

Молекулярно–генетични проучвания върху факторите на вирулентност на респираторни изолати *Pseudomonas aeruginosa* от пациенти с муковисцидоза

Гл. ас. Таня Стратева,¹ ас. Гезгана Петрова,² доц. Пенка Переновска², проф. Иван Митов¹

¹Катедра по медицинска микробиология, Медицински университет, София

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

Резюме

През периода 2006–2009 г. бяха събрани 42 щамове *Pseudomonas aeruginosa* от храчки на 26 пациенти с муковисцидоза (MV) за проучване на честотата на разпространение на гените, кодиращи фактори на вирулентност. Беше извършена амплификация чрез полимеразно-верижна реакция на 9 различни гени: *algD* (кодиращ алгинат), *pilB* (фимбриален протеин PilB на тип IV пили), *nan1* (неураминидаза), *lasB* (еластаза LasB), *plcH* (хемолитична фосфолипаза C), *exoS* (екзоензим S), *exoU* (екзоензим U), *exoT* (екзоензим T) и *exoY* (екзоензим Y). Беше установено широко разпространение на *algD* и *plcH* сред изследваните MV изолати *P. aeruginosa* – съответно 85,7% и 71,4%. Гените, кодиращи тип III ефекторни протеини, показаха следната честота: *exoS* – 52,4%, *exoU* – 28,6%, *exoT* – 54,8%, *exoY* – 85,7%. *pilB* и *nan1* бяха открити съответно при 9,5% и 38,1% от проучените изолати. Щамове *P. aeruginosa* с наличен *nan1* ген бяха изолирани само от пациенти с често повтарящи се екзацербации на белодробните инфекции и тежко клинично състояние ($n=6$). В заключение, слаймът, изграден от алгинат, беше основния фактор за адхезия на изследваните респираторни MV изолати *P. aeruginosa*. Честотата на *nan1*-положителните щамове беше умерена и в пряка корелация с преобладаващия относителен дял на пациенти в добро клинично състояние. Молекулярно-генетичното доказване на този ген може да се използва като индиректно средство за оценка на прогресията на белодробното заболяване при пациенти с MV.

Ключови думи: муковисцидоза, *P. aeruginosa*, фактори на вирулентност

Molecular-genetic investigations on the virulence factors among respiratory cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

T. Strateva¹, G. Petrova², P. Perenovska², I. Mitov¹

¹Department of medical microbiology, Medical University of Sofia;

²Pediatric clinic, UMBA „Alexandrovska“, Medical University of Sofia

Abstract

A total of 42 strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the sputa of 26 cystic fibrosis (CF) patients were collected during 2006–2008 to evaluate the prevalence of spread of the genes encoding virulence factors. Polymerase chain reaction amplification was performed for detection of 9 different virulence genes: *algD* (encoding alginate), *pilB* (type IV fimbrial protein PilB), *nan1* (neuraminidase), *lasB* (elastase LasB), *plcH* (haemolytic phospholipase C), *exoS* (exoenzyme S), *exoU* (exoenzyme U), *exoT* (exoenzyme T) and *exoY* (exoenzyme Y). The *algD* and *plcH* genes were widespread among the studied CF isolates of *P. aeruginosa* (respectively, 85.7% and 71.4%). The genes encoding the type III effector proteins revealed the following frequencies: *exoS* – 52.4 %, *exoU* – 28.6%, *exoT* – 54.8%, *exoY* – 85.7%. The *pilB* and *nan1* were found in 9.5% and 38.1% of the examined isolates, respectively. The *P. aeruginosa* strains containing the *nan1* were isolated only from patients with recurrent pulmonary exacerbations and poor clinical status ($n=6$). In conclusion, the slime, composed of an alginate, was a prevailing adhesin factor among respiratory CF *P. aeruginosa* isolates. The frequency of *nan1*-positive strains was moderate and in correlation with the predominant good clinical condition of the patients investigated. The molecular-genetic detection of this gene may be used as an indirect measure of CF pulmonary disease evolution.

Key words: cystic fibrosis, *P. aeruginosa*, virulence factors.

Използвани съкращения: MV – муковисцидоза, PCR – полимеразно-верижна реакция, *algD* – ген, кодиращ екзополisahарид алгинат, *pilB* – ген за фимбриалния протеин PilB на тип IV пилите, *nan1* – ген за неураминидаза, *lasB* – ген за еластаза LasB, *plcH* – ген за хемолитична фосфолипаза C, *exoS* – ген за екзоензим S, *exoU* – ген за екзоензим U, *exoT* – ген за екзоензим T, *exoY* – ген за екзоензим Y.

