

AKTUALNOŚCI BINET

Nr 5 / styczeń 2010

www.koroun.edu.pl

Drogie Koleżanki i Koledzy!



Witam serdecznie w Nowym Roku oddając w Państwa ręce piąty numer AKTUALNOŚCI BINET. Poświęcony on jest m. in. zakażeniom inwazyjnym wywołanym przez *Streptococcus pyogenes*, ponieważ pragniemy by sytuacja epidemiologiczna dotycząca tych zakażeń w naszym kraju była lepiej rozpoznawana. Część kliniczna Aktualności skupia się na znaczeniu „nowych” serotypów *Streptococcus pneumoniae*, które w niektórych regionach świata i w ostatnich latach wywołują coraz więcej zakażeń inwazyjnych. Jest to szczególnie ważne w świetle wprowadzenia na rynek nowej 13-walentnej koniugowanej szczepionki przeciw pneumokokom. Z kolei w części diagnostycznej wracamy do tematu testów lateksowych.

W dniach 8-9 grudnia 2009 r., w Warszawie, odbyło się XIII Sympozjum Naukowe „Postępy w medycynie zakażeń”, którego jedną z sesji pt.: „Inwazyjne pozaszpitalne zakażenia bakteryjne w Polsce – stan obecny” poświęcono aktywności Sieci BINet. Podczas jednego z wystąpień omówiono epidemiologię i mechanizmy wirulencji *Streptococcus pyogenes*. Ponadto, przedstawiono najnowsze polskie dane, dotyczące zakażeń inwazyjnych wywołanych przez *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* i *Neisseria meningitidis*. Dane te uzyskano w ramach działalności KOROUN i Sieci BINet, która dzięki Państwa współpracy wciąż się rozwija.

Wierzę, że przy naszym wspólnym zaangażowaniu, kolejny Nowy Rok poszerzy naszą wiedzę dotyczącą epidemiologii inwazyjnych zakażeń bakteryjnych w Polsce.

Przesyłam najserdeczniejsze życzenia pomyślnego Nowego Roku.



Z pozdrowieniami,

Waleria Hryniewicz

Epidemiologia

***Streptococcus pyogenes*; stary patogen, nowe wyzwania**

Dr n. biol. Izabela Sitkiewicz (isitkiewicz@cls.edu.pl)

Streptococcus grupy A (*Streptococcus pyogenes*, GAS) to groźny ludzki patogen, powodujący szereg zakażeń o zróżnicowanej lokalizacji i nasileniu. Szacuje się, że rocznie GAS odpowiada za ponad 600 milionów nowych infekcji i ponad pół miliona zgonów w skali globu. Według szacunków na podstawie danych WHO, *S. pyogenes* znajduje się w pierwszej dziesiątce patogenów powodujących największą liczbę zgonów w wyniku zakażeń lub powikłań, razem z takimi chorobami jak AIDS, gruźlica, malaria, wirusowe zapalenia wątroby oraz zakażeniami *Haemophilus influenzae* typu b oraz *S. pneumoniae*.

Zakażenia GAS są częstymi chorobami wieku dziecięcego, zwykle jednak ograniczają się do ropnego zapalenia gardła (angina lub szkarlatyna) oraz skóry i tkanki podskórnej (ropnie, liszajec, cellulitis, róża). Niestety, od około połowy lat 80-tych XX w., obserwuje się na świecie narastającą liczbę zachorowań na inwazyjne formy zakażeń GAS. Należą do nich bakteremia, sepsa, ropnie, zapalenie płuc, pourazowe zakażenia ośrodkowego układu nerwowego, paciorkowcowy zespół wstrząsu toksycznego, gorączka połogowa, martwica mięśni i martwicze zapalenie powięzi. Inwazyjne zakażenia paciorkowcowe mają niezwykle wysoki procent śmiertelności, dochodzący w niektórych przypadkach do 50%. Ze względu na swoją inwazyjność i zjadliwość paciorkowce są niebezpieczne zwłaszcza dla pacjentów w starszym wieku, z obniżoną odpornością oraz przewlekłymi chorobami jak np. cukrzyca. Istotne jest również występowanie groźnych odległych powikłań po zakażeniach GAS jak na przykład choroba reumatyczna (zwłaszcza u dzieci), oraz zapalenie kłębuszków nerkowych.

