

Agnieszka Iwańska¹, Joanna Nowak¹, Wojciech Skorupa², Ewa Augustynowicz-Kopeć¹

¹Zakład Mikrobiologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie
Kierownik: dr hab. n. med. prof. nadzw. E. Augustynowicz-Kopeć

²I Klinika Chorób Płuc, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. med. J. Kuś

Analiza częstości izolacji i profil lekooporności drobnoustrojów izolowanych z dróg oddechowych dorosłych chorych na mukowiscydozę leczonych w Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc w latach 2008–2011

Analysis of the frequency of isolation and drug resistance of microorganisms isolated from the airways of adult CF patients treated in the Institute of Tuberculosis and Lung Disease during 2008–2011

Praca nie była finansowana.

Abstract

Introduction: Cystic fibrosis (CF) is the most common genetic autosomal recessive genetic disease. The most serious symptoms are observed in the lungs. Recurrent respiratory infections are the main causes of the hospitalizations and deaths of cystic fibrosis patients. Pathogens that commonly infect the airways of adult CF patients include *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The aim of this study was to analyse the microorganisms cultured from the airways of adult CF patients and to test the antimicrobial resistance of the most frequently isolated bacteria.

Material and methods: In this study, 1422 isolates of 89 CF patients were collected during a 4-year period. The microorganisms were cultured and identified according to standard microbiological procedures. Identification and drug susceptibility were performed in an automatic system Phoenix (BD), Vitek2Compact (bioMérieux), and disk-diffusion method by Kirby-Bauer.

Results: Among the 1422 strains the most frequent pathogens were *Pseudomonas aeruginosa* (55.6%) and *Staphylococcus aureus* (37.8%). A total of 482 (61.0%) strains of 790 isolates of *P. aeruginosa*, were identified as *P. aeruginosa* mucoid phenotype. The isolates with mucoid phenotypes were more susceptible to antibiotics than non-mucoid. Eighty-six strains of *S. aureus* showed resistance to methicillin (MRSA), which accounted for 16.0% of all strains of *S. aureus*.

Conclusions: The analysis of microbiological materials from adult CF patients treated in IGiChP allowed the determination of the prevalence of potentially pathogenic microorganisms. The data obtained are consistent with the literature.

Key words: antimicrobial resistance, cystic fibrosis, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*

Pneumonol. Alergol. Pol. 2013; 81: 105–113

Streszczenie

Wstęp: Mukowiscydoza (CF) jest najczęściej występującą chorobą genetyczną dziedziczną w sposób autosomalny recesywny. Jest to choroba wielonarządowa, w której o jakości i długości życia chorych decyduje przede wszystkim stopień zaawansowania zmian w układzie oddechowym. Nawracające infekcje bakteryjne układu oddechowego są częstą przyczyną hospitalizacji i zgonów chorych na mukowiscydozę. Drobnoustrojami głównie zakażającymi drogi oddechowe dorosłych chorych na mukowiscydozę są *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*. Celem badania była analiza mikroorganizmów

Adres do korespondencji: mgr Agnieszka Iwańska, Zakład Mikrobiologii IGiChP, ul. Płocka 26, 01–138 Warszawa, tel./faks: 22 431 21 82, e-mail: a.pacholczyk@igichp.edu.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 10.07.2012 r.

Copyright © 2013 Via Medica

ISSN 0867–7077

izolowanych z dróg oddechowych dorosłych chorych na mukowiscydozę i określenie lekooporności najczęściej izolowanych patogenów.

Materiał i metody: Materiał do badań stanowiły 1422 szczepy izolowane od 89 chorych w okresie 4 lat. Do izolacji i identyfikacji szczepów stosowano standardowe procedury bakteriologiczne. Oznaczenie lekowrażliwości szczepów przeprowadzono w automatycznym systemie Phoenix (BD) i Vitek2Compact (bioMérieux) oraz metodą dyfuzyjno-krażkową wg Kirby-Bauera.

Wyniki: W naszym badaniu, wśród 1422 szczepów najczęściej izolowanymi patogenami były *Pseudomonas aeruginosa* (55,6%) i *Staphylococcus aureus* (37,8%). 482 (61,0%) z 790 szczepów *P. aeruginosa* zidentyfikowano, jako fenotyp śluzowy. W badaniu wykazano, że szczepy *P. aeruginosa* o fenotypie śluzowym cechowała większa wrażliwość na antybiotyki niż szczepy nieśluzowe. Osiemdziesiąt sześć szczepów *S. aureus* wykazywało oporność na metycylinę (MRSA), co stanowiło 16,0% wszystkich wyizolowanych od chorych szczepów *S. aureus*.

Wnioski: Przeprowadzona analiza mikrobiologiczna materiałów pochodzących od dorosłych chorych na mukowiscydozę leczonych w IGiChP pozwoliła na ustalenie częstości występowania u nich drobnoustrojów potencjalnie patogennych. Uzyskane dane są zgodne z danymi literaturowymi.

Słowa kluczowe: lekooporność, mukowiscydoza, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*

Pneumonol. Alergol. Pol. 2013; 81: 105–113

Wstęp

Mukowiscydoza (CF, *cystic fibrosis*) jest najczęstszą chorobą genetyczną u ludzi, dziedziczną w sposób autosomalny recesywny. Przyczyną choroby są mutacje pojedynczego genu *CFTR* zlokalizowanego na długim ramieniu chromosomu 7 [1, 2]. Produktem genu jest białko CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) regulujące przepływ jonów chlorkowych przez błony komórek nabłonka. Mutacje i wynikające z nich zaburzenia transportu jonów są przyczyną nieprawidłowej czynności gruczołów zewnątrzwydzielniczych zlokalizowanych głównie w układzie oddechowym, przewodzie pokarmowym oraz narządach płciowych [1–4].

