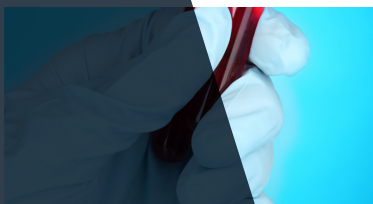


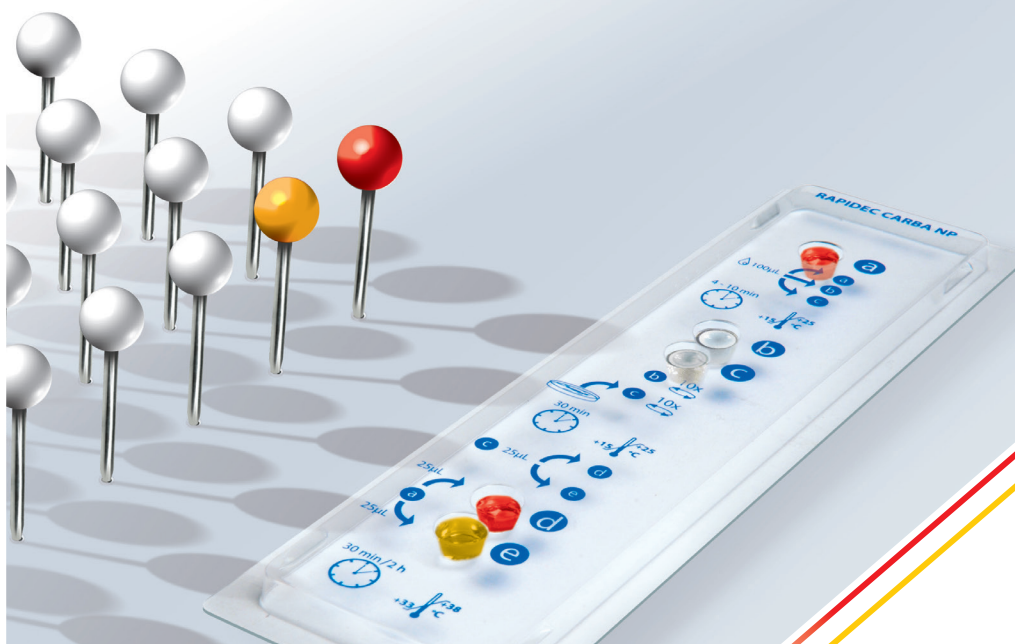
#72
lipiec 2015

aktualności bioMérieux





BE S.M.A.R.T. WITH RESISTANCE™



RAPIDEC® CARBA NP

**Lider w wykrywaniu
karbapenemaz**

Redakcja

wydawca: bioMérieux Polska Sp. z o.o.

Osoba odpowiedzialna: Ireneusz Popławski

Osoby biorące udział w przygotowaniu nr 72:

Marcin Iszkuło

Alicja Rusinek

Piotr Szczegół

Konrad Klimek

Aneta Lesiuk (korekta)

Adres redakcji i wydawcy:

bioMérieux Polska

01-518 Warszawa, ul. Gen. Józefa Zajęczka 9

tel. (22) 569 85 00 • fax (22) 569 85 54

www.biomerieux.pl

opracowanie graficzne:

Mariusz Glejzer

www.glejzer.com

Piśmiennictwo dostępne w redakcji

w tym numerze:

3

List Dyrektora Generalnego bioMérieux Polska

Berndta Junga

4-7

Mikrobiologia. Badania przesiewowe w praktyce

8-10

Mikrobiologia. Karbapenemazy

13-16

Mikrobiologia. Mikrobiologiczna diagnostyka legionelozy

17-18

Mikrobiologia. RAL STAINER – automatyczny aparat do barwienia prątków

19-26

Biologia molekularna. BKV – mało znany wirus niebezpieczny u pacjentów z obniżoną odpornością

27

Forum HAI

Szanowni Państwo,

W ostatnim numerze „Aktualności bioMérieux” Pani dr Elżbieta Wójcik – moja poprzedniczka, która przeszła na zasłużoną emeryturę - podziękowała Państwu za długoletnią, udaną współpracę.

Chciałbym powitać Państwa jako nowy Prezes bioMérieux Polska Sp. z o.o., jak również krótko się przedstawić.

Swoją współpracę z firmą bioMérieux rozpocząłem w 1988 roku i przez kolejne lata zajmowałem w niej różne stanowiska w działach sprzedaży i marketingu oraz stanowiska kierownicze zarówno w Niemczech, jak i za granicą, w siedzibie Grupy we Francji. W ciągu ostatnich ośmiu lat byłem Dyrektorem Zarządzającym bioMérieux Niemcy, a od jesieni 2014 roku jestem odpowiedzialny za działania firmy na terenie Europy Środkowej, w regionie sprzedaży, do którego należy również Polska.

Chciałbym kontynuować udaną pracę polskiego oddziału i być dla Państwa niezawodnym partnerem. Dla Państwa, jako klientów, najważniejsza jest jakość opieki nad pacjentem oraz produktów a naszym celem jest zadowolenie klientów.

Mam nadzieję, że nasza współpraca będzie układać się bardzo dobrze i będzie oparta na wzajemnym zaufaniu. Życzę Państwu przyjemnej i wartościowej lektury.

Pozdrawiam serdecznie,

Bernd Jung



Badania przesiewowe w praktyce – doświadczenia własne

mgr Maria Wesołowska

Szpital Kliniczny Przemienienia Pańskiego UM w Poznaniu

Zarówno w kraju jak i na świecie, obserwuje się problem narastającej lekooporności drobnoustrojów. Dotyczy to przede wszystkim pałeczek Gram-ujemnych, które wykazują oporność na wiele grup leków (MDR – *multi drug resistant*). Coraz częściej izolowane są również szczepy odporne na wszystkie dostępne leki (PDR – *pan drug resistance*). Szczególny problem stanowi rozprzestrzenianie się pałeczek Gram-ujemnych z rodziny *Enterobacteriaceae* wywarzających karbapenemazy (CPE – *carbapemase producing Enterobacteriaceae*). Zmieniająca się sytuacja epidemiologiczna przekłada się na rosnącą liczbę badań przesiewowych. Badania przesiewowe stanowią ważne narzędzie kontroli zakażeń szpitalnych, a informacje o florze bakteryjnej kolonizującej pacjenta wykorzystuje się również podejmując decyzje o modyfikacji profilaktyki okołoperacyjnej oraz w szczególnych przypadkach, także przy wdrażaniu empirycznej antybiotykoterapii.

Wykonując badania przesiewowe wypełniamy obowiązki ustawy („Ustawa o zapobieganiu oraz zwalczaniu zakażeń, chorób zakaźnych u ludzi” z dnia 5 grudnia 2008), identyfikując pacjentów skolonizowanych patogenami alarmowymi (zgodnie z listą patogenów alarmowych ujętą w rozporządzeniu Ministra Zdrowia z 23 grudnia 2011). Aby jak najlepiej wykorzystać badania screeningowe oraz informacje, których nam dostarczą, należy dokładnie rozważyć, którzy pacjenci zostaną nimi objęci, jakich patogenów będziemy poszukiwać oraz jakie będą konsekwencje wykrycia określonego patogenu (np. wdrożenie izolacji kontaktowej). Wydane w tym roku rekomendacje „Wskazania do wykonywania badań mikrobiologicznych u pacjentów hospitalizowanych” autorstwa prof. W. Hryniewicz i współpracowników, określają grupy pacjentów, którzy powinni zostać objęci badaniami przesiewowymi oraz wskazują na podstawowe kryteria, które należy uwzględnić opracowując procedury dla badań przesiewowych. O tym, kto i w jakim zakresie zostanie objęty badaniem przesiewowym decyduje między innymi specyfika pacjenta, danej jednostki szpitalnej, aktualna sytuacja epidemiologiczna. Utworzenie i wprowadzenie w życie procedur, które będą niosły za sobą rzeczywiste korzyści dla pacjentów i dla szpitala, nie jest możliwe bez ścisłej współpracy między laboratorium mikrobiologicznym, zespołem ds. kontroli zakażeń szpitalnych oraz personelem lekarskim i pielęgniarskim. Konieczne jest prowadzenie regularnych szkoleń poruszających kwestie:

- zasad zlecania badań przesiewowych dla konkretnych grup pacjentów

- sposobu pobrania materiału do badań, jego transportu i przechowywania
- postępowania w przypadku identyfikacji określonych patogenów alarmowych
- znaczenia i epidemiologicznych konsekwencji wykrycia wieloopornych drobnoustrojów.

Współczesne laboratorium mikrobiologiczne ma dostęp do szerokiej gamy narzędzi diagnostycznych, dzięki którym może w krótkim czasie określić czy badany drobnoustrój jest patogenem alarmowym. Dostępne podłoża chromogenne, testy biochemiczne i genetyczne pozwalają na szybką identyfikację patogenów umożliwiając szybkie wdrożenie procedur izolacji. Ważne jest, aby obecność wieloopornego drobnoustroju została w jak najkrótszym czasie zgłoszona lekarzowi prowadzącemu oraz zespołowi ds. kontroli zakażeń szpitalnych.

W naszym ośrodku prowadzimy badania przesiewowe dla sześciu grup pacjentów.

I Pacjenci należący do grupy narażonej na kolonizację CPE

Pałeczki Gram-ujemne z rodziny *Enterobacteriaceae* wywarzające karbapenemazy ze względu na wysoki potencjał epidemiczny oraz oporność na prawie wszystkie lub wszystkie dostępne leki stanowią poważne wyzwanie dla kontroli zakażeń. Zgodnie z zaleceniami rekomendowanymi przez Ministra Zdrowia z 2012 roku „Zalecenia dotyczące postępowania w przypadku zachorowań sporadycznych i ognisk epidemicznych wywołanych przez Gram-ujemne pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*” opracowano procedurę wykonywania badań przesiewowych w kierunku CPE u pacjentów przyjmowanych do naszego szpitala. Ponieważ problem występowania CPE dotyczy wielu krajów i wielu ośrodków opieki zdrowotnej w Polsce, ustalenie profilu pacjentów objętych screenowaniem jest kwestią problematyczną. Zgodnie z naszym schematem postępowania, wymaz z odbytu w kierunku kolonizacji CPE pobierany jest od pacjentów, którzy w ciągu ostatniego roku byli hospitalizowani w polskich ośrodkach, których dotyczy problem CPE lub wybranych ośrodkach zagranicznych (Grecja, Hiszpania, Turcja) lub odbyli podróż do Indii.

Badane próby posiewane są na podłoża chromogenne chromID CARBA (bioMérieux) selekcjonujące szczepy odporne na karbapenemy. W przypadku, gdy wynik posiewu jest dodatni, należy w jak najkrótszym czasie

sprawdzić czy oporność na karbapenemy związana jest w wytwarzaniem karbapenemazy. Dla tych szczepów wykonywany jest test Nordmana-Poirela (CARBA-NP). Można wykorzystać samodzielnie przygotowane odczynniki lub gotowe zestawy komercyjne. Wynik otrzymujemy już w ciągu dwóch godzin. Nasze doświadczenia ze szczepami wytwarzającymi karbapenemazy typu NDM pokazują, że reakcja ta zachodzi bardzo szybko (dodatni wynik reakcji widoczny był od razu po dodaniu odczynników, jeszcze przed rozpoczęciem inkubacji). Otrzymanie dodatniego wyniku testu CARBA-NP świadczy o wytwarzaniu karbapenemazy i jest podstawą do wszczęcia odpowiednich procedur. O dodatnim wyniku informowany jest lekarz prowadzący pacjenta oraz zespół ds. kontroli zakażeń szpitalnych. Pacjent zostaje natychmiast poddany izolacji kontaktowej. Dalsze etapy diagnostyki, identyfikacja drobnoustroju do gatunku, określenie lekowrażliwości oraz typu wytwarzanej karbapenemazy metodami fenotypowymi i wreszcie przesłanie szczepu do Krajowego Ośrodka ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD) celem potwierdzenia wykrytego mechanizmu oporności, odbywa się już po wdrożeniu procedury izolacji pacjenta. Zastosowanie testu CARBA-NP umożliwia wydanie wyniku dodatniego już w pierwszej dobie od pobrania materiału. Należy podkreślić, że uzyskanie dodatniego wyniku testu CARBA-NP zobowiązuje laboratorium do przesłania wyhodowanego szczepu do KORLD, nawet jeśli testy fenotypowe zinterpretowano jako ujemne.

Jak pokazuje przypadek jednego z pacjentów hospitalizowanych na Oddziale Pulmonologii naszego Szpitala, wdrożenie badań przesiewowych w kierunku CPE, przynosi wymierne korzyści. Pacjent został przyjęty na oddział z rozpoznaniem zapalenia płuc. Z wywiadu wynikało, że zachorował w trakcie pobytu w Grecji i był poddany leczeniu w jednym z greckich szpitali. Zgodnie z procedurą, pobrano od niego wymaz z odbytu w kierunku CPE. Następnego dnia rano, zauważono wzrost kolonii na podłożu chromogennym. Natychmiast wykonano test CARBA-NP i po kilku minutach otrzymano wynik dodatni. Niezwłocznie poinformowano lekarza prowadzącego oraz Zespół ds. Kontroli Zakażeń Szpitalnych. Izolacja pacjenta została wdrożona w pierwszej dobie od jego przyjęcia do szpitala. Ponieważ w naszym laboratorium dysponujemy testami genetycznymi Xpert®Carba –R (Cepheid) mamy możliwość szybkiej identyfikacji, metodą *real-time* PCR, karbapenemazy typu NDM, KPC, OXA-48, IPM i VIM, wykonaliśmy takie badanie dla wyhodowanego szczepu. Wynik otrzymaliśmy po 50 minutach. Prawdopodobnie podczas hospitalizacji w Grecji pacjent skolonizował się szczepem wytwarzającym karbapenemazę typu KPC. Metodami biochemicznymi zidentyfikowaliśmy szczep jako *Klebsiella pneumoniae*. Został on przesłany do KORLD, gdzie potwierdzono wyniki naszych badań.

Wykrycie szczepu CPE u jednego z pacjentów, pociąga za sobą szereg dalszych działań. Pobierane są wymazy z odbytu od wszystkich pacjentów, z którymi skolonizowana osoba miała kontakt. Screening jest prowadzony raz w tygodniu, dopóki skolonizowany pacjent

przebywa na oddziale. W opisanym powyżej przypadku szybkie wdrożenie izolacji zapobiegło rozprzestrzenieniu się patogenu i nie został on stwierdzony u żadnego z pozostałych pacjentów.

II Pacjenci hospitalizowani na Oddziale Hematologii i Transplantacji Szpiku

Pacjenci z hematologiczną chorobą nowotworową są szczególnie narażeni na kolonizację drobnoustrojami wieloopornymi, ze względu na długotrwałą hospitalizację, poddawanie antybiotykoterapii, często z zastosowaniem antybiotyków o szerokim spektrum działania, cykle chemioterapii, wpływające wyniszczająco na naturalną florę jelitową, neutropenię. Chemioterapia wywiera również efekt cytotoksyczny na komórki nabłonkowe jelit, prowadząc do ich rozszczelnienia, a w konsekwencji to przedostania się drobnoustrojów kolonizujących przewód pokarmowy do łożyska krwi. Dlatego tak niezwykle ważne jest prowadzenie badań przesiewowych dla pacjentów z oddziałów hematologicznych. W tym przypadku, zadaniem badania przesiewowego jest nie tylko identyfikacja pacjentów skolonizowanych wieloopornymi drobnoustrojami i poddanie ich izolacji, ale też określenie jaki jest wzór oporności drobnoustrojów występujących u danego pacjenta. W wyjątkowych sytuacjach, w przypadku wystąpienia bakteriemii i konieczności szybkiego podania antybiotyku, można oprzeć decyzję o wdrożeniu antybiotykoterapii, na bazie informacji pochodzących z badań przesiewowych (Frère i wsp. 2004, Weinstock i wsp. 2007, Reddy i wsp. 2007).

Od wszystkich pacjentów z Oddziału Hematologii i Pooddziału Transplantacji raz w tygodniu pobierany jest wymaz z odbytu w kierunku wankomycynoopornych enterokoków (VRE) oraz pałeczek MDR. Wymaz jest posiewany na podłoże D-coccosel z dodatkiem wankomycyny w stężeniu granicznym, w celu identyfikacji VRE oraz na podłoże chromogenne chromID ESBL (bioMérieux) w celu identyfikacji pałeczek MDR. Ważne jest, aby na wstępnym etapie badania zidentyfikować również szczepy odporne na karbapenemy, ponieważ mogą być producentami karbapenemazy. Dlatego dodatkowo wymaz posiewny jest na podłoże MacConkey'a, na którym układamy krążki antybiotykowe z ertapenemem i imipenemem. Dla szczepów o obniżonej wrażliwości na karbapenemy wykonujemy test CARBA-NP z podłoża chromogenne (z podłoża McConkeya nie należy wykonywać testu CARBA-NP).

Należy pamiętać, że uzyskanie wzrostu drobnoustrojów na podłożach chromogennych, traktowane jest jako podejrzenie wyhodowania szczepu VRE lub ESBL (+) i wymaga potwierdzenia. Dla każdego wyhodowanego szczepu wykonujemy identyfikację do gatunku i określamy lekowrażliwość oraz w zależności od potrzeb, testy w kierunku nabytych mechanizmów oporności (MBL, KPC, OXA-48).

III Pacjenci hospitalizowani na oddziałach chirurgicznych

Każdy pacjent przyjmowany na oddział chirurgiczny badany jest w kierunku kolonizacji szczepami MRSA. Kolonizacja może dotyczyć przedsionka nosa, gardła lub skóry pacjenta. Dlatego też łatwo może dojść do transmisji tego patogenu z pacjenta na pacjenta, personel szpitalny oraz do kontaminacji środowiska szpitalnego. Przy stwierdzeniu kolonizacji MRSA, dokonuje się eradykacji drobnoustroju lub, w niektórych przypadkach, zamiast standardowej profilaktyki okołoperacyjnej stosuje się wankomycynę, minimalizując ryzyko rozwoju zakażenia (Kavanagh i wsp. 2014).

