας με αντιβιοτικά, (γ) την άμεση ανάνηψη του ασθενούς εντός των πρώτων έξι ωρών και (δ) τη διεξοδική κλινική και ακτινολογική αξιολόγηση του ασθενούς, προκειμένου να διερευνηθεί το αρχικό σημείο της λοίμωξης. Ωστόσο, υπάρχουν παράγοντες όπως η εμπειρική αντιβιοτική θεραπεία που ξεκινά πριν από τη λήψη του αίματος και είναι ανεπαρκής στο 25% των ασθενών με βακτηριαιμία (Retamar, 2012), καθώς και η παρουσία «απαιτητικών» παθογόνων, οι οποίοι μπορεί να έχουν αρνητική επίπτωση στη διαγνωστική απόδοση της αιμοκαλλιέργειας (5 - 50% ψευδώς θετικά και 50% ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα). Αυτοί οι τεχνικοί περιορισμοί δεν έχουν εξαλειφθεί μολονότι έχουν γίνει σημαντικές βελτιώσεις στην αιμοκαλλιέργεια και για το λόγο αυτό απαιτείται η χρήση άλλων προσεγγίσεων, συμπληρωματικών των αιμοκαλλιέργειών, προκειμένου να βελτιωθεί η συνολική διαγνωστική απόδοσή τους (Mancini, 2010).

## **Η ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΑΙΜΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ**

Η αιμοκαλλιέργεια αποτελεί την κύρια μέθοδο για την ταυτοποίηση της αιτιολογίας μίας λοίμωξης της αιματικής ροής, καθώς είναι μια εύκολη διαδικασία με υψηλή ευαισθησία (Opota, 2015). Το βασικό πλεονέκτημα της αιμοκαλλιέργειας είναι η δυνατότητα αξιολόγησης της αντιμικροβιακής ευαισθησίας των μικροοργανισμών που αυτή παρέχει- χαρακτηριστικό το οποίο δεν έχει επιτευχθεί από καμία άλλη διαθέσιμη τεχνική έως σήμερα (Mancini, 2010). Η δυνατότητα αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς μελέτες έχουν δείξει πως η ανεπαρκής αντιμικροβιακή θεραπεία αποτελεί έναν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου θνησιμότητας για ασθενείς με σοβαρές λοιμώξεις. Μια πρόσφατη μελέτη (Kumar, 2006) σε ασθενείς με σηπτική καταπληξία έδειξε ότι για κάθε ώρα καθυστέρησης στη χορήγηση αποτελεσματικής αντιμικροβιακής

θεραπείας μετά την έναρξη της υπότασης, η επιβίωση των ασθενών μειώνεται κατά 8%.

Έτσι, η αιμοκαλλιέργεια χαρακτηρίζεται ως το σημερινό "χρυσό πρότυπο" στην διάγνωση της σήψης (Mancini, 2010). Η ευαισθησία της αιμοκαλλιέργειας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον όγκο του δείγματος (Orota, 2015). Για τους ενήλικες, ένα δείγμα αίματος μπορεί να έχει όγκο μέχρι 20ml και χρησιμοποιείται για τον ενοφθαλμισμό δύο φιαλών (μίας αερόβιας και μίας αναερόβιας φιάλης). Πριν από την έναρξη την αντιμικροβιακής θεραπείας 2 έως 4 αιμοκαλλιέργειες, δηλ. 40 έως 80ml αίματος, απαιτούνται για την ανίχνευση του αιτιολογικού παράγοντα στο 80% με 96% των περιπτώσεων βακτηριαμίας (Orota, 2015). Προκειμένου να εξουδετερωθούν τα αντιβιοτικά που χορηγήθηκαν πριν από τη δειγματοληψία, άνθρακας ή ρητίνες εισάγονται στις φιάλες αιμοκαλλιέργειας. Λυτικοί παράγοντες που προστίθενται στον καλλιεργητικό ζωμό ενισχύουν την ανάκτηση και την ανάπτυξη οργανισμών που έχουν ενδοκυτταρωθεί από μακροφάγα. Ο τυπικός χρόνος επώασης είναι 5 ημέρες, και είναι επαρκής για την ανάκτηση της πλειοψηφίας των οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων και των απαιτητικών βακτηρίων, όπως *Haemophilus*, *Aggregatibacter*, *Cardiobacterium*, *Eikenella* και *Kingella* και *Brucella* spp.. Ο χρόνος επώασης είναι αυξημένος για τους βραδέως αναπτυσσόμενους οργανισμούς, όπως οι μύκητες και τα *Mycobacteria* spp. (Orota, 2015).

Αν η αιμοκαλλιέργεια είναι θετική, το επόμενο βήμα είναι η χρώση κατά Gram σε ένα δείγμα της αιμοκαλλιέργειας. Η ανάλυση αυτή είναι απαραίτητη, καθώς με τον τρόπο αυτό επιβεβαιώνεται η παρουσία βακτηρίων/μυκήτων στην φιάλη του αίματος. Στην περίπτωση παρουσίας μικροβίων, ο μορφότυπος παρέχει ένα πρώτο στοιχείο για την αιτιολογία της λοίμωξης (Orota, 2015). Η ταυτοποίηση του μικροβίου μπορεί να επιτευχθεί στην συνέχεια χρησιμοποιώντας μία ποικιλία μεθόδων, οι οποίες είτε ξεκινούν μετά από ανακαλλιέργεια, είτε χρησιμοποιούν τη θετική αιμοκαλλιέργεια και μεθόδους που βασίζονται στο νουκλεϊνικό οξύ, όπως ο υβριδισμός και οι μικροσυστοιχίες, είτε απαιτούν βακτηριακό εμπλουτισμό και ένα βήμα καθαρισμού προκειμένου να αποκτηθεί βακτηριακό ίζημα, κατάλληλο να χρησιμοποιηθεί σε μία ποικιλία μεθόδων,

συμπεριλαμβανομένης της φασματομετρίας μάζας υποβοηθούμενης από υλικό μήτρας ιονισμού εκρόφησης με τη χρήση λέιζερ (MALDI-TOF MS) (Opota, 2015).

### **Οι περιορισμοί ενός χρυσού προτύπου: παράγοντες που επηρεάζουν την ευαισθησία της αιμοκαλλιέργειας**

Η αιμοκαλλιέργεια σήμερα γίνεται με συστήματα καλλιέργειας συνεχούς παρακολούθησης, με τη χρήση πλήρως αυτοματοποιημένων οργάνων, τα οποία επωάζουν τα δείγματα του αίματος. Τα όργανα αυτά ανιχνεύουν επίσης την μικροβιακή ανάπτυξη αναλύοντας την απελευθέρωση του CO<sub>2</sub> με τη βοήθεια φθορίζοντων (Bactec 9240, Becton Dickinson) ή χρωματομετρικών αισθητήρων (BacT/Alert, bioMerieux, Γαλλία), ή εναλλακτικά, μετρώντας τις μεταβολές πίεσης που οφείλονται στην κατανάλωση και την παραγωγή αερίων (VersaTREK, TREK Diagnostic Systems). Η πρόσφατη βελτιστοποίηση των μέσων καλλιέργειας και της αυτοματοποιημένης ανίχνευσης της μικροβιακής ανάπτυξης έχει βελτιώσει σημαντικά τις διαγνωστικές επιδόσεις αυτής της τεχνικής. Ωστόσο, υπάρχουν ακόμα κάποιοι παράγοντες, οι οποίοι μειώνουν τη συνολική ευαισθησία της αιμοκαλλιέργειας (Mancini, 2010).

#### **- Ο όγκος του αίματος**

Όπως προαναφέρθηκε, ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν τη διαγνωστική απόδοση της αιμοκαλλιέργειας είναι ο όγκος του αίματος. Αρκετές μελέτες σε ενήλικες και παιδιά έχουν δείξει ότι ο ρυθμός απομόνωσης των παθογόνων από τις αιμοκαλλιέργειες είναι ανάλογος της ποσότητας του αίματος που χρησιμοποιείται. Το στοιχείο αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τους παιδιατρικούς ασθενείς, από τους οποίους δεν είναι πάντα εφικτό να αποκτηθεί επαρκής όγκος αίματος.

#### **- Ο χρόνος που μεσολαβεί από τη δειγματοληψία έως την επώαση**

Ένας ακόμα σημαντικός παράγοντας, ο οποίος επηρεάζει το διαγνωστικό αποτέλεσμα της αιμοκαλλιέργειας, είναι ο χρόνος που μεσολαβεί από τη λήψη του αίματος έως την τοποθέτησή του στις φιάλες του ειδικού οργάνου, όπου

γίνεται η αιμοκαλλιέργεια (Sautter, 2006, Schwetz, 2007, Vigano, 2002). Ιδανικά, η αιμοκαλλιέργεια θα πρέπει να ξεκινά αμέσως μετά την αιμοληψία προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί ο χρόνος που θα μεσολαβήσει μέχρι την ανίχνευση και να μειωθεί ο αριθμός των ψευδώς αρνητικών δειγμάτων.

Ακόμα, μία εμφανής μείωση στην διαγνωστική ικανότητα της μεθόδου παρατηρήθηκε όταν οι φιάλες παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για περισσότερες από 12 ώρες και ακόμα μεγαλύτερη όταν αυτές προεπωάστηκαν στους 37°C πριν από την τοποθέτησή τους στο αυτόματο όργανο.

#### - Τα απαιτητικά παθογόνα και η αντιμικροβιακή θεραπεία

Ένας εγγενής περιορισμός της αιμοκαλλιέργειας είναι η χαμηλή ευαισθησία της σε «απαιτητικούς» μικροοργανισμούς, οι οποίοι αναπτύσσονται αργά όπως είναι οι *Bartonella* spp., *Francisella tularensis*, *Mycoplasma* spp., *Nocardia* spp., αλλά και διάφοροι μύκητες. Ακόμα, τα παθογόνα που εμφανίζουν ανομοιόμορφη ανάπτυξη στα κλασσικά συστήματα βακτηριακής καλλιέργειας, όπως *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii*, *Chlamydothila pneumoniae* και *Tropheryma whipplei* διαγνώσκονται καλύτερα με ανοσοδιαγνωστικές ή μοριακές τεχνικές. Η ύπαρξη πολλαπλών παραγόντων που επηρεάζουν την διαδικασία της αιμοκαλλιέργειας, όπως είναι η προγενέστερη αντιμικροβιακή θεραπεία, η μη βέλτιστη συλλογή δειγμάτων, ή η εσφαλμένη προαναλυτική επεξεργασία, μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.

#### - χρόνος ανάλυσης ως την τελική ταυτοποίηση

Όταν δοθεί ένα θετικό σήμα από το αυτοματοποιημένο όργανο (συνήθως μετά από 24 -48 ώρες επώασης), πραγματοποιείται μια χρώση κατά Gram (μαζί με μια προκαταρκτική αξιολόγηση της αντιμικροβιακής ευαισθησίας με αντιβιογράμμα κατά Kirby-Bauer απευθείας στη φιάλη της αιμοκαλλιέργειας. Στη συνέχεια γίνεται ταυτοποίηση του παθογόνου με βιοχημικές δοκιμασίες. Οι ταχείες φαινοτυπικές δοκιμασίες επιτρέπουν την ταυτοποίηση ενός μεγάλου ποσοστού παθογόνων που απομονώνονται από τις αιμοκαλλιέργειες (συνήθως εντός 18 -24 ωρών). Ωστόσο, συνήθως απαιτείται περισσότερος χρόνος για την τελική ταυτοποίηση και την εκτίμηση της αντιμικροβιακής ευαισθησίας του



απομονωθέντος μικροοργανισμού, ιδιαίτερα όταν στην αιμοκαλλιέργεια βρίσκονται παθογόνα που αναπτύσσονται αργά, όπως ζύμες ή αναερόβιοι μικροοργανισμοί.

## ΟΙ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι στη σημερινή, σύγχρονη εποχή της μοριακής τεχνολογίας, καμία μοριακή μέθοδος δεν έχει αντικαταστήσει την αιμοκαλλιέργεια ή δεν χρησιμοποιείται ευρέως συμπληρωματικά αυτής στα κλινικά εργαστήρια (Miller, 2009). Οι μοριακές μέθοδοι έχουν τη δυνατότητα να ξεπερνούν πολλούς περιορισμούς της αιμοκαλλιέργειας (Πίνακας). Η ιδανική μοριακή μέθοδος θα είναι ικανή αναλύοντας το αίμα του ασθενούς να κατευθύνει άμεσα στη βέλτιστη αντιμικροβιακή θεραπεία, ενώ στη συνέχεια θα παρέχει δεδομένα για την αξιολόγηση της θεραπείας, μετρώντας την κάθαρση του μικροβιακού νουκλεϊκού οξέως στο αίμα του ασθενούς με την πάροδο του χρόνου.

Need	Current status		Future opportunity
	<i>Culture</i>	<i>Molecular methods</i>	<i>Molecular methods</i>
Identify all bacterial and fungal pathogens	Identifies only culturable organisms	Varies with method from 25 frequently cultured organisms to panbacterial; limited or no fungal [4,36,37]	Panbacterial and panfungal identification
High sensitivity: bloodstream infections can be caused by less than 10 CFU/ml in adults [8–10]	Blood cultures are negative in >50% of clinically sepsis cases [3]	Mixed results. Blood culture is more sensitive in some cases, but molecular methods identify organisms missed by culture; reported sensitivities as low as 3 CFU/ml [36,37]	Sensitivity similar to culture but with panbacterial and panfungal identification
Rapid identification; mortality increases hourly in the absence of appropriate antimicrobial therapy [2]	Requires 1–5 days	Requires 1 day [40]	<1 h
Antimicrobial resistance determination	Requires 1 additional day after obtaining culture isolate	A few major resistance determinants measured [12,19,20,22,25,30]	Significant opportunity with future understanding of molecular mechanisms
Quantitative assessment of pathogen load; load correlates with disease severity [7,11]	Quantitative culture methods too difficult for routine practice	Not quantitative	Quantitative results
Low labor requirements, automated	Labor intensive	Labor intensive	Fully automated

CFU: Colony-forming unit.

**Πίνακας. Οι υπάρχουσες ανάγκες και η τρέχουσα κατάσταση των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση λοιμώξεων αιματικής ροής.**

## **Διαγνωστικές μέθοδοι βασισμένες στην ανίχνευση νουκλεϊνικού οξέως που εφαρμόζονται στη σήψη**

Η χρήση των μοριακών διαγνωστικών μεθόδων που βασίζονται στην ανίχνευση νουκλεϊνικού οξέως είναι περιορισμένη στη Μικροβιολογία, εξ' αιτίας των διαθέσιμων μεθόδων καλλιέργειας, οι οποίες είναι λιγότερο δαπανηρές, λιγότερο σύνθετες και συχνά περισσότερο ευαίσθητες (Mancini, 2010). Αν και αυτό ισχύει και στην περίπτωση της σήψης, κάποιες διαγνωστικές προσεγγίσεις που βασίζονται στην ανίχνευση νουκλεϊνικού οξέως έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία και κάποιες από αυτές είναι διαθέσιμες στο εμπόριο. Τα πλεονεκτήματα αυτών των μοριακών διαγνωστικών μεθόδων είναι η ταχύτητα στη διάγνωση, ο άμεσος αντίκτυπος στη θεραπεία των ασθενών, καθώς επίσης και η μείωση του κόστους της θεραπείας.

### **Οι διαφορετικές στρατηγικές και τα διαφορετικά αποτελέσματα**

Οι μέθοδοι που βασίζονται στην ανίχνευση νουκλεϊνικού οξέως και χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση της σήψης ανήκουν σε δύο κατηγορίες: α) αυτές που ανιχνεύουν και ταυτοποιούν παθογόνα σε φιάλες αιμοκαλλιέργειας που έχουν δώσει θετικό σήμα και β) αυτές που ανιχνεύουν και ταυτοποιούν μικροοργανισμούς απευθείας σε κλινικά δείγματα αίματος, ορού ή πλάσματος (Mancini, 2010).