Mukowiscydoza jest chorobą wielonarządową, jednak o jakości i długości życia chorych decyduje przede wszystkim stopień zaawansowania zmian w układzie oddechowym [5–7]. Efektem mutacji białka CFTR jest zmniejszenie żółtej warstwy płynu okołorzęskowego, osłabienie ruchu rzęsek oraz upośledzenie oczyszczania śluzowo-rzęskowego, które jest jednym z podstawowych mechanizmów obronnych w drogach oddechowych [8, 9]. W wyniku tych zaburzeń dochodzi do produkcji nadmiernie lepkiego i gęstego śluzu, którego zaleganie sprzyja kolonizacji bakteryjnej i tworzeniu biofilmu utrudniającego dostęp komórek fagocytujących i leków do miejsca zakażenia.

W wyniku procesu zapalnego wywołanego rozwijającym się zakażeniem bakteryjnym dochodzi do zniszczenia oskrzeli i tkanki płuc o różnym stopniu nasilenia, a ostatecznie do wystąpienia przewlekłej niewydolności oddechowej [1, 9–11].

Etiologia zakażeń bakteryjnych u chorych na mukowiscydozę zmienia się z wiekiem i zależy od stopnia zaawansowania choroby [5, 12]. Od cho-

rych dzieci izoluje się przede wszystkim bakterie z gatunku *Staphylococcus aureus* oraz *Haemophilus influenzae*. Wraz z rozwojem choroby, od dorosłych chorych z dróg oddechowych izolowane są głównie pałeczki *Pseudomonas aeruginosa*, rzadziej *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia* complex (*Bcc*), *Achromobacter* spp. [2, 9, 13–16].

Szczególne znaczenie kliniczne w mukowiscydozie przypisuje się zakażeniom wywołanym przez pałeczki *P. aeruginosa* [7, 9, 13]. W początkowej fazie choroby następuje kolonizacja dróg oddechowych szczepami tego gatunku bez otoczki śluzowej. W procesie przewlekłego zakażenia obserwuje się konwersję szczepów *P. aeruginosa* do postaci śluzowej, której fenotyp związany jest ze wzmożonym wydzielaniem egzokomórkowego polisacharydu [17–19]. Szczepy takie wykazują zmianę morfologii kolonii, zmianę formy gładkiej na szorstką lipopolisacharydu (LPS, *lipopolisaccharide*) wynikającą z skrócenia łańcuchów O-swoistych, ograniczoną aktywność proteolityczną. Wiele szczepów *P. aeruginosa* o fenotypie śluzowym pozbawionych jest możliwości wytwarzania rzęsek i pili. Fenotyp śluzowy *P. aeruginosa* u dorosłych chorych jest czynnikiem pogłębiającym uszkodzenia oskrzeli i płuc [8, 18, 20]. Całkowita eradykacja patogenu z organizmu chorego nie jest możliwa, istnieje jedynie szansa na redukcję liczby bakterii w miejscu infekcji i miejscowe ograniczenie procesu zapalnego. Wczesne wykrycie *P. aeruginosa* pozwala na podjęcie próby intensywnego leczenia w celu opóźnienia przejścia zakażenia w formę przewlekłą [10, 13, 19–22].

U chorych na mukowiscydozę obserwuje się również zakażenia metycylinoopornymi szczepami *Staphylococcus aureus* MRSA (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*). Według danych *Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry* z 2010 roku

szczepu MRSA wyhodowano od 25,7% chorych na mukowiscydozę [13, 23, 24].

Zakażenia bakteryjne w tej grupie chorych stanowią poważny problem diagnostyczny i terapeutyczny. Zapewnienie chorym jak najlepszej opieki wymaga ścisłej współpracy klinicysty i mikrobiologa. Wynik badania mikrobiologicznego umożliwia wdrożenie terapii ukierunkowanej na właściwy czynnik etiologiczny zakażenia. Zastosowanie intensywnej, właściwej dla danego zakażenia, antybiotykoterapii zmniejsza częstość zaostrzeń, spowalnia postęp choroby i wydłuża życie chorych na mukowiscydozę [7, 9, 16]. Wiarygodność wyniku jest uzależniona od właściwego pobrania materiału i czasu jego transportu do laboratorium. Zbyt długi czas upływający między pobraniem materiału, a wykonaniem badania mikrobiologicznego, oraz niewłaściwe warunki przechowywania i transportu próbek mogą spowodować brak wzrostu niektórych drobnoustrojów [8, 25, 26].

Ocena mikrobiologiczna materiału z dróg oddechowych jest niezwykle trudna i wynika przede wszystkim z obecności bogatej flory bakteryjnej w tym materiale, co utrudnia właściwe określenie czynnika etiologicznego zakażenia.

Intensywnie namnażający się *P. aeruginosa* o fenotypie śluzowym uniemożliwia izolację bakterii Gram-dodatnich, takich jak *S. aureus* oraz bardziej wymagających pałeczek Gram-ujemnych, *H. influenzae* i *B. cepacia complex*. Stosowanie selektywnych pożywek hamujących wzrost *P. aeruginosa* jest pomocne w izolacji *S. aureus* i *H. influenzae* oraz konieczne do izolacji *B. cepacia complex* [5, 7, 11, 26].

W mikrobiologicznej diagnostyce mukowiscydozy należy podkreślić ważność przedłużenia hodowli do 48 godzin ze względu na wolnorosnące szczepy *P. aeruginosa* o fenotypie śluzowym oraz szczepy *S. aureus* SCVs (*small colony variants*). Hodowlę pałeczek Bcc można wydłużyć nawet do 5 dni [5, 7, 11, 26].

Ocena lekooporności szczepów *P. aeruginosa* jest stale obszarem wielu kontrowersji. Wynika to z obecności różnych morfotypów kolonii i zróżnicowanej wrażliwości na antybiotyki w obrębie jednego genotypu szczepu izolowanego z materiału diagnostycznego. Wytyczne *The UK Cystic Fibrosis Trust Microbiology Laboratory Standards Working Group* z września 2010 roku [26] zalecają ocenę lekooporności szczepów *P. aeruginosa* metodą dyfuzyjno-krążkową i/lub oznaczania wartości MIC (*minimum inhibitor concentration*), ponieważ ocena wrażliwości na antybiotyki metodą automatyczną generuje zbyt dużo błędów [18, 26, 27].

