BINET

Krajowy Ośrodek Referencyjny
ds. Diagnostyki
Bakteryjnych Zakażeń
Ośrodkowego
Układu Nerwowego

KOROUN

AKTUALNOŚCI BINET

Nr 2 / styczeń 2009

www.koroun.edu.pl

Drogie Koleżanki i Koledzy!

Witam serdecznie w Nowym Roku oddając w Wasze ręce drugi numer AKTUALNOŚCI BINET, w którym skupiamy się na prawidłowej diagnostyce, terapii i profilaktyce zakażeń inwazyjnych nabytych poza szpitalem. W tym numerze podsumowujemy Zjazd Przedstawicieli Sieci Monitorowania Inwazyjnych Zakażeń Bakteryjnych BINet, który odbył się w grudniu 2008 roku. Przedstawiamy przypadek, który potwierdza jak ważna jest współpraca lekarzy i mikrobiologów w prawidłowej i szybkiej identyfikacji chorób inwazyjnych oraz przyglądamy się diagnostyce tych zakażeń.

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

Przesyłam najserdeczniejsze życzenia dla Wszystkich zaangażowanych w działanie naszej sieci. Pomyślnego Nowego Roku.

Serdecznie zapraszam

Z pozdrowieniami,

Epidemiologia

Dnia 8 grudnia 2008 r. w Warszawie, w siedzibie Polskiej Akademii Nauk, odbył się kolejny **Zjazd Przedstawicieli Sieci Monitorowania Inwazyjnych Zakażeń Bakteryjnych BINet.** W spotkaniu udział wzięło ponad 100 osób.

Konferencję rozpoczęła Pani dr n. med. Dorota Żabicka wykładem pt.: **„Bakteriemia gronkowcowa".** Wykład w dużej części poświęcony był patogenezie i epidemiologii bakteriemii wywoływanej przez *Staphylococcus aureus.* Gronkowiec złocisty powoduje głównie zakażenia skóry i tkanek miękkich, zapalenie płuc, zapalenie kości i choroby z udziałem toksyn gronkowcowych, ale może być także czynnikiem etiologicznym zarówno bakteriemii szpitalnej jak i pozaszpitalnej. Do zakażenia dochodzi zarówno u osób zdrowych jak i obciążonych czynnikami ryzyka zakażenia. W ostatnich latach zanotowano w Polsce wzrost liczby szczepów gronkowców opornych na meticylinę. Szczepy te są wielooporne, tzn. oprócz oporności na wszystkie antybiotyki β-laktamowe charakteryzują się także opornością na inne antybiotyki.

Pan mgr Marcin Kadłubowski przedstawił wykład pt.: **„Inwazyjne zakażenia *Listeria monocytogenes,* diagnostyka i epidemiologia".**
Listeria monocytogenes może być przyczyną inwazyjnych zakażeń. Najczęstsze postacie kliniczne listeriozy to zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i zapalenie mózgu, posocznica, poronienie. Epidemiologia listeriozy w Europie jest bardzo zróżnicowana. Są kraje, do których należy Polska, z niewielką liczbą przypadków oraz te z zapadalnością na poziomie 1,0/100.000 (Luksemburg, Dania, Finlandia, Czechy). W krajach z dobrym rozpoznaniem epidemiologicznym, np. w Wielkiej Brytanii, notuje się od 200 do 600 przypadków listeriozy rocznie. Polskie dane wyraźnie wskazują na konieczność poprawy monitoringu tych zakażeń. Istotne wydaje się też śledzenie trendów lekowrażliwości pałeczek *Listeria,* ponieważ pojawiają się doniesienia o spadku skuteczności poszczególnych antybiotyków oraz raporty dotyczące pojedynczych izolatów opornych na pewne leki stosowane w leczeniu listeriozy.

