

UNIwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Nauk o Zdrowiu

Tomasz Źródłowski

**Zastosowanie modyfikowanych technik fluorescencyjnej hybrydyzacji
in situ (FISH) i barwienia Grama jako testów skriningowych
w diagnostyce sepsy**

Praca doktorska

Praca wykonana w Zakładzie Molekularnej Mikrobiologii Medycznej – Katedra
Mikrobiologii Wydział Lekarski Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum
Kierownik jednostki: prof. dr hab. n. med. Małgorzata Bulanda

PROMOTOR: dr hab. Tomasz Gosiewski, prof. UJ
- Zakład Molekularnej Mikrobiologii Medycznej, Katedra Mikrobiologii, Collegium
Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

PROMOTOR POMOCNICZY: dr n. med. Mirosław Ziętkiewicz
- Oddział Anestezjologii i Intensywnej Terapii Pulmonologicznej, Krakowski Szpital
Specjalistyczny im. Jana Pawła II, Kraków
- Katedra Anestezjologii i Intensywnej Terapii, Collegium Medicum Uniwersytetu
Jagiellońskiego, Kraków

Kraków, 2020

PODZIĘKOWANIA

Składam serdeczne podziękowania wszystkim, dzięki którym możliwe było realizowanie badań wchodzących w skład niniejszej rozprawy doktorskiej oraz jej powstanie.

Szanownemu dr n. med. Mirosławowi Ziętkiewiczowi – Ordynatorowi Oddziału Anestezjologii i Intensywnej Terapii Pulmonologicznej Krakowskiego Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II, za nieocenioną pomoc, umożliwienie wykonania badań, za życzliwość i merytoryczne wsparcie, na które zawsze mogłem liczyć.

Dziękuję pracownikom Pracowni Mikrobiologii KSS JP2, szczególnie zaś Pani dr n. med. Aldonie Olechowskiej-Jarząb, za pomoc w pozyskaniu materiału do badań i ich realizacji.

Szczególne podziękowania kieruję do Pani dr n. med. Dominiki Salamon za wszechstronną pomoc, wsparcie podczas pisania tej pracy, za każdą cenną poradę i sugestię, a także za cały poświęcony czas.

Przede wszystkim dziękuję jednak mojemu Promotorowi, Panu dr hab. n. med. Tomaszowi Gosiewskiemu, prof. UJ, bez pomocy którego ta rozprawa nigdy by powstała. Współpraca z osobą tak bardzo oddaną nauce, a także nacechowaną życzliwością i zaufaniem, którymi mnie obdarzył pozostaną w mej pamięci stanowiąc wzorzec. Realizacja zawodowych celów pod okiem Pana Profesora jest dla mnie najwyższą nobilitacją.

Dziękuję też tym wszystkim, których tutaj nie wymieniłem, a którzy byli mi życzliwi i pomocni: zespołowi lekarskiemu, pielęgniarstwu, pracownikom Katedry Mikrobiologii UJ CM, oraz wielu innym osobom, z którymi miałem okazję współpracować i które zawsze będę serdecznie wspominać.

Pragnę też podziękować moim Rodzicom za cierpliwość i wytrwałość oraz wiarę w moje możliwości nawet wtedy, kiedy sam w siebie wątpiłem. Bez nich nie osiągnąłbym tego wszystkiego.

*Raz jeszcze bardzo serdecznie dziękuję.
Tomasz Źródłowski*

SPIS TREŚCI

I. WSTĘP	4
II. CYKL PUBLIKACJI	7
PRACA NR 1:	7
PRACA NR 2:	16
PRACA NR 3:	30
III. GENERALNE WNIOSKI:	51
IV. STRESZCZENIE:	52
V. SUMMARY:	53

I. WSTĘP

Sepsa to „zagrożająca życiu dysfunkcja narządowa spowodowana zaburzoną regulacją odpowiedzi ustroju na zakażenie”. Kryteria dysfunkcji narządów oparto o skalę SOFA (sepsis-related organ failure assessment – ocena niewydolności narządowej związanej z sepsą). Sepsę rozpoznaje się, jeśli w następstwie zakażenia lub podejrzanego zakażenia dochodzi do nagłej zmiany wydolności narządowej (zmiana o ≥ 2 punkty w skali SOFA). Skala niewydolności narządowej związanej z sepsą (SOFA) ocenia: układ nerwowy (skala Glasgow), układ krążenia (średnie ciśnienie tętnicze i stosowanie katecholamin), układ oddechowy (PaO_2/FiO_2), krzepnięcie krwi (liczbę płytek), stężenie bilirubiny i kreatyniny oraz diurezę (Singer et al.).

Łączna liczba zachorowań na sepsę na świecie jest trudna do ustalenia z powodu braku lub niedoskonałego raportowania. Szacuje się, że częstość występowania sepsy na świecie wynosi 31 milionów przypadków rocznie (437 na 100 000), a śmiertelność z nią związaną na około 5 milionów rocznie (Fleischmann et al.). Wg analizy przeprowadzonej w Stanach Zjednoczonych w latach 2009-2014, częstość sepsy oszacowano na 6% hospitalizowanych pacjentów (173690 pacjentów z sepsą na 2 901 019 hospitalizacji), a śmiertelność z nią związaną oceniono na 15% (Rhee et al.). W Polsce, według danych z 2007 roku, częstość występowania sepsy na oddziałach intensywnej terapii wynosiła 34%, ciężkiej sepsy 16%, a wstrząsu septycznego 6%, a roczna zachorowalność wynosiła 91/100 000 (Kubler et al.).

Podejście do bakteriemii w sepsie zmieniało się w czasie, ze względu na dostępne metody diagnostyczne. Diagnostyka mikrobiologiczna bakteriemii opierała się i nadal opiera na hodowli w systemach automatycznych (tzw. „złoty standard”). Zaletą tej metody jest jej prostota i relatywnie niski koszt. Wadą tej metody jest jej czasochłonność, sięgająca nawet kilku dni oraz niska czułość. Dodatkowo posiewy krwi u pacjentów septycznych stwierdza się w 15-61% przypadków, średnio w 30-50% (Gupta et al., Jamal et al.). Niski odsetek pozytywnych posiewów bakteryjnych, wykrycie endo- i egzotoksyn oraz ogólnoustrojowej reakcji zapalnej (SIRS - Systemic Inflammatory Response Syndrome) skłoniły do wysunięcia wniosków, że sepsie nie zawsze towarzyszy bakteremia, ale detekcja bakterii we krwi związana jest z wyższą śmiertelnością.

Celem zwiększenia wykrywalności drobnoustrojów we krwi, poszukiwane są nowe metody diagnostyczne oparte o alternatywę dla hodowli, np. metody molekularne, które są bardzo czułe i niezależne od stosowanej antybiotykoterapii.

Wykrywanie bakterii we krwi napotyka wiele trudności związanych z małą liczbą drobnoustrojów w próbce krwi, ich okresowym wysiewem do krwioobiegu, a także z powodu stosowanej antybiotykoterapii. Jeśli znane jest źródło, z którego następuje translokacja bakterii do krwi, wtedy łatwiej przewidzieć z jakim konkretnym czynnikiem etiologicznym zakażenia mamy do czynienia i zastosować ukierunkowaną antybiotykoterapię empiryczną. Niestety, lokalizacja źródła infekcji nie zawsze jest możliwa, a czas włączenia skutecznej antybiotykoterapii ma bezpośrednie przełożenie na szansę przeżycia.

Metody molekularne oparte o analizę materiału genetycznego np. SeptiFast (Roche), SepsiTTest (Molzym) czy VYOO (SIRA-Lab) są kosztowne i dostępne tylko w niektórych ośrodkach badawczych. System SeptiFast (Roche) (obecnie wycofany) wykorzystywał technikę real-time PCR i umożliwiał wykrywanie kilkunastu najczęściej spotykanych gatunków bakterii i grzybów w ciągu kilku godzin. Metoda SepsiTTest (Molzym) jest dwuetapowa. Pierwszy etap polega na degradacji ludzkiego DNA, wyodrębnienia DNA patogenów, usunięciu inhibitorów PCR. W drugim etapie następuje amplifikacja wybranych fragmentów rRNA i identyfikacja drobnoustroju za pomocą algorytmu bioinformatycznego BLAST. Metoda ta pozwala teoretycznie wykryć każdy mikroorganizm, ale konieczne jest sekwencjonowanie amplikonu, co zwiększa koszty badania i wydłuża czas oczekiwania na wynik.

Istnieje zatem potrzeba stworzenia szybkich, czułych i tanich badań skriningowych. W ramach pracy doktorskiej podjęta została próba zwiększenia wykrywalności bakterii we krwi za pomocą metody barwienia Grama i Fluorescencyjnej Hybrydyzacji in Situ (FISH) z zastosowaniem metodyki przedstawionej w poniższym cyklu trzech artykułów (w okresie od 2017 do 2020 roku), będących podstawą pracy doktorskiej (**sumaryczny wskaźnik Impact Factor = 7,815**).

LITERATURA:

Singer, Mervyn, et al. "The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)." *JAMA*, vol. 315, no. 8, American Medical Association, Feb. 2016, p. 801, doi:10.1001/jama.2016.0287.

Fleischmann, Carolin, et al. "Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-Treated Sepsis Current Estimates and Limitations." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 193, no. 3, 2016, pp. 259–72, doi:10.1164/rccm.201504-0781OC.

Rhee, Chanu, et al. "Incidence and Trends of Sepsis in US Hospitals Using Clinical vs Claims Data, 2009-2014". *JAMA*. 2017 Oct 3; 318(13): 1241–1249. doi: 10.1001/jama.2017.13836

Kübler, Andrzej, et al. "Wyniki Rejestru Przypadków Ciężkiej Sepsy Na Oddziałach Intensywnej Terapii w Polsce w Latach 2003–2009." *Anestezjologia Intensywna Terapia*, vol. 47, no. 1, 2015, pp. 7–13, doi:10.5603/AIT.2015.0002.

Gupta, Shipra, et al. "Culture-Negative Severe Sepsis." *Chest*, vol. 150, no. 6, Dec. 2016, pp. 1251–59, doi:10.1016/j.chest.2016.08.1460.

Jamal, Wafaa, et al. "Comparative Evaluation of BacT/ALERT 3D and BACTEC Systems for the Recovery of Pathogens Causing Bloodstream Infections." *Med Princ Pract*, vol. 15, 2006, pp. 223–27, doi:10.1159/000092186.

II. CYKL PUBLIKACJI

PRACA NR 1:

Fluorescent in situ hybridization and Gram-stained smears of whole blood as complementary screening tools in the diagnosis of sepsis. Źródłowski TW, Flis A, Ziętkiewicz M, Drwiła R, Gosiewski T. Pol Arch Intern Med. 2017; 127(2):122-124. doi: 10.20452/pamw.3949, (IF =2,882).

Celem badania było porównanie czułości hodowli krwi w systemie automatycznym, barwienia metodą Grama i metody FISH w wykrywaniu bakterii we krwi dorosłych pacjentów spełniających kryteria kliniczne sepsy.

Analizie poddano krew od 53 dorosłych pacjentów z objawami sepsy z Oddziału Anestezjologii i Intensywnej Terapii Krakowskiego Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II pobranych w latach 2012-2013. Badania uzyskały akceptację Komisji Bioetycznej UJ (KBET/94/B/2009). Kryteria włączenia do badania: pisemna zgoda pacjenta, spełnione wówczas obowiązujące kliniczne i laboratoryjne kryteria sepsy, która była definiowana jako ogólnoustrojowy zespół objawów powstający na skutek reakcji zapalnej (Systemic Inflammatory Response Syndrome - SIRS), wywołany zakażeniem. Kryteria wykluczenia: brak zgody pacjenta, brak objawów sepsy, niepełne zestawy krwi. Pojedynczy zestaw krwi składał się z butelek na hodowlę tlenową i beztlenową oraz osobnej próbki krwi żyłnej pobranej do probówki z antykoagulantem Vacutainer K₃EDTA (Becton Dickinson). Butelki poddawane były standardowej diagnostyce mikrobiologicznej opartej na hodowli monitorowanej w systemie automatycznym BacT/ALERT® 3D (bioMérieux) w Pracowni Mikrobiologii Krakowskiego Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II. Próbki krwi były natychmiast zamrażane w temperaturze minus 70-75°C i przesyłane do Katedry Mikrobiologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum celem przeprowadzenia dalszych badań, to jest barwienia metodą Grama oraz FISH.

Po rozmrożeniu, erytrocyty zostały poddane hemolizie za pomocą roztworu chlorku amonu, a uwolniona hemoglobina odseparowana, ponieważ stanowiła silne tło (również autofluorescencji). Powstała zawiesina była odwirowywana celem otrzymania zagęszczonego osadu, z którego następnie przygotowywano preparaty mikroskopowe Grama oraz FISH. Preparaty poddane barwieniu metodą Grama analizowano przy użyciu

mikroskopu świetlnego CX21 (Olympus). Preparaty poddane procedurze hybrydyzacji analizowano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego BX51 (Olympus) wyposażonego w obiektyw immersyjny 100x, lampę UV i kamerę F – View (Olympus). Celem wykrycia bakterii zastosowano następujące sondy znakowane fluoroforami (Genomed): dla wykrycia wszystkich gatunków bakterii łącznie posłużono się sondą EUB338:(FITC-5'–GCT GCC TCC CGT AGG AGT– 3'-FITC), dla rodzaju *Staphylococcus* stosowano sondę STA:(CY3-5'– TCC TCC ATA TCT CTG CGC 3'), a dla rodziny *Enterobacteriaceae* sondę ENT183:(CY3-5'– CTC TTT GGT CTT GCG ACG - 3'). Analizę obrazu prowadzono z wykorzystaniem oprogramowania komputerowego wersji AnalySYS (Soft Imaging). Do analizy statystycznej wykorzystano test Fishera, dwustronny (Gretl software ver. 1.9.4.). Weryfikację hipotez statystycznych przeprowadzono na poziomie istotności $p < 0,05$.

W sumie przebadano krew od 53 pacjentów z objawami sepsy za pomocą standardowej hodowli, barwienia Grama oraz metodą FISH. Uzyskano następujące odsetki wykrytych bakterii: hodowla 26,4% (n=14); barwienie Grama 43,4% (n=23) i FISH 50,9% (n=27). Czułość i specyficzność barwienia Grama w stosunku do hodowli wynosiła odpowiednio 85,7% i 71,8%, natomiast czułość i specyficzność metody FISH w stosunku do hodowli wynosiła 100% i 66,7%. Stwierdzono statystycznie istotne różnice między wynikami uzyskanymi metodą hodowli krwi i barwieniem metodą Grama ($F 0.00032$, $p < 0.01$) oraz hodowli i FISH ($F 0.00012$, $p < 0.01$). Czas potrzebny do uzyskania wyniku badania przy użyciu metod barwienia Grama i FISH wynosił około 4–5 godzin, zaś dla metody posiewu nawet 72 godziny.

Wnioski:

1. Wykorzystana metoda preparatyki krwi umożliwiła detekcję bakterii bezpośrednio w krwi żyłnej przy zastosowaniu zarówno metody barwienia Grama jak i FISH.
2. Zastosowane metody barwienia Grama jak i FISH dały istotnie wyższe odsetki pozytywnych wyników w porównaniu do metody hodowli, tj. „złotego standardu”.

Fluorescent in situ hybridization and Gram-stained smears of whole blood as complementary screening tools in the diagnosis of sepsis

Tomasz W. Źródłowski³, Agnieszka Flis², Mirosław Ziętkiewicz^{1,3}, Rafał Drwiła^{1,2}, Tomasz Gosiewski⁴

1 Department of Anesthesiology and Intensive Care, Faculty of Medicine, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland

2 Cardiac Anesthesia and Intensive Care Unit, John Paul II Hospital, Kraków, Poland

3 Thoracic Anesthesia and Respiratory Intensive Care Unit, John Paul II Hospital, Kraków, Poland

4 Bacteriology, Microbial Ecology and Parasitology Unit, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland

Introduction According to the Sepsis Definitions Task Force of the Society of Critical Care Medicine and European Society of Intensive Care Medicine, sepsis is currently defined as “life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection,”¹ and its diagnostic criteria rely on sepsis-related organ failure assessment scores—SOFA or qSOFA. Sepsis is diagnosed when SOFA score is 2 points or higher, if infection is present or suspected, or if there are 2 or more symptoms according to the qSOFA score (disorders of consciousness, systolic blood pressure ≤ 100 mmHg, respiratory rate ≥ 22 breaths/min). Additionally, systemic inflammatory response syndrome was left out of the definition of sepsis and the term “sepsis” replaced “severe sepsis.”

A proinflammatory response developing in an uncontrolled way in the body can lead to multiple organ dysfunction syndrome, including death. Therefore, discovering the source of infection early and determining the etiologic agent are crucial for the treatment optimization, employing effective targeted antibiotic therapy, and consequently, improving the prognosis for patients with sepsis.