Postęp w rozwoju medycyny wpływa na wydłużenie średniej długości życia chorych na mu-

kowiscydozę. Jednak stale wzrastający odsetek dorosłych niesie za sobą konieczność zapewnienia chorym specjalistycznej opieki. Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc jest jedną z nielicznych jednostek w Polsce zajmujących się leczeniem dorosłych chorych na mukowiscydozę.

Celem pracy była ocena udziału gatunkowego drobnoustrojów izolowanych z materiałów klinicznych od chorych na mukowiscydozę leczonych w Przychodni Przyklinicznej i I Klinice Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w okresie od stycznia 2008 do grudnia 2011 roku oraz ocena lekooporności izolowanych szczepów.

Materiał i metody

Analizą objęto 89 chorych na mukowiscydozę leczonych w IGIChP w latach 2008–2011, hospitalizowanych w I Klinice Chorób Płuc IGIChP i leczonych ambulatoryjnie w Przychodni Przyklinicznej IGIChP. Materiał do badań stanowiły 1422 szczepy izolowane z 1078 materiałów (1062 płwociny i 16 materiałów bronchoskopowych).

Szczepy bakteryjne

Szczepy identyfikowano rutynowymi metodami diagnostycznymi. Analizowano właściwości fenotypowe, cechy biochemiczne oraz wrażliwość na leki badanych szczepów. Diagnostykę mikrobiologiczną przeprowadzono na podstawie posiewów wykonanych na podłożach stałych: *Columbia blood agar* (bioMérieux, Oxoid), *MacConkey agar* (bioMérieux, Oxoid), *Mannitol-salt agar* (bioMérieux, Oxoid), *Chocolate agar* (bioMérieux, Oxoid) i podłoże do identyfikacji *Burkholderia cepacia complex* (BD Cepacia Medium). *Columbia blood agar* i *Chocolate agar* inkubowano przez 24 i 48 godzin w temperaturze 35–37°C w atmosferze 5–10% CO₂, *MacConkey agar*, BD Cepacia Medium oraz *Mannitol-salt agar* przez 24 i 48 godzin w temperaturze 35–37°C. Przynależność gatunkową wyhodowanych szczepów określano z użyciem systemu automatycznego Phoenix (BD) i Vitek-2Compact (bioMérieux). W identyfikacji szczepów *P. aeruginosa*, *H. influenzae* i *Streptococcus beta-hemolyticus* wykorzystywano testy komercyjne. *P. aeruginosa* identyfikowano na podstawie dodatniego testu na oksydazę oraz klasyczne testy biochemiczne. Pałeczki *H. influenzae* klasyfikowano do określonego gatunku na bazie zapotrzebowania na czynniki wzrostowe V (NAD) i X (hemina) oraz testem API NH (bioMérieux). Określenie przynależności paciorkowców beta-hemolizujących (*Streptococcus beta-haemolyticus*) do grupy wykonywano testem lateksowym do typowania

grupowego paciorkowców z grup serologicznych A, B, C, D, F i G według Lancefield Slidex Strepto Plus (bioMérieux).

Szczepy *S. aureus* identyfikowano w systemie automatycznym oraz testami: 1) lateksowy Slidex-Staph Kit (bioMérieux); 2) probówkowy — oceniający zdolność produkcji koagulazy, przy użyciu osocza liofilizowanego (BectonDickinson).

Testy oporności

Lekooporność szczepów określano w systemie automatycznym Phoenix (BD) i Vitek2Compact (bioMérieux). Wrażliwość na badane antybiotyki szczepów *P. aeruginosa* określano metodą dyfuzyjno-krążkową Kirby-Bauera i/lub oznaczając MIC z wykorzystaniem pasków z gradientem stężeń leków. Aktywność leków *in vitro* dla pałeczek *H. influenzae* wykonywano na podłożu HTM (*Haemophilus Test Medium*) metodą dyfuzji z krążków bibułowych. Wrażliwość szczepów paciorkowców beta-hemolizujących określano na podłożu *Mueller-Hinton 2 with Sheep Blood* (bioMérieux). W związku z wprowadzeniem od maja 2011 roku zaleceń oznaczeń lekowrażliwości według Europejskiego Komitetu ds. Oznaczeń Lekowrażliwości (EUCAST, *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) lekooporność szczepów *Haemophilus influenzae* oraz paciorkowców beta-hemolizujących oceniano na podłożu *Mueller-Hinton with Horse Blood + 20 mg/l beta-NAD*.

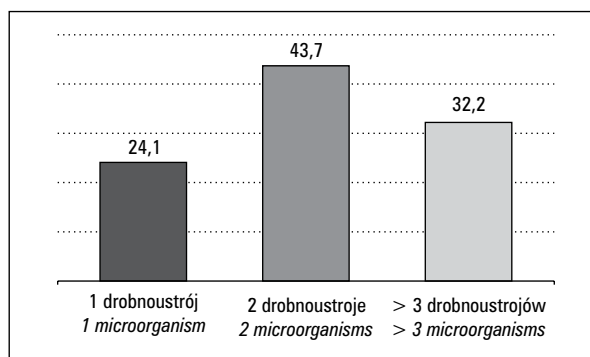
Interpretację wyników prowadzono na podstawie rekomendacji Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów oraz zaleceń amerykańskich *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), a od maja 2011 roku zgodnie z zaleceniami Konsultanta Krajowego w dziedzinie mikrobiologii lekarskiej według Europejskiego Komitetu ds. Oznaczeń Lekowrażliwości EUCAST.

Wyniki

Analizą objęto 89 chorych na mukowiscydozę w wieku 19–42 lat (49 kobiet i 40 mężczyzn) leczonych w IGiChP w latach 2008–2011.