Τρεις τύποι μεθόδων έχουν περιγραφεί: οι μέθοδοι οι οποίες στοχεύουν γονίδια παθογόνων χαρακτηριστικά του είδους ή του γένους τους, οι μέθοδοι που στοχεύουν συντηρημένες αλληλουχίες του βακτηριακού ή του μυκητιακού γενόματος, όπως είναι τα βακτηριακά γονίδια rRNA 16S, 5S, και 23S ή τα μυκητιακά ριβοσωμικά DNAs 18S, 5.8S, και 28S, και τέλος, πολλές άλλες μέθοδοι που επιτρέπουν την παράλληλη ανίχνευση στόχων χαρακτηριστικών του είδους ή του γένους των διαφορετικών παθογόνων που εμπλέκονται σε μία λοίμωξη (Mancini, 2010).

Ανεξάρτητα από την μέθοδο που θα χρησιμοποιηθεί, οι κλασικές τεχνικές PCR (συμπεριλαμβανομένης της nested PCR) θα πρέπει να αποφεύγονται καθώς είναι επιρρεπείς στη μεταφορά επιμολύνσεων μαζί με τα πολλαπλασιασμένα προϊόντα (Khlif, 2009). Οι τεχνικές πραγματικού χρόνου PCR, οι οποίες

βασίζονται στην αυτοματοποιημένη ανίχνευση του φθορισμού των αμπλικονίων (real-time PCR), είναι συνήθως πιο αποτελεσματικές, πιο εύκολες και λιγότερο επιρρεπείς σε επιμολύνσεις συγκριτικά με τις συμβατικές τεχνικές PCR. Οι τεχνικές αυτές επιτρέπουν επίσης την απόλυτη ή σχετική ποσοτικοποίηση της αλληλουχίας-στόχου και το διαχωρισμό πιθανών επιμολύνσεων (Hall, 2006, Lehmann, 2008).

Ωστόσο, οι real-time PCRs είναι ακριβότερες από τις συμβατικές PCRs, ενώ μερικές από τις πλατφόρμες που είναι διαθέσιμες στο εμπόριο ανιχνεύουν περιορισμένο αριθμό γονιδίων κι έχουν ανεπαρκή απόδοση. Επιπλέον, η αυξανόμενη ανάγκη για πλήρη αυτοματοποίηση απαιτεί τον συνδυασμό των μηχανημάτων real-time PCR με αυτοματοποιημένα συστήματα για την απομόνωση του νουκλεϊνικού οξέως, οδηγώντας σε μία ροή εργασίας υψηλής απόδοσης, αλλά και σε περαιτέρω αύξηση του κόστους. Δεδομένου ότι οι αλλαγές αυτές δεν είναι εύκολο να γίνουν σε όλα τα κλινικά εργαστήρια, ίσως οδηγηθούμε στην δημιουργία κάποιων νεότερων και μεγαλύτερων κεντρικών εργαστηρίων, με καλά εξειδικευμένο προσωπικό.

### **Η απομόνωση νουκλεϊνικού οξέως από αιμοκαλλιέργειες ή κλινικά δείγματα**

Ανεξάρτητα από τον τύπο της μεθόδου που χρησιμοποιείται για την διάγνωση της σήψης, ένα από τα πιο σημαντικά βήματα, το οποίο επηρεάζει σημαντικά την ευαισθησία της μεθόδου, είναι η απομόνωση του μικροβιακού νουκλεϊνικού οξέως από το αίμα (Mancini, 2010). Η ακριβής απομόνωση DNA από το κλινικό δείγμα αποτελεί τη βασική προϋπόθεση, ώστε στη συνέχεια να ακολουθήσει οποιαδήποτε μέθοδος βασισμένη στο νουκλεϊνικό οξύ. Η ιδανική μέθοδος θα πρέπει να είναι ευαίσθητη, αναπαραγωγίμη, οικονομικά συμφέρουσα, πλήρως αυτοματοποιημένη και αποδοτική στην απομόνωση βακτηριακού και μυκητιακού DNA. Τέσσερα κύρια μειονεκτήματα μπορούν να παρεμποδίσουν τη διαγνωστική απόδοση οποιασδήποτε μοριακής μεθόδου στη διάγνωση της σήψης και θα πρέπει να ξεπεραστούν από τη μέθοδο απομόνωσης: (1) η παρουσία αναστολέων της PCR στα κλινικά δείγματα αίματος, (2) η πιθανή παρουσία επιμολύνσεων από βακτηριακό ή μυκητιακό DNA των

αντιδραστηρίων, (3) ο κίνδυνος μεταφοράς επιμολύνσεων μεταξύ των δειγμάτων της ίδιας απομόνωσης, και τέλος, (4) η αλληλεπίδραση υψηλών επιπέδων ανθρώπινου DNA με την απομόνωση και την ενίσχυση του σπανιότερου βακτηριακού ή μυκητιακού DNA (Handschr, 2009).

Πρόσφατες μελέτες συνέκριναν κλασσικές μεθόδους απομόνωσης DNA, συμπεριλαμβανομένης της μεθόδου με φαινόλη-χλωροφόρμιο, με εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια. Πολλά από αυτά βασίζονται στην τεχνολογία περιστροφής στήλης, η οποία μπορεί εύκολα να χρησιμοποιηθεί σε ένα κλινικό εργαστήριο ρουτίνας που διαθέτει βασικό εξοπλισμό. Χρησιμοποιώντας αυτά τα κιτ, το νουκλεϊνικό οξύ απελευθερώνεται από τα κύτταρα χρησιμοποιώντας χαοτροπικά άλατα που μετουσιώνουν τις πρωτεΐνες. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η διαδικασία εκχύλισης αυξάνεται από την πέψη με πρωτεϊνάσες (Mancini, 2010).

Ο διαχωρισμός του νουκλεϊνικού οξέως γίνεται στη συνέχεια με προσωρινή προσρόφηση πάνω σε επιφάνεια γυάλινων ινών ή μεμβράνη πυριτικής πηκτής μέσα σε ένα πλαστική στήλη μίας χρήσης. Στη συνέχεια πλύσεις με ρυθμιστικά διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης άλατος αφαιρούν τις μετουσιωμένες πρωτεΐνες και τις ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους. Το δεσμευμένο DNA έπειτα καθαρίζεται με έκλυση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης άλατος (Read, 2001).

#### **- Εκχύλιση νουκλεϊνικού οξέος από φιάλες αιμοκαλλιέργειας**

Ένα κοινό πρόβλημα κατά την εκχύλιση νουκλεϊνικών οξέων από φιάλες αιμοκαλλιέργειας είναι η παρουσία αναστολέων PCR, όπως ο αντιπηκτικός και αντισυμπληρωματικός παράγοντας πολυαιθλοσουλφονικό νάτριο (SPS). Οι Millar *et al.* (2000) μελέτησαν αρκετές μεθόδους εκχύλισης, εμπορικές και in-house, για την απομόνωση βακτηριακού και μυκητιακού DNA από φιάλες αιμοκαλλιέργειας BacT/Alert. Οι περισσότερες από τις μεθόδους είχαν καλή απόδοση ανακτηθέντος DNA, ενώ τα εμπορικά αντιδραστήρια έδωσαν την μεγαλύτερη ποσότητα (Mancini, 2010).

#### **- Εκχύλιση νουκλεϊνικού οξέος από ολικό αίμα, ορό ή πλάσμα**

Μια εναλλακτική λύση για την απομόνωση DNA είναι η εκχύλιση απευθείας από κλινικά δείγματα ολικού αίματος ή, εναλλακτικά, από δείγματα πλάσματος και

ορού. Η εκχύλιση από δείγματα ολικού αίματος με EDTA παρέχει μεγαλύτερο αριθμό πιθανών βακτηρίων-στόχων από τις μεθόδους εκείνες που χρησιμοποιούν ορό και πλάσμα, βελτιώνοντας δυνητικά τη συνολική ευαισθησία. Ωστόσο, η παρουσία αναστολέων της PCR στο ολικό αίμα μπορεί να καταστήσει αυτή την μέθοδο λιγότερο ευαίσθητη. Για παράδειγμα, οι Zerva *et al.* (2001) ανέφεραν μεγαλύτερη ευαισθησία των δειγμάτων ορού για τη διάγνωση της ανθρώπινης βρουκέλλωσης με PCR, παρά το γεγονός ότι μέλη του γένους *Brucella* είναι προαιρετικά ενδοκυτταρικά παθογόνα. Πιο πρόσφατα, πραγματοποιήθηκε μια παρόμοια μελέτη για να συγκριθούν επτά εμπορικά αντιδραστήρια εκχύλισης DNA για την ανάκτηση του DNA της *Brucella melitensis* απευθείας από δείγματα ορού, η οποία έδειξε ότι αυτά που περιέχουν ένα στάδιο πέψης με πρωτεΐνάση K είχαν τη μεγαλύτερη ευαισθησία (Queiro-Ortuno, 2008). Επίσης έχουν περιγραφεί διάφορα ποσοστά διασταυρούμενης επιμόλυνσης μεταξύ δειγμάτων για τα διαφορετικά αντιδραστήρια, δείχνοντας ότι αυτή η πτυχή πρέπει επίσης να ληφθεί υπόψη όταν επιλέγεται ένα πρωτόκολλο απομόνωσης για μια διαδικασία ρουτίνας υψηλής απόδοσης. Επίσης έχουν αναπτυχθεί αρκετά αυτοματοποιημένα συστήματα για την άμεση εκχύλιση βακτηριακού και μυκητιακού DNA από δείγματα ολικού αίματος, αλλά το υψηλό κόστος τους περιορίζει τη χρήση τους στα κλινικά εργαστήρια ρουτίνας (Mancini, 2010).

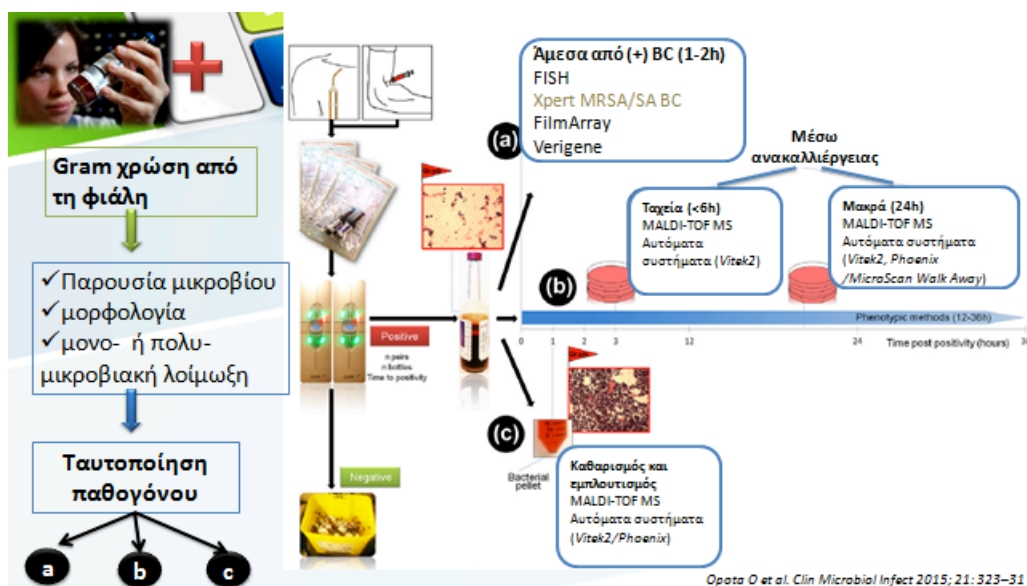
#### **- Απομόνωση νουκλεϊνικού οξέως μυκήτων από κλινικά δείγματα**

Η απομόνωση του DNA από μύκητες, όπως οι ζυμομύκητες και οι υφομύκητες, είναι ιδιαίτερα δύσκολη. Ένας σημαντικός αριθμός μεθόδων PCR έχει αναπτυχθεί για την ανίχνευση DNA μυκήτων σε δείγματα ολικού αίματος ή ορού. Η χαμηλή ευαισθησία πολλών μεθόδων βασισμένων στην ανίχνευση νουκλεϊνικών οξέων για την ανίχνευση του DNA μυκήτων φαίνεται να οφείλεται στη δυσκολία ρήξης του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων, καθώς και στα πολύ χαμηλά φορτία των μυκητικών κυττάρων που μπορεί να υπάρχουν στο αίμα κατά τη διάρκεια της μυκηταιμίας (σε ορισμένες περιπτώσεις, ακόμη και λιγότερο από 1 κύτταρο ανά ml). Πράγματι, διαφορετικά πρωτόκολλα απομόνωσης DNA μυκήτων από κλινικά δείγματα έχουν μεγάλες διαφορές στη συνολική ευαισθησία της μεθόδου (Bretagne 2005, White, 2003).

## (I) ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΑΠΟ ΑΙΜΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Έχουν περιγραφεί αρκετές μέθοδοι για την ανίχνευση βακτηριακού ή μυκητιακού DNA από αιμοκαλλιέργειες (Mancini, 2010). Αυτές έχουν εφαρμοστεί κυρίως σε θετικές αιμοκαλλιέργειες προκειμένου να επιτευχθεί ταχύτερη ταυτοποίηση των παθογόνων. Έχουν επίσης περιγραφεί μοριακές στρατηγικές για την ανίχνευση απαιτητικών παθογόνων σε αρνητικές καλλιέργειες αίματος. Το πραγματικό διαγνωστικό δυναμικό αυτών των προσεγγίσεων είναι ωστόσο περιορισμένο, καθώς δεν μπορούν να ξεπεράσουν τεχνικά προβλήματα και προβλήματα ευαισθησίας που παρατηρούνται μερικές φορές στην αιμοκαλλιέργεια. Επιπλέον, η κλινική χρησιμότητά τους περιορίζεται περαιτέρω από το γεγονός ότι η μοριακή αναγνώριση μπορεί να προηγηθεί των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από τις μεθόδους αιμοκαλλιέργειας μόνο μερικές ώρες. Ο ρόλος αυτής της ταχύτερης προσέγγισης αναγνώρισης είναι χρήσιμη όταν η ανακαλλιέργεια απαιτεί χρόνο, όπως στην περίπτωση των μυκήτων (Mancini, 2010).

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση παθογόνων παραγόντων σε αιμοκαλλιέργειες ανήκουν σε 3 κατηγορίες: 1) μέθοδοι που βασίζονται σε ενισχυμένο νουκλεϊνικό οξύ, 2) μέθοδοι που βασίζονται σε μη ενισχυμένο νουκλεϊνικό οξύ και 3) μέθοδοι που δεν βασίζονται στο νουκλεϊνικό οξύ.



**Εικόνα 5. Μέθοδοι για την ανίχνευση μικροοργανισμών σε θετικές αιμοκαλλιέργειες.** Όταν μια αιμοκαλλιέργεια χαρακτηρίζεται ως θετική, το πρώτο βήμα είναι η χρώση κατά Gram σε δείγμα από τη φιάλη αιμοκαλλιέργειας, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παρουσία των μικροβίων και να προσδιοριστεί ο μορφότυπος. Η χρώση κατά Gram επιτρέπει την αποκάλυψη της παρουσίας πολυμικροβιακών μικροβιαμιών. Στη συνέχεια η ταυτοποίηση των παθογόνων μπορεί να επιτευχθεί: (α) άμεσα από τη θετική αιμοκαλλιέργεια χρησιμοποιώντας μεθόδους με βάση το νουκλεϊνικό οξύ, (β) με ανακαλλιέργεια και χρησιμοποίηση φαινοτυπικών μεθόδων ή μέσω βραχέων ανακαλλιεργειών, κατάλληλες για ανάλυση φασματομετρίας μάζας (MALDI-TOF MS) και ορισμένες δοκιμές αντιμικροβιακής ευαισθησίας και (γ) χρησιμοποιώντας μικροβιακό ίζημα, κατάλληλο για MALDI-TOF ανάλυση και κάποιες δοκιμές αντιμικροβιακής ευαισθησίας. (Πηγή: Mancini *et al.*, 2010)

### **Μέθοδοι που βασίζονται σε ενισχυμένο νουκλεϊνικό οξύ**

#### **- Εξειδικευμένες μέθοδοι για παθογόνους παράγοντες**

Ο ρόλος αυτών των μεθόδων είναι περιορισμένος εξ' αιτίας της μεγάλης ποικιλίας παθογόνων που μπορεί να ευθύνονται για την σήψη (Thomas, 2007). Μερική χρησιμότητα μπορεί να υπάρχει για τις μεθόδους εκείνες με ειδικότητα στην ανίχνευση γονιδίων που προσδίδουν αντοχή στα σημαντικότερα αντιβιοτικά, όπως το *mecA* στους σταφυλόκοκκους ή τα γονίδια *van* στους εντερόκοκκους, επιτρέποντας έτσι έναν βραχύτερο κατά 12 έως 16 ώρες χρόνο διεκπεραίωσης από την κλασική φαινοτυπική ανίχνευση της αντοχής (Mancini, 2010).