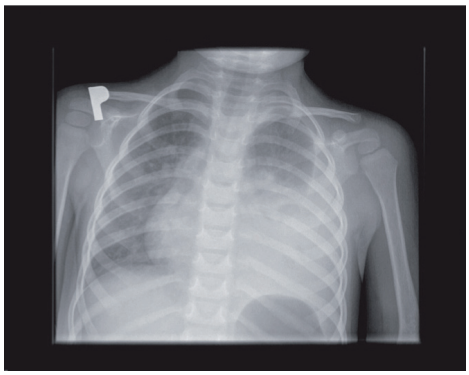
Pani Profesor Waleria Hryniewicz zaprezentowała dane dotyczące epidemiologii *Streptococcus pneumoniae* w wykładzie pt.: **„Inwazyjne zakażenia pneumokokowe w Polsce".** Pneumokoki są odpowiedzialne za zakażenia inwazyjne jak zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, bakteriemia, posocznica, zapalenie płuc z bakteriemią oraz za **zakażenia nieinwazyjne (zlokalizowane)** jak np. ostre zapalenie ucha środkowego, zapalenie zatok czy pozaszpitalne zapalenie płuc. Są jedną z głównych przyczyn zachorowalności i umieralności w skali świata. Najwyższe ryzyko zachorowań dotyczy niemowląt i małych dzieci < 2 r.ż. oraz osób dorosłych > 65 r.ż.
Spośród dodatnich izolatów/materiałów przesłanych do Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Diagnostyki Bakteryjnych Zakażeń Ośrodkowego Układu Nerwowego (KOROUN) w latach 1998-2008 aż **25% stanowiły pneumokoki.** Z danych KOROUN za lata 1995 - 2005 wynika również, że **w 22% przypadków zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych czynnikiem etiologicznym były właśnie pneumokoki.** W Polsce, w ostatnich latach, obserwuje się wzrost oporności pneumokoków na leki z różnych grup; dotyczy ona przede wszystkim penicyliny, doksycykliny i kotrimoksazolu. Dzięki coraz większej liczbie szczepów i materiałów, w których wykryto obecność pneumokokowego DNA, nadsyłanych do KOROUN, a w roku 2008 było ich prawie 200, mamy lepsze rozpoznanie sytuacji epidemiologicznej w Polsce. Istotnej wiedzy dostarcza nam serotypowanie pneumokoków, wśród których istnieje ponad 40 grup serologicznych i ponad 90 serotypów. Pomimo tej różnorodności **tylko niewielka liczba serotypów odpowiada za większość przypadków choroby inwazyjnej u dzieci. Jedyną skuteczną ochroną przeciwko pneumokokom są szczepienia.** W Polsce zarejestrowane są dwa typy szczepionek 23-walentna polischarydowa (dorośli) oraz 7-walentna skoniugowana przeznaczona dla dzieci. **Ta ostatnia obejmuje swym spektrum najczęściej występujące w Polsce serotypy, które jednocześnie są oporne na penicylinę tj.: 14, 9V, 19F, 23F i 6B. Szczepienia dzieci < 5 r.ż. są szczególnie ważne, gdyż stanowią one grupę zwiększonego ryzyka nabywania i rozprzestrzeniania wielolekoopornych szczepów. W Polsce szczepionka 7-walentna pokrywa blisko 100% szczepów wieloopornych wywołujących chorobę inwazyjną.**

Klinika

O współpracy mikrobiologa i lekarza klinicysty w szybkiej i prawidłowej diagnostyce ciężkich zakażeń inwazyjnych opowiada dr Ryszard Konior ze Szpitala Jana Pawła II w Krakowie.

Chłopiec 2,5 letni przesłany do Oddziału Neuroinfekcji z oddziału pediatrycznego szpitala rejonowego po kilkugodzinnej hospitalizacji, z powodu podejrzenia inwazyjnego zakażenia bakteryjnego. W wywiadzie częste infekcje dróg oddechowych. Miesiąc wcześniej był hospitalizowany w tym samym szpitalu rejonowym z powodu zapalenia płuc, najprawdopodobniej o etiologii wirusowej.

Cztery dni przed obecną hospitalizacją wystąpiła wysoka gorączka, ból ucha. Lekarz rejonowy przepisał azytromycynę, którą podawano do chwili przyjęcia do szpitala. W czasie kilkugodzinnej hospitalizacji w szpitalu rejonowym wykonano podstawowe badania krwi wraz z posiewem bakteriologicznym. Ze względu na narastającą śpiączkę oraz pogarszający się stan ogólny, po wprowadzeniu do leczenia pierwszej dawki cefalosporyny III-generacji dziecko przesłano do dalszego leczenia w Oddziale Neuroinfekcji. W chwili przyjęcia do oddziału stan ogólny był ciężki; dziecko leżące, cierpiące. W obrazie klinicznym dominowała duszność, tachykardia, gorączka 40°C. Badania podstawowe: CRP 342,3mg/l, OB: 60/100, L 7200. W badaniu rtg klatki piersiowej: w partiach środkowych obu płuc zagęszczenia plamiste o typie pneumonii. Wyraźnie zmniejszona powietrzność dolnego, lewego pola nadprzeponowego.