Wśród 89 chorych od 22 (24,7%) izolowano tylko jeden drobnoustrój, od 39 (43,8%) dwa (najczęściej *S. aureus* i *P. aeruginosa*), a od 28 (31,5%) trzy i więcej (ryc. 1).

Analizie poddano 1078 materiałów uzyskanych z dróg oddechowych chorych na mukowiscydozę. Z badanego materiału wyhodowano 1422 szczepy. Pałeczki *P. aeruginosa* izolowano od 74 (83,1%) chorych leczonych w IGiChP. Szczepy o fenotypie śluzowym wyhodowano od 49 (55,1%), a o fenotypie nieśluzowym od 55 (61,8%) chorych leczonych



Rycina 1. Odsetek chorych w zależności od ilości izolowanych drobnoustrojów

Figure 1. The percentage of patients depending on the number of isolated microorganisms

w IGiChP. W badanej grupie 89 chorych od 68 (76,4%) izolowano szczepy *S. aureus*, w tym u 16 chorych (18,0%) stwierdzono *S. aureus* MRSA (tab. 1).

Spośród wszystkich badanych szczepów 790 (55,6%) zaklasyfikowano do gatunku *P. aeruginosa*, a 538 (37,8%) do gatunku *S. aureus*. Pałeczki Gram-ujemne reprezentowane były przez gatunki: *S. marcescens* (0,9%), *K. pneumoniae* (0,7%), *E. coli* (0,6%), *Enterobacter* spp. (0,2%). Wśród pałeczek niefermentujących innych niż *P. aeruginosa* wyosobniono 14 szczepów *S. maltophilia* (0,9%) oraz 4 szczepy pałeczek *A. baumannii* complex (0,3%). Z analizowanych materiałów izolowano *Achromobacter* spp. — 22 szczepy (1,5%), *H. influenzae* — 11 szczepów (0,8%) oraz 9 szczepów paciorkowców beta-hemolizujących (0,7%).

Na rycinie 2 przedstawiono udział gatunkowy drobnoustrojów izolowanych z materiałów klinicznych od chorych na mukowiscydozę w latach 2008–2011.

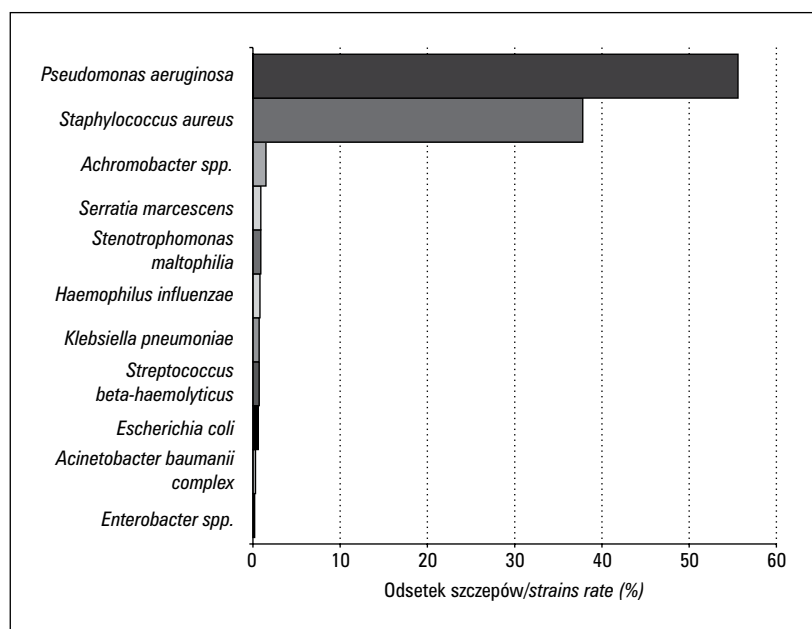
Wśród 790 badanych szczepów *P. aeruginosa* 482 (61,0%) sklasyfikowano jako fenotyp śluzowy.

Analiza lekooporności fenotypów śluzowego i nieśluzowego wykazała większą wrażliwość fenotypu śluzowego na badane antybiotyki. Odsetek szczepów *P. aeruginosa* fenotypu śluzowego wrażliwych na aminoglikozydy wynosił od 42,5% (na gentamycynę) do 67,4% (na tobramycynę), dla fenotypu nieśluzowego 25,7% (na gentamycynę) do 50,7% (na tobramycynę). Wrażliwość na antybiotyki beta-laktamowe kształtowała się od 66,0% (na ceftazydym) do 72,2% (meropenem) dla fenotypu śluzowego i od 46,1% (na piperacylinę z tazobaktamem) do 56,2% (na meropenem) dla fenotypu nieśluzowego. Wrażliwość na ciprofloksacynę wynosiła 59,1% dla fenotypu śluzowego i 41,2% dla fenotypu nieśluzowego. Wszystkie badane szczepy wykazywały wrażliwość na kolistynę (ryc. 3).

Tabela 1. Drobnoustroje izolowane z dróg oddechowych od 89 chorych na mukowiscydozę

Table 1. Microorganisms isolated from the airways of 89 patients with cystic fibrosis

Drobnoustrój/ <i>Microorganism</i>		Liczba izolatów (n = 1422) Number of isolates (%)	Liczba chorych (n = 89) Number of patients (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Fenotyp nieśluzowy <i>Mucoid phenotype</i>	308 (21,7)	55 (61,8)
	Fenotyp śluzowy <i>Non-mucoid phenotype</i>	482 (33,9)	49 (55,1)
	Fenotyp śluzowy + nieśluzowy <i>Mucoid and non-mucoid phenotype</i>	–	64 (71,9)
<i>Staphylococcus aureus</i>	MSSA	452 (31,8)	68 (76,4)
	MRSA	86 (6,0)	16 (18,0)
<i>Achromobacter</i> spp.		22 (1,5)	8 (9,0)
<i>Serratia marcescens</i>		14 (0,9)	5 (5,6)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		14 (0,9)	7 (7,9)
<i>Haemophilus influenzae</i>		11 (0,8)	7 (7,9)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		9 (0,7)	3 (3,4)
<i>Streptococcus</i> beta-haemolyticus (gr. C, G)		9 (0,7)	4 (4,5)
<i>Escherichia coli</i>		8 (0,6)	2 (2,2)
<i>Acinetobacter baumannii</i> complex		4 (0,3)	2 (2,2)

