

Антимикробна чувствителност на респираторни изолати *Pseudomonas aeruginosa* от пациенти с муковисцидоза

Д-р Таня Стратева,¹ проф. Иван Митов,¹ д-р Гергана Петрова,² доц. Пенка Переновска²

¹ Катедра по медицинска микробиология, Медицински университет, София

² Детска клиника, УМБАЛ „Александровска“, Медицински университет, София

Резюме

През периода 2005–2008 г. бяха събрани 102 щама *Pseudomonas aeruginosa* от храчки на пациенти с муковисцидоза, лекувани в Детската клиника на УМБАЛ „Александровска“, за проучване на тяхната антимикробна чувствителност. Чувствителността към 17 антимикробни лекарствени средства (АМЛС) беше определена чрез дифузионния дисков метод, в съответствие с препоръките на Clinical and Laboratory Standards Institute. Шестдесет и осем от изследваните изолати *Pseudomonas aeruginosa* (66.7%) бяха чувствителни на всички тествани антибиотици. Бяха установени следните нива на антимикробна резистентност: към imipenem – 5.9%, meropenem – 3.9%, amikacin – 3.9%, gentamicin – 7.8%, tobramycin – 5.9%, netilmicin – 13.7%, и към ciprofloxacin – 13.7%. Устойчивостта към АМЛС беше необичайно ниска, което корелира с: предимно интермитентна и хронична колонизация/инфекция, без склонност към повтарящи се екзацербации сред нашите пациенти, неналагащи честта и продължителна антимикробна терапия; емпирично лечение основно с перорални антибиотици; трудно осигуряване на инхалаторна терапия със скъпоструващия tobramycin; липса на клиничен опит с употреба на colistin в България към настоящия момент и др.

Ключови думи: муковисцидоза, *Pseudomonas aeruginosa*, антимикробна чувствителност.

Antimicrobial Susceptibility among Respiratory Cystic Fibrosis Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa*

D-r Tanya Strateva,¹ Prof. Ivan Mitov,¹ d-r Gergana Petrova,² Associate professor Penka Perenovska²

¹Department of Medical Microbiology, Medical University of Sofia

²Clinic of pediatrics, Alexander's University Hospital, Medical University of Sofia

Summary

A total of 102 strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the sputa of cystic fibrosis patients treated in the Pediatric clinic of the Alexander's University Hospital was collected during 2005–2008 to evaluate the antimicrobial suscep-

tibility. The susceptibilities to 17 antimicrobial agents were detected by the disk diffusion method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute recommendations. Of the investigated *Pseudomonas aeruginosa* isolates, 68 (66.7%) were susceptible to all of the antibiotics tested. The resistance rates against the following antimicrobials were: imipenem – 5.9%, meropenem – 3.9%, amikacin – 3.9%, gentamicin – 7.8%, tobramycin – 5.9%, netilmicin – 13.7%, and ciprofloxacin – 13.7%. The antimicrobial resistance was unusually low because of the following causes: mostly intermittent and chronic colonisation/infection without leaning towards recurrent exacerbations in the studied patients and thus lacking prolonged antimicrobial chemotherapy; empirical treatment mainly with oral antibiotics; difficult supply of inhalatory therapy with tobramycin because of the high price and necessity of prolonged use of the drug; absence of clinical use of colistin in Bulgaria etc.

Key words: cystic fibrosis, *Pseudomonas aeruginosa*, antimicrobial susceptibility.

Използвани съкращения: MV – муковисцидоза, АМЛС – антимикробни лекарствени средства, FEV₁ – форсиран експираторен обем за 1 секунда, FVC – форсиран витален капацитет, СУЕ – скорост на утаяване на еритроцитите.