Pacjentom pobierany jest wymaz z przedsionka nosa, który posiewamy na podłoże chromogenne chromID MRSA SMART (bioMérieux). Już po jednej dobie inkubacji, można stwierdzić, czy u danego pacjenta istnieje podejrzenie kolonizacji MRSA. Konieczne jest potwierdzenie metycylinyoporności, metodą fenotypową wykorzystującą krążek z cefoksytyną (30mg).

IV Pacjenci przygotowani do przeszczepu serca lub płuc.

W przypadku pacjentów przygotowywanych do przeszczepu serca pobierane są trzy wymazy w kierunku MRSA: z nosa, gardła oraz odbytu. Ponieważ w naszym szpitalu nie wykonuje się operacji przeszczepu płuc, rodzaj zlecanych badań przesiewowych zależy od ośrodka transplantacyjnego. Najczęściej badane są wymazy w kierunku MRSA (nos, gardło, odbyt) oraz wymazy z odbytu w kierunku VRE i/lub pałeczek Gram-ujemnych MDR.

V Pacjenci z ranami przewlekłymi.

Hospitalizacja w różnych jednostkach szpitalnych oraz wielokrotna, często długotrwała antybiotykoterapia sprzyjają kolonizacji przewlekłych ran wieloopornymi drobnoustrojami jak MRSA, *Acinetobacter baumannii* i *Pseudomonas aeruginosa* czy pałeczkami z rodziny *Enterobacteriaceae*. W przypadku pacjentów skolonizowanych takimi szczepami, należy rozważyć wdrożenie procedury izolacji kontaktowej (Hartemann-Heurtier i wsp. 2004). W naszym Szpitalu każdemu przyjętemu na oddział pacjentowi z raną przewlekłą, pobierany jest wymaz, który posiewa się na podłoże chromogenne w kierunku MRSA, VRE oraz pałeczek MDR.

VI Pacjenci hospitalizowani na Oddziałach Anestezjologii i Intensywnej Terapii (OIT)

Pacjenci przyjmowani na Oddział Intensywnej Terapii najczęściej byli już hospitalizowani na innych oddziałach naszego Szpitala lub w innych jednostkach szpitalnych. Pobyt na oddziale intensywnej terapii wiąże się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju zakażeń ze względu na cewnikowanie pęcherza moczowego, zakładanie centralnych linii naczyniowych oraz intubację. Dlatego też badania przesiewowe wykonywane są dla tych pacjentów

zarówno po przyjęciu na oddział jak i w trakcie hospitalizacji.

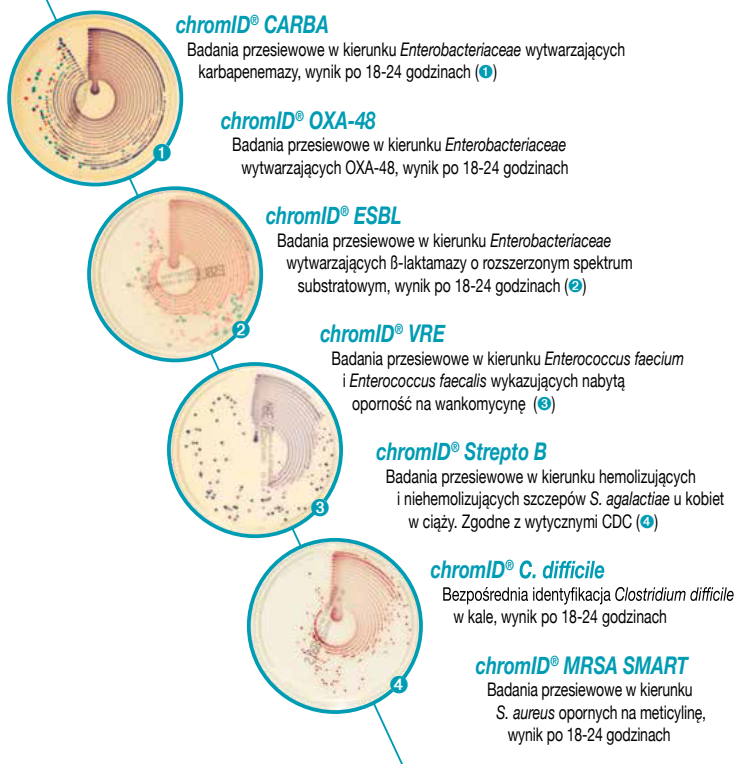
Badania przesiewowe wykonywane przy przyjęciu na OIT to:

- wymaz z przedsionka nosa w kierunku MRSA
- wymaz z odbytu w kierunku VRE oraz w kierunku wieloopornych pałeczek Gram-ujemnych,
- jeżeli pacjent był zaintubowany, badanie aspiratu tchawiczego w kierunku MRSA, VRE i pałeczek MDR.

W trakcie dalszej hospitalizacji raz w tygodniu, podobnie jak w przypadku pacjentów z oddziałów hematologicznych, od każdego z pacjentów pobierany jest wymaz z odbytu w kierunku kolonizacji VRE i pałeczkami MDR. Dodatkowo, dwa razy w tygodniu badane są aspiraty tchawicze pacjentów zaintubowanych. Dzięki temu, można nie tylko kontrolować proces kolonizacji pacjentów florą szpitalną, ale też wykorzystać uzyskane informacje przy podejmowaniu decyzji o wdrażaniu empirycznej antybiotykoterapii w przypadku rozwoju zapalenia płuc lub bakteriemii (Jung i wsp. 2009, Baba i wsp. 2011).



WYRÓŻNIAJĄCA kolekcja Badania przesiewowe i nadzór epidemiologiczny



PODSUMOWANIE

Wykonywanie badań przesiewowych niesie ze sobą wielowymiarowe korzyści:

- identyfikację patogenów alarmowych;
- ograniczenie liczby zakażeń szpitalnych poprzez izolację skolonizowanych pacjentów oraz modyfikację profilaktyki okołoperacyjnej;
- ukierunkowanie empirycznej antybiotykoterapii na podstawie uzyskanych wcześniej wyników;
- zmniejszenie kosztów związanych ze zwalczaniem zakażeń, wygaszaniem ognisk epidemicznych oraz antybiotykoterapią;
- realizację założeń programu ochrony antybiotyków.

Dzięki dostępnym narzędziom diagnostycznym,

wyniki badań przesiewowych mogą być uzyskiwane w krótkim czasie, umożliwiając szybkie podjęcie działań zapobiegających rozprzestrzenianiu się wieloopornych drobnoustrojów w środowisku szpitalnym. Aby proces ten był jak najbardziej efektywny konieczne jest opracowanie właściwych procedur oraz współpraca i komunikacja między pracownikami szpitala, która będzie prowadzić do skutecznego funkcjonowania ustalonych procedur w praktyce. Ścisła współpraca między zespołem do spraw kontroli zakażeń szpitalnych, laboratorium mikrobiologii oraz personelem lekarskim i pielęgniarskim owocuje schematami postępowania, korzystnymi dla pacjenta w perspektywie terapii i bezpieczeństwa oraz dla szpitala w sensie epidemiologicznym i ekonomicznym.

Bibliografia

1. Baba i wsp. *The role of surveillance cultures in the prediction of susceptibility patterns of Gram-negative bacilli in the intensive care unit* European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 2011, 30(6): 739-744
2. Frère i wsp. *Bacteremia after hematopoietic stem cell transplantation: incidence and predictive value of surveillance cultures* Bone Marrow Transplantation, 2004, 33: 745-749
3. Hartemann-Heurtier i wsp. *Diabetic foot ulcer and multidrug-resistant organisms: risk factors and impact.* Diabetic Medicine 2004, 21(7):710-715
4. Hryniewicz W. *Zalecenia dotyczące postępowania w przypadku zachorowań sporadycznych i ognisk epidemicznych wywołanych przez Gram ujemne pałeczki z rodziny Enterobacteriaceae. Zalecenia dotyczące postępowania w przypadku identyfikacji w podmiotach wykonujących działalność leczniczą szczepów bakteryjnych wytwarzających karbapenemy typu KPC, MBL lub OXA-48.* 2012 www.antybiotyki.edu.pl
5. Hryniewicz W., Ozorowski T., Pawlik K., Stefaniuk E. *Wskazania do wykonywania badań mikrobiologicznych u pacjentów hospitalizowanych* 2015 www.antybiotyki.edu.pl
6. Jung i wsp. *Previous endotracheal aspirate allows guiding the initial treatment of ventilator-associated pneumonia* Intensive Care Medicine 2009, 35(1):101-107
7. Kavanagh i wsp. *The use of surveillance and preventative measures for methicillin-resistant staphylococcus aureus infections in surgical patients* Antimicrobial Resistance and Infection Control 2014, 3:18
8. Reddy i wsp. *Screening for extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae among high-risk patients and rates of subsequent bacteremia* Clinical Infectious Diseases 2007, 45(7): 846-852
9. Weinstock i wsp. *Colonization, bloodstream infection, and mortality caused by vancomycin-resistant enterococcus early after allogeneic hematopoietic stem cell transplant* Biology of blood and marrow transplantation 2007, 13(5): 615-621

chromID
by bioMérieux

**PODSTAWĄ JEST
KÓLOR**

Karbapenemazy – najgroźniejszy mechanizm oporności bakterii Gram-ujemnych

dr Anna Baraniak
Zakład Mikrobiologii Molekularnej
Narodowy Instytut Leków w Warszawie

Karbapenemy

Karbapenemy to jedna z najnowszych generacji β -laktamów, wprowadzona do leczenia w połowie lat 1980, o najszerszym zakresie działania spośród wszystkich antybiotyków oraz bardzo dobrych parametrach farmakologicznych. Uznawane są one za leki „ostatniej szansy” i stosowane w leczeniu zakażeń, których sprawcą są chorobotwórcze bakterie. Charakteryzują się szerokim spektrum działania w stosunku do tlenowych i beztlenowych patogennych drobnoustrojów, zarówno Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych.

Karbapenemy są pochodną naturalnego antybiotyku, tienamycyny, wytwarzanego przez żyjący w glebie drobnoustroj – *Streptomyces cattleya*. Tienamycyna jest związkiem nietrwałym chemicznie, co nie pozwala na jej zastosowanie w lecznictwie. Poszukiwania trwałych jej pochodnych, zachowujących aktywność przeciwbakteryjną, doprowadziły do odkrycia innych związków o podobnej budowie i właściwościach: imipenemu, meropenemu, ertaprenemu i doriprenemu.

Mechanizm działania karbapenemów jest podobny do mechanizmu działania innych antybiotyków β -laktamowych i polega na zahamowaniu syntezy ściany komórkowej bakterii. Częsteczką β -laktamu łączy się z bakteryjną peptydazą – białkiem PBP (ang.: penicillin-binding protein), które jest zaangażowane w syntezę peptydoglikanu. Wysokie powinowactwo białka PBP względem antybiotyku β -laktamowego skutkuje blokadą aktywności enzymatycznej białka, co prowadzi do zaburzeń powstawania peptydoglikanu, a w konsekwencji powoduje lizę komórki bakteryjnej.

Mechanizmy oporności bakterii Gram-ujemnych na karbapenemy

Gwałtowny wzrost oporności bakterii chorobotwórczych na antybiotyki stał się najważniejszym wyzwaniem dla współczesnej medycyny terapii w ostatniej dekadzie. Oporność bakterii na β -laktamy, w tym karbapenemy, klasyfikuje się w obrębie czterech podstawowych, niezależnych od siebie strategii:

1. Wytwarzanie białek PBP o niskim powinowactwie do β -laktamów.
2. Zmniejszanie przepuszczalności osłon komórkowych bakterii.
3. Wypompowywanie leków z komórki bakteryjnej.
4. Wytwarzanie β -laktamaz – enzymów hydrolizujących cząsteczki β -laktamów.

Wytwarzanie β -laktamaz, jest najbardziej rozpowszechnionym i najgroźniejszym mechanizmem antybiotykooporności. β -laktamazy hydrolizują wiązanie amidowe w pierścieniu β -laktamowym powodując w ten sposób inaktywację leku. Enzymy zdolne do hydrolizy karbapenemów noszą nazwę karbapenemaz.

Oprócz wytwarzania karbapenemaz, także inne w/w strategie są w różnym stopniu wykorzystywane przez bakterie Gram-ujemne w celu uzyskania oporności na karbapenemy. Pierwsza z nich obserwowana jest głównie w szczepach *Acinetobacter baumannii* oraz *Proteus mirabilis*. Kolejne dwie, obniżenie przepuszczalności błony zewnętrznej i/lub wypompowywanie, są charakterystyczne dla pałeczek niefermentujących – *Pseudomonas aeruginosa* oraz *A. baumannii*. Pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* również wykorzystują mechanizmy oporności związane z białkami transportowymi. Identyfikowane są szczepy pałeczek jelitowych charakteryzujące się obniżoną wrażliwością lub wręcz opornością na karbapenemy, wynikającą ze zmian w profilach białek porynowych. Zawsze jednak takie izolaty dodatkowo wytwarzają na wysokim poziomie inne β -laktamazy, np. gatunkowo-specyficzne lub nabyte enzymy AmpC i/lub β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym, ESBL.

Karbapenemazy

Nadużywanie i często nieuzasadnione stosowanie w lecznictwie karbapenemów przyniosło negatywne skutki w postaci selekcji szczepów opornych, najpierw dzięki mechanizmom ograniczającym transport tych leków do komórki bakteryjnej, a od końca lat 1980, także wytwarzających karbapenemazy. Oba rodzaje oporności początkowo pojawiły się u niefermentujących pałeczek *P. aeruginosa*, ale później zaczęto identyfikować także szczepy *Enterobacteriaceae* wytwarzające nabyte karbapenemazy. Zaobserwowany na początku tego stulecia wzrost izolacji szczepów wytwarzających nabyte karbapenemazy w niektórych regionach świata, coraz częstsze przypadki przenoszenia wraz z pacjentami do innych krajów, wreszcie pojawianie się coraz to nowych typów tych enzymów spowodowało, że jest to obecnie jeden z najważniejszych tematów w dziedzinie epidemiologii lekooporności drobnoustrojów.

Karbapenemazy to enzymy hydrolizujące nie tylko, jakby mogło wydawać się z ich nazwy – karbapenemy,

ale także większość innych antybiotyków β -laktamowych. Są to enzymy o bardzo szerokich, zróżnicowanych spektrach substratowych, a wynika to z ich różnorodności strukturalno-ewolucyjnej, obejmującej wszystkie cztery klasy strukturalne β -laktamaz, przede wszystkim jednak klasy A, B i D.

Karbapenemazy klasy A

Najważniejszymi karbapenemazami klasy A są enzymy należące do rodziny KPC (ang.: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase). Naturalny producent tych β -laktamaz nie jest znany, natomiast, zgodnie ze swoją nazwą, najczęściej obserwuje się je w szczepach *K. pneumoniae*. Enzymy KPC zidentyfikowane zostały także u innych gatunków z rodziny *Enterobacteriaceae*, m.in.: *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, a także u *Pseudomonas spp.* i innych pałeczek niefermentujących. Enzymy KPC posiadają najszersze spektrum substratowe ze wszystkich β -laktamaz: hydrolizują wszystkie stosowane klinicznie β -laktamy, choć nie zawsze z taką samą wydajnością (najaktywniejsze są względem penicylin i cefalosporyn I generacji).

Po raz pierwszy szczepy wytwarzające β -laktamazy KPC zostały wykryte w USA i w ciągu zaledwie kilku lat rozprzestrzeniły się one w szpitalach tego kraju wywołując w nich liczne epidemie. Z pewnym opóźnieniem do podobnego zjawiska doszło w Izraelu. Lista krajów, u których stwierdzono obecność szczepów z enzymami KPC stale się powiększa, a od 2008 r. problem ten dotyczy również Polski. Wydaje się, że największe znaczenie w globalnym rozprzestrzenianiu się drobnoustrojów KPC⁺ ma element klonalny i związany jest z tzw. hiperepidemicznym klonem *K. pneumoniae*, który najpierw pojawił się w USA, potem został przeniesiony do Izraela, następnie Grecji, a wreszcie do wielu miejsc na całym niemal świecie.

Geny kodujące KPC są zlokalizowane w plazmidach różnych typów, z których szereg ma zdolność do koniugacji. Wydajność transferu tych plazmidów jest stosunkowo niewielka, niemniej wystarcza, by geny *bla*_{KPC} penetrowały coraz więcej populacji bakterii różnych gatunków. Ponadto, geny *bla*_{KPC} są zlokalizowane w obrębie transpozonu Tn4401, z grupy Tn3, co dodatkowo ułatwia ich horyzontalny transfer.

Karbapenemazy klasy B

Karbapenemazy klasy B to metalo- β -laktamazy (ang.: metallo- β -lactamases), MBL, zwane tak ze względu na wykorzystywanie jonów cynku jako kofaktorów reakcji hydrolizy pierścienia β -laktamowego. Z tego powodu są hamowane przez EDTA i inne chelatory jonów dwuwartościowych. Naturalny producent nabytych MBL nie jest znany, pomimo, że u wielu bakterii środowiskowych występują gatunkowo-specyficzne karbapenemazy, jednak żadna z nich nie mogła być prekursorem obserwowanych nabytych enzymów tej grupy. MBL są enzymami bardzo zróżnicowanymi strukturalnie i klasyfikuje się je w obrębie wielu rodzin, z czego najliczniej reprezentowane są rodziny VIM i IMP, występujące zarówno u pałeczek niefermentujących, jak i jelitowych.

MBL są najbardziej wyspecjalizowanymi i najaktywniejszymi karbapenemazami ze wszystkich klas. Spektrum substratowe, oprócz karbapenemów, obejmuje również wszystkie penicyliny i cefalosporyny. Mimo tak szerokiego zakresu działania nie rozkładają monobaktamów.

Pierwsze nabyte MBL pojawiły się na Dalekim Wschodzie. Najpierw u Gram-ujemnych pałeczek niefermentujących *P. aeruginosa*, później u bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*. Po pewnym czasie, szczepy MBL⁺ zaczęły być identyfikowane również w Europie. Także najpierw je obserwowano u pałeczek niefermentujących, po czym kilka lat później u pałeczek jelitowych. W Polsce pierwsze szczepy *K. pneumoniae* MBL⁺ zidentyfikowano w 2006 r.