Въведение

Pseudomonas aeruginosa е Грам-отрицателен бактерий, който често причинява опортюнистични инфекции в имуносупресирани индивиди. Той колонизира за първи път бронхиалното дърво на деца от 5 до 9 години, страдащи от муковисцидоза

(MV),¹⁵ и се изолира от храчките на приблизително 80% от пациентите над 18-годишна възраст.³ Обикновено се развиват респираторни инфекции, причинени от щамове с мукоиден морфотип.⁶ Анормалният епител на респираторния тракт на тези пациенти предразполага към продължителна колонизация с *P. aeruginosa* и, веднъж инфектирани, те почти никога не се очистват от бактериите, които играят ключова роля в прогресията на белодробното заболяване.²¹

Патогенезата на бронхопулмоналните инфекции, причинени от *P. aeruginosa*, е многофакторна, което се обуславя от участието на истински „арсенал“ от клетъчно-свързани и извънклетъчни (екстрацелуларни) фактори на вирулентност.¹⁸ Продукцията на част от извънклетъчните фактори, спомагащи за тъканната инвазия и дисеминация, се контролира от т. нар. „quorum sensing“ сигнализиращи системи, в резултат от чието действие тези фактори на вирулентност се синтезират по координиран, зависим от клетъчната плътност начин, а бактериите могат да преодолеят защитните механизми на макроорганизма.¹⁸

Продукцията на екзополисахарид алгинат (линеен полимер, съставен от остатъци на мануронова и глюкуронова киселини) и образуването на мукоидни колонии предпазва бактериите от имунния отговор на макроорганизма и действието на антибиотиците, което предразполага към хронично възпаление.⁹ Различни са механизмите, по които останалите фактори на вирулентност на *P. aeruginosa* могат да доведат до бронхопулмонални увреждания. Например, екзотоксин А катализира ADP-рибозилиране и инактивиране на фактора на елонгация 2, което води до потискане на протеиновия синтез и клетъчна смърт.¹⁹ Към настоящия момент са идентифицирани четири ефекторни протеини, секретирани чрез тип III секреторната система: екзоензим S (ExoS), екзоензим U (ExoU), екзоензим T (ExoT) и екзоензим Y (ExoY).⁷ ExoS е ADP-рибозилтрансфераза, която се секретира директно в цитозола на епителните клетки.²⁰ ExoU има уникален, бърз и силен цитотоксичен ефект, водещ до прогресиращо белодробно увреждане, и

играе важна роля в развитието на септичен шок.² Еластазите разрушават еластин-съдържащата белодробна тъкан и причиняват хеморагии при инвазивните инфекции.¹¹ Фосфолипидите на белодробния сърфактант могат да бъдат хидролизирани от две фосфолипази C (хемолитичната PLC-H и нехемолитичната PLC-N).¹⁴ *P. aeruginosa* продуцира неураминидаза, която отстранява остатъците на сиалова киселина от GM1-ганглиозидите, при което се образуват асиало-GM1, явяващи се по-добър рецептор за структурния протеин на пилите тип IV.⁵ Асиало-GM1-ганглиозиди се намират в изобилие по повърхността на епителните клетки в респираторния тракт на болните от MV. Неураминидазата участва и в образуването на биофилм, което улеснява колонизацията на респираторния тракт с *P. aeruginosa*.¹⁷

Целта на настоящото проучване беше определяне честотата на разпространение на гени, кодиращи клетъчно-свързани и извънклетъчни фактори на вирулентност (адхезини, инвазини и цитотоксини), сред респираторни изолати *P. aeruginosa* от пациенти с MV.