Detection of bacteria in blood might prove difficult owing to their relatively small number and periodic seeding into the bloodstream, and also as a result of the antibiotic therapy applied, which reduces the chance of culturing them. Currently, the gold standard in microbiological diagnostics of blood is its culture in automated systems (eg, BACTEC [Becton Dickinson]). The disadvantage is that this method is time-consuming, taking

even several days, and has low sensitivity, which allows to detect microbial growth only in 15% to 30% of the culture.²

To improve the effectiveness of identifying the etiological agent in blood, attempts have been undertaken to detect lipopolysaccharide for Gram-negative bacteria or mannan and galactomannan for fungi, using serological methods. Other promising diagnostic tools are significantly faster and more precise molecular methods based on polymerase chain reaction (PCR). Molecular biology techniques are independent of prior antibiotic treatment and do not require bacterial or fungal growth in a culture medium.^{3,4}

Serological or molecular diagnosis based on the PCR methods is costly and requires specialized diagnostic laboratories. Screening methods would be extremely valuable as they could quickly reveal the presence of bacteria in the direct smear. Such methods include Gram staining and fluorescent in situ hybridization (FISH). Therefore, the objective of this study was to compare culturing with the modified method for blood sample preparation for Gram staining and FISH in the direct smear from blood.

Patients and methods A total of 53 blood samples from adult patients with suspected sepsis were analyzed on the basis of the clinical picture and laboratory tests results. The blood samples were taken from patients of the Department of Anesthesiology and Intensive Care in the John Paul II Hospital in Kraków, Poland, in the years from 2012 to 2013. The research was approved

Correspondence to:

Tomasz Gosiewski, PhD,
Zakład Bakteriologii, Ekologii
Drobnoustrojów i Parazytologii,
Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet
Jagielloński, Collegium Medicum,
ul. Czysta 18, 31-121 Kraków,
Poland, phone: +48 12 633 25 67,
e-mail: tomasz.gosiewski@uj.edu.pl
Received: December 12, 2016.

Revision accepted:

January 20, 2017.

Published online: February 28, 2017.

Conflict of interests: none declared.

Pol Arch Intern Med. 2017;

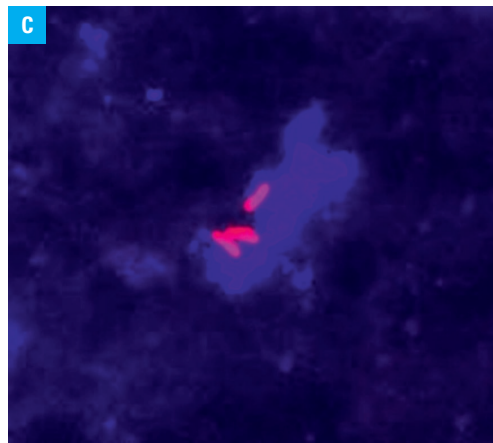
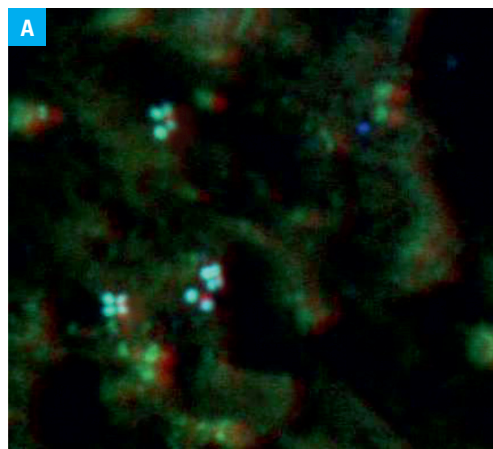
127 (2): 122-124

doi:10.20452/pamw.3949

Copyright by Medycyna Praktyczna,

Kraków 2017

FIGURE 1 Microscopic images (zoom, $\times 1000$); **A** – fluorescent in situ hybridization (FISH) smear with STA and EUB338 probes: visible *Staphylococcus* spp cells; **B** – Gram smear: visible Gram-positive cocci; **C** – FISH smear with ENT183 and EUB338 probes: visible *Enterobacteriaceae* cells; **D** – Gram smear: visible Gram-negative bacilli



by the Jagiellonian University Bioethics Committee (KBET/94/B/2009). Blood was drawn from patients who met the existing clinical criteria for sepsis.

The blood culture was carried out in the John Paul II Hospital in the Department of Microbiology, using the BacT/ALERT® 3D apparatus (bioMérieux, Hazelwood, Missouri, United States). Simultaneously, the blood samples were analyzed using FISH and Gram staining.

Fluorescent in situ hybridization in whole blood

Blood samples were subjected to in situ hybridization according to the method described by Gosiowski et al.⁵ In order to detect bacteria, the following fluorophore-labeled probes (Genomed, Warsaw, Poland) were used: probe EUB338 to detect all species of bacteria cumulatively: (FITC-5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT- 3'-FITC)⁶; probe STA—for the genus *Staphylococcus*: (CY3-5'-TCC TCC ATA TCT CTG CGC 3')⁷; and probe ENT183—for *Enterobacteriaceae* (CY3-5'-CTC TTT GGT CTT GCG ACG-3').⁸

The preparations were analyzed using the BX51 fluorescence microscope (Olympus, Ontario, Canada) equipped with an immersion objective 100 \times , an ultraviolet lamp, and an F-View camera (Olympus). Image analysis was carried out using the AnalySIS software (Soft Imaging, Ontario, Canada).

Preparation and gram staining of direct blood smears

Direct smears were prepared from blood samples ready for determination using FISH by conducting hemolysis of erythrocytes with a solution of ammonium chloride, and the leukocyte precipitate obtained was used to prepare microscope slides.⁵ Subsequently, standard Gram staining was applied. The preparations were examined using the CX21 light microscope (Olympus).

Statistical methods For statistical analysis, the 2-tailed Fisher exact test was used (Gretl software ver. 1.9.4., Toruń, Poland).

Results In total, 53 blood samples were tested using the blood culture, Gram-stained direct smears, and FISH (FIGURE 1A–1D), and the following percentages of positive results were obtained: 26.4% ($n = 14$); 43.4% ($n = 23$), and 50.9% ($n = 27$), respectively. Sensitivity and specificity for Gram staining and FISH compared to culture was 85.7% and 71.8% as well as 100% and 66.7%, respectively. Significant differences were found between the results obtained through blood culture and Gram staining ($F = 0.00032$; $P < 0.01$) as well as culture and FISH ($F = 0.00012$; $P < 0.01$). The time required to obtain test results using Gram staining and FISH amounted to about 4 to 5 hours, while for the culture it was even 72 hours.

Discussion Despite the tremendous progress in the diagnosis and treatment of sepsis, blood

culture still remains the gold standard in everyday clinical practice. Undoubtedly, the merits of this test are its simplicity, low cost, and the possibility of determining bacterial susceptibility to antibiotics. The downside of bacterial culture in blood is the time required to perform the test and low sensitivity. Bacteria can be cultured from blood only in about 15% to 30% of cases, and the result is obtained after 3 to 5 days, which may have serious consequences for the patient's health or even life.^{5,9} Hence, studies are being conducted to find alternative diagnostic methods, and they are mainly based on molecular biology research.^{2,4} Recently, our team demonstrated the presence of bacterial DNA in the blood of both healthy individuals and patients with sepsis. We noticed considerable taxonomic diversity between the 2 groups. Among healthy individuals, anaerobic bacteria DNA dominated in the blood, and in the group with sepsis, aerobic and microaerophilic bacteria DNA was mainly present.¹⁰ It brings us to a conclusion that the blood from each patient with symptoms of sepsis should be routinely tested for bacteremia.

In our study, we employed the FISH technique and Gram staining for direct smears of patients' blood subjected to preliminary preparation. It is common knowledge that Gram-stained direct smears do not constitute valuable diagnostic material because the image is obscured by erythrocytes. In literature, numerous reports can be found on the use of FISH for testing samples of fluids following blood culture.^{11,12}

Owing to hemoglobin sample purification in accordance with the methodology described by Gosiewski et al,⁵ in which a clear microscopic picture of good quality was obtained without background autofluorescence, the FISH method can be successfully applied today for whole blood, without prior culture. Analogous methods were used in the preparation of Gram smears, wherein erythrocytes were initially removed, and at the same time, the sample was concentrated.

High sensitivity of FISH testing (100%) and Gram staining (85.7%) was observed, but specificity was 85.7% and 71.8%, respectively. This difference most probably stems from the fact that a blood culture reveals only living and proliferating bacteria, while FISH and Gram staining can also confirm the presence of dead cells.¹² Blood culture has numerous limitations, including a small number of microbes in the blood and the use of antibiotics that inhibit the growth of bacteria. Furthermore, the strains cultured could have started through contamination. The shortcoming of our study was that we did not monitor the time of blood collection for microbiological testing in relation to the applied antibiotic treatment.

The highest proportion of positive results was obtained using the FISH method. Therefore, it seems that this method, based on molecular biology, may be successfully applied in laboratory diagnosis of sepsis as a screening tool while

waiting for the results of standard laboratory tests. The applied Gram staining may also be considered a rapid screening test on similar principles as cerebrospinal fluid direct smear testing; however, it shows lower sensitivity and specificity than FISH.

Excluding the fluorescence microscope and thermocycler equipment, the cost of FISH and Gram-staining analysis is lower than that of the PCR amplification.

The search for alternatives to the gold standard of blood culture is still a pressing issue. The methods that we propose could be used at least as complementary diagnostic tools before further progress in the diagnosis, management, and care of patients with sepsis is made.¹³

REFERENCES

- 1 Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315: 801.
- 2 Jamal W, Tamaray G, Pazhoor A, et al. Comparative evaluation of BacT/ALERT 3D and BACTEC systems for the recovery of pathogens causing bloodstream infections. *Med Princ Pract*. 2006; 15: 223-227.
- 3 Gosiewski T, Jurkiewicz-Badacz D, Sroka A, et al. A novel, nested, multiplex, real-time PCR for detection of bacteria and fungi in blood. *BMC Microbiol*. 2014; 14: 144.
- 4 Klouche M, Schröder U. Rapid methods for diagnosis of bloodstream infections. *Clin Chem Lab Med*. 2008; 46: 888-908.
- 5 Gosiewski T, Flis A, Sroka A, et al. Comparison of nested, multiplex, qPCR; FISH; SeptiFast and blood culture methods in detection and identification of bacteria and fungi in blood of patients with sepsis. *BMC Microbiol*. 2014; 14: 2323.
- 6 Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, et al. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol*. 1990; 56: 1919-1925.
- 7 Kempf VA, Trebesius K, Autenrieth IB. Fluorescent In situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 830-838.
- 8 Friedrich U, Van Langenhove H, Altendorf K, et al. Microbial community and physicochemical analysis of an industrial waste gas biofilter and design of 16S rRNA-targeting oligonucleotide probes. *Environ Microbiol*. 2003; 5: 183-201.
- 9 Loonen AJM, Wolffs PFG, Bruggeman CA, et al. Developments for improved diagnosis of bacterial bloodstream infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014; 10: 1687-1702.
- 10 Gosiewski T, Ludwig-Galezowska AH, Huminska K, et al. Comprehensive detection and identification of bacterial DNA in the blood of patients with sepsis and healthy volunteers using next-generation sequencing method – the observation of DNAemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017; 36: 329-333.
- 11 Calderaro A, Martinelli M, Motta F, et al. Comparison of peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization assays with culture-based matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of bacteria and yeasts from blood cultures and cerebrospinal fluid. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 8: 0468-0475.
- 12 Farina C, Perin S, Andreoni S, et al. Evaluation of the peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridisation technology for yeast identification directly from positive blood cultures: an Italian experience. *Mycoses*. 2012; 55: 388-392.
- 13 Alhazzani W, Jaeschke R. Resuscitation in sepsis in 2016. What's new? Dr. Waleed Alhazzani in an interview with Dr. Roman Jaeschke: part 1. *Pol Arch Med Wewn*. 2016; 126: 794-795.

Kraków, dnia 20 kwietnia 2020r.

Lek. Agnieszka Flis

(tytuł zawodowy, Imię i Nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**Fluorescent in situ hybridization and Gram-stained smears of whole blood as complementary screening tools in the diagnosis of sepsis**”, oświadczam, iż mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: rekrutacja pacjentów do badań.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Tomasza Źródłowskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wskazuje na indywidualny wkład lek. Tomasza Źródłowskiego przy opracowaniu koncepcji, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu tej pracy.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Agnieszka Flis', written over a horizontal dotted line.

(podpis współautora)

Kraków, dnia 20 kwietnia 2020r.

Dr n. med. Mirosław Ziętkiewicz

(tytuł zawodowy, Imię i Nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**Fluorescent in situ hybridization and Gram-stained smears of whole blood as complementary screening tools in the diagnosis of sepsis**”, oświadczam, iż mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: konsultacja wyników badań współudział w opracowaniu koncepcji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Tomasza Źródłowskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wskazuje na indywidualny wkład lek. Tomasza Źródłowskiego przy opracowaniu koncepcji, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu tej pracy.



(podpis współautora)

Kraków, dnia 20 kwietnia 2020r.

Prof. dr hab. n. med. Rafał Drwiła

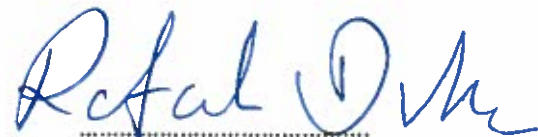
(tytuł zawodowy, imię i Nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**Fluorescent in situ hybridization and Gram-stained smears of whole blood as complementary screening tools in the diagnosis of sepsis**”, oświadczam, iż mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: konsultacja wyników badań oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Tomasza Źródłowskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wskazuje na indywidualny wkład lek. Tomasza Źródłowskiego przy opracowaniu koncepcji, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu tej pracy.



(podpis współautora)

Kraków, dnia 03 maja 2020r.

dr hab. Tomasz Gosiewski, prof. UJ

(tytuł zawodowy, Imię i Nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**Fluorescent in situ hybridization and Gram-stained smears of whole blood as complementary screening tools in the diagnosis of sepsis**”, oświadczam, iż mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: nadzór merytoryczny na prowadzeniem badań oraz interpretacją wyników i zatwierdzenie finalnej wersji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Tomasza Źródłowskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wskazuje na indywidualny wkład lek. Tomasza Źródłowskiego przy opracowaniu koncepcji, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu tej pracy.



.....
(podpis współautora)

PRACA NR 2:

Comparison of PCR, Fluorescent In Situ Hybridization and Blood Cultures for Detection of Bacteremia in Children and Adolescents During Antibiotic Therapy. Źródłowski TW, Jurkiewicz-Badacz D, Sroka-Oleksiak A, Salamon D, Bulanda M, Gosiewski T. Pol J Microbiol. 2018;67(4):479-486. doi: 10.21307/pjm-2018-056, (IF = 0,776).

Celem badania było określenie czułości hodowli krwi względem metod FISH i PCR w wykrywaniu bakterii we krwi dzieci i nastolatków z objawami klinicznymi sepsy, a także określenie jaki wpływ ma stosowana równolegle antybiotykoterapia na wykrywalność bakterii przy użyciu tych trzech metod diagnostycznych.

Analizie poddano krew od 92 dzieci z objawami sepsy wg kryteriów SIRS w wieku od pierwszego tygodnia życia do 18 roku życia z Oddziału Neuroinfekcji Dziecięcej (obecnie Oddział Pediatrii i Neurologii Dziecięcej) oraz z Oddziału Chorób Zakaźnych Wieków Dziecięcego (obecnie Oddział Chorób Infekcyjnych Dzieci i Hepatologii Dziecięcej) Krakowskiego Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II w latach 2010-2012 (30 miesięcy). Badania uzyskały akceptację Komisji Bioetycznej Okręgowej Izby Lekarskiej w Krakowie nr 30/KBL/OIL/2010 z dnia 17 marca 2010. Kryteria włączenia do badania: spełnione wówczas obowiązujące kliniczne i laboratoryjne kryteria sepsy, która była definiowana jako ogólnoustrojowy zespół objawów powstający na skutek reakcji zapalnej (Systemic Inflammatory Response Syndrome - SIRS), wywołany zakażeniem, zgoda opiekunów na badanie. Kryteria wykluczenia: brak zgody opiekunów, brak objawów sepsy. Wykluczono z analizy również pacjentów, od których co najmniej jedna metoda badania nie mogła być przeprowadzona z powodu zbyt małej objętości pobranej krwi. Objętość pobieranej krwi na hodowlę uzależniona była od wieku dziecka. U noworodków pobierano 1-2 ml krwi, u dzieci między 1 miesiącem a 2 rokiem życia 2-3 ml, u dzieci starszych 3-5 ml, u nastolatków 10 ml. Równolegle, niezależnie od wieku, pobierano 1 ml krwi żyłnej do probówek Vacutainer K₃EDTA (Becton – Dickinson). Krew pobrana do hodowli poddawana była inkubacji w systemie automatycznym BactAlert firmy bioMérieux w Pracowni Mikrobiologii Krakowskiego Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II. Próbkę krwi były natychmiast zamrażane i przechowywane w temperaturze minus 70-75°C, w Pracowni Mikrobiologii Uniwersytetu Jagiellońskiego do czasu analizy. Po rozmrożeniu, próbki krwi żyłnej poddawane były procesowi preparatyki, który został

opisany powyżej. Następnie otrzymany zagęszczony osad poddawany był dalszej preparatyce FISH jak w poprzednim badaniu oraz dodatkowo badaniu PCR.

