

**ZASADY POSTĘPOWANIA W PRZYPADKU ZAKAŻEŃ
OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO
WYWOŁYWANYCH PRZEZ
NEISSERIA MENINGITIDIS I INNE DROBNOUSTROJE**



**ZASADY POSTĘPOWANIA W PRZYPADKU ZAKAŻEŃ
OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO
WYWOŁYWANYCH PRZEZ
NEISSERIA MENINGITIDIS I INNE DROBNOUSTROJE**

dr n. med. Anna Skoczyńska

mgr biol. Marcin Kadłubowski

prof. dr hab. med. Waleria Hryniewicz

Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Diagnostyki Bakteryjnych Zakażeń

Ośrodkowego Układu Nerwowego (KOROUN)

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego

α -medica press

Copyright © 2004 α -medica press
All rights reserved
Wszystkie prawa zastrzeżone
ISBN 83-88778-xx-xx

Wszelkie uwagi prosimy kierować pod adresem wydawnictwa:
 α -medica press, skr. poczt. 333, 43-300 Bielsko-Biała
e-mail: poczta@alfamedica.pl
www.alfamedica.pl

Opracowanie rekomendowane przez
Głównego Inspektora Sanitarnego
(Warszawa, kwiecień 2004)

Uwaga:

Ciągle wprowadza się modyfikacje dawkowania poszczególnych leków i opisuje nowo dostrzeżone działania uboczne. Wydawca nie może wziąć odpowiedzialności, bezpośredniej ani pośredniej, za prawidłowość cytowanych w tej książce dawek leków. Zobowiązujemy zatem Czytelnika, by przed zastosowaniem jakiegokolwiek leku zalecanego w niniejszej książce, zapoznał się najpierw z drukowanymi informacjami, jakie załącza do leku producent.

Druk: Ośrodek Wydawniczy „Augustana”
Plac M. Lutra, 43-300 Bielsko-Biała

SPIS TREŚCI

Wprowadzenie	9
Charakterystyka głównych czynników etiologicznych zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych	10
<i>Neisseria meningitidis</i>	10
<i>Haemophilus influenzae</i>	12
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	13
Sytuacja epidemiologiczna w Polsce	14
Materiał do badań w przypadku zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i posocznicy	16
Płyn mózgowo-rdzeniowy	17
Pobieranie płynu mózgowo-rdzeniowego	17
Transport płynu mózgowo-rdzeniowego do laboratorium mikrobiologicznego i/lub jego zabezpieczanie ...	18
Postępowanie z płynem mózgowo-rdzeniowym	19
Bezpieczeństwo pracy z płynem mózgowo-rdzeniowym	20
Zagęszczanie płynu mózgowo-rdzeniowego	20
Hodowla płynu mózgowo-rdzeniowego	20
Przygotowanie preparatu mikroskopowego	22
Barwienie metodą Grama	22
Barwienie błękitem metylenowym wg Loefflera	23
Barwienie oranżem akrydyny	23
Barwienie Waysona	24
Metody typowania szczepów	25
Typowanie serologiczne	26
Bezpośrednie wykrywanie antygenów otoczkowych w płynie mózgowo-rdzeniowym i innych płynach ustrojowych	26
Testy lateksowe	26
Specyficzne surowice	27

Pełne typowanie serologiczne szczepów <i>Neisseria meningitidis</i> ...	27
Typowanie serologiczne z wykorzystaniem reakcji PCR	27
Badanie pęcznienia otoczek	28
Oznaczenie wrażliwości na leki szczepów <i>Neisseria meningitidis</i>	29
Oznaczenie wrażliwości na leki szczepów <i>Haemophilus influenzae</i> .	29
Oznaczenie wrażliwości na leki szczepów <i>Streptococcus pneumoniae</i> ..	30
Oznaczenie wrażliwości na leki szczepów innych gatunków	30
Metody genotypowe	31
PFGE	31
RAPD	32
MLST	32
Pobieranie krwi do badań mikrobiologicznych	33
Pobieranie wymazów z jamy nosowo-gardłowej od chorych i nosicieli ..	35
Pobieranie materiału z wybroczyn na skórze	36
Izolacja drobnoustroju tego samego gatunku z różnych materiałów od tego samego pacjenta	36
Raportowanie wyników	37
Zabezpieczenie materiału do reakcji PCR	37
Transport szczepów do laboratorium referencyjnego (KOROUN)	38
Przechowywanie szczepów	39
Badanie mikrobiologiczne <i>post mortem</i>	40
Hodowla drobnoustrojów <i>post mortem</i>	41
Badanie <i>post mortem</i> wykorzystujące reakcję PCR	42
Kontrola jakości	43
Odczynniki, podłoża i wyposażenie laboratorium prowadzącego diagnostykę bakteryjnych zakażeń inwazyjnych	42
Immunoprofilaktyka zakażeń wywołanych przez <i>Haemophilus influenzae</i> typu b	43
Immunoprofilaktyka zakażeń wywołanych przez <i>Streptococcus pneumoniae</i>	44
Immunoprofilaktyka zakażeń wywołanych przez <i>Neisseria meningitidis</i>	44

Chemioprophylaktyka zakażeń ośrodkowego układu nerwowego	46
Chemioprophylaktyka zakażeń wywołanych przez <i>Neisseria meningitidis</i>	46
Chemioprophylaktyka zakażeń wywołanych przez <i>Haemophilus influenzae</i>	49
Chemioprophylaktyka zakażeń wywołanych przez <i>Streptococcus pneumoniae</i>	49
Chemioprophylaktyka u kobiet ciężarnych i karmiących	49
Inne postępowanie	49
Postępowanie w przypadku wystąpienia zakażenia/zakażeń meningokokowych	50
Definicja inwazyjnej choroby meningokokowej	50
Schemat postępowania w przypadku wystąpienia zakażenia meningokokowego	53
Ankieta do wypełnienia i wysłania wraz ze szczepem w przypadku zakażeń ośrodkowego układu nerwowego i innych zakażeń meningokokowych	54
Piśmiennictwo	58

WPROWADZENIE

Zakażenia ośrodkowego układu nerwowego stanowią poważny problem diagnostyczny i terapeutyczny. Oprócz bezpośredniego zagrożenia życia mogą prowadzić do trwałych następstw, które wiążą się z ograniczeniem sprawności umysłowej i fizycznej. Dlatego w każdym przypadku podejrzenia zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i posocznicy konieczna jest natychmiastowa interwencja lekarza i w razie potwierdzenia wstępnej diagnozy szybkie podjęcie leczenia i hospitalizacja. Najczęstszą postacią zakażenia ośrodkowego układu nerwowego (oun) jest zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych. Może być wywoływane przez wirusy, bakterie, grzyby i pasożyty, jednak najpoważniejszy problem epidemiologiczny i kliniczny ze względu na częstość występowania i ciężkość przebiegu stanowią zakażenia bakteryjne. Z danych epidemiologicznych wynika, że zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, mimo rozwoju medycyny, jest w dalszym ciągu jedną z najczęstszych przyczyn zachorowalności i śmiertelności u dzieci. Szacuje się, że rocznie na całym świecie zapada na to schorzenie około 1 milion osób. Ponad 80% przypadków bakteryjnych zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych powyżej 6 m.ż. wywoływanych jest przez 3 drobnoustroje – *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* i *Streptococcus pneumoniae*.

W okresie noworodkowym i wczesnym niemowlęcym w zakażeniach oun dominują *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* i *Listeria monocytogenes*. Przebieg tych zakażeń jest znacznie cięższy, najczęściej związany z zakażeniem uogólnionym, a śmiertelność w tych przypadkach przekracza 50%.

Występowanie bakteryjnego zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych jest na tyle częste, że lekarz pierwszego kontaktu powinien podejrzewać ten typ zakażenia u każdego pacjenta z szybko narastającą gorączką, pobudzeniem lub zaburzeniami świadomości. Rozpoznanie zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych u pacjentów w wieku powyżej 1-2 lat zwykle nie jest trudne, ponieważ choroba najczęściej przebiega gwałtownie, z wysoką gorączką, bólami głowy i charakterystycznym zespołem objawów oponowych. Objawy te mogą się szybko nasilać, prowadząc do zaburzeń świadomości, a w najcięższych przypadkach do śpiączki i zgonu. Natomiast u niemowląt rozpoznanie zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych może być znacznie trudniejsze, ponieważ objawy, na ogół nietypowe (m.in. zaburzenia łaknienia i drgawki), mogą sugerować inne schorzenia.

W każdym przypadku tak ciężkiego zakażenia, jakim jest zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i posocznica, decydujące znaczenie rokownicze ma natychmiastowe wdrożenie skutecznego leczenia przeciwbakteryjnego. Z tego względu bardzo istotne jest precyzyjne rozpoznanie czynnika etiologicznego, ponieważ tylko wówczas możliwe jest prawidłowe i skuteczne leczenie przyczynowe, a także zapobieganie kolejnym zakażeniom w otoczeniu poprzez szczepienia lub profilaktyczne stosowanie antybiotyków (chemioprofilaktyka).

CHARAKTERYSTYKA GŁÓWNYCH CZYNNIKÓW ETIOLOGICZNYCH ZAPALENIA OPON MÓZGOWO-RDZENIOWYCH

NEISSERIA MENINGITIDIS

Neisseria meningitidis, Gram(-) dwójka (meningokok, dwójka zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych) jest chorobotwórczym drobnoustrojem, wywołującym m.in. ciężkie zakażenia inwazyjne, takie jak zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i posocznica, określane łącznie jako **inwazyjna choroba meningokokowa**. *Neisseria meningitidis* może również wywoływać ropne zapalenie stawów, zapalenie płuc, zapalenie osierdzia i wsierdzia, zapalenie spojówek, szpiku kostnego, ucha środkowego, gardła, zakażenia w obrębie układu moczowo-płciowego i miednicy małej. Bakteria ta może stanowić duże zagrożenie, ponieważ zakażenia mogą występować nie tylko w postaci zachorowań sporadycznych, endemicznych/hyperendemicznych, ale również epidemicznych/pandemicznych. Ze względu na różnice antygenowe wielocukrów otoczkowych szczepy *Neisseria meningitidis* podzielono na 13 grup serologicznych: A, B, C, D, X, Y, Z, W135, 29E, H, I, K i L, z których A, B, C, Y i W135 odpowiadają za prawie wszystkie przypadki zachorowań. Dalszą klasyfikację meningokoków na typy i podtypy serologiczne przeprowadza się w oparciu o różnice antygenowe białek błony zewnętrznej (ang. *outer membrane proteins* – OMPs).

Wyłącznym, naturalnym rezerwuarem jest człowiek, zarówno chory, jak i bezobjawowy nosiciel. Bezobjawowe nosicielstwo meningokoków może świadczyć o występowaniu znacznych różnic w zjadliwości poszczególnych szczepów oraz w różnej podatności gospodarza na zakażenie.

Drobnoustroje te kolonizują jamę nosowo-gardłową i są **przenoszone** drogą kropelkową lub przez kontakt bezpośredni. Szerzenie się choroby meningokokowej odbywa się zazwyczaj za pośrednictwem bezobjawowych nosicieli (rzadko pomiędzy osobami, które zachorowały). Nosicielstwo może utrzymywać się przez wiele miesięcy. Nosiciele mogą stanowić 2-25% populacji, ale w środowiskach zamkniętych ich odsetek może sięgać 40-80%. O stosunkowo niewielkiej zakaźności może świadczyć fakt, że nawet podczas epidemii tylko 1 na 1000 do 5000 osób skolonizowanych przez meningokoki rozwija zakażenie.

Okres wylegania inwazyjnej choroby meningokokowej może wynosić 2-10 dni, na ogół jednak jest to okres 3-4 dni. U niemowląt i młodszych dzieci choroba może mieć przebieg piorunujący, prowadzący w ciągu kilku godzin do zgonu. Najwięcej zachorowań wywołanych przez *Neisseria meningitidis* obserwuje się u młodszych dzieci i młodzieży, a największy odsetek nosicieli występuje u osób w wieku od 15 do 24 roku życia. Epidemie dotyczą zazwyczaj środowisk zamkniętych, jak szkoły, przedszkola, domy dziecka, akademiki, koszary, więzienia, domy opieki. Śmiertelność wynosi około 10-13%, ale w przypadku wystąpienia wstrząsu septycznego może sięgać 50%.

Epidemie wywołwane są głównie przez szczepy z grupy A i C. Szczepy grupy B są najczęściej związane z zachorowaniami sporadycznymi, chociaż mogą również wywoływać epidemie. Największe epidemie, dotychczas wywołwane przez grupę serologiczną A, mają miejsce w tzw. afrykańskim „pasie zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych” (*meningitis belt*) rozciągającym się na południe od Sahary.

Sezonowość. Obserwuje się sezonowość zachorowań meningokokowych. Natomiast nie widać wpływu pór roku na liczbę nosicieli w populacji. W Europie północnej i w Ameryce Północnej najczęściej zachorowań ma miejsce w pierwszym kwartale roku. Liczba ich osiąga najniższe wartości późnym latem. Epidemie w „pasie zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych” rozpoczynają się w porze suchej i kończą wraz z nadejściem pory deszczowej.

Zapadalność. Porównywanie zapadalności na zakażenia meningokokowe w różnych krajach jest utrudnione. Większość państw rejestruje, co prawda przypadki zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i posocznicy łącznie jako inwazyjną chorobę meningokokową, jednak w niektórych krajach rejestrowane są jedynie zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych. W Polsce obowiązuje osobne zgłaszanie zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i posocznicy o etiologii meningokokowej (nr A.39.8 wg ICD-10), co rozbija czytelność zgłoszeń, ale nowelizowana obecnie ustawa o chorobach zakaźnych obejmie rejestracją inwazyjną chorobę meningokokową.

Średnio przyjmuje się, że zapadalność dla większości krajów rozwiniętych waha się od 1-3 przypadków zakażeń meningokokowych na 100 000 mieszkańców. W Europie wynosi 1,1/100 000, a w Polsce wg danych Państwowego Zakładu Higieny 0,22/100 000 (dotyczy tylko zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych).

Pod względem objawów klinicznych zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych wywoływane przez *Neisseria meningitidis* zasadniczo nie różni się od innych bakteryjnych zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych. Częstym objawem posocznicy meningokokowej, mogącym występować również w przypadku zakażeń innymi czynnikami etiologicznymi, jest wysypka krwotoczna, występująca u około 10-50% chorych. Niekiedy w postaci piorunującej występują wylewy do nadnerczy (zespół Waterhouse-Friedrichsena), będące niekorzystnym czynnikiem rokowniczym. Posocznica występująca bez jednoczesnego zajęcia opon stanowi około 10% przypadków.

HAEMOPHILUS INFLUENZAE

Bakterie z gatunku *Haemophilus influenzae* to drobne, pleomorficzne, niewykazujące ruchu Gram(-) pałeczki lub ziarniakopałeczki. Niektóre szczepy wytwarzają otoczkę, której odmienność antygenowa stanowi podstawę do podziału tego gatunku na 6 grup serologicznych (a-f). Najgroźniejsze zakażenia wywoływane są przede wszystkim przez serotyp b (Hib). Szczepy Hib są przyczyną przeważającej większości ciężkich inwazyjnych zakażeń u dzieci poniżej 5 roku życia (najwięcej zachorowań występuje pomiędzy 4 miesiącem a 2 rokiem życia). Serotyp ten odpowiedzialny jest za ponad 90% zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych wywołanych przez ten gatunek, a także za inne zakażenia o charakterze inwazyjnym, takie jak posocznica, zapalenie płuc, zapalenie nągłośni, zapalenie kości i stawów oraz tkanki podskórnej. Wśród zakażeń nieinwazyjnych wywołanych przez *Haemophilus influenzae*, przede wszystkim przez szczepy nieotoczkowe można wymienić zapalenie ucha środkowego, zapalenie zatok i zaostżenia przewlekłego zapalenia oskrzeli.