W 2010 r. wielki rozgłos zyskała sprawa identyfikacji nowego rodzaju MBL – enzymu NDM-1, którego nazwa pochodzi od miejsca, w którym wykryto go po raz pierwszy (New Delhi metallo- β -lactamase). Olbrzymie poruszenie wywołało zastraszające rozprzestrzenienie się szczepów NDM⁺ w Indiach i innych krajach azjatyckich, nie tylko w szpitalach, ale także w środowisku oraz liczne przypadki ich przeniesienia do innych krajów przez skolonizowanych pacjentów lub turystów. Głównym sposobem rozprzestrzeniania się tej karbapenemazy wśród bakterii jest transfer horyzontalny, gdyż geny *bla*_{NDM} są zlokalizowane w plazmidach o wysokim potencjale koniugacyjnym. W 2011 r. pierwszy szczep *E. coli* NDM⁺ wyizolowano w Polsce u pacjenta przeniesionego ze szpitala w jednym z krajów środkowo-afrykańskich. Obecnie, w naszym kraju, jest to dominujący typ MBL identyfikowany u pałeczek *Enterobacteriaceae*, przede wszystkim występuje w szczepach *K. pneumoniae*.

Karbapenemazy klasy D

β -Laktamazy hydrolizujące karbapenemy klasy D to tzw. enzymy CHDL (ang.: carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases). Zdecydowana większość znanych wariantów enzymów CHDL wytwarzana jest przez szczepy *A. baumannii*. Należą do nich zarówno naturalne enzymy, charakterystyczne dla określonych gatunków, jak i β -laktamazy nabyte. Pierwszym opisanym nabytym enzymem tej klasy była OXA-23, zidentyfikowana właśnie u pałeczek niefermentujących *A. baumannii*. Natomiast pierwszym rodzajem nabytych CHDL obserwowanym tylko u *Enterobacteriaceae*, są enzymy typu OXA-48. β -Laktamazę tę zidentyfikowano w 2001 r. w Turcji, w *K. pneumoniae*, gdzie kilka lat później szczepy OXA-48+ wywołały liczne epidemie szpitalne. Drobnoustroje o takim fenotypie uległy także rozprzestrzenieniu w krajach basenu Morza Śródziemnego oraz Indiach, a także zostały przeniesione do Europy. W Polsce pierwszy szczep OXA-48+ został wyizolowany w 2012 r.

CHDL mają stosunkowo słabą aktywność wobec karbapenemów, a poza nimi hydrolizują jeszcze tylko penicyliny i cefalosporyny I generacji.

Głównym producentem β -laktamaz z grupy OXA-48 jest *K. pneumoniae*, ale obecność tych enzymów stwierdza się także u innych gatunków *Enterobacteriaceae*, zwłaszcza *E. coli* i *Enterobacter cloacae*. Koniugacyjny transfer plazmidów uważany jest za główny mechanizm rozprzestrzeniania się karbapenemaz OXA-48 w populacjach bakterii.

Wykrywanie karbapenemaz

Szczepy pałeczek Gram-ujemnych wytwarzające karbapenemazy nagminnie wykazują tzw. wielooporność, czyli niewrażliwość na co najmniej trzy grupy leków (ang.: multidrug-resistant, MDR) lub rozszerzoną wielooporność, czyli wrażliwość na nie więcej niż dwie grupy leków (ang.: extensively drug-resistant, XDR), a pojawiają się też wśród nich już szczepy odporne na wszystkie dostępne obecnie leki (ang.: pandrug-resistant, PDR). Znaczące ograniczenie lub całkowity brak opcji terapeutycznych wobec tak istotnych czynników zakażeń stanowi z oczywistych względów wielkie zagrożenie dla zdrowia publicznego. Zaliczone one zostały do grupy „patogenów alarmowych” i dlatego ważna jest ich niezwłoczna identyfikacja.

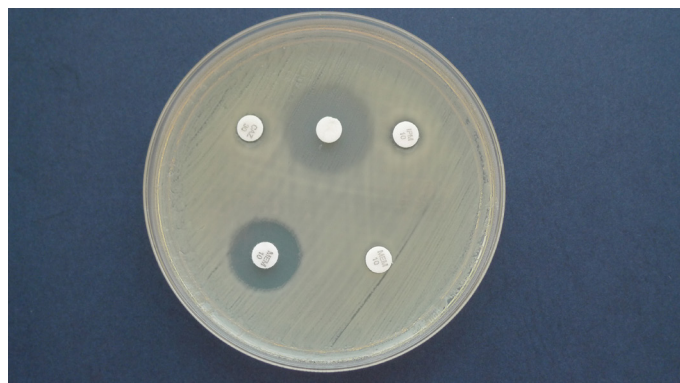
Na rynku polskim są dostępne podłoża chromogenne przeznaczone do wykrywania i wstępnej identyfikacji izolatów bakteryjnych *Enterobacteriaceae* charakteryzujących się niewrażliwością na karbapenemy. Szczepy, które wyrosną na takim podłożu mogą, ale nie muszą wytwarzać karbapenemazy. Ich wzrost na podłożu chromogennym może być spowodowany omawianą wyżej (pkt: Mechanizmy oporności bakterii Gram-ujemnych na karbapenemy) strategią oporności wynikającą ze zmian w przepuszczalności osłon komórkowych przy jednoczesnej produkcji innych β -laktamaz.

Medyczne laboratoria mikrobiologiczne są zobowiązane do identyfikacji mechanizmu MBL i KPC w szczepach pałeczek niefermentujących oraz mechanizmu MBL, KPC i OXA-48 w szczepach *Enterobacteriaceae*. Wykrywanie karbapenemaz można prowadzić różnymi metodami fenotypowymi i automatycznymi oraz testami molekularnymi. Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD) w swoich rekomendacjach wskazuje izolaty dla których należy prowadzić wykrywanie karbapenemaz oraz metody fenotypowe jakimi można je identyfikować.

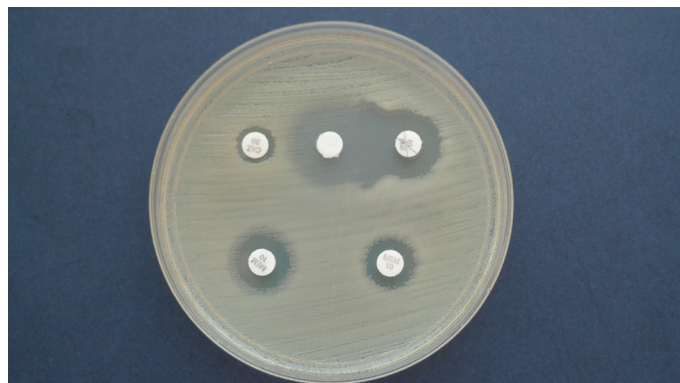
Wyniki testów fenotypowych uzyskuje się, w najbardziej sprzyjających warunkach, w ciągu doby od izolacji drobnoustroju. Ponieważ potencjał epidemiczny szczepów wytwarzających karbapenemazy jest bardzo duży, cały czas trwały poszukiwania szybkiego i łatwego w użyciu testu wykrywającego produkcję tych enzymów. Całkiem niedawno zostały opracowane dwa testy służące do szybkiej identyfikacji karbapenemaz, wykorzystujące fakt zmiany zabarwienia używanego barwnika (czerwieni fenolowej lub błękitu bromotymolowego) podczas zmiany pH środowiska reakcji, w czasie hydrolizy imipenemu przez karbapenemazę. Zaletą tych testów jest fakt, że odpowiedź na pytanie, czy dany izolat wytwarza karbapenemazę, otrzymujemy w ciągu kilku godzin od izolacji drobnoustroju. Takie szybkie uzyskanie wyniku pozytywnego testu umożliwia natychmiastowe wdrożenie szeregu procedur mających na celu zapobieżenie rozprzestrzenienia się tego niezwykle groźnego mechanizmu oporności.

Szczepy wykazujące dodatnie (oraz budzące wątpliwości) wyniki testów w kierunku wytwarzania karbapenemaz powinny zostać przesłane do KORLD w celu po-

twierdzenia rodzaju mechanizmu oporności metodami biologii molekularnej. Za metodę referencyjną identyfikacji karbapenemaz uważa się spektrofotometryczne oznaczenie hydrolizy imipenemu w ekstrakcie białkowym ze szczepu lub wykrycie genu kodującego karbapenemazę za pomocą specyficznej reakcji PCR.



Zdjęcie 1 - Testy fenotypowe wykrywające karbapenemazę MBL (na górze) oraz KPC (na dole). Interpretacja: szczep podejrzany o wytwarzanie KPC.



Zdjęcie 2 - Testy fenotypowe wykrywające karbapenemazę MBL (na górze) oraz KPC (na dole). Interpretacja: szczep podejrzany o wytwarzanie MBL.



Zdjęcie 3 - Szybki test wykrywający produkcję karbapenemazy przez szczep. Probówka 1 - kontrola; probówka 2 - właściwa reakcja. Obserwujemy zmianę zabarwienia używanego barwnika (czerwieni fenolowej) podczas zmiany pH środowiska reakcji, w czasie hydrolizy imipenemu przez karbapenemazę.

Mikrobiologiczna diagnostyka legionelozy

dr Natalia Rokosz-Chudziak
Zakład Bakteriologii
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego
Państwowy Zakład Higieny w Warszawie

Legioneloza

Legioneloza jest zakaźną chorobą wywołaną przez Gram-ujemne pałeczki z rodziny *Legionellaceae*, występujące w różnorodnych naturalnych i sztucznych zbiornikach wodnych. W środowisku naturalnym drobnoustroje te bytują i namnażają się wewnątrz komórek ameb, natomiast w organizmie człowieka w makrofagach pęcherzyków płucnych, rzadziej w innych makrofagach tkankowych, monocytach i leukocytach. Wykazano, że bakterie te mogą bytować w instalacjach wodnych budynków użytkowych, takich jak szpitale czy baseny. Obecność tych drobnoustrojów stwierdzono również w inhalatorach, biczach wodnych, klimatyzatorach, prysznicach, nawilżaczach, wieżach chłodniczych, turbinach dentystycznych czy też w fontannach. Z tego powodu, niezmiernie istotne jest prowadzenie działań mających na celu ograniczenie występowania i namnażania się pałeczek *Legionella* w systemach wodnych poprzez kontrolę czynników sprzyjających rozwojowi tych bakterii oraz cykliczne wykonywanie procesów oczyszczania i dezynfekcji instalacji wodnych.

Do zakażenia pałeczkami *Legionella* ludzi dochodzi poprzez wdychanie skażonego aerozolu wodno-powietrznego. Nie stwierdzono jednak przenoszenia się zakażenia tymi pałeczkami między ludźmi.

Legioneloza może przebiegać w trzech postaciach: choroby legionistów, tak zwanej gorączki Pontiac oraz postaci pozapłucnej. Chorobę legionistów po raz pierwszy opisano w 1977 roku w wyniku analizowania przebiegu epidemii zachorowań z wysoką śmiertelnością, która wystąpiła wśród uczestników Konwencji Legionów Amerykańskich w Filadelfii w 1976r. Czynnikiem etiologicznym choroby legionistów są najczęściej pałeczki należące do gatunku *Legionella pneumophila* serogrupy 1, znacznie rzadziej bakterie *Legionella pneumophila* zaliczane

do serogrupy 2-15 oraz inne gatunki takie jak *L. micdadei* czy *L. longbeache*. Procentowy udział w zakażeniach poszczególnych gatunków lub odmian serologicznych jest różny w zależności od regionu geograficznego. Choroba legionistów może przebiegać w postaci ostrego zapalenia płuc (3–8% wszystkich zachorowań na pozaszpitalne zapalenie płuc), a czas jej inkubacji szacuje się na 2–10 dni (najczęściej 5–6 dni, rzadko 20 dni). Do najczęściej opisywanych klinicznych objawów w przebiegu legionelozy należy zaliczyć: osłabienie, suchy kaszel, wysoką gorączkę (ciepłota ciała powyżej 39°C), bóle głowy, bóle mięśni, zaburzenia w oddychaniu. Potwierdzenie zachorowania opiera się wyłącznie na wynikach badań bakteriologicznych. Śmiertelność w przypadkach legionelozowego zapalenia płuc wynosi od 13% do 20%, a w przypadkach zakażenia pałeczkami *Legionella* nabytego w szpitalu może sięgać do 50%.

Gorączka Pontiac to łagodna postać legionelozy, wywołana przez pałeczki *Legionella pneumophila* grupy serologicznej 1 lub grup 2-14 oraz przez inne gatunki *Legionella*: *L. micdadei*, *L. anisa*, *L. feelei*. Nazwa choroby związana jest z wybuchem w lipcu 1968 roku w miejscowości Pontiac (USA, stan Michigan), epidemii choroby o objawach przypominających grypę, ale o nieustalonej wówczas etiologii. Dopiero w 1976 roku stwierdzono, że czynnikiem etiologicznym tej choroby są pałeczki *Legionella*. Do objawów gorączki Pontiac należą grypopodobne stany gorączkowe, z towarzyszącymi bólami głowy, mięśni i stawów oraz kaszlem, który występuje u około połowy chorych. Może również wystąpić ból gardła, mdłości, biegunka lub wymioty. Objawy utrzymują się 2–6 dni, po czym następuje samowyleczenie. W przypadku gorączki Pontiac nie wykazano obecności bakterii *Legionella* w płynach ustrojowych i w tkankach, natomiast o trwałym zakażeniu może świadczyć tylko podwyższony poziom swoistych przeciwciał.



bioNexia™
First Line Biology® tests
for Laboratories

Postać pozapłucna legionelozy występuje najczęściej u osób chorych z immunosupresją i po przeszczepieniu narządów. U pacjentów tych występuje zazwyczaj zespół septyczny, zaburzenia krążenia, krzepnięcia i zapalenie nerek.

Epidemiologia

Zachorowania wywołane przez pałeczki *Legionella* odnotowano już w większości krajów świata, głównie uprzemysłowionych. W Stanach Zjednoczonych 8000–18000 osób corocznie hospitalizuje się z powodu choroby legionistów, zaś na całym świecie, według szacunków Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, World Health Organization) 15 000–250 000 osób. W Stanach Zjednoczonych i w Europie częstą przyczyną legionelozy jest *L. pneumophila* serogrupy 1, która odpowiada za około 80% wszystkich potwierdzonych przypadków legionelozy, serogrupy 2–16 odpowiadają za 20–30% zachorowań. Zachorowania wywołane przez *L. pneumophila* sg 1 występują częściej w Anglii, Szkocji, Walii i w krajach basenu Morza Śródziemnego (Włochy, Francja, Hiszpania) niż w krajach skandynawskich. Z kolei w Australii i Nowej Zelandii najczęściej od chorych izolowane są pałeczki *L. longbeachae*. Drugie miejsce pod względem częstości wywoływanych zachorowań zajmuje *L. micdadei*, a *L. bozemanae* i *L. dumoffii* odpowiednio trzecie i czwarte miejsce. Gatunek *L. pneumophila* jest najczęściej izolowany, zarówno od chorych na legionelozę nabytą w środowisku, jak i od chorych zakażonych w czasie pobytu w szpitalu. Pozostałe gatunki, takie jak *L. micdadei*, *L. bozemanae*, *L. dumoffii*, *L. longbeachae* wywołują chorobę głównie w środowisku szpitalnym u pacjentów z obniżoną odpornością.

Według oficjalnych danych zamieszczanych w biuletynie „Choroby Zakaźne i Zatrucia w Polsce”, opracowywanym co roku przez Zakład Epidemiologii NIZP-PZH wraz z Głównym Inspektoratem Sanitarnym w Warszawie, pierwsze 3 rozpoznane przypadki legionelozy odnotowano w Polsce w 2003 roku. W kolejnych dwóch latach liczba zakażeń pałeczkami *Legionella* sp. wzrosła do 21. W latach 2006 – 2014 liczba zgłaszanych przypadków legionelozy ulegała znacznym wahaniom. I tak, przykładowo w 2006 roku odnotowano aż 89 przypadków (zapadalność na 100 tys. mieszkańców wynosiła 0,233) a w roku 2014 (wstępne dane) tylko 12 przypadków (zapadalność na poziomie 0,031). Z danych epidemiologicznych przedstawionych w raporcie w 2013 roku przez Europejskie Centrum do Spraw Zapobiegania i Kontroli Chorób (ECDC) wynika, że w niektórych krajach sąsiadujących z Polską liczba przypadków była znacznie wyższa i wynosiła: w Niemczech - 805 przypadków, w Czechach - 67, natomiast na Słowacji odnotowano tylko 6 przypadków. Na podstawie danych epidemiologicznych zebranych przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) wyodrębniono kilka czynników predysponujących do rozwoju choroby legionistów. Należą do nich: wiek powyżej 50 lat, palenie tytoniu, alkoholizm oraz płeć. Legionelozowe zapalenie płuc trzy razy częściej dotyczy mężczyzn niż

kobiet. Szacuje się, że w grupie pacjentów hospitalizowanych, u których rozpoznano legionelozę i zastosowano prawidłowe leczenie śmiertelność wynosi 13–20%.

Zgodnie z ustawą o chorobach zakaźnych i zakażeniach (DzU. nr 126 poz. 1384.) w Polsce od 2001 roku legionelozę podlega rejestracji w Głównym Inspektoracie Sanitarnym. Przeprowadzone dochodzenie epidemiologiczne ma na celu ustalić źródło zakażenia i skutecznie je zlikwidować. Na potrzeby nadzoru epidemiologicznego przyjęto, że zakażenie pałeczkami *Legionella* potwierdza się, gdy jest spełniony co najmniej jeden z poniższych kryteriów:

- izolacja *Legionella* ssp. z wydzieliny drzewa oskrzelowego lub z dowolnego miejsca, które w warunkach prawidłowych jest jałowe,
- wykrycie antygeny *Legionella pneumophila* w moczu,
- wykazanie znamiennego wzrostu miana swoistych przeciwciał przeciw *Legionella pneumophila* grupy serologicznej 1 w badaniu dwóch próbek surowicy.