Материали и методи

Бактериални щамове и пациенти

В проучването бяха включени 42 щамове *P. aeruginosa*, изолирани от храчките на общо 26 пациенти с MV, през периода 2006–2009 г. Видовете

| Двойки праймери | Мишена | Секвенция (5' – 3') | Размер на продукта (bp) | Температура на хибридизация (°C) | Литературен източник |
|-----------------|----------------------|-------------------------------|-------------------------|----------------------------------|----------------------|
| <i>algD-F</i> | алгинат | ATG CGA ATC AGC ATC TTT GGT | 1310 | 62 | [13] |
| <i>algD-R</i> | | CTA CCA GCA GAT GCC CTC GGC | | | |
| <i>pilB-F</i> | тип IV пили | ATG AAC GAC AGC ATC CAA CT | 826 | 60 | [1] |
| <i>pilB-R</i> | (пилин B) | GGG TGT TGA CGC GAA AGT CGA T | | | |
| <i>nan1-F</i> | неураминидаза | ATG AAT ACT TAT TTT GAT AT | 1317 | 53 | [1] |
| <i>nan1-R</i> | | CTA AAT CCA TGC TCT GAC CC | | | |
| <i>lasB-F</i> | еластаза <i>LasB</i> | GGA ATG AAC GAG GCG TTC TC | 300 | 60 | [13] |
| <i>lasB-R</i> | | GGT CCA GTA GTA GCG GTT GG | | | |
| <i>plcH-F</i> | хемолитична | GAA GCC ATG GGC TAC TTC AA | 307 | 60 | [13] |
| <i>plcH-R</i> | фосфолипаза C | AGA GTG ACG AGG AGC GGT AG | | | |
| <i>exoS-F</i> | екзоензим S | CTT GAA GGG ACT CGA CAA GG | 504 | 60 | [13] |
| <i>exoS-R</i> | | TTC AGG TCC GCG TAG TGA AT | | | |
| <i>exoU-F</i> | екзоензим U | GGG AAT ACT TTC CGG GAA GTT | 428 | 60 | [2] |
| <i>exoU-R</i> | | CGA TCT CGC TGC TAA TGT GTT | | | |
| <i>exoT-F</i> | екзоензим T | CAA TCA TCT CAG CAG AAC CC | 1159 | 58 | [8] |
| <i>exoT-R</i> | | TGT CGT AGA GGA TCT CCT G | | | |
| <i>exoY-F</i> | екзоензим Y | TAT CGA CGG TCA TCG TCA GGT | 1035 | 64 | [8] |
| <i>exoY-R</i> | | TTG ATG CAC TCG ACC AGC AAG | | | |

F – forward, R – reverse.

Табл. 1. Праймери за амплификация на гени, кодиращи фактори на вирулентност на *P. aeruginosa*

идентификация беше извършена чрез BBL Crystal Enteric/Nonfermenter ID System (Becton Dickinson, USA). Пациентите, на възраст 6–27 години, се проследяват в Клиника по детски болести при УМБАЛ „Александровска“ – София.

Диагностични критерии за остра екзацербация на бронхопулмоналните инфекции

Диагноза „остра екзацербация“ беше поставяна при наличие на поне 3 от следните 11 нови симптома/находки: увеличаване на кашлицата, повишено отделяне на храчки, 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 (FEO₁), анемия.⁴

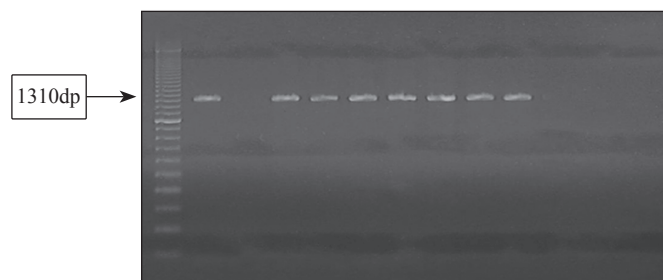
Полимеразно-верижна реакция (polymerase chain reaction, PCR) за амплификация на гени, кодиращи фактори на вирулентност

Чрез PCR бяха амплифицирани следните гени на *P. aeruginosa*: *algD* (кодиращ алгинат), *pilB* (фимбриален протеин PilB на тип IV пил), *nan1* (неурамини-газа), *lasB* (еластаза LasB), *plcH* (хемолитична фосфолипаза C), *exoS* (екзоензим S), *exoU* (екзоензим U), *exoT* (екзоензим T) и *exoY* (екзоензим Y). Изолирането на ДНК от клиничните щамове *P. aeruginosa* беше извършено чрез термоекстракция. Олигонуклеотидите, използвани като праймери за амплификация на изследваните гени, бяха синтезирани от Alpha DNA (Canada) и са представени в табл. 1. Реакциите на амплификация бяха извършвани в обем 25,0 µl, като крайната концентрация на микса за всяка проба съдържаше: 0,25 µM от съответните праймери, 0,2 mM dNTPs, 1x Reaction Buffer, 2,0 mM MgCl₂ и 1,5 U Taq ДНК полимераза (GENET BIO). Амплификацията беше проведена в PCR апарат Techgen (England) при еднакви условия за денатурация (5 min на 94 °C) и завършване на реакцията (7 min на 72 °C) и различни температури на хибридизация на праймерите (представени в табл. 1) и време за удължаване на веригата, в съответствие с последователността на конкретните праймери и дължината на очаквания продукт. Отчитането на PCR продуктите беше осъществено посредством стандартна агарозна електрофореза в 1,5% гел, с предварително включен в него етидиев бромид (0,5 µg/ml) и наблюдавано с UV-транслюминатор при λ=312 nm. Наличните продукти документирахме с дигитален фотоапарат Nikon Coolpix 4500.