Rezerwuarem drobnoustrojów należących do gatunku *Haemophilus influenzae* jest jama nosowo-gardłowa człowieka. Bakterie są **przenoszone** drogą kropelkową lub przez kontakt bezpośredni. Ogólnie określa się, że od 25 do 80% zdrowej populacji jest nosicielami szczepów z gatunku *Haemophilus influenzae*; u małych dzieci odsetek ten jest najwyższy i wynosić może 60-80%. U dzieci obserwuje się również więcej nosicieli szczepów otoczkowych serotypu b (Hib) (3-5%) w porównaniu z dorosłymi (1%). Najwyższy odsetek nosicieli Hib występuje u osób miesz-

kających wspólnie z chorym na zakażenie wywołane przez Hib (ogólnie wynosi 20-25%, a w przypadku dzieci <5 r.ż. nawet ponad 50%).

Zapadalność. Przed wprowadzeniem masowych szczepień przeciw *Haemophilus influenzae* typu b, w niektórych krajach, jak Finlandia (zapadalność 26/100 000 < 5 r.ż.) czy Stany Zjednoczone (zapadalność 60/100 000 < 5 r.ż.), drobnoustrój ten był najczęstszym czynnikiem etiologicznym bakteryjnych pozaszpitalnych zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych. W krajach, które wprowadziły powszechne szczepienia dzieci przeciw Hib, zakażenia inwazyjne wywoływane przez ten drobnoustrój zostały prawie całkowicie wyeliminowane. Szczepienia wpłynęły również na zmniejszenie poziomu nosicielstwa w całej populacji.

W Polsce szczepienie przeciw Hib nie jest obowiązkowe, ale wysoce zalecane. Według danych PZH zapadalność w Polsce na zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych wywoływane przez Hib u dzieci poniżej 5 roku życia wynosi około 2,5/100 000.

STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

Streptococcus pneumoniae (pneumokok, dwoinka zapalenia płuc) to Gram(+), katalazo(-) dwoinki, wytwarzające otoczkę wielocukrową. Ze względu na odrębności antygenowe wyróżniono wśród pneumokoków 90 serotypów otoczkowych. W odróżnieniu od *Neisseria meningitidis* i *Haemophilus influenzae* pneumokoki mogą wywoływać zakażenia nie tylko u ludzi.

U człowieka naturalnym miejscem bytowania (**rezerwuarem**) pneumokoków jest nosogardło, a kolonizacja dotyczy około 5-10% zdrowych dorosłych i 20-40% zdrowych dzieci.

Pneumokoki są **przenoszone** drogą kropelkową lub przez kontakt bezpośredni. Do najczęstszych chorób wywoływanych przez ten gatunek należą: zapalenie płuc, posocznica, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie zatok i ucha środkowego. W USA prawie każde dziecko do 5 r.ż. ma za sobą przebyte zapalenie ucha środkowego wywołane przez pneumokoki. Natomiast w krajach rozwijających się gatunek ten jest najczęstszym czynnikiem etiologicznym zapaleń płuc zarówno u dzieci, jak i dorosłych. Posocznica może występować niezależnie od zapalenia płuc lub być jego następstwem. Śmiertelność w jej przebiegu jest podobna do opisywanej dla pneumokokowego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i wynosi 17-25%. *Streptococcus pneumoniae* jako czynnik etiologiczny zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych dużo częściej wywołuje poważne powikłania niż inne bakterie i może odpowiadać za nawrotowe zapalenie

opon mózgowo-rdzeniowych. Najwięcej inwazyjnych zachorowań występuje w skrajnych grupach wiekowych, tj. u dzieci do 2 r.ż. oraz u osób powyżej 65 r.ż. **Zapadalność** w USA wynosi średnio 21 przypadków na 100 000, ale różni się znacząco w zależności od wieku i innych czynników ryzyka.

Sezonowość. Zachorowania najczęściej występują w miesiącach zimowych i wczesną wiosną, co koreluje ze wzrostem zakażeń wirusowych dróg oddechowych. Udział poszczególnych serotypów w zakażeniach nie jest identyczny i występuje zróżnicowanie między krajami i jednostkami chorobowymi. Poważnym problemem terapeutycznym jest oporność na penicylinę, której często towarzyszy brak wrażliwości na inne grupy antybiotyków (wielooporność). Dotyczy to ograniczonej liczby serotypów, z których tylko kilka rozprzestrzeniło się klonalnie na całym świecie (6B, 9, 14, 19, 23F).

SYTUACJA EPIDEMIOLOGICZNA W POLSCE

Rzeczywista sytuacja epidemiologiczna dotycząca zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych i innych zakażeń meningokokowych na terenie naszego kraju nie jest w pełni znana. Pomimo wielu działań i apeli wzywających do współpracy wciąż istnieje duża rozbieżność pomiędzy liczbą przypadków rejestrowanych przez PZH, a liczbą szczepów otrzymanywanych przez Krajowy Ośrodek Referencyjny d/s Diagnostyki Bakteryjnych Zakażeń Ośrodkowego Układu Nerwowego (KOROUN). I tak np. w przypadku meningokoków KOROUN otrzymuje jedynie około 35% szczepów odpowiedzialnych za zarejestrowane zakażenia. Na podstawie zakażeń meningokokowych, które miały miejsce w województwie zachodnio-pomorskim w roku 2003 i na początku 2004 okazało się, że również sama rejestracja przypadków pozostawia wiele do życzenia i pomimo gwarantowanego ustawą obowiązku zgłaszania zachorowań, nie zawsze ma ona miejsce. Dlatego też celem napisania tych wytycznych jest po pierwsze wdrożenie ujednoliconego schematu postępowania w przypadku zakażeń ośrodkowego układu nerwowego i innych zakażeń meningokokowych, który umożliwi ustalenie etiologii zakażenia, a co za tym idzie skutecznej terapii oraz zapobieganie rozprzestrzenianiu się zakażeń, zwłaszcza meningokokowych. Z kolei przesyłanie wszystkich szczepów do KOROUN pozwoli na pełną analizę sytuacji epidemiologicznej w Polsce opartą o dane laboratoryjne. Jedynie

stałe monitorowanie tych zakażeń pozwoli na właściwą ocenę i podjęcie skutecznych interwencji w przypadku wystąpienia sytuacji nadzwyczajnej lub sytuacji, która tylko na taką wygląda.

Według danych opracowanych przez KOROUN sytuacja epidemiologiczna w zakresie etiologii zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych w Polsce jest podobna do opisywanej na świecie. W latach 1997-2002, 85% potwierdzonych laboratoryjnie zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych wywołanych było przez trzy gatunki drobnoustrojów: *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* i *Streptococcus pneumoniae*. Najczęstszym czynnikiem etiologicznym zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych była *Neisseria meningitidis* (36%), następnie *Haemophilus influenzae* (26%) i *Streptococcus pneumoniae* (23%). Inne gatunki stanowiły 15% zebranych szczepów, wśród nich dominowały *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae*.

W roku 2002 odnotowano niepokojący wzrost liczby meningokoków grupy serologicznej C. Dotychczas, corocznie za ponad 80% zakażeń odpowiadała serogrupa B. Od początku działalności Ośrodka (lata 1997-2001) szczepy serogrupy C stanowiły średnio 11,2% zgromadzonych meningokoków, a w roku 2002 meningokoki tej serogrupy stanowiły już 31,4%. Tendencja ta utrzymała się również w 2003 r., kiedy to 39% otrzymanych meningokoków z zakażeń inwazyjnych należało do serogrupy C. Wzrost częstości występowania zachorowań wywołanych przez meningokoki należące do grupy serologicznej C jest obserwowany również w innych krajach europejskich oraz w Stanach Zjednoczonych. Doświadczenia tych państw wskazują, że pojawienie się meningokoków serogrupy C wpływa nie tylko na zmianę proporcji w zachorowaniach wywołanych przez poszczególne grupy serologiczne, ale co dużo groźniejsze, także na ogólny wzrost liczby zachorowań inwazyjnych. Oprócz tego w przypadku meningokoków grupy C obserwujemy niekiedy rozprzestrzenianie się danego klonu na terenie różnych krajów i kontynentów.

Jedynie u 5,8% meningokoków stwierdzono obniżoną wrażliwość na penicylinę. Jak dotąd nie ustalono jednoznacznego stanowiska terapeutycznego wobec zakażeń wywołanych przez te szczepy, ale większość badaczy twierdzi, że zjawisko to nie ma znaczenia klinicznego i szczepy takie mogą być z powodzeniem leczone dużymi dawkami penicyliny. Dlatego też **penicylina pozostaje lekiem z wyboru** w leczeniu zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych wywołanym przez *Neisseria meningitidis*.

Prawie 80% wszystkich szczepów *Haemophilus influenzae* wyhodowano od dzieci poniżej 5 r.ż. Ponad 90% szczepów wytwarzało otoczek i należało do serotypu b (Hib), Wśród szczepów *Haemophilus influenzae* 12,3% było opornych na ampicylinę w wyniku wytwarzania β -laktamaz. Wszyst-

kie szczepy były wrażliwe na cefalosporyny III generacji podawane parenteralnie, które pozostają lekiem z wyboru w leczeniu zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych wywoływanym przez *Haemophilus influenzae*.

Szczepy *Streptococcus pneumoniae* wykazały dużą różnorodność serologiczną, a najczęściej występującymi serotypami były: 3, 8, 19F i 6B. Zachorowania obserwowano we wszystkich grupach wiekowych, a 42% izolatów pochodziło od osób <20 r.ż. Niewrażliwość na penicylinę wykryto u 14,1% pneumokoków. Szczepy odporne na penicylinę wykazywały również oporność na inne antybiotyki (tzw. szczepy wielooporne). Najmniej aktywnymi antybiotykami *in vitro* okazały się chloramfenikol i kotrimoksazol, na które odpowiednio jedynie 71% i 66% szczepów było wrażliwych.

MATERIAŁ DO BADAŃ W PRZYPADKU ZAPALENIA OPON MÓZGOWO-RDZENIOWYCH I POSOCZNICY

Ze względu na ciężkość zakażenia i jego możliwe konsekwencje w każdym przypadku zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i posocznicy należy dążyć do ustalenia czynnika etiologicznego i jego wrażliwości na antybiotyki. Jest to możliwe jedynie w przypadku prawidłowego pobrania (i w odpowiednim czasie) właściwego materiału do badań.

Podstawowym materiałem do badań w przypadku podejrzenia zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych jest **płyn mózgowo-rdzeniowy**. W większości przypadków drobnoustroje dostają się do opon mózgowo-rdzeniowych drogą krwiopochodną, rzadziej przez ciągłość bądź bezpośrednio do ośrodkowego układu nerwowego. Dlatego ważnym materiałem diagnostycznym jest krew i **w każdym przypadku podejrzenia zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych należy wykonać posiew krwi**, który w początkowym stadium zakażenia jest dodatni nawet w ponad 50% przypadków. Pomocnym badaniem może też być **pobranie wymazu z jamy nosowo-gardłowej**, gdyż bakterie, które najczęściej wywołują zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych początkowo kolonizują jamę nosowo-gardłową, stąd przedostają się do krwi, a następnie pokonują barierę krew-mózg. Należy pamiętać, że pobranie wymazu z jamy nosowo-gardłowej od osób z otoczenia chorego na meningokokową chorobę inwa-

zyną jest bardzo ważnym postępowaniem w zapobieganiu dalszym zachorowaniom w środowisku.

W przypadku zakażenia wywołanego przez *Neisseria meningitidis* bakterie mogą być izolowane z **wybroczyn na skórze**, które są częstym objawem choroby.

Uwaga! Metodyka pobierania i opracowywania wymienionych materiałów opisana jest w dalszej części tego opracowania.

PŁYN MÓZGOWO-RDZENIOWY

Badanie płynu mózgowo-rdzeniowego u pacjentów z podejrzeniem zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych należy do najważniejszych i priorytetowych w laboratorium mikrobiologii klinicznej. Bakteryjne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych pozostawione bez leczenia lub leczone niewłaściwie stanowi bezpośrednie zagrożenie życia chorego. Dlatego tak duży nacisk kładzie się na szybkie opracowanie płynu mózgowo-rdzeniowego i właściwą identyfikację czynnika etiologicznego. Wykonanie preparatu i założenie hodowli bakteryjnej powinny być czynnościami wykonywanymi natychmiast po otrzymaniu płynu mózgowo-rdzeniowego.

POBIERANIE PŁYNU MÓZGOWO-RDZENIOWEGO

Szczególna uwaga powinna być zwrócona na **właściwe wyjałowienie miejsca nakłucia** podczas punkcji lędźwiowej, gdyż możliwe jest zanieczyszczenie pobieranego płynu mózgowo-rdzeniowego florą występującą na skórze (np. koagulazo(-) gronkowcami, maczugowcami).

1. Miejsce nakłucia należy oczyścić 70% alkoholem.
2. Powierzchnię skóry należy zdezynfekować 2% jodyną i pozostawić do wyschnięcia.
3. Lekarz wprowadza igłę i pobiera płyn mózgowo-rdzeniowy (najmniej 1 ml, optymalnie, jeśli to możliwe 3-4 ml) do jałowych zakręcanych probówek.
4. Po pobraniu materiału i wycofaniu igły, a przed założeniem opatrunku należy usunąć jodynę ze skóry za pomocą alkoholu, aby zapobiec podrażnieniu skóry.
5. Na ogół pobierane są 3 próbki płynu mózgowo-rdzeniowego, do badań analitycznych, mikrobiologicznych i cytologicznych. **Do badań mikro-**

biologicznych najlepiej przeznaczać płyn mózgowo-rdzeniowy z drugiej probówki, gdyż ewentualne zanieczyszczenia dotyczą płynu w pierwszej probówce, który z powodzeniem może być wykorzystany do badań analitycznych

6. Probówka zawierająca pobrany materiał kliniczny powinna być starannie podpisana z uwzględnieniem następujących danych: imię, nazwisko i wiek chorego, oddział, rodzaj materiału, data i godzina pobrania materiału. Oprócz tego materiał kliniczny do laboratorium powinien być dostarczony wraz ze skierowaniem zawierającym następujące dane: imię, nazwisko i datę urodzenia, numer historii choroby, pieczętkę oddziału, wstępne rozpoznanie choroby i ewentualne choroby towarzyszące, powód pobrania materiału do badania mikrobiologicznego, dane na temat antybiotykoterapii, rodzaj materiału do badania, datę pobrania i przesyłania materiału do laboratorium, wskazówki lub szczególne wymagania w zakresie diagnostyki mikrobiologicznej, podpis i pieczęć lekarza prowadzącego i szczegółową informację, komu należy przekazać wynik (telefon).

TRANSPORT PŁYNU MÓZGOWO-RDZENIOWEGO DO LABORATORIUM MIKROBIOLOGICZNEGO I/LUB JEGO ZABEZPIECZANIE

Pobrany płyn mózgowo-rdzeniowy należy jak najszybciej dostarczyć do laboratorium mikrobiologicznego. Jego opracowywanie powinno się rozpocząć w ciągu pierwszej godziny od pobrania płynu mózgowo-rdzeniowego. Probówek z płynu mózgowo-rdzeniowego nie należy wystawiać na działanie promieni słonecznych, wysokiej lub niskiej temperatury. Szczepy, które najczęściej wywołują zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych są bardzo wrażliwe na zmiany warunków środowiska. Dlatego w przypadku opóźnienia opracowywania płynu mózgowo-rdzeniowego lub jego transportu do laboratorium oddalonego od szpitala materiał należy zabezpieczyć przed ochłodzeniem (zabezpieczenie w cieplarni, transport w termosie lub termotorbie, w 37°C).