Dla przypadku prawdopodobnego spełnione powinno być co najmniej jedno z poniższych kryteriów:

- wykrycie antygeny *Legionella pneumophila* w wydzielinie drzewa oskrzelowego lub w tkance płucnej np. metodą immunofluorescencji bezpośredniej (DFA) z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych,
- wykrycie kwasu nukleinowego *Legionella* ssp. w wydzielinie drzewa oskrzelowego, tkance płucnej lub w dowolnym miejscu, które w warunkach prawidłowych jest jałowe,
- wykazanie znamiennego wzrostu miana swoistych przeciwciał przeciw *Legionella pneumophila* nienależących do grupy serologicznej 1, lub przeciw innym gatunkom *Legionella* ssp. w badaniu dwóch próbek surowicy,
- dla *Legionella pneumophila* grupy serologicznej 1 lub innych grup serologicznych, lub innych gatunków *Legionella*: wysokie miano przeciwciał w surowicy, w pojedynczym oznaczeniu.

W przypadku Gorączki Pontiac dla potwierdzenia przypadku klinicznego wystarczy uzyskanie dodatniego wyniku oznaczania obecności antygeny *L. pneumophila* w moczu lub wykazanie znamiennego wzrostu miana swoistych przeciwciał przeciw *Legionella pneumophila* grupy serologicznej 1 w badaniu dwóch próbek surowicy.

Diagnostyka mikrobiologiczna

Do mikrobiologicznych metod diagnozowania zakażenia pałeczkami *Legionella pneumophila* zalicza się: izolację i hodowlę drobnoustroju z próbek materiału klinicznego, wykrycie kwasu nukleinowego pałeczek *Legionella* przy użyciu metod molekularnych, wykrycie obecności antygeny tych bakterii w moczu, wykazanie znamiennego diagnostycznie poziomu swoistych przeciwciał oraz stwierdzenie obecności antygeny *Legionella* testem im-

munofluorescencji bezpośredniej (DFA) (Tabela 1). Każda z wyżej wymienionych metod ma jednak swoje ograniczenia i charakteryzuje się odmienną swoistością i czułością.

Izolacja i hodowla

Podstawą laboratoryjnego kryterium rozpoznania legionelozy jest wyizolowanie drobnoustroju z próbek materiału klinicznego i jego identyfikacja. W przypadku zakażeń wywoływanych przez pałeczki *Legionella* materiałem do badań bakteriologicznych jest plwocina, popłuczyny z drzewa oskrzelowego (BAL), płyn z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BALF), aspirat z biopsji przetchawiczej, fragment tkanki płucnej po biopsji lub z materiału sekcyjnego, punktat czy ropa. Mimo że pobranie tkanki płucnej, płynu opłucnowego lub BALF u niektórych chorych może stwarzać problemy, ze względów diagnostycznych jest to najlepszy materiał kliniczny do poszukiwania obecności żywych pałeczek *Legionella* sp. Plwocinę powinno się pobierać rano, przed spożyciem posiłku lub płynów, po dokładnym wyptukaniu jamy ustnej jałowym roztworem soli fizjologicznej. Pacjent musi wykrztusić jak najwięcej wydzieliny z oskrzeli do jałowego pojemniczka. Czynność tę może powtarzać. Trzeba mieć również na uwadze, że pacjenci z legionelozą charakteryzują się skąpym wydzielaniem plwociny. Z kolei próbkę BALF pobiera się przez ostrożne wkłino- wanie końca bronchoskopu w światło drogi oddechowej i podanie dużej objętości jałowej soli fizjologicznej (około 200 ml) o temperaturze 37°C. Roztwór należy podawać w równych porcjach po 50 ml. Po podaniu każdej części materiał należy odessać i umieścić w jałowym pojemniku.

Próbki materiału klinicznego należy pobrać jałowo, a następnie transportować w odpowiednich sterylnych pojemnikach. Jeżeli czas między pobraniem a posianiem będzie dłuższy niż 30 minut, próbkę należy przechować w lodówce, w przypadku ponad 24 godzin trzeba zamrozić ją w temperaturze -70°C.

Plwocina od pacjentów z podejrzeniem legionelozy powinna być wysiewana niezależnie od jej jakości, ponieważ, jak udowodniono, nawet z próbek zawierających ponad 10 komórek nabłonkowych i mniej niż 25 leukocytów w polu widzenia, często udaje się uzyskać wzrost tego drobnoustroju. Przed posiewem plwocinę należy potraktować związkiem mukolitycznym.

Hodowlę pałeczek *Legionella* sp. prowadzi się w temperaturze 36 +/-1°C w atmosferze o zwiększonej zawartości CO₂ i wilgotności powyżej 50% przez 10–14 dni. Dodatni wynik najczęściej można stwierdzić po 5 dniach hodowli. Podejrzone są kolonie wyrastające dopiero po 3 dniach po posiewie. Do izolacji stosuje się głównie podłoże agarowe BCYE -α (buffered charcoal yeast extract agar) z ekstraktem drożdżowym, pirofosforanem żelaza, chlorowodorkiem L-cysteiny, alfa-ketoglutaralem oraz węglem aktywowanym, który neutralizuje nadmiar wodoru wytwarzany podczas metabolizmu bakterii. Aby zapobiec wzrostowi konkurencyjnych, szybciej rosnących bakterii do podłoża hodowlanego BCYE-α

dodawane są antybiotyki. Podłożem takim jest podłoże GVPC, będące podłożem BCYE-α z dodatkiem antybiotyków: glicyną, wankomycyną, polimiksyną B, cykloheksamidem lub podłoże BMPA zawierające antybiotyki, takie jak: anizomycyna, cefamandol, polimiksyna B. Podłoże GVPC stosować można przede wszystkim do hodowli pałeczek *Legionella pneumophila*, ale także *L. bozemanii*, *L. longbeachae*, *L. dumoffii*, *L. jordanis*, *L. gormanii*, *L. anisa* i *L. micdadei*. Istotny jest również fakt, iż w warunkach laboratoryjnych bakterie te rosną w wąskim przedziale pH wynoszącym 6,2–7,2. Charakterystyczne kolonie *Legionella* są szaro-niebieskie, ale wraz z wiekiem mogą stawać się białe. Mają one regularne różowawe krawędzie, a w binokularowym mikroskopie są szkliste u podstawy. Podłoże GVPC dzięki obecności antybiotyków hamuje wzrost bakterii Gram-dodatnich, niektórych Gram-ujemnych, drożdżaków i pleśni.

Na czułość metod hodowlanych w rozpoznawaniu legionelozy mają wpływ odpowiednie pobranie i transport próbek materiału klinicznego oraz użycie odpowiednich podłoży hodowlanych. Czułość hodowli wynosi średnio 60%. Zakres czułości tej metody to 5–99% i zależy on od typu opracowanego materiału klinicznego. Dla plwociny zakres czułości szacuje się między 5%–70%, dla BAL: 30%–90%. Przyjmuje się, że swoistość hodowli, jako metody będącej „złotym standardem” wynosi 100%.

Wstępna identyfikacja pałeczek *Legionella* sp. polega m in. na wykonaniu preparatu barwionego metodą Grama. W wykonanym preparacie widoczne są cienkie, polimorficzne, niewytwarzające spor pałeczki Gram-ujemne. Ze względu na trudność w wybarwieniu kolonii równolegle stosuje się tzw. metodę pół-Grama, tj. barwienie bez odbarwiania alkoholem.

Badania molekularne

W rutynowo prowadzonej diagnostyce zakażeń wywoływanych przez pałeczki *Legionella* sp. wykazały swoją przydatność takie badania molekularne jak technika PCR (reakcja łańcuchowej polimerazy) czy Real-Time PCR (PCR w czasie rzeczywistym). Komercyjne zestawy PCR oraz Real-Time PCR umożliwiają wykrycie przede wszystkim sekwencji dla genu 16S rRNA (rDNA) lub dla genu mip (macrophage infectivity potentiator), kodującego w komórkach *L. pneumophila* białko o m.c. 24 kDa. Techniki te charakteryzują się znacznie wyższą czułością i swoistością w porównaniu z tradycyjnymi metodami serologicznymi i dają możliwość identyfikacji DNA pałeczek *Legionella pneumophila* zaliczanych do serogrup 1–15. Swoistość tych metod wynosi około 99% a czułość 33–92%. Materiałem klinicznym użytym w badaniach molekularnych może być: BAL, tkanka płucna, inne wydzieliny dróg oddechowych, surowica, mocz. W przypadku użycia niektórych komercyjnych zestawów Real-Time PCR, w których stosuje się startery dla genu mip *Legionella pneumophila* istnieje możliwość wystąpienia reakcji krzyżowych z *L. bozemanii*, *L. hackeliae*, *L. longbeachae*, *L. micdadei*.

Wykorzystanie metod molekularnych w diagnostyce

legionelozy w Polsce nie jest jeszcze powszechne. Wydaje się jednak, że w przyszłości badania te będą coraz częściej stosowane w praktyce klinicznej w naszym kraju, podobnie jak ma to już miejsce w takich krajach jak: Czechy, Niemcy, Austria, Francja, Dania, Szwecja czy Wielka Brytania.

Oznaczanie poziomu antygeny pałeczek Legionella w próbkach moczu

Wykrywanie antygeny Legionella w moczu dotyczy przede wszystkim pałeczek Legionella pneumophila serotypu 1, które odpowiadają za około 80% zakażeń. Obecność antygeny, którego głównym składnikiem jest prawdopodobnie lipopolisacharyd (LPS), oznacza się w próbce moczu pobranego wstępnie do jałowego, szczelnie zamkniętego pojemnika. Ponieważ jest to antygen ciepłostajny pobraną próbkę moczu można zagotować w temperaturze 100°C przez 5-10 minut w celu ewentualnego uniknięcia namnożenia się bakterii towarzyszących zakażeniu pałeczkami Legionella. Próbkę moczu powinna być pobierana do standardowego pojemnika. Może być przechowywana w temperaturze 15-25°C do 24 godzin od pobrania. W temperaturze 2-8°C może być przechowywana do 14 dni, a w temperaturze od -10°C do -20°C dłużej niż 14 dni. Próbkę moczu może być transportowana w szczelnym pojemniku w temp. 2-8°C lub zamrożona.

Przyjmuje się, że około 80-90% chorych z objawami zapalenia płuc już od pierwszego dnia wystąpienia objawów klinicznych wydalą w moczu antygen L. pneumophila. Wiadomo również, że obecność antygeny w próbkach moczu z reguły można stwierdzić w ciągu pierwszych 2-3 tygodni trwania choroby.

Obecnie do poszukiwania obecności antygeny pałeczek Legionella pneumophila serogrupy 1 w próbkach moczu dostępne są komercyjne zestawy immunoenzymatyczne ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) oraz szybkie testy oparte na technice immunochromatografii. W ostatnim czasie na rynku pojawił się również komercyjny szybki test immunochromatograficzny służący do wykrywania antygeny pałeczek L. pneumophila serogrupy 3, będących czynnikiem etiologicznym legionelozy na terenie Europy. Swoistość testów ELISA wynosi 80%-99%, natomiast czułość ich wzrasta wraz z ciężkością schorzenia i waha się w przedziale 65%-90%. Czas oczekiwania na uzyskanie wyniku wynosi około 4 godzin.

Zaletą szybkich testów immunochromatograficznych jest łatwość wykonania badania i krótki czas oczekiwania na wynik wynoszący kilkanaście minut (średnio 15 minut). Z tego powodu testy te zaleca się do rutynowej diagnostyki legionelozy wykonywanej u osób trafiających do szpitala z ciężkim zapaleniem płuc. Jest to metoda diagnostyczna z wyboru w ciągu pierwszych 2-3 tygodni trwania choroby. Wadą tych testów jest ich niższa czułość w porównaniu z testami immunoenzymatycznymi (ELISA) oraz brak wykrywania zakażeń wywołanych przez pałeczki Legionella zaliczanych do innych serogrup.

Mimo wad większość europejskich laboratoriów mikrobiologicznych używa szybkich testów do potwierdzenia zakażenia pałeczkami Legionella pneumophila. W Europie w 2013 roku metodą tą potwierdzono aż 78,2% tj. 5162 z 6601 odnotowanych przypadków legionelozy.

Oznaczanie poziomu swoistych przeciwciał dla pałeczek Legionella

Metody serologiczne diagnozowania legionelozy, polegające na oznaczaniu odczynem immunoenzymatycznym ELISA w próbce surowicy poziomu swoistych przeciwciał dla Legionella sp. mają głównie zastosowanie w przypadku dłużej trwających infekcji. Dostępne na rynku komercyjne zestawy ELISA umożliwiają oznaczenie poziomu immunoglobulin klasy A, G lub M dla lipopolisacharydowych antygenów (LPS) pałeczek Legionella pneumophila serogrup 1-7 (serogrupa 1 – Philadelphia, serogrupa 2 – Togus, serogrupa 3 – Bloomington, serogrupa 4 – Los Angeles, serogrupa 5 – Dallas 1E, serogrupa 6 – Chicago2, serogrupa 7 – Chicago8). Wykazano, że czułość odczynu ELISA mieści się w zakresie 70%-90% i limitowana jest przez czas, który jest niezbędny na rozwinięcie odpowiedzi humoralnej chorego do poziomu wykrywalnego tą metodą, jak również przez zdolność organizmu pacjenta do indukcji odpowiedzi immunologicznej. Swoistość odczynu ELISA wynosić może 50-99%. Jednym z głównych ograniczeń tej metody jest możliwość występowania reakcji krzyżowych w przypadku zakażeń bakteryjnych wywołanych przez Pseudomonas spp., Haemophilus sp., Bacteroides spp. oraz pałeczki Campylobacter.

Z danych literaturowych wynika, że tylko 25% - 40% pacjentów wykazywało serokonwersję (czterokrotny wzrost poziomu przeciwciał) po 1 tygodniu od powstania objawów chorobowych, a około 10% pacjentów wykazuje wzrost poziomu przeciwciał dopiero po 6-9 tygodniach, licząc od dnia wystąpienia objawów choroby. Przeciwciała zanikają zazwyczaj po 2-3 miesiącach, jednak niekiedy można je wykryć w próbce surowicy nawet po upływie 12-18 miesięcy. Zarówno u osób dorosłych, jak i u dzieci wykazanie znamiennego poziomu przeciwciał IgM bądź wykazanie czterokrotnego wzrostu miana przeciwciał IgG pozwalają na ustalenie rozpoznania tej etiologii zakażenia. Identyfikacja wzrostu stężenia IgG wymaga powtórzenia badania w odstępie 7-14 dni. Z tego względu badania te nie wpływają na decyzje terapeutyczne i mają raczej znaczenie epidemiologiczne.

W diagnostyce legionelozy stosuje się również test immunofluorescencji pośredniej (IFA, indirect fluorescent antibody). Test ten został opracowany po epidemii choroby legionistów w 1976 roku przez McDade i wsp. Służy on do wykrywania swoistych przeciwciał przede wszystkim dla pałeczek Legionella pneumophila serogrupy 1 w surowicy chorego. Opracowano również zestawy do identyfikacji wybranych innych serogrup L. pneumophila i innych gatunków Legionella. Obecnie na rynku dostępne są komercyjne testy wykrywające immunoglobuliny klas A, G i M lub zestawy do wykrywania

tylko przeciwciał klasy IgG lub tylko IgM. O zakażeniu pałeczkami *Legionella sp.* świadczy znamienny przyrost miana przeciwciał w dwóch próbkach surowicy uzyskanych w różnych okresach choroby. Wadą tego odczynu jest możliwość wystąpienia reakcji krzyżowych z antygenem *Legionella pneumophila* serogrupy 1 a przeciwciałami dla *P. aeruginosa*, *Campylobacter sp.*, *Rickettsia sp.*, *Coxiella burnetii*, *Bacteroides sp.*, *Haemophilus sp.* oraz *Citrobacter freundii*.

Oznaczanie antygeny pałeczek *Legionella sp.* metodą bezpośredniej immunofluorescencji (DFA)

Obecność antygeny pałeczek *Legionella sp.* można również stwierdzić w tkankach ludzkich przy użyciu metody bezpośredniej immunofluorescencji (DFA, direct fluorescent antibody). Odczyn ten stosowany jest do poszukiwania tylko antygeny pałeczek *L. pneumophila* głównie w wydzielinach dróg oddechowych, tkance płuc, płynie opłucnowym. Tkanki można utrzymywać formaliną. Przyjmuje się, że czułość tej metody wynosi 25–90%. Z kolei swoistość wynosi powyżej 95% i zależy od szeregu czynników m.in. od typu badanego materiału klinicznego, zastosowania dodatkowych technik w opracowaniu próbki materiału np. zagęszczania oraz od doświadczenia personelu wykonującego badanie. Zaletą tej metody jest możliwość

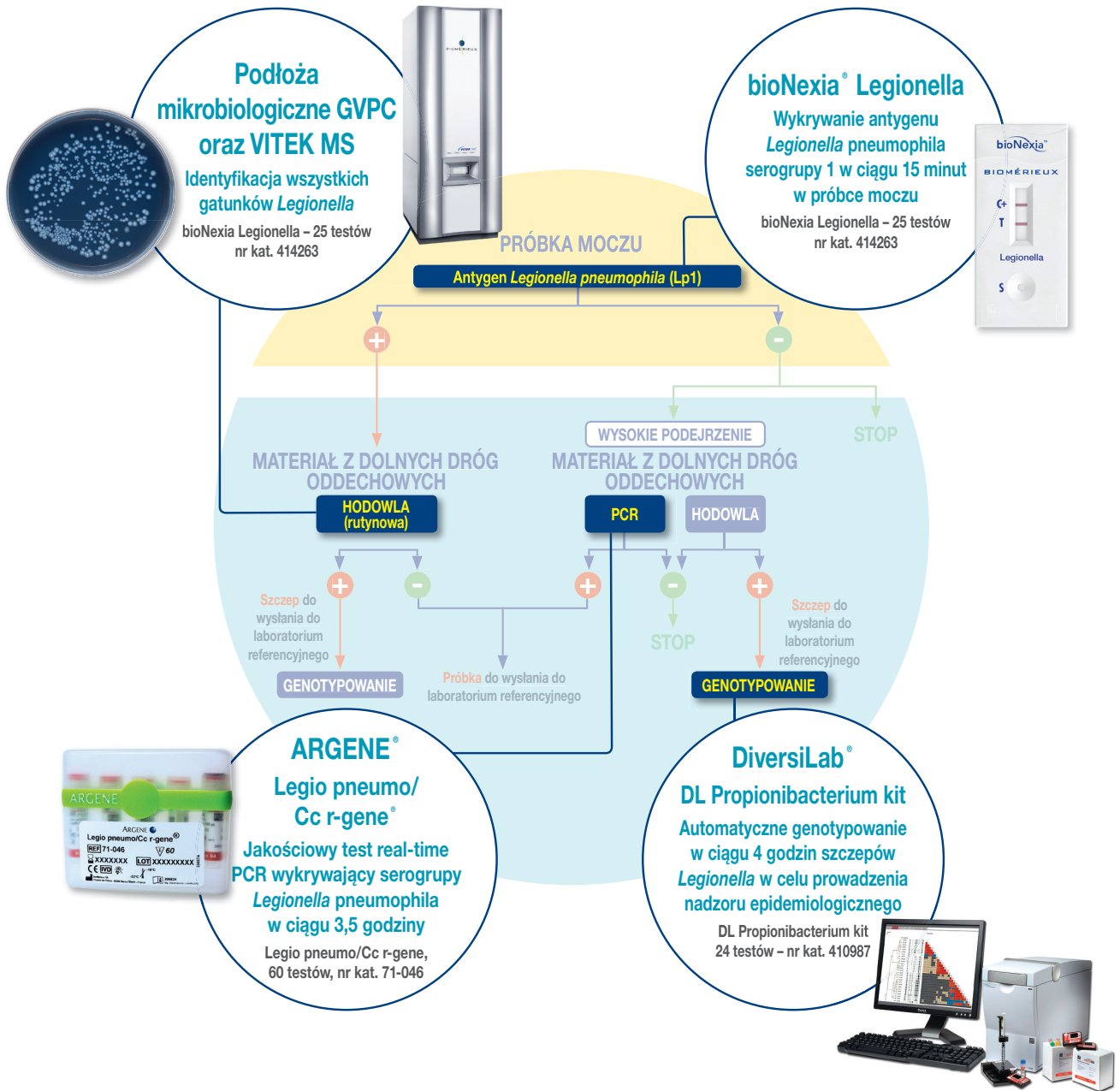
określenia przynależności wykrytych pałeczek *Legionella sp.* do odpowiednich serogrup, natomiast wadą jest możliwość wystąpienia nieswoistych reakcji krzyżowych z innymi antygenami bakteryjnymi. Ze względu na możliwość uzyskania w tym odczynie dużej liczby wyników fałszywie dodatnich, uważa się, że dodatni wynik badania nie stanowi podstawy do rozpoznania legionelozy i powinien być potwierdzony inną metodą.

