

БЕЛОДРОБНА КОЛОНИЗАЦИЯ С PSEUDOMONAS AERUGINOSA ПРИ ПАЦИЕНТИ С МУКОВИСЦИДОЗА

Маргарита Николова, Йоана Дянкова, Иван Христов,
Миглена Георгиева

Втора детска клиника, УМБАЛ „Св. Марина“ Варна,
Медицински университет - Варна

BACTERIAL PULMONARY COLONIZATION WITH PSEUDOMONAS AERUGINOSA IN CYSTIC FIBROSIS PATIENTS

Margarita Nikolova, Yoana Dyankova, Ivan Hristov, Miglena Georgieva

Second Clinic of Pediatrics, St. Marina University Hospital, Varna,
Medical University of Varna

РЕЗЮМЕ

Въведение: Муковисцидозата е най-честото животоограничаващо автозомно-рецесивно заболяване сред европейската раса. Белодробното засягане е в основата на високия процент болестност и смъртност. Най-значима за хроничната белодробна инфекция е колонизацията с *Pseudomonas aeruginosa*.

Цел: Запознаване със същността на инфекцията с *Pseudomonas aeruginosa* и неговите фактори на вирулентност и изготвяне на статистика за възрастовата бактериална белодробна колонизация при пациенти с муковисцидоза във Варненски експертен център.

Резултати: Нарастване на процента на белодробна колонизация с *Pseudomonas aeruginosa* при пациентите с муковисцидоза с нарастване на възрастта - до 85% при пациентите над 18-годишна възраст.

Заключение: *Pseudomonas aeruginosa* е в голяма степен отговорен за болестността и смъртността при хронично инфектираните пациенти с муковисцидоза. Затова превенцията и ранната диагностика са жизненоважни за прогнозата на тези пациенти.

ABSTRACT

Introduction: Cystic fibrosis (CF) is the most common life-limiting autosomal recessive condition in Caucasians. Lung damage is the main determinant of morbidity and mortality. The most important factor for chronic lung infection is the colonization with *Pseudomonas aeruginosa*.

Aim: Understanding the nature of the infection with *Pseudomonas aeruginosa* and its factors of virulence and compiling statistics on age-related bacterial pulmonary colonization in patients with cystic fibrosis in Expert Center - Varna.

Methods: Review of the medical literature and microbiological examination (sputum specimen, oropharyngeal swabs, BAL) of patients with cystic fibrosis at the Expert Center - Varna.

Results: With increasing age of the patient with cystic fibrosis there has also been an increase in the rate of pulmonary colonization with *Pseudomonas aeruginosa* - up to 85% in patients over 18 years of age.

Conclusion: *Pseudomonas aeruginosa* is largely responsible for morbidity and mortality in chronically infected cystic fibrosis patients. Therefore, prevention and early diagnosis are vital to the prognosis of these patients.

Ключови думи: муковисцидоза, *Pseudomonas aeruginosa*, белодробна инфекция, колонизация, диагноза

Keywords: cystic fibrosis, *Pseudomonas aeruginosa*, lung infection, colonization, diagnosis

ВЪВЕДЕНИЕ

Муковисцидозата е най-честото жiwотоограничаващо автозомно-рецесивно заболяване сред европейдната раса. Причинява се от дефект в ген, кодиращ протеин CFTR, локализиран в дългото рамо на хромозома 7. Протеинът CFTR е хлориден канал, разположен в апикалната мембрана на епителните клетки. Регулира предимно транспорта на хлор, но също така натриевия, бикарбонатния и водния транспорт (4). Дисфункцията на CFTR води до натрупване на вискозни секрети във всички каналчести структури. Стеснението и обструкцията на лумена им уврежда съответния орган и поддържа процес на хронична инфектираност (3).

