

MIKROBIOLOŠKA ANALIZA RESPIRATORNIH UZORAKA U DJECE S CISTIČNOM FIBROZOM

MICROBIOLOGY OF RESPIRATORY SAMPLES FROM CHILDREN WITH CYSTIC FIBROSIS

Maja Abram¹, Srđan Banac², Vojko Rožmanić²

SAŽETAK

Analizirani su retrogradno dvogodišnji (2005. – 2006.) rezultati mikrobiološke obrade respiratornih uzoraka dobivenih od bolesnika s cističnom fibrozom, liječenih u Klinici za dječje bolesti KBC-a Rijeka. Od 114 obrađenih kliničkih uzoraka, u 95,6% slučajeva kultura je bila pozitivna, a najčešći izolat bio je *Pseudomonas aeruginosa* (77,8%). *Staphylococcus aureus* izoliran u 9,6% uzoraka, dominantan je izolat u mlađe djece. *Burkholderia cepacia* izolirana je u samo jednome slučaju (0,6%). Dok je među testiranim sojevima vrste *Pseudomonas aeruginosa* najveći postotak otpornosti uočen prema gentamicinu (49,4%), netilmicinu (47,2%) i cef-tazidimu (44,9%), u dvama je izolatima (2,2%) zabilježena otpornost na kolistin.

Ključne riječi: cistična fibroza, bakterije, otpornost

SUMMARY

The aim of the study was to analyze the microorganisms cultured from respiratory samples of children with cystic fibrosis treated in the Clinic for children diseases, University Hospital Rijeka, during 2005 – 2006. In 95.6% of 114 clinical samples, microbiological examination yielded positive culture. The most frequently isolated microorganisms was *Pseudomonas aeruginosa* (77.8%). *Staphylococcus aureus* was isolated in 9.6% of samples and was dominant in younger CF children. *Burkholderia cepacia* was isolated just in one case (0.6%). A high resistance to gentamicin (49.4%), netilmicin (47.2%) and ceftazidime (44.9%) was observed in *Pseudomonas aeruginosa* strains, and two of them were colistin resistant (2.2%).

Key words: cystic fibrosis, bacteria, resistance

UVOD

Cistična fibroza (CF) jest autosomno recesivna, nasljedna bolest u kojoj je poremećena funkcija svih žlijezda s vanjskim izlučivanjem. Pogođena su različita tkiva koja tvore sluz, stoga je raspon simptoma i kliničkih očitovanja raznolik, ali prevladavaju poremećaji u probavnome i dišnome

sustavu. U početku, CF je opisan poglavito kao bolest gastrointestinalnoga sustava, s obzirom na to da se određene promjene mogu uočiti vrlo rano, čak i intrauterino¹. Iako plućno tkivo nije izvorno pogođeno i anatomski je zdravo tijekom rođenja, zaostajanje gustoga i ljepljivoga sekreta u dišnim putovima pridonosi kroničnoj kolonizaciji određenim patogenima, te ponavljanim dišnim infekcijama. Neodgovarajući obrambeni mehanizmi sluznice, trajna upala, te često prisutan gastroezofagealni refluks², utječu na napredovanje plućne bolesti u CF bolesnika. Učestalost infekcija i opseg trajnih oštećenja u plućima, u izravnu je suodnosu s duljinom života oboljelih.

Kronična infekcija donjega dišnoga sustava u CF bolesnika, uzrokovana je ograničenim brojem

¹ Zavod za kliničku mikrobiologiju, Klinički bolnički centar Rijeka

² Klinika za dječje bolesti, Klinički bolnički centar Rijeka

Primljeno: 10. 3. 2007.

Prihvaćeno: 1. 4. 2007.