#### **- Μέθοδοι ευρέως φάσματος (broad-range)**

Η κλινική χρησιμότητα των μεθόδων ευρέως φάσματος σε θετικές αιμοκαλλιέργειες είναι επίσης περιορισμένη (Mancini, 2010). Το κύριο μειονέκτημα των μεθόδων αυτών είναι ότι μετά την ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου, απαιτούνται περαιτέρω μέθοδοι ταυτοποίησης. Διάφορες στρατηγικές αναγνώρισης έχουν συνδεθεί με τις μεθόδους ευρέως φάσματος, όπως είναι η αλληλούχιση (sequencing) (Jordan, 2009, Qian, 2001), η ανάλυση πολυμορφισμού (SSCP) (Turenne, 2000) ή η επακόλουθη ειδική real-time PCR για το γένος ή το είδος. Η συγκεκριμένη προσέγγιση θα μπορούσε να είναι πιο χρήσιμη για τις αιμοκαλλιέργειες που παραμένουν αρνητικές παρά την έντονη υποψία βακτηριαμίας ή μυκηταιμίας, όπως στην περίπτωση της λοιμώδους

ενδοκαρδίτιδας. Ο κίνδυνος ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων εξ' αιτίας βακτηριακού ή μυκητικού DNA που υπάρχει στο περιβάλλον ή τις φιάλες καλλιέργειας αίματος θα πρέπει πάντοτε να λαμβάνεται υπόψη όταν χρησιμοποιούνται αυτές οι μέθοδοι (Muhl, 2008).

#### - Πολυπλεκτικές (multiplex) μέθοδοι

Μία συμβιβαστική λύση θα μπορούσε να δοθεί από τις πολυπλεκτικές μεθόδους, οι οποίες στοχεύουν διαφορετικά γονίδια των παθογόνων εκείνων που απομονώνονται συχνότερα κατά τις λοιμώξεις του κυκλοφορικού συστήματος. Τέτοια παραδείγματα είναι η multiplex PCR με επακόλουθη ανάλυση των προϊόντων πολλαπλασιασμού με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης (Louie, 2002), ο υβριδισμός σε πλάκα ενζυμικής ανοσοπροσοροφητικής δοκιμασίας (ELISA) (Wellinghausen, 2004) ή η πολυπλεκτική real-time PCR (Wellinghausen, 2004).

#### **Μέθοδοι που βασίζονται σε μη ενισχυμένο νουκλεϊνικό οξύ**

Για τις θετικές αιμοκαλλιέργειες έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλες μοριακές μέθοδοι που δεν βασίζονται στην ενίσχυση του στόχου. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι ο *in situ* υβριδισμός (FISH) με ανιχνευτές-ολιγονουκλεοτίδια που στοχεύουν βακτηριακά ή μυκητικά γονίδια ριβοσωμιακού RNA (γονίδια rRNA), τα οποία βρίσκονται σε πολλαπλά αντίγραφα. Μία εξέλιξη στους κλασσικούς ανιχνευτές-ολιγονουκλεοτίδια είναι οι πεπτιδονουκλεϊνικοί ανιχνευτές (PNA), οι οποίοι είναι συνθετικά ολιγομερή που μιμούνται τη δομή του DNA ή του RNA. Σε αυτούς τους ανιχνευτές η αρνητικά φορτισμένη (δεοξυ)ριβο-φωσφονουκλεϊκή «ραχοκοκαλιά» αντικαθίσταται από ένα μη-φορτισμένο «ικρίωμα" N-(2-αμινοαιθυλ)-γλυκίνης στο οποίο εφάπτονται οι νουκλεοτιδικές βάσεις μέσω ενός συνδέτη μεθυλεν-καρβονυλίου. Λόγω του αρνητικού τους φορτίου, οι PNA ανιχνευτές συνδέονται ισχυρότερα από τους DNA ανιχνευτές. Ως συμβατικοί ανιχνευτές FISH, σχεδιάζονται συνήθως για να στοχεύουν φυσικά γονίδια rRNA πολλαπλών αντιγράφων, επιτρέποντας έτσι την ανίχνευση μικροοργανισμών, χωρίς κάποιο στάδιο ενίσχυσης. Τέλος, οι ανιχνευτές PNA-FISH είναι λιγότερο επιρρεπείς στην αναστολή από προσμείξεις σε διαφορετικά κλινικά δείγματα, οι



οποίες ενισχύονται από τις μεθόδους που βασίζονται στην ενίσχυση νουκλεϊνικού οξέως (Brown, 2007, Forrest, 2008, Kirketerp-Moller, 2008).

### **Μέθοδοι που δεν βασίζονται στο νουκλεϊνικό οξύ**

Οι μέθοδοι που δεν βασίζονται στο νουκλεϊνικό οξύ και χρησιμοποιούνται για την άμεση ταυτοποίηση μικροοργανισμών που αναπτύσσονται στην αιμοκαλλιέργεια είναι συμβατικές ανοσολογικές και βιοχημικές μέθοδοι ταυτοποίησης, οι οποίες λαμβάνουν χώρα απευθείας στην φιάλη της θετικής αιμοκαλλιέργειας (Charpin, 2003, Davis, 1992, Funke, 2004, Rappaport, 1988). Ωστόσο, αμφότερες οι αντιγονικές και βιοχημικές παραλλαγές, καθώς και η παρουσία περισσότερων του ενός μικροβιακού είδους, όπως στις πολυμικροβιακές λοιμώξεις, μπορεί να οδηγήσουν στην εσφαλμένη ερμηνεία των αποτελεσμάτων, κάνοντας απαραίτητη την απομόνωση του (των) παθογόνου (ων) από τον ζωμό της αιμοκαλλιέργειας (Mancini, 2010). Μεταξύ των φαινοτυπικών μεθόδων, αναπτύσσονται νέες μέθοδοι ανίχνευσης παθογόνων με τη βοήθεια βακτηριοφάγων, οι οποίες στοχεύουν να βελτιώσουν την απόδοση, την ευαισθησία και την ταχύτητα των κλασικής δοκιμασίας πλακών λυτικού φάγου. Οι νέες αυτές μέθοδοι περιλαμβάνουν την άμεση οπτικοποίηση φάγων με διαφορετική σήμανση, φάγων αναφοράς που φέρουν γενετικά ανιχνεύσιμα σήματα μέσα στους βακτηριακούς ξενιστές τους και την ανίχνευση απογονικών φάγων (progeny phages) ή άλλων μοναδικών στοιχείων που απελευθερώνουν τα μολυσμένα κύτταρα-ξενιστές.

Όσον αφορά στη σήψη, μια μέθοδος η οποία βασίζεται σε φάγο (MicroPhage MRSA/MSSA δοκιμασία αιμοκαλλιέργειας- Longmont) βρίσκεται σήμερα σε κλινικές δοκιμές στις Ηνωμένες Πολιτείες (Mancini, 2010). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση του *Staphylococcus aureus* και την ανίχνευση της αντοχής του στη μεθικιλίνη απευθείας σε θετικές αιμοκαλλιέργειες. Κατά τη διαδικασία αυτή ανιχνεύεται η ενίσχυση ειδικών φάγων σχετικών με τον *S. aureus* παρουσία μεθικιλίνης μέσα σε διάστημα 5 ωρών. Ακόμα δεν υπάρχουν δημοσιεύσεις, οι οποίες αξιολογούν τα τεχνικά χαρακτηριστικά και τη γενική χρησιμότητα αυτής της μεθόδου (Mancini, 2010).

Ακόμα, διερευνάται η χρησιμότητα και άλλων μεθόδων που δεν βασίζονται στο νουκλεϊνικό οξύ για την ταυτοποίηση μικροβιακών παθογόνων απευθείας σε αιμοκαλλιέργειες. Οι περισσότερο ελπιδοφόρες τεχνικές είναι οι μέθοδοι πρωτεομικής, συμπεριλαμβανομένης της φασματομετρίας μάζας MALDI-TOF (MALDI-TOF MS) (Marvin, 2003). Η τεχνική αυτή έχει τη δυνατότητα να εντοπίζει βακτήρια ή μύκητες προσδιορίζοντας το πρωτεϊνικό προφίλ τους. Επιπλέον, έχει χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση βακτηριακών λοιμογόνων παραγόντων ή δεικτών αντοχής σε αντιβιοτικά. Το κύριο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι το γεγονός ότι επιτρέπει την αναγνώριση ή τυποποίηση των απομονωμένων μικροοργανισμών μέσα σε λίγα μόνο λεπτά (περίπου 30-45 λεπτά) (Banerjee, 2016) χωρίς τη χρήση αναλωσίμων. Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι δεν είναι τόσο γρήγορη όσο ο συμβατικός άμεσος έλεγχος αποικιών λόγω των απαιτούμενων σταδίων επεξεργασίας, καθώς επίσης ότι δεν παρέχει δεδομένα αντιμικροβιακής ευαισθησίας (Banerjee, 2016).

Οι τεχνικές φασματομετρίας μάζας καθίστανται επίσης σημαντικές μέθοδοι στην ανάλυση του DNA και μπορούν να χρησιμοποιηθούν συμπληρωματικά με τις μεθόδους εκείνες που βασίζονται στην ενίσχυση νουκλεϊνικού οξέως για την ταχύτερη αλληλούχιση των αμπλικονίων. Ένα παράδειγμα αυτών των υβριδικών τεχνικών είναι η PCR φασματομετρία μάζας (Null, 2001, von Wintzingerode, 2002). Η στρατηγική αυτή βασίζεται στην ενίσχυση με PCR και την μετέπειτα ανάλυση της σύνθεσης των βάσεων του ενισχυμένου προϊόντος χρησιμοποιώντας MALDI-MS ή την υψηλής απόδοσης μέθοδο φασματομετρίας μάζας ιονισμού με ηλεκτρο-ψεκασμό (ESI-MS). Αυτή η προσέγγιση συνδυάζει την ευαισθησία της PCR με την ταχύτητα των τεχνικών φασματομετρίας μάζας, επιτρέποντας διάγνωση υψηλής απόδοσης απευθείας από τα κλινικά δείγματα, συμπεριλαμβανομένου του αίματος.

Το σύστημα IRIDICA συνδιάζει την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και την τεχνολογία φασματομετρίας μάζας ιονισμού με ηλεκτρο-ψεκασμό σε μία πλατφόρμα. Αναπτύχθηκε από την εταιρία Abbott Molecular με σκοπό να βοηθήσει στην ανίχνευση και την ταυτοποίηση των αιτιολογικών παραγόντων μικροβιακών λοιμώξεων, βοηθώντας έτσι στην θεραπεία και την διαχείρισή

τους. Το σύστημα αυτό είναι σχεδιασμένο έτσι ώστε να ολοκληρώνει τον έλεγχο των δειγμάτων σε λιγότερο από 6 ώρες και στη συνέχεια να επιλέγεται και να χορηγείται η κατάλληλη θεραπεία. Τα κλινικά δείγματα που εξετάζονται είναι ολικό αίμα, στείρα υγρά, ιστοί, βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, ενδοτραχειακή αναρρόφηση και πλάσμα. Τα κλινικά δείγματα αρχικά υπόκεινται σε απομόνωση νουκλεϊνικού οξέος και στην συνέχεια σε PCR. Ακολουθεί ανάλυση φασματομετρίας μάζας και στη συνέχεια χρησιμοποιούνται μαθηματικοί αλγόριθμοι μαζί με μία σειρά εφαρμογών προκειμένου να ταυτοποιηθούν οι αιτιολογικοί παθογόνοι παράγοντες. Οι διαθέσιμες εφαρμογές είναι: i) οι IRIDICA BAC BSI, IRIDICA BAC SFT και IRIDICA BAC LRT, οι οποίες εξετάζουν την ύπαρξη 780 παθογόνων και την παρουσία 4 δεικτών ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, ii) η εφαρμογή IRIDICA fungal, η οποία εξετάζει την ύπαρξη περισσότερων από 200 μυκήτων και ζυμών και, iii) η εφαρμογή IRIDICA viral IC, η οποία εξετάζει την παρουσία περισσότερα από 130 είδη ιών.

Ένα αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό του συστήματος IRIDICA είναι ότι δεν απαιτεί καλλιέργεια πριν την ανάλυση- αντίθετα ο έλεγχος γίνεται απευθείας σε έναν αριθμό διαφορετικών κλινικών δειγμάτων. Η Abbott Molecular υποστηρίζει πως το σύστημα IRIDICA συνδιάζει την ευαισθησία της PCR και την ειδικότητα της φασματομετρίας μάζας ιονισμού με ηλεκτρο-ψεκασμό προσφέροντας ρυθμό ανίχνευσης 3 φορές μεγαλύτερο από τις μεθόδους που χρησιμοποιούν την αιμοκαλλιέργεια για τις λοιμώξεις αιματικής ροής. Το κυριότερο πλεονεκτήματα του συστήματος IRIDICA για τους ασθενείς είναι η γρήγορη ταυτοποίηση του αιτιολογικού παθογόνου παράγοντα, η οποία συνεπάγεται την ταχεία έναρξη της αντιμικροβιακής αγωγής, τη συντομότερη διάρκεια της θεραπείας και της παραμονής των ασθενών στο νοσοκομείο, λιγότερες παρενέργειες από την θεραπεία και καλύτερη κλινική έκβαση.