Муковисцидозата е заболяване с полиорганно засягане, но белодробната увреда е в основата на болестността и високия процент смъртност. Колонизацията с патогенни микроорганизми започва в ранна детска възраст, като най-значима е тази с *Pseudomonas aeruginosa* (6). В детството 10 до 30% от пациентите с кистозна фиброза са колонизирани, а при възрастните - 80 до 90%.

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa е грам-отрицателен опортюнистичен патоген. Често срещан е в редица разнообразни среди по целия свят, включително почвата, прясната и морската вода, както и по повърхността на дихателната апаратура. Като опортюнистичен патоген, той води двойствен начин на живот - като коменсален и екологичен организъм, но понякога може да премине към патогенно състояние, причинявайки инфекции, чието лечение е скъпо струващо и трудно.

Най-забележимата от тях е инфекцията на белите дробове при пациентите с муковисцидоза. Придобива се от околната среда, а скорошни проучвания демонстрират корелация между микробиома на синусите и последващо преминаване към по-ниските отдели на дихателната система, където произвежда антибиотично устойчиви, повърхностно прикре-

пени колонии, заобиколени от полимерна матрица, известни като биофилми или микроколонии (12). Друга характерна особеност е преминаването на немуроидния *Pseudomonas aeruginosa* в мууроиден в резултат на генни мутации (в гени *algU*, *mucA* I *mucB*), водещи до производство на полизахарид, известен като алгинат (мууроиден екзоползахарид). Включването на колонии *Pseudomonas aeruginosa* в произведението в големи количества алгинат, формира биофилм, което води до повишаване на резистентността към имунните механизми и към повечето конвенционални антибиотици (2,11).

Кворумна сигнализация

Pseudomonas aeruginosa използва изобилие от фактори на вирулентност, за да колонизира и поддържа инфекцията при имунокомпрометирани домакини, като производството на много от тези фактори на вирулентност се регулира в зависимост от плътността на клетките - така наречената кворумна сигнализация (QS, quorum sensing) (1,12). Тя представлява колективно клетъчно поведение, включващо сигнални системи, основани на различни химически сигнали, които им помагат прецизно да отчитат и контролират плътността на бактериалната популация и да координират генната експресия. QS се осъществява с помощта на сигнални молекули с ниско молекулно тегло, наречени още автоиндуктори, които се синтезират непрекъснато по време на бактериалния растеж. Тези молекули са разположени между клетките и при достигане на критична концентрация се активира специфичен регулаторен протеин (действащ като регулатор на транскрипцията), което води до промяна в генната експресия.

Pseudomonas aeruginosa притежава три известни QS системи: LasI/LasR системата, за която автоиндукторът е 3-оксододеcanoил-хомосерин лактон (3OC12-HSL); системата RhlI/RhlR (C4-HSL), за която автоиндуктор е бутирил-хомосерин лактон и система на базата на хинолон, за която 2-хептил-3-хидрокси-4-хинолон (*Pseudomonas*

хинолонов сигнал, PQS) е най-мощният автоиндуктор. Колективно тези QS системи представляват интегрирана регулаторна мрежа, която засяга транскрипцията на до 10% от генома на *Pseudomonas aeruginosa*, включително и гени за производство на много фактори на вирулентност.

Секреция на детерминанти за вирулентност и разграждащи ензими

Организмът притежава пет от шестте известни класа секреторни системи в грам-отрицателните бактерии.

