

*Agnieszka Iwańska¹, Joanna Nowak¹, Wojciech Skorupa², Ewa Augustynowicz-Kopec¹

Mikrobiologiczna analiza drobnoustrojów izolowanych z dróg oddechowych dorosłych chorych na mukowiscydozę leczonych w Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc

Microbiological analysis microorganisms isolated from the airways of adult CF patients treated in the National Tuberculosis and Lung Disease Research Institute

¹Zakład Mikrobiologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa
Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. Ewa Augustynowicz-Kopec

²I Klinika Chorób Płuc, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa
Kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Jan Kuś

Słowa kluczowe

lekooporność, mukowiscydoza,
Pseudomonas aeruginosa,
Staphylococcus aureus

Key words

antimicrobial resistance, cystic fibrosis,
Pseudomonas aeruginosa,
Staphylococcus aureus

Streszczenie

Wstęp. Mukowiscydoza (CF) jest najczęściej występującą w populacji kaukaskiej chorobą genetyczną o autosomalnym typie dziedziczenia. Najpoważniejsze objawy obserwuje się w płucach. Nawracające infekcje układu oddechowego są główną przyczyną chorobowości i śmiertelności chorych na mukowiscydozę. Patogenami najczęściej zakażającymi drogi oddechowe dorosłych chorych na mukowiscydozę są *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*.

Cel pracy. Celem badania była analiza gatunków bakterii patogennych izolowanych z dróg oddechowych dorosłych chorych na mukowiscydozę i określenie ich lekooporności.

Materiał i metody. Materiał do badań stanowiło 621 szczepów bakterii patogennych wyizolowanych od 92 chorych w okresie od stycznia do listopada 2014 roku. Do hodowli szczepów i ich identyfikacji stosowano standardowe procedury bakteriologiczne. Oznaczenie lekooporności szczepów przeprowadzono z wykorzystaniem metody dyfuzji z paska (MIC), dyfuzyjno-krażkowej wg Kirby-Bauera oraz automatycznej Vitek 2 Compact (bioMérieux).

Wyniki. W przeprowadzonej analizie stwierdzono, że najczęściej izolowanymi patogenami były *Pseudomonas aeruginosa* (53,9%) i *Staphylococcus aureus* (34,6%). 166 (47,3%) z 351 szczepów *P. aeruginosa* zidentyfikowano jako fenotyp śluzowy. W badaniu wykazano, że szczepy *P. aeruginosa* o fenotypie śluzowym były bardziej wrażliwe na leki niż szczepy nieśluzowe.

Wnioski. Wynik badania mikrobiologicznego chorych na mukowiscydozę umożliwia zastosowanie intensywnej, właściwej dla danego zakażenia antybiotykoterapii, przez co zmniejsza częstość zaostrzeń, spowalnia postęp choroby i wydłuża życie.

S u m m a r y

Introduction. Cystic fibrosis (CF) is the most autosomal recessive genetic disease. The most serious symptoms are observed in the lungs. Recurrent respiratory infections are the main causes of the morbidity and mortality of cystic fibrosis patients. Pathogens that commonly infect the airways of adult CF patients include *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Aim. The aim of this study was to analysis of microorganisms cultured from airways adult CF patients and antimicrobial resistance tests of the most frequently isolated bacteria.

Material and methods. In this study, 420 sputum samples of 92 CF patients were collected during between January and November 2014. The microorganisms were cultured and identification according to standard microbiological procedures. Drug resistance were performed in automatic system Vitek 2 Compact (bioMérieux), MIC and disk-diffusion method by Kirby-Bauer.

Results. In our study, among the isolates the most frequent pathogens were *Pseudomonas aeruginosa* (53.9%) and *Staphylococcus aureus* (34.6%). 166 (47.3%) strains of 351 isolates *P. aeruginosa*, were identified as *P. aeruginosa* mucoid phenotype. This

Adres/address:

*Agnieszka Iwańska
Zakład Mikrobiologii IGiChP
Płocka 26, 01-138 Warszawa
tel./fax +48 (22) 431-21-82
a.iwanska@igichp.edu.pl

study demonstrated that the isolates with mucoid phenotypes were more susceptible than non-mucoid isolates.