Za chorobotwórczość *S. pyogenes* odpowiada duża liczba czynników, biorących aktywny udział w kolejnych etapach procesu patogenezy. Czynniki te obejmują szereg różnorodnych białek odpowiedzialnych za kolonizację gospodarza, przerwanie barier jego układu odpornościowego oraz umożli-

wienie rozprzestrzeniania się drobnoustroju w organizmie gospodarza. Do podstawowych czynników GAS umożliwiających nie tylko kolonizację, ale również ucieczkę przed układem immunologicznym gospodarza, zalicza się główne białko powierzchniowe M. Różnice w budowie aminokwasowej zmiennej części tego białka odpowiedzialne są za występowanie różnych serotypów (w chwili obecnej ponad 100). Szczepy należące do różnych serotypów są zróżnicowane pod względem patogenności. Dodatkowo, określone serotypy są bardziej związane z objawami choroby o określonej lokalizacji.

Nie ma obecnie komercyjnie dostępnej szczepionki przeciwko *S. pyogenes*, a antybiotykiem z wyboru stosowanym w leczeniu zakażeń jest penicylina. Jak dotąd, wszystkie szczepy *S. pyogenes* wykazują wrażliwość *in vitro* na penicylinę; niestety, antybiotyk ten wykazuje niewystarczające działanie, jeśli podawany jest w monoterapii, w ciężkich zakażeniach inwazyjnych, w których patogenie ważną rolę odgrywa toksyna wstrząsu toksycznego. Dlatego w terapii tych zakażeń ważne jest dołączenie do penicyliny antybiotyku hamującego biosyntezę białek, w tym toksyn (makrolidy, klindamycyna). Makrolidy mają także zastosowanie w leczeniu anginy paciorkowcowej wyłącznie w przypadku alergii na penicylinę. Obserwuje się narastającą oporność *S. pyogenes* na antybiotyki makrolidowe. Dlatego w sytuacjach, gdy nie można podać penicyliny niezbędne jest określenie wrażliwości na makrolidy i klindamycynę. W przypadku terapii empirycznej do prawidłowego wyboru odpowiedniego terapeutycznego niezbędne są dane na temat poziomu oporności na określone klasy antybiotyków wśród szczepów występujących na określonym terenie oraz tła genetycznego opornych szczepów. Wiedza taka pozwala na optymalne i racjonalne stosowanie antybiotyków, znacząco wpływając na zahamowanie rozprzestrzeniania się opornych szczepów. Dodatkowo, w przypadku *S. pyogenes* obserwuje się geograficzne zróżnicowanie występowania serotypów oraz genów oporności. Wiele zjadliwych szczepów *S. pyogenes* rozprzestrzenia się w sposób klonalny, co stanowi przesłankę do lokalnego monitorowania zakażeń.

S. pyogenes charakteryzuje się, dużym potencjałem chorobo-

twórczym, co stanowi wyzwanie zarówno dla praktycznej medycyny zakażeń i mikrobiologii klinicznej, a także dla epidemiologii i badań podstawowych. Aktywne monitorowanie liczby i rodzaju zakażeń wywoływanych przez krążące w populacji serotypów i klony pozwala na dokładne rozpoznanie i oszacowanie problemu występowania potencjalnie inwazyjnych szczepów GAS. W wielu krajach europejskich, USA oraz Kanadzie, istnieją zespoły zajmujące się monitorowaniem inwazyjnych zakażeń GAS oraz tworzeniem kolekcji wszystkich szczepów inwazyjnych w celu ich molekularnej charakterystyki.

W Polsce dopiero w 2009 roku wprowadzono obowiązek raportowania do Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego-Państwowego Zakładu Higieny zakażeń inwazyjnych GAS. Próby charakteryzowania inwazyjnych GAS i zakażeń przez nie

wywoływanych były podejmowane w Polsce, w Zakładzie Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego (obecnie Narodowy Instytut Leków), ale badania nie miały charakteru ciągłego monitorowania i dotyczyły głównie izolatów opornych na antybiotyki, wyjątkowo zjadliwych lub podejrzanych o wywoływanie ognisk. Wydaje się, że utworzenie sieci BINet stwarza wyjątkową okazję, by monitorować zakażenia wywoływane przez GAS, zwłaszcza inwazyjne, co pozwoli rozpoznać sytuację epidemiologiczną tych zakażeń w Polsce przyczyniając się do ich skuteczniejszego zwalczania.

Dlatego apelujemy do Państwa o nadsyłanie inwazyjnych izolatów *S. pyogenes*.

