

21.01.2009.

Opracowanie: Marcin Kadłubowski, Anna Skoczyńska, Waleria Hryniewicz
Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Diagnostyki
Bakteryjnych Zakażeń Ośrodkowego Układu Nerwowego (KOROUN)
Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej
Narodowy Instytut Leków
ul. Chelmska 30/34, 00-725 Warszawa
tel. +48 22 841 12 33
tel. +48 22 851 46 70
fax +48 22 841 29 49
email: koroun@cls.edu.pl
www.koroun.edu.pl

ZASADY POSTĘPOWANIA DIAGNOSTYCZNEGO W PRZYPADKACH PODEJRZENIA OSTREGO BAKTERYJNEGO ZAPALENIA OPON MÓZGOWO- RDZENIOWYCH LUB INNEGO INWAZYJNEGO ZAKAŻENIA BAKTERYJNEGO NABYTEGO POZA SZPITALEM

Inwazyjne zakażenia bakteryjne nabyte poza szpitalem stanowią poważny problem terapeutyczny, diagnostyczny, a w przypadku zakażeń meningokokowych również zagrożenie dla zdrowia publicznego. Części tych zakażeń (np. Hib, część zakażeń pneumokokowych i meningokokowych) można zapobiegać poprzez szczepienia ochronne, dlatego tak ważne jest ich ciągłe i wnikliwe monitorowanie. Tylko w ten sposób możliwe jest formułowanie aktualnych rekomendacji dotyczących leczenia, diagnostyki i profilaktyki inwazyjnych zakażeń oraz szybkie reagowanie w sytuacjach zagrożenia epidemicznego.

Za **zakażenie inwazyjne** uważa się takie zakażenie, w którym szczep bakteryjny izoluje się z krwi, płynu mózgowo-rdzeniowego lub innych fizjologicznie jałowych miejsc organizmu. Choć istnieje wiele postaci pozaszpitalnych bakteryjnych zakażeń inwazyjnych (zapalenie płuc z bakterią, ropne zapalenie stawów, zapalenie tkanki podskórnej, zapalenie powięzi), na ogół określenie inwazyjnej choroby bakteryjnej kojarzy nam się z postaciami najczęściej występującymi, czyli z zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych oraz z posocznica.

Zarówno **bakteryjne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych (zomr)** jak i **posocznica (sepsa)** bakteryjna stanowią bezpośrednie zagrożenie życia pacjenta. Szybkie wdrożenie skutecznej terapii jest kluczowe dla przeżycia pacjenta oraz zapobieżenia wystąpienia powikłań. Ze względu na fakt, że pozaszpitalne zomr i posocznica może

wywoływać wiele drobnoustrojów, identyfikacja czynnika etiologicznego jest niezwykle ważna i niezbędna dla podejmowania kolejnych kroków, zarówno terapeutycznych, jak i profilaktycznych. Poza tym poznanie czynnika etiologicznego zakażenia dostarcza cennych danych dla opracowań epidemiologicznych.

Do najczęstszych czynników etiologicznych tego rodzaju zakażeń w Polsce, w grupie wiekowej powyżej trzeciego miesiąca życia, należą *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* i *Haemophilus influenzae*. Pałeczki hemofilne typu b jednak, w przeciwieństwie do meningokoków i pneumokoków, rzadko wywołują inwazyjne zakażenia u osób powyżej 5 roku życia. We wszystkich grupach wiekowych zakażenia inwazyjne nabyte poza szpitalem mogą również, choć rzadziej, wywoływać inne gatunki bakteryjne, takie jak np. *Salmonella sp.*, *Klebsiella pneumoniae* lub *Staphylococcus aureus*. W przypadkach zakażeń występujących u noworodków i niemowląt poniżej 3 miesiąca życia wśród czynników sprawczych dominują *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes* i *Escherichia coli* serotypu K1. Te gatunki mogą również wywoływać inwazyjne zakażenia w innych grupach wiekowych, szczególnie u osób z upośledzeniami odporności.

W ustalaniu czynnika etiologicznego zakażenia diagnostyka opiera się o:

- badania biochemiczne;
- badania serologiczne;
- badania mikrobiologiczne;
- badania molekularne.

W niniejszym opracowaniu skupiono się przede wszystkim na roli diagnostyki mikrobiologicznej.