## **(II) ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΑΠΕΥΘΕΙΑΣ ΑΠΟ ΔΕΙΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ, ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΟΡΟΥ**

Ιδιαίτερως σημαντική θα ήταν η ανάπτυξη και η κλινική επικύρωση μεθόδων που θα βασίζονται σε ενισχυμένο νουκλεϊνικό οξύ για να επιτυγχάνουν

ανίχνευση και ταυτοποίηση βακτηριακών και μυκητιακών παθογόνων απευθείας από δείγματα αίματος, πλάσματος ή ορού (Mancini, 2010). Μία καλά σχεδιασμένη και κλινικά επικυρωμένη μέθοδος θα απαιτούσε σημαντικά συντομότερο αναλυτικό χρόνο (2 έως 4 ημέρες λιγότερο) συγκριτικά με τις μεθόδους εκείνες που βασίζονται στην καλλιέργεια. Όσον αφορά τις μοριακές τεχνικές που εφαρμόζονται, έχουν περιγραφεί διάφορες στρατηγικές ανίχνευσης συμπεριλαμβανομένων 1) αυτών που βασίζονται στο νουκλεϊνικό οξύ ((i) παθογόνο-ειδικές, (ii) ευρέως φάσματος και (iii) πολυπλεκτικές) καθώς και 2) αυτών που δεν βασίζονται στο νουκλεϊνικό οξύ (PCR/ESI-MS)

### **Μέθοδοι που βασίζονται στο νουκλεϊνικό οξύ**

#### **- Παθογονοειδικές μέθοδοι**

Αν και έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετοί μοριακοί στόχοι για την ειδική ανίχνευση διαφορετικών παθογόνων (Gray, 1999, Heininger, 1999, Newcombe, 1996, Peters, 2007), η κλινική χρησιμότητα τους στη διάγνωση λοιμώξεων του κυκλοφορικού συστήματος είναι περιορισμένη λόγω του μεγάλου αριθμού παθογόνων που μπορεί να εμπλέκονται σε μία λοίμωξη. Οι μέθοδοι αυτές εφαρμόζονται όταν υπάρχει υποψία ύπαρξης "απαιτητικών" ή αργά αναπτυσσόμενων μικροοργανισμών, όπως για παράδειγμα σε περιπτώσεις ενδοκαρδίτιδας με αρνητική αιμοκαλλιέργεια ή σε περιπτώσεις πιθανής ρικετσίωσης, πυρετού Q, μπαρτονέλλωσης, βρουκέλλωσης ή ασθένειας Whipple. Σε αυτές τις περιπτώσεις, μέθοδοι ειδικές για το παθογόνο μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε δείγματα αίματος με EDTA, ορό, καρδιακές βαλβίδες και δείγματα αγγειακής βιοψίας. Ωστόσο, θα πρέπει πάντα να λαμβάνονται υπόψη η πιθανότητα χρήσης άλλων πιο συμβατικών και λιγότερο δαπανηρών τεχνικών. Για παράδειγμα, μία ειδική PCR για *Coxiella burnetii* που εφαρμόζεται σε δείγματα ορού αποδεικνύεται χρήσιμη τις πρώτες εβδομάδες της λοίμωξης (πριν από μία πιθανή ορομετατροπή), ενώ δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται 4 εβδομάδες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων, όταν η ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων έχει καλή ευαισθησία.

#### - **Μέθοδοι ειδικές του γένους**

Οι δοκιμασίες που είναι ειδικές για το γένος των παθογόνων επιτρέπουν την ανίχνευση μιας συγκεκριμένης ομάδας παθογόνων μικροοργανισμών χωρίς περαιτέρω αναγνώριση του είδους τους (Farrell, 2005, Klingspor, 2009). Μια περίπτωση που θα μπορούσε να επωφεληθεί σε μεγάλο βαθμό από μια τέτοιου είδους προσέγγιση, είναι η ανίχνευση της διηθητικής ασπεργίλλωσης. Ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών δείχνει τη χρησιμότητα μιας τέτοιας μεθόδου, ειδικής του γένους, για ουδετεροπενικούς ασθενείς με αιματολογικές και μη αιματολογικές κακοήθειες (Klingspor, 2009).

Μια πρόσφατη μετα-ανάλυση (Mengoli, 2009) που αξιολογεί μελέτες χρησιμοποιώντας διαφορετικές τεχνικές PCR σε δείγματα αίματος, ορού ή πλάσματος και συγκρίνει τα μοριακά αποτελέσματα με διαγνώσεις που έγιναν σύμφωνα με τα κριτήρια του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Έρευνας και Θεραπείας του καρκίνου (EORTC) για την διηθητική ασπεργίλλωση, συμπέρανε ότι μόνο ένα αρνητικό αποτέλεσμα PCR είναι αρκετό ώστε να αποκλειστεί πιθανή διηθητική ασπεργίλλωση, ενώ απαιτούνται δύο θετικά τεστ για την επιβεβαίωση της διάγνωσης και μάλιστα σε διαφορετικά είδη δειγμάτων (π.χ. ορός και BAL).

#### - **Μέθοδοι ευρέως φάσματος**

Όσον αφορά στις μεθόδους ευρέως φάσματος, ο συνδυασμός της universal PCR που στοχεύει συντηρημένες περιοχές με αλληλούχιση ή υβριδισμό έχει εφαρμοσθεί για την άμεση ανίχνευση βακτηρίων και μυκήτων από δείγματα αίματος. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η προσέγγιση αυτή δυνητικά επιτρέπει την άμεση ανίχνευση οποιουδήποτε βακτηρίου μπορεί ή όχι να καλλιεργηθεί, ή μύκητα. Η εφαρμογή της σε κλινικά δείγματα είναι περιορισμένη από τους ίδιους τεχνικούς παράγοντες που περιγράφηκαν παραπάνω, όπως ο κίνδυνος ψευδώς θετικών δειγμάτων εξ' αιτίας επιμόλυνσης από μικροβιακό DNA στη διαδικασία εκχύλισης ή τα αντιδραστήρια. Ωστόσο, υπό ορισμένες προϋποθέσεις, αυτή η προσέγγιση μπορεί να είναι χρήσιμη. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η εφαρμογή των μεθόδων ευρέως φάσματος στην νεογνική σήψη, όπου η απόδοση των αιμοκαλλιιεργειών είναι συχνά απογοητευτική, με

υψηλό αριθμό ψευδώς αρνητικών δειγμάτων (Reier-Nilsen, 2009, Schabereiter-Gurtner, 2008).

### **Πολυπλεκτικές PCR και μικροσυστοιχίες**

Υποσχόμενες προσεγγίσεις για χρήση ρουτίνας στα κλινικά εργαστήρια είναι οι πολυπλεκτικές real-time PCR που επιτρέπουν την άμεση ταυτοποίηση παθογόνων απευθείας σε κλινικά δείγματα. Στο πλαίσιο αυτό, μεταξύ των πλέον χρήσιμων μοριακών στόχων είναι η εσωτερική μεταγραφόμενη διαστηματική περιοχή 1 (ITS1) και ITS2 ριβοσωμικές αλληλουχίες DNA (Mancini, 2010). Οι περιοχές ITS είναι μη κωδικοποιητικές αλληλουχίες DNA διάσπαρτες ανάμεσα σε υψηλά διατηρημένα βακτηριακά γονίδια rRNA και μυκητικό ριβοσωμικό DNA, που παρουσιάζουν υψηλό επίπεδο ετερογένειας μεταξύ διαφορετικών βακτηριακών και μυκητικών γενών και ειδών. Τα χαρακτηριστικά αυτά επιτρέπουν τη χρήση ενός περιορισμένου συνόλου ελαφρώς εκφυλισμένων εκκινήτων για την PCR και την ειδικής του είδους ανίχνευσης με ανιχνευτές που στοχεύουν τις ITS περιοχές.

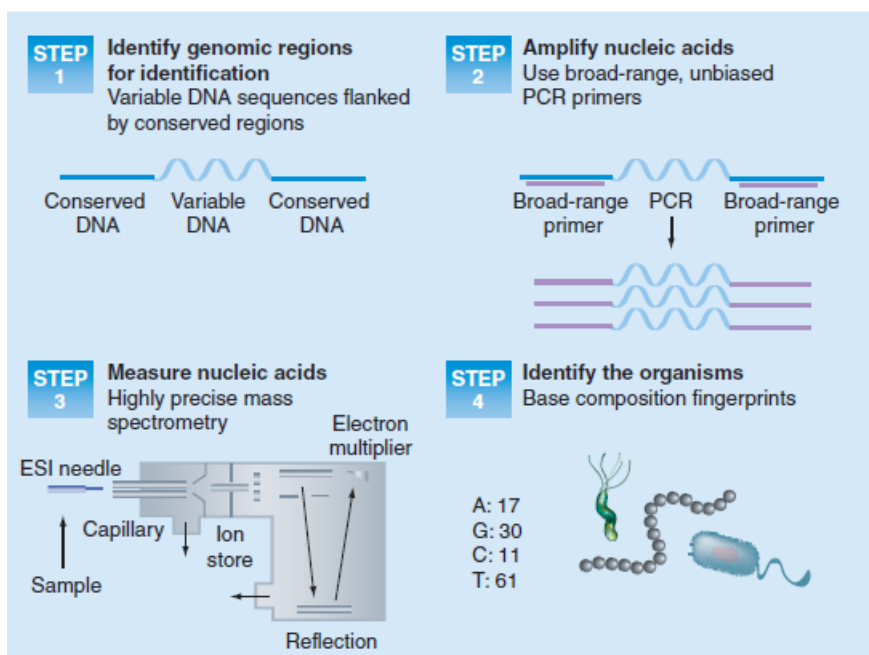
Τα διαγνωστικά χαρακτηριστικά αμφότερων των ευρέως φάσματος και πολυπλεκτικών μεθόδων θα μπορούσαν να αυξάνονται εκθετικά, όσον αφορά την εξειδίκευση και τον αριθμό των αναγνωρίσιμων παθογόνων, με την ανάπτυξη των DNA μικροσυστοιχιών, που είναι μικροτσιπ επικαλυμμένα με μεγάλο αριθμό βακτηριακών στόχων. Κάποιες πρωτότυπες μικροσυστοιχίες έχουν ήδη περιγραφεί και εφαρμοστεί στη διάγνωση της σήψης (Cleven, 2006, Palka-Santini, 2007, Shang, 2005). Μία από αυτές περιλάμβανε επίσης έξι γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά, αλλά περιορίστηκε στην ανίχνευση των *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Escherichia coli* σε θετικές αιμοκαλλιέργειες. Η κλινική χρησιμότητα των μικροσυστοιχιών θα είναι πολύ σημαντική από την στιγμή που θα είναι διαθέσιμη μία ευρεία ομάδα γενετικών δεικτών αντοχής στα αντιβιοτικά (προσαρμοσμένη στην γεωγραφική κατανομή των γονιδίων αντοχής) και παραγόντων λοιμογονικότητας, η οποία θα χρησιμοποιείται απευθείας στα κλινικά δείγματα.

## Μέθοδοι που δεν βασίζονται στο νουκλεϊνικό οξύ

Η PCR/ESI-MS αποτελεί μία υβριδική τεχνική, η οποία συνδιάζει την μέθοδο φασματομετρίας μάζας με ιονισμό ηλεκτροψεκασμού με την PCR.

Το μηχάνημα PLEX-ID της Abbott Molecular χρησιμοποιεί την τεχνική αυτή για να ανιχνεύσει και να ταυτοποιήσει έως 800 παθογόνα, συμπεριλαμβανομένων Gram-θετικών, Gram-αρνητικών βακτηρίων και μυκήτων (Opota, 2015). Εννέα ζεύγη εκκινητών καλύπτουν το προκαρυωτικό βασίλειο και τέσσερα ζεύγη εκκινητών ανιχνεύουν είδη *Candida*. Τέσσερα επιπρόσθετα ζεύγη εκκινητών ανιχνεύουν τα γονίδια ανθεκτικότητας *mecA*, *blaKPC*, *vanA* και *vanB*. Οι εκκινητές δεσμεύονται ειδικά σε συντηρημένες αλληλουχίες που περιβάλλουν πολυμορφικές περιοχές. Η αναγνώριση του παθογόνου σε επίπεδο είδους βασίζεται περισσότερο στην ανάλυση της σύνθεσης των βάσεων, A, C, G και T του αμπλικονίου παρά στην αλληλουχία των βάσεων. Η σύνθεση των βάσεων επιτυγχάνεται από 4 παραμέτρους: την ακριβή μάζα του αμπλικονίου μετρούμενη με ESI-MS, το μήκος του αμπλικονίου, τη μάζα κάθε βάσης και τους κανόνες συμπληρωματικότητας του DNA. Η σύνθεση των βάσεων κάθε αμπλικονίου συγκρίνεται στη συνέχεια με μία βάση δεδομένων η οποία παρέχει την ταυτότητα του παθογόνου (Opota, 2015).

Ένα από τα πλεονεκτήματα του PLEX-ID είναι ο σύντομος χρόνος που απαιτείται για τα αποτελέσματα, ο οποίος οφείλεται στη χρήση της ESI-MS έναντι της αλληλούχησης κατά Sanger (1 λεπτό έναντι αρκετών ωρών). Επιπλέον, η χρήση συγκεκριμένων εκκινητών και όχι εκφυλισμένων εξηγεί μάλλον την καλή αναλυτική ευαισθησία αυτής της τεχνικής. Με τη χρήση μιας βελτιστοποιημένης μεθόδου εκχύλισης DNA ειδικής για ολικό αίμα, τα όρια ανίχνευσης του PLEX-ID είναι 16 CFU / mL για τα βακτήρια και 4 CFU / mL για *Candida spp.* (Opota, 2015).



**Εικόνα 6.** Η διαδικασία ταυτοποίησης κι γενεοτύπησης μικροβίων με PCR/ESI-MS (Πηγή: van der Poll *et al.*, 2017)

## ΕΜΠΟΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΣΤΗ ΣΗΨΗ

Οι μοριακές τεχνικές για την ανίχνευση μικροβιακών παθογόνων στο κλινικό δείγμα επιτρέπουν μια πιο γρήγορη διάγνωση των λοιμώξεων του κυκλοφορικού συστήματος. Ωστόσο η σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας θα πρέπει να εκτιμηθεί σε διαφορετικές κλινικές μελέτες (Manzini, 2010). Επιπλέον, όλες οι τεχνικές πρέπει να ελέγχονται προσεκτικά από τεχνική και κλινική άποψη. Αρκετές εμπορικές μοριακές μέθοδοι πρώτης γενιάς για τη διάγνωση της σήψης είναι ήδη διαθέσιμες. Οι περισσότερες από τις αναφερόμενες μεθόδους έχουν εγκριθεί για διαγνωστική χρήση στην Ευρώπη, αλλά όχι στις Ηνωμένες Πολιτείες.

## Εμπορικές μέθοδοι για την ταυτοποίηση παθογόνων σε θετικές αιμοκαλλιέργειες

Μεταξύ των εμπορικών μεθόδων που εφαρμόζονται στις θετικές αιμοκαλλιέργειες, η πιο καλά μελετημένη είναι η PNA-FISH, η οποία διατίθεται σαν εμπορικό από την AdvanDx (Woburn, MA). Η τεχνολογία AdvanDx PNA-



FISH στηρίζεται στην τεχνική του φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού, η οποία χρησιμοποιεί φθορίζοντες ανιχνευτές πεπτιδονουκλεϊνικής φύσης που στοχεύουν rRNA γονίδια ενός περιορισμένου αριθμού βακτηρίων (*S. aureus* ή αρνητικοί στην κοαγκουλάση staphylococci, *Enterococcus faecalis* ή άλλοι επιλεγμένοι εντερόκοκκοι, *E. coli*, ή *P. aeruginosa*) και τα γονίδια rDNA ειδών *Candida* (*Candida albicans*/*C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, ή *C. glabrata*/*C. krusei*). Εν συντομία, μία σταγόνα καλλιεργητικού ζωμού αιμοκαλλιέργειας προστίθεται σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα η οποία περιέχει μια σταγόνα μονιμοποιητικού διαλύματος. Πέντε λεπτά αργότερα, προστίθενται μία σταγόνα ανιχνευτή PNA του *S. aureus* και μια καλυπτρίδα. Ο ανιχνευτής και το δείγμα επωάζονται για 90 λεπτά. Οι καλυπτρίδες αφαιρούνται και οι αντικειμενοφόρες πλάκες εμβυθίζονται σε προθερμασμένο διάλυμα πλύσης για 30 λεπτά. Αφού οι αντικειμενοφόρες πλάκες στεγνώσουν, προστίθενται μία σταγόνα στερεωτικού μέσου και μια καλυπτρίδα και στη συνέχεια οι πλάκες εξετάζονται σε μικροσκόπιο φθορισμού με ελαιοκαταδυτικό φακό (100x) (Stender, 2003). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται πλέον και για την ανίχνευση άλλων βακτηρίων και μυκήτων (Shepard, 2008, Sogaard, 2005).

Η συγκεκριμένη μεθοδολογία είναι αρκετά εύχρηστη, απαιτώντας αναλυτικό χρόνο 15 λεπτών περίπου. Ωστόσο, λόγω των σταδίων ξήρανσης και των περιόδων επώασης, ο χρόνος που μεσολαβεί μέχρι το τελικό αποτέλεσμα είναι περίπου 3 ώρες. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου είναι υψηλές, με μέση ευαισθησία και ειδικότητα 99% και 100% αντίστοιχα (Forrest, 2006, Hensley, 2009, Peleg, 2009, Shepard, 2008, Wilson, 2005).