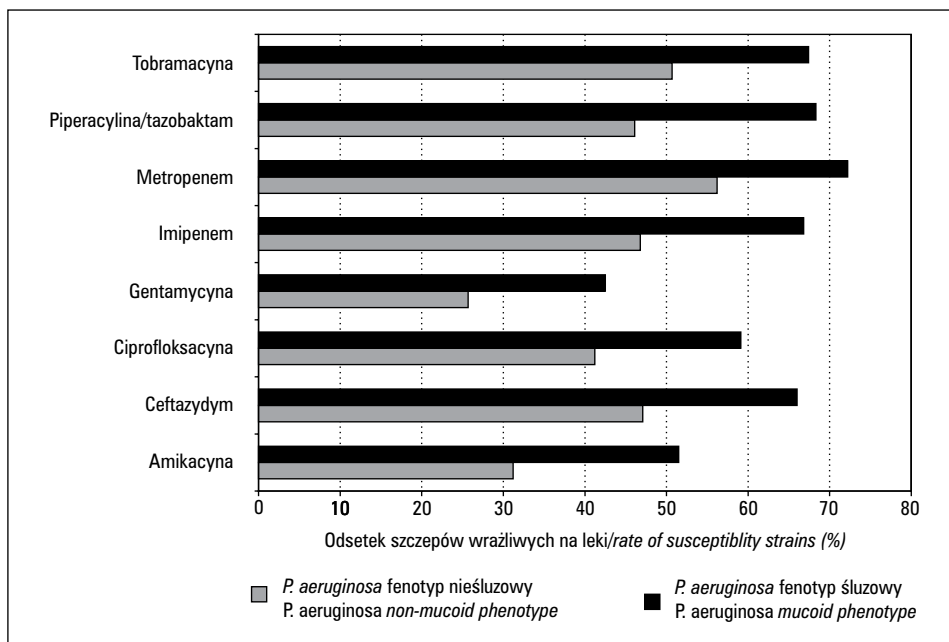


Rycina 2. Udział gatunkowy drobnoustrojów izolowanych z materiałów klinicznych od dorosłych chorych na mukowiscydozę (n = 1422)

Figure 2. Prevalence of pathogens identified from respiratory specimens in adult patients with cystic fibrosis (n = 1422)

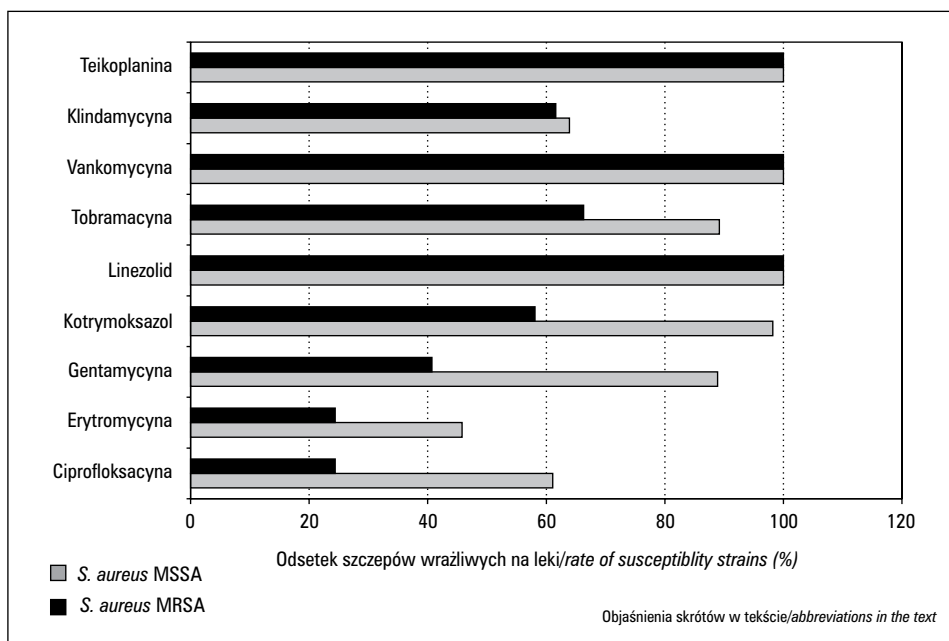
Wszystkie szczepy *S. aureus* MSSA (*methicillin-sensitive Staphylococcus aureus*) wykazywały wrażliwość na linezolid i glikopeptydy (wankomycyna i teikoplanina). Ponad

90% badanych szczepów było wrażliwych na trimetoprim/sulfametoksazol, a 88,9% na tobramycynę. Odsetek szczepów wrażliwych na erytromycynę wynosił 45,8%, na klindamycynę



Rycina 3. Wrażliwość szczepów *P. aeruginosa* na antybiotyki (n = 790)

Figure 3. Sensitivity of *P. aeruginosa* to antibiotics (n = 790)



Rycina 4. Wrażliwość szczepów *S. aureus* na antybiotyki (n = 538)

Figure 4. Sensitivity of *S. aureus* to antibiotics (n = 538)

63,9%. Na ciprofloksacynę wrażliwych było 61,1% szczepów.

Wśród 538 szczepów *S. aureus* 86 (16,0%) wykazywało oporność na metycylinę. Analizowane szczepy *S. aureus* MRSA charakteryzowała niższa wrażliwość na badane antybiotyki niż szczepy *S. aureus* MSSA. Ponad 50% badanych szczepów

S. aureus MRSA wrażliwa była na trimetoprim/sulfametoksazol, a 66,3% na tobramacynę. Wrażliwość na erytromycynę wynosiła 24,4%, na klindamycynę 61,6%. Na ciprofloksacynę wrażliwych było 24,4% szczepów. Wszystkie szczepy *S. aureus* MRSA wykazywały wrażliwość na linezolid i glikopeptydy (wankomycyna i teikoplanina) (ryc. 4).