Analizę próbek poddanych procesowi hybrydyzacji prowadzono przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego BX51 (Olympus) wyposażonego w obiektyw immersyjny 100x, lampę UV i kamerę F – View (Olympus). Do analizy obrazu FISH wykorzystano oprogramowanie komputerowe wersji AnalySYS (Soft Imaging). Izolację DNA drobnoustrojów z krwi przeprowadzono przy wykorzystaniu zestawu Blood Mini (A&A Biotechnology). Amplifikację PCR materiału genetycznego bakterii wykonano zgodnie z metodyką przedstawioną w pracy nr 2 cyklu. Do analizy statystycznej wykorzystano test χ^2 , test U-Manna Whitney’a oraz analizę wariancji – ANOVA (Gretl software ver. 1.9.4.). Weryfikację hipotez statystycznych przeprowadzono na poziomie istotności $p < 0,05$.

Łącznie krew pobraną od 92 dzieci z objawami sepsy poddano diagnostyce z zastosowaniem systemu hodowli automatycznej oraz metod molekularnych FISH i PCR. Odsetek wyników dodatnich w próbkach krwi badanych trzema metodami wynosił: 18,5% dla hodowli krwi, 39,1% dla FISH i 71,7% dla PCR. Uwzględniając antybiotykoterapię, u pacjentów bez leczenia w momencie pobierania krwi do badania odsetek wyników dodatnich wynosił: hodowla 25,5%, FISH 41,9% i PCR 67,4% oraz u pacjentów ze stosowaną antybiotykoterapią przed pobraniem krwi: hodowla 9,7%, FISH 36,7% i PCR 75,5%. Bakterie Gram dodatnie i Gram ujemne stanowiły odpowiednio: 47% i 53% z metody hodowli, 77,8% i 22,2% FISH oraz 42,4% i 53,3% PCR.

Wnioski:

1. Wykorzystana metoda preparatyki zwiększyła skuteczność wykrywania bakterii w porównaniu do tradycyjnej hodowli oraz umożliwiła ich detekcję w krwi przy użyciu metod FISH i PCR.
2. Antybiotykoterapia miała istotny wpływ na wykrywalność bakterii metodą hodowlaną, ale nie wpływała na wyniki metodą FISH i PCR.

Comparison of PCR, Fluorescent in Situ Hybridization and Blood Cultures for Detection of Bacteremia in Children and Adolescents During Antibiotic Therapy

TOMASZ W. ŻRÓDŁOWSKI¹, DANUTA JURKIEWICZ-BADACZ², AGNIESZKA SROKA-OLEKSIAK^{3,5},
DOMINIKA SALAMON³, MAŁGORZATA BULANDA⁴ and TOMASZ GOSIEWSKI^{3*}

¹Thoracic Anesthesia and Respiratory Intensive Care Unit, John Paul II Hospital, Cracow, Poland

²Vaccine Centre, John Paul II Hospital, Cracow, Poland

³Chair of Microbiology, Department of Molecular Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Jagiellonian University Medical College, Cracow, Poland

⁴Chair of Microbiology, Department of Epidemiology of Infection, Faculty of Medicine, Jagiellonian University Medical College, Cracow, Poland

⁵Department of Mycology, Chair of Microbiology, Faculty of Medicine, Jagiellonian University Medical College, Czysza 18; 31-121 Krakow, Poland

Submitted 26 June 2018, revised 11 September 2018, accepted 15 September 2018

Abstract

The gold standard in microbiological diagnostics of bacteremia is a blood culture in automated systems. This method may take several days and has low sensitivity. New screening methods that could quickly reveal the presence of bacteria would be extremely useful. The objective of this study was to estimate the effectiveness of these methods with respect to blood cultures in the context of antibiotic therapy. Blood samples from 92 children with sepsis were analyzed. Blood cultures were carried out in standard automated systems. Subsequently, FISH (Fluorescent In-Situ Hybridization) and nested multiplex-real-time-PCR (PCR) were performed. Blood cultures, FISH and PCR yielded positive results in 18%, 39.1%, and 71.7% of samples, respectively. Significant differences were found between the results obtained through culture before and after induction of antibiotherapy: 25.5% vs. 9.7%. There was no significant difference in FISH and PCR results in relation to antibiotics. The three methods employed demonstrated significant differences in detecting bacteria effectively. Time to obtain test results for FISH and PCR averaged 4–5 hours. FISH and PCR allow to detect bacteria in blood without prior culture. These methods had high sensitivity for the detection of bacteremia regardless of antibiotherapy. They provide more timely results as compared to automated blood culture, and may be useful as rapid screening tests in sepsis.

Key words: antibiotic therapy, FISH, PCR, sepsis

Introduction

Bacteremia is defined as a confirmed presence of one or more bacterial species in the blood (Albur et al. 2016). Sepsis is defined as a life-threatening organ dysfunction resulting from an impaired regulation of the response to an infection caused mainly by bacteremia. Criteria of organ dysfunction are based on Sepsis Related Organ Failure Assessment (SOFA) and quick Sepsis Related Organ Failure Assessment (qSOFA) scores. In the case of suspicion of a systemic infection, sepsis is diagnosed given ≥ 2 points in SOFA score or in the presence of ≥ 2 clinical signs in qSOFA score, including low blood pressure (SBP ≤ 100 mmHg), high respiratory rate (≥ 22 breaths/min) or altered mental

status (Glasgow coma scale < 15). To give a diagnosis, systemic inflammatory response syndrome (SIRS) criteria still come as useful, including leucocytosis, and also CRP and procalcitonin level.

Current recommendations are unfortunately only related to adults (Singer et al. 2016). The pediatric criteria thus far, largely based on SIRS, met with a lot of criticism similarly to adult criteria, since sepsis in children differs when it comes to clinical signs and symptoms, lab results and management (Goldstein et al. 2005; Churpek et al. 2015; Kaukonen et al. 2015). Implementation of new sepsis recommendations in pediatrics needs standardization of organ failure depending on age, which is especially difficult owing to the specific character of childhood diseases.

* Corresponding author: T. Gosiewski, Chair of Microbiology, Department of Molecular Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Jagiellonian University Medical College, Cracow, Poland; e-mail: tomasz.gosiewski@uj.edu.pl
© 2018 Tomasz W. Żródłowski et al.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

At present, it is considered that sepsis is the main cause of death in children globally (Dugani and Kissoon 2017). Epidemiologic data are incomplete, but it is estimated that infectious conditions are responsible for approximately 40% of deaths in children below 5 years of age. In 2015, the World Health Organization (WHO) has announced four main causes of death due to infectious conditions in children: pneumonia (16%), diarrhea (9%), neonatal sepsis (7%), malaria (5%), followed by measles (1%) and HIV/AIDS (1%) (WHO 2017).

Owing to limitations of the diagnostic criteria, it is still prevalent to identify the blood infection microbiologically, in order to definitely confirm sepsis.

The current "gold standard" of microbiological sepsis diagnostics is blood culture in automated systems. This method is of relatively small efficiency due to the low number of pathogens in the blood and the fact that it is time-consuming (up to 72 h), with 15–20% of results being positive (Jamal et al. 2006). Microbial growth inhibitors may additionally impede or delay the detection of microorganisms; therefore, it is recommended to administer adequate antibiotic therapy after blood for microbiological testing has been collected, but only if such collection will not significantly delay treatment (>45 min). Lack of specific pathogen identification yields empirical therapy. Ineffectiveness of such treatment may be life threatening or leads to permanent multi-organ dysfunction and failure to thrive.

There are ongoing efforts to improve the efficacy of microbial identification with alternative diagnostic techniques, independent of antibiotic therapy, such as serological (detection of lipopolysaccharide (LPS) of Gram-negative bacteria or mannan and galactomannan of fungi) or molecular methods FISH and PCR, detecting the DNA or RNA of pathogens in the blood. Unfortunately, molecular methods are costly, need special laboratory apparatuses but are quick (3–4 h) and sensitive (Klouche and Schröder 2008; Gosiewski, Jurkiewicz-Badacz, et al. 2014; Źródłowski et al. 2017). Identification of the etiological agent and prompt targeted therapy could lower mortality and permanent health consequences in patients.

The aim of the study was the evaluation of efficacy of FISH, PCR and blood culture in detection of the etiological factor of bacteremia in children and adolescents, before and after antibiotic treatment.

Experimental

Materials and Methods

Blood samples from 92 children and adolescents aged from 1 week to 18 years of age (mean age 4.7 years; standard deviations (SD) 3.54), with the clinical symp-

oms and blood lab results of sepsis, were analysed. Patients in the age group 2 to 5 years dominated (45%), followed by neonates (23.4%).

Blood samples originated from the Department of Neuroinfections and Pediatric Neurology as well as from the Department of Pediatric Infectious Diseases of the John Paul II Specialist Hospital in Cracow in the years 2010–2012 (30 months) according to SIRS criteria. The study was approved by the Bioethical Committee from the Regional Chamber of Physicians in Cracow, decision no. 30/KBL/OIL/2010 from 17 March 2010.

Inclusion criteria (at least two were to be met) (Levy et al. 2003) were as follows: i) body temperature over 38.5°C or below 36.0°C (rectal or oral); ii) leukocytosis over 2 SD for the given age; iii) clinical signs and symptoms or results of additional studies suggesting an infection (organ abscess, leukocytes present in physiologically sterile fluids, radiological evidence of pneumonia, hemorrhagic eruption), and iv) C-reactive protein (CRP) exceeding 50 IU/ml.

The patients excluded from the study group consisted of those that did not fulfil the inclusion criteria, or no permission was obtained from their lawful caretakers. Also excluded were the patients whose blood samples were of too small volume to conduct at least one of the test methods. Eventually, 92 patients were included into the study.

Microbiological examinations. Two blood samples were taken from each patient. The samples came from a separate puncture of a different vein. Sample volume depended on the patient's age. In neonates: 1–2 ml of blood was collected, in children from 1 month to 2 years of age: 2–3 ml, in older children: 3–5 ml, in teenagers: 10 ml. Blood samples underwent standard microbiological diagnostics based on the BactAlert (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) automated blood culture system in the Microbiology Laboratory of the John Paul II Specialist Hospital in Cracow. The incubation time used for detection of bacteria in automated blood culture was 7 days.

Molecular studies. Parallel molecular studies were performed on the blood samples using FISH and PCR. In order to perform molecular studies, 1.5 ml of blood was collected to Vacutainer K₃EDTA tubes (Becton Dickinson, Warsaw, Poland) from all patients, irrespective of age. Samples were frozen to –70°C, and then transferred to the Chair of Microbiology of Jagiellonian University Medical College in Cracow.

Microbial DNA isolation from blood. With the aim of determining the sensitivity of the PCR method, microbial DNA was isolated from 1.5-ml blood samples. DNA isolation was carried out according to the method described by Gosiewski et al. with the employment of a ready-to-use Blood Mini (A&A Biotechnology) kit (Gosiewski, Szała, et al. 2014).

PCR amplification. All the processes of DNA amplification were performed with the use of the real-time PCR method (qPCR) in a CFX96 thermal cycler (Bio-Rad) by employing the species-specific starters and TaqMan probes (Table IV), according to the procedure by Gosiewski et al. (Gosiewski, Flis, et al. 2014). Additionally, β -actin gene detection was performed in every sample of DNA isolated from blood in order to verify whether PCR inhibition takes place (Gosiewski, Jurkiewicz-Badacz, et al. 2014).

FISH method. 200 μ l of blood was subjected to preparation using 0.17 M of ammonium chloride solution (ICN Biomedicals) as in the case of preparing blood samples for DNA isolation until a pale pink pellet was obtained. The pellet was suspended in 20 μ l of sterile deionized water from which 10 μ l was transferred onto the surface of SuperFrost⁺Plus (Menzel-Glaser) microscope slide for hybridization in order to get a smear of approximately 10 mm in diameter. The preparation was dried under laminar flow and subsequently poured over with 500 μ l of 4% paraformaldehyde (Sigma) solution and incubated for 20 min at 4°C. Then, the preparation was washed with PBS and poured over with 2 ml of 96% methanol (POCH). The whole specimen was kept under cover for 15 min at 20°C. Upon completion of the fixation process, methanol was washed off with warm (37°C) PBS solution and placed on 20 μ l of diluted solution of lysozyme (1 mg/ml) (Sigma) and lysostaphin (0.05 mg/ml) (Sigma). It was incubated for 5 min at 37°C and then washed twice with sterile deionized water. Hybridization was performed with the use of single-chain oligonucleotide probes (Table IV) labelled with fluorochromes at 5' ends, targeted at the 16S rRNA conservative fragment typical for the studied group of bacteria, according to the protocol published by Gosiewski et al. (Gosiewski, Flis, et al. 2014).

Statistical methods. Chi-squared test, Mann-Whitney *U* test and analysis of variance (ANOVA) were used to compare the effect of antibiotic therapy on the effectiveness of culture, PCR and FISH. Fisher's exact test, two-tailed, was used to compare the effectiveness of methods (Gretl software ver. 1.9.4.). Verification of statistical hypotheses was performed at a significance level of $p < 0.05$.

Results

Data shown in Table I demonstrate that among the patients ($n = 92$) with blood samples collected and cultures performed before administration of antibiotics ($n = 51$), 25.5% of the samples were positive while 74.5% were negative. In the case of patients who had antibiotics administered prior to blood collection and blood cultures ($n = 41$), only 9.7% of the samples were positive

Table I
Antibiotic therapy vs. blood culture results.

Blood culture	Antibiotic therapy prior to blood collection	
	n	%
Negative	37	90.3
Positive	4	9.7
Total	41	100.0
Blood culture	Antibiotic therapy after blood collection	
	n	%
Negative	38	74.5
Positive	13	25.5
Total	51	100.0
Blood culture	Total	
	n	%
Negative	75	81.5
Positive	17	18.5
Total	92	100.0

$\chi^2 = 5.768$; $p = 0.024$; $V_c = 0.23$; Results significant: $p < 0.05$

Table II
Antibiotic therapy vs. FISH results.

FISH	Antibiotic therapy prior to blood collection	
	n	%
Negative	31	63.3
Positive	18	36.7
Total	49	100.0
FISH	Antibiotic therapy after blood collection	
	n	%
Negative	25	58.1
Positive	18	41.9
Total	43	100.0
FISH	Total	
	n	%
Negative	56	60.9
Positive	36	39.1
Total	92	100.0

$\chi^2 = 0.253$; not significant

and 90.3% negative – this difference was statistically significant. Gram-positive and Gram-negative bacteria constituted 47% ($n = 8$) and 53% ($n = 9$), respectively. In total, positive cultures were obtained from 18.5% ($n = 17$) of patients.

FISH results were positive in 36 out of 92 (39.1%) patients and demonstrated the presence of Gram-negative rods ($n = 4$), which constituted 11.1%, Gram negative coccus ($n = 4$) – 11.1% and Gram-positive coccus ($n = 28$) – 77.8% of all the bacteria detected.

Table II shows the relationship between antibiotic therapy and the FISH results. Chi-squared test did not

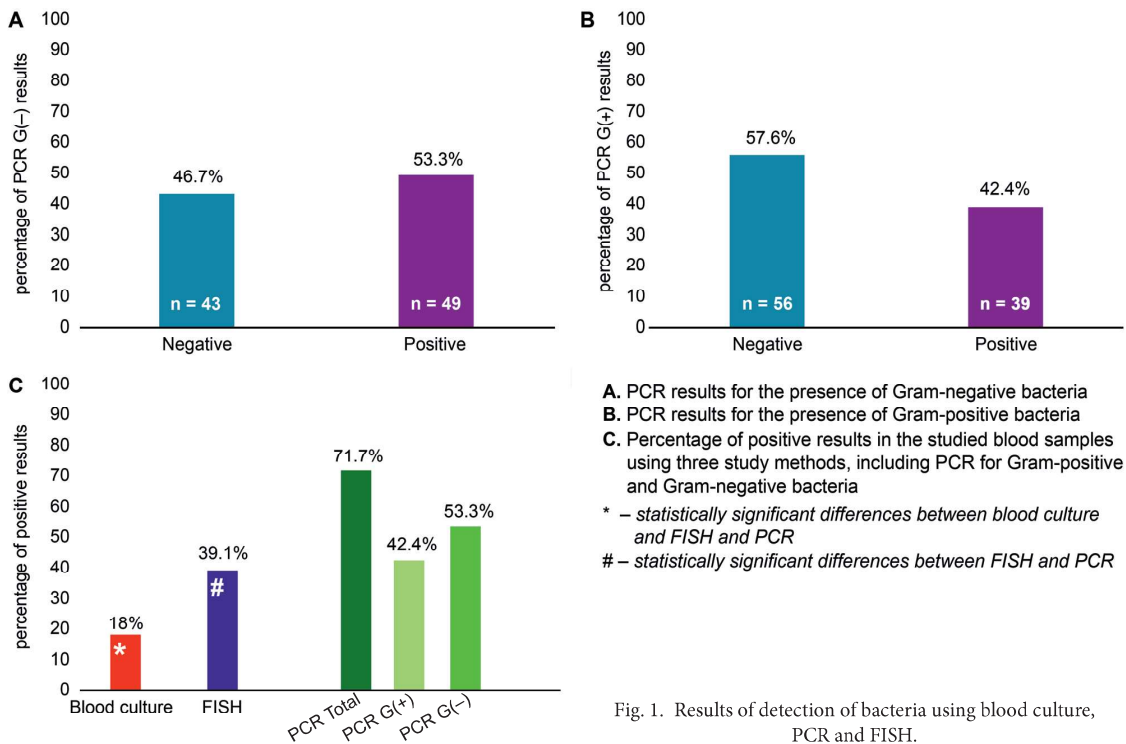


Fig. 1. Results of detection of bacteria using blood culture, PCR and FISH.

show any statistically significant differences between the attributes studied.