Въведение

Муковисцидозата (MV) е мултисистемно обменно заболяване с аутозомно-рецесивен път на унаследяване, засягащо предимно екзокринните жлези. Най-сериозни са пораженията в дихателната и храносмилателната система – хронични бронхопулмонални възпаления с нарушен мукоцилиарен клирънс поради вторична инфекция на гъстата бронхиална слуз, панкреатична екзокринна инсуфициенция и холестатична цироза на черния дроб. В най-тежките си форми заболяването води до фатален изход през първата година на живота, но благодарение на съвременните подходи на лечение и поддържащи процедури повечето

геца днес имат шанса да доживеят до зряла възраст.

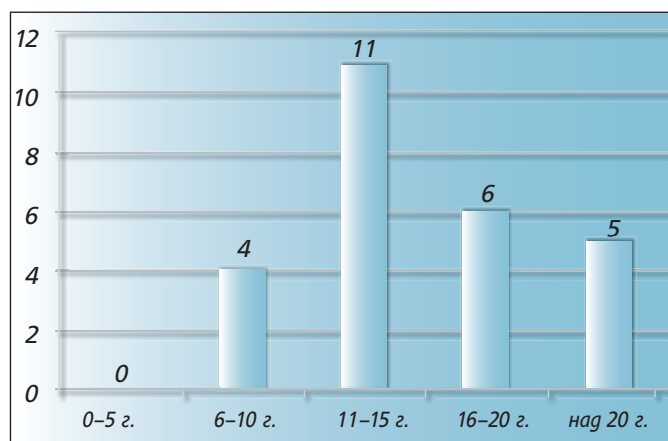
Pseudomonas aeruginosa е най-честият етиологичен причинител на бронхопулмонални инфекции при пациентите с MV (до 80% над 18-годишна възраст).^{1, 2} Абнормният епител на респираторния тракт предразполага към продължителна колонизация. Веднъж инфектирани, болните почти никога не се очистват от бактериите, които играят ключова роля в прогресията на белодробното заболяване.³ Въпреки хроничния характер на инфекциите, преобладава клиничното становище, че антимиicrobialната химиотерапия подобрява белодробната функция, увеличава преживяемостта на пациентите и повишава качеството им на живот, особено при започване на агресивно лечение с антимиicrobialни лекарствени средства (АМЛС) още при първо изолиране на *Pseudomonas aeruginosa*.⁴

Целта на настоящото проучване беше да се установи антимиicrobialната чувствителност на изолатите *Pseudomonas aeruginosa* от хракчи на пациенти с MV, лекувани в Детска клиника на УМБАЛ „Александровска“ в периода 2005–2008 г.

Материали и методи

Пациенти

В проучването бяха включени общо 26 пациенти с MV, на възраст от 6 до 27 години, които подлежат на диспансерно наблюдение и лечение в Детската клиника на УМБАЛ „Александровска“, София. Разпределението по възраст е показано на фиг. 1. Патофизиологията на MV се дължи на мутации в гена, локализиран в дългото рамо на 7 хромозома, водещи до синтез на протеин, част от мембраните на всички епителни клетки, наречен кистичен фиброзен трансмембранен регулатор (CFTR).⁵ Поради възникнала



Фиг. 1. Възрастово разпределение (в брой) на пациентите, страдащи от муковисцидоза

мутация се кодира синтез на патологичен протеин, който блокира хлорните канали в мембраните на епителните клетки и по този начин се засягат всички екзокринни жлези, особено органите на дихателната система, гастро-интестиналния тракт и панкреаса. При нашите пациенти се наблюдават следните мутации на *cftr* гена: deltaF508/deltaF508 (n=11), неизвестна/deltaF508 (n=3), N1303K/deltaF508 (n=3), неизвестна/N1303K (n=1), R1070Q/218insA (n=1), deltaF508/R1070Q (n=1), deltaF508/306delTAGA (n=1), G1069R+L88X/deltaF508 (n=1), Q220X/2183G-A (n=1), неизвестна/2184 ins108n (n=1) и неизвестни (n=2).