PODSUMOWANIE

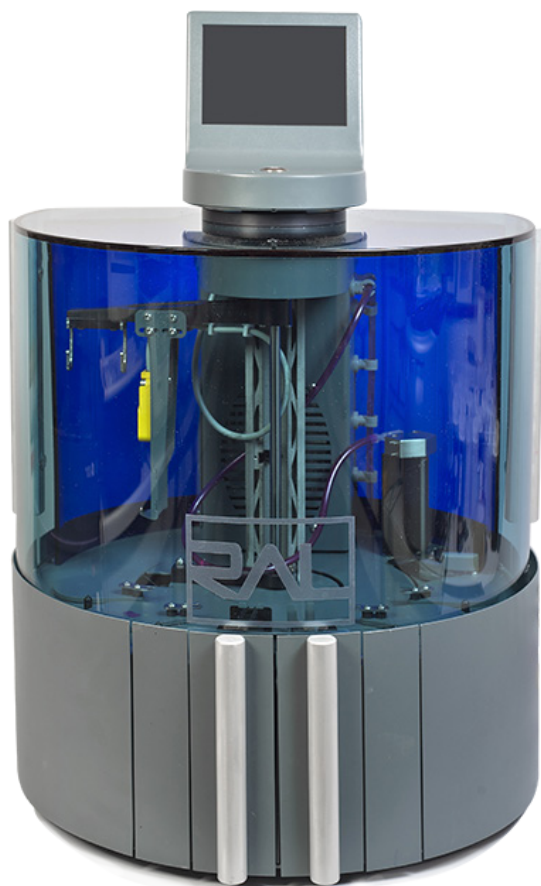
W mikrobiologicznej diagnostyce zakażeń pałeczkami *Legionella sp.* wykorzystuje się metody izolacji bakterii z próbek materiału klinicznego, techniki molekularne, jak i metody serologiczne. Badania te wykonuje się w Polsce jedynie w nielicznych laboratoriach. Niewielka liczba chorych badanych w kierunku legionelozy oraz ograniczona różnorodność materiałów klinicznych i niska liczba próbek pobieranych od jednego pacjenta, kierowanych do badania są przyczyną niskiej wykrywalności przypadków legionelozy w Polsce. Wydaje się, więc konieczne zwiększenie dostępności badań mikrobiologicznych w kierunku wykrywania zakażeń pałeczkami *Legionella sp.* u ludzi, jak również badanie w kierunku legionelozy większej liczby chorych z zapaleniem płuc.

METODA/ KIERUNEK BA- DANIA	MATERIAŁ	OKRES CHOROBY	CZAS OTRZYMANIA WYNIKU	CZUŁOŚĆ (%)	SWOISTOŚĆ (%)	WIARYGODNOŚĆ ROZPOZNANIA
Izolacja i hodowla	Plwocina, BAL, BALF, aspirat z biopsji przełtchawiczej, fragment tkanki płucnej po biopsji lub z materiału sekcyjnego, punktat, ropa, krew	Od początku zachorowania	Od 6 do 10 dni	plwocina: 5-7%, BAL: 30-90%, fragment tkanki płucnej po biopsji: 90-99%, krew: 10-30%	100%	Potwierdzenie
PCR	Plwocina, BAL, mocz, surowica	Od początku zachorowania, nawet pomimo leczenia	Okolo 2 godzin	plwocina, BAL: 85-92%; mocz, surowi- ca: 33-70%	plwocina, BAL: 94-99%; mocz, surowica: 98%	Orientacyjne
Oznaczanie antygeny metodą ELISA	Mocz		Okolo 3 -4 godzin		ELISA: 80-99%	Potwierdzone
Oznaczanie antygeny szybkim testem immu- nochromatogra- ficznym	Mocz		Okolo 15 -20 minut	ELISA: 65-90% Szybkie testy: ok. 85%		Potwierdzone
Oznaczanie po- ziomu przeciwciał metodą ELISA (klasy IgA, IgG, IgM)	Surowica	Od 5 dnia. Materiał powtórnie pobrać i oznaczyć 14 dni później	Okolo 4-6 godzin	Wykazanie serokonwersji (badanie dwóch próbek surowicy): 70-90%; zbadanie pojedynczej próbki surowicy: brak danych	Wykazanie sero- konwersji: 95-99%; zbadanie poje- dynczej próbki surowicy: 50-70%	Wynik oznaczenia dla jednej próbki – przypadek prawdopodobny Wykazanie serokonwer- sji – przypadek potwierdzony

Kompletne rozwiązanie do diagnostyki zakażeń Legionella



RAL STAINER – automatyczny aparat do barwienia prątków



Mikrobiologiczne rozpoznanie gruźlicy u chorego polega na stwierdzeniu obecności prątków w materiale diagnostycznym. We wszystkich laboratoriach prętka na świetle, a więc również i w Polsce, pierwszym etapem diagnostyki gruźlicy jest badanie mikroskopowe. Jest to metoda tania i prosta w wykonaniu, umożliwiającą szybką identyfikację chorego prątkującego. Wykrycie prątków w preparacie wykonanym z materiału klinicznego ma ogromne znaczenie przede wszystkim z epidemiologicznego punktu widzenia, ponieważ identyfikuje chorego obficie prątkującego – dla wykazania obecności prątków w preparacie bezpośrednim potrzeba co najmniej 10^4 – 10^5 komórek bakterii w 1 ml badanego materiału. Dodatni wynik bakterioskopii umożliwia szybkie potwierdzenie diagnozy i wczesne podjęcie prawidłowego leczenia.

RAL STAINER jest zautomatyzowanym, łatwym w obsłudze i przyjaznym w użytkowaniu aparatem do barwienia materiałów od chorych z podejrzeniem gruźlicy w celu wykrycia prątków. „Barwienie w kąpeli” w aparacie jest procesem wystandaryzowanym, a stosowane odczynniki w formie gotowej do użycia sporządzone są z wysokiej jakości składników.

dr Magdalena Klatt

prof. dr hab. Ewa Augustynowicz-Kopeć
Zakład Mikrobiologii Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc
w Warszawie

Proces barwienia trwa około 30 minut i obejmuje:

- chemiczne utrwalenie preparatów,
- barwienie,
- płukanie i suszenie.

Aparat ma dwie niezależne szuflady, w których jednorazowo można umieścić od 1 do 10 preparatów do barwienia. Cykl barwienia nie wymaga nadzoru ze strony personelu laboratorium, a po zakończeniu procesu barwienia preparaty mogą być od razu oceniane przez diagnostę.

Aparat RAL Stainer oferuje użytkownikowi 10 protokołów barwienia. Każdy z tych protokołów laboratorium może zmodyfikować i dostosować do własnych, indywidualnych potrzeb. Dostęp do programów barwienia i uprawnień użytkowników chronione są hasłami.

Barwienie preparatów w aparacie RAL Stainer jest bezpieczne, ponieważ personel laboratorium nie jest narażony na bezpośredni kontakt z toksycznymi barwnikami, a opary odczynników są neutralizowane przez filtr z węglem aktywowanym.

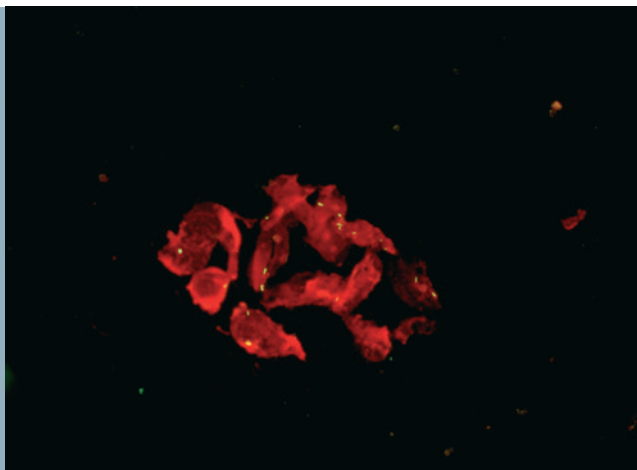
Czujniki aparatu zapewniają prawidłowość wykonania każdego cyklu barwienia optymalizując głębokość zanurzenia szkiełek w roztworach barwiących. System ten sygnalizuje również zbyt małą objętość płynów do płukania oraz konieczność opróżnienia pojemnika na odpady.

Do barwienia prątków dostępne są dwa zestawy barwników: RAL STAINER FLUO-RAL oraz RAL STAINER COLD ZN.

Zestaw RAL STAINER FLUO-RAL daje możliwość fluorescencyjnego barwienia auraminą 300 preparatów, okres ważności tego zestawu do barwienia wynosi 7 dni od dnia otwarcia. Cały proces barwienia – czas zanurzenia szkiełek w każdym z roztworów, liczba cykli barwienia, a więc i zabarwionych preparatów, termin ważności odczynników oraz czas od rozpoczęcia ich użytkowania – jest automatycznie monitorowany przez aparat na podstawie odczytu etykiety z chipem RFID umieszczonej na opakowaniu pierwszego z odczynników.

Stosowanie jednego, wybranego przez użytkownika protokołu barwienia pozwala na uzyskiwanie powtarzalnych wyników oraz wyeliminowanie błędów proceduralnych, które mogą pojawiać się podczas barwienia manualnego – różny czas trwania poszczególnych etapów barwienia, który w konsekwencji powoduje różną jakość rozmazu. Rozmazy barwione w aparacie RAL STAINER są dobrze wybarwione, czytelne i łatwe

w interpretacji (świecące żółto-zielone prątki na czerwonym tle) (Zdjęcie 1).



Zdjęcie 1 Rozmaz barwiony auraminą

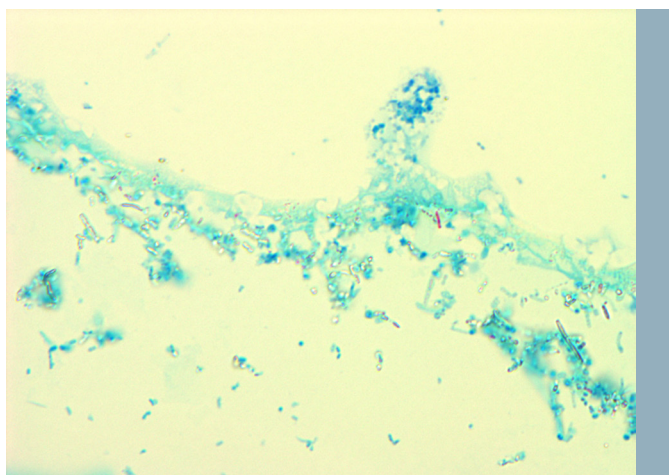
Barwienie auraminą jest jednak niewystarczające do wydania dodatniego wyniku bakterioskopii; każdy preparat, w którym stwierdzono prątki w barwieniu fluorescencyjnym wymaga potwierdzenia ich obecności w preparacie barwionym fuksyną metodą Ziehl-Neelsena.

To barwienie umożliwia nam drugi zestaw barwników RAL STAINER COLD ZN, za pomocą którego możemy zbarwić około 500 szkiełek. Okres ważności tego zestawu od momentu rozpoczęcia użytkowania wynosi 14 dni.

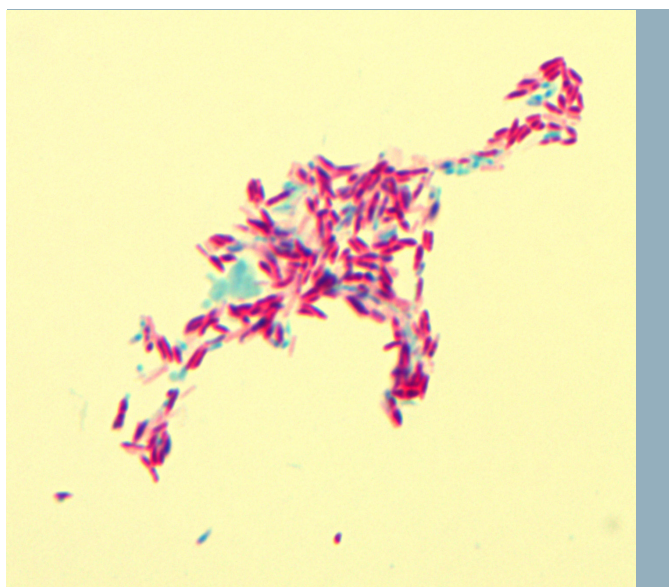
Proponowany przez bioMérieux protokół barwienia RAL STAINER COLD ZN wymaga Naszym zdaniem niewielkich modyfikacji, to znaczy skrócenia czasu barwienia błękitem metylenowym do maksimum 30 sekund, co powoduje, że preparaty są jaśniejsze i łatwiej ocenić morfologię prątków na tle innych bakterii w materiale od chorego.

Do barwienia metodą Ziehl-Neelsena w aparacie RAL STAINER producent zaleca stosowanie dwóch różnych zestawów odczynników; jednego do barwienia preparatów bezpośrednich z materiałów od chorych (Zdjęcie 2) i drugiego do barwienia preparatów wykonanych z hodowli (Zdjęcie 3). Ten podział jest istotny ze względu na zdolność prątków do tworzenia biofilmów, a jego stosowanie w codziennej diagnostyce minimalizuje prawdopodobieństwo pojawienia się wyników fałszywie dodatnich. Taka sytuacja miała miejsce w Zakładzie Mikrobiologii IGiChP podczas testowania aparatu. Do barwienia preparatów zarówno z materiałów od chorych jak i hodowli początkowo stosowany był jeden zestaw odczynników. Po kilku dniach pracy we wszystkich barwionych preparatach pojawiły się prątki, pochodzące ze stosowanych odczynników. Wykonanie zalecanego przez producenta czyszczenia obiegu hydraulicznego aparatu roztworami odkażającymi zawierającymi aktywny chlor oraz zastosowanie dwóch zestawów barwników (jeden do barwienia rozmazów z materiałów od chorych, drugi do barwienia preparatów z hodowli) rozwiązało problem. W związku z możliwością kontaminacji rozmazów prątkami z odczynników należy pamiętać o codziennym barwieniu preparatów kontrolnych (dodatnich i ujemnych) i w przypadku zaobserwowania w ujemnych

rozmazach bakterii barwiących się fuksyną wykonać zalecane przez producenta czyszczenie obiegu hydraulicznego aparatu w celu zapobieżenia namnażania się mikroorganizmów. Procedura ta jest prosta i szybka, nie wymaga specjalnych przygotowań.



Zdjęcie 2 Rozmaz z płwociny barwiony metodą Ziehl-Neelsena na zimno



Zdjęcie 3 Rozmaz z hodowli barwiony metodą Ziehl-Neelsena na zimno

Aparat RAL STAINER jest urządzeniem, które znajdzie zastosowanie w laboratoriach prętka zatrudniających odpowiednio wykwalifikowany, przeszkolony i doświadczony personel. Prostota obsługi, uzyskiwanie powtarzalnych wyników barwienia, wyeliminowanie styczności pracowników z toksycznymi odczynnikami stanowią niewątpliwie zalety aparatu. Stosowany w laboratorium prętka pozwala na uproszczenie codziennych, rutynowych czynności diagnostycznych, usprawniając pracę i zwiększając jej komfort. Aparat RAL STAINER zwiększa czułość rozmazu i szanse stwierdzenia obecności prątków w preparatach dzięki dobrze, w wystandaryzowany sposób, zabarwionemu rozmazom.

BKV – mało znany wirus niebezpieczny u pacjentów z obniżoną odpornością

mgr Anna Sadowska
Pracownia Diagnostyki Laboratoryjnej
Kliniki Medycyny Transplantacyjnej i Nefrologii

1. Wstęp

Infekcje polyomawirusami znane były już w latach 50tych XX wieku i już wtedy łączono je z możliwością powstawania guzów u myszy z osłabioną odpornością. Uważano wówczas, że odpowiedzialny jest nieznan czynnik, który ulega przenoszeniu między osobnikami (z gr. poly- wiele oma-guz, nowotwór). Pierwszy polyomawirus u naczelnych został zidentyfikowany w 1960r. i wykryto go w komórkach nerki afrykańskiej małpy zielonej, był on wykorzystywany do produkcji ludzkich szczepionek skierowanych przeciwko polio i adenowirusom. Wirus został nazwany małpim wirusem 40 (simian virus 40 – SV 40).