Статистическата обработка беше направена чрез t-тест на Стюдънт. За статистически значими бяха приемани стойности на *P* пог 0.05.

Резултати и обсъждане

Беше установена следната честота на разпространение на гените за фактори на вирулентност сред проучените изолати *P. aerugi-*



Фиг. 1. Агарозна гел-електрофореза на PCR-продукти на *algD* гени в щамове *P. aeruginosa* от храчки на пациенти с муковисцидоза

Амплифицираният фрагмент е с дължина 1310 bp. Отляво-надясно: 100 bp Ladder; (+) положителен контролен щам; (-) отрицателна контрола и 7 (+) положителни продукти на *algD*

nosa: *algD* – 85,7%, *pilB* – 9,5%, *nan1* – 38,1%, *lasB* – 100%, *plcH* – 71,4%, *exoS* – 52,4%, *exoU* – 28,6%, *exoT* – 54,8%, и *exoY* – 85,7%. Генът *lasB* беше открит във всички наши изолати, подобно на 100% му доказване в наскоро изследвани щамове *P. aeruginosa* от храчки на пациенти с MV от Франция.¹³ За разлика от широкото разпространение на *algD* (фиг. 1), *pilB* беше открит в едва 9,5% от щамовете (4/42), което говори за второстепенна роля на пилите в адхезията на *P. aeruginosa* към респираторните епителни клетки на страдащи от MV индивиди. Наскоро аналогично молекулярно-генетично изследване, извършено от Finnep и колеktiv, установи дори пълна липса *pilB* сред MV щамове *P. aeruginosa* от Ирландия.⁸

Установената в настоящото проучване честота на разпространение на *exoS* беше значимо по-ниска от наскоро докладваната честота при изследване на MV изолати *P. aeruginosa* във Франция (93,8 %, *P*<0,001)¹³ и САЩ (85,0 %, *P*<0,01)⁷. Ефекторният протеин *ExoS* причинява директно тъканно разрушаване при белодробни инфекции и може да изпълнява важна роля при бактериалната дисеминация.¹⁸ Относително по-ниският дял на *ExoS*-продуциращи щамове в нашето проучване може да се свърже с факта, че бронхопулмоналните екзацербации не бяха преобладаващата форма на инфекция сред проследените пациенти. Наличието на *exoU* ген сред нашите MV изолати *P. aeruginosa* беше по-високо от установеното от Feltman и сътр. в САЩ (10,0%).⁷ По литературни данни *ExoU* се продуцира от почти 1/3 от клиничните изолати *P. aeruginosa*, при това тези щамове в 90% от случаите се свързват с тежки инфекции.^{10, 16} Освен това, *ExoU*, заедно с *ExoT*, участва в началната фаза на септичния шок.¹² Сходна беше честотата на *exoY*, кодиращ аденилат-циклазата *ExoY*, с откритата в проучването на Feltman и колеktiv (85,6%/90%).⁷

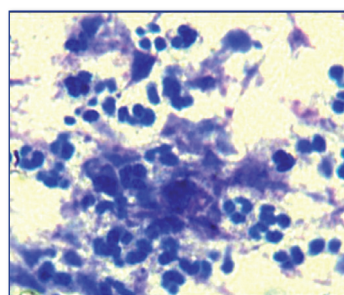
Съпоставянето на резултатите ни с получените от Lanotte и съавт. данни показва значимо по-ниско разпространение на *nan1* сред нашите MV изолати *P. aeruginosa* (38,1%) в сравнение с френските изолати от болни с MV (61,7%) – *P*<0,02.¹³ Клинични проучвания са доказали, че разпространението