Klinika

Znaczenie nowych serotypów szczepionkowych w klinice chorób pneumokokowych

Dr n. med. Piotr Albrecht, I Katedra Pediatrii WUM

Inwazyjne (IChP) i nieinwazyjne choroby wywoływane przez pneumokoki stanowią jedną z głównych przyczyn śmiertelności i chorobowości u dzieci poniżej 5 roku życia (r.ż.).

Wprowadzenie w 2000 roku i coraz powszechniejsze stosowanie skoniugowanej siedmiowalentnej szczepionki przeciw-pneumokokowej (PCV7) przyczyniło się do spektakularnej redukcji częstości posocznicy i pneumokokowych zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych a także znaczącego spadku częstości występowania zapaleń płuc i ostrego zapalenia ucha środkowego (OZUŚ) oraz liczby wizyt i hospitalizacji związanych z tymi jednostkami chorobowymi. Całkiem niespodziewanie okazało się, że spadek ten dotyczył, dzięki tzw. zjawisku odporności zbiorowiskowej, również populacji nieszczepionej, czyli dorosłych i nieszczepionych noworodków i małych niemowląt. Coraz powszechniejsze i doskonalsze monitorowanie

zakażeń pneumokokowych (czego przykładem w Polsce jest powstanie sieci BINet) wykazało jednak, że niektóre serotypy nie występujące w PCV7, odgrywają poważną i niekiedy rosnącą rolę, a część z nich cechuje się dodatkowo znaczną zjadliwością i antybiotykoopornością. Zjawisko to tłumaczy się zarówno selekcyjną presją powszechnego stosowania szczepionki PCV7 prowadzącą do zastępowania jednych serotypów przez inne, nadużywaniem i nieprawidłowym stosowaniem antybiotyków, ale również naturalną fluktuacją częstości występowania poszczególnych serotypów na przestrzeni dłuższych przedziałów czasowych.

Jakie zatem nowe serotypy pneumokoka nabrały znaczenia epidemiologicznego i chorobotwórczego ograniczając nieco efektywność szczepień PCV7 w populacji dziecięcej?

Należą do nich, z różnych zresztą względów, serotypy **1, 5, 7F** (zawarte w nowych szczepionkach PCV10 i PCV13) oraz serotypy **6A, 3, i 19A** (znajdujące się jedynie w nowej PCV13).

Czym charakteryzują się nowe serotypy szczepionkowe 1, 3, 5, 6A, 7F i 19A?

Serotyp 1

Serotyp ten jest istotną przyczyną IChP a ponadto zarówno przed okresem szczepionkowym, jak i po nim pozostaje jedną z najczęstszych przyczyn zapaleń płuc powikłanych ropniakami opłucnej i w tym przypadku także u dzieci powyżej 2 r.ż. Według wielu badań i obserwacji częstość zapaleń płuc z wysiękiem opłucnowym wywołanych serotypem 1 systematycznie rośnie. Zgodnie z rekomendacjami WHO serotyp ten powinien znajdować się zwłaszcza w szczepionkach przeciw pneumokokowym przeznaczonych dla krajów wspieranych przez GAVI (Global Alliance for Vaccines and Immunization = Globalny Sojusz na Rzecz Szczepionek i Szczepień). Należą do nich m.in.: Afganistan, Burundi, Boliwia, Kongo, Etiopia, Ghana, Indonezja, Pakistan.

Serotyp 3

Jest jednym z ważniejszych serotypów odpowiedzialnych za OZUŚ (w erze poszczepionkowej odpowiada za ok. 13% zakażeń ucha środkowego). W Stanach Zjednoczonych jest drugim co do częstości występowania serotypem hodowanym z różnego typu materiałów. Choć w etiologii IChP odgrywa mniejszą rolę, to zarówno w erze przedszczepionkowej jak i obecnie jest niezwykle istotnym odpowiedzialnym za powikłane zapalenia płuc.

Serotyp 5

Największą rolę, jako czynnik odpowiedzialny za IChP u dzieci powyżej 2 r.ż., odgrywa w Afryce. W związku z tym zgodnie z rekomendacjami WHO serotyp ten powinien znajdować się w szczepionkach przeciw pneumokokowym przeznaczonych dla krajów wspieranych przez GAVI. W badaniach przeprowadzonych w Chile wykazano, że serotyp ten stanowi czwarty pod względem częstości czynnik etiologiczny zapaleń płuc z bakterią u dzieci poniżej 35 m. ż. i trzeci u dzieci powyżej 2 r.ż. W Europie (0,4% hodowanych serotypów) i w Polsce, jak na razie, nie odgrywa istotnej roli.