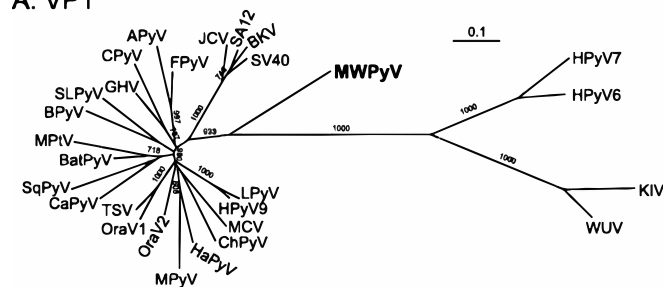
Małpi wirus SV40 podobnie do mysiego (MPyV) uważany był za onkogenny u gryzoni. We wczesnych latach 60tych odkryto, że wirus ten może także indukować nowotwory u ludzi (pojawiło się podejrzenie możliwości zainfekowania ok. 100 milionów osób zaszczepionych zanieczyszczonymi SV40 szczepionkami). Następnie poliowirusy odkrywano u innych kręgowców (ptaki, gryznie, bydło, ludzie).

Poliowirusy mają wiele cech wspólnych z papilomawirusami (dawniej były traktowane łącznie), m.in. potencjał onkogenny. Obecnie klasyfikowane są jako osobny rodzaj Polyomavirus (rodzina Polyomaviridae) a nie jako Papowavirusy. Za drogi transmisji PyVs uważa się drogę oddechową, fekalno-oralną, krew oraz przeszczepiane narządy. Pierwsze poznane ludzkie polyomawirusy to wirusy BK oraz JC. Ich nazwy pochodzą od inicjałów pacjentów od których zostały po raz pierwszy wyizolowane w 1971r. Od 2007 roku odkryto 8 nowych ludzkich polyomawirusów (HPyVs). Trzeci i czwarty KI i WU nazwano odpowiednio od nazw ośrodków badawczych,

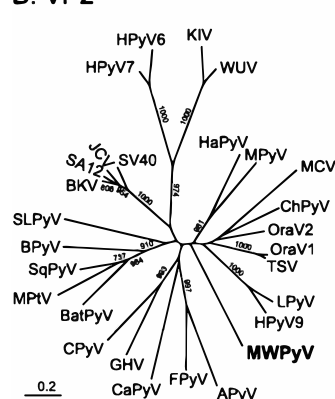
w których je odkryto (Karolinska Institute oraz Washington University). Piąty, MC poliowirus (MCPyV) swoją nazwę zawdzięcza jego wykryciu w komórkach raka neuroendokrynnego skóry (rak z komórek Merkla, Merkel cell carcinoma), podobnie ósmy z kolei wirus TS (TSPyV) po raz pierwszy zidentyfikowano u pacjentów z rzadką chorobą skóry (Trichodysplasia spinulosa). Szósty i siódmy (HPyV6 oraz HPyV7) zostały zidentyfikowane w skórze a dziewiąty - HPyV9 w skórze oraz w surowicy. Ich nazwy pochodzą od kolejności odkrywania. Dziesiąty, jak na razie ostatni, czyli HPyV10 to MWPyV znaleziony w kale i skórze. Jego nazwa związana jest z regionem geograficznym, w którym został zlokalizowany po raz pierwszy (Malawi).

Ogólna budowa poliowirusów obejmuje 3 regiony: region wczesny kodujący antygeny jądrowe, późny białka kapsydu oraz niekodujący region kontrolny mający wpływ na ekspresję genów regionu wczesnego i późnego. Poliowirusy wykazują wysoki stopień homologii pod względem budowy morfologicznej oraz organizacji strukturalnej (na poziomie nukleotydów oraz aminokwasów 50-80%). Homologia jest zdecydowanie wyższa w obrębie genów regionu wczesnego. Analiza filogenetyczna ludzkich i innych poliowirusów schematycznie została przedstawiona poniżej.

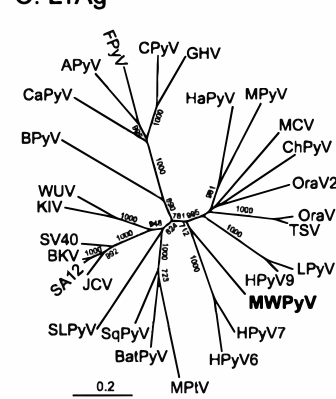
A. VP1



B. VP2



C. LTAg



Infekcje tymi wirusami są szeroko rozpowszechnione w populacji ogólnej, zwykle przebiegają bezobjawowo bardzo rzadko dając objawy kliniczne. Do kontaktu z wirusem najczęściej dochodzi we wczesnym dzieciństwie. PyVs powodują zakażenia latentne, do reaktywacji wirusa może dojść na skutek niedoborów odporności, do których może prowadzić na przykład stosowanie leczenia immunosupresyjnego u pacjentów po transplantacjach. W przypadku manifestacji klinicznej związane z nimi patologie mają różne objawy. Jest to efekt zróżnicowanej odpowiedzi organizmu gospodarza na replikację (mimo tego, aby doszło do infekcji oraz ewentualnej transformacji nowotworowej muszą zaistnieć ściśle określone okoliczności: obecność lub brak specyficznych receptorów na powierzchni komórki gospodarza, obecność lub brak czynników obecnych wewnątrz komórki, które koordynują ekspresję genów wirusowych oraz umożliwiając ukończenie cyklu życiowego wirusa). Dla przykładu wyróżnia się:

- Efekt cytotatyczny – utrata zakażonych komórek w przebiegu masywnej replikacji ale bez cech zapalenia. Tak się dzieje w przebiegu postępującej wieloogniskowej encefalopatii (PML) na skutek niekontrolowanej replikacji wirusa JC w mózgu (utrata oligodendrocytów) pacjentów z zaawansowanym HIV-AIDS.
- Zespół rekonstrukcji immunologicznej (IRIS) – „ciemna strona układu immunologicznego”, patologia charakteryzuje się uogólnioną odpowiedzią zapalną (odpowiedź komórkowa) na obecność antygenów wirusowych. Przykładem są tu: związane z BKV krwotoczne zapalenie pęcherza (HC) u pacjentów po transplantacjach komórek krwiotwórczych, paradoksalnie z gorszym przebiegiem PML u pacjentów z HIV-AIDS po włączeniu leczenia antyretrowirusowego a także objawy występujące po usunięciu natalizumabu (plazmafereza) u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym.
- Efekt cytotatyczny –zapalny charakteryzuje wysoki stopień replikacji oraz silna odpowiedź zapalna na skutek lizy komórek, nekrozy wraz z infiltracją granulocytów i limfocytów. Taki typ patologii obserwuje się w przebiegu nefropatii związanej z wirusem BK (PyVAN) stadium B, u pacjentów po alloprzeszczepach nerek.
- Autoimmunizację związaną z PyV a szczególnie obecność toczenia rumieniowatego układowego (SLE) uważa się jako patologiczną odpowiedź na własne antygeny, która została wywołana antygenami wirusa. Dla przykładu LTag po wbudowaniu do DNA i nukleosomów może indukować powstawanie przeciwciał anty DNA i histonom oraz innych przeciwiądrowych.
- Onkogeneza związana z PyV – aktywacja ekspresji genów regionu wczesnego w komórkach gospodarza bez dostatecznej ekspresji genów regionu późnego. W efekcie dochodzi do gwałtownej lizy komórek (MCPyV – obecność mutacji w obrębie LTag i/lub VP1 i integracji wirusa z chromosomami powoduje

zaburzenie replikacji genomu wirusa oraz ekspresji genów regionu późnego. Oddzielenie ekspresji LTag od ekspresji kapsydu może skutkować nagromadzeniem wirionów, w konsekwencji lizą komórek). Dotyczy rzadkich przypadków związanych z BKV raków urotelialnych. Wykazano na modelach nowotworów związanych z MCV oraz SV40, że immunologiczne rozpoznanie specyficznych LTag epitopów może mieć działanie ochronne co sugeruje, że defekt immunologiczny może pełnić istotną rolę w onkogenezie związanej z PyV u ludzi.

Rozumiejąc i mając na uwadze powyższe, bardzo zróżnicowane mechanizmy, można w pewnym sensie przewidzieć pojawienie się konkretnej patologii, dlatego narastająca bądź wysoka wiremia powinny być szczególnie brane pod uwagę przy przewidywaniu rozwoju schorzeń mających ścisły związek z jej wysokim poziomem (np. PyVAN, PML czy HC). Z drugiej strony należy sobie zdawać sprawę, że w przypadku innych patologii t.j. wystąpienie powikłań autoimmunizacyjnych czy onkogenezy nie zależy od stopnia replikacji PyV. Mając na uwadze powyższe informacje zawsze jednak należy pamiętać, że wszelkie oznaczenia DNA czy białek poliomawirusów należy rozważać w kontekście aspektów klinicznych, gdyż zróżnicowanie objawów oraz możliwości odpowiedzi organizmu ludzkiego są tak wielkie, że inne postępowanie może prowadzić do fałszywych wniosków, szczególnie jeżeli pacjenci poddawani są immunosupresji czy chemioterapii.

Istnieje konieczność dalszych badań dotyczących roli poliomawirusów, szczególnie tych ciągle nowoodkrywanych, w patogenezie chorób oraz onkogenezie.

2. Wirus BK

BK należy do Polyomawirusów (rodzina Polyomaviridae), zawiera kapsyd ikozaedralny bez osłonki lipidowej, kolisty dwuniciowy DNA. Jest to wirus mały (42-45nm), DNA zawiera około 5000 par zasad. Genom wirusa koduje 6 białek. Replikacja zachodzi w jądrze zakażonej komórki. Funkcjonalnie genom wirusa BK, podobnie jak innych Polyomawirusów składa się z trzech głównych komponentów:

1. Region wczesny kodujący tzw. duży antygen T oraz mały antygen t (LT –large tumor, st – small tumor). Antygeny te kumulowane są w jądrze komórkowym, stymulują wzrost komórek, mają znaczenie podczas replikacji. Białka regionu wczesnego związane są z „unieśmiertelnieniem” oraz transformacją komórkową (umożliwiają replikację i transformację wirusową znosząc kontrolę cyklu komórkowego). Duży antygen T wiąże się do białek, supresorów nowotworowych Rb i p53 chroniąc komórkę przed śmiercią. Ma zdolność regulacji cyklu komórkowego poprzez bezpośredni wpływ na komórkowe czynniki transkrypcyjne tj. c-Jun czy c-Fos (białka regionu wczesnego mediują transformację nowotworową stąd nazwa – tumor).

2. Region późny, w którym kodowane są białka kapsydowe VP1-3 (białka strukturalne) i agnoproteina (białko niestrukturalne), niezbędne do wnikania wirusa i jego gromadzenia. Uważa się, że agnoproteina może być odpowiedzialna za udział w uwalnianiu kompletnych wirionów z zakażonej komórki.

3. Niekodujący region kontrolny (NCCR) o wysokim stopniu zróżnicowania genetycznego. Geny tego regionu mogą mieć wpływ na stopień wirulencji, replikacji oraz transkrypcji. Ponadto region ten zawiera geny mogące mieć wpływ na regulację ekspresji genów regionu wczesnego i późnego.

BKV wiąże się do komórki gospodarza za pomocą receptora glikoproteinowego. Następuje endocytoza, cząstki wirusa poprzez struktury wewnątrzplazmatycznej siateczki transportowane są do jądra komórkowego. Przed wniknięciem DNA do jądra komórkowego usuwane są białka kapsydu. Następuje proces transkrypcji, powstają nowe wiriony.

Cykl replikacyjny wirusa trwa 36-44 godzin. U osób z obniżoną odpornością wirus może namnażać się poza jądrem i przyczyniać się do śmierci komórki. Szczepy wirusa BK genetycznie sklasyfikowane są w oparciu o polimorfizm regionu VP1 (genotyp I-VI) oraz strukturę NCCR.

Należy pamiętać, że wiele wirusów ma działanie immunomodulujące co jest szczególnie istotne u pacjentów z zaburzeniami odporności np. po transplantacjach przyjmujących wiele kombinacji leków, nie tylko immunosupresyjnych. Mają one wpływ na odpowiedź immunologiczną, która u poszczególnych pacjentów może przebiegać inaczej.

Wirus BK został wykryty w 1971r. Nazwa pochodzi od inicjałów pacjenta, od którego po raz pierwszy został wyizolowany (z moczu pacjenta po alloprzeszczepieniu nerki (alloKTx), u którego doszło do zwężenia moczowodu). Infekcje wirusem BK są powszechne, zwykle przebiegają bezobjawowo lub dając niecharakterystyczne objawy (zakażenia górnych dróg oddechowych, stany podgorączkowe, przemijające zapalenie pęcherza). Uważa się, że do większości zakażeń dochodzi w okresie dzieciństwa (szczyt zapadalności na zakażenie BK przypada u dzieci między 2 a 5 rokiem życia). Szacuje się, że nawet 90% dorosłej populacji posiada przeciwciała świadczące o przebyciu infekcji BKV. Wirusy przedostają się do tkanek powodując zakażenie przetrwałe. BKV pozostaje w stanie latencji przede wszystkim w komórkach dróg moczowych oraz komórkach nabłonkowych cewek nerkowych a także w leukocytach krwi obwodowej oraz prawdopodobnie w tkance mózgowej. Wirus Polyoma BK u osób z prawidłową odpornością nie powoduje patologii (latentne zakażenie komórek nabłonka dróg moczowych). Cechy aktywnej replikacji mogą być obecne u osób z obniżoną odpornością, np. u kobiet w ciąży czy osób w podeszłym wieku. Częstość występowania wiriurii u osób zdrowych wynosi 4-18%, wzrasta w drugim i trzecim trymestrze ciąży oraz u osób starszych, a także u cukrzyków. Wydaje się jednak, że u osób immunokompetentnych, wyłączając pierwotną infekcję, wirus nie ma

znaczenia klinicznego nawet jeżeli dochodzi do okresowej replikacji. Zakażenie o znaczeniu klinicznym ma miejsce u pacjentów ze znacznie obniżoną odpornością, głównie u osób po transplantacji nerki. Patologie wywołane przez wirus BK mogą być wynikiem reaktywacji zakażenia latentnego lub nadkażenia szczepem wirusa pochodzącym od dawcy. U pacjentów po transplantacji nerki zakażenie latentne może ulec reaktywacji w procesie leczenia immunosupresyjnego. U 3-10% biorców nerki może powodować jej cewkowo śródmiąższowe zapalenie (nefropatię związaną z zakażeniem wirusem polyoma (PyVAN), nefropatię BK), które może prowadzić do niewydolności przeszczepu. U pacjentów po transplantacji komórek krwiotwórczych może powodować krwotoczne zapalenie pęcherza moczowego (HC). Są to dwie obecnie najczęstsze jednostki chorobowe związane z zakażeniem wirusem BK. Pierwsza jest szczególnie niebezpieczna u pacjentów po przeszczepieniu nerki a kolejna dotyczy głównie pacjentów po allotransplantacjach komórek macierzystych (HSCT).

W związku z powyższym można wysunąć wniosek, że wirus BK jest niebezpieczny przede wszystkim u pacjentów po transplantacjach a ze względu na specyfikę zakażenia oraz niecharakterystyczne objawy i brak odpowiedniego leczenia szczególnie zagraża pacjentom po przeszczepieniu nerki.

3. Znaczenie Kliniczne

Krwotoczne zapalenie pęcherza moczowego (Hemorrhagic Cystitis)

Związane z BKV krwotoczne zapalenie pęcherza u pacjentów po allotransplantacjach komórek krwiotwórczych (HSCT) jest przyczyną wielu poważnych powikłań mogących prowadzić nawet do śmierci pacjenta. Reaktywacja następuje prawdopodobnie na skutek względnego lub całkowitego niedoboru odporności na skutek aplazji a także podczas terapii immunosupresyjnej poprzedzającej HSCT, której celem jest zapobiegnięcie odrzuceniu przeszczepu i/lub profilaktyce choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD). U pacjentów po HSCT rozwój BKV-HC zależy od wielu czynników t.j.: przeszczep allogeniczny vs autologiczny, kondycjonowanie mieloablacyjne, dawcy niespokrewnieni, transplantacja krwi pępowinowej, status serologiczny przed transplantacją. Wpływ mają ponadto m.in. wiek biorcy, niezgodność w zakresie antygenów HLA (HLA mismatch jako kofaktor BK wiriurii), oraz GvHD. Jako, że drogi moczowe są głównym miejscem latencji wirusa, uważane są jako pierwsze miejsce reaktywacji BKV. Przyjmuje się, że przemijająca wiriuria ma miejsce u wszystkich pacjentów po alloHSCT, a około 4-25% pacjentów rozwinię przetrwałe HC. Około połowa pacjentów po alloHSCT posiada BKV w moczu (wiriuria) w momencie transplantacji lub do 100 dni po dokonaniu przeszczepu. U 5-40% tych pacjentów rozwinię aktywne HC (Stopień I i II – współistnienie mikro i makrohaturii, stopień III i IV obejmuje kolejno występowanie skrzepów oraz ciężkich krwotoków z pęcherza wraz z uszkodzeniem nerek). Sugeruje się, że proces BKV-HC postępuje w sposób chronologiczny.

Ostatnia, najcięższa faza koresponduje z odnową hematopoezy. Jest to uwarunkowane rozwojem odpowiedzi immunologicznej w przebiegu reaktywacji BKV (konceptcja zespołu rekonstrukcji immunologicznej – IRIS), co należy brać pod uwagę podczas diagnozowania i/lub wprowadzania odpowiedniej terapii, tym bardziej, że **nadal nie ma optymalnego leczenia przeciwwirusowego**. Pozostaje leczenie wspomagające tj: przepłukiwanie pęcherza, przetaczanie krwi, łagodzenie objawów, acykliczne analogi nukleozydów (Cidofovir) oraz alternatywne (tlenoterapia hiperbaryczna, Leflunomid, antybiotyki fluorochinolowe). Obiecujące wydaje się być leczenie z zastosowaniem Cidofoviru, nad którym badania nadal trwają.