| Лаб. № | Дата на изолиране | Инициали, възраст | Оплаквания, физикално изследване | Цитологично изследване на храчка | Микробиологична находка | Лабораторни изследвания | Инструментални изследвания | Лечение |
|------------|-------------------|-------------------|--|--|--|--|---|--|
| 8 | 20.02.2006 | Т. Т., 12 г. | Кашлица, хрема; отслабено везикуларно дишане, средни и дребни влажни хрипове субскапуларно | III ст. клет. богатство, 40% PMNL, слуз, детрит | <i>P. aeruginosa</i> – мукоиден, wild type* чувствителност <i>S. aureus</i> <i>H. influenzae</i> | Hb 108 g/l WBC 18.94 G/l Sg 83.5% Thr 453 G/l CYE 31 mm/h | Спирометрия – смесен тип Вентилаторна недостатъчност | Амоксицилин/клавуланова киселина 14 дни |
| 15a 15b | 18.05.2006 | Т. Т., 12 г. | Кашлица и задух; хиперсонорен тон, множество влажни хрипове, обструкция | II-III ст. клет. богатство, 42% PMNL, единични Ery, слуз, детрит | <i>P. aeruginosa</i> – зелен пигмент, wild type <i>P. aeruginosa</i> – кафяв пигмент, wild type | 112 g/l WBC 17.7 G/l Sg 83% Thr 368 G/l CYE 27 mm/h | Спирометрия – потейка Вентилаторна недостатъчност от смесен тип, Влажни стойности на FEV ₁ и FVK (сравнение с 20.02.2006 г.) | Инхалаторно Тобрамицин 28 дни + Цефаклор 14 дни + Метилпреднизолон |
| 19a 19b | 15.06.2006 | Т. Т., 12 г. | Кашлица, задух, хронична умора; звънливи хрипове | II ст. клет. богатство, 39% PMNL, слуз, детрит | 2 щама <i>P. aeruginosa</i> – wild type, мукоиден и немуктоиден | Hb 103 g/l WBC 19.31 G/l Sg 74.6% Thr 155 G/l CRP 6.5 mg/l | Спирометрия – смесен тип Вентилаторна недостатъчност Рентгенография – емфизем и фиброза | Цефтриаксон + Амикацин 14 дни; Ципрофлоксацин 14 дни, р.о. |
| 27 | 04.09.2006 | Т. Т., 12 г. | Кашлица, t до 38.2 °C; дребни влажни хрипове двустранно | Оскъдна храчка, един. Ery и PMNL | <i>P. aeruginosa</i> резистентен на имипенет, мукоиден | WBC 18.91 G/l Sg 71% Thr 359 G/l CRP 5.6 mg/l | Спирометрия – смесен тип Вентилаторна недостатъчност | Ципрофлоксацин 14 дни, р.о. |
| 30 | 02.10.2006 | Т. Т., 13 г. | Кашлица, t 38.9 °C | III ст. клет. богатство, 30% PMNL, 6% Eo | <i>P. aeruginosa</i> резистентен на имипенет, мукоиден | WBC 9.1 G/l Sg 65.4% Thr 399 G/l CYE 34 mm/h CRP 3.8 mg/l | Спирометрия – смесен тип Вентилаторна недостатъчност Рентгенография – пневмония | Инхалаторно Тобрамицин 28 дни + Ципрофлоксацин 28 дни, р.о. |
| 14 | 09.05.2006 | М. С., 13 г. | Кашлица, отпадналост, t 38.2 °C; влажни хрипове предимно вдясно | III-IV ст. клет. богатство, 59% PMNL, слуз, детрит | <i>P. aeruginosa</i> – wild type, мукоиден <i>S. pneumoniae</i> | Hb 110 g/l WBC 11.2 G/l Sg 71% Thr 267 G/l CYE 33 mm/h | Рентгенография – пневмония | Инхалаторно Колимицин 28 дни + Ципрофлоксацин 28 дни, р.о. |
| 31 | 10.10.2006 | М. С., 13 г. | Отпадналост, безапетитие; средни и дребни влажни хрипове вдясно | Оскъдна храчка, малко клетъчни елементи | <i>P. aeruginosa</i> – wild type, мукоиден | WBC 9.5 G/l Sg 69% Thr 253 G/l CYE 35 mm/h | Рентгенография – пневмония | Инхалаторно Колимицин 28 дни + Ципрофлоксацин 28 дни, р.о. |

Табл. 2. Клинично-лабораторна информация за пациентите с муковисцидоза, от които са изолирани щамове *P. aeruginosa* с амплифициран ген за неураминидаза.