Dyskusja

Zmiany w układzie oddechowym w przebiegu przewlekłej choroby oskrzelowo-płucnej decydują o jakości i długości życia chorych na mukowiscydozę [4–7, 28–30]. Dane z literatury wskazują na zależny od wieku chorego udział gatunkowy patogenów w zakażeniach dróg oddechowych chorych na mukowiscydozę [12].

Właściwe leczenie chorych na mukowiscydozę jest warunkiem przedłużenia ich życia, dlatego niezbędne jest monitorowanie występowania drobnoustrojów w drogach oddechowych chorych oraz oznaczanie lekooporności wyizolowanych szczepów [5, 7, 28, 29].

Leczenie zakażeń dróg oddechowych chorych na mukowiscydozę jest efektywne, jeżeli opiera się na wynikach badań mikrobiologicznych uwzględniających lekooporność izolowanych drobnoustrojów [31]. Dlatego ważna jest znajomość lokalnej flory bakteryjnej i jej lekooporności, szczególnie w przypadkach, gdy należy włączyć leczenie empiryczne [11].

Diagnostyka mikrobiologiczna zakażeń dolnych dróg oddechowych obejmuje posiewy płwociny, wydzieliny oskrzelowej lub popłuczyn pęcherzykowo-oskrzelowych [27]. W prezentowanej pracy najczęstszym materiałem uzyskanym od chorych była płwocina (98,5%).

Wśród chorych na mukowiscydozę dzieci w pierwszych latach choroby zakażenia spowodowane przez szczepy *Staphylococcus aureus* i *Haemophilus influenzae* prowadzą do uszkodzeń nabłonków, ułatwiając kolonizację przez inne drobnoustroje. Gatunkiem najczęściej izolowanym od dorosłych chorych na mukowiscydozę jest *Pseudomonas aeruginosa*, powodujący przewlekłe zakażenie z następowymi zaostrzeniami [7, 9, 11, 16].

W analizowanej pracy dokonano analizy częstości izolacji drobnoustrojów oraz wrażliwości uzyskanych szczepów od dorosłych chorych na mukowiscydozę leczonych w IGiChP w Warszawie.

W prezentowanej grupie przeważali chorzy, od których izolowano dwa patogeny — 39 (43,8%). Trzy i więcej patogeny wyizolowano od 28 (31,5%), zaś jeden patogen wyhodowano od 22 (24,7%) chorych. W badaniach Moore i wsp. najliczniejszą grupę stanowili chorzy, od których izolowano tylko jeden drobnoustrój 53%, od 38% chorych wyosobniono dwa, a od pozostałych 4% izolowano trzy drobnoustroje [28]. Odmienny profil izolacji drobnoustrojów od chorych na mukowiscydozę przedstawili Paixão i wsp. Stwierdzili oni, że od 85% chorych izolowany był tylko jeden drobnoustrój [12].

W naszych badaniach w zakażeniach dróg oddechowych dorosłych chorych na mukowiscydozę przeważały infekcje o etiologii *P. aeruginosa*, co jest zgodne z doniesieniami innych autorów [27, 28, 32]. Od 83,1% chorych izolowano pałeczki *P. aeruginosa*, w większości (61,8%) fenotyp nieśluzowy. W badaniach prezentowanych przez Valenza i wsp. [30] oraz Paixão i wsp. [12] również uzyskano wyniki wskazujące na wyższe odsetki *P. aeruginosa* fenotypu nieśluzowego w grupie dorosłych chorych. Natomiast Paschola i wsp. wykazali u chorych wyższe odsetki *P. aeruginosa* o fenotypie śluzowym [32]. Według badaczy istnieje ścisły związek między obecnością śluzowych szczepów *P. aeruginosa* a pogorszeniem wskaźników czynnościowych układu oddechowego chorych na mukowiscydozę, ponieważ pałeczki o fenotypie śluzowym nie poddają się eradykacji i wykazują wysoką oporność na antybiotyki [9, 12, 20].

Prezentowane wyniki wskazują na wyższą wrażliwość na antybiotyki *P. aeruginosa* o fenotypie śluzowym niż szczepów nieśluzowych. Najwyższą aktywność wobec wszystkich badanych szczepów *P. aeruginosa* wykazywała kolistyna, karbapenemy i połączenia β -laktamów z inhibitorami (piperacylina/tazobaktam). Podobne wyniki uzyskali Srfuengfung i wsp. [33] oraz Valenza i wsp. [30]. W badaniach Paixão i wsp. [12] wykazano większą wrażliwość na antybiotyki szczepów *P. aeruginosa* o fenotypie nieśluzowym. Niezależnie jednak od fenotypu oporności, izolowanie od chorych szczepów o fenotypie śluzowym jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym, ponieważ szczepy te, wytwarzając egzopolisacharydową otoczkę, stają się odporne na fagocytozę.

W prezentowanej pracy wykazano, że drugim co do częstości występowania drobnoustrojem izolowanym od chorych był *S. aureus*. Dane te są zbieżne z innymi doniesieniami, gdzie częstość kolonizacji szczepami *S. aureus* wynosiła od 10,1% do 57,0% [17, 27, 28, 30, 32].

Problem w leczeniu zakażeń o etiologii *S. aureus* stanowią szczepy odporne na metycylinę. W prezentowanych badaniach szczepy *S. aureus* odporne na metycylinę (MRSA) wyizolowano od 18,0% chorych, co nie odbiega od badań z innych ośrodków. W Stanach Zjednoczonych MRSA izolowano od 18,8% [27], w Hiszpanii od 18,0% [34], w Brazylii od 6%, a w Niemczech od 5% chorych [30]. Ryzyko pojawiania się szczepów MRSA wśród chorych zwiększa się wraz z liczbą i długością hospitalizacji. Valenza i wsp. sugerują, że rozpowszechnienie wystąpienia szczepów *S. aureus* MRSA u chorych na mukowiscydozę koreluje z częstością występowania zakażeń o etiologii

MRSA w wielu innych grupach chorych w danym kraju [30].