Adresa za dopisivanje: prof. dr. sc. Maja Abram, dr. med., Zavod za kliničku mikrobiologiju, Klinički bolnički centar Rijeka, Krešimirova 42, 51000 Rijeka, tel.: 051 658 843, faks: 051 658 841, e-mail: amaja@medri.hr

bakterijskih vrsta. *Staphylococcus aureus* najčešći je početni patogen. Uz *Haemophilus influenzae* uobičajeni je izolati u mlađe djece, te predisponira plućno tkivo za naseljavanje drugim bakterijama. Postupno, unatoč agresivnoj antibiotskoj terapiji, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) kronično kolonizira tkivo, te se danas navodi kao dominantan, vodeći uzročnik pobola i smrtnosti u oboljelih od CF-a³. U iskašljaju CF bolesnika sve se češće izolira *Burkholderia cepacia*, gram-negativna nefermentirajuća oportunistička bakterija koja s bakterijom vrste *P. aeruginosa* ne samo da dijeli isti mikrookoliš, već u zajedničkom suodnosu stvara mješoviti biofilm u plućima oboljelih⁴. *B. cepacia* infekcija u bolesnika s CF-om, može dovesti do rapidna oštećenja funkcije pluća⁵ i bakterijemije, a među CF bolesnicima zabilježene su i epidemije izazvane tom bakterijom⁶. S obzirom na to, rana identifikacija vrste *B. cepacia* ima veliku važnost poradi sprečavanja prijenosa na ostale bolesnike, te pravoga izbora antibiotika u liječenju te uobičajeno višestruko otporne bakterije. U zadnje vrijeme, spomenutim se bakterijama pridružuju pojedine nove vrste kao *Stenotrophomonas maltophilia*⁷, *Achromobacter xylosoxidans*⁸, *Ralstonia pickettii*⁹ za koje su podaci o kliničkoj važnosti još uvijek nepotpuni.

Rano otkrivanje kolonizatora, praćenje promjena u sastavu mikrobne flore kvalitativnom, odnosno kvantitativnom analizom respiratornih uzoraka, te određivanje osjetljivosti i otpornosti izoliranih sojeva prema antibioticima, doprinos su mikrobiološkoga laboratorija liječenju CF bolesnika.

ISPITANICI I METODE

Rezultati rutinske mikrobiološke analize uzoraka iz dišnoga sustava djece s dijagnosticiranom cističnom fibrozom, obrađeni su retrogradno. U razdoblju od 1. siječnja 2005. do 31. prosinca 2006., u Klinici za dječje bolesti riječkoga KBC-a, liječilo se osam, odnosno sedam (koncem godine 2005. jedan je bolesnik preminuo) CF bolesnika u dobi od tri godine do osamnaest godina. Tijekom uobičajenih kontrolnih pregleda, kao i razdoblju hospitalizacije zbog pogoršanja dišne infekcije, ukupno 114 kliničkih uzoraka (91 iskašljaj, 15 obrisaka ždrijela, 8 aspirata bronha) poslano je na mikrobiološku analizu u Zavod za kliničku mikrobiologiju.

Mikrobiološka hranilišta i uvjeti rasta za očekivane mikroorganizme razumijevali su naciepljivanje uzoraka na krvni, čokoladni i MacConkeyev agar, te aerobnu inkubaciju na 37°C kroz 24 sata i 48

sati. Izolati su identificirani standardnim bakteriološkim tehnikama. Dok je *Pseudomonas aeruginosa* identificiran pozitivnim testom oksidaze i produkcijom pigmenta, za ostale gram-negativne nefermentirajuće bakterije korišteni su komercijalni API 20NE stripovi (BioMerieux, Marcy l'Etoile, Francuska).

Rezultati antibiotske osjetljivosti, odnosno otpornosti za vrstu *P. aeruginosa*, dobiveni su testiranjem izoliranih sojeva uobičajenim disk-difuzijskim postupkom antibiograma, u skladu s CLSI (Clinical Laboratory Standards) preporukama¹⁰, na Mueller-Hintonovoj podlozi i s BBL (Beckton Dickenson Microbiology Systems, Cockeysville, Md.) antibiotskim diskovima.