W Oddziale Neuroinfekcji prowadzono nadal dożylną terapię cefalosporynową. Początkowo uzyskano poprawę stanu klinicznego a w 3 dobie spadek CRP do 36,9 mg/l. W 4 dobie leczenia wystapito ponownie pogorszenie: pojawiła się większa duszność, CRP wzrosło do 155 mg/l. Kontrolne badanie radiologiczne klatki piersiowej wykazało progresję zmian zapalnych w płucach oraz płyn w lewej jamie opłucnowej.

Jednocześnie uzyskano informację, że z krwi pobranej w szpitalu rejonowym wyhodowano *Streptococcus pneumoniae.* Szczep przesłano do KOROUN. Podejrzewając, że mamy do czynienia z opornym szczepem pneumokokowym do leczenia dodatkowo włączono wankomycynę. Dalsze leczenie prowadzono w Oddziale Pulmonologii Kliniki Pediatrii Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego. Uzyskano pełne wyleczenie przy pozostawieniu dotychczasowej antybiotykoterapii.

Serotypowanie w KOROUN wykazało, że sprawcą tego ciężkiego zapalenia płuc był serotyp 14. Izolaty należące do tego serotypu są obecnie odpowiedzialne za bardzo wiele przypadków inwazyjnej choroby pneumokokowej w Polsce, w wielu przypadkach wykazują obniżoną wrażliwość na penicylinę. W naszym przypadku pomimo pierwszych sygnałów z laboratorium szpitala rejonowego o oporności na penicylinę i obniżonej wrażliwości na cefalosporyny badanie lekooporności w KOROUN nie potwierdziło tego zjawiska.

Oznaczanie wrażliwości w KOROUN wykazało, że badany szczep ma MIC penicyliny 0,12 mg/L i wg kryteriów CLSI z 2007r., należy uznać za średniowrażliwy na ten antybiotyk. Szczep był wrażliwy na cefalosporyny III generacji (MIC ceftriaksonu 0,0075 mg/L) i amoksycylinę (MIC<0,015 mg/L), ale oporny na azytromycynę (MIC>16 mg/L) i kotrimoksazol (MIC=4/76 mg/L).

Komentarz: Wydaje się, że gdyby u opisywanego pacjenta w początkowym zapaleniu ucha podjęto terapię wg standardów, a więc amoksycylinę w dawce 80 mg/kg wagi ciała na dobę, to nie doszłoby do dalszego rozwoju choroby i rozwinięcia zapalenia płuc z bakteriemią.

Diagnostyka

W tej sekcji chcemy zwrócić Państwa uwagę na podstawowe elementy prawidłowej diagnostyki mikrobiologicznej, odpowiadając na najczęściej zadawane pytania. Aspekty te zostały omówione na **Zjeździe Przedstawicieli Sieci Monitorowania Inwazyjnych Zakażeń Bakteryjnych BINet** w ramach wystąpienia dr Anny Skoczyńskiej.

• W jakich sytuacjach należy zlecać badanie bakteriologiczne?

Zawsze w sytuacji podejrzenia zakażenia inwazyjnego, które stanowi bezpośrednie zagrożenie życia pacjenta. Najczęstszymi postaciami tych zakażeń są zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, posocznica, bakteriemia oraz zapalenie płuc z bakteriemią.

Kiedy należy pobierać materiał biologiczny?

Próbki krwi/płynu mózgowo-rdzeniowego (lub inne) należy pobrać jałowo, założyć hodowlę, wykonać preparat i test lateksowy, a część zabezpieczyć do badań niehodowlanych (PCR). Materiał najlepiej pobrać przed rozpoczęciem antybiotykoterapii, jednak nie później niż do 72 godz. od jej rozpoczęcia. Jeśli w pracowni w badanym materiale stwierdzono obecność bakterii (preparat, test lateksowy), a hodowla była ujemna, to do badań PCR należy przesłać tą właśnie próbkę materiału.