*Забележка: „Wild type“ чувствителност означава чувствителност към всички антипсевдомонадни антибиотици

на *pan1* сред щамове *P. aeruginosa*, изолирани от храчки на MV индивиди, корелира с клиничното състояние на избраните пациенти, т.е. увеличава се при влошаване на заболяването, което показва значението на неураминидазата в еволюцията на белодробната инфекция при MV.¹³ В тази връзка, различията в честотата на гена сред двете популации пациенти (в България и Франция) може да се дължат на самите пациенти. Според клинично-лабораторната информация, сред нашите пациенти преобладават деца с интермитентна и хронична колонизация с *P. aeruginosa*, които са в стабилно клинично състояние. Само малка част от тях (6/26) са с тежки хронични бронхопулмонални инфекции, характеризиращи се с чести екзацербации. Щамовете *P. aeruginosa*, при които доказахме *pan1* ген, бяха изолирани точно от тези пациенти. В табл. 2 са представени клинично-лабораторна информация и данни от инструменталните изследвания на пациентите, съвпадащи по време с микробиологичното доказване на щамове *P. aeruginosa* от храчка, които експресират *pan1*. Както е видно от таб-



Фиг. 2. Цитологично изследване на храчка (оцветяване по Гимза), получена от пациент с екзацербация на бронхопулмоналната инфекция, причинена от *P. aeruginosa*: полисегментоядрени левкоцити, метаплазия на сквамозни епителни клетки, слуз.

PMNL – полиморфноядрени (полисегментоядрени) левкоцити, Eo – еозинофили, WBC – левкоцити, Sg – сегментоядрени (неутрофилни) левкоцити, Thr – тромбоцити, CYE – скорост на утаяване на еритроцитите, Hb – хемоглобин, CRP – С-реактивен протеин, FEV₁ – форсиран експираторен обем за 1 секунда, FVK – форсиран витален капацитет, i.v. – интравенозно, р.о. – през устата

лицата, в дните на установяване на микробиологичната находка пациентите са били в състояние на екзацербация на бронхопулмоналната инфекция. Екзацербацията корелира с високо съдържание на полисегментоядрени левкоцити и метаплазия на сквамозни епителни клетки в храчките (фиг. 2); левкоцитоза, с преобладаване на сегментоядре-