Serotyp 6A

Choć z jednej strony ponad wszelką wątpliwość wykazano, że przeciwciała przeciw serotypowi 6B (zawartemu w PCV7)

chronią przed IChP OZUŚ i nosicielstwem nosowo-gardłowym wywołanym przez serotypy 6A (odporność krzyżowa), to z drugiej strony stopień ochrony zapewniany przez PCV7 w stosunku do IChP wywołanego przez serotypy 6A, nie jest tak dobry jak w stosunku do serotypu 6B. Stąd serotyp 6A znalazł się w szczepionce PCV13. Wprowadzono go tam także ze względu na to, że serotyp ten coraz częściej bywa wieloantybiotykoodporny.

Serotyp 7F

Serotyp ten, co prawda, nie występuje zbyt często (0,8% w Afryce; 3,2% w Europie) odgrywa jednak bardzo istotną rolę ze względu na swoją zjadliwość. **Ma on najwyższy wskaźnik niekorzystnego zejścia zakażenia sięgający 14,8%.** Odpowiada za ciężkie powikłane zapalenia płuc, rzadko natomiast wywołuje OZUŚ.

Serotypy 19A

Początkowo sądzono, że serotyp 19F zawarty w PCV7 zapewni krzyżową odporność w stosunku do serotypu 19A. Badania porejestacyjne nie potwierdziły jednak tych oczekiwań. W okresie po wprowadzeniu PCV7 zanotowano bowiem istotny wzrost zakażeń wywołanych przez serotyp 19A. Jest on tak samo odpowiedzialny za IChP OZUŚ jak i nosicielstwo nosowo-gardłowe. Jest on w tej chwili nie tylko jednym z najczęściej wywołujących IChP u dzieci poniżej 2 r.ż., ale także serotypem niezwykle często penicylino- lub wieloantybiotykoodpornym. Tego wzrostu częstości IChP wywołanego przez serotypy 19A nie można przypisać wyłącznie selekcyjnej roli szczepień PCV7, gdyż wzrost częstości jego występowania był już obserwowany przed erą szczepień przeciw pneumokokowym. Obecny wzrost przypisuje się m.in. ściśle określonej klonowi ST-320. W niektórych regionach świata (Alaska) wzrost częstości zakażeń serotypem 19A związany jest z klonami innymi niż ST-320. Wzrost częstości zakażeń wywołanych przez pneumokoki 19A obserwuje się we Francji, Belgii, Izraelu. W Polsce także odnotowuje się coraz więcej zakażeń wywoływanych przez pneumokoki tego serotypu, ale dotyczy to wciąż niewielkiej

liczby izolatów. Globalnie odgrywa on ważną rolę jako czynnik wywołujący OZUŚ oraz powikłane zapalenia płuc.

Szacuje się, że pełny zestaw dodatkowych serotypów wraz z serotypami zawartymi w szczepionce PCV7 da w najbliższych przynajmniej latach pokrycie serotypowe, jeśli chodzi o IChP u dzieci poniżej 5 r.ż. w Polsce, sięgające około 87% (PCV7 ok. 71%, PCV 10 ok. 77%) [dane KOROUN/BINet].

Piśmiennictwo

1. Dinleyici EC, Yargic ZA.: Current knowledge regarding the investigational 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. Expert Review of Vaccine. 2009; 8 (8): 977-986.
2. Dinleyici EC, Yargic ZA.: Pneumococcal conjugated vaccine: PHiD-CV. Expert Rev Anti Infect Ther. 2009;7(9):1063-1074.
3. Porat N, Amit U, Givon-Lavi N, Leibovitz E, Dagan R. Increasing Importance of Multidrug-Resistant Serotype 6A *Streptococcus pneumoniae* Clones in Acute Otitis Media in Southern Israel. Pediatr Infect Dis J. 2009 Nov 18.
4. Isaacman DJ, McIntosh ED, Reinert RR.: Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future vaccines. Int J Infect Dis (2009), doi: 10.1016/j.ijid.2009.05.010.
5. Choi EH, Kim SH, Eun BW, Kim SJ, Kim NH, Lee J, Lee HJ.: *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in children, south Korea. Emerg Infect Dis 2008, 14 (2), 275-281.
6. Dagan R, Givon-Lavi N, Leibovitz E, Greenberg D, Porat N.: Introduction and proliferation of multidrug-resistance *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A clones that cause acute otitis media in an unvaccinated population. J Infect Dis 199 (6), 771-773 (2009)
7. Rodgers GL, Arguedas A, Cohen R, Dagan R.: Global serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates causing otitis media in children: potential implications for pneumococcal conjugate vaccines. Vaccine 27 (29), 3802-3810 (2009).
8. Hammitt LL, Bruden DL, Butler JC, Baggett HC, Hurlburt DA, Reasonover A, Hennessy TW.: Indirect effect of conjugate vaccine on adult carriage of *Streptococcus pneumoniae*: an explanation of trends in invasive pneumococcal disease. J Infect Dis 193 (11), 1487-1494 (2006) pneumococcal regional serotype distribution for pneumococcal AMC TPP www.vaccineamc.org/files/TPP_codebook.pdf
9. Meeting of the Immunization Strategic Advisory Group of Experts, November 2007-conclusions and recommendations. Wkly Epidemiol Rec. 2008 Jan 4;83(1):1-15.