Jeśli w ciągu najbliższych kilku godzin od pobrania transport płynu mózgowo-rdzeniowego do laboratorium nie jest możliwy lub w przypadku, gdy badanie mikrobiologiczne nie może być wykonane przez mikrobiologa (brak dyżurów), pracownicy laboratorium analitycznego bądź oddziału, gdzie pobrano płyn, muszą być zobowiązani do wykonania testów lateksowych, wykonania z odwirowanego jałowo płynu preparatu mikroskopowego barwionego metodą Grama, posiania płynu mózgowo-

rdzeniowego na podłoża wzrostowe (agar krwawy i czekoladowy) oraz zabezpieczenia płynu mózgowo-rdzeniowego do identyfikacji z wykorzystaniem łańcuchowej reakcji polimerazy – PCR (sposób zabezpieczania próbki na badanie PCR opisany jest w rozdziale *Zabezpieczanie materiału do reakcji PCR*, str. 37). Ponieważ możliwe jest zanieczyszczenie hodowli, która nie jest zakładana przez mikrobiologów, alternatywą dla postępowania opisanego powyżej może być posiewanie płynu mózgowo-rdzeniowego na podłoża do posiewów krwi i innych materiałów z jałowych miejsc ciała, którymi dysponuje pracownia mikrobiologiczna. Podłoża te są na tyle bogate, że zabezpieczają wzrost drobnoustrojów o wysokich wymaganiach wzrostowych. Przy takim podejściu traci się jednak możliwość sporządzenia preparatu bezpośredniego, który może być bardzo pomocny, a nawet decydujący w pierwszym etapie postępowania terapeutycznego i diagnostycznego.

Uwaga! Posianie płynu mózgowo-rdzeniowego na podłoża do posiewów krwi i innych materiałów nie zwalnia od zabezpieczania próbki płynu mózgowo-rdzeniowego do ewentualnej identyfikacji czynnika etiologicznego z wykorzystaniem PCR.

POSTĘPOWANIE Z PŁYNEM MÓZGOWO-RDZENIOWYM

W przypadku pobrania małej objętości płynu mózgowo-rdzeniowego (co często ma miejsce u małych dzieci), wystarczającej do wykonania tylko jednego badania, lekarz powinien zdecydować, które z badań – mikrobiologiczne czy analityczne jest bardziej potrzebne w leczeniu chorego. Wydaje się jednak, że ustalenie czynnika etiologicznego jest niezwykle istotne dla skutecznego i celowanego leczenia chorego oraz dla celów epidemiologicznych. Poza tym część bakteryjnych zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych nie daje wartości parametrów biochemicznych charakterystycznych dla ropnego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych.

Jeśli oprócz rutynowej hodowli wymagane są dodatkowe badania, przed wirowaniem należy połowę objętości płynu mózgowo-rdzeniowego umieścić w osobnej jałowej probówce (badanie w kierunku grzybów). Optymalnie, do każdego badania bakteriologicznego wymagany jest przynajmniej 1 ml płynu mózgowo-rdzeniowego. Do badania w kierunku grzybów większa ilość płynu mózgowo-rdzeniowego zwiększa szansę dodatknej hodowli (np. do wykrycia grzybów *Cryptococcus* za pomocą hodowli może być potrzebne 5-10 ml płynu mózgowo-rdzeniowego).

BEZPIECZEŃSTWO PRACY Z PŁYNEM MÓZGOWO-RDZENIOWYM

- Wszystkie czynności związane z hodowlą płynu mózgowo-rdzeniowego powinny być wykonywane w boksie laminarnym. Każdy boks laminarny powinien być sprawdzany co sześć miesięcy, a filtry wymieniane wg oceny sprawdzającego.
- W trakcie opracowywania płynu mózgowo-rdzeniowego powinien być zawsze zakładany fartuch i rękawiczki.

ZAGĘSZCZANIE PŁYNU MÓZGOWO-RDZENIOWEGO

Wirowanie płynu mózgowo-rdzeniowego zwiększa szansę wykrycia drobnoustrojów w preparacie i w hodowli. Płyn mózgowo-rdzeniowy należy wirować 15 minut przy 3 000 g w temperaturze pokojowej, gdyż rzadko można zaobserwować drobnoustroje w płynie mózgowo-rdzeniowym bez jego zagęszczenia.

Zamiast wirowania można 2 ml płynu mózgowo-rdzeniowego sączyć przez sterylny sączonek o średnicy porów 0,45 mm. Odwrócony sączonek kładzie się następnie na podłoże z agarem czekoladowym.

Wirówka cytospin używana przez niektóre laboratoria nawet 100-krotnie zwiększa szansę obserwacji bakterii. Jest to urządzenie służące do wirowania płynnych materiałów biologicznych. Płyn mózgowo-rdzeniowy najlepiej wirować 15 minut przy 1 000 g. Dużą zaletą cytospinu jest to, że nie tylko zwiększa prawdopodobieństwo zobaczenia bakterii w preparacie bezpośrednim, lecz również leukocyty znajdujące się w płynie mózgowo-rdzeniowym zachowują swoją morfologię.

Uwaga! Z odwirowanego płynu wykonuje się: preparat bezpośredni oraz zakłada hodowlę, natomiast supernatant służyć może do wykrywania antygenów otoczkowych, najczęściej metodą aglutynacji lateksu opłaszczono swoistymi przeciwciałami.

HODOWLA PŁYNU MÓZGOWO-RDZENIOWEGO

- Jeśli do badań mikrobiologicznych otrzymuje się przynajmniej 0,75 ml płynu mózgowo-rdzeniowego, to po jego wirowaniu przez 15 minut (3 000 g) w temperaturze pokojowej, klarowny supernatant, należy przenieść do jałowej próbówki, a osad komórek pozostawić w próbówce. Jeśli po wirowaniu osad komórek nie jest widoczny okiem nieuzbrojonym należy pozostawić kilka kropli płynu na dnie próbówki, w któ-

rej wirowano płyn mózgowo-rdzeniowy, a supernatant przenieść ostrożnie do jałowej probówki.

- Z pozostałego supernatantu i osadu należy sporządzić jednorodną zawiesinę.
- Zawiesina ta służy do posiewu na podłoża wzrostowe i do sporządzania preparatu barwionego metodą Grama (i jeśli konieczne, do preparatu barwionego inną metodą). Objętość zawiesiny powinna umożliwić umieszczenie jednej kropli na każdym podłożu i szkiełku do preparatu. W przypadku, gdy zawiesina jest z domieszką krwi lub jest lepka kroplę należy rozetrzeć na szkiełku. Przygotowanie preparatów powinno odbywać się po założeniu hodowli, aby uniknąć przypadkowych zanieczyszczeń podczas ich sporządzania.
- Należy zabezpieczyć probówkę z pozostałą zawiesiną w cieplarni, gdyby okazało się, że np. po obejrzeniu preparatu bezpośredniego należy założyć hodowlę na dodatkowych podłożach. Drugą probówkę z supernatantem należy zabezpieczyć w lodówce do badania testami lateksowymi. Obie probówki należy dokładnie opisać.
- Część płynu mózgowo-rdzeniowego (co najmniej 150 μ l) należy zabezpieczyć w celu przeprowadzenia identyfikacji z wykorzystaniem łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Jeśli w pracowni nie jest możliwe szybkie wykonanie takiego badania, to płyn mózgowo-rdzeniowy należy zamrozić, a następnie zbadać go w późniejszym czasie na miejscu lub wysłać do ośrodka, który takie badania wykonuje (patrz rozdział: *Zabezpieczanie materiału do reakcji PCR*, str. 37).
- Rutynowo, podejrzewając etiologię bakteryjną, płyn mózgowo-rdzeniowy posiewa się na **podłoże krwawe, wzbogacone czekoladowe oraz do bogatego bulionu** (np. tioglikolanowy czy z wyciągiem mózgowo-sercowym).
- Jeśli w preparacie bezpośrednim obserwuje się Gram(-) pałeczki, które mogą należeć do rodziny *Enterobacteriaceae*, pozostały płyn mózgowo-rdzeniowy można posiać na podłoże MacConkey'a. Jeśli natomiast w preparacie bezpośrednim stwierdzono obecność bakterii morfologicznie podobnych do beztlencowców lub tym bardziej, gdy wiadomo, że pacjent jest obciążony czynnikami ryzyka zakażenia bakteriami beztlencowymi, do posiania płynu mózgowo-rdzeniowego powinna być dołączona płytka z podłożem umożliwiającym wzrost beztlencowców.
- Zawiesinę posianą na podłoża wzbogacone czekoladowe i krwawe należy rozprowadzić po ich powierzchni, a płytki inkubować w 35°C w atmosferze 5% CO₂. Gdy po 24 godz. hodowla jest ujemna, inkubację należy przedłużyć o dalsze 48 godz. (WHO zaleca dalsze 72 godz.).

Niektórzy zalecają przedłużenie inkubacji o dalsze 4 dni, gdy w preparacie obserwowano bakterie, a hodowla po 72 godz. jest ujemna.

- Po 18-24 godzinach inkubacji należy sprawdzić wzrost drobnoustrojów na płytkach. W razie wzrostu powinna zostać rozpoczęta identyfikacja czynnika etiologicznego.
- Jeśli bulion tioglikolanowy był używany i zaobserwowano jakiegokolwiek zmętnienie, to należy wykonać preparat barwiony metodą Grama oraz posiać bulion na podłoże czekoladowe, niezależnie od wyniku pierwotnych hodowli. W przypadku braku wzrostu w bogatym bulionie hodowlę należy zakończyć po 5 dniach.

PRZYGOTOWANIE PREPARATU MIKROSKOPOWEGO

Po odwirowaniu płynu należy ściągnąć supernatant do jałowej probówki i pozostawić dla wykonania testu lateksowego (patrz poniżej) bądź badań biochemicznych. Nad osadem należy zostawić nieco supernatantu w celu zawieszenia osadu. Kroplę zawieszonego osadu należy nanieść na czyste odtłuszczone szkiełko podstawowe i odczekać chwilę. Czynność tę należy powtórzyć kilkakrotnie w celu zagęszczenia preparatu (preparat warstwowy) zwłaszcza, jeśli podejrzewamy obecność *Haemophilus influenzae* lub gdy płyn nie jest zbyt mętny. Po wysuszeniu preparat utrwalamy, przesuując szkiełko 3-4 razy nad płomieniem palnika. Następnie preparat taki barwimy najczęściej metodą Grama i błękitem metylenowym. Preparat należy wykonać i ocenić zaraz po wyschnięciu szkiełka. Obserwacja preparatu powinna trwać nawet do 30 minut, uwzględniając zmiany pól widzenia. Stwierdzenie obecności drobnoustrojów w preparacie powinno być natychmiast zgłoszone do lekarza prowadzącego lub dyżurnego.

BARWIENIE METODĄ GRAMA

Metoda jest bardzo prosta i szybka, co jest niezwykle ważne w tak poważnych zakażeniach, jak zakażenia ośrodkowego układu nerwowego. Wykonywana jest rutynowo we wszystkich pracowniach bakteriologicznych (dlatego opis jej pominięto). Około 75-90% dodatnich hodowli płynu mózgowo-rdzeniowego jest pozytywne w tym barwieniu. Jeśli cho-

rym przed pobraniem płynu mózgowo-rdzeniowego podawano leki przeciwbakteryjne, szansa uzyskania dodatniego wyniku z preparatu bezpośredniego maleje do 40-60%. Barwienie metodą Grama daje pozytywny wynik, jeżeli w 1 ml płynu jest $\geq 10^5$ bakterii. Szansa uzyskania dodatniego wyniku w preparacie barwionym jest również zależna od drobnoustroju i waha się od 90% (*Streptococcus pneumoniae*), poprzez 75% (*Neisseria meningitidis*) do poniżej 50% (*Listeria monocytogenes*, beztlenowce).

BARWIENIE BŁĘKITEM METYLENOWYM WG LOEFLERA

Wysuszony i utrwalony preparat pokrywa się roztworem błękitu metylenowego na 3 minuty, następnie spłukuje wodą i osusza. Preparat ogląda się pod immersją. W tym barwieniu uwidaczniany jest wzajemny stosunek elementów morfotycznych (limfocyty, leukocyty, fagocyty, bakterie).

Skład roztworu do barwienia

Nasycony roztwór błękitu metylenowego	30 ml
Woda destylowana	100 ml
1% roztwór KOH	1 ml

Przygotowanie nasyconego roztworu błękitu metylenowego: do 30 ml alkoholu etylowego należy dodawać błękit metylenowy do czasu aż przestanie się rozpuszczać, a jego nadmiar osiadzie na dnie naczynia.

BARWIENIE ORANŻEM AKRYDYNY

Oranż akrydyny to barwnik fluorochromowy, który wnika do kwasów nukleinowych drobnoustrojów. Jest to metoda bardziej czuła od metody barwienia wg Grama i wykrywa $\geq 10^4$ bakterii w 1 ml płynu. Ważną zaletą tej metody jest również fakt, że możliwe jest obserwowanie drobnoustrojów wewnątrz- i zewnątrzkomórkowo nawet po rozpoczętej antybiotykoterapii. Inną zaletą tego barwienia jest również krótki czas oglądania próbki, gdyż kontrast między bakteriami a ciemnym tłem jest bardzo duży nawet przy powiększeniu $\times 400$. Barwienie to trzeba jednak weryfikować barwieniem Grama, ale barwić można ten sam preparat. Aby móc korzystać z tej metody, pracownia mikrobiologiczna musi mieć dostęp do mikroskopu fluorescencyjnego.

Skład roztworu do barwienia

Oranż akrydyny 20 mg
Octan sodu 190 ml (100 ml 1 M $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3 \text{H}_2\text{O}$ + 90 ml 1 M HCl)

Po sporządzeniu roztworu należy doprowadzić pH do wartości 3,5 za pomocą 1 M HCl. Ostatecznie roztwór ma zawierać 100 mg/l oranżu akrydyny. Należy go przechowywać w brązowej butelce w temperaturze pokojowej.

Utrwalone preparaty należy pokryć na 2 minuty roztworem barwiącym, zmyć pod bieżącą wodą, wysuszyć i oglądać pod powiększeniem x100, x400, a ostatecznie x540 z olejkiem immersyjnym. W barwieniu tym, w niskim pH bakterie i grzyby są pomarańczowe, leukocyty i ziarnistości żółte, pomarańczowe lub czerwone, natomiast tło jest czarne. Przy pierwszych wykonywanych preparatach należy zwracać szczególną uwagę na ziarnistości ze zniszczonych leukocytów, które swoim wyglądem mogą przypominać ziarniaki. Przy sporządzeniu nowych roztworów należy je sprawdzać przy użyciu szczepów wzorcowych: *Escherichia coli* ATCC 25922 i *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

BARWIENIE WG WAYSONA

Jest to barwienie czulsze niż barwienie wg Grama. Odczynnikami w tym barwieniu są: fuksyna zasadowa, błękit metylenowy, etanol i fenol. Bakterie są ciemno-niebieskie, substancje białkowe barwią się na kolor jasno-niebieski, natomiast leukocyty są jasno-niebieskie i purpurowe. Występuje również dobry kontrast między podłożem a bakteriami. Drugim barwieniem uzupełniającym powinno być barwienie wg Grama, ale nie można dobarwiać tego samego preparatu jak w przypadku barwienia z oranżem akrydyny.

Skład roztworu do barwienia

Roztwór A

Fuksyna zasadowa	200 mg
Błękit metylenowy	750 mg
95% etanol	20 ml

Roztwór B

5% fenol	200ml
----------	-------

Przygotowane roztwory należy przefiltrować, powoli wlać roztwór A do roztworu B, a całość przechowywać w ciemnej butelce w temperaturze pokojowej. Preparat po utrwaleniu barwi się 10 sekund, zmywa wodą, osusza i ogląda pod powiększeniem x100, x400 oraz x1000 z olejkiem immersyjnym.