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί η τεχνική QuickFISH, η οποία αποτελεί μια βελτιωμένη μορφή της PNA-FISH και απαιτεί 30 λεπτά για την ταυτοποίηση παθογόνων σε αιμοκαλλιέργειες αφού ο αριθμός των βημάτων πλύσης έχει ελαχιστοποιηθεί.

Μία ενδιαφέρουσα νέα τεχνολογία είναι η Prove-it Sepsis (Mobidiag, Ελσίνκι, Φινλανδία), η πρώτη που βασίζεται σε μικροσυστοιχίες και έχει σχεδιαστεί ειδικά για τη μικροβιολογική διάγνωση της σήψης. Αυτή επιτρέπει την ανίχνευση ενός ευρύτερου συνόλου βακτηριακών ειδών και του γονιδίου *mecA*. Τα Gram-θετικά είδη που ανιχνεύονται από τη μέθοδο Prove-it Sepsis είναι τα

*Listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae*, και *Clostridium perfringens*, ενώ Gram-αρνητικά είδη τα οποία είναι ανιχνεύσιμα είναι τα *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *Bacteroides fragilis*, *B. vulgatus* και μία ευρύτερη ομάδα Enterobacteriaceae. Ο αναλυτικός χρόνος ρουτίνας είναι 3 ώρες. Η ευαισθησία της φτάνει στο 94% και η ειδικότητά της στο 96% (Manzini, 2010). Αν και ενδιαφέρουσα, η κλινική χρησιμότητα αυτής της μεθόδου είναι ακόμα περιορισμένη λόγω της χρήσης της μόνο σε θετικές αιμοκαλλιέργειες και όχι απευθείας σε δείγματα αίματος. Η βελτίωση του σταδίου της ενίσχυσης μπορεί δυνητικά να επιτρέψει την εφαρμογή της μεθόδου απευθείας σε δείγματα αίματος (Manzini, 2010).

### **Εμπορικές μέθοδοι για την ανίχνευση και ταυτοποίηση παθογόνων παραγόντων απευθείας σε κλινικά δείγματα**

Το SepsiT<sub>est</sub> (Molz<sub>ym</sub>, Bremen, Germany) είναι μία ευρέως φάσματος μέθοδος με βάση την PCR, η οποία στοχεύει το 16S rRNA γονίδιο των βακτηρίων και το 18S rDNA γονίδιο των μυκήτων (Muhl, 2008). Χαρακτηρίζεται από την προαναλυτική επιλεκτική αποικοδόμηση του ανθρώπινου DNA που παρεμβαίνει στην PCR προκειμένου να βελτιωθεί το συνολικό όριο ανίχνευσης της μεθόδου (20 έως 40 CFU / ml για *S. aureus*). Μετά από την PCR, ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης, και, σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος, η οριστική ταυτοποίηση γίνεται με αλληλούχιση. Αυτή η προσέγγιση επιτρέπει την ανίχνευση και ταυτοποίηση μεγάλου αριθμού βακτηριακών ή μυκητιακών ειδών, αλλά η επεξεργασία των αμπλικονίων μετά την ενίσχυσή τους δημιουργεί υψηλό κίνδυνο ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων εξ' αιτίας επιμολύνσεων. Επιπλέον, η αλληλούχιση παρατείνει τον αναλυτικό χρόνο σε περισσότερες από 8 έως 12 ώρες, καθιστώντας την κλινική χρησιμότητα της μεθόδου αμφισβητήσιμη για ταχεία διάγνωση.

Η LOOXSTER / VYOO (SIRS-Lab, Jena, Germany) είναι μία μέθοδος με βάση την πολυπλεκτική PCR που αφορά περίπου 35 βακτηριακά είδη (*S. aureus*, πολλοί σταφυλόκοκκοι αρνητικοί στην κοαγκουλάση, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, αρκετοί στρεπτόκοκκοι της ομάδας viridans, *E. faecalis*, *E. faecium*, *C.*

*perfringens*, *Bacillus cereus*, *E. coli*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *S. marcescens*, *M. morgani*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *A. baumannii*, *Burkholderia Cepacia*, *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *B. fragilis*, *P. buccae*, *P. melaninogenica* και *P. intermedia*) και 6 είδη μυκήτων (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* και *A. fumigatus*). Η μέθοδος αυτή μπορεί επίσης να ανιχνεύει κάποιους γενετικούς δείκτες ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, όπως τα γονίδια SHV α-λακταμάσης (χωρίς να διακρίνει τις SHV β-λακταμάσες εκτεταμένου φάσματος), το γονίδιο *mecA* και τα γονίδια *vanA* και *vanB*. Το προϊόν LOOXSTER χρησιμοποιεί μια στρατηγική η οποία εκμεταλλεύεται τις διαφορές στην μεθυλίωση ανάμεσα στο βακτηριακό/μυκητιακό και το ανθρώπινο DNA για τον εμπλουτισμό του κλινικού δείγματος σε DNA παθογόνου με χρωματογραφία συγγένειας χρησιμοποιώντας το μοτίβο CpG δακτύλων Zn, η οποία ακολουθείται από την ενίσχυση του γονιδίου 16S rDNA χρησιμοποιώντας ένα προϊόν γνωστό ως VYOO (Sachse, 2009). Τα ενισχυμένα προϊόντα ηλεκτροφορούνται σε γέλη αγαρόζης με δυνατότητα ταυτοποίησης τους μέσω αξιολόγησης ενός ηλεκτροφορητικού προφίλ, ειδικού για το παθογόνο. Ο συνολικός χρόνος της μεθόδου είναι περίπου 8 ώρες, ενώ η ευαισθησία είναι 3 έως 10 CFU/ml (Reier-Nilsen, 2009). Σε αναλυτικές μελέτες, η συγκεκριμένη προσέγγιση οδήγησε σε σημαντική τροποποίηση του λόγου DNA παθογόνου και ανθρώπινου DNA. Περίπου το 90% του ευκαρυωτικού DNA απομακρύνθηκε από τα κλινικά δείγματα και το γεγονός αυτό οδήγησε σε αύξηση της ευαισθησίας τουλάχιστον δέκα φορές συγκριτικά με δείγματα τα οποία δεν είχαν υποβληθεί στον εμπλουτισμό DNA του παθογόνου (Lehmann, 2009).

Ακόμα, η τεχνική LightCycler SeptiFast (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ) είναι, μέχρι σήμερα, η μοναδική πολυπλεκτική real-time μέθοδος PCR διαθέσιμη για τη διάγνωση της σήψης. Έχει τη δυνατότητα ανίχνευσης γενετικού υλικού 25 μικροοργανισμών, τα οποία αντιπροσωπεύουν περίπου το 90% των ειδών που ευθύνονται για τις μικροβιαμίες. Το πάνελ του τεστ LightCycler SeptiFast Test περιλαμβάνει *S. aureus*, πολλούς αρνητικούς στην κοαγκουλάση σταφυλόκοκκους, *S. pneumoniae*, διάφορα είδη στρεπτόκοκκων, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. coli*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *P.*

*mirabilis*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *A. baumannii*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* και *A. Fumigatus*. Η μέθοδος χρησιμοποιεί ανιχνευτές διπλής φθορίζουσας μεταφοράς ενέργειας (FRET) που στοχεύουν σε εσωτερικές μεταγραφόμενες διαστηματικές (ITS) περιοχές ειδικές για το κάθε είδος. Το ανθρώπινο DNA από τα λευκοκύτταρα του αίματος και το DNA του παθογόνου απομονώνονται μαζί με μηχανική λύση με χρήση κεραμικών σφαιριδίων σε όργανο Magnalyzer (Roche Molecular Systems). Στην συνέχεια 50 μl του εκλούσματος υποβάλλονται σε 3 παράλληλες πολυπλεκτικές real-time PCR (Gram-θετικά βακτήρια, Gram-αρνητικά βακτήρια και μύκητες). Φθορίζοντες ανιχνευτές χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των παθογόνων παραγόντων. Το προφίλ τήξης των ενισχυμένων προϊόντων υπολογίζεται με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού, επιτρέποντας έτσι την ανίχνευση του παθογόνου παράγοντα και την ταυτοποίησή του σε επίπεδο γένους και είδους. Το όριο ανίχνευσης κυμαίνεται από 3 έως 30 CFU/ml, ανάλογα με το μεμονωμένα παθογόνα, ενώ ο αναλυτικός χρόνος είναι περίπου 6 ώρες. Η μέθοδος έχει πολύ ικανοποιητική επίδοση ως συμπλήρωμα στην αιμοκαλλιέργεια για ουδετεροπενικούς (Mancini, 2009, Mancini, 2008, Steinmann, 2009, Varani, 2009) και παιδιατρικούς ασθενείς (Mussap, 2007, Paolucci, 2009, Vince, 2008), ασθενείς στην ΜΕΘ και ασθενείς γενικής ιατρικής (Louie, 2008, Westh, 2009). Δεν παρατηρήθηκε πλεονέκτημα της μεθόδου για ασθενείς με υποψία λοιμώδους ενδοκαρδίτιδας, αλλά διάφορα βακτήρια που σχετίζονται με την ασθένεια δεν περιλαμβάνονται στο πάνελ του SeptiFast και η ευαισθησία της μεθόδου μπορεί να μην είναι επαρκής για την ανίχνευση της χαμηλού βαθμού βακτηριαμίας που σχετίζεται με αυτή την κατάσταση. Εν κατακλείδι, το κύριο τεχνικό πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η real-time μορφή της που μειώνει αισθητά τον κίνδυνο επιμολύνσεων. Τρέχοντες περιορισμοί της μεθόδου είναι το πολύ υψηλό κόστος και η έλλειψη πληροφοριών σχετικά με την αντιμικροβιακή ευαισθησία.

Αναφορικά με την PCR/ESI-MS, οι προηγούμενες εκδόσεις της μεθόδου, η οποία επινοήθηκε από την Ibis Biosciences, τώρα μέρος της Abbott Molecular, ήταν γνωστές στο εμπόριο ως TIGER ή Ibis T5000. Η τρέχουσα εμπορική πλατφόρμα που εκτελεί την ανάλυση φασματομετρίας μάζας είναι γνωστή ως Abbott PLEX-

ID και η δοκιμασία για την άμεση ανάλυση των λοιμώξεων της αιματικής ροής που τρέχει στο PLEX-ID καλείται BAC Spectrum Assay. Αυτή η τεχνική χρησιμοποιεί εκκινητές σχεδιασμένους για υψηλά συντηρημένες περιοχές του γονιδιώματος όλων των βακτηρίων ή των μυκήτων. Με το όργανο PLEX-ID, μια αντίδραση ενίσχυσης μπορεί να αναλυθεί με φασματόμετρο μάζας σε 30 δευτερόλεπτα, επιτρέποντας την ανάλυση περίπου 30 πλακών μικροτιτλοδότησης μέσα σε 24 ώρες. Η υψηλή αυτή απόδοση επιτρέπει κάθε δείγμα να διερευνείται με πολλαπλές αντιδράσεις PCR ώστε να αυξηθούν τόσο το εύρος της κάλυψης όσο και η αναλυτική ισχύς, επιτρέποντας τη διαφοροποίηση ακόμα και στενά σχετιζόμενων ειδών (Ecker, 2010).

Το σύστημα IRIDICA το οποίο προαναφέρθηκε, χρησιμοποιεί έναν συνδιασμό αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και φασματομετρίας μάζας ιονισμού με ηλεκτρο-ψεκασμό. Τα κλινικά δείγματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι ολικό αίμα, στείρα υγρά, ιστοί, βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, ενδοτραχειακή αναρρόφηση και πλάσμα, ενώ η ταυτοποίηση των παθογόνων ολοκληρώνεται σε λιγότερο από 6 ώρες.

Τέλος, το πάνελ T2Candida είναι μια νέα ποιοτική διαγνωστική πλατφόρμα που χρησιμοποιείται για τη διάγνωση της μυκηταιμίας, με μέσο χρόνο ταυτοποίησης ειδών μικρότερο των 5 ωρών. Το πάνελ T2Candida χρησιμοποιείται από το πλήρως αυτοματοποιημένο όργανο T2Dx σε δείγματα ολικού αίματος K2EDTA και έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύει 5 *Candida* spp.: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* και *Candida glabrata*. Συνδυάζοντας το μαγνητικό συντονισμό με μοριακές τεχνικές, το πάνελ αυτό αρχικά ενισχύει το DNA και στη συνέχεια ανιχνεύει το ενισχυμένο προϊόν από τη συσσώρευση υπερμαγνητικών σωματιδίων που επάγει το αμπλικόνιο και τη μέτρηση T2 μαγνητικού συντονισμού (T2 Magnetic Resonance - T2MR) (Zervou, 2017).

### **Οι κύριες ελλείψεις των μοριακών μεθόδων που εφαρμόζονται για τη μικροβιολογική διάγνωση της σήψης**

Παρά την αξιοσημείωτη τεχνική πρόοδο των μοριακών μεθόδων που εφαρμόζονται απ' ευθείας στο κλινικό δείγμα, η ευρεία χρήση τους για τη

μικροβιολογική διάγνωση της σήψης είναι περιορισμένη λόγω των ελλείψεων που επηρεάζουν τη σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας (Manzini, 2010). Το πρώτο σημείο που πρέπει να έχουμε κατά νου όταν αξιολογούμε μοριακές τεχνικές είναι ότι η ανίχνευση του κυκλοφορούντος μικροβιακού DNA (DNAαιμία) δεν υποδηλώνει απαραίτητα την παρουσία ενός ζώντος μικροοργανισμού υπεύθυνου για μια δεδομένη μόλυνση. Η υψηλή ευαισθησία που απαιτείται για τη διάγνωση της σήψης μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο των θετικών αποτελεσμάτων λόγω κάποιας μεταφερόμενης επιμόλυνσης ή λόγω ανίχνευσης DNA του περιβάλλοντος, το οποίο έχει επιμολύνει το δείγμα του αίματος. Επιπλέον, η DNAαιμία μπορεί να είναι αποδεικτικό στοιχείο παροδικής βακτηριαϊμίας που δεν σχετίζεται με καμία λοίμωξη ή μπορεί να σχετίζεται με παραμονή κυκλοφορούντος DNA, το οποίο ανιχνεύεται αρκετές ημέρες αφότου έχει ολοκληρωθεί μία επιτυχής αντιλοιμώδης θεραπεία. Απαιτούνται περισσότερες μελέτες για την αξιολόγηση της κλινικής χρησιμότητας αυτής της νέας εργαστηριακής παραμέτρου ως συμπλήρωμα στην αιμοκαλλιέργεια, σε διαφορετικές κατηγορίες ασθενών (Manzini, 2010). Ένα ακόμα σημαντικό μειονέκτημα των διαθέσιμων μοριακών μεθόδων για τη διάγνωση της σήψης είναι το γεγονός ότι δεν παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την αντιμικροβιακή ευαισθησία του ανιχνευθέντος παθογόνου. Η ταχεία ανίχνευση ενός παθογόνου μπορεί να επιτρέψει την βελτιστοποίηση της εμπειρικής θεραπείας με πιθανό οικονομικό όφελος, αλλά η έλλειψη ενός συγκεκριμένου φάσματος ευαισθησίας, ειδικά για παθογόνα με ανθεκτικότητα σε πολλά φάρμακα, μπορεί να περιορίσει την κλινική χρησιμότητα αυτών των μεθόδων. Στις περιπτώσεις όπου η παρουσία ενός μόνο γονιδίου συνδέεται πάντοτε με φαινοτυπική αντοχή, όπως το γονίδιο *mecA* για την αντοχή στην οξακιλλίνη και τα γονίδια *van* για την αντοχή στη βανκομυκίνη, είναι σχετικά απλό να σχεδιαστούν οι μοριακές στρατηγικές που επιτρέπουν την ανίχνευσή τους. Κάτι τέτοιο είναι πιο δύσκολο στις περιπτώσεις όπου η φαινοτυπική αντοχή επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως όταν υπάρχουν διαφορετικά γονίδια που ρυθμίζουν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που καθορίζουν την αντοχή (Manzini, 2010).