Диагностични критерии за остра екзацербация на бронхопулмоналните инфекции

Диагноза „остра екзацербация“ беше поставяна при наличие на поне 3 от следните 11 нови симптоми/находки: увеличаване на кашлицата, повишено отделяне на хракчи, температура, загуба на телесна маса, отсъствие от училище или работа, намаляване на физическата активност, затруднено дишане, нови аускултаторни находки, нови рентгенографски находки, понижаване на стойностите на форсирания експираторен обем за 1 секунда (FE₀₁), анемия.⁶

Клиничен материал за микробиологично изследване

След издухване на носа, изплакване на устата и преглъщане на вода, пациентът спонтанно отделяше хракча в стерилен контейнер. При някои деца, след функционално изследване на дишането (спирометрия), беше използван стандартен метод за индукция на хракча. За целта инхалаторно беше прилаган изотоничен разтвор на натриев хлорид при премедикация с 2,5–5 mg салбутамол за избягване на възможността от бронхоспазм в процеса на индукция на хракча при рисковите пациенти.⁷

Микробиологично изследване

В зависимост от консистенцията, някои хракчи (жилавите) бяха поставяни първоначално в термостат на 37°C за 30 минути, с добавен панкреатин за втечняване. От втечнените хракчи бяха приготвяни натривки, които след оцветяване по Грам бяха микроскопирани. След вортексирание за 15 секунди хракчите бяха посявани на следните хранителни среди: кръвен агар, шоколадов агар, агар на МакКонки и селективна среда за изолиране на дрожди (Сабуро). Направените посявки бяха култивирани

в продължение на 18–24 часа, на 37°C. Клинично-значимите микроорганизми бяха идентифицирани с биохимични тестове и беше определяна тяхната антимикробна чувствителност.

Бактериални щамове

Бяха проучени общо 102 клинични щамове *Pseudomonas aeruginosa* (87 мукоидни и 15 немуконидни), изолирани от храчките на изследваните пациенти с MV. Видовата идентификация беше извършена чрез конвенционални микробиологични методи и потвърдена с BBL Crystal Enteric/Nonfermenter ID System (Becton Dickinson, USA).

Метод за определяне на чувствителността към АМЛС

Чувствителността към 17 АМЛС беше определена чрез дифузионния дисков метод на Bauer-Kirby, в съответствие с препоръките на Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).⁸

Резултати и обсъждане

Установената чувствителност към АМЛС на щамовете *Pseudomonas aeruginosa*, изолирани от храчки на болни от MV, е представена на табл. 1. Таблицата показва разпределението (по брой и процент) на чувствителните, интермедиерно чувствителните и резистентните изолати, в съответствие с критериите на CLSI-2007.

Шестдесет и осем от изследваните 102 MV-щамове *Pseudomonas aeruginosa* (66.7%) напълно съответстваха на т. нар. „wild-type“ фенотип

Pseudomonas aeruginosa, т. е. бяха чувствителни на всички тествани антипсевдомонадни антибиотици – карбоксипеницилини, уреидопеницилини, цефалоспоринови трета и четвърта генерация, монобактами, карбапенеми, аминогликозиди, флуорохинолони и colistin. Сред проучените MV-изолати беше установена незначителна резистентност към следните АМЛС: imipenem – 5.9%, meropenem – 3.9%, amikacin – 3.9%, gentamicin – 7.8%, tobramycin – 5.9%, netilmicin – 13.7%, и към ciprofloxacin – 13.7%.

Всички щамове от настоящото проучване бяха чувствителни на colistin. По литературни данни, сред MV-изолатите *Pseudomonas aeruginosa* по света са открити резистентни на colistin щамове. В наскоро проведени мащабни проучвания в Испания⁹ и Англия¹⁰ беше констатирана резистентност към този антибиотик, съответно 2.9% и 3.1%. Наскоро Johansen H. и сътрудници докладваха за две нозокомиални инфекции и продължително разпространение на colistin-резистентни немуконидни *Pseudomonas aeruginosa* сред хронично инфектирани датски пациенти с MV.¹¹