METODY TYPOWANIA SZCZEPÓW

Ze względu na poważne konsekwencje zdrowotne i społeczne, jakie niosą za sobą opisywane zakażenia, oprócz rozpoznania czynnika etiologicznego w konkretnym przypadku zachorowania niezwykle ważne jest prowadzenie ciągłego monitorowania tych zakażeń. Ma to na celu zapobieganie rozprzestrzenianiu się zachorowań, które w każdej chwili mogą przyjąć charakter epidemiczny. Jednym z najważniejszych elementów postępowania w czasie podejrzenia epidemii jest przeprowadzenie typowania szczepów wyizolowanych od chorych i nosicieli celem ustalenia pokrewieństwa pomiędzy izolatami pochodzącymi z ogniska zachorowań i dróg szerzenia drobnoustrojów. Wybór metod zależy od wyznaczonego celu typowania. Typowanie epidemiologiczne powinno posługiwać się metodami rozdzielczymi, których wyniki muszą być łatwe w interpretacji, wiarygodne, powtarzalne i dostępne w krótkim czasie.

Poza rutynowymi metodami diagnostycznymi, które zawsze stanowią podstawową część typowania szczepów największe zastosowanie znalazło typowanie serologiczne. Wstępną metodą typowania dostępną dla rutynowych laboratoriów mikrobiologicznych może być określanie i porównywanie wzorów oporności/wrażliwości badanych izolatów.

TYPOWANIE SEROLOGICZNE

Jedną z metod charakteryzującą drobnoustroje jest typowanie serologiczne, które w przypadku wielu gatunków bakteryjnych utraciło swoją dawną pozycję na rzecz nowszych, szybszych, bardziej powtarzalnych i w większym stopniu rozdzielczych metod genetycznych. Jest to zrozumiałe, ponieważ typowanie serologiczne w większości przypadków jest pracochłonne, czasochłonne i kosztowne, a otrzymane wyniki niekiedy trudne do interpretacji. Powtarzalność może być niska, ponieważ badane są cechy szczepów, których ekspresja zależy od wielu czynników, np. od składu podłoża, temperatury, wilgotności czy czasu hodowli związanego z fazą wzrostu drobnoustroju.

Roli typowania serologicznego nie można jednak przecenić, ponieważ m.in. od jego wyników zależy charakter podejmowanych działań profilaktycznych, a w sytuacji epidemii stanowi ono jeden z wstępnych etapów oceny pokrewieństwa szczepów.

BEZPOŚREDNIE WYKRYWANIE ANTYGENÓW OTOCzkOWYCH W PŁYNIE MÓZGOWO-RDZENIOWYM I INNYCH PŁYNACH USTROJOWYCH

TESTY LATEKSOWE

Do identyfikacji czynnika etiologicznego służą także testy lateksowe, które są bardzo wygodne w użyciu ze względu na możliwość otrzymania wyniku w bardzo krótkim czasie. Ponadto mogą one wykrywać drobno-ustroje chorobotwórcze nawet po zastosowaniu leczenia przeciwbakteryjnego, kiedy wyniki hodowli są zazwyczaj ujemne. Jest to możliwe, ponieważ wykrywają antygeny otoczkowe także z uszkodzonych i zabitych bakterii. Odczynnikami w teście lateksowym są specyficzne przeciwciała skierowane przeciw antygenom bakteryjnym, które w zetknięciu z nimi powodują widoczną aglutynację. W zestawie są również obecne kontrolne lateksy: dodatni i ujemny. Testy te mogą dawać reakcje krzyżowe i fałszywe wyniki. I tak np. zarówno próbki zawierające nieznaczące ilości antygeny, jak i te z jego dużą zawartością mogą dawać wyniki fałszywie ujemne. Wyniki fałszywie ujemne można również uzyskać w przypadku szczepów *Streptococcus pneumoniae* oraz *Haemophilus influenzae* typu b, nieposiadających antygenów otoczkowych, ponieważ test lateksowy wykrywa obecność wyżej wymienionych bakterii tylko na podstawie tych antygenów. Mogą wystąpić reakcje krzyżowe pomiędzy lateksem dla *Haemophilus influenzae* a szczepami *Escherichia coli* K100 oraz pomiędzy szczepami z grupy *Streptococcus viridans* a lateksem dla *Streptococcus pneumoniae*. Inne reakcje krzyżowe mogą być wynikiem złego przygotowania próbek lub też nieodpowiedniego wykonania testu.

Testy lateksowe są wstępnym etapem identyfikacji, który musi być party preparatem i hodowlą.

Uwaga! Bardzo ważne jest uważne zapoznanie się z ulotką dołączoną do testu przez producenta (występują różnice pomiędzy testami). Są tam umieszczone informacje, które materiały biologiczne można badać danym testem, jak należy je opracować i jakie są ograniczenia testu.

Dostępne i najczęściej stosowane testy lateksowe:

Slidex meningitide-Kit5 (*bioMerieux*)

Wellcogen Bacterial Antygen Kit (*Murex-Abbott*)

Directigen (*Becton Dickinson*)

SPECYFICZNE SUROWICE

Grupy serologiczne meningokoków można określać metodą aglutynacji szkiełkowej za pomocą zestawu specyficznych surowic (*Murex-Abbott*). Badanie to jest na ogół wykonywane jedynie przez laboratoria referencyjne.

Typy serologiczne *Haemophilus influenzae* (a-f) można oznaczać metodą aglutynacji szkiełkowej za pomocą specyficznych surowic (*Murex-Abbott*).

Serotypy *Streptococcus pneumoniae* określa się w reakcji pęcznienia otoczek (reakcja Quellunga). Ze względu na wymaganą dużą liczbę surowic (90 serotypów) typowanie to wykonuje się w niewielkiej liczbie ośrodków na świecie.

PEŁNE TYPOWANIE SEROLOGICZNE SZCZEPÓW *NEISSERIA MENINGITIDIS*

Pełne typowanie serologiczne oprócz określenia grypy serologicznej obejmuje identyfikację typu, podtypu i ewentualnie immunotypu. Jako wynik otrzymujemy fenotyp szczepu, tj. grupę:typ:podtyp serologiczny (np. fenotyp najczęściej występujący w Polsce, to B:22:P1.14). Badanie to jest wykonywane jedynie przez laboratoria referencyjne, ze względu na wysoki koszt dużej liczby potrzebnych surowic. Większość laboratoriów referencyjnych określa typy i podtypy serologiczne metodą ELISA wykorzystując antygen pełnokomórkowy (*whole cell ELISA – WCE*), chociaż stosowana jest również metoda immunoblotting.

Krajowy Ośrodek Referencyjny w Warszawie typuje serologicznie szczep *Neisseria meningitidis* metodą ELISA przy użyciu zestawu przeciwciał monoklonalnych (*National Institute for Biological Standards and Control*, Anglia).

TYPOWANIE SEROLOGICZNE Z WYKORZYSTANIEM REAKCJI PCR

Od wielu lat rozwijane są metody pozwalające na identyfikację czynnika etiologicznego również wtedy, gdy niemożliwe jest uzyskanie dodatniego wyniku hodowli drobnoustroju, np. na skutek rozpoczętej antybiotykoterapii. Do niedawna można było jedynie korzystać z pomocy gotowych zestawów testów lateksowych. Dopiero adaptacja metod biologii

molekularnej, a zwłaszcza PCR jako metody identyfikacji drobnoustrojów pozwoliła na częstsze wykrywanie głównych czynników etiologicznych zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych nawet, gdy do badań pobrano bardzo małą objętość płynu mózgowo-rdzeniowego (co nierzadko ma miejsce u dzieci) lub wtedy, kiedy płyn mózgowo-rdzeniowy pobrano po rozpoczęciu leczenia. Ta ostatnia sytuacja ma również miejsce, gdy chorzy z małych ośrodków trafiają do specjalistycznych szpitali na ogół po rozpoczęciu leczenia. Wykorzystując metodę PCR i specyficzne startery otrzymujemy jednoznaczny wynik w postaci produktu amplifikacji o odpowiedniej wielkości. Wynik taki jest powtarzalny i łatwy do interpretacji. Metoda jest prosta i bardzo czuła, ponieważ do badania wystarczy mała objętość płynu mózgowo-rdzeniowego, gdyż PCR umożliwia powielenie materiału genetycznego obecnego w płynie mózgowo-rdzeniowym.

W KOROUN stosuje się metodę PCR do potwierdzania etiologii zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych, wywoływanych przez najczęstsze czynniki etiologiczne. W przypadku szczepów otoczkowych *Haemophilus influenzae*, oprócz identyfikacji gatunku istnieje również możliwość określania typów serologicznych, a w przypadku *Neisseria meningitidis* najczęstszych grup serologicznych A, B, C, Y i W135. W przypadku pneumokoków możliwa jest identyfikacja gatunku i wybranych typów serologicznych.

BADANIE PĘCZNIENIA OTOCZEK

Jest to metoda rzadko używana, przydatna jedynie dla szczepów posiadających otoczkę, na przykład: *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, otoczkowe *Haemophilus influenzae*. Na szkiełku miesza się kroplę płynu mózgowo-rdzeniowego lub hodowli, oczko ezy surowicy odpornościowej specyficznej dla polisacharydów otoczkowych danej bakterii, błękit metylenowy, przykrywa szkiełkiem nakrywkowym i inkubuje w temperaturze pokojowej 30 minut. Kompleks antygen-przeciwciała na powierzchni bakterii powoduje zmiany jej otoczkę, co widać pod mikroskopem. Otoczkę staje się przezroczysta i spęczniała. Metoda ta wymaga dużego stężenia przeciwciał.

OZNACZANIE WRAŻLIWOŚCI NA LEKI SZCZEPÓW *NEISSERIA MENINGITIDIS*

W przypadku izolowania szczepów należących do gatunku *Neisseria meningitidis* nie powinno stosować się metody dyfuzyjnej dla oznaczania wrażliwości na antybiotyki, ponieważ brak jest określonych kryteriów interpretacji dla tej metody. Metodą z wyboru oznaczania wrażliwości szczepów izolowanych z zakażeń ośrodkowego układu nerwowego jest określanie najmniejszych stężeń hamujących (MIC) danego antybiotyku. W przypadku meningokoków stosowane są metody mikrorozcieńczeń w bulionie lub rozcieńczeń w agarze. Nie są to jednak metody rutynowe i wykonują je tylko niektóre laboratoria. Metodą alternatywną do oznaczania wartości MIC mogą być Etesty, które są bardzo wygodne w użyciu i mogą być stosowane przez każde laboratorium. Ponieważ w rekomendacjach *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) brak jest interpretacji MIC dla meningokoków, przeprowadza się ją w oparciu o kryteria opracowane dla pneumokoków. Jak na razie szczep *Neisseria meningitidis* w Polsce wykazują powszechną wrażliwość na antybiotyki i **penicylina G pozostaje w dalszym ciągu lekiem z wyboru w leczeniu zakażeń wywołanych przez *Neisseria meningitidis*.**

OZNACZANIE WRAŻLIWOŚCI NA LEKI SZCZEPÓW *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*

Badanie wrażliwości szczepów *Haemophilus influenzae* wykonuje się na podłożu HTM (*Haemophilus Test Medium*), wzbogaconym w NAD, heminę i wyciąg drożdżowy. Można stosować metodę dyfuzji antybiotyku z krążka oraz oznaczać najmniejsze stężenia hamujące antybiotyków metodą podwójnych rozcieńczeń w bulionie lub Etestami. Zalecane jest badanie wytwarzania β -laktamazy (test cefinazowy) oraz oznaczanie MIC ampicyliny, cefalosporyny III generacji i ewentualnie chloramfenikolu w stosunku do szczepów *Haemophilus influenzae* izolowanych z krwi lub płynu mózgowo-rdzeniowego od chorych z zakażeniami zagrażającymi życiu.

OZNACZANIE WRAŻLIWOŚCI NA LEKI SZCZEPÓW *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

W celu oznaczenia wrażliwości na antybiotyki szczepów należących do gatunku *Streptococcus pneumoniae* stosuje się metodę dyfuzyjną, z wyjątkiem penicyliny, cefotaksymu i ceftriaksonu, dla których trzeba określić najmniejsze stężenia hamujące (MIC) metodą mikrorozcieńczeń w bulionie lub stosując Etesty. Niezwykle przydatną w praktyce mikrobiologicznej jest metoda przeglądowa z krążkiem z 1 μg oksacyliny na podłożu Mueller-Hintona z dodatkiem 5% odwłóknionej krwi baraniej. Gdy strefa wzrostu wokół krążka wynosi ≤ 19 mm, to badany szczep jest niewrażliwy na penicylinę. Dalsze rozróżnienie jest możliwe tylko przy pomocy oznaczenia MIC. Dla szczepów średniowrażliwych MIC penicyliny jest w przedziale 0,12-1,0 mg/l, natomiast dla szczepów opornych MIC $> 1,0$ mg/l. Należy pamiętać, że zakażenia obojętne wywoływane przez szczepy średniowrażliwe na penicylinę nie można leczyć tym antybiotykiem. Należy w takich przypadkach bezwzględnie oznaczyć MIC ceftriaksonu i cefotaksymu, bowiem szczepy o obniżonej wrażliwości na penicylinę mogą być wrażliwe lub odporne na cefalosporyny III generacji. W takiej sytuacji może zaistnieć konieczność podania wankomycyny. Aktywność jej jednak może nie być wystarczająca do eradykacji drobnoustrojów z płynu mózgowo-rdzeniowego i zaleca się leczenie skojarzone z rifampicyną (obowiązuje oznaczenie MIC rifampicyny), ewentualnie, jeśli to możliwe należy stosować wysokie dawki cefotaksymu z wankomycyną. W przypadku szczepów opornych na β -laktamy, a wrażliwych *in vitro* na chloramfenikol, należy oznaczyć najmniejsze stężenia bójcze (MBC) chloramfenikolu, ponieważ szczepy te pomimo wrażliwości *in vitro* są często odporne klinicznie na ten lek.

OZNACZANIE WRAŻLIWOŚCI NA LEKI SZCZEPÓW INNYCH GATUNKÓW

Aktualne rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki zamieszczone są w czasopiśmie „Mikrobiologia Medycyna” (ISSN 1233-6203).

METODY GENOTYPOWE

Obecnie w typowaniu drobnoustrojów szeroko wykorzystuje się metody biologii molekularnej, które w porównaniu z metodami fenotypowymi charakteryzują się większą powtarzalnością i rozdzielczością. Ponadto często umożliwiają badanie także tych szczepów, które nie poddają się typowaniu metodami fenotypowymi. W badaniu pokrewieństwa szczepów najczęściej wykorzystuje się analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP – *restriction fragments length polymorphism*) genomowego DNA rozdzielanych z wykorzystaniem elektroforezy pulsacyjnej (PFGE – *pulsed-field gel electrophoresis*) oraz badanie polimorfizmu produktów łańcuchowej reakcji polimerazy z użyciem starterów o arbitralnie dobranej sekwencji DNA (DNA-RAPD – *randomly amplified polymorphic*).

ANALIZA POLIMORFIZMU DŁUGOŚCI FRAGMENTÓW RESTRYKCYJNYCH GENOMOWEGO DNA Z WYKORZYSTANIEM ELEKTROFOREZY PULSACYJNEJ (PFGE)

Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych genomowego DNA z wykorzystaniem elektroforezy pulsacyjnej (PFGE) jest jedną z najczęściej wykorzystywanych metod w typowaniu epidemiologicznym, a jej głównymi zaletami są wysoka rozdzielczość, powtarzalność, możliwość oceny faktycznego pokrewieństwa między szczepami oraz możliwość porównywania wyników pomiędzy różnymi ośrodkami. Dzięki temu jest ona szeroko wykorzystywana zarówno w badaniu epidemii ograniczonych czasem i miejscem, jak też z powodzeniem może służyć w szeroko zakrojonych badaniach nad rozprzestrzenianiem się i ewolucją szczepów.