Conclusions. Although the epidemiology of bacterial infections in CF patients has become more complex, the life expectancy of these patients continues to increase. The prevalence of different pathogens in materials from CF patients should be closely monitored, especially mucoid strains *P. aeruginosa* are associated with persisting and recurring infections.

WSTĘP

Mukowiscydoza (ang. *cystic fibrosis* – CF) jest jedną z najczęstszych chorób dziedzicznych rasy białej. Spowodowana jest defektem genu *CFTR*, kodującego białko przezbłonowe *CFTR* (ang. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), będące kanałem chlorkowym odpowiedzialnym za transport chloru i sodu przez błony komórek nabłonkowych. Nieprawidłowe funkcjonowanie białka wynikające z braku lub niskiego poziomu ekspresji genu prowadzi do zaburzeń równowagi elektrolitowej, zmniejszenia zolowej warstwy płynu okołorzęskowego i upośledzenia klirensu śluzowo-rzęskowego. Efektem tych zaburzeń jest produkcja nadmiernie lepkiego i gęstego śluzu, którego zaleganie sprzyja kolonizacji bakterii i tworzeniu biofilmu utrudniającego dostęp komórek fagocytujących i leków do miejsca zakażenia (1-4). Chorzy na mukowiscydozę już od wczesnego dzieciństwa narażeni są na nawracające i przewlekłe infekcje bakteryjne w układzie oddechowym o różnej etiologii bakteryjnej, w wyniku których dochodzi do powolnego, ale stałego odoskrzelowego niszczenia tkanki płucnej (5-7). Przed erą antybiotykową dzieci chore na mukowiscydozę umierały w pierwszym roku życia. Postęp, jaki dokonał się w medycynie, znacznie poprawił jakość i długość życia chorych. W 1986 roku tylko 29,2% stanowią chory ≥ 18. roku życia, natomiast w 2012 roku dorośli chory stanowili 49,1%. Według danych Cystic Fibrosis Foundation w Stanach Zjednoczonych w ciągu dwóch ostatnich dekad średnia prognozowana długość życia chorych wzrosła o prawie 10 lat, od wieku 31,3 roku w 2002 roku do 41,1 w 2012 roku (8-10).

W wielu badaniach stwierdzono, że etiologia zakażeń bakteryjnych zależna jest od wieku chorego (5-7). W pierwszej dekadzie życia u chorych ma mukowiscydozę infekcje wywołują przede wszystkim *Staphylococcus aureus* i *Haemophilus influenzae*, które uszkadzając nabłonek, ułatwiają kolonizację innym drobnoustrojom. Wraz z rozwojem choroby, od dorosłych chorych z dróg oddechowych izolowane są głównie pałeczki *Pseudomonas aeruginosa*, rzadziej *Burkholderia cepacia* complex (*Bcc*), *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Burkholderia gladioli*, *Ralstonia* spp., *Cupriavidus* spp., *Inguilinus* spp., *Herbaspirillum* spp. i *Pandoraea* spp. (5, 11-13). W grupie chorych na mukowiscydozę pomimo intensywnej antybiotykoterapii, niektórych drobnoustrojów takich jak *P. aeruginosa*, *Bcc* i *A. xylosoxidans* nie udaje się całkowicie eradykować, ich

obecność prowadzi do zaostrzeń płucnych i częstszych hospitalizacji (14-18).

Wśród potencjalnych patogenów u chorych na mukowiscydozę wymienia się również prątki niegruźlicze (ang. *mycobacterium other than tuberculosis* – MOTT), zwane także atypowymi. W tej grupie chorych MOTT izoluje się z częstością 4-28%. Zróżnicowanie gatunkowe prątków wydaje się zmieniać w zależności od rozmieszczenia geograficznego. W Stanach Zjednoczonych dominują gatunki *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium kansasii* oraz *Mycobacterium abscessus*, w Europie zaś *M. abscessus* (19-22).

Drobnoustroje związane z zakażeniami układu oddechowego uznawane są za genetycznie i fenotypowo różnorodne. Analiza mikrobiomu dróg oddechowych osób palących, niepalących, chorych na ciężką postać POChP oraz chorych na mukowiscydozę dowodzi, że liczebność bakterii jest największa w mukowiscydozie, przy jednoczesnej najmniejszej różnorodności flory bakteryjnej. Z badań tych wynika, że z powodu długotrwałej koegzystencji dwóch lub więcej gatunków zasiedlających drogi oddechowe chorych dochodzi do ich zmienności fenotypowej. Interakcje międzybakteryjne, w tym również wymiana informacji genetycznej, mogą mieć wpływ na różnice fenotypowe drobnoustrojów i ich wrażliwość na leki (21-23).