Wlewy immunoglobulin – sugeruje się, że ludzkie IVIG posiadają przeciwciała neutralizujące, ale prawdopodobnie ich skuteczność zależy od ich miana, a także powinowactwa do kanalików nerkowych, w których zachodzi replikacja. Uważa się jednak, że humoralna odpowiedź na zakażenie może być nieadekwatna i kładzie się nacisk na rolę odpowiedzi komórkowej BK specyficznej. W ciężkich przypadkach HC może być wymagana interwencja urologiczna (kauteryzacja, embolizacja a nawet cystektomia). Reasumując BKV-HC jest trudnym do leczenia powikłaniem allo HSCT przyczyniającym się do przedłużenia hospitalizacji, wzrostu liczby powikłań skutkujących dalszymi komplikacjami co jest niezwykle istotne ze względów medyczno-ekonomicznych. Niektórzy autorzy sugerują, że poziomy DNA BKV we krwi mogą korelować ze stopniem ciężkości choroby uważając oznaczenie DNA BKV jako jej marker - wirurgia > 104 kopii/ml a znaczący wzrost ryzyka rozwoju BKV-HC i nefropatii związanej z wirusem BK (z przeżywalnością 1 roczną na poziomie 50%). Z kolei maksymalna wartość wirurii BK >3-6 jednostek w skali logarymicznej kopii/ml koreluje z występowaniem HC, nie koreluje natomiast z jego ciężkością. Ostatnio podkreśla się wpływ wirurii BK jako markera prognostycznego nefropatii związanej z BKV u dzieci po HSCT. Monitorowanie wirurii raz na tydzień szczególnie w pierwszych 100 dniach po transplantacji jest ostatnio zalecane w celu „wyłapania” rozwijającej się infekcji i zapobiegnięciu komplikacjom na wczesnych jej etapach.

Nefropatia BK (BKVAN, BKVN, PyVN) – Śródmiąższowe zapalenie nerki przeszczepionej (BKV – associated nephropathy, BKV – nephropaty, Polyomavirus – associated nephropathy)

Poważne powikłanie u biorców nerek prowadzące do utraty organu nawet do 80% wszystkich przypadków. Podstawowy mechanizm patogenetyczny nie jest do końca zdefiniowany. Podejrzewa się, że kluczowym elementem jest zaburzenie równowagi między replikacją wirusa, a kontrolą układu odpornościowego gospodarza. Mimo wielu prób zastosowań różnych leków (lefludomid, cidofovir, IVIG, glikokortykosteroidy) w różnych kombinacjach **nadal obiecującą metodą leczenia pozostaje redukcja immunosupresji**, umożliwiająca rekonstrukcję odpowiedzi immunologicznej biorcy w celu zwalczania infekcji.

Ceną za to natomiast jest wzrost ryzyka odrzucenia przeszczepu.

Choroba ma charakter przewlekły, postępujący i skąpoobjawowy. Jedynym objawem klinicznym BKVN jest pogorszenie czynności graftu bez uchwytnej przyczyny.

Nefropatii BK nie można rozpoznać na podstawie rutynowego badania histopatologicznego, którego obraz przypomina ostre odrzucanie (mylne rozpoznanie i intensyfikacja leczenia immunosupresyjnego w takich przypadkach prowadzić może bowiem paradoksalnie nie do poprawy czynności przeszczepu, a do powrotu do leczenia dializami). W tym miejscu należy podkreślić jak ważne jest w przypadku pacjentów po transplantacji nerki odróżnienie przewlekłej nefropatii przeszczepu od opornego na leczenie ostrego odrzucania. Zwłaszcza, że u większości chorych z nefropatią BK rozpoznawane jest także ostre odrzucanie, wskutek czego należy równowagę balansować między leczeniem ostrego odrzucania, które uznaje się za priorytetowe, a leczeniem przeciwwirusowym za pomocą redukcji immunosupresji.

Jeszcze niedawno pacjenci z BKVN mieli bardzo złe rokowanie, obecnie wczesne wykrycie choroby daje szanse wyzdrowienia. Choroba występuje zazwyczaj pod koniec pierwszego roku po zabiegu transplantacji (pierwsze 1,5-50 miesięcy). Przyjmuje się, że zakażenie początkowo jest ograniczone do nabłonka cewek, gdzie powstają „decoy cells”, które następnie złączają się do światła kanalików a następnie do dalszych dróg moczowych. Początkowo zakażenie ma charakter ogniskowy, następnie cząsteczki wirusa przedostają się do krwi obwodowej (przez kapilary okołocewkowe) i obserwowana jest wirurgia. Wirus jest cytopatyczny dla komórek cewek i prowadzi do charakterystycznego ich uszkodzenia. Infekcja BKV może się przyczyniać do powstawania kompleksów immunologicznych odkładających się wzdłuż patologicznie odsłoniętej błony podstawnej cewek co może prowadzić do autoimmunizacji w odpowiedzi na antygeny cewkowe.

Sporadycznie BKVN można zaobserwować u biorców innych narządów (w nerkach własnych pacjentów po przeszczepie płuc i serca). Uważa się, że częstsze występowanie BKVN u biorców nerek może się wiązać z większą podatnością, częstością, obserwowaną wyższą wirurią co jest związane z głębokimi zaburzeniami odporności i co może sugerować nadrzędną rolę immunosupresji w rozwoju nefropatii BK (występuje tylko u pacjentów stosujących immunosupresję).

Potencjalne czynniki ryzyka replikacji BKV:

Biorca – terapia immunosupresyjna (szczególnie takrolimus i MMF), epizody ostrego odrzucania, niezgodność HLA, niezgodność w ABO, seronegatywny biorca/pozytywny dawca, stenty moczowodowe, zaburzona specyficzna odpowiedź T komórkowa, podeszły wiek, płęć męska, rasa biała, azjatycka, infekcje CMV, reaktywacja we wczesnym okresie po transplantacji BKV przeniesionego z przeszczepionym narządem, opóźniona czynność przeszczepu, steroidoterapia, diabetes mellitus.

Dawca – Uszkodzenie mechaniczne lub niedokrwienne zaburzenie reperfuzji, dawca zmarły, brak antygenu HLA C7, seropozytywność (wysokie miano przeciwciał), wiek >60-65, płeć żeńska, rasa/pochodzenie Afroamerykańskie

Wirus - Pseudogatunki mogą mieć wpływ na wirulencję BKV, mutacje regionu NCCR, mutacje VP-1

Na podstawie danych pochodzących z piśmiennictwa stwierdza się wzrost liczby przypadków BKVN. Pojawiają się hipotezy sugerujące, że wzrost częstości występowania BKVN u biorców przeszczepów może być związany z wpływem efektywnej kontroli wirusa na interakcje układu odpornościowego dawca-biorca poprzez obniżenie powinowactwa wiązania i rozpoznawania zainfekowanych komórek uroepitelialnych dawcy prezentujących antygen komórkom CD8+ biorcy. Ta hipoteza tłumaczy wzrost zapadalności na BKVN u biorców niezgodnych pod względem antygenów HLA z antygenami dawcy.

Uważa się, że ok. 30-40% biorców nerki rozwija wirurię, 10-20% wiramię a tylko 3-10%BKVN (ale jak na wstępie wspomniano do 80% przypadków może się skończyć utratą przeszczepu). Różnorodność doniesień może być związana z brakiem ogólnie obowiązującego konsensusu, a co za tym idzie z różnorodnością strategii skringowej, czynników ryzyka, protokołów immunosupresji itd. Sugeruje się, że wynik wirerii na poziomie co najmniej 10000 kopii/ml (4 log kopii/ml) może być czynnikiem ryzyka BKVN. Ważne jest, żeby ustalić punkt odcięcia, poniżej którego zdecydowanie łatwiej będzie opanować infekcję. Uważa się, że wysoki ładunek wirusa utrudnia jego usuwanie ponieważ dołącza się zaburzenie odporności (terapia antywirusowa może zredukować ładunek wirusa, ale jego zwalczenie wymaga ciągłej kontroli immunologicznej).

Z powodu braku dobrze zdefiniowanych czynników ryzyka rozwoju BKVN monitorowanie wirerii BKV staje się możliwością wczesnego wykrycia i wyprzedzenia BKVN. PyAN stadium A-C na wczesnym etapie może być bezobjawowa, a nawet jeśli wystąpią objawy są one niespecyficzne. Dlatego wczesna diagnostyka jest konieczna bowiem stadium C jest już nieodwracalne. Niemniej jednak trzeba pamiętać, że stadium A i B są trudne do odróżnienia od ostrego odrzucania komórkowego, dlatego wykonanie tylko biopsji nie jest pozbawione ograniczeń mimo, że uznawana jest ona za złoty standard.

Najnowsze dane wskazują, że ekonomicznie zasadne jest monitorowanie samej wirerii ponieważ BKVN nie występuje w przypadku braku wirerii. Profilaktyczne monitorowanie może prowadzić do zatrzymania progresji wirerii BKV do BKVN. Rekomendacje KDIGO z 2009 roku mówią, że należy wprowadzić redukcję immunosupresji gdy NAT dla BKV utrzymują się > 104 kopii/ml. Autorzy twierdzą ponadto, że wzrost wirerii w kolejnych oznaczeniach (trend) bez względu na liczbę kopii upoważnia do redukcji immunosupresji gdyż wczesna interwencja zapobiega rozwojowi BKN. Niektórzy sugerują, że co najmniej 2 oznaczenia >2,8 log kopii/ml dla osocza i >6,4 log kopii/ml dla moczu 1 miesiąc po transplantacji

mogą rozpoznać BKVN z czułością 100% i specyficznością 98,7%.

Należy pamiętać, że niskie przetrwałe wiremie mogą również przyczyniać się do rozwoju BKVN (w moczu wysoki ładunek wirusa).

Skryning w kierunku BK powinien być ponadto prowadzony w przypadku intensyfikacji immunosupresji w leczeniu ostrego odrzucania.

Jako ciekawostkę warto dodać, że niektóre dane wskazują na to, że cyklosporyna może mieć właściwości antywirusowe (doświadczenia na liniach komórkowych Vero E6) poprzez supresję replikacji. Podobne właściwości wykazuje sirolimus.

4. Diagnostyka laboratoryjna

a. Histopatologia

Rutynowe badanie histopatologiczne wykazuje zazwyczaj śródmiąższowe zapalenie nerek i uszkodzenie przypominające ostrą martwicę cewek (w komórkach cewek występuje powiększenie i atypia jąder, wirusowe wtęty wewnątrzjądrowe, martwica i apoptoza komórek). Zmienione komórki nabłonka cewek złuszcza się odsłaniając fragmenty błony podstawnej. W okolicach uszkodzenia mogą być widoczne ogniskowe nacieki komórek mieszanych, ze szczególnym znaczeniem komórek plazmocytarnych. Często spotykane jest zjawisko tubulitis, które jest oznaką ostrego odrzucania – w tym przypadku jest to cecha współistniejącego zakażenia wirusowego w obrębie cewek. Nie można jednoznacznie odróżnić czy jest to proces związany z ostrym odrzucaniem czy zakażeniem BKV.

3 stadia zaawansowania nefropatii:

A – ogniskowe zajęcie komórek nabłonka cewek nerkowych, w komórkach można wykryć antygen T, zmiany cytopatyczne są ograniczone.

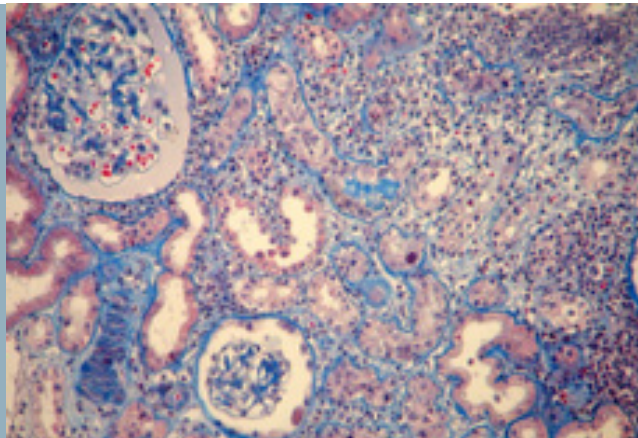
B – rozległe zajęcie miąższu nerki, zmiany wieloogniskowe lub rozlane. Widoczne zmiany cytopatyczne, w naciekach granulocyty, monocyty plazmocyty.

C – włóknienie narządu jako efekt istniejącego procesu zapalnego. Na tym etapie wykrywa się nieliczne komórki zakażone wirusem.

Immunohistochemia (IHC) złoty standard w rozpoznawaniu BKN (specyficzne barwienie z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciwko antygenowi T wirusa SV40 – 70% homologii z BKV). Badanie to jest pozytywne jedynie w przypadku zakażenia aktywnego (nie latentnego) co jednoznacznie wskazuje na nefropatię BK.

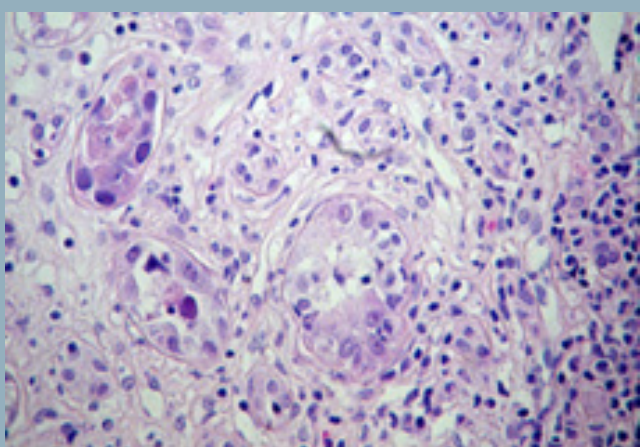
Biopsja narządu stanowi podstawę rozpoznania, ale jako technika inwazyjna nie nadaje się do monitorowania leczenia. Istnieją inne nieinwazyjne techniki służące do monitorowania rozwoju infekcji BKV („decoy cells”, PCR). Należy pamiętać, że z racji ogniskowej natury zakażeń PyV wynik biopsji może być fałszywie negatywny.

b. Ocena mikroskopowa osadu moczu barwionego metodą wg Papanicolau i poszukiwanie „decoy cells” (złuszczone komórki nabłonka dróg moczowych z charakterystycznymi wtrętami wirusowymi w jądrze komórkowym). Ocena w mikroskopie świetlnym.



NEFROPATIA BKV

- zapalenie śródmiąższowo-cewkowe
 - obecność wtrętów wirusowych w jądrach niektórych komórek nabłonka cewkowego
- Barwienie AFOG



NEFROPATIA BKV

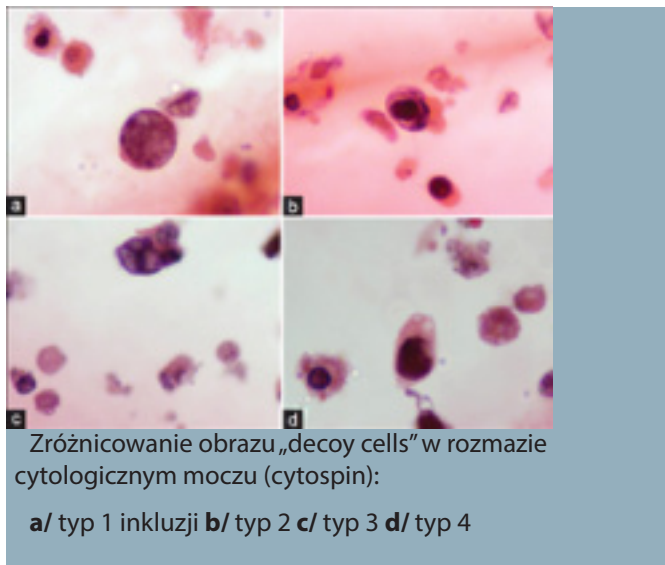
- zapalenie śródmiąższowo-cewkowe
- obecność wtrętów wirusowych w jądrach niektórych komórek nabłonka cewkowego
- złuszczenie nabłonka cewkowego.

Barwienie HE

Skrining za pomocą tego badania jest użyteczny do wczesnego diagnozowania HC indukowanego wirusem BK z czułością prawie 100% ale niestety z dość niską wartością PPV (<30%) - ok. połowa pacjentów po HSCT wolna od choroby wydalala BKV w tym samym czasie po przeszczepieniu.

Obecność „decoy cells” może świadczyć o reaktywacji wirusa bez znacznego uszkodzenia kanalików nerkowych jak i o rozwoju śródmiąższowego zapalenia nerki.

Objawy replikacji wirusa rozumiane jako obecność „decoy cells” można stwierdzić u prawie połowy chorych po Tx nerki. Ponieważ proporcja zainfekowanych komórek wykazuje wysoki stopień zmienności wyniki powinny być potwierdzane technikami biologii molekularnej.



Zróżnicowanie obrazu „decoy cells” w rozmazie cytologicznym moczu (cytospin):

a/ typ 1 inkluzji b/ typ 2 c/ typ 3 d/ typ 4

c. Testy serologiczne

Do tej grupy zalicza się:

- test hemaglutynacji (HA) - wykorzystanie zjawiska hemaglutynacji erytrocytów grupy 0 przez BKV oraz zahamowania hemaglutynacji – obecność przeciwciał indukuje zahamowanie hemaglutynacji (HAI), możliwe jest wykonanie szeregu rozcieńczeń badanej surowicy i oznaczenie miana.
- testy ELISA (płytki opłaszczane są antygenami (np. VLP1) pochodzącymi z ekstraktów komórek zainfekowanych wirusem /np. komórki Vero/
- odczyn neutralizacji wirusa,
- technologia xMAP Luminex - wysokoczuła metoda z użyciem mikrokulek (mikrosfer) jako fazy stałej z wykorzystaniem fluorymetrii przepływowej, umożliwiającą wykonanie testów multiparametrycznych (multiplex) , np. VLPs jako antygeny docelowe.

Obecnie żadna z powyższych metod nie znajduje zastosowania w rutynowej diagnostyce klinicznej zakażeń wirusem BK (stosowane głównie do celów epidemiologicznych), przede wszystkim z powodu braku dostępnych na rynku testów diagnostycznych, a także dostępnością czułych i bardziej użytecznych testów bezpośrednich (PCR).