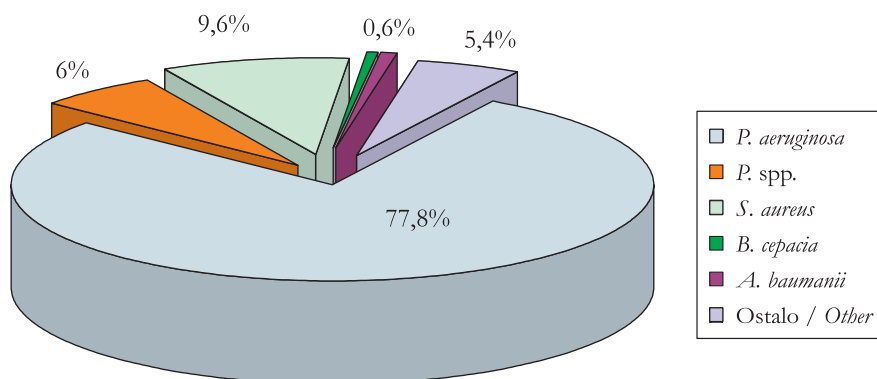
REZULTATI

U Klinici za dječje bolesti liječilo se osam CF bolesnika u dobi od tri godine do 18 godina. Od početka 2005. do konca 2006., obrađeno je 114 uzoraka iz dišnoga sustava, i u 95,6% slučajeva dobiven je pozitivan rezultat. Dok je u 45% pozitivnih kultura izolirana samo jedna bakterijska vrsta, u ostalim su slučajevima nađena dva različita fenotipa, ili više (najviše 4) različitih fenotipova pseudomonasa, koinfekcija pseudomonasom i zlatnim stafilokokom, te koinfekcija pseudomonasom i drugom bakterijskom vrstom.

Na slici 1. vidi se da je najčešće izolirana bakterija bila *Pseudomonas aeruginosa* (77,8%) i ostali pseudomonasi (6%), te *Staphylococcus aureus* (9,6%). *Burkholderia cepacia* i *Acinetobacter baumannii* izolirani su u samo jednome slučaju (0,6%). Sve ostale bakterije (*Streptococcus pyogenes* skupine A, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*), tvorile su 5,4% ukupnoga broja izolata.

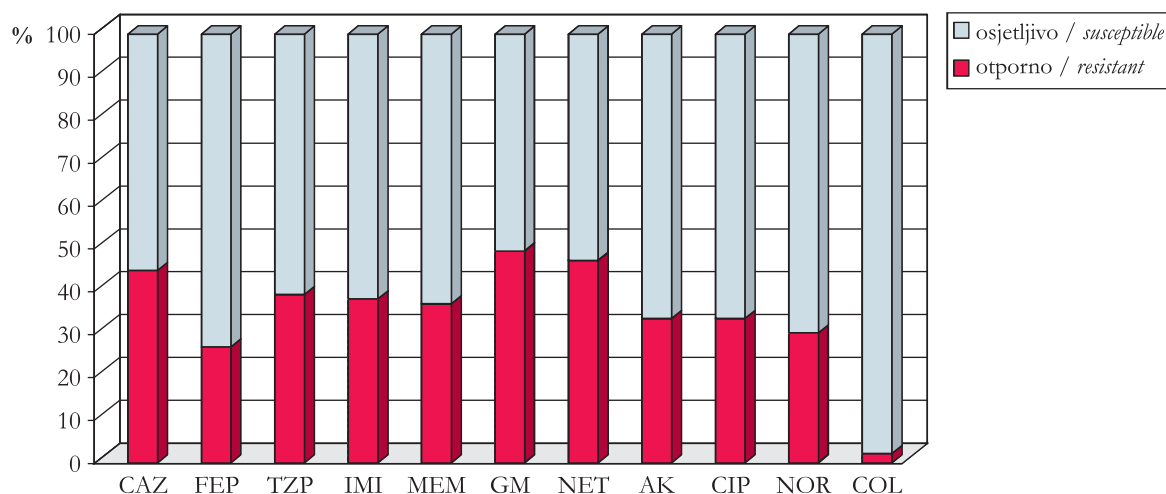
Za određivanje postotka osjetljivosti, odnosno otpornosti, izostavljeni su duplikatni sojevi (izolirani u istoga bolesnika u razdoblju od mjesec dana). Različiti morfotipovi vrste *P. aeruginosa*, testirani su kao zasebni izolati. U konačnici, rezultati se odnose na ukupno 89 sojeva vrste *P. aeruginosa*.