Szczególne znaczenie kliniczne w tej grupie chorych przypisuje się zakażeniom wywołanym przez *P. aeruginosa*. Zakażenia pałeczką stwierdza się u większości dorosłych chorych (80%). Zmiany fenotypowe *P. aeruginosa* podczas przewlekłego zakażenia, jakie towarzyszy mukowiscydozie, zostały dobrze poznane i udokumentowane (9, 10, 24, 25). W początkowej fazie choroby następuje kolonizacja dróg oddechowych szczepami bez otoczki śluzowej, a wraz z postępem choroby obserwuje się konwersję do szczepów śluzowych. Fenotyp śluzowy związany jest ze wzmożonym wydzielaniem egzokomórkowego polisacharydu i jest czynnikiem pogłębiającym uszkodzenia oskrzeli i płuc.

Mimo stosowanej profilaktyki i leczenia antybiotykami prawie nigdy nie udaje się eradykować z dróg oddechowych chorych na mukowiscydozę szczepów z gatunku *Staphylococcus aureus*. Obecność gronkowca złocistego w drogach oddechowych chorych oceniana jest na 30-50%. Chorzy mogą ulegać kolonizacji lub zakażeniu zarówno metycylinowrażliwymi (MSSA), jak i metycylinoopornymi (MRSA) szczepami *S. aureus* (3, 6-9).

Wśród ważnych czynników etiologicznych zakażeń w mukowiscydozie wymienia się liczne gatunki pałeczek

czek z rodzaju *Burkholderia* (dawniej *Pseudomonas*), w tym *B. gladioli* oraz *Burkholderia cepacia* complex. Badania molekularne wykazały, że *Burkholderia cepacia* complex jest kompleksem kilku gatunków, niewykazujących żadnych różnic fenotypowych. Obecnie zidentyfikowano 17 ściśle powiązanych odmian genomowych występujących w materiałach od chorych na mukowiscydozę. Najczęściej stwierdzano szczepy z gatunku *B. cenocepacia* (50%), kolejno *B. multivorans* (35%), *B. cepacia*, *B. stabilis* i *B. vietnamiensis*. *B. gladioli* jest trzecim co do częstości gatunkiem *Burkholderia* wywołującym zakażenia w grupie chorych na mukowiscydozę w Stanach Zjednoczonych (15%). Choć częstość zakażeń *Burkholderia* w mukowiscydozie jest niewielka, to ich obecność w materiale od chorego uważa się za niekorzystny czynnik rokowniczy, związany z pogorszeniem funkcji płuc, wzrostem częstości hospitalizacji; jest również powodem dyskwalifikacji chorych do przeszczepienia płuc. Ponadto problem terapeutyczny stanowi naturalna i nabyta oporność pałeczek *Burkholderia* na wiele grup antybiotyków i chemioterapeutyków (penicyliny, imipenem, kolistyna, aminoglikozydy) (26, 27). Eradykacja pałeczek jest praktycznie niemożliwa ze względu na wysoką zdolność do przetrwania w komórkach nabłonkowych i makrofagach (26-28).

Diagnostyka mikrobiologiczna zakażeń dróg oddechowych chorych na mukowiscydozę jest trudna i stanowi wyzwanie dla laboratorium mikrobiologicznego (2, 3, 5). Leczenie zakażenia może być efektywne, jeżeli wybór antybiotyku jest skorelowany z wynikiem antybiogramu. Ocena lekooporności szczepów *P. aeruginosa* jest stale przedmiotem wielu kontrowersji. Wynika to z obecności różnych morfotypów kolonii i zróżnicowanej wrażliwości na antybiotyki w obrębie jednego genotypu szczepu wyizolowanego z materiału diagnostycznego (5, 25).

Duża złożoność i zmienność mikrobiomu dróg oddechowych u chorych na mukowiscydozę narzuca konieczność wykonywania badań mikrobiologicznych stanowiących podstawę rozpoznania i leczenia zakażeń chorych na mukowiscydozę. Stałe wzrastający odsetek dorosłych chorych niesie ze sobą konieczność zapewnienia specjalistycznej opieki medycznej. Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc jest jedną z nielicznych jednostek w Polsce zajmujących się leczeniem dorosłych chorych na mukowiscydozę.