The PCR studies were performed for 92 patients in order to detect the presence of Gram-positive and Gram-negative bacteria. Amplification sensitivity was defined as the relation of the C_T value, i.e. the number of reaction cycle in which the linear increase of the

product cuts an established baseline 100 RFU (relative fluorescence unit) (Fig. 1). Table III shows the relationship between antibiotic therapy and PCR results. Chi-squared test did not show any statistically significant differences between the attributes studied.

Figure 1 demonstrates positive results of the three methods used in this study: blood culture, FISH and PCR. Statistically significant differences were found between the results obtained after blood culture and FISH ($F=0.0$, $P<0.05$), FISH and PCR ($F=0.0029$, $P<0.05$) as well as blood culture and PCR ($F=0.0108$, $P<0.01$). Fungal microorganisms were not found with any of the methods. No significant differences in the effectiveness of the detection of the bacteria by three methods used depended on the age and sex of patients.

Repeatability of results using the three methods (culture, FISH and PCR) amounted to 21 samples (22.8%). Compatibility between blood culture and PCR involved 40 samples (43.5%), between blood culture and FISH: 71 samples (77.1%), while between FISH and PCR it was observed for 50 samples (54.3%).

Table III
Antibiotic therapy vs. PCR results.

PCR	Antibiotic therapy prior to blood collection	
	n	%
Negative	12	24.5
Positive	37	75.5
Total	49	100.0
PCR	Antibiotic therapy after blood collection	
	n	%
Negative	14	32.6
Positive	29	67.4
Total	43	100.0
PCR	Total	
	n	%
Negative	26	28.3
Positive	66	71.7
Total	92	100.0

$\chi^2 = 0.731$; not significant

Discussion

The American College of Critical Care Medicine/ Pediatric Advanced Life Support (ACCM/PALS) published sepsis management guidelines. The “sepsis bundles” were proposed to improve treatment efficacy. The

Table IV
Sequences of primers and probes (Genomed) utilized in this study.

Amplification	Oligonucleotide	5'-3'	Origin	Target sequences
Bacteria	EXT_BAC_F	kGCGrACGGGTGAGTAA	(Gosiewski, Jurkiewicz-Badacz, et al. 2014)	16S rRNA
	EXT_BAC_R	CGCATTTACCCGCTA		
	*GN/GP_F	GACTCCTACGGGAGGC	(Bispo et al. 2011)	
	*GN/GP_R	GCGGCTGCTGGCAC		
	GP_Probe	Hex – CTGAyssAGCAACGCCGCG – TAMRA (Q)		
	GN_Probe	Cy5 – CCTGAysCAGCmATGCCGCG – BHQ-2		
β -actin gene (amplification inhibition control)	F	GCCAGTGCCAGAAGGCCAA	(Valle Jr et al. 2010)	Human β -actin gene
	R	TTAGGGTTGCCATAACAGC		
FISH	STA	CY3 – TCCTCCATATCTCTGCGC	(Kempf et al. 2000)	<i>Staphylococcus</i> spp. – 16S rRNA
	ENT 183	CY3-5' – CTCTTGGTCTTGCGACG	(Friedrich et al. 2003)	<i>Enterobacteriaceae</i> 16S rRNA
	EUB338	FITC – GCTGCCTCCCGTAGGAGT – FITC	(Amann et al. 1990)	All bacteria – 16S rRNA

main objectives were: hemodynamic stability, treatment of infection and lowering oxygen demand (de Oliveira et al. 2008). According to recommendations, intravenous antimicrobial therapy should be administered as early as possible, i.e. within 1 h of suspecting sepsis or septic shock. In a retrospective study, Kumar et al. (2006) have shown that early administration of appropriate antibiotics improved survival rates in adult patients with septic shock. Weiss et al. (2014) obtained similar results for children.

The success of therapy depends to a big extent on the identification of the etiological factor (Weinstein et al. 1983; Ibrahim et al. 2000; MacArthur et al. 2004). Presently, the “gold standard” for diagnosis of sepsis is a classic blood culture. Surely, the advantages of this method are its simplicity, low cost and the possibility to determine drug sensitivity of pathogens. The disadvantages of the method are the time consumption and low sensitivity. The average time from the blood collection to results is 3–5 days, and the proportion of positive cultures to the total number of cultures performed varies from 15 to 30%, depending on the studies (Jamal et al. 2006; Gosiewski, Flis, et al. 2014). Microbial growth inhibitors in the form of antibiotics play a major role in the negative culture results, what was shown in our study. Positive culture results were obtained from 25.5% of patients without prior antibiotic therapy, and from only 9.7% after antibiotic use (Table I). Owing to such results, the search for new techniques to identify pathogens in the blood is ongoing. FISH and PCR are relatively well known molecular techniques. FISH is generally used to study post-culture media samples (Farina et al. 2012). Presently, the method of sample purification was worked out by Gosiewski et al. and

a much clearer high-quality microscopic view was obtained without auto-fluorescence in the background, which allows the blood examination without the need for prior cultures (Gosiewski, Flis, Sroka, Kędzierska, et al. 2014). The PCR method is used, among others, in the commercially available Septi-Fast test (Roche). The study is based on the PCR technique and allows to identify 25 most common microorganisms responsible for over 90% of sepsis cases. In our study, a nested-multiplex real-time PCR method worked out by Gosiewski et al. was used (Gosiewski, Jurkiewicz-Badacz, et al. 2014; Gosiewski, Flis, et al. 2014).

In our study, both molecular methods turned out to be more sensitive and quicker than the classic culture and independent of antibiotic therapy. FISH and PCR were performed in 92 patients and positive results were obtained in 39.1% and 71.7% of patients, respectively, whereas using the classical blood culture approach – only in 18.5% the bacteria were detected. In some samples analysed, DNA of Gram-negative and Gram-positive bacteria was isolated simultaneously (42.4% versus 53.3%, respectively). Hence, the sum of results is higher than the positive results of PCR (71.7%). The difference in sensitivity of molecular tests vs. blood cultures results from the fact that cultures detect only living bacteria, which are able to grow, but molecular methods also confirm the presence of DNA that may originate from dead cells (Farina et al. 2012). Repeatability of results using the three methods was 22.8%. The calculation takes into account both consistent positive results as well as consistent negative results. The highest result repeatability (77.1%) was obtained when comparing blood cultures with FISH; therefore, it can be assumed that this analytical method could

be the best alternative to blood culture. On the other hand, it should be noted that FISH sensitivity is not high and amounts to circa 10^3 CFU/ml. Hence, it is possible that it was the reason of the highest compatibility with culture (Gosiewski et al. 2011). Furthermore, high percentage of Gram-positive bacteria may be due to contamination of the sample with skin bacteria during collection or processing, but non-template control (NTC) gave negative results in PCR. Unfortunately, we did not obtain consent of the bioethical commission, especially since the study also involved newborns. Our previous research showed that bacterial DNA could be detected by amplification method in the blood of healthy adult people but its taxonomic composition is completely different from the one seen in septic patients (Gosiewski et al. 2017). Also, these results are comparable to our previous studies (Gosiewski et al. 2005; Żródlowski et al. 2017). In the literature, there are no reports on using FISH to detect bacteria directly in the blood, except for the publications of our team; therefore, we cannot compare our results with other studies.

Molecular diagnostics of sepsis is a very hard task. Unfortunately, the methods of molecular biology encounter limitations while conducting microbiological diagnostic of the blood. The difficulty lies in isolating DNA matrix of a proper quality and of the highest possible concentration. Different species of bacteria, which may be biological agents inducing sepsis (sometimes polietiological) are characterized by varied susceptibility to cell lysis and, consequently, the propensity to efficient DNA isolation. An additional problem is constituted by the fact that the blood contains heme, which is a very strong inhibitor of DNA polymerases used in PCR (Opel et al. 2010). It is still the case that blood culture remains the basic diagnostic method, although theoretically a technical potential exists to detect pathogens with the molecular methods.

Acknowledgments:

This study was supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education within the framework of a project grant N N401 006739.

Conflict of interest

Author does not report any financial or personal connections with other persons or organizations, which might negatively affect the contents of this publication and/or claim authorship rights to this publication.

Literature

Albur M, Hamilton F, MacGowan AP. 2016. Early warning score: a dynamic marker of severity and prognosis in patients with Gram-negative bacteraemia and sepsis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 15:23.

Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol.* 56(6):1919–1925.

Bispo PJM, de Melo GB, Hofling-Lima AL, Pignatari ACC. 2011. Detection and gram discrimination of bacterial pathogens from aqueous and vitreous humor using real-time PCR assays. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52(2):873–881.

Churpek MM, Zdravcevic FJ, Winslow C, Howell MD, Edelson DP. 2015. Incidence and prognostic value of the systemic inflammatory response syndrome and organ dysfunctions in ward patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 192(8):958–964.

Dugani S, Kisson N. 2017. Global advocacy needed for sepsis in children. *J Infect.* 74 Suppl 1:S61–S65.

Farina C, Perin S, Andreoni S, Conte M, Fazii P, Lombardi G, Manso E, Morazzoni C, Sanna S. 2012. Evaluation of the peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridisation technology for yeast identification directly from positive blood cultures: an Italian experience. *Mycoses.* 55(5):388–392.

Friedrich U, Van Langenhove H, Altendorf K, Lipski A. 2003. Microbial community and physicochemical analysis of an industrial waste gas biofilter and design of 16S rRNA-targeting oligonucleotide probes. *Environ Microbiol.* 5(3):183–201.

Goldstein B, Giroir B, Randolph A. 2005. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics*. *Pediatr Crit Care Med.* 6(1):2–8.

Gosiewski T, Flis A, Sroka A, Kędzierska A, Pietrzyk A, Kędzierska J, Drwiła R, Bulanda M. 2014. Comparison of nested, multiplex, qPCR; FISH; SeptiFast and blood culture methods in detection and identification of bacteria and fungi in blood of patients with sepsis. *BMC Microbiol.* 14:313.

Gosiewski T, Jurkiewicz-Badacz D, Sroka A, Brzychczy-Włoch M, Bulanda M. 2014. A novel, nested, multiplex, real-time PCR for detection of bacteria and fungi in blood. *BMC Microbiol.* 14:144.

Gosiewski T, Kasprzyk A, Strus M. 2005. Comparison of the sensitivity of detection of bacteria in human blood using classic culture methods and molecular techniques: PCR and FISH. *Med Dosw Mikrobiol.* 57(3):319–325.

Gosiewski T, Ludwig-Galezowska AH, Huminska K, Sroka-Oleksiak A, Radkowski P, Salamon D, Wojciechowicz J, Kus-Slowinska M, Bulanda M, Wolkow PP. 2017. Comprehensive detection and identification of bacterial DNA in the blood of patients with sepsis and healthy volunteers using next-generation sequencing method – the observation of DNAemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 36(2):329–336.

Gosiewski T, Pietrzyk A, Brzychczy-Włoch M, Heczko P. 2011. Use of PCR and FISH methods for rapid identification of bacterial bloodstream infections. *Ann Acad Med Siles.* 65(5–6):14–22.

Gosiewski T, Szała L, Pietrzyk A, Brzychczy-Włoch M, Heczko PB, Bulanda M. 2014. Comparison of methods for isolation of bacterial and fungal DNA from human blood. *Curr Microbiol.* 68:149–155.

Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. 2000. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest.* 118(1):146–155.

Jamal W, Tamaray G, Pazhoor A, Rotimi VO. 2006. Comparative evaluation of BacT/ALERT 3D and BACTEC systems for the recovery of pathogens causing bloodstream infections. *Med Princ Pract.* 15(3):223–227.

Kaukonen K-M, Bailey M, Pilcher D, Cooper DJ, Bellomo R. 2015. Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. *N Engl J Med.* 372(17):1629–1638.

Kempf VA, Trebesius K, Autenrieth IB. 2000. Fluorescent in situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. *J Clin Microbiol.* 38(2):830–838.

- Klouché M, Schröder U.** 2008. Rapid methods for diagnosis of bloodstream infections. *Clin Chem Lab Med.* 46(7):888–908.
- Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, Suppes R, Feinstein D, Zanotti S, Taiberg L, et al.** 2006. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock*. *Crit Care Med.* 34(6):1589–1596.
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent J-L, Ramsay G, et al.** 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* 31(4):1250–1256.
- MacArthur RD, Miller M, Albertson T, Panacek E, Johnson D, Teoh L, Barchuk W.** 2004. Adequacy of early empiric antibiotic treatment and survival in severe sepsis: Experience from the MONARCS Trial. *Clin Infect Dis.* 38(2):284–288.
- de Oliveira CF, de Oliveira DSE, Gottschald AFC, Moura JDG, Costa GA, Ventura AC, Fernandes JC, Vaz FAC, Carcillo JA, Rivers EP, et al.** 2008. ACCM/PALS haemodynamic support guidelines for paediatric septic shock: an outcomes comparison with and without monitoring central venous oxygen saturation. *Intensive Care Med.* 34(6):1065–1075.
- Opel KL, Chung D, McCord BR.** 2010. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *J Forensic Sci.* 55(1):25–33.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche J-D, Cooper-Smith CM, et al.** 2016. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA.* 315(8):801.
- Valle Jr DL, Andrade JI, Cabrera EC, Rivera WL.** 2010. Evaluation of buffy coat 16S rRNA PCR, buffy coat culture and whole blood PCR for detection of bacteraemia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 105(2):117–122.
- Weinstein MP, Reller LB, Murphy JR, Lichtenstein KA.** 1983. The clinical significance of positive blood cultures: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. I. Laboratory and epidemiologic observations. *Rev Infect Dis.* 5(1): 35–53.
- Weiss SL, Fitzgerald JC, Balamuth F, Alpern ER, Lavelle J, Chilutti M, Grundmeier R, Nadkarni VM, Thomas NJ.** 2014. Delayed antimicrobial therapy increases mortality and organ dysfunction duration in pediatric sepsis*. *Crit Care Med.* 42(11):2409–2417.
- WHO. 2017. Causes of child mortality. Geneva (Switzerland): World Health Organization.
- Żródlowski TW, Flis A, Ziętkiewicz M, Drwiła R, Gosiewski T.** 2017. Fluorescent in situ hybridization and Gram-stained smears of whole blood as complementary screening tools in the diagnosis of sepsis. *Polish Arch Intern Med.* 127(2):122–124.

Kraków, dnia 20 kwietnia 2020r.

dr n. med. Danuta Jurkiewicz-Badacz

(tytuł zawodowy, Imię i Nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**Comparison of PCR, Fluorescent in Situ Hybridization and Blood Cultures for Detection of Bacteremia in Children and Adolescents During Antibiotic Therapy**”, oświadczam, iż mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: rekrutacja pacjentów oraz współudział w interpretacji wyników badań.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Tomasza Źródłowskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wskazuje na indywidualny wkład lek. Tomasza Źródłowskiego przy opracowaniu koncepcji; opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu tej pracy.



(podpis współautora)

Kraków, dnia 20 kwietnia 2020r.

dr n. med. Agnieszka Sroka-Oleksiak

(tytuł zawodowy, Imię i Nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**Comparison of PCR, Fluorescent in Situ Hybridization and Blood Cultures for Detection of Bacteremia in Children and Adolescents During Antibiotic Therapy**”, oświadczam, iż mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: przeprowadzenie analiz laboratoryjnych próbek przy pomocy PCR oraz FISH.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Tomasza Źródłowskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wskazuje na indywidualny wkład lek. Tomasza Źródłowskiego przy opracowaniu koncepcji, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu tej pracy.