Otrzymane wzory PFGE porównuje się i określa ich typy, na ogół zgodnie z kryteriami zaproponowanymi przez Tenovera i wsp. Szczepy uznaje się za blisko spokrewnione, jeśli między wzorami występuje różnica najwyżej trzech prążków. Zalicza się je wówczas do tego samego podtypu i oznacza takim samym symbolem literowym wraz z cyframi arabskimi. Gdy między wzorami jest różnica od czterech do sześciu prążków, to szczepy można zakwalifikować jako należące do tego samego typu (izolaty prawdopodobnie spokrewnione); oznacza się je takim samym symbolem literowym, ale różnymi cyframi arabskimi. Szczepy o wzorach różni-

cych się większą niż sześć liczbą prążków oznacza się różnymi literami (izolaty niespokrewnione).

ANALIZA POLIMORFIZMU PRODUKTÓW ŁAŃCUCHOWEJ REAKCJI POLIMERAZY Z UŻYCIEM STARTERÓW O ARBITRALNIE DOBRANEJ SEKWENCJI (RAPD)

Technika RAPD jest metodą rzadziej stosowaną ze względu na mniejszą rozdzielczość i niższą powtarzalność niż PFGE. To sprawia, że wyniki uzyskane tą metodą są bardzo trudne do porównywania pomiędzy różnymi laboratoriami. Wzory RAPD analizować można wizualnie. Do jednego typu zalicza się wzory RAPD, które posiadają jednakowy zestaw prążków różniących się co najwyżej intensywnością. Dużą zaletą techniki RAPD, zwłaszcza w porównaniu z PFGE jest szybkość uzyskania wyniku oraz łatwość wykonania eksperymentu. W przypadku dysponowania hodowlą bakteryjną wyniki RAPD można uzyskać już po kilku godzinach, a wyniki PFGE najwcześniej po 4 dniach. Dlatego metodę RAPD wykorzystuje się na ogół wtedy, gdy wynik analizy potrzebny jest szybko, a epidemia jest ograniczona w miejscu i czasie. Niemniej jednak uważa się, że technika RAPD jest tylko wstępnym etapem postępowania, a jej wyniki powinny być poparte danymi uzyskanymi z użyciem innych metod.

MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST)

Ostatnio coraz częściej wykorzystywaną metodą w ocenie pokrewieństwa wielu szczepów bakteryjnych, zarówno w badaniach populacyjnych, jak i w dochodzeniu epidemiologicznym, jest technika *multilocus sequence typing* (MLST). Polega ona na sekwencjonowaniu określonych fragmentów kilku (np. siedmiu w przypadku *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* i *Streptococcus pneumoniae*) wybranych genów odznaczających się pewnym stopniem polimorfizmu. Pomimo zalet, jakimi są wysoka czułość i powtarzalność, stosowanie metody MLST jest poważnie ograniczone, gdyż wymaga wykwalifikowanego personelu i bardzo kosztownego sprzętu, na który mogą sobie pozwolić jedynie specjalistyczne laboratoria. Jednak metoda ta, jak żadna z dotychczas stosowanych, stwarza wraz z wyspecjalizowaną bazą danych (dostępna w Internecie), zupełnie wyjątkową możliwość określania profilu allelicznego, pozwalającego na identyfikację i porównywanie izolatów występujących na całym świecie.

POBIERANIE KRWI DO BADAŃ MIKROBIOLOGICZNYCH

Krew należy pobrać w momencie narastania temperatury (około 30 minut przed osiągnięciem szczytu). W sytuacji ostrego przebiegu zakażenia z utrzymaniem się wysokiej gorączki i koniecznością natychmiastowego wdrożenia leczenia przeciwbakteryjnego, zalecane jest pobranie krwi z dwóch różnych nakłuć bezpośrednio po sobie. W przypadku występowania gorączki o znanej przyczynie zaleca się wykonanie dwóch posiewów krwi w odstępach około godzinnych, a w razie potrzeby badanie należy powtórzyć po 24 i 48 godzinach. Jeśli zachodzi konieczność wykonania badania bakteriologicznego krwi w trakcie prowadzonej u chorego antybiotykoterapii, krew na posiew należy pobrać przed podaniem kolejnej dawki leku, gdy jego stężenie w surowicy pacjenta jest najniższe.

Na ogół do potwierdzenia czynnika etiologicznego zakażenia krwi konieczne jest wyhodowanie patogenów z dwu niezależnych pobrań, jednak w przypadku części drobnoustrojów, które nie występują na skórze czy też w śródowisku, jednokrotne wyhodowanie szczepu wraz z objawami klinicznymi ma wartość diagnostyczną. Dotyczy to w szczególności trzech najczęstszych czynników etiologicznych zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych tj.: *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* i *Streptococcus pneumoniae*.

- Krew powinna być pobierana przy łóżku chorego, w uzasadnionych przypadkach w gabinecie zabiegowym. Pielęgniarka przed pobraniem krwi powinna dokładnie umyć i zdezynfekować ręce środkiem przeznaczonym do tego celu.
- Przed pobraniem krwi konieczne jest odpowiednie przygotowanie miejsca wkłucia. Należy je zdezynfekować 2% roztworem jodowego środka dezynfekcyjnego, a następnie 70% alkoholem etylowym, wykonując ruchy odśrodkowe. Należy odczekać 1-2 minuty do odparowania alkoholu. Nie wolno ponownie dotykać miejsca wkłucia.
- Krew należy pobrać ze świeżego wkłucia do żyły. Nie wolno pobierać krwi do posiewu z cewnika założonego na stałe.
- Przed pobraniem krwi podłoże należy ogrzać do temperatury 35-37°C poprzez umieszczenie butelek z podłożem w ciepłarni lub zanurzając je w naczyniu z odpowiednio ciepłą wodą. Ma to istotne znaczenie dla

przetrwania drobnoustrojów wrażliwych na wahania temperatury (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*).

- Korek butelki, do której będzie wprowadzana krew należy przygotować w sposób identyczny, jak skórę pacjenta.
- Krew należy pobrać w ilości odpowiedniej do rodzaju podłoża stosowanych do badania, zgodnie z zaleceniami producenta. Jeśli producent nie zaleca inaczej, należy zachować stosunek 1:10 lub 1:20 ilości materiału do ilości podłoża. Gdy pobierana jest krew od dziecka, należy stosować podłoża pediatryczne, gdzie wymagana ilość materiału jest mniejsza. Do posiewów krwi wykorzystuje się zestawy dwóch butelek, z podłożami do hodowli bakterii tlenowych i beztlenowych; są one dostępne w wersji pediatrycznej i dla dorosłych. Wiele laboratoriów korzysta również z automatycznych systemów do szybkiego wykrywania drobnoustrojów we krwi i innych płynach ustrojowych.
- Do pobrania krwi zaleca się stosowanie igieł dwustronnych, umożliwiających pobranie krwi bezpośrednio do butelki z podłożem. Można też krew pobrać igłą i strzykawką, należy jednak pamiętać o zmianie igły przed wprowadzeniem krwi do butelki.
- W przypadku nieudanego wkłucia w żyłę należy zmienić igłę.
- Po wyjęciu igły z butelki, powierzchnię korka należy przykryć jałowym gazikiem i okleić plastrem, jeśli nie istnieje firmowe zabezpieczenie.
- Podłoże z dodaną krwią dokładnie wymieszać, aby nie wytworzyły się skrzepy.
- Transport materiału do laboratorium mikrobiologicznego powinien przebiegać jak najszybciej i nie wolno dopuścić w czasie jego trwania do schłodzenia próbki. W przypadku braku możliwości dostarczenia pobranej krwi do laboratorium, należy przechować krew w temperaturze ciepłarki (35-37°C).
- Bezpośrednio po dostarczeniu pobranego materiału do laboratorium mikrobiologicznego butelki z podłożem należy bezzwłocznie wstawić do ciepłarki (temp. 35-37°C).
- Podłoża należy przeglądać codziennie (lub częściej), bez wstrząsania i mieszania, w celu wizualnego stwierdzenia wzrostu drobnoustrojów w podłożu poprzez zaobserwowanie zmętnienia, hemolizy podłoża płynnego lub pojawienia się kolonii bakteryjnych w podłożach z fazą stałą.

Uwaga! Podłoże do posiewów krwi, które zawiera w swym składzie polianetosulfonian nie nadaje się do hodowli szczepów *Neisseria meningitidis*.

POBIERANIE WYMAZÓW Z JAMY NOSOWO-GARDŁOWEJ OD CHORYCH I NOSICIELI

- Pacjent z głową lekko przechyloną do tyłu powinien głęboko oddychać. Należy poprosić go o szerokie otwarcie ust.
- Delikatnie przytrzymać szpatułką język w celu uwidocznienia miejsca pobrania materiału. Konieczne jest jasne światło skierowane w stronę jamy ustnej pacjenta.
- W przypadku pobierania materiału z jamy nosowo-gardłowej należy przygotować mały wacik na odpowiednim, łatwo dającym się modelować drucie lub dostępne wymazówki na giętym drucie. Trzeba je lekko zgiąć i wprowadzić delikatnie za języczkiem podniebiennym ku górze lub przez otwór nosowy ku tyłowi, aż dotknie tylnej ściany jamy nosowo-gardłowej. Wykonuje się wtedy ruchy wacika ku dołowi i ku górze w celu potarcia ściany gardła.
- Pobrany materiał należy jak najszybciej przekazać do laboratorium mikrobiologicznego.
- W przypadku braku możliwości natychmiastowego opracowania pobranego materiału klinicznego w laboratorium, należy pobrać wymaz za pomocą specjalnych, fabrycznych zestawów zawierających wacik z odpowiedniego, absorbującego materiału i podłoże transportowe.

W badaniach na nosicielstwo konieczne jest korzystanie z podłoży wybiórczych, umożliwiających wyhodowanie poszukiwanego drobnoustroju i hamujących wzrost innych bakterii. Podłoża wybiórcze do hodowli szczepów *Neisseria meningitidis* można przygotować w laboratorium na bazie agaru krwawego lub czekoladowego, do którego dodaje się zestaw antybiotyków:

Zestaw antybiotyków do podłoża wybiórczego dla *Neisseria meningitidis*

Wankomycyna	3,0 µg/ml
Kolistyna	7,5 µg/ml
Nystatyna	13,5 µg/ml

Gotowe zestawy antybiotyków do wybiórczej hodowli *Neisseria spp.* są produkowane przez wiele firm zajmujących się diagnostyką mikrobiologiczną (np. *Becton Dickinson*, *bioMerieux*, *Merck*, *Oxoid*)

W przypadku badań na nosicielstwo szczepów *Haemophilus influenzae* (poszukujemy wyłącznie serotypu b) pobrany materiał należy posiewać na wybiórcze podłoże dla *Haemophilus spp.*, tj. podłoże czekoladowe z bacytracyną lub korzystać z podłoża czekoladowego i krążków z bacytracyną, poszukując szczepów rosnących wokół krążka. Po wyhodowaniu szczepu należy wykonać serotypowanie.

POBIERANIE MATERIAŁU Z WYBRO CZYN NA SKÓRZE

W przypadku zakażenia wywołanego przez *Neisseria meningitidis*, bakterie mogą być izolowane z wybrczyn na skórze, które są częstym objawem choroby. Stosuje się zarówno technikę prostego rozerwania zmian skórnych i pobrania wymazów, jak i biopsję. Dodatni wynik preparatu barwionego metodą Grama w przypadku materiału pobranego z wybrczyn można otrzymać do 48 godz. od rozpoczęcia antybiotykoterapii.

IZOLACJA DROBNOUSTROJU TEGO SAMEGO GATUNKU Z RÓŻNYCH MATERIAŁÓW OD TEGO SAMEGO PACJENTA

Jeśli z krwi, wybrczyn czy jamy nosowo-gardłowej pacjenta wyizolowano ten sam drobnoustrój, co z płynu mózgowo-rdzeniowego, badanie wrażliwości na leki i dalsze typowanie (np. serologiczne) należy wykonać jedynie dla patogenu wyhodowanego z jednego materiału. Szczepy wyhodowane z wszystkich materiałów **powinny być przesłane do KOROUN** celem wykonania dalszego typowania, w tym molekularnego.

RAPORTOWANIE WYNIKÓW

Wszystkie wyniki uzyskiwane na poszczególnych etapach identyfikacji i oznaczania wrażliwości na leki powinny być **na bieżąco** przekazywane lekarzowi prowadzącemu. Wyniki wszystkich badań należy zapisywać w książce laboratoryjnej.

ZABEZPIECZENIE MATERIAŁU DO REAKCJI PCR

W diagnostyce mikrobiologicznej do identyfikacji drobnoustrojów coraz częściej wykorzystuje się łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) i specyficzne startery. Technika ta umożliwi wykrywanie specyficznych sekwencji DNA danego drobnoustroju i umożliwi identyfikację gatunku, grupy serologicznej bądź wrażliwości na leki, nawet wtedy, gdy dysponujemy bardzo małą próbką materiału, a także materiałem biologicznym zawierającym bardzo małą liczbę lub nieżywe drobnoustroje.

Pobrany materiał (płyn mózgowo-rdzeniowy, surowicę, krew) należy niezwłocznie zamrozić w możliwie najniższej temperaturze i tak przygotowany przesłać w pojemniku z suchym lodem do laboratorium wykonującego badanie PCR.

Krew. Do badań PCR krew stabilizowaną EDTA należy jak najszybciej zamrozić i przesłać w takim stanie do ośrodka, który wykonuje badania. Optymalna ilość krwi, którą należy pobrać do badań metodą PCR to 2 ml.

Surowica. W przypadkach potwierdzonej choroby inwazyjnej czułość reakcji PCR na bazie surowicy jest nieco mniejsza niż dla krwi. Surowicę należy przesłać do laboratorium referencyjnego w stanie zamrożenia, a minimalna ilość materiału do badań PCR to 1 ml.

Płyn mózgowo-rdzeniowy. Do badania PCR wystarczy nawet 150 μ l płynu, który można przesłać zamrożony w pojemniku z suchym lodem.

Płyn mózgowo-rdzeniowy, po uprzednim przygotowaniu, można przesyłać również w temperaturze pokojowej. W tym celu należy go gotować 10 minut, wirować 5 minut, a supernatant przenieść do probówki i przesłać w temperaturze pokojowej do dalszych badań.

TRANSPORT SZCZEPÓW DO LABORATORIUM REFERENCYJNEGO (KOROUN)

Szczepy trzech najczęstszych czynników etiologicznych (*Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*) najlepiej transportować na wymazówkach z podłożami transportowymi przeznaczonymi dla drobnoustrojów wrażliwych o wysokich wymaganiach wzrostowych. Dodatkowo, w celu zwiększenia szansy przeżycia szczepu, należy je przesłać na odpowiednio grubych i niezbyt wysuszonych plastikowych płytkach lub skosach ze wzbogaconym podłożem czekoladowym w przypadku *Haemophilus influenzae* i z podłożem krwawym w przypadku szczepów *Neisseria meningitidis* i *Streptococcus pneumoniae*. Płytki i wymazówki należy zabezpieczyć przed uszkodzeniem w czasie transportu.

Inne szczepy odpowiedzialne za zakażenia oún, takie jak np. *Listeria spp.*, gronkowce, pałeczki Gram(-) czy inne paciorkowce, najlepiej transportować na wymazówkach z podłożami transportowymi lub samodzielnie przygotowanych skosach agarowych lub płytkach.