CEL PRACY

Celem pracy była analiza mikrobiologiczna patogenów izolowanych z materiałów od chorych na mukowiscydozę leczonych w Przychodni Przyklinicznej i I Klinice Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w okresie od stycznia do listopada 2014 roku.

MATERIAŁ I METODY

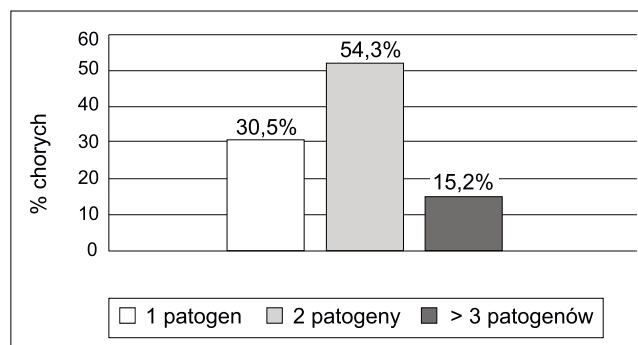
Analizie poddano materiały od 92 chorych na mukowiscydozę, w wieku od 18 do 51 lat (57 kobiet i 39 mężczyzn), hospitalizowanych w I Klinice Chorób Płuc IGiChP i leczonych ambulatoryjnie w Przychodni Przyklinicznej IGiChP w okresie 1.01.2014-

30.11.2014 roku. W analizowanym okresie od chorych pobrano 420 plwocin, z których wyizolowano 651 szczepów bakterii patogennych.

Szczepy zidentyfikowano rutynowymi metodami diagnostycznymi. Analizowano właściwości fenotypowe, cechy biochemiczne oraz oporność na leki badanych szczepów. Diagnostykę mikrobiologiczną przeprowadzono w oparciu o posiewy wykonane na podłożach stałych: Columbia blood agar, MacConkey agar, Mannitol-salt agar, Chocolate agar, CHROMagar MRSA i *Burkholderia Cepacia Selective Agar*. Przynależność gatunkową szczepów określano z wykorzystaniem systemu automatycznego Vitek 2 Compact oraz testów komercyjnych. Rozróżnienie typu śluzowego i nieśluzowego wykonywano na podstawie obserwacji makroskopowych kolonii *P. aeruginosa* na płycie z pożywką MacConkey agar. Lekooporność szczepów określano przy użyciu pasków z gradientem stężeń (MIC), metodą dyfuzyjno-krażkową wg Kirby-Bauera i z zastosowaniem systemu Vitek 2 Compact. Wyniki lekooporności interpretowano w oparciu o wytyczne EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) i rekomendacje Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów.

WYNIKI

Od 28 (30,5%) chorych z materiału izolowano tylko jeden drobnoustroj, od 50 (54,3%) dwa, od 14 (15,2%) trzy i więcej drobnoustrojów (ryc. 1).



Ryc. 1. Rozkład grupy chorych w zależności od ilości wyhodowanych drobnoustrojów.

W grupie 92 chorych u 64 (69,6%) stwierdzono zakażenia mieszane, najczęściej o etiologii *P. aeruginosa* i *S. aureus* – 149 próbek (35,5%) od 42 chorych (45,7%).

Analizie poddano 420 materiałów uzyskanych z dróg oddechowych chorych na mukowiscydozę.

Z badanego materiału wyosobniono 651 bakterii patogennych, wśród których 351 (53,9%) zidentyfikowano do gatunku *P. aeruginosa*, 225 (34,6%) *S. aureus* (tab. 1).

Wśród pałeczek niefermentujących innych niż *P. aeruginosa* stwierdzono 33 szczepy *Achromobacter* spp. (5,1%) i 7 *S. maltophilia* (1,1%). Najczęściej

Tabela 1. Patogeny najczęściej izolowane z dróg oddechowych od chorych na mukowiscydozę.