## **ΘΕΡΑΠΕΙΑ**

### **Η ανοσορύθμιση ως θεραπεία της σήψης**

Ο τρόπος με τον οποίο θα πρέπει να αντιμετωπίζεται η απόκριση του ξενιστή στους ασθενείς με σήψη είναι αμφιλεγόμενος (van der Poll, 2017). Η αποτυχία πολλών κλινικών δοκιμών που έχουν χρησιμοποιήσει αντιφλεγμονώδεις παράγοντες δείχνει πως η αναστολή συγκεκριμένων συστατικών της εκτεταμένης φλεγμονώδους απόκρισης δεν βελτιώνει πάντα την έκβαση της ασθένειας (Marshall, 2014). Πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν τώρα τη χρήση ανοσοδιεγερτικών στους ασθενείς με σήψη (Hotchkiss, 2013) προκειμένου να αποκατασταθούν οι ανοσολογικές λειτουργίες, κι έτσι να μειωθούν η συχνότητα εμφάνισης δευτερογενών λοιμώξεων και η θνησιμότητα. Ωστόσο, μια πρόσφατη μελέτη αναφέρει ότι οι δευτερογενείς λοιμώξεις ευθύνονται μόνο για το 10,9% της συνολικής θνησιμότητας από σήψη στις ΜΕΘ (van Vught, 2016). Μια σχετικά νέα προσέγγιση είναι η έγχυση αλλογενών μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων ως μια πιθανή θεραπεία της σήψης (van der Poll, 2017). Το κλειδί για την επιτυχία οποιασδήποτε ανοσο-κατευθυνόμενης θεραπείας είναι ο εντοπισμός ασθενών, οι οποίοι θα μπορούσαν να επωφεληθούν από τη συγκεκριμένη παρέμβαση. Ως εκ τούτου, η χορήγηση κάθε θεραπείας θα πρέπει να συνδέεται με ένα συγκεκριμένο βιοδείκτη, ο οποίος θα παρέχει μια εικόνα για την έκφραση του στόχου - μια προσέγγιση που ονομάζεται "theranostics" (van der Poll, 2017).

### **Στρατηγικές που στοχεύουν στην εκτεταμένη φλεγμονή**

Τεχνικές καθαρισμού του αίματος έχουν προταθεί ως μέθοδοι απομάκρυνσης των PAMPs και των φλεγμονωδών ενδιάμεσων από την κυκλοφορία των ασθενών. Δύο σχετικά μικρές τυχαιοποιημένες μελέτες που διερεύνησαν την αποτελεσματικότητα της αιμοπροσρόφησης της πολυμυξίνης Β για την

απομάκρυνση του LPS από το αίμα των ασθενών με σήψη είχαν αντιφατικά αποτελέσματα (Cruz, 2009, Payen, 2015). Πρόσφατα, περιγράφηκε μια συσκευή καθαρισμού του αίματος, η οποία απομακρύνει πολλαπλά παθογόνα και τοξίνες από το αίμα μέσω μαγνητικών νανοσωματιδίων επικαλυμμένων με μια κατεργασμένη μορφή της ανθρώπινης λεκτίνης που συνδέεται σε μαννόζη (γνωστή και ως MBPC) και η οποία αξιολογείται επί του παρόντος σε προκλινικές μελέτες (Kang, 2014).

Το AB103 είναι ένα πεπτίδιο που αναστέλλει την αλληλεπίδραση μεταξύ του CD28 (ένας υποδοχέας που εκφράζεται σε T κύτταρα) και βακτηριακών υπεραντιγόνων (Arad, 2011). Το AB103 μείωσε τη θνησιμότητα σε μοντέλα ποντικών επαγόμενα από υπεραντιγονικό σοκ και πολυμικροβιακή βακτηριακή σήψη (Arad, 2011, Ramachandran, 2015). Το συγκεκριμένο πεπτίδιο αποδείχθηκε ασφαλές σε μια μελέτη φάσης II σε ασθενείς με νεκρωτικές λοιμώξεις των μαλακών μορίων (Bulger, 2014) και σήμερα αξιολογείται σε μια δοκιμή φάσης III (US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov, 2017). Άλλες αντιφλεγμονώδεις στρατηγικές που μελετήθηκαν σε κλινικές δοκιμές σήψης είναι η χρήση ενός εξανθρωποποιημένου μονοκλωνικού αντισώματος C5a (CaCP29, φάση II, ολοκληρώθηκε, αλλά δεν υπάρχουν επί του παρόντος διαθέσιμα αποτελέσματα) (US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov, 2016) και η διαλυτή ανασυνδιασμένη ανθρώπινη θρομβομοντουλίνη (ART 123), η οποία συνδιάζει αντιπηκτική και αντιφλεγμονώδη δράση (φάση III, σε εξέλιξη) (US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov, 2016). Ένας ελκυστικός θεραπευτικός στόχος για την σήψη είναι το αγγειακό ενδοθήλιο και οι στρατηγικές που αποκαθιστούν τη λειτουργία του ενδοθηλιακού φραγμού. Αρκετές ενώσεις έχουν δοκιμαστεί για το σκοπό αυτό σε ασθενείς με διαφορετικές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένων της αγγειοποιητίνης-1 και / ή ρυθμιστών του TIE2, αγωνιστών του S1P1, το ινωδοπεπτιδίου Bβ15-42 και μίας PAR1 pepducin (Opal, 2015).



## Ανοσολογική διέγερση

Υπάρχουν αρκετά φάρμακα τα οποία θα μπορούσαν ενδεχομένως να αντιστρέψουν την ανοσοκαταστολή που προκαλεί η σήψη (Hotchkiss, 2013, Leentjens, 2013, Patil, 2016). Αρκετοί βιοδείκτες έχουν προταθεί για την επιλογή ασθενών, οι οποίοι θα μπορούσαν να ωφεληθούν από την ανοσοδιέγερση, συμπεριλαμβανομένης της μειωμένης έκφρασης του HLA DR στα μονοκύτταρα, της αυξημένης έκφρασης του PDL1 στα μονοκύτταρα και της μειωμένης ικανότητας των λευκοκυττάρων να παράγουν προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες μετά από διέγερση με βακτηριακούς αγωνιστές, όπως το LPS (Hotchkiss, 2013, Shao, 2016). Μία προσέγγιση είναι η χρήση ανοσοδιεγερτικών κυτταροκινών, όπως οι IFN $\gamma$ , IL-7 και IL-15. Η IFN $\gamma$  μπορεί να αυξήσει την φαγοκυτταρική ικανότητα και την ικανότητα θανάτωσης των φαγοκυττάρων. Η θεραπεία με IFN $\gamma$  αυξάνει την έκφραση HLA DR στα μονοκύτταρα κατά την ανθρώπινη πειραματική ενδοτοξαιμία και ασθενείς με σήψη (Leentjens, 2012, Docke, 1997), ενώ μία σειρά περιπτώσεων δείχνει ότι η IFN $\gamma$  χορηγούμενη ως επικουρική θεραπεία μπορεί να αποκαταστήσει τη λειτουργία των μονοκυττάρων και να βελτιώσει την έκβαση της σήψης (Docke, 1997, Delsing, 2014, Nalos, 2012). Οι IL-7 και IL-15 είναι και οι δύο σημαντικές για τη μνήμη και την ομοιόσταση των T κυττάρων (Rochman, 2009). Η χορήγηση της IL-7 έχει αποδειχθεί ότι παρέχει προστασία έναντι της θνησιμότητας σε μοντέλα σήψης ποντικού (Unsinger, 2010, Kasten, 2010).

Οι σημαντικότεροι μηχανισμοί με τους οποίους η IL-7 τροποποίησε την ανοσοκαταστολή που επάχθηκε από την σήψη σε αυτές τις μελέτες περιλαμβάνουν την επαγωγή του πολλαπλασιασμού των T κυττάρων, την αναστολή της απόπτωσης των λεμφοκυττάρων και την αύξηση της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης, με αποτέλεσμα την καλύτερη κυκλοφορία των κυττάρων. Η ex vivo θεραπεία T κυττάρων που συλλέχθηκαν από ασθενείς με σήψη με IL-7 βελτίωσε τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων και την ικανότητα παραγωγής IFN $\gamma$ , παρέχοντας έμμεσες ενδείξεις ότι η IL-7 μπορεί να αντιστρέψει τη δυσλειτουργία των λεμφοκυττάρων κατά την ανθρώπινη σήψη (Venet, 2012). Επί του παρόντος, διεξάγονται δύο κλινικές δοκιμές που αξιολογούν τα αποτελέσματα της θεραπείας με IL-7 σε ασθενείς με σήψη (US

National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov, 2016, 2017). Στα ποντίκια, η IL-15 μειώνει τη θνησιμότητα που προκαλεί η πνευμονία από το *Pseudomonas aeruginosa* και η πολυμικροβιακή σήψη της κοιλιακής χώρας. Η προστατευτική δράση της IL-15 σχετίζεται με τη μείωση της απόπτωσης των κυττάρων φυσικών φονιάδων, των δενδριτικών κυττάρων, των CD8<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων και των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου (Inoue, 2010). Επιπλέον, η IL-15 αυξάνει τα επίπεδα της IFN $\gamma$  στο πλάσμα και το ποσοστό των φυσικών κυττάρων φονιάδων που παράγουν IFN $\gamma$ , υποδηλώνοντας ότι μπορεί να αναστρέφει την απόπτωση και την ανοσοκαταστολή, τα οποία αποτελούν δύο χαρακτηριστικά παθολογικά φαινόμενα της σήψης (Inoue, 2010).

Ο παράγοντας διέγερσης αποικιών των κοκκιοκυττάρων μακροφάγων (GM-CSF) επιταχύνει την παραγωγή ουδετερόφιλων, μονοκυττάρων και μακροφάγων. Η χορήγηση του σε ασθενείς με σήψη με μειωμένη έκφραση μονοκυτταρικού HLA DR σχετίζεται με την αποκατάσταση των επιπέδων HLA DR και λιγότερες ημέρες παραμονής στην ΜΕΘ (Meisel, 2009). Ο GM-CSF αποκαθιστά την ικανότητα των λευκοκυττάρων του αίματος να απελευθερώνουν TNF κατά τη διέγερσή τους και ελαττώνει τη συχνότητα εμφάνισης δευτερογενών λοιμώξεων σε παιδιά με σήψη (Hall, 2011). Μια εκτενέστερη μελέτη που αξιολογεί την αποτελεσματικότητα του GM-CSF στην πρόληψη δευτερογενών λοιμώξεων σε ασθενείς με σήψη και μειωμένη έκφραση μονοκυτταρικού HLA DR βρίσκεται σε εξέλιξη (US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov, 2016). Ο παράγοντας διέγερσης αποικιών των κοκκιοκυττάρων (G-CSF), ο οποίος διεγείρει την παραγωγή κοκκιοκυττάρων, δεν κατάφερε να βελτιώσει την έκβαση ασθενών με σήψη σε αρκετές δοκιμές (Bo, 2011).

Αντισώματα έναντι ανασταλτικών σημείων του ανοσιακού ελέγχου έχουν προταθεί ως πιθανή θεραπεία για τη σήψη, καθώς αποκαθιστούν τη λειτουργία των T κυττάρων (Hotchkiss, 2013). Μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των PD1 και PDL1 έχουν αναπτυχθεί για τη θεραπεία του καρκίνου και είναι διαθέσιμα για κλινική χρήση (Pardoll, 2012). Μια κλινική δοκιμή φάσης Ib / IIa που εξετάζει ένα ειδικό αντίσωμα για τον PDL1 σε ασθενείς με σήψη βρίσκεται σε εξέλιξη.

Η θυμοσίνη α1 είναι ένα θυμικό πεπτίδιο που δρα ως ενδογενής ρυθμιστής των λειτουργιών τόσο της φυσικής όσο και της επίκτητης ανοσίας (Tuthill, 2010). Η θυμοσίνη α1 έχει χρησιμοποιηθεί σε ασθενείς με ιογενείς λοιμώξεις και καρκίνο και έχει καλό προφίλ ασφάλειας. Σε μια μικρή δοκιμή, η θεραπεία με μεθυμοσίνη α1 αύξησε την έκφραση του HLA DR στα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα, τείνοντας να μειώσει τη θνησιμότητα σε ασθενείς με σήψη (Wu, 2013).

### **Η χορήγηση μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων**

Η χορήγηση αλλογενών μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων ή κυττάρων του στρώματος (MSC) έχει δειχθεί ότι μειώνει την οργανική δυσλειτουργία και τη θνησιμότητα σε ζωικά μοντέλα σήψης, μέσω μηχανισμών που περιλαμβάνουν αντιμικροβιακές, αντι-αποπτωτικές, ανοσορυθμιστικές και προστατευτικές ιδιότητες (Walter, 2014, Kingsley, 2016). Η αντιμικροβιακή δράση των MSC διαμεσολαβείται από διάφορες αντιμικροβιακές πρωτεΐνες και πεπτίδια, όπως οι βακτηριακές defensins, η LL 37, η λιποκάλινη 2 (επίσης γνωστή ως NGAL) και ο παράγοντας ανάπτυξης κερατινοκυττάρων (KGF, επίσης γνωστός ως FGF7). Πολλαπλοί μηχανισμοί εμπλέκονται στην αντιφλεγμονώδη δράση των MSC, συμπεριλαμβανομένης της επαγωγής των IL-10, KGF και TSG6, και την αναστολή της p38 πρωτεϊνικής κινάσης που ενεργοποιείται από μιτογόνα (Walter, 2014, Kingsley, 2016, Nemeth, 2009, Monsel, 2015). Η χορήγηση των MSC στον άνθρωπο φαίνεται να είναι ασφαλής κι έχουν προγραμματιστεί ή έχουν ξεκινήσει τουλάχιστον δύο κλινικές δοκιμές πρώιμης φάσης σε ασθενείς με σήψη (US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov*, 2016, 2017).

### **Στοχεύοντας την αίμη**

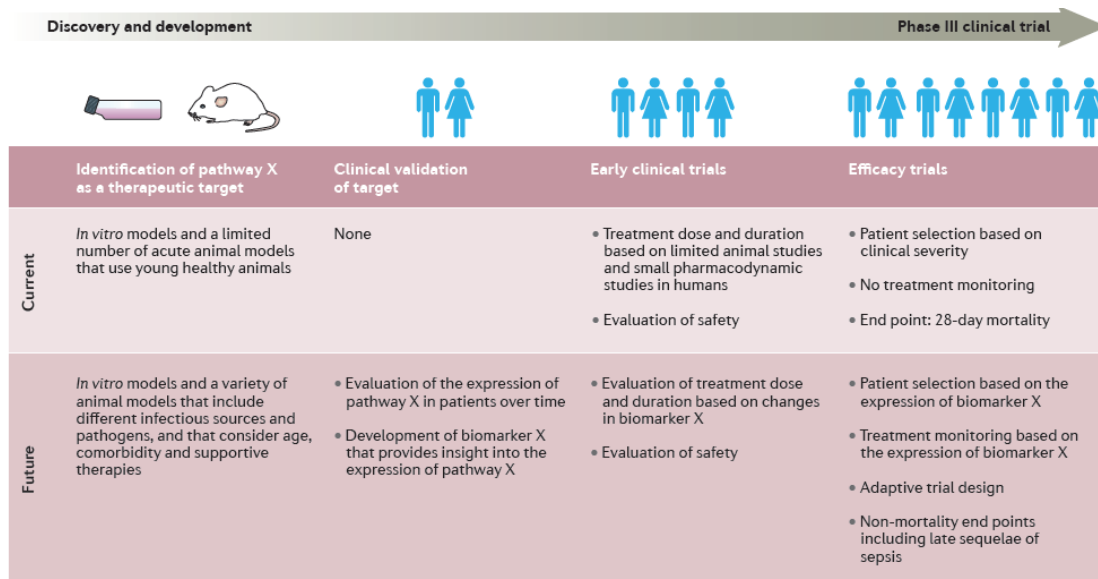
Η αιμόλυση είναι μια σοβαρή επιπλοκή της σήψης, η οποία αποτελεί στοιχείο για μια κακή έκβαση (Larsen, 2010). Πρόσφατα, η αίμη αναγνωρίστηκε ως ισχυρός αναστολέας της φαγοκυττάρωσης και της μετανάστευσης των φαγοκυττάρων, καθώς διαταράσσει την δυναμική του κυτταροσκελετού της ακτίνης (Martins, 2016). Ένας έλεγχος χημικών ουσιών αποκάλυψε ότι η κοινή φαρμακευτική ουσία κινίνη, η οποία χρησιμοποιείται κατά της ελονοσίας, μπορεί να αποτρέψει τις επιδράσεις της αίμης στον κυτταροσκελετό, να αποκαταστήσει τη

φαγοκυττάρωση και να βελτιώσει την επιβίωση σε μοντέλα σήψης ποντικών (Martins, 2016). Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η κινίνη θα μπορούσε να είναι μία πιθανή θεραπεία για επιλεγμένους ασθενείς με σήψη.