(podpis współautora)

Kraków, dnia 20 kwietnia 2020r.

dr n. med. Dominika Salamon

(tytuł zawodowy, Imię i Nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**Comparison of PCR, Fluorescent in Situ Hybridization and Blood Cultures for Detection of Bacteremia in Children and Adolescents During Antibiotic Therapy**”, oświadczam, iż mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: współudział w interpretacji wyników badań oraz konsultacji merytorycznej manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Tomasza Źródłowskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wskazuje na indywidualny wkład lek. Tomasza Źródłowskiego przy opracowaniu koncepcji, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu tej pracy.



.....

(podpis współautora)

Kraków, dnia 20 kwietnia 2020r.

Prof. dr hab. n. med. Małgorzata Bulanda

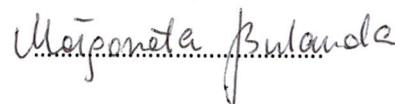
(tytuł zawodowy, Imię i Nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**Comparison of PCR, Fluorescent in Situ Hybridization and Blood Cultures for Detection of Bacteremia in Children and Adolescents During Antibiotic Therapy**”, oświadczam, iż mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: konsultacja wyników badań oraz współudział w opracowaniu koncepcji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Tomasza Źródłowskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wskazuje na indywidualny wkład lek. Tomasza Źródłowskiego przy opracowaniu koncepcji, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu tej pracy.



(podpis współautora)

Kraków, dnia 03 maja 2020r.

dr hab. Tomasz Gosiewski, prof. UJ

(tytuł zawodowy, Imię i Nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**Comparison of PCR, Fluorescent in Situ Hybridization and Blood Cultures for Detection of Bacteremia in Children and Adolescents During Antibiotic Therapy**”, oświadczam, iż mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: nadzór merytoryczny na prowadzeniem badań oraz interpretacją wyników i zatwierdzenie finalnej wersji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Tomasza Źródłowskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wskazuje na indywidualny wkład lek. Tomasza Źródłowskiego przy opracowaniu koncepcji, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu tej pracy.



.....
(podpis współautora)

PRACA NR 3:

Classical Microbiological Diagnostics of Bacteremia: Are the Negative Results Really Negative? What is the Laboratory Result Telling Us About the "Gold Standard"?
Źródłowski T, Sobońska J, Salamon D, McFarlane IM, Ziętkiewicz M, Gosiewski T.
Microorganisms. 2020 Feb 29;8(3). pii: E346. doi: 10.3390/microorganisms8030346,
(IF = 4,167).

Badanie miało na celu sprawdzenie czy zastosowanie metody preparatyki krwi opisanej w pracach nr 1 i 2 cyklu może zwiększyć wykrywalność bakterii nie tylko w próbkach krwi pobranych bezpośrednio od pacjentów, ale także w płynach pochodowlanych, w których nie wykazano wzrostu bakterii. Ponadto, sprawdzono, czy opisana metodyka może wykrywać bakterie także w próbkach krwi pobranych od zdrowych wolontariuszy.

Próbki krwi oraz podłoża hodowlane pochodziły od pacjentów z Oddziału Anestezjologii i Intensywnej Terapii Pulmonologicznej Krakowskiego Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II i zostały pobrane w latach 2017-2018. Badania uzyskały akceptację Komisji Bioetycznej UJ nr 1072.6120.131.2017 z dn. 28 września 2017. Kryteria włączenia do badania: pisemna zgoda pacjenta, spełnione aktualnie obowiązujące kryteria sepsy, bazujące na skali SOFA (Sepsis-related (Sequential) Organ Failure Assessment Score) definiującej niewydolność narządową. Sepsa, to nagłe zwiększenie wyniku oceny w skali SOFA o ≥ 2 pkt przy współistniejącym zakażeniu. Kryteria wykluczenia z badania: brak zgody pacjenta, SOFA < 2, niepełne zestawy krwi oraz wzrost bakterii w hodowli krwi. Kryteria włączenia do grupy kontrolnej: pisemna zgoda ochotnika, brak objawów infekcji.

Pobrano łącznie 96 zestawów krwi od pacjentów z rozpoznaną sepsą oraz 57 próbek krwi grupy kontrolnej od zdrowych ochotników. Pojedynczy zestaw składał się z krwi pobranej na hodowlę w kierunku bakterii tlenowych (10 ml) i beztlenowych (10 ml) oraz osobnej próbki krwi (2 ml) w probówce Vacutainer K₃EDTA (BectonDickinson). Krew pobrana na podłoże BacT/ALERT®3D(bioMérieux) analizowana była w automatycznym systemie wykrywania drobnoustrojów firmy BactAlert (bioMérieux), w Pracowni Mikrobiologii Krakowskiego Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II. Próbki krwi były natychmiast zamrażane i przechowywane w temperaturze minus 70-75°C w Pracowni

Mikrobiologii Uniwersytetu Jagiellońskiego do czasu analizy. Krew po hodowli, która nie wykazała wzrostu również była zamrażana i przechowywana w Pracowni Katedry Mikrobiologii UJ CM w temperaturze minus 70-75°C do czasu dalszej analizy. Następnie badany materiał rozmrażany był etapowo i poddawany dalszej obróbce zgodnie z procedurą opisaną w pracy nr 1 i badane przy pomocy metod barwienia Grama oraz FISH. Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej przy użyciu parametrycznych i nieparametrycznych testów za pomocą oprogramowania IBM SPSS Statistics Software, ver. 25 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Zmienne skategoryzowane poddano analizie z użyciem testu Chi-kwadrat lub testu Fishera. Zmienne ciągłe analizowano z użyciem testu t. Weryfikację hipotez statystycznych przeprowadzono na poziomie istotności $p < 0.05$.

Po wykluczeniu niepełnych zestawów krwi oraz hodowli, które wykazały wzrost, łącznie analizie metodą Gram i FISH poddano 82 zestawy próbek od pacjentów spełniających kryteria kliniczne sepsy oraz 57 próbek krwi pochodzących od zdrowych ochotników. Odsetek bakterii wykrytych przy pomocy metody barwienia Grama wynosił: 35,4% dla ujemnych hodowli tlenowych, 31,7% dla ujemnych hodowli beztlenowych, 62,2% dla próbek krwi pacjentów septycznych oraz 38,6% dla próbek krwi grupy kontrolnej. Odsetek wykrytych bakterii metodą FISH wynosił: 56,1% dla ujemnych hodowli tlenowych, 64,6% dla ujemnych hodowli beztlenowych, 75,6% dla próbek krwi pacjentów septycznych oraz 64,9% próbek krwi pochodzących od zdrowych ochotników. Na podstawie analizy obrazu mikroskopowego preparatów FISH z krwi i butelek ujemnych, pochodzących od pacjentów z sepsą oraz krwi z grupy kontrolnej stwierdzono, że we wszystkich przypadkach widoczne były skupiska komórek bakteryjnych, które uległy fagocytozie. W przypadku preparatów barwionych za pomocą metody Grama, nie uwidoczniono komórek fagocytujących (z uwagi na niespecyficzne barwienie), a jedynie skupiska komórek bakterii.

Analizie poddano również zgodność wyników uzyskanych z metod barwienia Grama i FISH. Wynik uznawano za zgodny, jeśli był pozytywny lub negatywny w przypadku obu metod diagnostycznych dla konkretnej próbki. W grupie z sepsą wyniki zgodne były odpowiednio w 86,6% dla próbek krwi żyłnej, 67,1% butelek beztlenowych i 79,3% butelek tlenowych, w grupie kontrolnej 73,7% dla próbek krwi. Zgodność

barwienia Grama z metodą FISH była istotna statystycznie ($p < 0.05$) dla wszystkich analizowanych wariantów w obu grupach.

Badano także korelację pomiędzy skalą SOFA (wartość średnia 6, przedział 17), stężeniem CRP (wartość średnia 194, przedział 644) i stężeniem prokalcytoniny (wartość średnia 6, przedział 102), a częstością pozytywnych lub negatywnych wyników badanych preparatów, ale badane parametry nie wykazały zależności istotnych statystycznie ($p > 0,05$).

Czas potrzebny do uzyskania wyniku badania przy użyciu metody barwienia Grama wynosił 1 godzinę, zaś dla FISH wynosił 4 godziny. W przypadku metody posiewu, uwzględniając czas hodowli nawet kilka dni.

Wnioski:

1. Wykorzystana metoda preparatyki krwi zwiększyła skuteczność wykrywania drobnoustrojów w porównaniu do tradycyjnej hodowli oraz umożliwiła detekcję bakterii we krwi pełnej zarówno barwieniem Grama jak i metodą FISH.
2. Najwyższy odsetek wyników pozytywnych uzyskano z użyciem metody FISH.
3. Barwienie Grama i metoda FISH umożliwiły także wykrycie bakterii w materiale po hodowli, który nie wykazał wzrostu.
4. Obie metody wykazały obecność bakterii zarówno u pacjentów z sepsą jak i u zdrowych ochotników, co potwierdza dotychczasowe doniesienia o stałej 'fizjologicznej' bakteriemii.
5. Zarówno u pacjentów z objawami sepsy jak i u osób zdrowych, zwizualizowane bakterie obecne były wewnątrz leukocytów (sfagocytowane).



Article

Classical Microbiological Diagnostics of Bacteremia: Are the Negative Results Really Negative? What is the Laboratory Result Telling Us About the “Gold Standard”?

Tomasz Źródłowski ^{1,2}, Joanna Sobońska ³, Dominika Salamon ³, Isabel M. McFarlane ⁴, Mirosław Ziętkiewicz ^{1,5,*} and Tomasz Gosiewski ^{3,*}

¹ Thoracic Anesthesia and Respiratory Intensive Care Unit, John Paul II Hospital, 31-202 Kraków, Poland; t.zrodowski@szpitaljp2.krakow.pl

² Department of Internal Medicine, St. John’s Episcopal Hospital, Far Rockaway, NY 11691, USA

³ Department of Molecular Medical Microbiology, Chair of Microbiology, Faculty of Medicine, Jagiellonian University Medical College, 31-121 Krakow, Poland; joanna.sobonska@uj.edu.pl (J.S.); dominika.salamon@uj.edu.pl (D.S.)

⁴ Department of Medicine, SUNY Downstate Medical Center, Brooklyn, NY 11203, USA; Isabel.McFarlane@downstate.edu

⁵ Department of Anesthesiology and Intensive Care, Faculty of Medicine, Jagiellonian University Medical College, 31-501 Krakow, Poland

* Correspondence: miroslaw.zietkiewicz@uj.edu.pl (M.Z.); tomasz.gosiewski@uj.edu.pl (T.G.)

† These authors contributed equally to this work.

Received: 8 February 2020; Accepted: 27 February 2020; Published: 29 February 2020



Abstract: Standard blood cultures require at least 24–120 h to be reported as preliminary positive. The objective of this study was to compare the reliability of Gram staining and fluorescent in-situ hybridization (FISH) for detecting bacteria in otherwise negative blood culture bottles. Ninety-six sets were taken from patients with a diagnosis of sepsis. Six incomplete blood culture sets and eight blood cultures sets demonstrating positive growth were excluded. We performed Gram stain and FISH on 82 sets taken from post-operative septic patients: 82 negative aerobic blood cultures, 82 anaerobic blood cultures, and 82 blood samples, as well as 57 blood samples taken from healthy volunteers. From the eighty-two blood sets analyzed from the septic patients, Gram stain visualized bacteria in 62.2% of blood samples, 35.4% of the negative aerobic bottles, and in 31.7% of the negative anaerobic bottles. Utilizing FISH, we detected bacteria in 75.6%, 56.1%, and 64.6% respectively. Among the blood samples from healthy volunteers, FISH detected bacteria in 64.9%, while Gram stain detected bacteria in only 38.6%. The time needed to obtain the study results using Gram stain was 1 h, for FISH 4 h, and for the culture method, considering the duration of growth, 5 days. Gram stain and FISH allow quick detection of bacteria in the blood taken directly from a patient. Finding phagocytosed bacteria, which were also detected among healthy individuals, confirms the hypothesis that blood microbiome exists.

Keywords: sepsis; bacteremia; blood culture; Gram staining; Fluorescence in-situ Hybridization(FISH)

1. Introduction

Sepsis is “a life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection” as defined by the Society of Critical Care Medicine and European Society of Intensive Care Medicine Task Force (SCCM/ESICM Sepsis Definitions Task Force). The preliminary diagnosis is usually based on the clinical picture and is often made before any laboratory results become available [1], while the

diagnostic and prognostic assessments are based on sepsis-related organ failure assessment (SOFA) or the quick SOFA (qSOFA) scores [2]. The SOFA score includes: PaO₂/FiO₂, the need of mechanical ventilation, Glasgow Coma Scale, mean arterial pressure, platelet count, bilirubin and creatinine level.

The global incidence of sepsis is difficult to ascertain due to lack of or insufficient reporting, but it ranges from 73.6/100,000 in the United States in 1979 to 1180/100,000 in Northern Australia from 2007 to 2008 [3,4]. In 2016, the global incidence of sepsis was estimated at 31 million cases per year (437 per 100,000) and its mortality, around 5 million/year. Being that sepsis is the main cause of mortality worldwide [5], the prompt identification of the source of infection and determination of the etiologic agent are important for optimization of therapy, including the selection of an effective, targeted antibiotic therapy, which can contribute to improved prognosis in patients with sepsis.

The detection of bacteria in the blood can be difficult due to a variety of causes ranging from the relatively small number of organisms at a given time, their periodic seeding into the bloodstream, and the antibiotic therapy applied which can remain in the culture media reducing the chances of recovering microorganisms in the cultures. The current gold standard in microbiological diagnostics involves culturing blood samples in automated systems such as BACTEC (Becton Dickinson). The flaws of the blood culture method include the time needed to detect growth, which can take up to several days, and its low sensitivity, leading to detection of microbial growth in the range 15–61% of cases with 30–50% on average [6,7].

Attempts have been made to enhance the effectiveness of detection of etiologic agents using serological and molecular methods. Serological methods identify microbial components, such as lipopolysaccharide (LPS) of Gram-negative bacteria or mannan and galactomannan of fungi [8–10], while molecular methods detect the microbial genetic material in a shorter time and with higher precision than the traditional culture method [11,12]. Molecular methods do not require microbial growth in a culture medium and do not depend on previous antibiotic therapy [13–15].

Serological and molecular diagnostics are, however, expensive and require special expertise. Therefore, screening methods could be very beneficial as they would facilitate the detection of bacteria (bacteremia) and fungi (candidemia) in the blood or, allow a higher efficacy of microorganism detection especially in standard blood culture that failed to show growth [16,17]. Among the screening methods, Gram staining and FISH (fluorescence in-situ hybridization) are useful as they allow the visualization of microbial cells in the direct smear [13,18–20].

Due to the poor recovery rate of the standard blood culture method, the objective of this study was to assess if the gold standard method may omit the presence of bacteria in some of the tested blood samples. We aimed to ascertain not only if detection of bacteremia is feasible utilizing Gram stain and FISH on reportedly negative blood cultures and blood samples of healthy volunteers but also to compare these two screening methods.

2. Materials and Methods

2.1. Patients

The study was conducted at the John Paul II Specialist Hospital in Cracow, Poland, which admits over 20,000 patients/year, and performs about 2000 open heart procedures and 1100 thoracic procedures annually.

Blood samples (2 mL) and standard blood culture were taken from patients admitted to the Intensive Care Unit (ICU) (Table 1). The study was conducted from August 1, 2017 to December 31, 2018. The patients who took part in the study had undergone thoracic surgery subsequently developing post-operative pulmonary complications for which intravenous antibiotics had been initiated. During the course of the ICU stay, the patients demonstrated new signs and symptoms of sepsis (SOFA \geq 2); laboratory tests were ordered including blood cultures and other basic labs. In total, 96 septic patients with a SOFA score \geq 2 points were enrolled in the study. SIRS score and inflammatory markers (CRP, procalcitonin) were monitored but were not a part of the inclusion criteria of the study.

Exclusion criteria were SOFA score < 2, incomplete blood sets, and growth of bacteria in blood cultures. The 57 healthy volunteers were recruited by advertisements posted in the hospital's Bulletin Board. Inclusion criteria was the absence of inflammation markers (CRP, leukocytosis).

Table 1. Clinical characteristics of studied patient groups.

	Sepsis Group – Blood Cultures		Control Group (n = 57)
	Negative (n = 82)	Positive (n = 8)	
Sex (male/female)	0.64 (± 0.2)	0.85 (± 0.4)	0.31 (± 0.1)
Age (year)	69.4 (± 11.2)	58.8 (± 9.4)	39.6 (± 7.9)
BMI (kg/m ²)	22.7 (± 4.8)	23.5 (± 3.8)	24.5 (± 1.9)
SOFA score	7.9 (± 4.1)	6.6 (± 4.7)	N/A
WBC (10 ⁹ /L)	17.2 (± 10.9)	18.1 (± 11.3)	4.5 (± 0.8)
CRP (mg/L)	194.1 (± 140.5)	175.5 (± 150.8)	1.4 (± 0.6)
PCT (ng/mL)	5.9 (± 0.6)	5.2 (± 0.7)	N/A

SOFA score - sepsis-related organ failure assessment; WBC – White Blood Cells; PCT – procalcitonin; CRP - C-reactive protein; BMI - Body Mass Index.