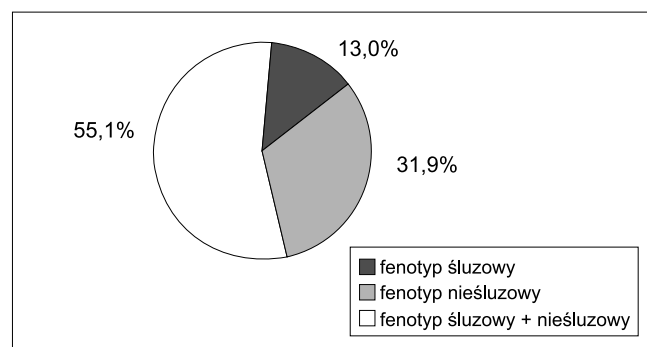
Drobnoustroj		Liczba izolatów (%)	Liczba chorych (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	fenotyp nieśluzowy	185 (28,4%)	22 (23,9%)
	fenotyp śluzowy	166 (25,5%)	9 (9,8%)
	śluzowy + nieśluzowy	–	38 (41,3%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	MSSA	205 (31,5%)	61 (66,3%)
	MRSA	20 (3,1%)	2 (2,2%)
	MSSA + MRSA	–	5 (5,4%)

izolowane gatunki z rodziny *Enterobacteriaceae*: *S. marcescens* – 10 (1,5%) szczepów, *Enterobacter* spp. – 8 (1,2%), *P. mirabilis* – 4 (0,6%), *E. coli* – 2 (3,1%), *Aeromonas sobria* – 2 (3,1%) (tab. 2).

Tabela 2. Drobnoustroje rzadziej izolowane od chorych na mukowiscydozę.

Drobnoustroje	Liczba izolatów (%)	Liczba chorych (%)
<i>Achromobacter</i> spp.	33 (5,1%)	12 (13,0%)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	7 (1,1%)	4 (4,3%)
<i>Haemophilus influenzae</i>	5 (0,8%)	4 (4,3%)
<i>Enterobacteriaceae</i> (<i>E. coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>A. sobria</i> , <i>E. cloacae</i>)	26 (4,0%)	12 (13,0%)
<i>Comamonas testosteroni</i>	2 (0,3%)	2 (2,2%)
<i>B. gladioli</i>	1 (0,2%)	1 (1,1%)
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	1 (0,2%)	1 (1,1%)

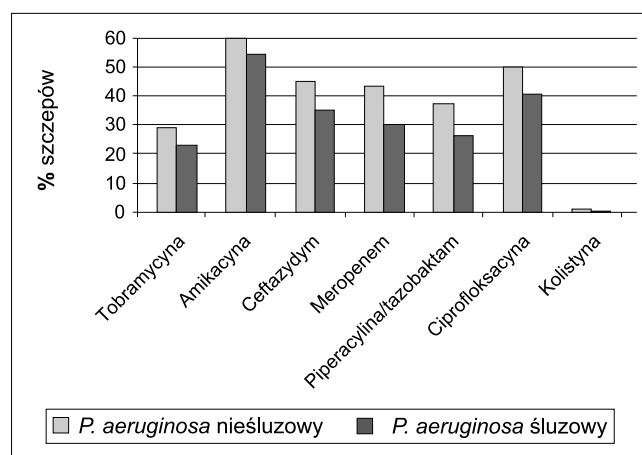
Najczęściej od chorych izolowano pałeczki *P. aeruginosa* – 69 (75,0%) chorych, w tym u 9 (13,0%) chorych zidentyfikowano tylko fenotyp śluzowy, a u 22 (31,9%) wyłącznie nieśluzowy, u 38 (55,0%) stwierdzono fenotyp śluzowy i nieśluzowy (ryc. 2).

**Ryc. 2.** Fenotypy *P. aeruginosa*.

Wśród 351 szczepów *P. aeruginosa*, 166 (47,3%) szczepów sklasyfikowano jako fenotyp śluzowy. Analiza lekooporności pałeczek o fenotypie śluzowym i nieśluzowym nie wykazała istotnych różnic. Odsetek szczepów *P. aeruginosa* fenotypu śluzowego opornych na aminoglikozydy wynosił od 54,2% (na amikacynę) do 22,9% (na tobramycynę) dla fenotypu śluzowego i od 59,8% (na amikacynę) do 29,4% (na tobramycynę) dla fenotypu nieśluzowego. Lekooporność na antybiotyki beta-laktamo-

we kształtowała się od 34,9% (na ceftazydym) do 26,5% (na piperacylinę z tazobaktamem) dla fenotypu śluzowego i od 45,1% (na ceftazydym) do 37,3% (na piperacylinę z tazobaktamem) dla fenotypu nieśluzowego. Niespełna 50% wszystkich badanych szczepów opornych było na ciprofloksacynę. Wśród analizowanych szczepów jeden wykazywał oporność na kolistynę (ryc. 3).