Обобщените данни от тези европейски проучвания, както и резултатите от някои проучвания в САЩ по това време, показаха по-висока резистентност на MV-изолатите *Pseudomonas aeruginosa* в САЩ. Така например резистентността към някои от най-често използваните антипсевдомонадни антибиотици в Испания (2003–2004), Англия (2000) и САЩ (2000) беше следната: към piperacillin – съответно 20.9%, 29.7%, 48.2%; ceftazidime – 14.6%, 39.6%, 49.9%; tobramycin – 13.1%, 10.1%, 22.2%; gentamicin – 33.0%, 47.0%, 52.4%; ciprofloxacin – 28.6%, 29.7%, 37.4%.^{9, 10, 12}

Антибиотичната чувствителност на нашите MV-изолати *Pseudomonas aeruginosa* беше по-висока от чувствителността на аналогични щамове от западна Европа и САЩ през последните години, което свързахме с преобладаване на пациенти в добро до умерено-тежко клинично състояние (интермитентна до хронична колонизация/инфекция с *Pseudomonas aeruginosa*, без склонност към чести екзацербации), които не се нуждаят от продължително антибиотично лечение. При аускултация на повечето болни (19 от общо 26 участваха в настоящото проучване) беше установено чисто везикуларно дишане, с бронхиален характер в местата на образувани бронхиектазии, без наличие на хрипове. Кръвната картина показа нормални или на горната граница стойности на общ брой левкоцити, неутрофилни левкоцити и СУЕ. При рентгенографско изследване на белите дробове

Антимикробни лекарствени средства	Брой (%) изолати		
	Чувствителни	Интермедиерни	Резистентни
Carbencillin	98 (96.1)	2 (2.0)	2 (2.0)
Azlocillin	102 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Piperacillin	102 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Piperacillin+ tazobactam	102 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Ceftazidime	102 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Cefoperazone	102 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Cefepime	98 (96.1)	2 (2.0)	2 (2.0)
Cefpirome	98 (96.1)	2 (2.0)	2 (2.0)
Aztreonam	98 (96.1)	2 (2.0)	2 (2.0)
Imipenem	94 (92.1)	2 (2.0)	6 (5.9)
Meropenem	98 (96.1)	0 (0.0)	4 (3.9)
Amikacin	98 (96.1)	0 (0.0)	4 (3.9)
Gentamicin	90 (88.2)	4 (3.9)	8 (7.8)
Tobramycin	96 (94.1)	0 (0.0)	6 (5.9)
Netilmicin	86 (84.3)	2 (2.0)	14 (13.7)
Ciprofloxacin	84 (82.3)	4 (3.9)	14 (13.7)
Colistin	102 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

Табл. 1. Антимикробна чувствителност на 102 изолата *Pseudomonas aeruginosa* от храчки на пациенти с муковисцидоза

не бяха установени нови находки, най-вече пневмонични огнища и емфиземни изменения. Спирометрията при повечето изследвани пациенти показва стабилни нива на FVC и FEV₁, незначително намаляващи с възрастта. При цитологично изследване на храчките бяха открити стабилни нива на неутрофилни левкоцити, без сигнификантно увеличаване на метаплазията на сквамозни епителни клетки при последователни изследвания.

Преобладаващата част от изследваните респираторни изолати *Pseudomonas aeruginosa* (87 от 102, т.е. 85.3%) бяха от мукоиден морфотип, дължащ се на образуването на слайм. Обикновено мукоидните MV-изолати се характеризират с по-висока резистентност и свидетелстват за продължителна колонизация на бронхиалното дърво, но са публикувани и научни съобщения, които представят по-чувствителни мукоидни MV-щамове *Pseudomonas aeruginosa*, в сравнение с немуктоидни MV-изолати.^{13, 14}

Някои особености на антибиотичната политика в България, отнасящи се до лечението на белодробни инфекции при пациенти с MV, също корелират с установената висока антимикуробна чувствителност на респираторните изолати *Pseudomonas aeruginosa* – емпирично лечение предимно с перорални антибиотици (най-често ципрофлоксацин); доскоро трудно осигуряване на инхалаторна терапия с тобрамицин поради високата цена на препарата и необходимостта от дълго лечение (курсове по 28 дни); липса на регистрация на colistin към настоящия момент и др.