- ◆ Двете секреторни системи от тип I на *Pseudomonas aeruginosa* са отговорни за секрецията на алкална протеаза и протеин, свързващ хема, които функционират като детерминанти на вирулентността.
- ◆ Секреторна система тип II служи за освобождаване на няколко вирулентни фактора, започващи с Екзотоксин А, който инхибира синтеза на протеини от гостоприемника по начин, подобен на дифтерийния токсин. Други фактори на вирулентност, секретирани чрез система тип II, включват няколко фосфолипази и протеази, които атакуват клетките на гостоприемника и разграждат макромолекулите в храчката.
- ◆ Секреторна система тип III отделя токсини, които се инжектират директно в гостоприемните клетки. Тези токсини (ЕхoS, ЕхoТ, ЕхoU, ЕхoY) нарушават образуването на цитоскелет, преобразуването на сигнала и имат активност на фосфолипаза.
- ◆ При *Pseudomonas aeruginosa* липсва секреторна система тип IV.
- ◆ Системи тип V при *Pseudomonas aeruginosa* отделят естераза, друга протеаза и хемаглютинин-подобен протеин.
- ◆ Също така притежава три секреторни системи тип VI, секретирани пептидогликаназа и фосфолипаза, като и двата ензима вероятно

участват при разграждане на съседните бактериални клетки.

Pseudomonas aeruginosa отделя също множество разграждащи ензими, които атакуват гостоприемника и осигуряват хранителни вещества за растеж и патогенност.

Редокс системи

Културите на *Pseudomonas aeruginosa* имат синьо-зелен цвят и това до голяма степен се дължи на либерална секреция на редокс-активно феназиново съединение, наречено пиоцианин. Производството на пиоцианин е QS-регулирано и е в състояние да унищожи клетки-гостоприемници чрез промяна на критични клетъчни процеси, генериране на реактивен кислород, променящо клетката сигнализиране и предизвикване на неутрофилна апоптоза. Други редокс-активни фактори, произведени от *Pseudomonas aeruginosa*, включват 4-хинолон молекули, които регулират вирулентността по начин, зависим от плътността на клетките, както и цитотоксичната отрова циановодород, играещ роля в патогенността.

Pseudomonas aeruginosa е смъртоносен опортюнистичен патоген и това произтича от обширния масив от фактори на вирулентност, които е в състояние да произведе. Много от тези фактори са QS-регулирани, което улеснява колонизацията на белия дроб при пациентите с кистозна фиброза, чрез избягване на фагоцитозата, промяна в имунния отговор и унищожаване на тъканта на гостоприемника (8,12).

ДИАГНОЗА

Рутинното диагностициране на *Pseudomonas aeruginosa* става най-вече чрез микробиологично изследване на храчка, спонтанно отхрачена или индуцирана чрез вдишване на хипертоничен разтвор (3-7%). Много от пациентите, особено децата под 7 години, са неспособни да отделят храчка (около 30-35%) (10,13). Поради тази причина при тези пациенти се изследва микробиологично посявка от гърлен секрет, като се приема, че горните дихателни пътища от-

разяват флората от долните дихателни пътища – методът е ориентиран с риск от фалшиво отрицателни резултати. Най-голяма трудност представлява получаването на представителни проби от дихателните пътища на кърмачета и малки деца. Поради това е необходимо използването на методи, които могат да допълнят или да бъдат алтернатива на микробиологичното изследване. Бронхоалвеоларният лаваж (БАЛ) е златен стандарт, но е инвазивен и обикновено се използва само когато има убедителни причини за получаване на респираторна проба и други подходи са се провалили. Откриването на серумни антитела срещу *Pseudomonas aeruginosa* се очертава като възможен спомагателен метод с цел ранна ерадикационна терапия. Откриване на IgG срещу *Pseudomonas aeruginosa* чрез използване на ELISA, допълва използваните понастоящем методи за мониторинг (10,13). При налични антитела и отрицателни за култура проби от дихателната система трябва да се търси вероятна инфекция чрез повторение на тест или чрез използване на по-чувствителни и специфични методи (10).

Дефиниция на инфекцията с *Pseudomonas aeruginosa*

Повечето от използваните в момента дефиниции се основават на микробиологични резултати от посявка на храчка и/или наличието на антитела срещу *Pseudomonas aeruginosa*. Хроничната инфекция може да се определи като инфекция, която продължава въпреки терапията и независимо от имунитета на домакина.