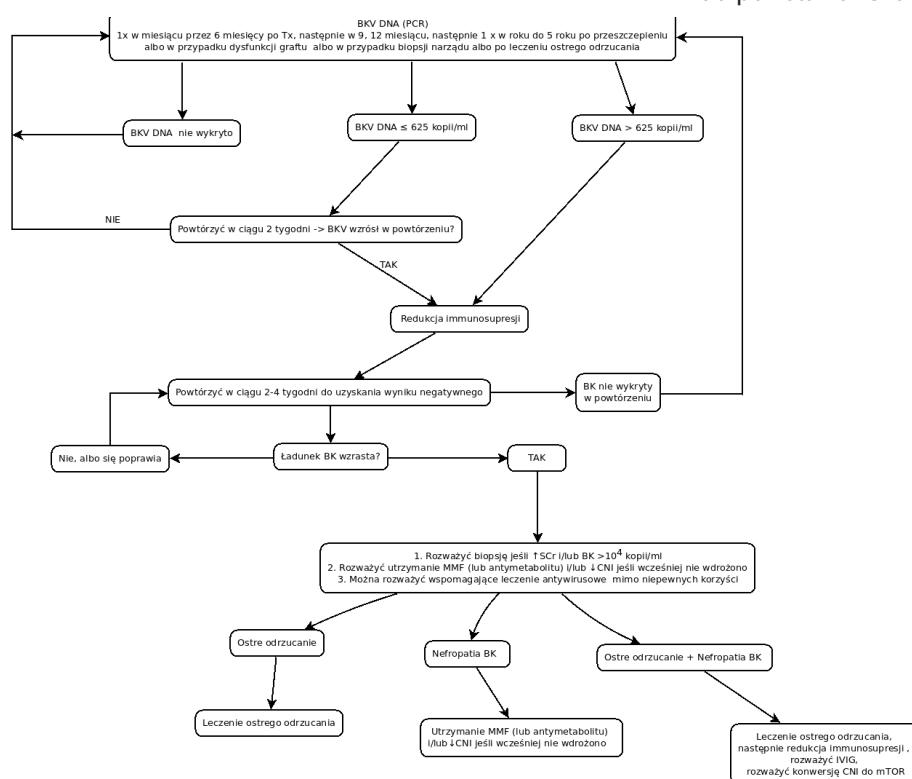
d. Biologia molekularna

Real Time PCR - obecnie stosowana metoda diagnostyczna. Rola tej czulej metody na dzień dzisiejszy wydaje się być nie do przecenienia chociażby z tego powodu, że rutynowo nie określa się statusu serologicznego dawca/biorca przed przeszczepieniem.

Wczesna profilaktyka jest bardzo ważna ze względu na specyfikę pacjentów po transplantacjach szczególnie tych otrzymujących narządy od dawców zmarłych, gdy nie znamy dobrze dawcy (niektórzy autorzy sugerują, że replikacja BKV w moczu dawcy może być związana z rozwojem wirerii u biorcy). Istotna jest również ze względu na specyfikę biorcy (z powodu obniżenia odporności może wystąpić opóźnienie klasycznych klinicznych oraz radiologicznych objawów zakażenia i stanu zapalnego w porównaniu z osobami bez zaburzeń odporności - szybki rozwój zakażenia).

Główny cel: Najwcześniejsze rozpoznanie toczącej się aktywnej infekcji, niedopuszczenie do rozwoju PyVAN, zwłaszcza, że nawet w populacji o relatywnie niskim ryzyku wystąpienia wirerii BK (biorcy dobrze dopasowani pod względem HLA, leczenia CsA) wirerii może wystąpić.

Proponowany algorytm diagnostyki wirerii BKV



Skryning replikacji BKV jest rekomendowany do identyfikacji pacjentów z ryzykiem BKVAN. Heterogenność testów dostępnych na rynku powstrzymuje określenie uniwersalnych rekomendacji dotyczących monitorowania BKV, aczkolwiek wykorzystanie poprawnie zwalidowanych, komercyjnych zestawów odczynnikowych umożliwia określenie ładunku wirusa z wysoką powtarzalnością i precyzją.

Wg KDIGO i rekomendacji z 2014r. wszyscy pacjenci po transplantacji nerki powinni być regularnie badani w kierunku replikacji BKV w osoczu lub w moczu w celu identyfikacji pacjentów z wzrastającym ryzykiem BKVAN. W zaleceniach można znaleźć sugestie wartości odcięcia na poziomie $>4 \log$ kopii/ml w osoczu. Długotrwała wirerii $>4 \log$ kopii/ml definiowana jest jako wskaźnik przypuszczalnego BKVN (wg AST i KDIGO istotna jest również wiriuria $>7 \log$ kopii/ml oraz wykonanie

biopsji), z kolei wysoka wiriuria zwykle wyprzedza wirerii i potencjalną nefropatię o 4-12 tygodni. Tak więc rekomenduje się monitorowanie wirerii w osoczu 1x w miesiącu przez 6 pierwszych miesięcy po transplantacji a następnie co 3 miesiące do 2 roku po przeszczepieniu.

Niestety ze względu na brak standaryzacji testów należy zdawać sobie sprawę, że wartości te muszą być ściśle dopasowane do danej jednostki, która prowadzi pacjentów i współpracującego laboratorium. Zróżnicowanie testów i brak standaryzacji to ważna przyczyna niezgodności wartości wirerii i niemożliwości określenia konsensusów (uniwersalny cut-off z wysoką PPV)

Rekalibracja wobec powszechnego standardu a także w zależności od sprzętu, stosowanych odczynników i warunków otoczenia mogłaby znacząco zredukować bias w porównaniach między oznaczeniami i przyczynić się do możliwości porównywania wyników i w konsekwencji do powstania rekomendacji grup ekspertów, możliwych

do zastosowania w każdej klinice leczącej pacjentów po transplantacjach.

Wprowadzenie stałego nadzoru nad rozwojem wirerii BKV do rutynowej diagnostyki BKVAN umożliwia postawienie wczesnego rozpoznania i interwencji która może skutkować maksymalną ochroną przeszczepionego narządu.

Wg informacji otrzymanych z NIBSC (The National Institute for Biological Standards and Control) w chwili obecnej trwają prace nad powstaniem pierwszego międzynarodowego wzorca dla wirusa BK.

e. Diagnostyka immunologiczna

Ma szczególne znaczenie u biorców nerek gdyż ma wpływ na przebieg kliniczny – reaktywację BKV i BKVAN.

Obecnie pomocnym w klinice badaniem jest ocena subpopulacji limfocytów T, a zwłaszcza CD8+ i CD4+. Zauważono bowiem, że u pacjentów z BKN silna odpowiedź cytotoksyczna T komórkowa (CTL) związana była ze spadkiem wiriurii, a także z niskimi poziomami przeciwciał anty BK podczas gdy niska lub niewykrywalna odpowiedź CTL korelowała z przetrwałymi i wysokimi poziomami przeciwciał anty BK. Są doniesienia dokumentujące wzrost występowania wirerii u pacjentów z defektem odpowiedzi zależnej od limfocytów CD8+ (polifunkcyjnych). Częściej obserwowano również defekt odpowiedzi CD4+ u pacjentów z wirerią rozwijających jawny-objawowy BKN. Znacząco wyższe poziomy IFN- γ /TNF α – TCD8+ IL2/TNF α – TCD4+ odnotowywano u pacjentów z historią wyleczenia w stosunku do ciężkich, długotrwałych reaktywacji BKV, co sugeruje ogromną rolę limfocytów TCD8+.

Przyszłością diagnostyki jest monitorowanie specyficznej odpowiedzi T komórkowej na zakażenie BKV i zindywidualizowanie diagnostyki w kierunku odpowiedzi immunologicznej konkretnego pacjenta. Jak na razie uważa się, że BK specyficzna odpowiedź immunologiczna ogranicza się do odpowiedzi T komórkowej skierowanej do białek wirusowych – LT i VP1. Ostatnie badania sugerują jednak, że VP2 i VP3 również są immunogenne i zdolne do wywołania odpowiedzi immunologicznej.

Ostatnio pojawiają się również doniesienia świadczące o roli limfocytów NK (odpowiedź nieswoista) a szczególnie ich aktywujących receptorów KIR3DS1 w odpowiedzi

skierowanej przeciwko wirusowi BK (pacjenci z replikacją BKV oraz z BKVN mieli mniej tych receptorów w porównaniu do grupy kontrolnej). Sugeruje się możliwość genetycznych predyspozycji do rozwoju BKVAN

związanych z konkretnym genotypem NK-KIR (identyfikacja pacjentów wysokiego ryzyka BKVN w momencie transplantacji?).

Znaczenie: rozróżnienie odrzucania od BKN, monitorowanie efektywności leczenia biorców nerek z odrzucaniem.

PODSUMOWANIE

Ze wszystkich metod diagnostycznych ocena ładunku wirusa BK za pomocą monitorowania wirerii na chwilę obecną wydaje się być najlepsza, bo jest bezinwazyjna i szybka, a dzięki zastosowaniu odczynników dobrej jakości zadowalająco powtarzalna i precyzyjna. Pomocna może być również ocena subpopulacji limfocytów (oszacowanie ogólnej odpowiedzi T komórkowej pacjenta) w celu oceny stanu układu immunologicznego pacjenta.

Bołączką nowoczesnej diagnostyki laboratoryjnej jest brak standaryzacji, który nadal dotyczy dużej grupy metod. Niektóre laboratoria w celu obniżenia kosztów nadal stosują testy „in-house” wykazujące duże zróżnicowanie. Z kolei producenci odczynników dopuszczonych do diagnostyki na terenie Unii Europejskiej (CE IVD) produkują zestawy, które różnią się od siebie (tzw. tajemnica firmy), co skutkuje tym, że nie powinno się lub powinno z dużą dozą niepewności porównywać wyniki pochodzące z różnych laboratoriów (testy różnią się czułością, swoistością, liniowością, genem targetowym lub jego fragmentem podlegającym amplifikacji /rozmiar amplikonu/, limitem detekcji, rodzajem matrycy – krew pełna/osocze/surowica, zastosowaniem sond, primerów itd.). Problem polega na tym, że w wielu przypadkach nadal nie ma pierwotnego wzorca, wobec którego metody powinny być kalibrowane. Dotyczy to wielu metod, nie tylko z zakresu diagnostyki molekularnej. W przypadku diagnostyki wirusologicznej odchodzi się, na szczęście, od metod tzw. „in-house” (co zresztą powinno być brane pod uwagę jeżeli laboratorium ubiega się o akredytację). Coraz częściej używa się odczynników dobrych, wiódących firm o ściśle określonych parametrach, stale monitorowanych za pomocą m.in. badań biegłości.

Pojawiają się również sukcesywnie międzynarodowe wzorce, dzięki którym wyniki badań mogą być porównywane, co ma szczególne znaczenie w przypadku pacjentów po transplantacjach narządów, czy onkologicznych, którzy są stale przypisani do ośrodka monitorującego ich stan kliniczny (porównania międzyośrodkowe). Bardzo ważna jest również świadomość wszystkich osób zaangażowanych w proces diagnostyczny (zlecających badanie lekarzy, personel pobierający, transportujący i wykonujący oznaczenie), jaki wpływ na cały proces diagnostyczny ma pobranie i przechowywanie (jakość próbki) materiału. Bardzo ważny jest etap przygotowywania próbki przed procesem amplifikacji czyli używanie odpowiednich materiałów i kompatybilnych ze sobą wysokiej jakości odczynników.

Ponadto bardzo ważna jest współpraca lekarzy klinicyistów i diagnostów laboratoryjnych w kwestii wspólnego ustalania „norm” – punktów odcięcia pod względem istotności klinicznej dla poszczególnych grup pacjentów, co jest szczególnie istotne w przypadku braku standaryzacji testów oraz ze względu na różne parametry analityczne bardzo czułych testów, obecnie występujących na rynku.

Reasumując, w celu wprowadzenia wiarygodnej, jednoznacznej determinacji BKVL konieczna jest standaryzacja oznaczeń wirerii BKV. Wyniki uzyskane takimi metodami można by porównywać, a co za tym idzie grupy ekspertów mogłyby tworzyć jednoznaczne zalecenia kliniczne. Na chwilę obecną heterogenność testów limituje porównania międzylaboratoryjne i powstrzymuje określenie uniwersalnego cut-off BKVL z wysoką dodatnią wartością predykcyjną identyfikującą pacjentów z ryzykiem BKVN.

Światowej klasy eksperci w walce z antybiotykoopornością w czasie Światowego Forum HAI zorganizowanego przez bioMérieux

W czasie piątej edycji Forum bioMérieux zobowiązało się do wspierania globalnego projektu edukacyjnego dedykowanego zwalczaniu antybiotykooporności, która została uznana za główne globalne zagrożenia dla zdrowia publicznego.

Marcy l'Etoile (Francja), 22 czerwca 2015 roku - Ponad siedemdziesięciu światowej sławy ekspertów w dziedzinie antybiotykooporności spotkało się w Annecy w czasie piątej edycji Światowego Forum HAI sponsorowanego przez firmę bioMérieux, światowego lidera w dziedzinie diagnostyki in vitro i lidera w mikrobiologii. Forum było okazją do podzielenia się swoim doświadczeniem i wiedzą w zakresie antybiotykooporności w odniesieniu do ludzi, zwierząt, środowiska i żywności. Dyskusje potwierdziły potrzebę współdziałania pomiędzy tymi sektorami. Ponieważ antybiotykooporność mikroorganizmów ma wpływ zarówno na ludzi, jak i zwierzęta, do skutecznego zwalczania tego globalnego zagrożenia dla zdrowia publicznego niezbędne jest skoordynowanie działań podejmowanych przez specjalistów służby zdrowia i weterynarii. Ekspertsi podkreślili także potrzebę kształcenia pracowników służby zdrowia, jak również innych użytkowników chemioterapeutyków. Zaproponowano szereg konkretnych, innowacyjnych działań edukacyjnych, a za priorytet uznano stworzenie międzynarodowego projektu, który firma bioMérieux zobowiązała się wspierać.

Antybiotykooporność została uznana przez najważniejsze agencje i organizacje (CDC, ECDC, WHO...) za ogólnoświatowy priorytet służby zdrowia. Rosnące na całym świecie zaniepokojenie rozwijającymi się mechanizmami antybiotykooporności skłoniło prezydenta Obamę do ogłoszenia pięcioletniego planu administracji publicznej dedykowanego walce z tym coraz większym zagrożeniem dla zdrowia publicznego. W dniu 2 czerwca 2015 roku firma bioMérieux wzięła udział w, odbywającym się w Białym Domu, Forum dotyczącym racjonalnej antybiotykoterapii w celu omówienia dostępnych sposobów wdrożenia, w ciągu najbliższych pięciu lat, zmian, które miałyby spowolnić rozwój bakterii antybiotykooptycznych, zapobiec rozprzestrzenianiu się zakażeń organizmami antybiotykooptycznymi oraz zapewnić skuteczne działanie istniejących antybiotyków.

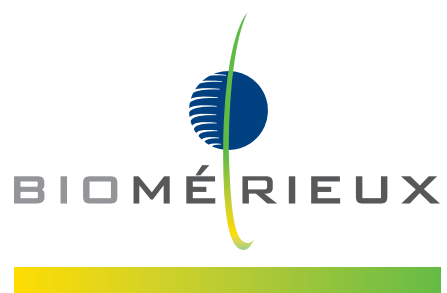
Nadmierne i niewłaściwe stosowanie antybiotyków, zarówno u ludzi jak i zwierząt, doprowadziło do rozwoju mechanizmów oporności, co wiąże się z wysoką zachorowalnością i śmiertelnością oraz znacznymi kosztami opieki zdrowotnej. Dlatego ważne jest monitorowanie rozwoju mechanizmów oporności, a także

sposobów stosowania antybiotyków na całym świecie. W związku z tym, w 2013 roku, podczas poprzedniego Światowego Forum HAI eksperci uzgodnili, że konieczne jest przeprowadzenie pierwszego globalnego Punktownego Badania Epidemiologicznego (ang. Global Point Prevalence Survey, GPPS) w celu przeanalizowania procedur podawania antybiotyków oraz występowania antybiotykooporności. Badanie odbywa się w warunkach szpitalnych i jest finansowane wyłącznie przez bioMérieux. Jednakże, w celu zapewnienia niezależności uzyskanych wyników, projekt jest koordynowany przez grupę ekspertów, w tym profesorów Hermana Goossensa, Dilipa Nathwania, Vincenta Jarliera i Petera Zarba, którzy prowadzili już badania tego typu na poziomie europejskim. Wstępne dane zostały zaprezentowane podczas tegorocznego Światowego Forum HAI, a ostateczne wyniki zostaną opublikowane w przyszłym roku, w listopadzie. Wnioski z piątej edycji Światowego Forum HAI uwydatniły ważną rolę edukacji w walce z antybiotykoopornością. bioMérieux zobowiązała się do wspierania procesu wdrażania łatwo dostępnych narzędzi szkoleniowych dostosowanych do potrzeb użytkowników chemioterapeutyków. Konieczne jest także śledzenie postępów w realizacji projektu. Wiele przykładów udanych kampanii edukacyjnych prowadzonych przez ekspertów uczestniczących w Światowym Forum HAI pokazało przydatność i skuteczność tego rodzaju działań rozwijanych na poziomie globalnym, a następnie dostosowanych lokalnie.

bioMérieux kontynuuje swoją, trwającą nieustannie od momentu powstania firmy, walkę o zdrowie publiczne. Inwestycje badawczo-rozwojowe firmy pozwalają spółce rozwijać się i wprowadzać na rynek innowacyjne rozwiązania diagnostyczne, które przyczyniają się w szczególności do walki z chorobami zakaźnymi oraz bardziej racjonalnej antybiotykoterapii. Firma wspiera również kilka inicjatyw mających na celu wzrost świadomości, a także wysokiej rangi spotkania naukowe, takie jak Światowe Forum HAI, jak również sympozja krajowe oraz „dni świadomości” dedykowane specjalistom służby zdrowia i weterynarii.

Dalsze informacje dostępne są na stronie:
www.biomerieux.com
www.youtube.com/biomerieuxdiagnostic





www.biomerieux.pl