Заклучение

Антимикуробната резистентност на проучените щамове *Pseudomonas aeruginosa* е пониска от устойчивостта на подобни MV-изолати в западна Европа и САЩ през последните години, което се свързва с: предимно интермитентна и хронична колонизация/инфекция с *Pseudomonas aeruginosa*, без склонност към повтарящи се екзацербации сред нашите пациенти, неналагащи честта и продължителна антимикуробна терапия; емпирично лечение основно с перорални антибиотици; доскоро трудно осигуряване на инхалаторна терапия със скъпоструващия тобрамицин; липса на клиничен опит с употреба на колистин в България към настоящия момент и др.

Благодарност. Проучването е финансирано по **договор № 1-С/2008 г.** от конкурса „Стимулиране на научни изследвания в области с постигнати високи постижения“ на СМН, Медицински университет, София.

Литература

- Ramsey, B. W. Management of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1996; 335:179–188.
- Cystic Fibrosis Foundation. Patient registry 2001 annual data report. Bethesda, MD: Cystic Fibrosis Foundation; 2002.
- Govan, J. R. & Deretic, V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 1996; 60, 539–574.
- Canton, R., Cobos, N, de Gracia, J, Baquero, F, Honorato, J, Gartner, S, Alvarez, A, Salcedo, A, Oliver, A & Garcia-Quetglas, E on behalf of the Spanish Consensus Group for Antimicrobial Therapy in the Cystic Fibrosis Patient. Antimicrobial therapy for pulmonary pathogenic colonization and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11, 690–703.
- Zielenski, J., Rozmahel, R, Bozon, D, Kerem, B, Grzelczak, Z, Riordan, J. R., Rommens, J & Tsui, L. C. Genomic DNA sequence of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) gene. *Genomics* 1991; 10, 214–228.
- Cystic Fibrosis Foundation. Microbiology and infectious disease in cystic fibrosis. Consensus Conference: Concepts in Care. Vol. 5, section 1. Bethesda, MD: Cystic Fibrosis Foundation, 1994.
- Twaddell, S. H., Gibson, P. G., Carty, K., Woolley, K. L. & Henry, R. L. Assessment of airway inflammation in children with acute asthma using induced sputum. *Eur Respir J* 1996; 9, 2104–2108.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100-S17. CLSI, Wayne, PA, 2007.
- Morosini, M. I., Garcia-Castillo, M., Loza, E., Perez-Vazquez, M., Baquero, F. & Canton, R. Breakpoints for predicting *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility to inhaled tobramycin in cystic fibrosis patients: use of high-range E-test strips. *J Clin Microbiol* 2005; 43, 4480–4485.
- Pitt, T. L., Sparrow, M. & Stefanidou, M. Survey of resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from UK patients with cystic fibrosis to six commonly prescribed antimicrobial agents. *Thorax* 2003; 58, 794–796.
- Johansen, H. K., Moskowitz, S. M., Ciofu, O., Pressler, T. & Hoiby, N. Spread of colistin-resistant non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* among chronically infected Danish cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 2008, March 19.
- Burns, J. L., Saiman, L., Whittier, S., Larone, D., Krzewinski, J., Liu, Z., Marshall, S. A. & Jones, R. N. Comparison of agar diffusion methodologies for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2000; 38, 1818–1822.
- Ciofu, O., Fussing, V., Bagge, N., Koch, C. & Hoiby, N. Characterization of pared mucoid/non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Danish cystic fibrosis patients: antibiotic resistance, β -lactamase activity and ribotyping. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48, 391–396.
- Srifuengfung, S., Tiensasitorn, C., Yungyuen, T. & Dhiraputra, C. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid and non-mucoid type. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2004; 35, 893–89.