Следните определения за хронична инфекция с *Pseudomonas aeruginosa* при пациентите с муковисцидоза са публикувани и използвани в различните центрове:

1. Критерии от Копенхаген за хронична инфекция с *Pseudomonas aeruginosa*:
 - ◆ Устойчиво присъствие на *Pseudomonas aeruginosa* за поне шест последователни месеца или по-малко, когато се комбинира с наличие на две или повече антитела срещу *Pseudomonas aeruginosa*

- ◆ Периодичната колонизация с *Pseudomonas aeruginosa* е определена като: култура на *Pseudomonas aeruginosa* поне веднъж и присъствието на нормални нива на антитела срещу *Pseudomonas aeruginosa*

Всеки пациент се изследва средно десет пъти годишно.

2. Дефиниция на Ballmann et al. (5):

- ◆ Първо откриване на *Pseudomonas aeruginosa* (PA1)
- ◆ Хронична колонизация с *Pseudomonas aeruginosa* (PAC)
- ◆ Първо откриване на мукоиден щам *Pseudomonas aeruginosa* (PAm)
- ◆ Хронична мукоидна колонизация с *Pseudomonas aeruginosa* (PACm)

За преход към хронични стадии (PAC и PACm) повече от 50% от културите за период от 12 месеца трябва да бъдат положителни за *Pseudomonas aeruginosa* и свързания с нея фенотип (мукоиден или немуктоиден).

Пациентите се наблюдават редовно един до четири пъти годишно. При всяко посещение се изследва посявка на храчка или на гърлен секрет.

3. Критерии на Лийдс:

- ◆ Хронична инфекция: когато повече от 50% от месеците, през които са взети проби, са с положителни култури за *Pseudomonas aeruginosa*
- ◆ Интермитентна инфекция: когато 50% или по-малко от месеците, през които са взети проби са с положителни култури за *Pseudomonas aeruginosa*
- ◆ Свободен от инфекция: без растеж на *Pseudomonas aeruginosa* през последните дванадесет месеца, като преди това са били *Pseudomonas aeruginosa* положителни
- ◆ Пациенти, които никога не са били инфектирани - *Pseudomonas aeruginosa* никога не се е изолирал от храчка или секрет от гърло (14,15).

Варненски експертен център

Във Варненски експертен център се проследяват общо 46 пациенти с кистозна

фиброза - от 1 г. до 32 г. (средна възраст - 13 год.), 24 от мъжки и 22 от женски пол.

От тях 22-ма (48%) са колонизирани с *Pseudomonas aeruginosa* - хронична или интермитентна инфекция (Табл. 1).

ограничаване на контакта между пациенти с кистозна фиброза (9).

В процес на разработка са антипсевдомонасни ваксини - орални, парентерални и назални, но проучванията с тях за момента

Табл. 1. Процент на колонизация с *Pseudomonas aeruginosa* при различни възрастови групи

Пациенти от 0 до 6 г.	18% (2 от общо 11 - чрез СНГ и БАЛ)
Пациенти между 6 и 18 г.	32% (7 от общо 22 - посявка на хрчка)
Пациенти над 18 г.	85% (11 от общо 13 - посявка на хрчка)

При пациентите над 18 год., проследяващи се във Варна, честотата на хронична инфекция с *Pseudomonas aeruginosa* е по-висока, сравнена с тази в София и в Европа.

По данни от Европейския регистър на пациентите с муковисцидоза от 2017 г., включващ пациенти от 35 страни, процентът на хронична колонизация с *Pseudomonas aeruginosa* в България (пациенти от два индивидуални центъра – в София и Варна) е най-висок – 62.16%. При деца процентът на колонизация е 44.44%, а при възрастни – 83.58%. Под 20% честота на хронична инфекция с *Pseudomonas aeruginosa* са отчетени в Литва (14.29%), Албания (18.85%) и Чехия (19.83%). Освен в България, висока честота се наблюдава в Молдова (54%), Хърватия (45.98%) и Гърция (45.24%) (7).