Ethics consideration: All subjects gave their informed consent for inclusion before they participated in the study. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Jagiellonian University Bioethical Committee (No. 1072.6120.131.2017) on 28 September 2017.

2.2. Samples

In total, 96 blood set were taken from septic patients with a SOFA score ≥ 2 points [2]: 2–3 blood sets were taken from different anatomical sites for standard microbiological diagnostics. A single set consisted of blood taken for aerobic and anaerobic bacterial cultures and a separate 2 mL blood sample. Under strict sterile conditions, blood cultures (aerobic and anaerobic bottles-FAN Plus media (bioMérieux) with adsorbent polymeric beads (APB) to neutralize antimicrobials) were drawn (10 mL each) from the patients with sepsis and inoculated into the BacT/ALERT[®]3D system (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) blood culture media. During the same phlebotomy, a 2-mL blood sample was also collected from the septic patients into VACUETTE[®] TUBE K3E (Becton Dickinson, Eysins, Vaud, Switzerland).

Fifty-seven 2-mL blood samples were drawn into VACUETTE[®] TUBE K3E (Becton Dickinson, Eysins, Vaud, Switzerland) from healthy volunteers under sterile conditions.

The blood culture bottles were sent promptly to the Microbiology laboratory and placed in the BacT/ALERT[®]3D system (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). The 2-mL blood samples from the septic patients and the healthy volunteers were stored at -72 °C until further analysis. After 5 days of incubation, the negative blood culture media were also frozen at -72 °C and maintained until enough samples had been collected prior to working in batches.

The next step was defrosting of the 2-mL blood samples and the blood culture media samples using a warm bath at 37 °C. After defrosting, the samples were ready to undergo the FISH method and Gram staining according to the procedures described below.

2.3. Blood Purification, Pellets Separation, and Direct Smear Preparation

Utilizing the methodology described by Gosiewski et al. (2017), erythrocytes and hemoglobin (creating a strong background) were removed from the blood samples and culture media using ammonium chloride solution. The next phase consisted of sample concentration by centrifugation.

The obtained pellet of leukocytes was then used to prepare the microscope slides for Gram staining and FISH [21,22].

2.4. Gram Staining

The standard Gram stain technique was carried out and the smears were examined using the CX21 light microscope (Olympus, Olympus Corporation, PA, USA 18034-0610).

2.5. Fluorescence in-situ Hybridization (FISH).

The blood samples were subjected to the FISH methodology previously described by our group, which allows the visualization of bacterial DNA or localized bacterial RNAs within cells [11,13]. The FISH technique can be summarized as follows: The leukocyte pellet sample was fixed utilizing 4% paraformaldehyde, followed by a 96% solution of methanol, air drying, application of the probe, denaturation by heating at approximately 50 °C, removing the unbound probe and applying 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma, Poznan, Poland) which is a fluorescent stain that binds strongly to adenine–thymine rich regions in the DNA. To detect bacteria in the samples, the following probes labelled with fluorophores were employed (Genomed, Warsaw, Poland): to detect all bacterial species-probe EUB338: (FITC-5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'-FITC) [23], for the genus *Staphylococcus*-probe STA: (CY3- 5'-TCC TCC ATA TCT CTG CGC 3') [24], and for the *Enterobacteriaceae*-probe ENT183: (CY3- 5'-CTC TTT GGT CTT GCG ACG-3') [25]. Leukocytes were stained using the DAPI dye (Sigma). The probes encompassed over 95% of bacterial taxa present in the blood of patients with sepsis. FISH smears were examined using a BX51 fluorescence microscope (Olympus) equipped with a 100x immersion objective, a UV lamp (Olympus, Olympus Corporation, PA, Corporation, USA 18034-0610) and an F-View camera (Olympus, PA, USA, 18034-0610). Image analysis was carried out with the use of AnalySYS (Soft Imaging, Warsaw, Poland) computer software.

2.6. Statistical Analysis

The results were subjected to statistical analysis using parametric and nonparametric tests using IBM SPSS Statistics Software, ver. 25 (IBM Corp., NY,10504-1722 USA). Categorical variables were examined using the chi-square test or Fisher's exact test. Continuous variables were analyzed using the t-test. Statistical hypotheses were verified at the significance level of $p < 0.05$.

3. Results

The patients who took part in the study met the SOFA criteria of sepsis after a thoracic surgery. The mean SOFA score ranged from 6.6 in patients with positive blood cultures to 7.9 in patients with negative blood cultures.

From the 96 sets taken from patients with a diagnosis of sepsis, six incomplete blood culture sets and eight blood culture sets demonstrating positive growth were excluded. The following microorganisms were found in blood samples excluded from the study: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* (two patients), *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus mitis*, *S. haemolyticus*, *Lactobacillus* spp., *Candida albicans*.

Therefore, 82 blood sets from the sepsis group (2-mL blood samples plus the aerobic and anaerobic bottles) and 57 blood samples from the control group were analyzed using both Gram stain and FISH.

Below, in Figures 1 and 2, the results of the study (Gram stain and the FISH method) are presented for the septic patients and the healthy volunteer groups.

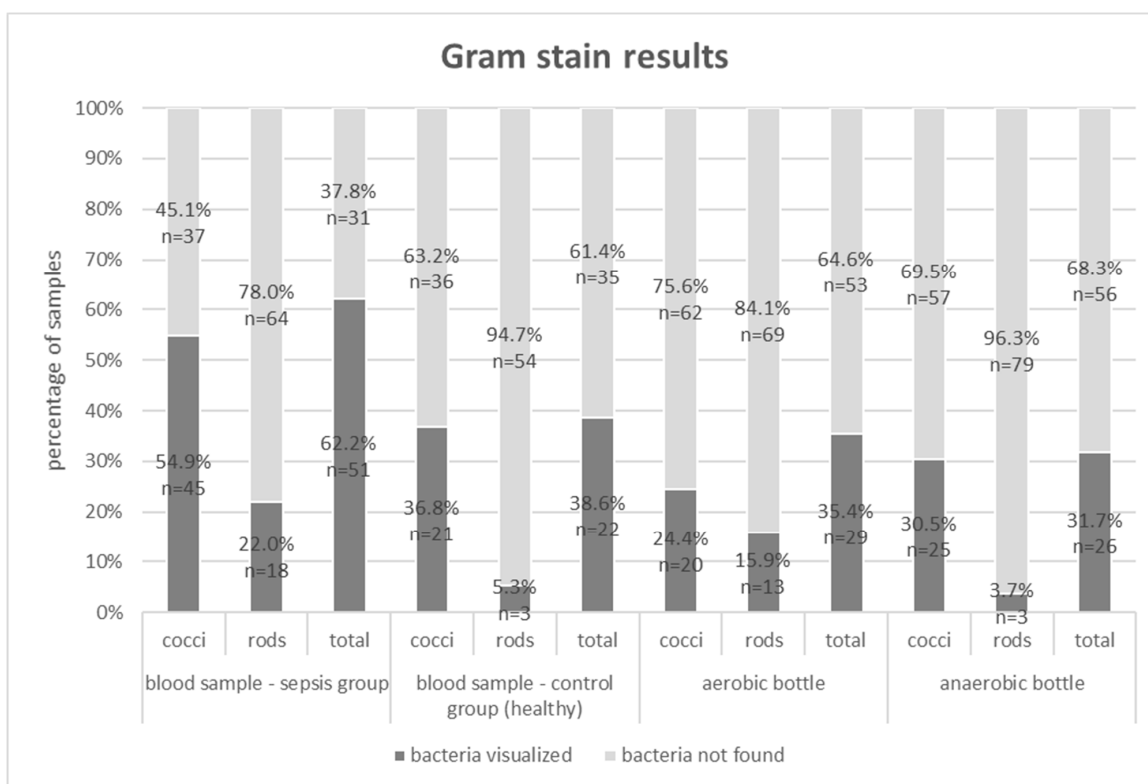


Figure 1. Gram stain results for blood samples, aerobic and anaerobic bottles in the group of patients with sepsis and for blood samples in the control group; (n)—absolute values of visualized bacteria.

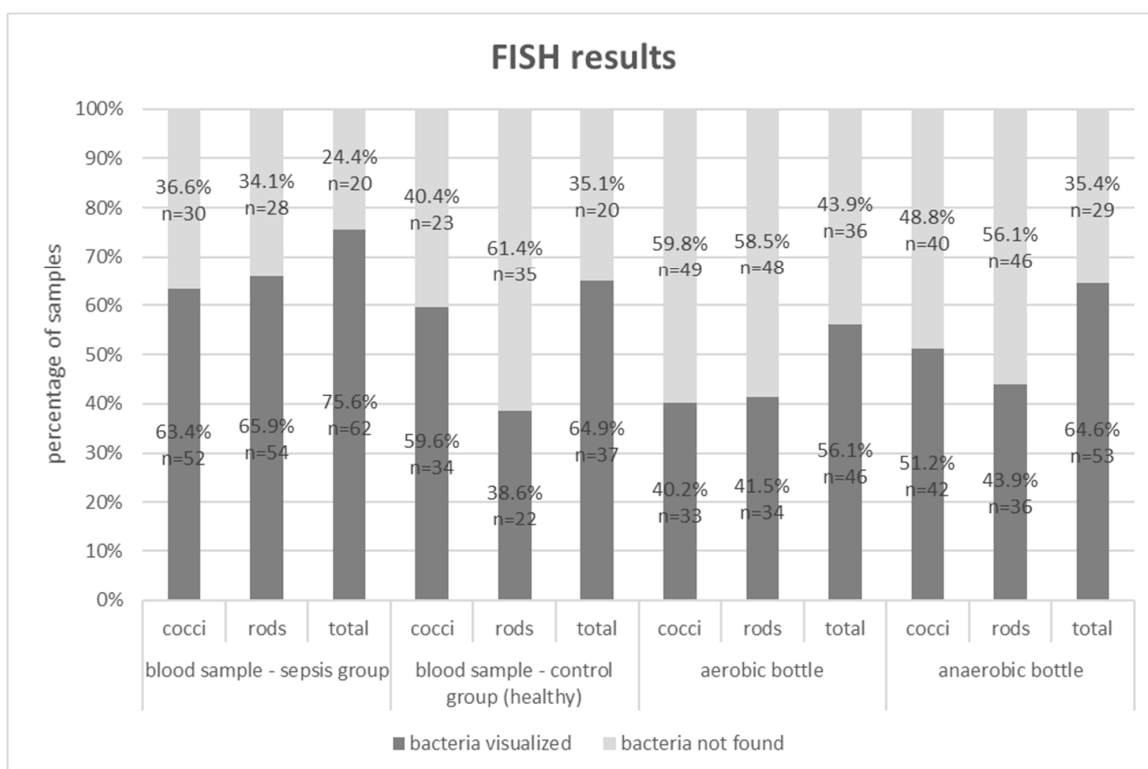


Figure 2. FISH results for blood samples, aerobic and anaerobic bottles in the group of patients with sepsis and for blood samples in the control group; (n)—absolute values of visualized bacteria.

“Total” for Gram stain and the FISH methods indicates that bacteria, including cocci, rods, and others were visualized. In the analyzed samples, Gram-negative and Gram-positive bacteria were often isolated simultaneously (e.g Gram staining of blood samples in sepsis group visualized cocci in 54.9% and rods in 22%). Hence, the sum of results is higher than the total positive results (62.2%).

The Gram stain technique was able to detect bacteria in 62.2% (51/82) of 2-mL blood samples from the sepsis group, 35.4% (29/82) of aerobic bottles, 31.7% (26/82) of anaerobic bottles, and in 38.6% (22/57) of 2-mL blood samples from the control group. The FISH methodology detected bacteremia in 75.6% (62/82) of 2-mL blood samples, 56.1% (46/82) of aerobic bottles, 64.6% (53/82) of anaerobic bottles and in 64.9% (37/57) of 2-mL blood samples from the control group (Figure 3). For each type of sample, FISH gave a higher percentage of positive results than the Gram staining method (Table 2). The differences were statistically significant ($p < 0.05$).

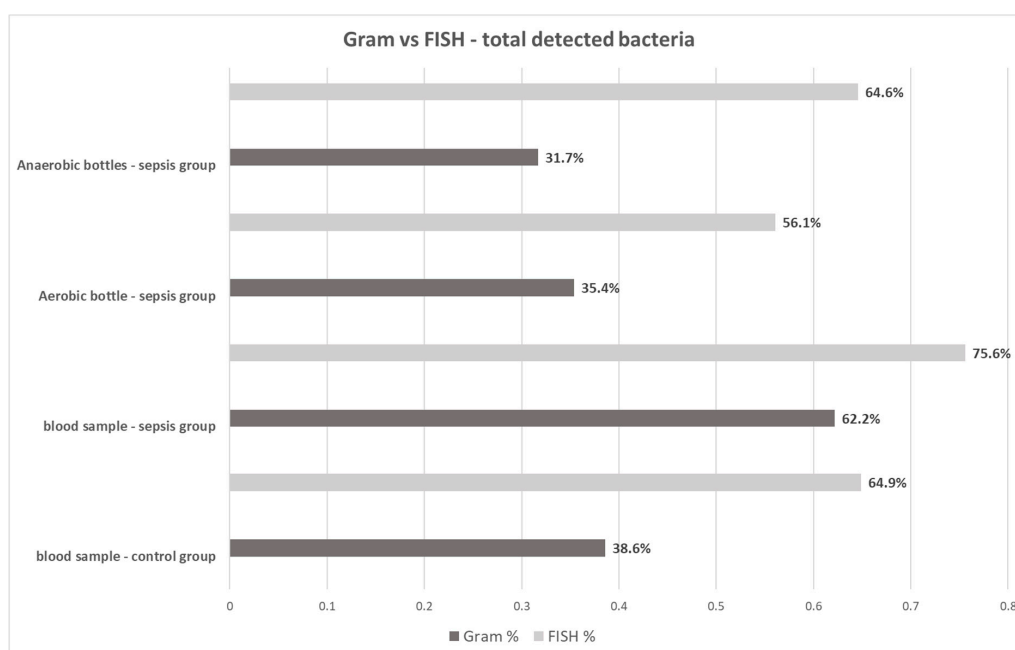


Figure 3. Total Gram stain and FISH results for blood samples, aerobic and anaerobic bottles in the group of patients with sepsis and for blood samples in the control group.

On the basis of microscopic image analyses of FISH smears from the blood, negative bottles derived from patients with sepsis and the blood from the control group, it was found that, in all the cases, there were clusters of bacterial cells which had undergone phagocytosis, visible in leukocytes stained blue with the use of DAPI (Figure 4). As for the smears that were Gram stained, phagocytic cells were not visualized (due to the nonspecific dye); however, there were clusters of bacterial cells.

Concordance of results obtained from Gram stain and FISH was also analyzed. The result was deemed concordant if, when applying both research methods, it was possible to visualize bacteria in the same sample or when no bacteria was found in the same sample. In the group with sepsis, the results were concordant in 86.6% for blood samples, 67.1% for anaerobic bottles, and 79.3% for aerobic bottles; in the control group, results were concordant in 73.68% for blood samples. The concordance of Gram stain and FISH was statistically significant ($p < 0.05$) for all variants analyzed in both groups.

Correlation was also studied between the SOFA score (mean 6, range 17), the levels of CRP (mean 194, range 644) and procalcitonin (mean 6, range 102), as well as the frequency of positive or negative results for the smears tested; however, the examined parameters did not show statistically significant dependencies ($p > 0.05$).

The time necessary to complete the testing using Gram stain was 1 h, while for FISH, it was 4 h.