### **Θεραπείες που στοχεύουν επιγενετικές τροποποιήσεις στη σήψη**

Η ανακάλυψη διαταραχών σε επιγενετικές διεργασίες που ρυθμίζουν τη γονιδιακή μεταγραφή σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος κατά τη σήψη, πιθανόν οδηγεί σε νέες θεραπείες οι οποίες θα στοχεύουν αυτές τις διεργασίες για την αποκατάσταση της ανοσολογικής λειτουργίας.

Οι πιθανές προσεγγίσεις περιλαμβάνουν την επαγωγή της ανοσολογικής μνήμης και την αντιστροφή της ανοσοπαράλυσης με β-γλυκάνη (Novakovic, 2016), και τον άμεσο φαρμακολογικό χειρισμό των επιγενετικών ενζύμων. Ο αναστολέας του SIRT1, EX 527, έδειξε αξιοσημείωτα προστατευτικά αποτελέσματα κατά την κοιλιακή σήψη ποντικού: η θεραπεία με EX 527 ανέτρεψε την αδυναμία των λευκοκυττάρων να προσκολληθούν στην μικροαγγείωση του λεπτού εντέρου και την *in vivo* ανοχή στο LPS, αύξησε την συνάθροιση λευκοκυττάρων στο περιτόναιο και βελτίωσε την κάθαρση των περιτοναϊκών βακτηρίων (Vachharajani, 2014). Η αναστολή του SIRT2 στην πειραματική σήψη αντέστρεψε την κατεσταλμένη φλεγμονώδη απόκριση *in vivo* μέσω της ενεργοποίησης ενδοθηλιακών κυττάρων και κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων βελτιώνοντας την επιβίωση (Wang, 2016).



**Εικόνα 7. Η ανάπτυξη θεραπευτικών ουσιών για τη σήψη.** Η εύρεση των σωστών στόχων είναι το κλειδί για την ανάπτυξη θεραπευτικών φαρμάκων. Παραδοσιακά, οι στόχοι εντοπίζονται από μελέτες σε ζώα, στα οποία έχουν χορηγηθεί βακτηριακά προϊόντα, όπως είναι η ενδοτοξίνη, ή έχουν υποβληθεί σε λοίμωξη της κοιλιακής κοιλότητας, των πνευμόνων ή άλλων σημείων του σώματος. Αν και τα σημερινά ζωικά μοντέλα σήψης είναι χρήσιμα για τον προσδιορισμό θεραπευτικών στόχων, δεν αντικατοπτρίζουν επαρκώς την παρατεταμένη πορεία της σήψης που παρατηρείται στους ασθενείς και συνήθως δεν ενσωματώνουν μεταβλητές που είναι κοινές στην ανθρώπινη σήψη. Εάν εντοπιστούν δυνητικοί στόχοι σε ζωικά μοντέλα, η πιθανή συμμετοχή τους στην ανθρώπινη σήψη θα πρέπει να επαληθευτεί στους ασθενείς με τη λήψη λεπτομερών μετρήσεων με την πάροδο του χρόνου. (Πηγή: van der Poll *et al.*, 2017)

## **Μελλοντικές προοπτικές**

Επί του παρόντος, η σήψη είναι ένα σύνδρομο που καθορίζεται από κλινικά κριτήρια. Μέθοδοι που θα μπορούν να διαχωρίσουν τους ασθενείς σύμφωνα με ένα βιοχημικό και / ή ανοσολογικό προφίλ είναι απαραίτητες για την εξατομικευμένη ιατρική (Εικόνα 7). Οι νέες τεχνολογίες που παρέχονται από το πεδίο "omics" θα μπορούσαν να προσφέρουν μεγάλη βοήθεια στην ανάπτυξη αυτών των μεθόδων και να συνδέσουν την έκφραση του RNA, της πρωτεΐνης και των επιπέδων των μεταβολιτών με συγκεκριμένες επιπλοκές και αποτελέσματα. Με αυτό τον τρόπο, οι ασθενείς με σήψη θα μπορούσαν να χωριστούν σε υποομάδες που θα χαρακτηρίζονται από διαφορετική παθολογία. Η πρόκληση είναι να ανακαλύψουμε και να ταυτοποιήσουμε σύνολα βιοδεικτών που θα μπορούν να μετρηθούν σε κλινικά δείγματα, όπως το αίμα και τα ούρα, και οι οποίοι θα αντικατοπτρίζουν τα παθοφυσιολογικά γεγονότα που συμβαίνουν σε διαφορετικά σημεία σώματος. Τέτοιες ομάδες βιοδεικτών θα μπορούσαν να βοηθήσουν στον εντοπισμό των ασθενών εκείνων που θα μπορούσαν να ωφεληθούν από μια στοχευμένη θεραπεία σε κλινικές δοκιμές, καθώς και στην παρακολούθηση της επίδρασης της θεραπείας.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Arad G., Levy R., Nasie I., *et al.* Binding of superantigen toxins into the CD28 homodimer interface is essential for induction of cytokine genes that mediate lethal shock. *PLoS Biol.* 2011 Sep;9(9):e1001149.
2. Banerjee R., Özenci V., Patel R.. Individualized approaches are needed for optimized blood cultures. *Clin Infect Dis.* 2016; 63(10):1332-1339.
3. Bo L., Wang F., Zhu J., *et al.* Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) and granulocytemacrophage colony stimulating factor (GM-CSF) for sepsis: a meta-analysis. *Crit. Care* 2011; 15, R58.
4. Bone R. C., Balk R. A., Cerra F. B., *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest.* 1992; 101(6):1644-55.
5. Bretagne S. and Costa J. M.. Towards a molecular diagnosis of invasive aspergillosis and disseminated candidosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2005; 45:361–368.
6. Brown A. R., and Govan J. R.. Assessment of fluorescent in situ hybridization and PCR-based methods for rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex organisms directly from sputum samples. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45:1920–1926.
7. Bulger E. M., Maier R. V., Sperry J., *et al.* A Novel Drug for Treatment of Necrotizing Soft-Tissue Infections: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Surg.* 2014;149(6):528-36.
8. Chapin K., and Musgnug M.. Evaluation of three rapid methods for the direct identification of *Staphylococcus aureus* from positive blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:4324–4327.
9. Chelazzi C., Villa G., Mancinelli P., *et al.* Glycocalyx and sepsis-induced alterations in vascular permeability. *Crit. Care.* 2015; 19: 26.
10. Cleven B. E., Palka-Santini M., Gielen J., *et al.* Identification and characterization of bacterial pathogens causing bloodstream infections by DNA microarray. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:2389–2397.
11. Coopersmith C. M., Amiot D. M., Stromberg P. E., *et al.* Antibiotics improve survival and alter the inflammatory profile in a murine model of sepsis from *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Shock.* 2003; 19(5):408-14.
12. Cruz D.N., Antonelli M., Fumagalli R., *et al.* Early use of polymyxin B hemoperfusion in abdominal septic shock: the EUPHAS randomized controlled trial. *JAMA.* 2009;301(23):2445-52
13. Cuenca A. G., Delano M. J., Kelly-Scumpia K. M., *et al.* A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma. *Mol Med.* 2011; 17(3-4):281-92.

14. Davis T. E., Fuller D. D. & Aeschleman E. C.. Rapid, direct identification of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* from blood cultures using commercial immunologic kits and modified conventional tests. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1992; 15:295–300.
15. Delsing C. E., Gresnigt M. S., Leentjens J., *et al.* Interferon-gamma as adjunctive immunotherapy for invasive fungal infections: a case series. *BMC Infect Dis.* 2014; 14:166.
16. Deutschman C. S. & Tracey K. J.. Sepsis: current dogma and new perspectives. *Immunity.* 2014; 40, 463–475.
17. Döcke W. D., Randow F., Syrbe U., *et al.* Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med.* 1997;3(6):678-81.
18. Farrell J. J., Doyle L. J., Addison R. M., *et al.* Broad-range (pan) *Salmonella* and *Salmonella* serotype Typhi-specific real-time PCR assays: potential tools for the clinical microbiologist. *Am. J. Clin. Pathol.* 2005; 123:339–345.
19. Fleischmann C., Thomas-Rueddel D. O., Hartmann M., *et al.* Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis. *Dtsch Arztebl Int.* 2016; 113(10):159-66.
20. Forrest G. N., Mankes K., Jabra-Rizk M. A., *et al.* Peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization-based identification of *Candida albicans* and its impact on mortality and antifungal therapy costs. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:3381–3383.
21. Forrest G. N., Roghmann M. C., Toombs L. S., *et al.* Peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization for hospital-acquired enterococcal bacteremia: delivering earlier effective antimicrobial therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008; 52: 3558–3563.
22. Funke G. & Funke-Kissling P.. Use of the BD PHOENIX Automated Microbiology System for direct identification and susceptibility testing of gram-negative rods from positive blood cultures in a three-phase trial. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42:1466–1470.
23. Gaieski D. F., Edwards J. M., Kallan M. J. *et al.* Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit. Care Med.* 2013; 41, 1167–1174.
24. Gray S. J., Sobanski M. A., Kaczmarek E. B., *et al.* Ultrasound-enhanced latex immunoagglutination and PCR as complementary methods for non-culture-based confirmation of meningococcal disease. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37:1797–1801.
25. Haase G., Hall G., Johnson J. K., Merz W. G., *et al.* Multicenter evaluation of the *Candida albicans/Candida glabrata* peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization method for simultaneous dual-color identification of *C. albicans* and *C. glabrata* directly from blood culture bottles. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46:50–55.
26. Hall K. K. & Lyman J. A.. Updated review of blood culture contamination. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 19:788–802.



27. Hall M. W, Knatz N. L, Vetterly C., *et al.* Immunoparalysis and nosocomial infection in children with multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med.* 2011; 37(3):525-32.
28. Handschur M., Karlic H., Hertel C., *et al.* Preanalytic removal of human DNA eliminates false signals in general 16S rDNA PCR monitoring of bacterial pathogens in blood. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2009; 32:207–219.
29. Heininger A., Binder M., Schmidt S., *et al.* PCR and blood culture for detection of *Escherichia coli* bacteremia in rats. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37:2479–2482.
30. Hensley D. M., Tapia R. & Encina Y.. An evaluation of the Advandx *Staphylococcus aureus*/CNS PNA FISH assay. *Clin. Lab. Sci.* 2009; 22:30–33.
31. Hotchkiss R. S., Moldawer L. L., Opal S. M., *et al.* Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primers.* 2016; 2:16045.
32. Hotchkiss R. S., Monneret G. & Payen D.. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13, 862–874.
33. Hotchkiss R. S., Swanson P. E., Freeman B. D., *et al.* Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med.* 1999; 27:1230-51.
34. Jordan, J. A., Jones-Laughner J. & Durso M. B.. Utility of pyrosequencing in identifying bacteria directly from positive blood culture bottles. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47:368–372.
35. Inoue S., Unsinger J., Davis C. G., *et al.* IL-15 prevents apoptosis, reverses innate and adaptive immune dysfunction, and improves survival in sepsis. *J Immunol.* 2010;184(3):1401-9.
36. Kang J. H, Super M., Yung C. W., *et al.* An extracorporeal blood-cleansing device for sepsis therapy. *Nat Med.* 2014;20(10):1211-6.
37. Kasten K. R., Prakash P. S., Unsinger J., *et al.* Interleukin-7 (IL-7) treatment accelerates neutrophil recruitment through gamma delta T-cell IL-17 production in a murine model of sepsis. *Infect Immun.* 2010; 78(11):4714-22.
38. Kaukonen M., Bailey M., Suzuki S., *et al.* Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000–2012. 2014; *JAMA* 3 (11):1308–1316.
39. Khlif M., Mary C., H. Sellami A., *et al.* Evaluation of nested and real-time PCR assays in the diagnosis of candidaemia. *Clin. Microbiol. Infect.* 2009; doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02762.
40. Kingsley S. M. & Bhat B. V.. Could stem cells be the future therapy for sepsis? *Blood Rev.* 2016; **30**, 439–452.

41. Kirketerp-Moller K., Jensen P. O., Fazli M. *et al.* Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46:2717–2722.
42. Klingspor L., and Loeffler J.. Aspergillus PCR formidable challenges and progress. *Med. Mycol.* 2009; 47(Suppl. 1):S241–S247.
43. Koupetori M., Retsas T., Antonakos N., *et al.* Bloodstream infections and sepsis in Greece: over-time change of epidemiology and impact of de-escalation on final outcome. *BMC Infect Dis.* 2014;14:272.
44. Kumar A., Roberts D., Wood K. E., *et al.* Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit. Care Med.* 2006; 34:1589–1596.
45. Larsen R., Gozzelino R., Jeney V., *et al.* A central role for free heme in the pathogenesis of severe sepsis. *Sci Transl Med.* 2010;2(51):51ra71.
46. Leentjens J., Kox M., Koch R. M., *et al.* Reversal of immunoparalysis in humans in vivo: a double-blind, placebo-controlled, randomized pilot study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;186(9):838-45.
47. Leentjens J., Kox M., van der Hoeven J.G, *et al.* Immunotherapy for the adjunctive treatment of sepsis: from immunosuppression to immunostimulation. Time for a paradigm change? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2013; 187, 1287–1293.
48. Lehmann L. E., Alvarez J., Hunfeld K. P. *et al.* Potential clinical utility of polymerase chain reaction in microbiological testing for sepsis. 2009; *Crit. Care Med.* 37(12), 3085–3090.
49. Lehmann L. E., Hunfeld K. P., Emrich T., *et al.* A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med. Microbiol. Immunol.* 2008; 197:313–324.
50. Levi M., Schultz M. & van der Poll T. Sepsis and thrombosis. *Semin. Thromb. Hemost.* 2013; 39, 559–566.
51. Levi M. & van der Poll T. Inflammation and coagulation. *Crit. Care Med.* 2010; 38, S26–34.
52. Levy M. M., Fink M. P., Marshall J. C., *et al.* 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit. Care Med.* 2003; 31:1250–1256.
53. Louie L., Goodfellow J., Mathieu P., *et al.* Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci from blood culture bottles by using a multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(8):2786-90.
54. Louie R. F., Tang Z., Albertson T. E., *et al.* Multiplex polymerase chain reaction detection enhancement of bacteremia and fungemia. *Crit. Care Med.* 2008; 36:1487–1492.