Diagnostyka

Testy lateksowe - doświadczenia KOROUN (część 2) Dr n. med. Piotr Albrecht, I Katedra Pediatrii WUM

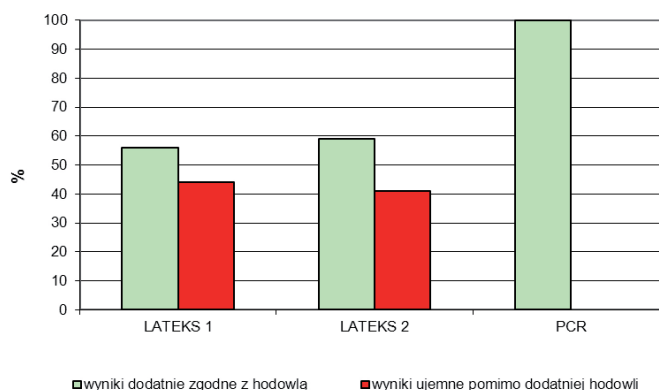
Szybkie testy diagnostyczne oparte na metodzie aglutynacji lateksowej są często wykorzystywane w diagnostyce bakteryjnych pozaszpitalnych zakażeń inwazyjnych. Testy te posiadają wiele zalet umożliwiających szybkie uzyskanie wyniku, nawet po rozpoczętej antybiotykoterapii, gdy komórki bakteryjne są uszkodzone lub zabite, nie wymagają specjalistycznego sprzę-

tu laboratoryjnego i mogą być z powodzeniem wykonywane przez przeszkolony personel laboratoryjny. Jednak stosowanie testów lateksowych budzi wiele kontrowersji i wciąż pozostaje kwestią dyskusyjną.

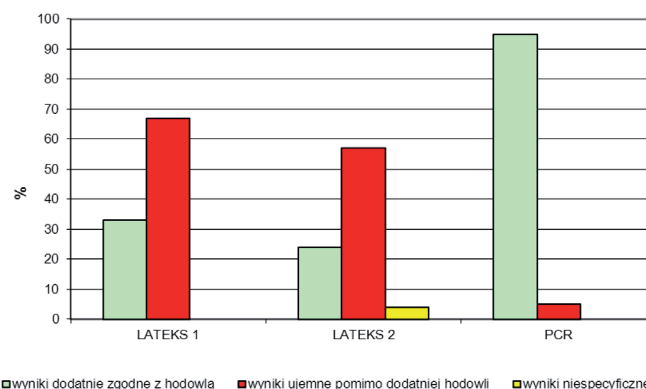
W okresie od stycznia 2008 r. do końca listopada 2009 r. KOROUN otrzymał 53 próbki materiałów klinicznych (płyn mózgowo-rdzeniowy, surowica), z których **wyhodowano szczepy będące czynnikami etiologicznymi zakażenia inwazyjnego** (szczepy: *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*,