Diagnostyka biochemiczna dotyczy badań płynu mózgowo-rdzeniowego (pmr) i krwi pacjenta. Badania te, obejmujące określenie w pmr stężeń glukozy, białka itp., pozwalają na wstępne różnicowanie zomr bakteryjnych od wirusowych, grzybiczych lub gruźliczych. Również liczba komórek (cytoza) w pmr oraz ich charakterystyka często pozwala na wstępne określenie charakteru zakażenia. Badania analityczne krwi, określające między innymi morfologię (leukocytozę), OB, stężenie CRP, czy prokalcytoniny również mogą ukierunkowywać diagnozę.

Diagnostyka zakażeń oparta o badania serologiczne (**wykrywanie wybranych antygenów drobnoustrojów**) dotyczy przypadków zarówno zomr jak i posocznicy i polega

na przeprowadzaniu szybkich testów lateksowych, pozwalających na wykrycie w materiale klinicznym (np. pmr, surowica, mocz) antygenów specyficznych dla najczęstszych czynników etiologicznych ostrych pozaszpitalnych bakteryjnych zakażeń inwazyjnych. Testy lateksowe pozwalają na wykrycie antygenów meningokoków, pneumokoków, pałeczek hemofilnych typu b, paciorkowców grupy B i pałeczek okrężnicy serotypu K1. Zaletą testów lateksowych jest fakt, że pozwalają one na wykrycie antygenów pochodzących również z martwych komórek bakteryjnych. W każdym przypadku przeprowadzania testów lateksowych bardzo ważne jest, by dokładnie kierować się instrukcją producenta. Nie każdy bowiem test nadaje się do wykrywania antygenów w materiałach innych niż płyn mózgowo-rdzeniowy. Należy również pamiętać, że testy lateksowe potrafią dawać fałszywie dodatnie lub fałszywie ujemne wyniki, dlatego wskazane jest, aby były one poparte wynikami innych badań. Według zaleceń Europejskiego Centrum Zapobiegania i Kontroli Chorób – ECDC (z *ang.* European Centre for Disease Prevention and Control) – dodatni wynik testu lateksowego w płynie mózgowo-rdzeniowym jest wystarczający do potwierdzenia czynnika etiologicznego zakażenia.

Diagnostyka mikrobiologiczna zakażeń obejmuje badanie mikroskopowe preparatu uzyskanego z materiału klinicznego (pmr, krew, zmiany skórne, punktaty, inne), barwionego metodą Grama oraz posiew na odpowiednie podłoża mikrobiologiczne w celu wyhodowania czynnika etiologicznego zakażenia. Obserwację odpowiednio przygotowanego preparatu należy prowadzić przez co najmniej pół godziny, zmieniając pola widzenia. W przypadku płynu mózgowo-rdzeniowego o niskiej cytozie należy przygotować tzw. wielowarstwowy preparat mikroskopowy, poprzez nakroplenie i wysuszenie na szkiełku podstawowym kilku kolejnych warstw pmr. Zaobserwowanie w obrazie mikroskopowym form specyficznych dla poszczególnych gatunków drobnoustrojów pozwala na ukierunkowanie diagnozy. W przypadku zakażeń meningokokowych zaobserwowanie w preparacie płynu mózgowo-rdzeniowego Gram-ujemnych dwoinek (wraz z objawami klinicznymi u pacjenta) jest według wytycznych ECDC wynikiem wystarczającym do potwierdzenia przypadku zakażenia. Należy pamiętać, że zarówno wynik dodatni, jak i ujemny wymaga **natychmiastowego** powiadomienia lekarza prowadzącego. Ze względu na ważność preparatu mikroskopowego w toku diagnostycznym zakażeń inwazyjnych **nie do przyjęcia jest sytuacja**, w której materiał kliniczny pobierany jest od chorego bezpośrednio na podłoże transportowe bądź hodowlane. Takie działanie wyklucza bowiem możliwość przeprowadzenia diagnostyki przez badanie

mikroskopowe, stosowanie testów lateksowych czy wykonanie badań molekularnych i może nie tylko opóźnić, ale także uniemożliwić ustalenie etiologii zakażenia. W przypadkach, gdy od pacjenta uda się pobrać dwie próbki płynu mózgowo-rdzeniowego do dwóch oddzielnych probówek, do badań mikrobiologicznych powinna trafić druga próbka, ponieważ dla pierwszej istnieje większe ryzyko zanieczyszczenia florą skóry pacjenta, co obniża wiarygodność prowadzonych badań. **W każdym przypadku podejrzenia zakażenia inwazyjnego, nawet, jeśli przebiega ono pod postacią wyłącznie zomr, do badań mikrobiologicznych musi być pobrana krew pacjenta (posiew).**