55. Mancini N., Carletti S., Ghidoli N., *et al.* The era of molecular and other non-culture-based methods in diagnosis of sepsis. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23:235-51.
56. Mancini N., Carletti S., Ghidoli N., *et al.* Molecular diagnosis of polymicrobial sepsis. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47:1274-1275.
57. Mancini N., Clerici D., Diotti R., *et al.* Molecular diagnosis of sepsis in neutropenic patients with haematological malignancies. *J. Med. Microbiol.* 2008; 57:601-604.
58. Marshall J. C. Why have clinical trials in sepsis failed? *Trends Mol. Med.* 2014; 20, 195-203.
59. Martin S., Mannino M., Eaton S., *et al.* The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 1546-54.
60. Martins R., Maier J., Gorki A. D., *et al.* Heme drives hemolysis-induced susceptibility to infection via disruption of phagocyte functions. *Nat Immunol.* 2016;17(12):1361-1372.
61. Marvin L. F., Roberts M. A. & Fay L. B.. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta.* 2003; 337:11-21.
62. Matzinger P.. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* 1994; 12, 991-1045.
63. McPherson D., Griffiths C., Williams M., *et al.* Sepsis-associated mortality in England: an analysis of multiple cause of death data from 2001 to 2010. *BMJ Open.* 2013; 3(8).
64. Meisel C. *et al.* Granulocyte-macrophage colonystimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2009; 180, 640-648.
65. Mengoli C., Cruciani M., Barnes R. A., *et al.* Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2009; 9:89-96.
66. Millar C., Jiru X., Moore J., *et al.* A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *J. Microbiol. Methods* 2000; 42:139-147.
67. Miller M. B., Tang Y. W.. Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 2009; 22(4), 611-633.
68. Monsel A., Zhu Y. G., Gennai S., *et al.* Therapeutic Effects of Human Mesenchymal Stem Cell-derived Microvesicles in Severe Pneumonia in Mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;192(3):324-36.
69. Muhl H., Kochem A. J., Disque C., *et al.* Activity and DNA contamination of commercial polymerase chain reaction reagents for the universal 16S rDNA real-

- time polymerase chain reaction detection of bacterial pathogens in blood. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; doi:10.1016/j.diagmicrobio.2008.07.011.
70. Mussap M., Molinari M. P., Senno E., *et al.*. New diagnostic tools for neonatal sepsis: the role of a real-time polymerase chain reaction for the early detection and identification of bacterial and fungal species in blood samples. *J. Chemother.* 2007; 19(Suppl. 2):31–34.
  71. Nalos M., Santner-Nanan B., Parnell G., *et al.*. Immune effects of interferon gamma in persistent staphylococcal sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(1):110-2.
  72. Németh K., Leelahavanichkul A., Yuen P. S., *et al.*. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med.* 2009;15(1):42-9.
  73. Newcombe J., Cartwright K., Palmer W. H., *et al.*. PCR of peripheral blood for diagnosis of meningococcal disease. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34:1637–1640.
  74. Novakovic B., Habibi E., Wang S. Y., *et al.*.  $\beta$ -Glucan Reverses the Epigenetic State of LPS-Induced Immunological Tolerance. *Cell.* 2016;167(5):1354-1368.
  75. Null A. P., Hannis J. C., Muddiman D. C., *et al.*. Genotyping of simple and compound short tandem repeat loci using electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal Chem.* 2001; 73(18):4514-21.
  76. Opal S. M. & van der Poll T.. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. *J. Intern. Med.* 2015; 277, 277–293.
  77. Opota O., Croxatto A., Prod'hom G., *et al.*. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art. *Clin Microbiol Infect.* 2015; 21(4):313-22.
  78. Palka-Santini M., Putzfeld S., Cleven B. E., *et al.*. Rapid identification, virulence analysis and resistance profiling of *Staphylococcus aureus* by gene segment-based DNA microarrays: application to blood culture post-processing. *J. Microbiol. Methods.* 2007; 68:468–477.
  79. Paolucci M., Capretti M. G., Dal Monte P., *et al.*. Laboratory diagnosis of late-onset sepsis in newborns by multiplex real-time PCR. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58:533–534.
  80. Pardoll D. M. Immunology beats cancer: a blueprint for successful translation. *Nat. Immunol.* 2012; 13, 1129–1132.
  81. Parikh S. M. Dysregulation of the angiotensin–Tie-2 axis in sepsis and ARDS. *Virulence.* 2013; 4, 517–524.
  82. Patil N. K., Bohannon J. K. & Sherwood E. R. Immunotherapy: a promising approach to reverse sepsis-induced immunosuppression. *Pharmacol. Res.* 2016; 111, 688–702.

83. Payen D. M., Guilhot J., Launey Y., *et al.*. Early use of polymyxin B hemoperfusion in patients with septic shock due to peritonitis: a multicenter randomized control trial. *Intensive Care Med.* 2015;41(6):975-84.
84. Peleg A. Y., Y. Tilahun M. J. Fiandaca E. M., *et al.*. Utility of peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization for rapid detection of *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47:830–832.
85. Peters R. P., van Agtmael M. A., Gierveld S., *et al.*. Quantitative detection of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* DNA in blood to diagnose bacteremia in patients in the intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45:3641–3646.
86. Ποντίκης Κ. (2015). ΣΗΨΗ, Κουτσούκου Α., Βασιλειάδης Ι., Ροβίνα Ν., Ποντίκης Κ., Ντάγανου Μ., Αυγεροπούλου Σ., Κυριακοπούλου Μ., Ρωμανού Β., Βασικές αρχές εντατικής θεραπείας, Αθήνα, Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών.
87. Ramachandran G., Kaempfer R., Chung C. S., *et al.*. CD28 homodimer interface mimetic peptide acts as a preventive and therapeutic agent in models of severe bacterial sepsis and gram-negative bacterial peritonitis. *J Infect Dis.* 2015 Mar 15;211(6):995-1003.
88. Retamar P., Portillo M. M., López-Prieto M. D., *et al.*. SAEI/SAMPAC Bacteremia Group. Impact of inadequate empirical therapy on the mortality of patients with bloodstream infections: a propensity score-based analysis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(1):472-8.
89. Rochman Y., Spolski R. & Leonard W. J. New insights into the regulation of T cells by  $\gamma c$  family cytokines. *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9, 480–490.
90. Qian Q., Tang Y. W., Kolbert C. P., *et al.*. Direct identification of bacteria from positive blood cultures by amplification and sequencing of the 16S rRNA gene: evaluation of BACTEC 9240 instrument true-positive and false-positive results. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39:3578–3582.
91. Queipo-Ortuno M. I., Tena F., Colmenero J. D., *et al.*. Comparison of seven commercial DNA extraction kits for the recovery of *Brucella* DNA from spiked human serum samples using real-time PCR. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 27:109–114.
92. Rappaport T., Sawyer K. P. & Nachamkin I. Evaluation of several commercial biochemical and immunologic methods for rapid identification of gram-positive cocci directly from blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26:1335–1338.
93. Read S. J. Recovery efficiencies on nucleic acid extraction kits as measured by quantitative LightCycler PCR. *Mol. Pathol.* 2001; 54:86–90.
94. Reier-Nilsen T., Farstad T., Nakstad B., *et al.*. Comparison of broad range 16S rDNA PCR and conventional blood culture for diagnosis of sepsis in the newborn: a case control study. *BMC Pediatr.* 2009; 9:5.

95. Rhee C., Gohil S. & Klompas M. Regulatory mandates for sepsis care — reasons for caution. *N. Engl. J. Med.* 2014; 370, 1673–1676.
96. Riewald M. & Ruf W. Science review: role of coagulation protease cascades in sepsis. *Crit. Care.* 2003; 7, 123–129.
97. Sachse S., Straube E., Lehmann M., *et al.* Truncated human cytidylate-phosphatedeoxyguanylate-binding protein for improved nucleic acid amplification technique-based detection of bacterial species in human samples. 2009; *J. Clin. Microbiol.* 47(4), 1050–1057.
98. Sautter R. L., Bills A. R., Lang D. L., *et al.* Effects of delayed-entry conditions on the recovery and detection of microorganisms from BacT/ALERT and BACTEC blood culture bottles. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:1245–1249.
99. Schabereiter-Gurtner C., Nehr M., Apfalter P., *et al.* Evaluation of a protocol for molecular broad-range diagnosis of culture-negative bacterial infections in clinical routine diagnosis. *J. Appl. Microbiol.* 2008; 104:1228–1237.
100. Schwetz I., Hinrichs G., Reisinger E. C., *et al.* Delayed processing of blood samples influences time to positivity of blood cultures and results of Gram stain-acridine orange leukocyte Cytospin test. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45:2691–2694.
101. Seymour C. W., Iwashyna T. J., Cooke C. R., *et al.* Marital status and the epidemiology and outcomes of sepsis. *Chest.* 2010; 137, 1289–1296.
102. Shang S., Chen G., Wu Y., *et al.* Rapid diagnosis of bacterial sepsis with PCR amplification and microarray hybridization in 16S rRNA gene. *Pediatr. Res.* 2005; 58:143–148.
103. Shao R., Fang Y., Yu H., Zhao L., *et al.* Monocyte programmed death ligand-1 expression after 3-4 days of sepsis is associated with risk stratification and mortality in septic patients: a prospective cohort study. *Crit Care.* 2016;20(1):124.
104. Shepard J. R., Addison R. M., Alexander B. D., *et al.* Multicenter evaluation of a *Candida albicans* peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization probe for characterization of yeast isolates from blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43:2909–2912.
105. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W., *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315:801-10.
106. Sogaard M, Stender H, Schonheyder HC. Direct identification of major blood culture pathogens, including *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*, by a panel of fluorescence in situ hybridization assays using peptide nucleic acid probes. 2005; *J. Clin. Microbiol.* 43(4), 1947–1949.
107. Steinmann J., Buer J., Rath P. M., *et al.* Invasive aspergillosis in two liver transplant recipients: diagnosis by SeptiFast. *Transpl. Infect. Dis.* 2009; 11:175–178.

108. Stender H. PNA FISH: an intelligent stain for rapid diagnosis of infectious diseases. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2003; 3(5), 649–655.
109. Sun S., Zhao G., Liu C., *et al.* Treatment with anti-C5a antibody improves the outcome of H7N9 virus infection in African green monkeys. *Clin Infect Dis.* 2015; 60(4):586-95.
110. Sundararajan V., Macisaac C. M., Presneill J. J., *et al.* Epidemiology of sepsis in Victoria, Australia. *Crit. Care Med.* 2005; 33, 71–80.
111. Tang D., Kang R., Coyne C. B., *et al.* PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol. Rev.* 2012; 249, 158–175.
112. Thomas L. C., Gidding H. F., Ginn A. N., *et al.* Development of a real-time *Staphylococcus aureus* and MRSA (SAM-) PCR for routine blood culture. *J. Microbiol. Methods.* 2007; 68:296–302.
113. Turenne C. Y., Witwicki E., Hoban D. J., *et al.* Rapid identification of bacteria from positive blood cultures by fluorescence-based PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38:513–520.
114. Tuthill C., Rios I. & McBeath R.. Thymosin  $\alpha$  1: past clinical experience and future promise. *Ann. NY Acad. Sci.* 2010; 1194, 130–135.
115. Unsinger J., McGlynn M., Kasten K. R., *et al.* IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis. *J Immunol.* 2010;184(7):3768-79.
116. US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02246595> (2016).
117. US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02246595> (2016).
118. US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02640807> (2016).
119. US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02361528> (2016)
120. US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02883803> (2016).
121. US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02469857> (2017).
122. US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02797431> (2017).
123. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov*  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02421484> (2017).

124. Vachharajani V. T., Liu T., Brown C. M., *et al.* SIRT1 inhibition during the hypoinflammatory phenotype of sepsis enhances immunity and improves outcome. *J Leukoc Biol.* 2014;96(5):785-96.
125. van Vught L. A. Incidence, risk factors, and attributable mortality of secondary infections in the intensive care unit after admission for sepsis. *JAMA.* 2016; 315, 1469–1479.
126. Varani S., Stanzani M., Paolucci M., *et al.* Diagnosis of bloodstream infections in immunocompromised patients by real-time PCR. *J. Infect.* 2009; 58:346–351.
127. Venet F., Foray A. P., Villars-Méchin A., *et al.* IL-7 restores lymphocyte functions in septic patients. *J Immunol.* 2012;189(10):5073-81.
128. Vigano E. F., Vasconi E., Agrappi C., *et al.* Use of simulated blood cultures for time to detection comparison between BacT/ALERT and BACTEC 9240 blood culture systems. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2002; 44:235–240.
129. Vince A., Lepej S. Z., Barsic B., *et al.* LightCycler SeptiFast assay as a tool for the rapid diagnosis of sepsis in patients during antimicrobial therapy. *J. Med. Microbiol.* 2008; 57:1306–1307.
130. von Lilienfeld-Toal M., Lehmann L. E., Raadts A. D., *et al.* Utility of a commercially available multiplex real-time PCR assay to detect bacterial and fungal pathogens in febrile neutropenia. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47:2405–2410.
131. von Wintzingerode F., Böcker S., Schlötelburg C., *et al.* Base-specific fragmentation of amplified 16S rRNA genes analyzed by mass spectrometry: a tool for rapid bacterial identification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(10):7039-44.
132. Walter J., Ware L. B. & Matthay M. A. Mesenchymal stem cells: mechanisms of potential therapeutic benefit in ARDS and sepsis. *Lancet. Respir. Med.* 2014. **2**, 1016–1026.
133. Walton A. H., Muenzer J. T., Rasche D., *et al.*, Reactivation of multiple viruses in patients with sepsis. *PLoS One.* 2014; 9(2).
134. Wang X., Buechler N. L., Martin A., *et al.* Sirtuin-2 Regulates Sepsis Inflammation in ob/ob Mice. *PLoS One.* 2016; 11(8).
135. Ward P. A. The harmful role of C5a on innate immunity in sepsis. *J. Innate Immun.* 2010; 2, 439–445.
136. Wellinghausen N., Wirths B., Essig A., *et al.* Evaluation of the Hyplex BloodScreen multiplex PCR-enzyme-linked immunosorbent assay system for direct identification of gram-positive cocci and gram-negative bacilli from positive blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42:3147–3152.
137. Wellinghausen N., Wirths B., Franz A. R., *et al.* Algorithm for the identification of bacterial pathogens in positive blood cultures by real-time LightCycler polymerase chain reaction (PCR) with sequence-specific probes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2004; 48:229–241.



138. Westh H., Lisby G., Breysse F., *et al.*. Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of bloodstream pathogens in patients with suspected sepsis. *Clin. Microbiol. Infect.* 2009; doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02736.
139. White LE, Hassoun HT, Bihorac A, *et al.*. Acute kidney injury is surprisingly common and a powerful predictor of mortality in surgical sepsis. *J Trauma Acute Care Surg.* 2013; 75(3):432-8.
140. White P. L., Shetty A. & Barnes R. A.. Detection of seven *Candida* species using the Light-Cycler system. *J. Med. Microbiol.* 2003; 52:229–238.
141. Whittaker S.A., Mikkelsen M.E., Galeski D.F., *et al.*. Severe sepsis cohorts derived from claims-based strategies appear to be biased toward a more severely ill patient population. *Crit Care Med.* 2013; 41(4):945-53.
142. Wu J., Zhou L., Liu J., *et al.*. The efficacy of thymosin alpha 1 for severe sepsis (ETASS): a multicenter, single-blind, randomized and controlled trial. *Crit Care.* 2013;17(1).
143. Zaccone V., Tosoni A., Passaro G., *et al.*. Internal Medicine Sepsis Study Group. Sepsis in Internal Medicine wards: current knowledge, uncertainties and new approaches for management optimization. *Ann Med.* 2017; 1-11.
144. Zerva L., Bourantas K., Mitka S., Kansouzidou A., Legakis N. *et al.*. Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39:1661–4.
145. Zervou F. N., Zacharioudakis I. M., Kurpewski J., *et al.*. T2 Magnetic Resonance for Fungal Diagnosis. *Methods Mol Biol.* 2017; 1508:305-319.