E. coli). Materiały te postanowiono wykorzystać w badaniu przydatności diagnostycznej testów lateksowych. Podobnie jak w doświadczeniu opisanym w Aktualnościach BINet nr 4, wykorzystano zestawy testów lateksowych dwóch różnych producentów, które dostępne są na polskim rynku (oznaczone jako LATEKS 1 i LATEKS 2). Oba testy pozwalają na wykrycie rozpuszczalnych antygenów: *Neisseria meningitidis* (grupy A, B, C, W135 oraz Y), *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* grupy B, *Haemophilus influenzae* typu b, w materiałach klinicznych takich jak: płyn mózgowo-rdzeniowy (PMR), surowica i moczu. Jednocześnie w tych samych materiałach szukano specyficznych sekwencji DNA z zastosowaniem reakcji łańcuchowej polimerazy, PCR. Zastosowanie metody PCR pozwoliło na wykrycie materiału genetycznego w 98% materiałów potwierdzonych hodowlą; tylko w jednym z nich nie wykryto DNA. Uzyskane wyniki PCR odpowiadały wynikom otrzymanym w hodowli potwierdzając, że ta właśnie metoda niehodowlana jest skuteczna i z powodzeniem może być stosowana w diagnostyce bakteryjnych zakażeń inwazyjnych.

Wyniki testów lateksowych odbiegały znacznie od tych uzyskanych w hodowli. Zaledwie w 38% wyniki obu testów lateksowych pozwoliły na wstępne potwierdzenie czynnika etiologicznego wyhodowanego z badanych materiałów. **W 40% wyniki testów lateksowych były ujemne pomimo dodatniej hodowli!** Kolejny raz zaobserwowano również występowanie reakcji niespecyficznych (tzn. dodatnich w kierunku innych drobnoustrojów niż te, które wyhodowano z danej próbki) z wykorzystaniem LATEKSU 2 (7,5%). Podobnie jak w badaniu opisanym w Aktualnościach BINet nr 4, dotyczyły one próbek surowicy i głównie odczynnika lateksowego *N. meningitidis* B/*E.coli*. Należy podkreślić, że przeważająca większość danych klinicznych oraz literaturowych odnośnie wykorzystywania metody aglutynacji lateksowej odnosi się do próbek PMR. W związku z tym porównano wyniki badań obu testów lateksowych przeprowadzonych dla próbek PMR oraz surowicy. Otrzymane wyniki przedstawiono na rycinach 1 i 2.



Rycina 1. Zestawienie wyników testów lateksowych i metody PCR dla próbek płynu mózgowo-rdzeniowego, z których wyhodowano czynnik etiologiczny



Rycina 2. Zestawienie wyników testów lateksowych i metody PCR dla próbek surowicy, z których wyhodowano czynnik etiologiczny

Okazało się, że zdecydowanie lepszym materiałem do badań metodą aglutynacji lateksowej był płyn mózgowo-rdzeniowy. W przypadku wykorzystania PMR, jako materiału diagnostycznego, uzyskano większą ilość dodatnich wyników zgodnych z hodowlą dla obu testów lateksowych (56% - LATEKS 1 i 59% LATEKS 2). Co istotne, nie zaobserwowano występowania żadnych reakcji niespecyficznych. Dla przypomnienia: w definicji Unii Europejskiej widnieje zapis, że o potwierdzonym przypadku inwazyjnej choroby meningokokowej świadczy obok dodatniego posiewu i/lub wykrycia materiału genetycznego i/lub wykrycia dwoinek Gram ujemnych w preparacie, także

dodatni wynik testu lateksowego dla płynu mózgowo-rdzeniowego, **ale nie dla surowicy!** Należy jednak podkreślić, że coraz więcej krajów odstępuje od wykonywania testów lateksowych w zakażeniach inwazyjnych, ze względu na trudności w otrzymaniu wiarygodnych wyników.

Przeprowadzone przez KOROUN badania pozwalają na sformułowanie następujących wniosków, o których należy pamiętać w codziennej pracy z testami lateksowymi:

- Testy lateksowe są tylko metodą skryningową, pomocniczą w diagnostyce mikrobiologicznej i nie mogą zastąpić hodowli czy wykonania preparatu mikroskopowego.

- Nawet przy dodatniej hodowli, która jest „złotym standardem” w diagnostyce mikrobiologicznej, testy lateksowe mogą nie wykrywać czynnika etiologicznego zakażenia, dając wiele reakcji fałszywie ujemnych.
- Płyn mózgowo-rdzeniowy jest lepszym materiałem diagnostycznym niż surowica w badaniach z zastosowaniem testów lateksowych.
- Wyniki uzyskane metodą PCR odpowiadały wynikom otrzymanym w hodowli potwierdzając, że ta właśnie metoda niehodowlana jest skuteczna i z powodzeniem może być stosowana w diagnostyce bakteryjnych zakażeń inwazyjnych.