Na slici 2. vidi se da su testirani sojevi pokazali najveći stupanj otpornosti prema gentamicinu (49,4%), potom netilmicinu (47,2%), te ceftazidimu (44,9%). Podjednaka je otpornost prema meropenemu (37,1%), imipenemu (38,2%), te kombinaciji piperacilina s tazobaktamom (39,3%). Približno trećina sojeva otporna je na amikacin i ciprofloksacin (33,7%), te na norfloksacin (30,3%). U dvama izolatima (2,2%) zabilježena je otpornost na kolistin.



Slika 1. Učestalost pojedinih patogena iz uzoraka dišnoga sustava (N=114) u djece s cističnom fibrozom

Figure 1 The recovery rates of certain pathogens from respiratory tract samples (N=114) from children with cystic fibrosis



Slika 2. Postotak osjetljivih/otpornih sojeva vrste *Pseudomonas aeruginosa* (N=89) izoliranih iz respiratornih uzoraka u djece oboljele od cistične fibroze

Figure 2 Percentage of susceptible/resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* (N=89) isolated from respiratory tract samples from children with cystic fibrosis

(CAZ-ceftazidim; FEP-cefepim; TZP-piperacilin + tazobaktam; IMI-imipenem; MEM-meropenem; GM-gentamicin; NET-netilmicin; AK-amikacin; CIP-ciprofloksacin; NOR-norfloksacin; COL-kolistin)

RASPRAVA

Plućna bolest vodeći je uzrok pobola i smrtnosti u oboljelih od CF-a. Posljedica je kombinacije različitih čimbenika: nagomilavanja i zaostajanja viskozno sekreta, trajnih upalnih promjena i poremećenih obrambenih mehanizama sluznice, te kronične kolonizacije i infekcije određenim patogenima. Rano otkrivanje i prepoznavanje uzročnika, te određivanje njihove osjetljivosti prema antibioticima, nužni su u praćenju CF bolesnika i provođenju odgovarajućih terapijskih protokola.

U većine djece s CF-om, bakterijska kolonizacija donjih dišnih putova uspostavlja se već u dobi od godine dana^{11,12}. Općeprihvaćena je određena hijerarhija prema kojoj plućna kolonizacija u CF bolesnika započinje naseljavanjem vrsta *Staphylococcus aureus* i *Haemophilus influenzae*. U djece u koje je dijagnosticiran CF tijekom novorođenačkoga probira, u 29% slučajeva zlatni je stafilokok prvoredni kolonizator tijekom prve godine života¹¹. Rosenfeld i suradnici također su ustanovili zamjetno prisustvo vrste *S. aureus* u dvogodišnjoj i trogodišnjoj djece oboljele od CF-a, a u dojenčadi do prve godine života prevladava *H. influenzae*¹². I naši rezultati potvrđuju spomenute navode, s obzirom na to da zlatni stafilokok zauzima važno mjesto kao osnovni i jedini izolat u troje oboljele djece u dobi od tri godine do šest godina.

U 82% slučajeva, *S. aureus* prethodi naseljavanju vrste *P. aeruginosa*¹¹, koja do adolescentne dobi postaje prevladavajuća bakterija zahvaljujući mnogobrojnim čimbenicima virulencije, te nizu svojih osobitosti. Jedna od važnijih osobitosti jest sposobnost stvaranja biofilma – složene višestanične zajednice koja je pod “quorum-sensing” kontrolom¹³⁻¹⁵. Stvaranju obilna biofilma pridonosi kvaliteta ispljuvka u CF bolesnika, koji je izvrstan supstrat i izvor nutrijenata za vrstu *P. aeruginosa*¹⁶. U našem radu tijekom dvogodišnjega razdoblja, upravo je *P. aeruginosa* prevladavajući izolat nađen u 77,8% pozitivnih kultura. Od osam CF bolesnika, petero starijih od 16 godina kronično je inficirano tom bakterijom koja se redovito izolira, kako tijekom kliničke stabilnosti, tako i tijekom pogoršanja plućne bolesti u oboljele djece. U bolesnika koji je preminuo koncem godine 2005., u posljednjem uzorku ispljuvka također je izolirana vrsta *P. aeruginosa* u miješanoj kulturi s vrstom *Acinetobacter baumannii*.