• **Jakie szczepy i materiał wysyłać do KOROUN w ramach projektu BINet?**

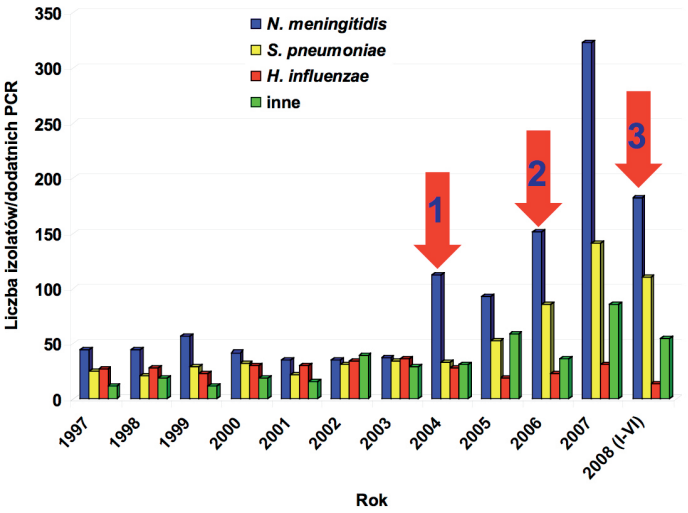
Wysyłamy szczepy *N. meningitidis, S. pneumoniae, H. influenzae, S. pyogenes, S. agalactiae, L. monocytogenes i S. aureus,* odpowiedzialne za zakażenia inwazyjne. Najlepsze wyniki w diagnostyce niehodowanej (PCR) uzyskuje się dla pełnej krwi (2,5-5 ml; noworodki 0,5-1 ml) pobranej na EDTA. Badana może być również krew pobrana na heparynę i cytrynian, surowica, nieodwirowany PMR i małe skrawki narządów (1 x 1 x 1 cm) pobrane *post mortem.*

• **Jak należy przesyłać szczepy i materiał do badań PCR?**

Świeżą i czystą hodowlę szczepu należy przesyłać jednocześnie na wymazówce z podłożem transportowym i na płytce z podłożem czekoladowym lub krwawym wraz z wypełnioną ankietą. Prosimy o zabezpieczanie szczepów w pracowni do czasu uzyskania potwierdzenia telefonicznego z KOROUN. Najlepiej wysyłać szczepy na początku tygodnia, zabezpieczone przed zgnieceniem, przemarznięciem lub przegrzaniem. Odpowiednie do objętości próbki do badań PCR probówki należy dokładnie zamknąć, opisać i zabezpieczyć przed zgnieceniem. Krew, surowicę i PMR można przesyłać w temp. pokojowej (latem zabezpieczać przed przegrzaniem), a skrawki tkanek zamrożone na suchym lodzie lub przynajmniej z wkładami chłodzącymi.

Chcemy również przedstawić Państwu wpływ powołania sieci BINet na lepsze rozpoznanie etiologii zakażeń inwazyjnych w Polsce.

Na Rycinie 1 przedstawiono liczbę izolatów i materiałów dodatnich w badaniach PCR przesłanych do KOROUN w kolejnych latach. W Tabeli 1 przedstawiono m.in. dane dotyczące badań z wykorzystaniem PCR, z których wynika, że do połowy roku 2008, ponad 30% zakażeń meningokokowych zostało potwierdzonych laboratoryjnie właśnie dzięki niehodowlanej metodzie PCR. Wpływ sieci BINet jest również widoczny poprzez wzrost liczby badań prowadzonych w KOROUN; w roku 2008 zostało wydanych ponad dwukrotnie więcej wyników badań niż w roku 2007 (973 vs 442).



Rycina 1. Liczba izolatów poszczególnych gatunków i materiałów, w których wykryto DNA gatunkowo-specyficzne, wyhodowanych i pobranych od pacjentów z zakażeniami inwazyjnymi, przesłane do KOROUN, 1997-czerwiec 2008. Na wzrost potwierdzonych laboratoryjnie zakażeń wpływ miały niewątpliwie trzy okoliczności: 1 - zmiana systemu rejestracji zakażeń inwazyjnych, 2 – wystąpienie ognisk epidemicznych inwazyjnej choroby meningokokowej i związany z tym wzmożony nadzór, 3 – powołanie sieci BINet.

Rok	Izolaty (n)	PCR+ Nmen (n)	Próbki na PCR (n)
2003	52	-	-
2004	115	-	-
2005	102	6	24
2006	145	15	66
2007	259	65	271
2008 (I-VI)	125	65	266 (168 pacjentów)

Tabela 1. Liczba inwazyjnych szczepów N. meningitidis przesłana do KOROUN oraz liczba przypadków, gdy w materiale klinicznym metodą PCR wykryto materiał genetyczny specyficzny dla N. meningitidis (PCR+Nmen) w stosunku do wszystkich materiałów przesłanych na badania PCR (Próbki na PCR).