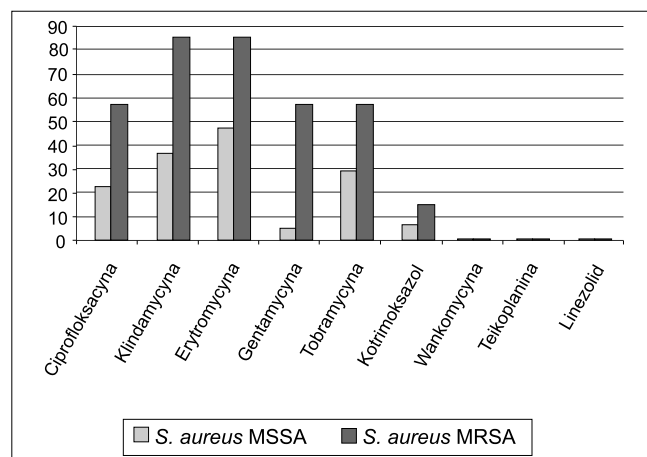
W badanej grupie 92 chorych od 68 (73,9%) izolowano szczepy *S. aureus*, w tym od 61 (66,3%) tylko

**Ryc. 3.** Lekooporność szczepów *P. aeruginosa* na antybiotyki.

S. aureus wrażliwy na metycylinę, a od 2 (2,2%) tylko *S. aureus* oporny na metycylinę, od 5 (5,4%) chorych izolowano zarówno *S. aureus* MSSA, jak i MRSA.

U 205 szczepów *S. aureus* MSSA nie odnotowano szczepów opornych na glikopeptydy (wankomycyna, teikoplanina) i linezolid. Tylko 10% szczepów *S. aureus* wykazywało oporność na trimetoprim/sulfametoksazol i aminoglikozydy (tobramycyna – 3,0%, amikacyna i gentamycyna – 4,5%). Odsetek szczepów opornych na makrolidy wynosił 47,0%, na linkosamidy – 36,4%. Na ciprofloksacynę opornych było 21,2% szczepów.

Wśród 20 szczepów *S. aureus* MRSA nie obserwowano szczepów opornych na linezolid i glikopeptydy. Niespełna 20% szczepów MRSA opornych było na trimetoprim/sulfametoksazol. Lekooporność na makrolidy i linkosamidy wynosiła 85,7%. Odsetek szczepów opornych na aminoglikozydy kształtował się od 42,9% na amikacynę do 57,1% na gentamycynę i tobramycynę. Na ciprofloksacynę opornych było 57,1% szczepów. Nie izolowano szczepów opornych na ceftarolinę (ryc. 4).



Ryc. 4. Lekooporność szczepów *S. aureus* na antybiotyki.

DYSKUSJA

Pomimo postępu w opiece nad chorymi na mukowiscydozę i wydłużenia życia obserwowanego w ciągu ostatnich 20 lat, zakażenia bakteryjne stanowią poważny problem diagnostyczny i terapeutyczny. W celu poprawy metody leczenia i kontroli zakażeń konieczne jest coraz lepsze poznawanie mechanizmów choroby i etiologii zakażeń.

W przedstawionej pracy dokonano analizy częstości występowania bakterii patogennych i oceny ich lekooporności wśród 92 dorosłych chorych na mukowiscydozę leczonych w IGiChP. Od 1/3 chorych izolowano jeden patogen, a od 2/3 chorych dwa i więcej patogenów. Od większości chorych izolowano dwa patogeny – 50 (54,3%), od 28 (30,5%) jeden, a od 14 (15,2%) trzy i więcej drobnoustrojów. W badaniach Moore'a i wsp. dominującą grupę stanowili chorzy, od których izolowano tylko jeden patogen (53%), od 38% chorych wyizolowano dwa, a od pozostałych 4% trzy patogeny (29). W zakażeniach dróg oddechowych chorych na mukowiscydozę stwierdza się zakażenia mieszane, najczęściej o etiologii *S. aureus* i *P. aeruginosa* (1, 7, 9, 11, 21, 22). W badanej grupie u 64 (69,6%) chorych stwierdzono zakażenia mieszane, najczęściej o etiologii *P. aeruginosa* i *S. aureus* – 42 chorych (45,7%). W badaniu Huberta i wsp. stwierdzono występowanie w nieco niższych odsetkach MSSA i *P. aeruginosa* u 29,6% chorych, a MRSA i *P. aeruginosa* u 18,8% chorych (30).