Wśród analizowanych szczepów *S. aureus* większość była wrażliwa na cefoksytynę, co jest związane z wrażliwością na penicyliny izoksazylowe, penicyliny z inhibitorem β -laktamaz i cefalosporyny aktywne wobec *Staphylococcus*. W badanym materiale wszystkie szczepy *S. aureus* wrażliwe były na glikopeptydy oraz linezolid. Podobne wyniki uzyskali Valenza i wsp. oraz Paixão i wsp. [12, 30].

Wielu badaczy donosi o izolacji z materiałów klinicznych z dróg oddechowych dorosłych chorych na mukowiscydozę patogenów takich jak: *Stenotrophomonas maltophilia* i *Achromobacter* spp. W niniejszym materiale również potwierdzono występowanie tych drobnoustrojów. Częstość występowania *S. maltophilia* i *Achromobacter* spp. w analizowanej grupie chorych wynosiła 0,9% i 1,5%. Burns i wsp. uzyskali wyższe odsetki występowania wymienionych wyżej drobnoustrojów odpowiednio 10,3% i 8,7% [27]. Nieznany jest wpływ wymienionych patogenów na przebieg choroby oraz długość życia chorych. Obserwowany wzrost częstości izolacji może wynikać z ułatwionej kolonizacji zmienionej niszy ekologicznej chorych na mukowiscydozę [29, 35].

Jak wynika z danych piśmiennictwa, *H. influenzae* jest często izolowany z materiałów klinicznych chorych na mukowiscydozę w początkowej fazie choroby, rzadko w trzeciej dekadzie życia [8, 16, 18]. Wyniki uzyskane w naszej pracy potwierdzają, że w grupie dorosłych chorych odsetek izolowanych szczepów pałeczek *Haemophilus* był niski i wynosił 7,9% chorych. Według danych z literatury odsetek dorosłych chorych, od których izolowano ten gatunek, wahał się od 1,5% do 24,0% [17, 30, 32, 36].

Od początku lat osiemdziesiątych z materiałów klinicznych od chorych na mukowiscydozę izoluje się pałeczki *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) [6, 9, 18]. W chwili obecnej wyodrębnia się 10 odmian wariantów genomowych tego patogenu. Od chorych na mukowiscydozę najczęściej izoluje się gatunek *B. cenocepacia* i *B. multivorans*. Choć częstość kolonizacji Bcc w mukowiscydozie jest niewielka, to obecność patogenu w posiewie jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym [13, 14, 31]. Występowanie pałeczek Bcc w drogach oddechowych jest powiązane z pogorszeniem funkcji płuc i wzrostem częstości hospitalizacji oraz bywa powodem dyskwalifikacji chorych do przeszczepienia płuc. Następstwem zakażeń Bcc są martwicze zapalenia płuc, często powikłane rozwojem posocznicy [2]. Ponadto problemem

terapeutycznym jest oporność Bcc na wiele grup antybiotyków i chemioterapeutyków. Odsetek izolacji Bcc różni się znacznie w poszczególnych ośrodkach i prawdopodobnie wynika z możliwości identyfikacji patogenu oraz transmisji szczepów między chorymi lub zakażeniami z nieznanymi źródłami [6, 13, 15, 16, 18]. W przedstawionej pracy w grupie dorosłych chorych nie izolowano pałeczek z rodzaju *Burkholderia*. Podobne wyniki przedstawił w swojej pracy Perpati i wsp. [36]. W pracach innych autorów odsetek izolacji Bcc wahał się od 1,8% do 22,5% [28, 29, 32].

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy i dane zawarte w publikacjach potwierdzają konieczność prowadzenia u chorych na mukowiscydozę systematycznych badań mikrobiologicznych w celu umożliwienia klinicyście prowadzenia prawidłowej terapii.

Wnioski

1. Przeprowadzona analiza mikrobiologiczna materiałów pochodzących od dorosłych chorych na mukowiscydozę leczonych w IGIChP pozwoliła na ustalenie częstości występowania u nich drobnoustrojów potencjalnie patogennych:
 - w zakażeniach dolnych dróg oddechowych chorych na mukowiscydozę dominują szczepy *Pseudomonas aeruginosa* (55,6%) i *Staphylococcus aureus* (37,8%),
 - mieszane zakażenia bakteryjne stwierdzono u 66 (74,2%) chorych.
2. Wśród pałeczek *Pseudomonas* wyższą wrażliwość na antybiotyki wykazywały szczepy o fenotypie śluzowym. Największą aktywność wobec badanych szczepów *P. aeruginosa* wykazywały: kolistyna, piperacylina z tazobaktamem, imipenem i meropenem.
3. Wszystkie szczepy *S. aureus* wrażliwe były na glikopeptydy oraz linezolid.
4. Prawidłowa diagnostyka mikrobiologiczna materiałów pochodzących od chorych na mukowiscydozę oraz znajomość drobnoustrojów kolonizujących drogi oddechowe umożliwiają klinicyście prowadzenie prawidłowej terapii.

Konflikt interesów

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów.

Piśmiennictwo:

1. Ratjen F, Döring G. Cystic fibrosis. *Lancet* 2003; 361: 681–689.
2. Campana S., Taccetti G., Ravenni N. i wsp. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a cystic fibrosis center. *J. Cyst. Fibros.* 2004; 3: 159–163.