Uwaga! Szczepy wysłane do KOROUN powinny być przesiewane do czasu telefonicznego potwierdzenia otrzymania żywego szczepu przez laboratorium referencyjne. Wówczas, w przypadku nieudanego ożywienia szczepu w KOROUN, istnieje możliwość powtórnego przesłania. W przypadku zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych lub posocznicy wszystkie szczepy wyhodowane z różnych materiałów od pacjenta (z płynu mózgowo-rdzeniowego, krwi, jamy nosowo-gardłowej, wybroczyn) należy wysłać do KOROUN. W sytuacji wyhodowania szczepu z krwi, należy podać rozpoznanie: zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych czy bakteriemia/posocznica. Każdy szczep wysyłany do KOROUN powinien tam trafić wraz z wypełnioną ankietą, zamieszczoną na końcu tego opracowania.

PRZECHOWYWANIE SZCZEPÓW

Szczepy *Neisseria meningitidis* i *Haemophilus influenzae* można przechowywać przez długi okres czasu np. w bulionie czekoladowym z dodatkiem 10% glicerolu w temperaturze -70°C . Bulion czekoladowy przygotowuje się na bazie bulionu TSB (bulion tryptozowo-sojowy), do którego dodaje się 10% krwi baraniej, a całość podgrzewa się do pierwszego wrzenia nad płomieniem palnika. Szczepem (jedną dobrze wyizolowaną kolonią) zaszczepia się ostudzony bulion, miesza i inkubuje 24 godz. w 37°C w atmosferze z podwyższonym stężeniem CO_2 . Po inkubacji dodaje się 10% glicerolu, miesza, rozlewa jałowo do małych jałowych probówek i zamraża.

Szczepy *Neisseria meningitidis* i *Haemophilus influenzae* w bulionie opisanym powyżej można również przechowywać w zamrażarkach (zamrażalnikach) ale znacznie krócej (nie powinno być problemu zżywieniem szczepu w ciągu 1-3 tygodni, zależnie od szczepu) ze względu na ich wyższą temperaturę, -30 (-18) $^{\circ}\text{C}$.

Jeśli laboratorium nie dysponuje świeżą krwią baranią, to szczepy można zamrażać w samym bulionie TSB z dodatkiem 10% glicerolu. W tym wypadku jednak czystą hodowlę zbieramy z płytki krwawej lub czekoladowej po całonocnej inkubacji (najlepiej za pomocą jałowej wymazówki) i w bulionie TSB z glicerolem przygotowujemy bardzo gęstą zawiesinę bakteryjną, którą rozlewa się jałowo do małych probówek i zamraża (**bez inkubacji**).

Szczepy *Streptococcus pneumoniae* można przechowywać w bulionie TSB z surowicą końską i glicerolem (w stosunku 5:4:1). W 1 ml takiego podłoża umieszcza się eżę hodowli pneumokokowej, inkubuje kilka godzin w temperaturze 37°C i zamraża.

Można też korzystać z gotowych systemów do przechowywania zamrożonych szczepów, np.: Microbank firmy *Pro-Lab Diagnostics* lub Cryobank firmy *MAST Diagnostics*. Systemy takie składają się z małych zakręcanych probówek, w których umieszczony jest bulion z koralikami, do których chętnie przylegają bakterie. Z czystej i świeżej hodowli bakteryjnej przygotowuje się gęstą zawiesinę o gęstości około 3-4 jednostek McFarlanda, miesza przez kilkakrotne odwrócenie (nie wolno korzystać z wortexu), a następnie odrzuca się bulion, w którym są zanurzone koraliki. Probówki z koralikami zamraża się w -70°C . W celużywienia szczepu wystarczy wyjąć jeden koralik i znajdujące się na nim bakterie

rozprowadzić na podłożu krwawym lub czekoladowym, ewentualnie wrzucić koralik do bulionu czekoladowego lub innego bogatego bulionu.

BADANIE MIKROBIOLOGICZNE *POST MORTEM*

Celem przeprowadzenia badania mikrobiologicznego materiału pochodzącego z autopsji jest między innymi potwierdzenie czynnika etiologicznego zakażenia, na które wskazywały objawy kliniczne, ocena prawidłowości postępowania terapeutycznego bądź wykrycie jako przyczyny śmierci zakażenia, na które nie wskazywały objawy kliniczne.

Badanie mikrobiologiczne stanowi jedynie część postępowania diagnostycznego, a jego wyniki mogą być jedynie rozpatrywane i analizowane wraz z objawami klinicznymi choroby, badaniami dodatkowymi oraz badaniami anatomopatologicznymi.

W krótkim czasie po zgonie pacjenta może dojść i zazwyczaj dochodzi do namnożenia i przemieszczania się flory endogennej, która nie była przyczyną zakażenia/zgonu. Składa się na to kilka czynników, takich jak zatrzymanie procesów obronnych organizmu, zakażenie w trakcie autopsji lub w okresie poprzedzającym autopsję. W związku z tym wynik dodatni badania mikrobiologicznego nie zawsze koreluje z przyczyną zgonu pacjenta, a ocena tego wyniku musi być interpretowana przez lekarza patologa ze szczególną ostrożnością i uwagą. Korelacja czynników etiologicznych zakażenia jest największa wówczas, gdy próbki są pobierane szybko po zgonie (koniecznie w ciągu 5 godz.) lub w sytuacji, gdy badane są materiały pochodzące z co najmniej dwóch (lepiej więcej) różnych tkanek/narządów.

HODOWLA DROBNOUSTROJÓW POST MORTEM

Próbki materiału należy dostarczyć do laboratorium natychmiast po pobraniu. Próbkę krwi do badania mikrobiologicznego należy pobrać z komór serca. Jeśli to możliwe należy pobrać 10 ml krwi i rozdzielić równo pomiędzy podłoże do hodowli bakterii tlenowych i beztlenowych. Gdy planuje się badanie próbki metodą PCR należy zabezpieczyć materiał do tego badania (patrz niżej). Pobranie próbki krwi powinno się odbywać bez żadnego ucisku na żyłę główną lub na organy jamy brzusznej, co mogłoby spowodować zanieczyszczenie florą jelitową.

Próbki tkanek (są lepszym materiałem niż wymazy) o wymiarach 2 x 2 x 0,5 cm należy umieścić w jałowym zakręcanym pojemniku. Próbki te mogą być użyte do badań bakteriologicznych (w tym, w kierunku *M. tuberculosis*) i mikologicznych.

Jeżeli wysuwane jest podejrzenie bakteriemii/posocznicy, należy pobrać jednocześnie próbki krwi i śledziony, gdyż porównanie wyników hodowli obu próbek może być pomocne przy ustaleniu czynnika etiologicznego zakażenia. Jeśli nie ma możliwości uzyskania próbki krwi, należy przesłać fragment śledziony. Oprócz tego zaleca się pobieranie wycinków również z innych miejsc, takich jak płuca, wątroba i nerki.

W przypadku ropni, zawartość ropnia należy pobrać strzykawką i po jej zabezpieczeniu natychmiast przesłać do laboratorium. Dodatkowo należy pobrać fragment tkanki ze ściany ropnia.

Gdy zachodzi konieczność transportu do oddalonego laboratorium, należy zabezpieczyć właściwe warunki umożliwiające przeżycie bakteriom tlenowym, beztlenowym, grzybom i wirusom (w zależności od podejrzanego czynnika etiologicznego).

Diagnostyka mikrobiologiczna próbek pozyskanych podczas autopsji powinna być zapewniona przez wieloprofilowe laboratorium diagnostyczne.

BADANIE *POST MORTEM* WYKORZYSTUJĄCE REAKCJĘ PCR

Najlepszym materiałem do badań jest krew i płyn mózgowo-rdzeniowy. Jeśli nie ma możliwości uzyskania próbki krwi, należy przesłać wyćinki śledziony, płuc, wątroby czy nerki. W celu otrzymania wiarygodnego wyniku najlepiej przeprowadzać badanie, na co najmniej dwóch pobranych materiałach.

Pobrane próbki materiału (krew, płyn mózgowo-rdzeniowy, fragmenty tkanek) należy niezwłocznie zamrozić w możliwie najniższej temperaturze i w takim stanie przesłać do KOROUN.

Uwaga! Wszystkie czynności związane z opracowywaniem próbek z autopsji powinny być wykonywane w boksie laminarnym. Konieczny jest ubiór ochronny (fartuch i rękawiczki).

KONTROLA JAKOŚCI

Podłoża i odczynniki powinny być poddawane właściwej kontroli jakości.

ODCZYNNIKI, PODŁOŻA I WYPOSAŻENIE LABORATORIUM PROWADZĄCEGO DIAGNOSTYKĘ BAKTERYJNYCH ZAKAŻEŃ INWAZYJNYCH

- Płytki z agarem Columbia z 5% odwołknionej krwi baraniej
- Płytki z agarem czekoladowym
- Bulion bogaty w czynniki wzrostowe, na przykład bulion tioglikolany, bulion z wyciągiem mózgowo-sercowym (BHI)
- Płytki z podłożem dla bakterii beztlenowych
- Płytki z podłożem dla grzybów
- Sterylne pipety pasteurowskie
- Wirówka (3000 g)
- Szkiełka do wykonywania preparatów

- Odczynniki konieczne do wykonania preparatów
- Testy i odczynniki do identyfikacji drobnoustrojów
- Testy lateksowe
- Pojemnik ze środkiem odkażającym na odpady
- Ciepłarka o temp. 37°C
- Ciepłarka o temp. 37°C wytwarzająca CO₂ lub ekcykator

IMMUNOPROFILAKTYKA ZAKAŻEŃ WYWOŁYWANYCH PRZEZ *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* TYPU B

Najlepszą metodą zapobiegania jest immunoprofilaktyka czynna (szczepienia). Szczepionki przeciwko zakażeniom *Haemophilus influenzae* typu b (Hib) są od wielu lat stosowane na świecie z doskonałymi wynikami. W tych krajach, w których wprowadzono szczepienia na masową skalę (np. Finlandia, Wielka Brytania, Niemcy, Szwajcaria, Austria, Irlandia, Stany Zjednoczone Ameryki Północnej) zaobserwowano gwałtowny spadek wszystkich zakażeń inwazyjnych (*meningitis*, *pneumonia*, *epiglottitis*) wywołanych przez Hib. Szczepionki zawierają wielocukier otoczkowy typu b skoniugowany z toksoidem błoniczym lub tężcowym, bądź z białkami osłony zewnętrznej *Neisseria meningitidis* grupy B. Taki skład szczepionki umożliwia powstanie swoistej odpowiedzi immunologicznej u niemowląt już od drugiego miesiąca życia. W Polsce zarejestrowane są różne szczepionki o podobnej skuteczności. W polskim kalendarzu szczepień (PSO-2004) szczepionka przeciw Hib należy do grupy zalecanych (na koszt pacjenta). W tym roku stała się szczepionką obowiązkową dla dzieci z domów małego dziecka.

Szczepionki przeciw *Haemophilus influenzae* typu b.

Producent	Nazwa	Uwagi
<i>Aventis Pasteur</i>	Act-HIB	Koniugat z toksoidem tężcowym
<i>Merck Sharp & Dohme</i>	PedvaxHIB	Koniugat z antygenem otoczkowym <i>Neisseria meningitidis</i>
<i>GlaxoSmithKline</i>	Hiberix	Koniugat z toksoidem tężcowym
<i>Wyeth</i>	HibTITER	Koniugat z toksoidem błoniczym CRM197

IMMUNOPROFILAKTYKA ZAKAŻEŃ WYWOŁYWANYCH PRZEZ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

Jeszcze do niedawna nie było skutecznej szczepionki przeciwko *Streptococcus pneumoniae* dla niemowląt i małych dzieci. Dostępne na rynku 23-walentne szczepionki, reprezentujące najczęściej występujące serotypy, nie wykazują wystarczającej immunogenności u dzieci poniżej 2 r.ż. i są obecnie zalecane wszystkim powyżej 65 r.ż. Ponadto, zaleca się ich podawanie osobom powyżej 5 r.ż. z czynnościową i anatomiczną asplenią, przewlekłą chorobą sercowo-naczyniową, przewlekłą chorobą płuc, przewlekłą chorobą nerek lub zespołem nerczycowym, cukrzycą, alkoholizmem, anemią sierpowato-krwinkową, w stanach immunosupresji.

Ostatnio zarejestrowano koniugowaną szczepionkę (Prevenar), przeciw 7 serotypom pneumokokowym, które były odpowiedzialne za 80% wszystkich zakażeń inwazyjnych w Stanach Zjednoczonych u dzieci do 5 r.ż. Szczepionka ta jest skuteczna poniżej drugiego roku życia i została już w niektórych krajach wprowadzona do kalendarza szczepień.

Szczepionki przeciw *Streptococcus pneumoniae*.

Producent	Nazwa	Uwagi
Aventis Pasteur	Pneumo 23 (23-walentna)	Nieskoniugowana
Merck Sharp & Dohme	Pneumovax 23 (23-walentna)	Nieskoniugowana
Wyeth	Prevenar (7-walentna)	Koniugat z toksoidem błoniczym CRM197

IMMUNOPROFILAKTYKA ZAKAŻEŃ WYWOŁYWANYCH PRZEZ *NEISSERIA MENINGITIDIS*

Szczepionki pierwszej generacji przeciw zakażeniom *Neisseria meningitidis* zawierają oczyszczony wielocukier otoczkowy. Główną ich wadą jest słaba immunogenność u małych dzieci, z wyjątkiem szczepionki przeciw meningokokom grupy A. Dostępne szczepionki przeciw *Neisseria me-*

ningitidis to szczepionka dwuwalentna przeciw grupom A i C oraz czterowalentna: A+C+W135+Y.

W 1999 roku w Anglii wprowadzono po raz pierwszy masowe szczepienia monowalentną szczepionką koniugowaną przeciw *Neisseria meningitidis* grupy C, skuteczną także w zapobieganiu zakażeniom u dzieci poniżej 2 r.ż. Obecnie mamy już trzech producentów takiej szczepionki.

Nie ma dotychczas skutecznej szczepionki przeciw meningokokom grupy B, które wywołują najwięcej zachorowań w Europie.

Szczepionki przeciw *Neisseria meningitidis*.

Producent	Nazwa	Uwagi
Aventis Pasteur	Mengivac (A+C) (polisacharydowa szczepionka A+C)	Nieskoniugowana
Aventis Pasteur	Menomune (polisacharydowa szczepionka A+C+Y+W-135)	Nieskoniugowana
GlaxoSmithKline	Mencevax (polisacharydowa szczepionka A+C+Y+W-135)	Nieskoniugowana
Wyeth-Lederle	Meningitec (monowalentna C)	Koniugat z toksoidem błoniczym CRM197
Baxter	NeisVac-C (monowalentna C)	Koniugat z toksoidem tężcowym
Chiron	Menjugate (monowalentna C)	Koniugat z toksoidem błoniczym CRM197

W sytuacji wystąpienia zakażenia meningokokowego podawanie szczepionki jest zalecane:

- Osobom mającym bezpośredni kontakt z chorym, u którego potwierdzono zakażenie wywołane przez szczep *Neisseria meningitidis* serogrupy C; należy podać szczepionkę koniugowaną pomimo wcześniejszej chemioprofilaktyki.
- Osobom w wieku powyżej 2 miesięcy, mającym bezpośredni kontakt z chorym, u którego potwierdzono zakażenie wywołane przez szczep *Neisseria meningitidis* serogrupy A; należy podać szczepionkę polisacharydową A + C.
- Osobom w wieku powyżej 2 lat, mającym bezpośredni kontakt z chorym, u którego potwierdzono zakażenie wywołane przez szczep *Neisseria meningitidis* serogrupy W135 lub Y; należy podać czterowalentną szczepionkę polisacharydową A, C, W135, Y.