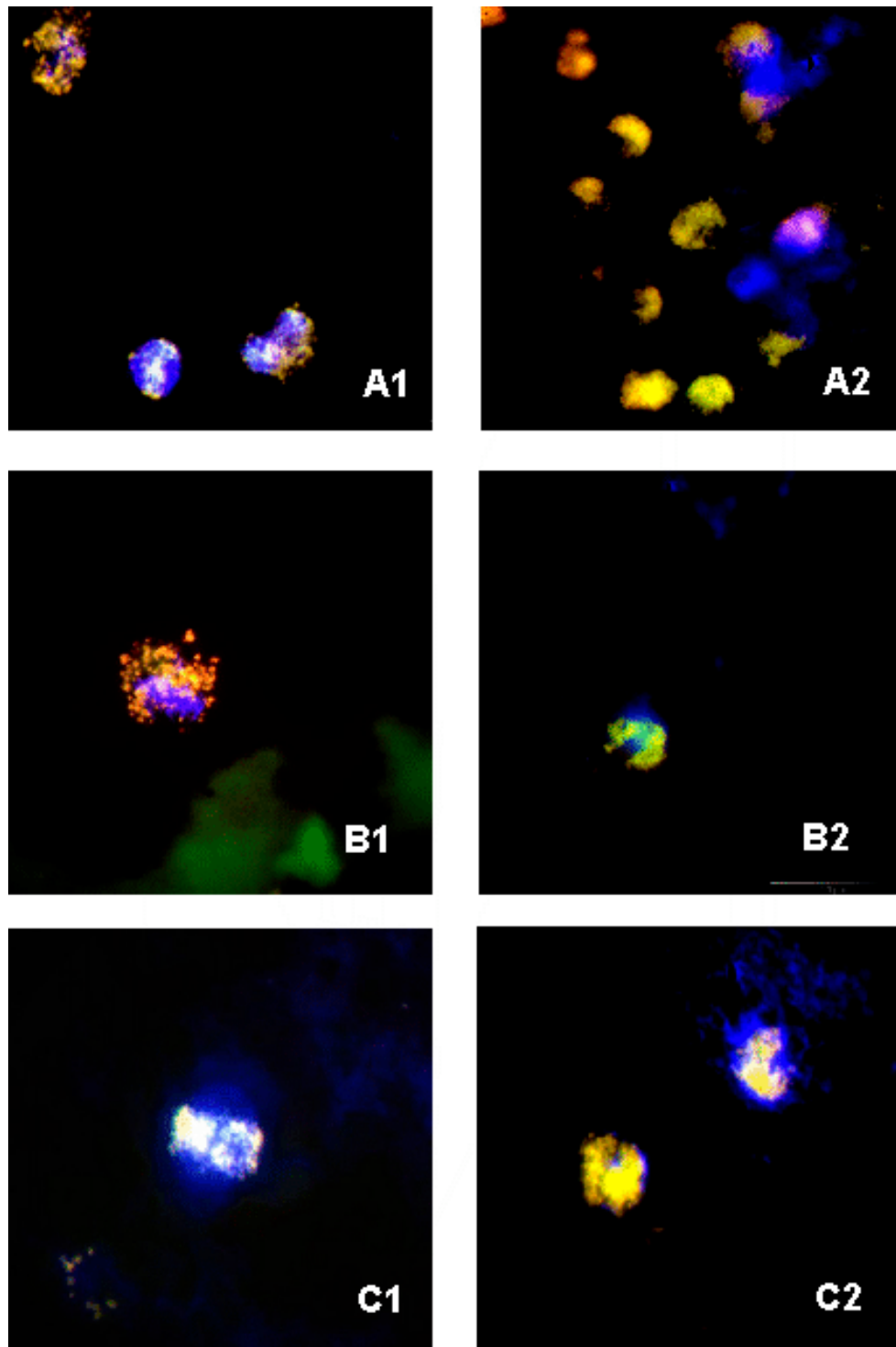


Figure 4. FISH photos from a fluorescent microscope: (A1,A2) blood sample from septic patients—smear with probes STA and EUB338—visible phagocytosed *Staphylococcus* spp. cells; (B1,B2) negative samples in blood culture media—smear with probes STA, ENT183 and EUB338—visible phagocytosed *Staphylococcus* spp. and *Enterobacteriaceae* cells; (C1,C2) blood sample from healthy volunteers—smear with probes STA and EUB338 smear with probes STA, ENT183 and EUB338— visible phagocytosed *Staphylococcus* spp. and *Enterobacteriaceae* cells. 1000x zoom.

Table 2. Quantitative comparison of positive and negative results obtained by Gram staining and FISH methods for blood samples, aerobic and anaerobic bottles in the group of patients with sepsis and for blood samples in the control group.

Gram stain	[%]	FISH	
		bacteria not found	bacteria visualized
Blood Samples – Control Group			
	bacteria not found	35.1	26.3
	bacteria visualized	0.0	38.6
Blood Samples – Sepsis Group			
	bacteria not found	24.4	13.4
	bacteria visualized	0.0	62.2
Aerobic Bottles Samples – Sepsis Group			
	bacteria not found	43.9	20.7
	bacteria visualized	0.0	35.4
Anaerobic Bottles Samples – Sepsis Group			
	bacteria not found	24.4	45.3
	bacteria visualized	11.0	19.3

The differences were statistically significant ($p < 0.05$).

4. Discussion

Experts agree that sepsis defines a collection of organ failure symptoms caused by infection [26]. Sepsis is a set of symptoms caused by systemic inflammation due to bacterial or fungal infection. Symptomatic bacteremia does not necessarily mean sepsis, but it is classified as a blood stream infection (BSI) and requires microbiological diagnostic of blood.

Until now, the blood culture has been the gold standard with regard to detecting bacteria in blood. The advantages of this method lie in its undeniable simplicity, low costs, and the possibility to determine the susceptibility/resistance of bacteria to antibiotics. The unquestionable flaws are its sensitivity and the long time needed for bacterial growth. Positive blood cultures in patients with sepsis were found in 15–61% of cases, 30–50% on average [6,7].

A low proportion of positive bacterial cultures, the discovery of endo- and exotoxins and the phenomenon of systemic inflammatory response led researchers to the conclusion that sepsis is not always accompanied by bacteremia [8–10], but its appearance is associated with a much higher mortality [27]. The approach to this issue is changing with the modifications to the definition of sepsis and the developments regarding diagnostic methods. The application of molecular biology techniques in diagnostics, among others, new-generation sequencing based on analysis of 16S rDNA, made it possible to discover new phenomena. The most surprising fact was the discovery of genetic material of bacteria in the blood of all subjects, both healthy volunteers and patients with sepsis [12,27,28]. However, in healthy volunteers mostly anaerobic bacteria DNA was found, while in septic patients the predominance of aerobic bacteria DNA was observed. The term “blood microbiome” has even been invented to refer to the taxonomic diversity of the numerous traces of bacteria that are present in the blood [28,29]. Their location and forms can vary. Some are identified following lysis of erythrocytes [30,31] (L-forms), dysfunctional in terms of the cell wall and cell division but showing activity [32]. Some of them are present in the intracellular form in phagocytes and are referred to as

neutrophil-associated microbiomes (NAMs), and such a form was identified in our study using the FISH method. Neutrophil dysfunction may lead to excessive release of bacterial material from phagocytes, which will overpower their phagocytosis and change the image of the blood microbiome [32–34].

Traditional methods in automated blood culture systems detect only living bacteria, capable of cell division, while the Gram stain and molecular methods can confirm the presence of cell structures or their nucleic acids, without information on the metabolic activity of cells [17]. In our study, we attempted to increase the detectability of bacteria directly in the blood and post-culture fluids using Gram stain and FISH with the application of the methodology that was devised by our team. Eight (8.9%) out of 90 of the collected blood culture sets demonstrated growth. The low percentage of positive cultures compared to global data may have probably been associated with the use of antibiotics prior to blood sample collection for microbiological testing. The clinical characteristics of the group of patients excluded from the study, due to positive blood culture results, is similar to the study group, therefore the condition of the patients could not affect the culture results (Table 1). Patients who took part in the study had undergone thoracic surgery, in which infectious pulmonary complications were predominant. For that reason, the patients had received intravenous antibiotics before the development of septic symptoms, which might have influenced the results of blood cultures, but not the results obtained through Gram stain or FISH [13]. Despite the antibiotic therapy applied and the fact that the amount of blood drawn for testing was modest, both methods allowed the visualization of bacteria in the blood of those patients whose cultures gave negative results (Figures 1–3). Moreover, these methods also enabled us to detect bacteria in post-culture fluids, which were considered negative by the automated blood culture system; therefore, a portion of the results may probably be classified as false negatives.

It was very interesting to learn that, in the case of all the samples in which the presence of bacteria was confirmed through the application of FISH, it was possible to visualize large amounts of bacterial cells enclosed in leukocytes stained with DAPI (probably due to phagocytosis), which may explain the lack of bacterial growth (Figure 4). Also, 65% of blood samples drawn from healthy volunteers showed, owing to FISH, the presence of phagocytosed bacteria (Figures 2–4). Our observations are confirmed by the study by Li et al. (2018), which showed the presence of the aforementioned specific neutrophil-associated microbiome in healthy individuals and patients with sepsis [29]. It cannot be ruled out that, in the case of sepsis, there are so many bacteria in the blood that phagocytosis is not effective enough, hence, bacterial antigens stimulate the inflammatory process. On the other hand, in a healthy adult, bacteria are quickly phagocytosed and have no opportunity to trigger inflammation, but they can be detected using molecular biology methods. Results of the Gram stain did not demonstrate the presence of phagocytes (given the lack of specific staining), however, they allowed the presence of clusters of bacterial cells to be revealed.

The greatest controversy regarding the application of highly sensitive research methods is the possibility of obtaining false positive results through contamination of the sample, usually with microorganisms that can be found on the skin. Collecting an uncontaminated blood sample is the key stage when carrying out a blood culture, Gram staining, as well as molecular methods. A false positive is defined as growth of bacteria in a blood culture bottle when they are absent in the patient's bloodstream. The source of the contamination may be the patient's skin, but also the hands of the person who is taking the sample, the tools utilized, or the immediate surroundings. Microorganisms such as *Corynebacterium*, *Cutibacterium*, coagulase-negative staphylococci, or *Bacillus* spp. are often present on the skin, but they rarely cause serious infections. Finding them in a single blood culture may be treated as contamination of no clinical significance. One should also pay attention to the fact that coagulase-negative staphylococci may be the cause of catheter-related bloodstream infection (CRBSI) and central line-associated bloodstream infection (CLABSI) or may be the etiologic agent behind bacteremia or sepsis. Bacterial cultures may show growth of bacteria released from the biofilm that covers vascular catheters and from other sources, e.g., bone infections [35,36]. Furthermore, for all samples that showed the presence of bacteria owing to FISH, bacterial cells were visualized enclosed

in phagocytes, which proves that they did not come from the outside, hence, they were not a result of contamination (Figure 4).

Detection of bacterial cells in blood samples (especially in healthy volunteers) might be a consequence of transient bacteremia. In the literature, its descriptions appear most often in the context of invasive dental or surgical procedures. While the study group of patients (with clinical symptoms of sepsis) underwent thoracic surgery, the control (healthy) group did not undergo any surgical intervention. It is very difficult to clearly determine the percentage of false positive blood test results because there are no specific determinants of contamination—it is only possible to determine a higher or lower probability which could have been higher in the study group.

There are few studies that confirm the possibility of bacterial detection in negative blood culture fluids, with the use of an additional culture on enriched media or using Gram stain, however, due to the lack of a procedure for concentrating or purifying the samples or the use of FISH, the authors obtained lower percentages of bacterial detection compared to our results [37,38]. In the literature, there are no reports on the detection of bacteria directly in the blood using FISH, apart from the studies by our team, so we cannot compare the obtained results with other studies [13,20]. With the use of FISH, a high percentage of genetic material of Gram-negative bacteria in the blood samples of healthy individuals was detected, which would argue for the translocation of bacteria into the bloodstream and, generally, for the existence of bacterial DNAemia phenomenon, in completely healthy people [39–41]. The presence of bacterial ribosomal RNA signals the presence of bacterial cells, hence, also their DNA, since ribonucleic acid degrades very quickly, in contrast to deoxyribonucleic acid. Elevated levels of circulating free DNA (cfDNA) in the blood that come directly from the breakdown of bacterial or phagocytic cells as well as resulting from necrosis or apoptosis have been described in pathological condition (sepsis, inflammation, stroke, cancer), physiological conditions (pregnancy, physical exertion), and following surgical procedures [41–43].

The studies are based on the detection of microbial DNA using state-of-the-art molecular methods such as NGS (Next Generation Sequencing) or PCR (Polymerase Chain Reaction), which identify specific fragments of microbial DNA. These techniques, however, do not answer the question of whether the detected DNA was contained in a living or dead cell, or whether it is the result of the breakdown or release of DNA into the bloodstream by phagocytic cells. FISH and Gram staining may detect dead bacterial cells inside phagocytic cells which can explain the detection of bacteria in the negative blood cultures and in the blood taken from healthy volunteers. Non-specific binding of Gram dyes or probes to non-bacterial targets might occur, but it is easily distinguished from the shape of bacterial cells. Owing to the blood sample purification method that was applied by our team, it was possible to obtain a high-quality microscopic image, which allowed us to directly visualize the Gram stained bacterial cells, but also was an opportunity to detect genetic material inside bacterial cells, which confirms our previous observations [20–22].

The FISH and Gram staining methods allowed the detection of bacterial cells but did not provide information about whether the cells were alive or dead. It is possible that in the study group, in which clinical signs of infection were present, live bacterial cells were detected, but in the control group, dead bacteria could probably be found. The use of diagnostic methods, which do not determine the status of the microorganism cells, may lead to a clinically false positive result. On the other hand, blood culture (detection of live cells) often fails, despite the presence of clinical signs of blood stream infection. FISH methodology detects in-situ bindings of the nucleic acid probe, which is supposed to be specific to the segment of a bacterial genome, while Gram staining visually detects the morphology of the microscopic image which supports the presence of the bacterial cell. However, without proper negative control, one does not guarantee analytical specificity. Repetitive testing (10 times for example) over the same “seemingly” negative or positive blood samples might give a statistical indication of the analytical specificity of this methodology. Therefore, clinical assessment of the patient’s condition is critical and in this context the analysis of the results of microbiological blood tests is very important.

We also attempted to correlate the SOFA score, procalcitonin levels, CRP, or the leukocyte count with the frequency of positive results of Gram stain or FISH, but the results did not show statistical significance. Lack of correlation of the clinical picture and the levels of inflammatory parameters with the frequency of the detection of bacterial material can be explained by the presence of microorganisms in both healthy and septic individuals, which is also confirmed by other researchers [12,28,29,44].

LIMITATIONS OF THE STUDY: Our study has several limitations worth noting. It is a single center study, limited by a small sample size of 82 sets, use of antibiotics before drawing blood cultures, the number of bacteria depended on the amount of inoculated blood, lack of blood cultures in the control group, and positive cultures in the sepsis group, as well as possible contamination of samples during collection of blood and further laboratory testing.

5. Conclusions

FISH demonstrated greater sensitivity in comparison with Gram staining. Both methods enable the detection of bacteria in media culture that did not show growth. Both methods revealed the presence of bacteria in the blood of patients with sepsis and the control group, which confirms the reports to date regarding the constant 'physiological bacteremia'. Further studies are necessary to distinguish between contamination, asymptomatic bacteremia, and fully symptomatic clinical sepsis.

Author Contributions: Conceptualization, T.G.; methodology, J.S., D.S.; formal analysis, T.Ż.; investigation, T.Ż.; resources, T.Ż., M.Z.; data curation, T.Ż., I.M.M., M.Z., D.S.; writing—original draft preparation, T.Ż.; writing—review and editing, T.G., M.Z., I.M.F., D.S.; visualization, T.Ż., J.S.; supervision, T.G., M.Z., D.S.; project administration, J.S., D.S.; funding acquisition, J.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Jagiellonian University Medical College: K/ZDS/007832.