| Лаб. № | Дата на изолиране | Инициали, Възраст | Оплаквания, физикално изследване | Цитологично изследване на храчка | Микробиологична находка | Лабораторни изследвания | Инструментални изследвания | Лечение |
|--------|-------------------|-------------------|--|--|--|--|--|---|
| 24 | 30.06.2006 | Г. М., 6 г. | Кашилица, t 39,2 °C, безапетитие; отслабено везикуларно дишане, средни и дребни влажни хрипове двустранно | 60% PMNL, плоски епителни клетки | <i>P. aeruginosa</i> – wild type, немукоеген <i>S. aureus</i> | WBC 9,1 G/l Sg 54% Thr 308 G/l CYE 50 mm/h | Рентгенография – пневмония | Меропенем 2 седмици; Цефтриаксон + Амикацин 10 дни |
| 36 | 19.12.2006 | Г. М., 6 г. | Кашилица, t до 38,6 °C, отпаднало; отслабено везикуларно дишане, множество средни и дребни влажни | 68% PMNL, деформирани клетки с метаплазия | <i>P. aeruginosa</i> – wild type, мукоеген | WBC 7,0 G/l Sg 69% Thr 215 G/l CYE 47 mm/h | Рентгенография – пневмония | Цефтриаксон + Амикацин 10 дни; Ципрофлоксацин + Кларитромицин 14 дни, i.v. |
| 17 | 05.06.2006 | А. А., 15 г. | В добро клинично състояние | 46% PMNL, деформирани епит. клетки, слуз | <i>P. aeruginosa</i> – wild type | WBC 8,8 G/l Sg 51,4 Thr 322 G/l CYE 17 mm/h | Спирометрия – смесен тип вентилаторна недостатъчност | Инхалаторно Тобрамицин 28 дни |
| 34 | 13.12.2006 | А. А., 16 г. | Кашилица, субфебрилна температура, дребни влажни хрипове вляво | 29% PMNL, 9% Eo, дрожди | <i>P. aeruginosa</i> – wild type, мукоеген | WBC 8,5 G/l Sg 53,6% Thr 318 G/l CYE 19 mm/h | Спирометрия – смесен тип вентилаторна недостатъчност | Ципрофлоксацин 14 дни, p.o. |
| 40 | 19.02.2007 | А. А., 16 г. | Кашилица, субфебрилна температура, дребни влажни хрипове вляво | 31% PMNL, 2% Eo, плоски епит. клетки, дрожди | <i>P. aeruginosa</i> – wild type, мукоеген | WBC 10,6 G/l Sg 63% Thr 325 G/l CYE 21 mm/h | Спирометрия – смесен тип вентилаторна недостатъчност, влошени стойности на FEV ₁ и FVK (сравнение с 13.12.2006) | Инхалаторно Амикацин + Ципрофлоксацин p.o., 28 дни |
| 41 | 21.02.2007 | М. Т., 17 г. | Кашилица, t до 38,9 °C; отслабено везикуларно дишане, средни и дребни влажни хрипове; хепатоспленомегалия; цироза и диабет | 29% PMNL, слуз, епит. клетки със 70% метаплазия | <i>P. aeruginosa</i> – мукоеген тип, wild type чувствителност | Hb 103 g/l WBC 3,4 G/l Sg 59% CYE 18 mm/h CRP 0,9 mg/l | Спирометрия – смесен тип вентилаторна недостатъчност Рентгенография – пневмония | Меропенем 14 дни i.v. |
| 5 | 14.12.2008 | В. Й., 15 г. | Кашилица, t 38,4 °C, дребни влажни хрипове вляво | III ст. клет. богатство 44% PMNL, 8% Eo, дрожди | 2 морфотипа <i>P. aeruginosa</i> (мукоеген и немукоеген) | WBC 12,9 G/l Sg 68% Thr 328 G/l CYE 25 mm/h CRP 5,2 mg/l | Рентгенография – пневмония и емфизем | Меропенем 14 дни i.v. |

Табл. 2. (продължение) Клинично-лабораторна информация за пациентите с муковисцидоза, от които са изолирани щамове *P. aeruginosa* с амплифициран ген за неураминидаза

*Забележка: „Wild type“ чувствителност означава чувствителност към всички антипсевдомонадни антибиотици

ни левкоцити в периферната кръв, анемия, ускорена СУЕ, повишена концентрация на С-реактивния протеин; доказване на смесен тип вентилаторна недостатъчност (обструкция и рестрикция) при спирометрия; чести пневмонии и микробиологично доказване на *P. aeruginosa*, а често и на други причинители на респираторни инфекции в храчките. Таблицата представя еволюцията на основното заболяване на четирима пациенти (Т. Т., М. С., Г. М. и А. А.), които бяха определени като „хронично колонизирани с *P. aeruginosa*, с рецидивиращи екзацербации на бронхопулмоналните инфекции“. За нещастие, едно от децата почина в началото на 2008 г.

Изводи

1. Слаймът, изграден от екзополизахарида алгинат, беше определен като основен адхезивен фактор на проучените респираторни изолати *P. aeruginosa* от пациенти с MV.

2. Относително ниският дял на EhoS-продуциращи изолати *P. aeruginosa* се свърза с факта, че бронхопулмоналните екзацербации не бяха доми-

нираща форма на инфекцията сред мониторираните пациенти.

3. Честотата на гена, кодиращ неураминидаза, беше средно висока и в пряка корелация с преобладаващия относителен дял на пациенти в стабилно клинично състояние, без склонност към повтарящи се екзацербации на бронхопулмоналните инфекции. Молекулярно-генетичното доказване на този ген може да се използва като индиректно средство за оценка на прогресията на белодробното заболяване при пациенти с MV.

Благодарност. Проучването е финансирано по Проект № 4/2009 г., Договор № 20/2009 г. от Конкурса „Грант 2009“ на СМН, Медицински университет, София.

Литература

1. Стратева, Т. (2008). Микробиологични и молекулярно-генетични проучвания върху механизмите на резистентност и факторите на вирулентност на клинични щамове *Pseudomonas aeruginosa*. Дисертация за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“, специалност 01.06.12 „Микробиология“.

Пълната библиографска справка е на разположение в издателството и може да бъде представена при поискване.