ZASADY PRZESYŁANIA SZCZEPÓW BAKTERYJNYCH I MATERIAŁÓW KLINICZNYCH DO KOROUN

W celu potwierdzenia identyfikacji i przeprowadzenia dalszych badań w oparciu o diagnostykę molekularną.

Przygotowano na podstawie „Rekomendacje diagnostyczne inwazyjnych zakażeń bakteryjnych nabytych poza szpitalem". M. Kadłubowski, A. Skoczyńska, W. Hryniewicz, KOROUN, NIL, 2007.

Materiał biologiczny od pacjenta z podejrzeniem zakażenia inwazyjnego, nie powinien być pobierany bezpośrednio na podłoże hodowlane lub transportowe, ponieważ uniemożliwia to wykonanie innych badań diagnostycznych jak:

- preparat bezpośredni,
- test lateksowy,
- badania biochemiczne,
- badania metodą PCR.

IZOLAT BAKTERYJNY

1. Kluczowym elementem diagnostyki jest wyhodowany od pacjenta z inwazyjnym zakażeniem szczep bakteryjny. Każdy szczep bakteryjny wyhodowany z zakażenia inwazyjnego nabytego poza szpitalem, powinien zostać przesłany do KOROUN **wraz z wypełnionym formularzem.**
2. Szczep bakteryjny należy wysłać do KOROUN **w dwóch wersjach (np. płytka Petriego i wymazówka z podłożem trans-**

portowym, płytka i skos agarowy itp.).

3. Hodowla powinna być świeża i czysta - należy kontynuować diagnostykę, aż do potwierdzenia dotarcia przesyłki do KOROUN i ożywienia izolatu. W sytuacji gdy szczep nie przeżyje transportu do Ośrodka Referencyjnego, konieczne jest jego ponowne przesłanie.
4. Należy zabezpieczyć szczep przed ewentualnym zgnieceniem, uszkodzeniem oraz zmianami temperatury, próbki mogą być przesyłane w temperaturze pokojowej z dbałością o ich możliwie jak najszybsze dostarczenie.

ZASADY PRZESYŁANIA SZCZEPÓW BAKTERYJNYCH I MATERIAŁÓW KLINICZNYCH DO KOROUN

W celu potwierdzenia identyfikacji i przeprowadzenia dalszych badań w oparciu o diagnostykę molekularną.

MATERIAŁ BIOLOGICZNY

1. Należy zabezpieczyć materiał do badań molekularnych – wymagane jest **150 µl płynu mózgowo-rdzeniowego i/lub 2 ml krwi pobranej na skrzep lub stabilizator czy 2 ml surowicy** w jałowych, szczelnie zamykanych i opisanych probówkach. Do czasu wysłania do KOROUN materiał należy przechowywać w lodówce lub zamrozić.
2. Próbki materiałów klinicznych powinny być pobrane od pacjenta możliwie najszybciej, ale nie później niż **w ciągu 72 godzin** od włączenia antybiotykoterapii.
3. **Jeżeli wynik preparatu bezpośredniego oraz hodowli prowadzonej w laboratorium lokalnym jest ujemny po 24 h** od pobrania materiału należy wysłać zabezpieczony materiał biologiczny do badań molekularnych do KOROUN
4. Jeżeli przed ustaleniem etiologii zakażenie doprowadzi do zgonu pacjenta, do KOROUN należy wysłać **materiały mikrobiologiczne pobrane śródsekcyjnie** np.: krew z komór serca (2ml) oraz skrawki (0,5 x 0,5 x 0,5 cm) śledziony, wątroby, nerek oraz drobne fragmenty zmienionej skóry (przy wysypce krwotocznej), w takiej sytuacji prosimy o kontakt z telefoniczny z KOROUN (22) 851 46 70 lub (22) 841 12 33 przed wysłaniem próbek.

Dodatkowe informacje i wzór formularza można znaleźć na stronie: www.koroun.edu.pl

Szczepy i materiały biologiczne należy przesyłać na adres:
Narodow Instytut Leków KOROUN
Ul. Chełmska 30/34
00-725 Warszawa