Acknowledgments: The authors would like to thank Aldona Olechowska-Jarząb for help in collecting bottles after blood culture.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Hunfeld, K.-P.; Bingold, T.; Brade, V.; Wissing, H. Molecular biological detection of pathogens in patients with sepsis. Potentials, limitations and perspectives. *Anaesthesist* **2008**, *57*, 326–337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Singer, M.; Deutschman, C.S.; Seymour, C.W.; Shankar-Hari, M.; Annane, D.; Bauer, M.; Bellomo, R.; Bernard, G.R.; Chiche, J.-D.; Coopersmith, C.M.; et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **2016**, *315*, 801. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Davis, J.S.; Cheng, A.C.; McMillan, M.; Humphrey, A.B.; Stephens, D.P.; Anstey, N.M. Sepsis in the tropical Top End of Australia's Northern Territory: Disease burden and impact on Indigenous Australians. *Med. J. Aust.* **2011**, *194*, 519–524. [[CrossRef](#)]
4. Centers for Disease Control (CDC). Increase in National Hospital Discharge Survey Rates for Septicemia—United States. *JAMA* **1990**, *263*, 937–938.
5. Fleischmann, C.; Scherag, A.; Adhikari, N.K.J.; Hartog, C.S.; Tsaganos, T.; Schlattmann, P.; Angus, D.C.; Reinhart, K. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis current estimates and limitations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2016**, *193*, 259–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Gupta, S.; Sakhuja, A.; Kumar, G.; McGrath, E.; Nanchal, R.S.; Kashani, K.B. Culture-Negative Severe Sepsis. *Chest* **2016**, *150*, 1251–1259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Jamal, W.; Tamaray, G.; Pazhoor, A.; Rotimi, V.O. Comparative evaluation of BacT/ALERT 3D and BACTEC systems for the recovery of pathogens causing bloodstream infections. *Med. Princ. Pract.* **2006**, *15*, 223–227. [[CrossRef](#)]
8. Opal, S.M. Endotoxins and other sepsis triggers. *Contrib. Nephrol.* **2010**, *167*, 14–24.
9. Dickson, K.; Lehmann, C. Inflammatory Response to Different Toxins in Experimental Sepsis Models. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4341. [[CrossRef](#)]

10. Patterson, T.F.; Thompson, G.R.; Denning, D.W.; Fishman, J.A.; Hadley, S.; Herbrecht, R.; Kontoyiannis, D.P.; Marr, K.A.; Morrison, V.A.; Nguyen, M.H.; et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **2016**, *63*, e1–e60. [[CrossRef](#)]
11. Gosiewski, T.; Flis, A.; Sroka, A.; Kedzierska, A.; Pietrzyk, A.; Kedzierska, J.; Drwila, R.; Bulanda, M. Comparison of nested, multiplex, qPCR; FISH; SeptiFast and blood culture methods in detection and identification of bacteria and fungi in blood of patients with sepsis. *BMC Microbiol.* **2014**, *14*, 2323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Gosiewski, T.; Ludwig-Galezowska, A.H.H.; Huminska, K.; Sroka-Oleksiak, A.; Radkowski, P.; Salamon, D.; Wojciechowicz, J.; Kus-Slowinska, M.; Bulanda, M.; Wolkow, P.P.P. Comprehensive detection and identification of bacterial DNA in the blood of patients with sepsis and healthy volunteers using next-generation sequencing method - the observation of DNAemia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2017**, *36*, 329–336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Źródłowski, T.W.; Jurkiewicz-Badacz, D.; Sroka-Oleksiak, A.; Salamon, D.; Bulanda, M.; Gosiewski, T. Comparison of PCR, fluorescent in situ hybridization and blood cultures for detection of bacteremia in children and adolescents during antibiotic therapy. *Polish J. Microbiol.* **2018**, *67*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Gosiewski, T.; Jurkiewicz-Badacz, D.; Sroka, A.; Brzychczy-Włoch, M.; Bulanda, M. A novel, nested, multiplex, real-time PCR for detection of bacteria and fungi in blood. *BMC Microbiol.* **2014**, *14*, 144. [[CrossRef](#)]
15. Klouche, M.; Schröder, U. Rapid methods for diagnosis of bloodstream infections. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2008**, *46*, 888–908. [[CrossRef](#)]
16. Calderaro, A.; Martinelli, M.; Motta, F.; Larini, S.; Arcangeletti, M.C.; Medici, M.C.; Chezzi, C.; De Conto, F. Comparison of peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization assays with culture-based matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of bacteria and yeasts from blood cultures and cerebrospina. *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, *8*, O468–O475. [[CrossRef](#)]
17. Farina, C.; Perin, S.; Andreoni, S.; Conte, M.; Fazii, P.; Lombardi, G.; Manso, E.; Morazzoni, C.; Sanna, S. Evaluation of the peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridisation technology for yeast identification directly from positive blood cultures: An Italian experience. *Mycoses* **2012**, *55*, 388–392. [[CrossRef](#)]
18. Parcell, B.J.; Orange, G. V PNA-FISH assays for early targeted bacteraemia treatment. *J. Microbiol. Methods* **2013**, *95*, 253–255. [[CrossRef](#)]
19. Loonen, A.J.M.; Wolfs, P.F.G.; Bruggeman, C.A.; van den Brule, A.J.C. Developments for improved diagnosis of bacterial bloodstream infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2014**, *33*, 1687–1702. [[CrossRef](#)]
20. Źródłowski, T.W.; Flis, A.; Ziętkiewicz, M.; Drwila, R.; Gosiewski, T. Fluorescent in situ hybridization and Gram-stained smears of whole blood as complementary screening tools in the diagnosis of sepsis. *Polish Arch. Intern. Med.* **2017**, *127*, 122–124. [[CrossRef](#)]
21. Gosiewski, T.; Brzychczy, M. Gosiewski Method for efficient isolation of microbial dna from blood. United States Patent US9879311 (B2), 30 January 2018.
22. Gosiewski, T.; Szała, L.; Pietrzyk, A.; Brzychczy-Włoch, M.; Heczko, P.B.; Bulanda, M. Comparison of Methods for Isolation of Bacterial and Fungal DNA from Human Blood. *Curr. Microbiol.* **2014**, *68*, 149–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Amann, R.I.; Binder, B.J.; Olson, R.J.; Chisholm, S.W.; Devereux, R.; Stahl, D.A. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, *56*, 1919–1925. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kempf, V.A.; Trebesius, K.; Autenrieth, I.B. Fluorescent In situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* **2000**, *38*, 830–838. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Friedrich, U.; Van Langenhove, H.; Altendorf, K.; Lipski, A. Microbial community and physicochemical analysis of an industrial waste gas biofilter and design of 16S rRNA-targeting oligonucleotide probes. *Environ. Microbiol.* **2003**, *5*, 183–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Rhodes, A.; Phillips, G.; Beale, R.; Cecconi, M.; Chiche, J.D.; De Backer, D.; Divatia, J.; Du, B.; Evans, L.; Ferrer, R.; et al. The Surviving Sepsis Campaign bundles and outcome: Results from the International Multicentre Prevalence Study on Sepsis (the IMPReSS study). *Intensiv. Care Med.* **2015**, *41*, 1620–1628. [[CrossRef](#)]
27. Potgieter, M.; Bester, J.; Kell, D.B.; Pretorius, E. The dormant blood microbiome in chronic, inflammatory diseases. *FEMS Microbiol. Rev.* **2015**, *39*, 567–591. [[CrossRef](#)]

28. Li, S.-K.; Leung, R.K.-K.; Guo, H.-X.; Wei, J.-F.; Wang, J.-H.; Kwong, K.-T.; Lee, S.-S.; Zhang, C.; Tsui, S.K.-W. Detection and identification of plasma bacterial and viral elements in HIV/AIDS patients in comparison to healthy adults. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18*, 1126–1133. [[CrossRef](#)]
29. Li, Q.; Wang, C.; Tang, C.; Zhao, X.; He, Q.; Li, J. Identification and Characterization of Blood and Neutrophil-Associated Microbiomes in Patients with Severe Acute Pancreatitis Using Next-Generation Sequencing. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, *8*, 5. [[CrossRef](#)]
30. Domingue, G.J.; Schlegel, J.U. Novel bacterial structures in human blood: Cultural isolation. *Infect. Immun.* **1977**, *15*, 621–627. [[CrossRef](#)]
31. Tedeschi, G.G.; Bondi, A.; Paparelli, M.; Sprovieri, G. Electron microscopical evidence of the evolution of corynebacteria-like microorganisms within human erythrocytes. *Experientia* **1978**, *34*, 458–460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Devine, K.M. Bacterial L-forms on tap: An improved methodology to generate *Bacillus subtilis* L-forms heralds a new era of research. *Mol. Microbiol.* **2012**, *83*, 10–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Sinha, M.; Jupe, J.; Mack, H.; Coleman, T.P.; Lawrence, S.M.; Fraley, S.I. Emerging technologies for molecular diagnosis of sepsis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2018**, *31*, e00089-17. [[CrossRef](#)]
34. Delano, M.J.; Ward, P.A. Sepsis-induced immune dysfunction: Can immune therapies reduce mortality? *J. Clin. Invest.* **2016**, *126*, 23–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Lissauer, M.E.; Leekha, S.; Preas, M.A.; Thom, K.A.; Johnson, S.B. Risk factors for central line-associated bloodstream infections in the era of best practice. *J. Trauma Acute Care Surg.* **2012**, *72*, 1174–1180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Wright, M.-O.; Decker, S.G.; Allen-Bridson, K.; Hebden, J.N.; Leaptrot, D. Healthcare-associated infections studies project: An American Journal of Infection Control and National Healthcare Safety Network data quality collaboration: Location mapping. *Am. J. Infect. Control* **2018**, *46*, 577–578. [[CrossRef](#)]
37. Peretz, A.; Isakovitch, N.; Pastukh, N.; Koifman, A.; Glyatman, T.; Brodsky, D. Performance of Gram staining on blood cultures flagged negative by an automated blood culture system. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2015**, *34*, 1539–1541. [[CrossRef](#)]
38. Kocoglu, M.E.; Bayram, A.; Balci, I. Evaluation of negative results of BacT/Alert 3D automated blood culture system. *J. Microbiol.* **2005**, *43*, 257–259.
39. Greene, M.T.; Saint, S.; Ratz, D.; Kuhn, L.; Davis, J.; Patel, P.K.; Rogers, M.A.M. Role of transfusions in the development of hospital-acquired urinary tract-related bloodstream infection among United States Veterans. *Am. J. Infect. Control* **2019**, *47*, 381–386. [[CrossRef](#)]
40. Watanabe, N.; Kryukov, K.; Nakagawa, S.; Takeuchi, J.S.; Takeshita, M.; Kirimura, Y.; Mitsuhashi, S.; Ishihara, T.; Aoki, H.; Inokuchi, S.; et al. Detection of pathogenic bacteria in the blood from sepsis patients using 16S rRNA gene amplicon sequencing analysis. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0202049. [[CrossRef](#)]
41. Rhodes, A.; Wort, S.J.; Thomas, H.; Collinson, P.; David, E.D. Plasma DNA concentration as a predictor of mortality and sepsis in critically ill patients. *Crit. Care* **2006**, *10*, R60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Garnacho-Montero, J.; Huici-Moreno, M.J.; Gutiérrez-Pizarraya, A.; López, I.; Márquez-Vácaro, J.A.; Macher, H.; Guerrero, J.M.; Puppó-Moreno, A. Prognostic and diagnostic value of eosinopenia, C-reactive protein, procalcitonin, and circulating cell-free DNA in critically ill patients admitted with suspicion of sepsis. *Crit. Care* **2014**, *18*, R116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Grumaz, S.; Stevens, P.; Grumaz, C.; Decker, S.O.; Weigand, M.A.; Hofer, S.; Brenner, T.; von Haeseler, A.; Sohn, K. Next-generation sequencing diagnostics of bacteremia in septic patients. *Genome Med.* **2016**, *8*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Benítez-Páez, A.; Álvarez, M.; Belda-Ferre, P.; Rubido, S.; Mira, A.; Tomás, I. Detection of transient bacteraemia following dental extractions by 16S rDNA pyrosequencing: A pilot study. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e57782. [[CrossRef](#)]



Kraków, dnia 20 kwietnia 2020r.

Mgr Joanna Sobońska

(tytuł zawodowy, Imię i Nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**Classical Microbiological Diagnostics of Bacteremia: Are the Negative Results Really Negative? What is the Laboratory Result Telling Us About the "Gold Standard"?**”, oświadczam, iż mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: pozyskanie finansowania odczynników, współudział w badaniach laboratoryjnych oraz wykonanie zdjęć preparatów mikroskopowych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Tomasza Źródłowskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wskazuje na indywidualny wkład lek. Tomasza Źródłowskiego przy opracowaniu koncepcji, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu tej pracy.



(podpis współautora)

Kraków, dnia 20 kwietnia 2020r.

dr n. med. Dominika Salamon

(tytuł zawodowy, Imię i Nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**Classical Microbiological Diagnostics of Bacteremia: Are the Negative Results Really Negative? What is the Laboratory Result Telling Us About the "Gold Standard"?**”, oświadczam, iż mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: współudział w badaniach laboratoryjnych, interpretacji wyników badań oraz konsultacji merytorycznej manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Tomasza Źródłowskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wskazuje na indywidualny wkład lek. Tomasza Źródłowskiego przy opracowaniu koncepcji, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu tej pracy.



.....

(podpis współautora)

Nowy Jork, USA, dnia 20 kwietnia 2020r.

Isabel McFarlane, MD FACP
Clinical Assistant Professor
Department of Medicine
State University of New York
Downstate Health Sciences University

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**Classical Microbiological Diagnostics of Bacteremia: Are the Negative Results Really Negative? What is the Laboratory Result Telling Us About the "Gold Standard"?**”, oświadczam, iż mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: współudział w interpretacji wyników i korekta merytoryczna oraz językowa manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Tomasza Źródłowskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wskazuje na indywidualny wkład lek. Tomasza Źródłowskiego przy opracowaniu koncepcji, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu tej pracy.

Isabel McFarlane
April 20th, 2020

.....
(podpis współautora)

Kraków, dnia 20 kwietnia 2020r.

Dr n. med. Mirosław Ziętkiewicz

(tytuł zawodowy, Imię i Nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**Classical Microbiological Diagnostics of Bacteremia: Are the Negative Results Really Negative? What is the Laboratory Result Telling Us About the "Gold Standard"?**”, oświadczam, iż mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: konsultacja wyników badań, współudział w opracowaniu koncepcji manuskryptu oraz zatwierdzenie finalnej wersji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Tomasza Źródłowskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wskazuje na indywidualny wkład lek. Tomasza Źródłowskiego przy opracowaniu koncepcji, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu tej pracy.



(podpis współautora)

Kraków, dnia 03 maja 2020r.

dr hab. Tomasz Gosiewski, prof. UJ

(tytuł zawodowy, Imię i Nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**Classical Microbiological Diagnostics of Bacteremia: Are the Negative Results Really Negative? What is the Laboratory Result Telling Us About the "Gold Standard"?**”, oświadczam, iż mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: nadzór merytoryczny na prowadzeniem badań oraz interpretacją wyników i zatwierdzenie finalnej wersji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Tomasza Źródłowskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wskazuje na indywidualny wkład lek. Tomasza Źródłowskiego przy opracowaniu koncepcji, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu tej pracy.



.....
(podpis współautora)

III. GENERALNE WNIOSKI:

1. Zastosowana metodologia umożliwiła detekcję bakterii we krwi pełnej zarówno przy użyciu barwienia Grama, ale także za pomocą metod FISH czy PCR.
2. Metody Gram i FISH pozwoliły również na wykrycie bakterii w ujemnych próbkach po hodowli krwi, co pokazuje niską skuteczność „złotego standardu” diagnostycznego.
3. Stosowanie antybiotykoterapii istotnie obniża skuteczność hodowli krwi w przeciwieństwie do metod PCR i FISH.
4. Barwienie metodą Grama oraz FISH pozwoliły wykryć obecność bakterii zarówno u pacjentów z sepsą jak i zdrowych ochotników, co może potwierdzać dotychczasowe doniesienia o występowaniu stałej ‘fizjologicznej’ bakteriemii.
5. Barwienie Grama i metoda FISH są tanie, łatwo dostępne, znacznie skracają czas diagnostyki bakteriologicznej i być może, mogłyby znaleźć swoje miejsce jako metody skriningowe w sepsie.

IV. STRESZCZENIE:

Zastosowanie modyfikowanych technik fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH) i barwienia Grama jako testów skriningowych w diagnostyce sepsy.

Sepsa to „zagrożająca życiu dysfunkcja narządowa spowodowana zaburzoną regulacją odpowiedzi ustroju na zakażenie”.

Łączna liczba zachorowań na sepsę na świecie jest trudna do ustalenia z powodu niedoskonałego raportowania. Szacuje się, że częstość występowania sepsy na świecie wynosi 31 milionów przypadków rocznie (437 na 100 000), a śmiertelność z nią związaną na około 5 milionów rocznie.

Diagnostyka mikrobiologiczna bakteriemii opiera się na hodowli krwi. Jej zaletą jest prostota i niski koszt, zaś wadą czasochłonność oraz niska czułość. Dodatkowo wyniki stwierdza się w 15-61% przypadków. Czas włączenia skutecznej antybiotykoterapii ma bezpośrednie przełożenie na szansę przeżycia. Metody molekularne oparte o analizę materiału genetycznego są kosztowne i dostępne tylko w niektórych ośrodkach badawczych.

W ramach pracy doktorskiej podjęta została próba zwiększenia wykrywalności bakterii we krwi za pomocą skriningowych metod barwienia Grama i Fluorescencyjnej Hybrydyzacji in Situ (FISH).

Uzyskane wyniki potwierdziły skuteczność obu metod w badaniu próbek krwi pełnej - istotnie wyższe odsetki wyników pozytywnych w stosunku do hodowli krwi. Ponadto, umożliwiły wykrycie bakterii w ujemnych próbkach po hodowli, a także w próbkach krwi od zdrowych wolontariuszy, co może potwierdzać dotychczasowe doniesienia o występowaniu stałej 'fizjologicznej' bakteriemii.

V. SUMMARY:

The modified technique of fluorescent in situ hybridization (FISH) and Gram staining as screening tests for sepsis.

Sepsis is “a life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection”.

The global incidence of sepsis is difficult to ascertain due to lack of or insufficient reporting. The global incidence of sepsis was estimated at 31 million cases per year (437 per 100,000) and its mortality, around 5 million/year.

The microbiological diagnostics of bacteremia consists of blood culture. The advantage of this method is its simplicity and cost effectiveness. The disadvantage is that this method is time-consuming and has low sensitivity. Bacterial growth is detected in 15-61%. Time needed to initiate a targeted therapy has a direct impact on patient’s survival. Molecular methods based on the genetic analysis are costly and available only in some research centers.

The goal of this doctoral thesis was to assess if screening methods of Gram staining and Fluorescent Hybridization In Situ (FISH) can increase a rate of detection of bacteria in blood.

Study results confirm the effectiveness of both methods in microbiological testing of whole blood - significantly higher percentage of positive results in comparison to blood culture. Additionally, both methods enabled the detection of bacteria in negative media culture, as well as in the blood of healthy volunteers, which may confirm the reports to date regarding the constant ‘physiological’ bacteremia.