Превенция

Стратегиите за превенция започват с контрол на инфекцията в дома и здравните заведения. Фондация „Кистозна фиброза“ (CFF) предоставя насоки за подпомагане на пациенти, семейства и здравни работници, за да се предотврати разпространението на често срещаните CF патогени, включително *Pseudomonas aeruginosa* (6). Пациентите и здравните работници се обучават за спазване на хигиенен режим - антимикробен сапун или алкохол за ръцете и използване на лични предпазни средства (напр. престилки, маски). Допълнителните мерки включват: подходяща дезинфекция и почистване на дихателното оборудване и

не са убедителни (9).

Антибиотична терапия

- Флуорохинолони: Ciprofloxacin, Levofloxacin
 - ♦ Продължават изпитванията за инхалаторна употреба
 - ♦ Недостатъчно данни и опит с Levofloxacin, но е отчетена полза по отношение грам-положителните организми в сравнение с Ciprofloxacin
 - ♦ Липса на данни в подкрепа на профилактична или дългосрочна употреба
 - ♦ Забавена орална абсорбция, причинена от дефекта в CFTR.
- Аминогликозиди: Tobramycin, Amikacin, Gentamicin
 - ♦ Инхалаторния Tobramycin е препоръчан за ерадикационна терапия и за дългосрочна употреба при хронична инфекция
 - ♦ Продължават изпитвания на инхалаторен липозомен Amikacin
 - ♦ Дозиране веднъж дневно при интравенозно приложение
 - ♦ Синергия с b-лактами *in vitro*
 - ♦ Повишени дози при пациентите с муковисцидоза поради повишен бъбречен клирънс
 - ♦ По-високи нива на нефротоксичност при употреба на Gentamicin, спрямо Tobramycin и Amikacin
- Антипсевдомонасни b-лактами: Piperacillin-tazobactam, Ticarcillin-clavulanate, Ceftazidime, Cefepime

- ◆ Времезависимо действие на удължени интервали и непрекъсната инфузия
 - ◆ Повишено дозиране поради увеличен обем на разпределение при пациенти с муковисцидоза
 - ◆ Дозозависими нежелани ефекти при употреба на Piperacillin-tazobactam
4. Монобактам: Aztreonam
- ◆ Инхалаторен Aztreonam се препоръчва за дългосрочна употреба при хронични инфекции
 - ◆ Често се използва за дългосрочна употреба
 - ◆ Фармакокинетичните/фармакодинамичните параметри налагат допълнително проучване
5. Карбапенеми: Imipenem-cilastatin, Meropenem, Doripenem
- ◆ Повишена устойчивост на *Pseudomonas aeruginosa* към Imipenem-cilastatin
 - ◆ Времезависимо действие на удължени интервали и непрекъсната инфузия
6. Полимиксин: Colistin
- ◆ Инхалаторна форма се препоръчва за ерадикационна терапия и дългосрочна употреба при хронична инфекция
 - ◆ Високите нива на невротоксичност и нефротоксичност ограничават употребата му интравенозно
 - ◆ Използва се за много резистентни инфекции или когато други средства са неефективни или противопоказани (16)

В България пациентите с муковисцидоза получават като поддържащо лечение един от двата налични инхалаторни антибиотици - Colobreathe (Colistin) или Tobi (Tobramycin), като и двата се реимбурсират на 100% от НЗОК.

Лечението на екзацербациите започва емпирично с антипсевдомонасен антибиотик или по стара антибиограма, като след получаване на новите микробио-

логични изследвания се действа според антибиограмата.