Iako je infekcija vrstom *P. aeruginosa* povezana s napredovanjem bolesti, te povećanim pobolom i smrtnosti, ne predstavlja neposrednu opasnost za oboljeloga odmah nakon otkrivena kolonizacije.

Sve se više prepoznaje mogućnost ranoga terapijskoga pristupa kojim se pokušava eliminirati ili bar kontrolirati infekcija izazvana još uvijek osjetljivim, nemukoidnim sojevima karakterističnim za početnu kolonizaciju, odnosno infekciju. Kliničko je zapažanje da primjena antibiotika u liječenju CF bolesnika ne dovodi do trajna iskorjenjivanja vrste *P. aeruginosa*, kada je ta bakterija kronično kolonizirala donje dišne putove. U mnogih CF bolesnika uočava se prisustvo različitih sojeva vrste *P. aeruginosa* s različitom osjetljivošću prema antibioticima. Otporne subpopulacije vrste *P. aeruginosa* tijekom terapije mogu postati dominantne. Zbog toga potrebno je testirati sve morfološki različite sojeve iz istoga uzorka. U našem je istraživanju visoki postotak otpornosti prema gentamicinu i ceftazidimu usporediv s rezultatima sličnog istraživanja u Velikoj Britaniji, gdje su rezultati prikupljeni u 10 CF centara pokazali da je u sedam centara više od 25% izolata otporno na ceftazidim, a samo je u dvama centrima otpornost prema gentamicinu bila niža od 30%¹⁷. S obzirom na visoki stupanj otpornosti, upitna je njihova empirijska primjena u toj skupini bolesnika. Korištenje antibiotika u obliku aerosola, poput kolistina i tobramicina, bolesnicima s kroničnom infekcijom pseudomonasom, može unaprijediti plućnu funkciju, te smanjiti pojavu pogoršanja¹⁸. Međutim, interpretacija rezultata antibiograma novi je izazov mikrobiolozima. Postojeće preporuke odnose se uglavnom na antibiotike koji se primjenjuju unutarvenski, te je upitno mogu li se primijeniti i na antibiotike koji se primjenjuju lokalno.

Dodatni su izazov nove vrste bakterija koje se sve češće povezuju s CF-om pluća. Tijekom ispitivanja dvogodišnjega razdoblja, u jednog je bolesnika izolirana *Burkholderia cepacia*. *B. cepacia* široko je rasprostranjena u okolišu¹⁹, a odnedavna postalo je jasno da je i važni patogen u CF bolesnika. Nije poznato kako i zašto u pojedinim CF bolesnika ista bakterija izaziva produljenu infekciju s postupnim pogoršanjem plućne funkcije, a u drugih dovodi do rapidna propadanja plućnoga tkiva poznatoga kao “*cepacia* sindrom”. Jedno je od objašnjenja to što *B. cepacia* razumijeva sklop srodnih bakterijskih vrsta²⁰. Tek je u zadnje vrijeme zapaženo da se iz toga sklopa izdvajaju *B. cenocepacia* i *B. multivorans* kao najčešći uzročnici teških plućnih infekcija u CF bolesnika²¹. *B. cepacia* ima dojmivi broj čimbenika virulencije^{22,23} koji istodobno štite bakteriju, te razaraju plućno tkivo. Dodatno, *B. cepacia* ima sposobnost života u biofilmu, a novija istraživanja u prilog su među-

sobnu suodnosu i suživotu s vrstom *P. aeruginosa* u složenu biofilmu u plućima CF bolesnika^{4,24}.

ZAKLJUČAK

U liječenju CF bolesnika, važnost je mikrobiološkoga laboratorija neupitna. Poradi planiranja uspješnih terapijskih protokola, bitno je pratiti vrste patogena i stanje njihove osjetljivosti, odnosno otpornosti. Rano otkrivanje uzročnika, njihovo prepoznavanje i testiranje vezano uz odgovarajuće antibiotike, mogu imati bitan utjecaj na klinički tijek plućne bolesti. Pojava novih patogena, te neobičnih već poznatih fenotipova, nameću potrebu uvođenja novih selektivnih hranilišta i unapređenje bakterioloških postupaka u obradi respiratornih uzoraka CF bolesnika.