CHEMIOPROFILAKTYKA ZAKAŻEŃ OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO

Ze względu na konsekwencje dla zdrowia i życia, jakie niesie zakażenie ośrodkowego układu nerwowego zaleca się w przypadku stwierdzenia inwazyjnych zakażeń wywołanych przez *Neisseria meningitidis* przeprowadzanie badań na nosicielstwo u osób z bezpośredniego (najbliższego) kontaktu i rozpoczęcie chemioprophylaktyki. W przypadku zakażeń ośrodkowego układu nerwowego, wywołanych przez *Haemophilus influenzae* typu b, a zwłaszcza przez *Streptococcus pneumoniae*, podjęcie chemioprophylaktyki dotyczy tylko wyjątkowych sytuacji, opisanych poniżej.

CHEMIOPROFILAKTYKA ZAKAŻEŃ WYWOŁYWANYCH PRZEZ *NEISSERIA MENINGITIDIS*

Zakażenia meningokokowe są groźne nie tylko dla samego chorego, ale stanowią potencjalne zagrożenie epidemiczne dla populacji. Dlatego też w każdym przypadku zakażenia meningokokowego (dotyczy również zakażenia spojówek) należy pobrać wymazy od osób z bezpośredniego kontaktu i bezwzględnie rozpocząć chemioprophylaktykę. Pobranie wymazów od tych osób i podanie chemioprophylaktyki powinny być wykonane najszybciej jak to tylko możliwe, najlepiej w ciągu 24 godzin od wystąpienia przypadku. **W żadnym wypadku chemioprophylaktyka nie powinna być opóźniona z powodu oczekiwania na wynik wymazu.** Pomimo braku wpływu wyników tych wymazów na rozpoczęcie chemioprophylaktyki u osób z bezpośredniego kontaktu, ich wartość jest nie do przecenienia w badaniach epidemiologicznych umożliwiających właściwą ocenę sytuacji i podjęcie odpowiednich działań przeciwepidemicznych. W przypadku opóźnienia zgłoszenia przypadku zakażenia meningokokowego podanie chemioprophylaktyki wydaje się uzasadnione do 4 tygodni od wystąpienia zachorowania. Sposób pobierania wymazów z jamy nosowo-gardłowej opisany jest w rozdziale „Pobieranie wymazów z jamy nosowo-gardłowej od chorych i nosicieli”.

W przypadku zakażeń meningokokowych chemioprophylaktyka może być również konieczna po zakończeniu leczenia. Dlatego też u wszystkich pacjentów po przebytych zapaleniu opon mózgowo-rdzeniowych lub posocznicy (z wyjątkiem leczenia ceftriaksonem) należy pobrać wymaz z jamy nosowo-gardłowej, w celu wykluczenia utrzymywania się nosiciel-

stwa *Neisseria meningitidis*. Szczególną uwagę należy zwracać na chorych leczonych dużymi dawkami penicyliny i chloramfenikolu, gdyż leki te mogą być skuteczne tylko wobec drobnoustrojów obecnych w płynie mózgowo-rdzeniowym, natomiast nie likwidują nosicielstwa w jamie nosowo-gardłowej.

W przypadku zakażenia meningokokowego **chemioprophylaktyka jest zalecana** następującym osobom, które w ciągu 7 dni poprzedzających zachorowanie miały kontakt z chorym:

- domownikom zamieszkującym/śpiącym razem z chorym
- osobom będącym w kontakcie intymnym z chorym (głębokie pocałunki)
- uczniom/studentom/osobom śpiącym w tej samej sali sypialnej
- studentom dzielącym kuchnię z chorym w jednym akademiku
- skoszarowanym żołnierzom i funkcjonariuszom
- osobom mającym krótki kontakt z chorym, jeśli miały one bezpośredni kontakt z wydzielinami chorego z dróg oddechowych tuż przed i w czasie przyjmowania chorego do szpitala
- osobom przeprowadzającym resuscytację usta-usta, odsysanie i intubację.

Wszystkim osobom, które kontaktowały się z chorym oraz osobom, które przyjęły chemioprophylaktykę (nie daje ona stuprocentowej ochrony), należy udzielić informacji o możliwości wystąpienia zachorowania i konieczności zgłaszania się do lekarza w sytuacji wystąpienia charakterystycznych dla zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i posocznicy objawów klinicznych.

Niekiedy rozpoznanie, które osoby powinny, a które nie, zostać objęte chemioprophylaktyką jest niejednoznaczne i dodatkowo może być utrudnione przez obawy bądź panikę osób, które miały styczność z chorym, dlatego też ostateczna decyzja powinna być podjęta przez lekarza nadzorującego postępowanie po rozpoznaniu zakażenia meningokokowego.

Najczęściej używanymi lekami przeciwbakteryjnymi w chemioprophylaktyce zakażeń meningokokowych są rifampicyna, ciprofloksacylna i ceftriakson, ale istnieją również doniesienia na temat skutecznego stosowania w chemioprophylaktyce spiramycyny, ofloksacyny i minocykliny.

Proponuje się następujące leki przeciwbakteryjne i schematy chemioprophylaktyki w przypadku zakażenia *Neisseria meningitidis* dla osób z najbliższego kontaktu z chorym:

Rifampicyna

Rifampicyna może być stosowana u osób z wszystkich grup wiekowych. Przeciwwskazaniem do jej stosowania jest żółtaczka i nadwrażliwość na lek. Należy zwrócić szczególną uwagę na możliwość interakcji z lekami przeciwwzakrzepowymi, przeciwwymiotnymi i antykoncepcyjnymi. Osoby, które mają przyjmować rifampicynę należy również poinformować o działaniach niepożądanych obejmujących zabarwienie moczu i szkieł kontaktowych.

Rifampicyna

Dawkowanie: doustnie przez 2 dni, co 12 godzin

Dorośli	600 mg
Dzieci > 1 miesiąca	10 mg/kg (maksymalnie 600 mg)
Dzieci < 1 miesiąca	5 mg/kg

Ciprofloksacyna

Ciprofloksacyna może być stosowana u dorosłych (powyżej 18 roku życia). Jej zastosowanie jest bardzo dogodne w przypadku, gdy wiele osób musi być objętych chemioprophylaktyką, ponieważ wystarczająca jest tylko jedna dawka leku. Poza tym jest bardziej dostępna niż rifampicyna, której używanie jest niekiedy ograniczane do leczenia gruźlicy i zakażeń wieloopornymi szczepami. Ciprofloksacyna nie jest zalecana u osób poniżej 18 roku życia i u kobiet ciężarnych i karmiących.

Ciprofloksacyna

1 dawka doustnie

Dorośli (> 18 roku życia)	500 mg
---------------------------	--------

Ceftriakson

Ceftriakson może być stosowany u osób z wszystkich grup wiekowych. Dużą niedogodnością jest jego domięśniowa droga podania.

Ceftriakson

1 dawka domięśniowo

Dorośli	250 mg
Dzieci poniżej 15 roku życia	125 mg

CHEMIOPROWFILAKTYKA ZAKAŻEŃ WYWOŁYWANYCH PRZEZ *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*

W przypadku stwierdzenia zachorowania na zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych wywołanego przez *Haemophilus influenzae* profilaktyka powinna obejmować wszystkich domowników, także dorosłych, jeśli chociaż jeden z członków rodziny ma mniej niż 4 lata. W przypadku tego drobnoustroju ryzyko zakażenia zależy od wieku i jest szczególnie duże dla dzieci w wieku od 2 miesiąca do 2 roku życia. CDC zaleca następującą profilaktykę:

Rifampicyna

przez 4 dni raz dziennie

dawka – 20 mg/kg (maksymalnie 600 mg dziennie)

CHEMIOPROWFILAKTYKA ZAKAŻEŃ WYWOŁYWANYCH PRZEZ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

W przypadku tego drobnoustroju bardzo rzadko opisywane są zachorowania epidemiczne; zwykle dotyczą środowisk zamkniętych, tj. żołnierzy, więźniów i mieszkańców domów opieki. Ryzyko wystąpienia drugiego zachorowania wśród osób z bliskiego kontaktu nie zostało zdefiniowane i brak jednoznacznego stanowiska w sprawie podjęcia chemioprowfilaktyki w przypadku zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych wywołanego przez ten drobnoustroj. Proponuje się następujący schemat chemioprowfilaktyki:

Rifampicyna

przez 2 dni co 12 godzin

dawka – 10 mg/kg

CHEMIOPROWFILAKTYKA U KOBIEC CIĄŻARNYCH I KARMIAJĄCYCH

W razie konieczności likwidacji nosicielstwa u kobiet ciążarnych zalecanym lekiem jest ceftriakson (1 dawka 250 mg domięśniowo).

Niektóre rekomendacje dopuszczają również stosowanie rifampicyny (doustnie 600 mg, co 12 godzin, przez dwa dni), ale u zwierząt laboratoryjnych rifampicyna wykazywała działanie teratogenne.

INNE POSTĘPOWANIE

W niektórych krajach (np. Norwegia) nie zaleca się przeprowadzania chemioprophylaktyki według wyżej przedstawionego schematu. W Norwegii, w przypadku osób poniżej 15 r.ż., które miały domowy kontakt z chorym, rozpoczyna się leczenie penicyliną i codzienną obserwacją lekarską przez okres tygodnia. Wszystkim pozostałym osobom, które kontaktowały się z chorym udzielane są informacje o możliwości wystąpienia zachorowania i konieczności zgłaszania się do lekarza w sytuacji wystąpienia charakterystycznych dla zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych lub posocznicy objawów klinicznych.

POSTĘPOWANIE W PRZYPADKU WYSTĄPIENIA ZAKAŻENIA/ZAKAŻEŃ MENINGOKOKOWYCH

DEFINICJA INWAZYJNEJ CHOROBY MENINGOKOKOWEJ

Potwierdzony przypadek inwazyjnej choroby meningokokowej. Kliniczne rozpoznanie zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, posocznicy/bakteriemii lub innego zakażenia inwazyjnego (np. ropne zapalenie stawów, zapalenie opłucnej, zapalenie tkanki podskórnej oczodołu) z równoczesną w tych przypadkach izolacją *Neisseria meningitidis* z właściwych materiałów klinicznych lub obecność w preparacie mikroskopowym Gram(-) dwoinek, lub dodatni test lateksowy w kierunku *Neisseria meningitidis*, lub wykrycie meningokokowego DNA w materiale klinicznym.

Prawdopodobny przypadek inwazyjnej choroby meningokokowej. Kliniczne rozpoznanie zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, posocznicy/bakteriemii lub innego zakażenia inwazyjnego, gdzie po konsultacji

lekarza z mikrobiologiem i epidemiologiem, najbardziej prawdopodobnym czynnikiem etiologicznym wydaje się być *Neisseria meningitidis*. Na tym etapie brak jednak pełnego potwierdzenia mikrobiologicznego.

Możliwy przypadek inwazyjnej choroby meningokokowej. Kliniczne rozpoznanie zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, posocznicy/bakteriemii lub innego zakażenia inwazyjnego, bez możliwości określenia na tym etapie czynnika etiologicznego (inne czynniki etiologiczne są w takim samym stopniu prawdopodobne jak *Neisseria meningitidis*).

W przypadku wystąpienia zakażenia meningokokowego najważniejsze są szybkie i skoordynowane działania wszystkich odpowiednich służb. Przede wszystkim informacja **od lekarza ze szpitala**, w którym zdiagnozowano zakażenie meningokokowe (potwierdzone lub podejrzane) powinna dotrzeć bez zwłoki do odpowiedniej **stacji sanitarno-epidemiologicznej**, która podejmie działania mające na celu ustalenie listy osób mających bezpośredni kontakt z chorym. Od takich osób należy pobrać wymazy z jamy nosowo-gardłowej (patrz rozdział „*Pobieranie wymazów z jamy nosowo-gardłowej od chorych i nosicieli*”), jak najszybciej podać odpowiednią chemioprophylaktykę i rozważyć zasadność zastosowania immunoprofilaktyki. Na każdym etapie postępowania bardzo istotna jest rzetelna informacja na temat charakterystyki zakażeń meningokokowych, która powinna trafić do osób z bezpośredniego kontaktu z chorym, osób stykających się z chorym w miejscach wspólnego przebywania (np. szkoły, zakłady pracy) oraz jeśli istnieje taka potrzeba, do opinii publicznej celem wczesnego zaobserwowania objawów. Równolegle wraz z działaniami opisanymi powyżej **pracownia mikrobiologiczna** zobowiązana jest do ustalenia czynnika etiologicznego zakażenia, zabezpieczenia płynu mózgowo-rdzeniowego lub krwi/surowicy do badań z wykorzystaniem PCR oraz przesłania szczepu do **KOROUN**. Szczepy od nosicieli wyhodowane w pracowniach mikrobiologicznych stacji sanitarno-epidemiologicznych należy również wysłać do KOROUN. Szczepy należy przesyłać wraz z wypełnioną ankietą, której wzór znajduje się na końcu niniejszego opracowania. W KOROUN otrzymane szczepy zostają poddane bardziej szczegółowym badaniom fenotypowym (typowanie serologiczne, oznaczanie wrażliwości na leki) oraz genotypowym (RAPD, PFGE, MLST), umożliwiającym ustalanie pokrewieństwa izolatów. W razie zgonu pacjenta, którego przyczyną mogło być zakażenie meningokokowe należy zabezpieczyć właściwy materiał i przesłać do KOROUN (patrz rozdział: *Badanie mikrobiologiczne post mortem*, str. 40).

Jedynie ścisła współpraca lekarzy praktyków, mikrobiologów, pracowników stacji sanitarno-epidemiologicznej i KOROUN umożliwia, w przypadku wystąpienia zakażeń meningokokowych, właściwe rozpoznanie

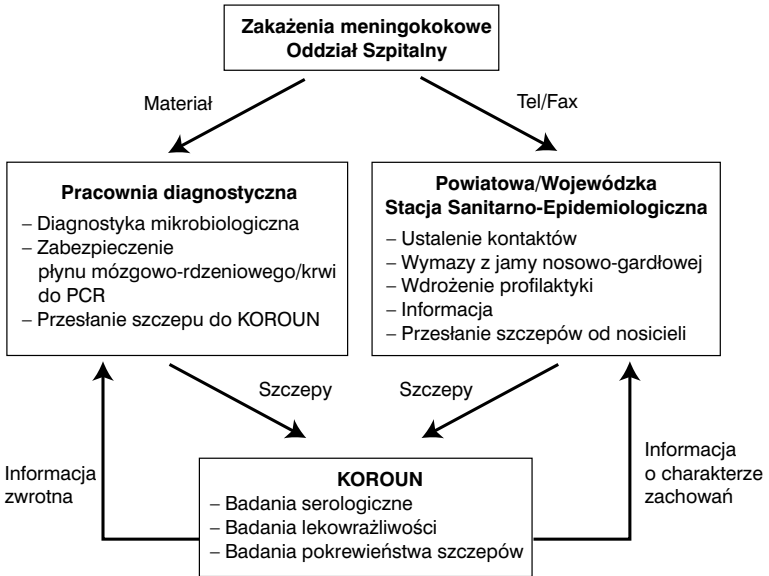
sytuacji epidemiologicznej, które jest niezbędne do podjęcia odpowiednich działań zapobiegających rozprzestrzenianiu się epidemii.

W przypadku wystąpienia **pojedynczego zachorowania**, ryzyko kolejnego zakażenia wśród osób mających kontakt z chorym, poza osobami mieszkającymi razem z chorym, jest niskie. W takiej sytuacji nie zaleca się chemioprophylaktyki osobom stykającym się z chorym w przedszkolu, szkole, miejscu pracy itp. Osoby, którym należy podać chemioprophylaktykę wymienione są w rozdziale „*Chemioprophylaktyka zakażeń wywołanych przez Neisseria meningitidis*”).