Jeśli możliwym czynnikiem inwazyjnego zakażenia u pacjenta jest *N. meningitidis*, badaniu mikrobiologicznemu powinien być poddany (o ile możliwe jest jego pobranie) **wymaz z jamy nosowo-gardłowej** pacjenta (**nie mylić z nosem i gardłem**). Stwierdzenie w nosogardzieli obecności meningokoków, przy jednoczesnych objawach klinicznych świadczących o zakażeniu inwazyjnym, pozwala na określenie **prawdopodobnego przypadku inwazyjnej choroby meningokokowej**. Wynika to z faktu, że ogromna większość zakażeń meningokokowych poprzedzona jest bezobjawowym nosicielstwem meningokoków w jamie nosowo-gardłowej, skąd dopiero bakterie przedostają się do krwi i dalej do innych układów. Powyższa reguła nie dotyczy innych czynników etiologicznych, tzn. wyhodowanie z nosogardła pacjenta *S. pneumoniae* oznacza, że pacjent jest nosicielem pneumokoków, ale w żadnym stopniu nie potwierdza, ani nie wyklucza, że czynnikiem etiologicznym trwającego zakażenia jest ten gatunek bakteryjny.

Najbardziej kluczowym elementem diagnostyki zakażeń jest **wyhodowanie czynnika etiologicznego**. Uzyskanie szczepu bakteryjnego pozwala nie tylko na identyfikację drobnoustroju odpowiedzialnego za zakażenie, ale również na jego pełną charakterystykę fenotypową (antybiogram w celu wdrożenia celowanej terapii antybiotykowej), serologiczną (w zależności od drobnoustroju ustalenie grup, typów, podtypów serologicznych) oraz genetyczną. **Szczep bakteryjny wyhodowany od pacjenta z inwazyjnym zakażeniem jest najlepszym materiałem do dalszych badań.** Każdy szczep wyhodowany z inwazyjnego zakażenia nabytego poza szpitalem (w przypadku choroby meningokokowej również wyhodowany z nosogardła pacjenta) należy przesłać wraz z dokładnie wypełnionym formularzem do KOROUN w celu potwierdzenia identyfikacji i przeprowadzenia dalszych badań. Formularz powinien zawierać podstawowe dane o pacjencie, terapii i materiale do badań oraz dokładny adres i telefon osoby, do której powinien być wysłany wynik badania.

Po wysłaniu do Ośrodka Referencyjnego izolat bakteryjny należy utrzymywać przy życiu, aż do uzyskania informacji telefonicznej, że w KOROUN udało się go ożywić. W sytuacjach, gdy szczep nie przeżyje transportu do Ośrodka, konieczne jest jego ponowne przesłanie.

Diagnostyka molekularna inwazyjnych zakażeń opiera się na wykrywaniu w materiale klinicznym pobranym od pacjenta sekwencji kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) specyficznych dla poszczególnych gatunków, grup i typów drobnoustrojów. Zaletą tej metody jest fakt, że potrafi ona dać dodatnie wyniki dla próbek pobranych nawet do 72 godzin od wdrożenia u pacjenta leczenia przeciwbakteryjnego (wykrywany jest materiał pochodzący z zabitych komórek bakterii).

W niektórych przypadkach trudno jest uzyskać dodatni i wiarygodny wynik we wszystkich ze wspomnianych badań, jednak w każdym przypadku, o ile to tylko możliwe, należy prowadzić diagnostykę wszystkimi metodami.

W przypadku podejrzenia wystąpienia zakażenia o charakterze zomr lub posocznicy należy przyjąć schemat postępowania diagnostycznego, w którym materiał pobrany od chorego (pmr, krew) poddaje się badaniom mikrobiologicznym, biochemicznym i testom lateksowym, **jednocześnie** zachowując odpowiednie ilości materiałów na badania genetyczne. Jeśli wynik preparatu bezpośredniego z materiału oraz hodowli prowadzonej w lokalnym laboratorium szpitalnym jest ujemny po 24 godzinach od pobrania materiału od chorego, próbki przeznaczone do badań molekularnych należy przesłać do KOROUN. Jeśli po wysłaniu materiałów na badania molekularne w laboratorium uda się wyhodować czynnik etiologiczny zakażenia, należy o tym bezzwłocznie poinformować KOROUN i wysłać do badań wyizolowany od pacjenta szczep bakteryjny.