LITERATURA

- Peršić M. Kliničke manifestacije gastrointestinalnih poremećaja u djece s mukoviscidozom. Paediatr Croat 2001;45(Supl 1):83-7.
- Rozmanic V, Drinkovic DT, Ahel V, Drinkovic DT, Persic A, Votava AR. Gastroesophageal reflux in patients with cystic fibrosis. Eur Resp J 2003;22(Suppl):45:230s.
- Murray TS, Egan M, Kazmierczak BI. *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonization in cystic fibrosis patients. Curr Opin Pediatr 2007;19:83-8.
- Eberl L, Tummeler B. *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: genome evolution, interaction and adaptation. Int J Med Microbiol 2004;294:123-31.
- George RB, Cartier Y, Casson AG, Hernandez P. Suppurative mediastinitis secondary to *Burkholderia cepacia* in a patient with cystic fibrosis. Can Respir J 2006;13:215-8.
- Campana S, Taccetti G, Ravenni N, Favari F, Cariani L, Sciacca A, i sur. Transmission of *Burkholderia cepacia* complex: evidence for new epidemic clones infecting cystic fibrosis patients in Italy. J Clin Microbiol 2005;43:5136-42.
- Graff GR, Burns JL. Factors affecting the incidence of *Stenotrophomonas maltophilia* isolation in cystic fibrosis. Chest 2002;121:1754-60.
- Saiman L, Siegel J. Infection control in cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev 2004;17:57-71.
- Beringer PM, Appleman MD. Unusual respiratory bacterial flora in cystic fibrosis: microbiologic and clinical features. Curr Opin Pulm Med 2000;6:545-50.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 15th informational supplement. CLSI/NCCLS M100-S15, 2005.
- Abman SH, Ogle JW, Harbeck RJ, Butler-Simon N, Hammond KB, Accurso FJ. Early bacteriologic, immunologic, and clinical courses of young infants with cystic fibrosis identified by neonatal screening. J Pediatr 1991;119:211-7.
- Rosenfeld M, Gibson RL, McNamara S, Emerson J, Burns JL, Castile R, i sur. Early pulmonary infection, inflammation, and clinical outcomes in infants with cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol 2001;32:356-66.
- Smith RS, Iglewski BH. *P. aeruginosa* quorum sensing systems and virulence. Curr Opin Microbiol 2003;6:56-60.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 1999;284:1318-22.
- Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO, Welsh MJ, Greenberg EP. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. Nature 2000;407:762-4.
- Palmer KL, Mashburn LM, Singh PK, Whiteley M. Cystic fibrosis sputum supports growth and cues key aspects of *Pseudomonas aeruginosa* physiology. J Bacteriol 2005;187:5267-77.
- Pitt TL, Sparrow M, Warner M, Stefanidou M. Survey of resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from UK patients with cystic fibrosis to six commonly prescribed antimicrobial agents. Thorax 2003;58:794-6.
- Doring G, Conway SP, Heijerman HG, Hodson ME, Hoiby N, Smyth A, i sur. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. Eur Res J 2000;16:749-67.
- Gowan JRW, Huges Je, Vandamme P. *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic ecological issues. J Med Microbiol 1996;45:395-407.
- Mahenthalingam E, Vandamme P. Taxonomy and pathogenesis of the *Burkholderia cepacia* complex. Chron Respir Dis 2005;2:209-17.
- Lipuma JJ. Update on the *Burkholderia cepacia* complex. Curr Opin Pulm Med 2005;11:528-33.
- Hutchinson ML, Poxton MR, Govan JR. *Burkholderia cepacia* produces a hemolysin that is capable of inducing apoptosis and degranulation of mammalian phagocytes. Infect Immun 1998;6:2033-9.
- Martin DW, Mohr CD. Invasion and intracellular survival of *Burkholderia cepacia*. Infect Immun 2000;68:24-9.
- Lewenza S, Conway B, Greenberg EP, Sokol PA. Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. J Bacteriol 1999;181:748-56.