W przypadku **wystąpienia 2 lub więcej zakażeń meningokokowych** w tym samym przedszkolu, szkole, uczelni, rodzinie itp., należy uzyskać jak najwięcej informacji na temat zachorowań i danej placówki, w której one zaistniały. Ważne jest ustalenie daty zachorowań i ostatniego pobytu chorych w placówce, ustalenie związku epidemiologicznego pomiędzy nimi, objawy kliniczne i charakterystyka szczepów meningokokowych (serologiczna i genetyczna). Jeśli zachorowania wywołane są przez dwa różne szczepy meningokokowe (różnice serologiczne, brak pokrewieństwa), należy postępować tak jak w przypadku zakażeń sporadycznych. Jeśli natomiast w tej samej instytucji w okresie 4 tygodni występują dwa lub więcej zachorowania (potwierdzone lub prawdopodobne) spowodowane przez szczepy tej samej serogrupy, należy podjąć odpowiednie środki. Jeśli można ustalić, że zachorowania dotyczą określonej grupy osób/klasę, to chemioprophylaktyka i immunoprophylaktyka (jeśli jest dostępna) powinna objąć tę właśnie grupę. W przypadku, gdy nie jest to możliwe, zależnie od wielkości instytucji i różnicy wieku osób chorych, należy zastanowić się nad decyzją podania profilaktyki wszystkim osobom w danej placówce. W takich sytuacjach zamykanie instytucji, a zwłaszcza dezynfekcja obiektu (meningokoki nie utrzymują się w środowisku) nie wpływa na zmniejszenie ryzyka zachorowań.

Uwaga! W każdym przypadku zaistniałych wątpliwości, co do właściwego postępowania diagnostycznego, terapeutycznego i profilaktycznego należy kontaktować się z odpowiednimi służbami epidemiologicznymi i KOROUN.

SCHEMAT POSTĘPOWANIA W PRZYPADKU WYSTĄPIENIA ZAKAŻENIA MENINGOKOKOWEGO



ANKIETA (1/2)

ZAKAŻENIA OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO I INNE ZAKAŻENIA MENINGOKOKOWE

**Wypełnioną ankietę wraz ze szczepem
prosimy przesłać na adres:**

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego
Krajowy Ośrodek Referencyjny
ds. Diagnostyki Bakteryjnych Zakażeń
Ośrodkowego Układu Nerwowego
ul. Chełmska 30/34
00-725 Warszawa

Informacji udzielają:

dr Anna Skoczyńska
mgr Marcin Kadłubowski
Anna Klarowicz
tel: (22) 851-46-70
fax: (22) 841-29-49.

DANE OŚRODKA PRZESYŁAJĄCEGO SZCZEP

Osoba wypełniająca ankietę

Nazwa, adres, telefon, fax ośrodka

Data i podpis

DANE PACJENTA

Imię i nazwisko/inicjały

Data urodzenia/wiek

Płeć (proszę zakreślić) K M

Miejsce zamieszkania (miejscowość)

Uczęszcza do (zakreślić):

żłobka tak nie

przedszkola tak nie

Rodzeństwo (liczba)

Wiek w latach (zakreślić) 0-2 3-5 6-10 >10

Zakażenia ośrodkowego układu nerwowego w rodzinie

Numer historii choroby

Data wystąpienia objawów

Data przyjęcia do szpitala

Diagnoza (proszę zakreślić)

Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych

Bakteriemia/Posocznica

Inne (jakie?)

Objawy

Oponowe tak nie

Wysypka (gdzie?)

Inne (jakie?)

Efekt leczenia (proszę zakreślić)

Wyleczenie

Powikłania

Zgon

Upośledzenie odporności pacjenta

Szczepienia przeciw patogenom ośrodkowego układu nerwowego (kiedy?)

Neisseria meningitidis *Haemophilus influenzae* typu b *Streptococcus pneumoniae*

ANKIETA (2/2)

BADANIE PŁYNU MÓZGOWO-RDZENIOWEGO (PMR)

Data pobrania PMR

Wygląd płynu (proszę zakreślić)

Przejrzysty

Ropny (mętny)

Krwawy

Barwienie metodą Grama

Wynik

.....

Głukoza (mg/dl)

Białko (mg/dl)

Komórki (ogółem)

% wielojądrzastych

% limfocytów

% jednojądrzastych

Test lateksowy tak nie

Producent testu

Wynik

Data izolacji szczepu

Gatunek szczepu

Nr oryg. szczepu

UWAGI

.....

.....

.....

.....

BADANIE KRWI LUB INNEGO MATERIAŁU

Rodzaj materiału

Krew tak nie

Inny (jaki?)

Data pobrania materiału

Barwienie metodą Grama

Wynik

Test lateksowy tak nie

Producent testu

Wynik

Data izolacji szczepu

Gatunek szczepu

UWAGI

.....
.....
.....
.....

ANTYBIOTYKOTERAPIA (LEKI, DAWKI)

Antybiotyk

.....

Dawkowanie

.....

Okres leczenia

.....

PIŚMIENNICTWO

1. American Academy of Pediatrics. Meningococcal infections. W: Pickering, L.K. (wyd.), Red Book: Report of the Committee on Infectious Diseases. Wyd. 25. Elk Grove Village, IL, 2003.
2. Austrian R.: The enduring Pneumococcus: unfinished business and opportunities for the future. *Microb. Drug Resist.*, 3, 111-115, 1997.
3. Begg N.: Outbreak management, w: Meningococcal disease, Cartwright K. (red.), John Wiley & Sons, Chichester, 285-305, 1995.
4. Bleck T.P., Greenlee J.E.: Approach to the patient with central nervous system infection. W: Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. (wyd.), Principles and practice of infectious diseases. Fifth edition. Churchill Livingstone, New York, 950-959, 2000.
5. Brandtzaeg P., Kieruf P., Gaustad P., Skulberg A., Bruun J.N., Halvorsen S., Sorensen E.: Plasma endotoxin as predictor of multiple organ failure and death in systemic meningococcal disease. *J. Infect. Dis.*, 159, 195-204, 1989.
6. Broome C.V.: The carrier state: *Neisseria meningitidis*. *J. Antimicrobial Chemother.*, 18 (Suppl. A), 25-34, 1986.
7. Caplan M.J., Koontz F.P.: Cumitech 35, Postmortem microbiology. B.W. McCurdy (wyd.), American Society for Microbiology, Washington, D.C. 2001.
8. Cartwright, K.A.V., Ala'Aldeen D.A.A.: *Neisseria meningitidis*: clinical aspects. *J. Infect.*, 34, 15-19, 1997.
9. Caugant D.A.: Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. *APMIS*, 106, 505-525, 1998.
10. Caugant D.A., Hoiby E.A., Magnus P., Scheel O., Hoel T., Bjune G., Wedege E., Eng J., Froholm L.O.: Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis* in a randomly sampled population. *J. Clin. Microbiol.*, 32, 323-330, 1994.
11. Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. Popovic T., Ajello G.W., Facklam R.R. (coordinators): CDC, Atlanta, USA 1998.
12. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Prevention and control of meningococcal disease. *MMWR*; 49 (RR-07), 1-10, 2000.

13. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Meningococcal disease and college students. MMWR; 49 (RR-07), 11-20, 2000.
14. Connolly, M. i wsp.: Is group C meningococcal disease increasing in Europe? A report of surveillance of meningococcal infection in Europe 1993-6. *Epidemiol. Infect.*, 122, 41-49, 1999.
15. Cundell D., H.R. Masure E.I.: Tuomanen. The molecular basis of pneumococcal infection: a hypothesis. *Clin. Infect. Dis.*, 21 (Suppl. 3), 204-212, 1995.
16. Dunne W.M., Nolte Jr. F.S., Wilson M.L.: Cu,itech 1B, Blood cultures III. J.A. Hindler (wyd.), American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1997.
17. Gray L.D., Fedorko D.P: Laboratory diagnosis of bacterial meningitis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2, 130-145, 1992.
18. Griffiss J.M., Brandt B.L., Jarvis G.A.: Natural immunity to *Neisseria meningitidis*. W: N.A. Vedros (wyd.), Evolution of meningococcal disease. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, Vol. 2, 99-119, 1987.
19. Hryniewicz W., Skoczyńska A., Klarowicz A., Grzesiowski P: Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Diagnostyki Bakteryjnych Zakażeń Ośrodkowego Układu Nerwowego. Raport z działalności za lata 1997-99. Centralne Laboratorium Surowic i Szczepionek, Warszawa 2000.
20. Hryniewicz W., Skoczyńska A., Żak-Puławska Z.: „Raport Krajowego Ośrodka Referencyjnego d/s Diagnostyki Bakteryjnych Zakażeń Ośrodkowego Układu Nerwowego w sprawie zachorowań wywołanych przez *N.meningitidis* w Zielonce.” Meldunek 12/B/97, PZH, MZiOS 1997.
21. Johnston, R.B. Jr.: Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Rev. Infect. Dis.*, 13 (Suppl. 6), 509-517, 1991.
22. Kadhubowski M., Skoczyńska A., Hryniewicz W.: Zakażenia *Haemophilus influenzae* u dzieci. *Klinika Pediatryczna* 2003, 11, 331-4.
23. Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Winn W.C. Jr.: *Haemophilus*. W: Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Fifth edition. Lippincott, Philadelphia, 363-393, 1997.
24. Kriz P, Musilek M., Skoczyńska A., Hryniewicz W.: Genetic and antigenic characteristic of *Neisseria meningitidis* strains isolated in the Czech Republic in 1997-98. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2000, 19, 452-459.
25. Lystad A.: Principles and practice of control of meningococcal disease in Norway. *NIPH Annals*, 3/2, 103-107, 1980.
26. Morse S.A., Genco C.A.: *Neisseria*. W: Collier L., Balows A., Sussman M.: (wyd.), Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Ninth edition. Arnold, London, Vol. 2, 877-900, 1998.

27. Moxon E.R., Murphy T.F.: *Haemophilus influenzae*. W: Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R.: (wyd.) Principles and practice of infectious diseases. Fifth edition. Churchill Livingstone, New York, 2369-2378, 2000.
28. Musher D.M.: *Streptococcus pneumoniae*. W: Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R.: (wyd.) Principles and practice of infectious diseases. Fifth edition. Churchill Livingstone, New York, 2128-2147, 2000.
29. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard – sixth edition. NCCLS document M7-A6. Wayne, Pennsylvania 2003.
30. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard – eighth edition. NCCLS document M2-A8. Wayne, Pennsylvania 2003.
31. Oppenheim B.A.: Antibiotic resistance in *Neisseria meningitidis*. Clin. Infect. Dis., 24 (Suppl 1), 98-101, 1997.
32. Pittman M.: Variation and type specificity in the bacterial species *Haemophilus influenzae*. J. Exp. Med., 53, 471-495, 1931.
33. Poolman J.T., Van Der Ley P.A., Tommassen J.: Surface structures and secreted products of meningococci. W: K. Cartwright (wyd.), Meningococcal disease. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 21-34, 1995.
34. Powars D., Larsen R., Johnson J., Hulbert T., Sun T., Patch M.J., Francis R., Chan L.: Epidemic meningococemia and purpura fulminans with induced protein C deficiency. Clin. Infect. Dis., 17, 254-261, 1993.
35. Public Health Laboratory Service Meningococcus Forum. Guidelines for public health management of meningococcal disease in the UK. Commun Dis and Public Health, 5(3), 187-204, 2002.
36. Ray C.G., Smith J.A., Wasilaukas B.L., Zabransky R.: Cumitech 14A, Laboratory diagnosis of central nervous system infections. J.A. Smith (wyd.), American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1993.
37. Roos K.L., Tunkel A.R., Scheld W.M.: Acute bacterial meningitis in children and adults. W: Scheld W.M., Whitley R.J., Durack D.T.: (wyd.) Infections of the central nervous system. Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia, 335-401, 1997.
38. Rosenstein N.E., Perkins B.A., Stephens D.S., Popovic T., Hughes J.M.: Meningococcal disease. N. Engl. J. Med., 344, 1378-1388, 2001.
39. Skoczyńska A, Hryniewicz W.: Epidemiologia i leczenie zakażeń wywołanych przez *Neisseria meningitidis*. Polski Merkuriusz Lekarski. 2003, XV, 89, 459-62.

40. Skoczyńska A., Patrzalek M., Piotrowska M., Klarowicz A., Hryniewicz W.: Charakterystyka szczepów *Neisseria meningitidis* izolowanych w regionie kieleckim od dzieci z zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych. *Pediatrics Polska* 2002, LXXVII, 11, 627-633.
41. Skoczyńska A., Hryniewicz W.: „Raport z działalności Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Diagnostyki Bakteryjnych Zakażeń Ośrodkowego Układu Nerwowego za lata 1997-98.” *Mikrobiologia Medycyna* 1999, 2(19), 45-8.
42. Skoczyńska A., Hryniewicz W.: Bakteryjne zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych w Polsce. *Terapia i leki*, 2000, 4, 27-30.
43. Skoczyńska A., Hryniewicz W.: Zakażenia ośrodkowego układu nerwowego w świetle zmian oporności drobnoustrojów *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* i *Streptococcus pneumoniae* na leki przeciwbakteryjne. *Nowa Medycyna* 1999, 9, 21-25.
44. Skoczyńska A., Kadłubowski M., Hryniewicz W.: Wzrost liczby wykrywanych w Polsce zakażeń wywoływanych przez szczepy *Neisseria meningitidis* należące do grupy serologicznej C. *Meldunek 7/B/03, PZH, GIS* 2003.
45. Skoczyńska A., Kriz P., Konradsen H., Hryniewicz W.: Characteristics of the major etiologic agents of bacterial meningitis isolated in Poland in 1997-98. *Microbial Drug Resistance* 2000, 2, 147-53.
46. Skoczyńska A., Hryniewicz W.: Genetic relatedness, antibiotic susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* responsible for meningitis in Poland, 1997-2001. *Microbial Drug Resistance* 2003, 9, 175-182.
47. Skoczyńska A., Żak-Puławska Z., Hryniewicz W.: „Opracowanie ogniska zachorowań wywołanych przez *Neisseria meningitidis* u dzieci.” *Pediatrics Polska* 1998, LXXIII, 5, 361-67.
48. Slack M.P.E., Jordens J.Z.: *Haemophilus*. W: L. Collier, A. Balows, M. Sussman (wyd.), *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. Ninth edition. Arnold, London, Vol. 2, 1167-1190, 1998.
49. Tenover F.C., Arbeit R.D., Coering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H., Swaminathan B.: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.*, 33 2233-2239, 1995.
50. Tunkel A.R., Scheld W.M.: *Acute meningitis*. W: Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R.: (wyd.) *Principles and practice of infectious diseases*. Fifth edition. Churchill Livingstone, New York, 959-997, 2000.

51. Tunkel A.R., Scheld W.M.: Acute meningitis. W: Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R.: (wyd.) Principles and practice of infectious diseases. Fourth edition. Churchill Livingstone, New York, 831-864, 1995.
52. Van Deuren M., Brandtzaeg P., van der Meer J.W.: Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. Clin. Microbiol. Rev., 13, 144-166, 2000.
53. Vazquez J.A., Arreaza L., Block C., Ehrhard I., Gray S.J., Heuberger S., Hoffmann S., Kriz P., Nicolas P., Olcen P., Skoczynska A., Spanjaard L., Stefanelli P., Taha M.K., Tzanakaki G.: Interlaboratory comparison of agar dilution and Etest methods for determining the MICs of antibiotics used in management of *Neisseria meningitidis* infections. Antimicrob Agents Chemother. 2003, 47, 3430-4.
54. Woods J.P., Kersulyte D., Tolan R.W. Jr., Berg C.M., Berg D.E.: Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction analysis to type disease and carrier strains of *Neisseria meningitidis* isolated during a university outbreak. J. Infect. Dis., 169 1384-1389, 1994.