ZASADY PRZESYŁANIA SZCZEPÓW BAKTERYJNYCH I MATERIAŁÓW KLINICZNYCH DO KOROUN:

W przypadku wyhodowania od pacjenta bakterii odpowiedzialnych za inwazyjne zakażenie nabyte poza szpitalem, należy je przesłać do KOROUN wraz z dokładnie wypełnionym formularzem. **Szczep bakteryjny należy wysłać w dwóch wersjach** (np. płytka Petriego i wymazówka z podłożem transportowym, płytka i skos agarowy itp.), **zabezpieczając go na czas transportu przed ewentualnym zgnieceniem, czy uszkodzeniem i zmianami temperatury.** Do KOROUN należy wysłać **świeżą, czystą**

hodowlę szczepu z podaną datą posiewu. Hodowlę w laboratorium lokalnym należy kontynuować aż do potwierdzenia dotarcia przesyłki do Ośrodka i ożywienia izolatu.

W każdym przypadku inwazyjnego zakażenia należy zabezpieczyć materiały kliniczne do badań molekularnych, pozwalających na identyfikację czynnika sprawczego. **Do tego rodzaju badań wymagane jest co najmniej 200µl płynu mózgowo-rdzeniowego i/lub 2,5-3 ml krwi (od noworodków 0,5-1 ml). Najlepsze wyniki w diagnostyce niehodowlanej uzyskuje się dla pełnej krwi pobranej na EDTA, ale badana może być również krew pobrana na heparynę i cytrynian oraz surowica (2 ml).** Próbkę materiałów powinny być przesyłane w jałowych, szczelnie zamykanych i dokładnie opisanych próbkach, wraz z wypełnionym formularzem (objętość próbki powinna być dobrana do objętości materiału – należy unikać przesyłania bardzo małych objętości np. pmr w dużych próbkach). Nie ma konieczności wysyłania materiału na suchym lodzie – można je przesyłać w temperaturze pokojowej, dbając jednak o jak najszybsze ich dostarczenie do Ośrodka Referencyjnego. **Ze względów bezpieczeństwa materiały należy na czas transportu zabezpieczyć przed uszkodzeniem. UWAGA! PRÓBKI MATERIAŁÓW KLINICZNYCH MUSZĄ BYĆ POBRANE OD PACJENTA MOŻLIWIE NAJSZYBCIEJ, ALE NIE PÓŹNIEJ NIŻ W CIĄGU 72 GODZIN OD WŁĄCZENIA ANTYBIOTYKOTERAPII. KOROUN zastrzega sobie prawo do odmowy wykonania badania na próbkach pobranych później lub źle zabezpieczonych.**

Jeśli przed ustaleniem etiologii zakażenie doprowadzi do zgonu pacjenta, do KOROUN należy wysłać materiały kliniczne pobrane śródsekcyjnie, w celu podjęcia prób ustalenia czynnika etiologicznego. Materiały, które są przydatne w tego rodzaju badaniach to krew z komór serca (2 ml) oraz **niewielkie skrawki (0,5 x 0,5 x 0,5 cm)** śledziony, wątroby, nerek oraz drobne fragmenty zmienionej skóry (przy wysypce krwotocznej). Pobrane *post mortem* materiały należy zabezpieczyć w **jałowych, szczelnie zamykanych i dokładnie opisanych pojemnikach** i dostarczyć do KOROUN wraz z formularzem lub pisemną informacją dotyczącą przypadku **po uprzednim uzgodnieniu telefonicznym**. Próbkę sekcyjne, można przesyłać zamrożone na suchym lodzie lub przynajmniej z wkładami chłodzącymi, pod warunkiem zapewnienia możliwie najszybszego dostarczenia ich do Ośrodka. Z tego względu preferowaną formą ich transportu do KOROUN jest przesyłka kurierska.

W szczególnych sytuacjach, gdy spełnienie powyższych warunków przesyłania szczepów bakteryjnych i materiałów do KOROUN nie jest możliwe, konieczny jest kontakt z Ośrodkiem.