В заключение, процентът на хронична белодробна инфекция с *Pseudomonas aeruginosa* е най-висок при пациентите с муковисцидоза. *Pseudomonas aeruginosa* е в голяма степен отговорен за болестността и смъртността при хронично инфектираните. Причина за това е разнообразието от фактори на вирулентност, както и резистентността към конвенционалната антибиотична терапия. Затова превенцията и ранната диагностика са жизненоважни за прогнозата на тези пациенти.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мърхова, М., Костадинова, С., Бактериални биофилми - физиология и екология. Сборник с доклади от Юбилейна научна конференция по екология; Ноември 2008, стр. 275-284.
2. Трифонова, А., Савов, Е., Гергова, И., Бактериални инфекции при муковисцидоза. In Spiro, брой №3(15), септември 2011, стр. 15-19.
3. Шмилев, Т. и колектив, Клинична пулмология в детската възраст, Второ издание, 2017г. Глава 45, стр. 473-487.
4. Antoniou, S., & Elston, C., (2016), Cystic fibrosis. *Medicine*, 44(5), 321-325.
5. Ballmann, M., Rabsch, P., von der Hardt, H., Long-term follow up of changes in FEV1 and treatment intensity during *Pseudomonas aeruginosa* colonization in patients with cystic fibrosis., *Thorax* 1998; 53 (9):732-7.
6. Davies, J.C., *Pseudomonas Aeruginosa* in cystic fibrosis: pathogenesis and persistence. *Paediatr Respir Rev*, 2002 Jun ;3(2): 128-34.
7. ECFS Patient Registry, Annual Data Report., 2017, p. 60-69.
8. Hendiani, S., Ponour, M., Kashef, N., Quorum – sensing – regulated virulence factors in *Pseudomonas Aeruginosa* are affected by sub – lethal photodynamic inactivation., *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 26 (2019) 8-12.
9. Johansen, H.K., Gotzsche, P.C., Vaccines for preventing infection with *Pseudomonas*

- Aeruginosa in cystic fibrosis. Cochrane Database Syst Rev. 2015 Aug 23; (8).
10. Mauch, RM., Levy, CE., Serum antibodies to Pseudomonas Aeruginosa in cystic fibrosis as a diagnostic tool: a systematic review. J Cyst Fibros., 2014; Sep; 13(5): 499-507.
 11. Moore, JE., Mastoridis, Clinical implications of Pseudomonas Aeruginosa location in the lungs of patients with cystic fibrosis. PJ ClinPharmTher. 2017 Jun; 42(3):259-267.
 12. Palmer, GG., Whitely, M., Metabolism and pathogenicity of Pseudomonas aeruginosa infections in the lungs of individuals with cystic fibrosis. Micriol Spectr. 2015 Aug.
 13. Petrova, G., Perenovska, P., Lesichkova, S., Miteva, D., Lazova, S., Issaev, V., Strateva, T., Is diagnostic of Pseudomonas Aeruginosa deficient in Bulgarian CF patients. Journal of Cystic Fibrosis, Volume 16, Supplement 1, June 2017, Page S108.
 14. Pressler, T., Bohmova, C., Conway, S., Dumcius, S., Hjelte, L., Hoiby, N., Kollberg, H., Tummler, B., Vavrova, V., Chronic Pseudomonas aeruginosa infection definition: EuroCareCF Working Group report. J Cyst Fibros. 2011 Jun; 10 Suppl 2: S75-8.
 15. Schelstraete, P., Haerynk, F., Vandaele, S., Deseyne, S., De Baets, F.; Eradication therapy for Pseudomonas aeruginosa colonization episodes in cystic fibrosis patients not chronically colonized by P. Aeruginosa. J Cyst Fibros. 2013 Jan; 12(1):1-8.
 16. Talwalkar, JS., Murray, TS., The Approach to Pseudomonas aeruginosa in Cystic Fibrosis. Clin Chest Med. 2016 Mar; 37(1):69-81.

Адрес за кореспонденция:

Маргарита Николова
Втора детска клиника
УМБАЛ „Св. Марина“
бул. Христо Смирненски 1
9000 Варна
e-mail: margaritanikolovva@gmail.com