3. Kerem E., Conway S., Elborn S., Heijerman H. Standards of care for patients with cystic fibrosis: a European consensus. *J. Cyst. Fibros.* 2005; 4: 7–26.
4. Boucher R.C. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur. Respir. J.* 2004; 23: 146–158.
5. Beringer P.M., Appleman M.D. Unusual respiratory bacterial flora in cystic fibrosis: microbiologic and clinical features. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2000; 6: 545–550.
6. Govan J.R. Infection control in cystic fibrosis: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and the *Burkholderia cepacia* complex. *J. R. Soc. Med.* 2000; 93: 40–45.
7. O'Malley C.A. Infection control in cystic fibrosis: cohorting, cross-contamination, and the respiratory therapist. *Respir. Care* 2009; 54: 641–657.
8. Michaels M.G., Gondor M. Respiratory infections in patients with cystic fibrosis. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* 1998; 9: 234–242.
9. Lyczak J.B., Cannon C.L., Pier G.B. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15: 194–222.
10. Mainz J.G., Naehrlich L., Schien M. i wsp. Concordant genotype of upper and lower airways *P. aeruginosa* and *S. aureus* isolates in cystic fibrosis. *Thorax* 2009; 64: 535–540.
11. Balke B., Schmoldt S., Häussler S., Suerbaum S., Heesemann J., Hogardt M.A. German external quality survey of diagnostic microbiology of respiratory tract infections in patients with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 2008; 7: 7–14.
12. Paixão V.A., Barros T.F., Mota C.M., Moreira T.F., Santana M.A., Reis J.N. Prevalence and antimicrobial susceptibility of respiratory pathogens in patients with cystic fibrosis. *Braz. J. Infect. Dis.* 2010; 14: 406–409.
13. Saiman L., Siegel J. Infection control in cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17: 57–71.
14. McManus T.E., McDowell A., Moore J.E., Elborn J.S. Organisms isolated from adults with cystic fibrosis. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2004; 3: 26–31.
15. de Vrankrijker A.M., Wolfs T.F., van der Ent C.K. Challenging and emerging pathogens in cystic fibrosis. *Paediatr. Respir. Rev.* 2010; 11: 246–254.
16. Coutinho H.D.M., Falcão-Silva V.S., Gonçalves G.F. Pulmonary bacterial pathogens in cystic fibrosis patients and antibiotic therapy: a tool for the health workers. *Int. Arch. Med.* 2008; 1: 24.
17. Santana M.A., Matos E., do Socorro Fontoura M., Franco R., Barreto D., Lemos A.C. Prevalence of pathogens in cystic fibrosis patients in Bahia. Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 2003; 7: 69–72.
18. Miller MB, Gilligan PH. Laboratory aspects of management of chronic pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41: 4009–4015.
19. Starner T.D., McCray Jr PB., Pathogenesis of early lung disease in cystic fibrosis: a window of opportunity to eradicate bacteria. *Ann. Intern. Med.* 2005; 143: 816–822.
20. Pritt B., O'Brien L., Washington W. Mucoid *Pseudomonas* in cystic fibrosis. *Am. J. Clin. Pathol.* 2007; 128: 32–34.
21. Ciofu O., Fussing V., Bagge N., Koch C., Høiby N. Characterization of paired mucoid/non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Danish cystic fibrosis patients: antibiotic resistance, beta-lactamase activity and RiboPrinting. *J. Antimicrob. Chemother.* 2001; 48: 391–396.
22. Høiby N., Frederiksen B., Pressler T. Eradication of early *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J. Cyst. Fibros.* 2005; 2: 49–54.
23. Dasenbrook E.C., Checkley W., Merlo C.A., Konstan M.W., Lechtzin N., Boyle M.P. Association between respiratory tract methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and survival in cystic fibrosis. *JAMA* 2010; 303: 2386–2392.
24. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: Annual Data Report 2010 (www.cf.org/LivingWithCF/CareCenterNetwork/PatientRegistry/)
25. Yankaskas J.R., Marshall B.C., Sufian B., Simon R.H., Rodman D. Cystic fibrosis adult care: consensus conference report. *Chest* 2004; 125: 1S–39S.
26. Laboratory standards for processing microbiological samples from people with cystic fibrosis ([www.cftrust.org.uk/aboutcf/publications/consensusdoc/cd_laboratory_standards_\(for_web\)_4_oct_2010.pdf](http://www.cftrust.org.uk/aboutcf/publications/consensusdoc/cd_laboratory_standards_(for_web)_4_oct_2010.pdf))
27. Burns J.L., Emerson J., Stapp J.R. i wsp. Microbiology of sputum from patients at cystic fibrosis centers in the United States. *Clin. Infect. Dis.* 1998; 27: 158–163.
28. Moore J.E., Shaw A., Howard J.L., Dooley J.S.G., Elborn S. Infection control and the significance of sputum and other respiratory secretions from adult patients with cystic fibrosis. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2004; 3: 8.
29. Steinkamp G., Wiedemann B., Rietschel E. i wsp. Emerging bacteria study group. Prospective evaluation of emerging bacteria in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 2005; 4: 41–48.
30. Valenza G., Tappe D., Turnwald D. i wsp. and antimicrobial susceptibility of microorganism isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 2008; 7: 123–127.
31. Saiman L., Siegel J.; Cystic Fibrosis Foundation. Infection control recommendations for patients with cystic fibrosis: microbiology, important pathogens, and infection control practices to prevent patient-to-patient transmission. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 2003; 24: S6–S52.
32. Paschoal I.A., de Oliveira Villalba W., Bertuzzo C.S., Cerqueira E.M., Pereira M.C. Cystic fibrosis in adults. *Lung* 2007; 185: 81–87.
33. 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: 893–896.
34. García A.D., Ibarra A., Rodríguez F.C., Casal M. Antimicrobial susceptibility of bacterial isolates from patients with cystic fibrosis. *Rev. Esp. Quimioter.* 2004; 17: 332–3325.
35. Spicuzza L., Sciuto C., Vitaliti G., Di Dio G., Leonardi S., La Rosa M. Emerging pathogens in cystic fibrosis: ten years of follow-up in a cohort of patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* 2009; 28: 191–195.
36. Perpati G., Moraitou H., Armeniakou E. i wsp. Incidence different pathogens and sensitivity to antimicrobials in an adult CF center in Greece during 2002–2009. *J. Cyst. Fibros.* 2010; 9: 25.