W przeprowadzonej analizie w materiałach klinicznych uzyskanych od chorych na mukowiscydozę dominowały szczepy z gatunku *P. aeruginosa*, co jest zgodne z doniesieniami innych autorów (6, 10, 14, 29). W grupie 92 chorych od 69 (75,0%) izolowano *P. aeruginosa*, w tym 9 (13,0%) chorych miało tylko fenotyp śluzowy, 22 (31,9%) tylko nieśluzowy, a 38 (55,0%) fenotyp śluzowy i nieśluzowy. Podobne wyniki uzyskano w badaniach Huberta i wsp., w których z materiału od 207 (72,0%) dorosłych chorych na mukowiscydozę izolowano szczepy *P. aeruginosa* (30), natomiast w badaniach Valenzy i wsp. od 50% chorych (31).

W opinii wielu badaczy istnieje silny związek między obecnością śluzowych szczepów *P. aeruginosa* a obniżeniem czynności układu oddechowego chorych na mukowiscydozę. Wynika to z faktu, że pałeczki o fenotypie śluzowym nie poddają się eradykacji i wykazują wysoką oporność na antybiotyki (6, 9, 10, 13, 32, 33). Natomiast wyniki naszych badań wskazują na podobną lekooporność na antybiotyki szczepów *P. aeruginosa* o fenotypie śluzowym i nieśluzowym. Wyniki badań własnych są porównywalne z wynikami badań Owllii i wsp. (34).

W pracy najwyższą aktywność wobec wszystkich badanych szczepów *P. aeruginosa*, zarówno śluzowych, jak i nieśluzowych, wykazywały kolistyna, tobramycyna, piperacylina z tazobaktamem oraz ceftazydym. Podobnie Manno i wsp. w badaniach stwierdzili znaczne odsetki szczepów wrażliwych na te leki: kolistynę, ceftazydym, piperacylinę z tazobaktamem i tobramycynę (33).

W badaniach własnych wykazano, że drugim co do częstości występowania drobnoustrojem był ***S. aureus* izolowany od 68 (73,9%) chorych, w tym od 61 (66,3%) tylko MSSA, u 2 (2,2%) tylko MRSA, a u 5 (5,4%) chorych izolowano zarówno *S. aureus* MSSA, jak i MRSA.** Hubert i wsp. izolowali szczepy *S. aureus* wrażliwe na metycylinę od 49,0% dorosłych chorych, a odporne MRSA od 18,0% chorych (30). W ostatnich latach wśród chorych na mukowiscydozę leczonych w IGiChP zauważono spadek częstości izolacji *S. aureus* MRSA z 18,0% (2011) do 7,6% (2014) (35). Według danych Patient Registry Cystic Fibrosis Foundation z 2012 roku w tej grupie chorych częstość zakażeń szczepami MSSA wzrosła z 37% w roku 1995 do 67% w 2010 roku, podobnie MRSA z 0,1% w 1995 roku do 25,7% w 2010 roku. Wyniki wielu badań wykazały, że szczepy MSSA częściej izolowane są od dzieci, a MRSA z podobną częstością u dzieci i dorosłych (30). W grupie chorych problem stanowią również coraz częściej szczepy pozaszpitalne (ang. *community-associated* – CA-MRSA). Badania dotyczące zakażeń układu oddechowego przez CA-MRSA u dorosłych sugerują, że drobnoustrój ten w ponad 50% przypadkach może wywoływać martwicze zapalenie płuc, o znacznej śmiertelności (6, 9, 10, 36-39).

W naszej pracy szczepy *S. aureus* odporne na metycylinę (MRSA) wyizolowano od 7 (7,3%) chorych. Podobne odsetki uzyskano we Włoszech i w Brazylii, gdzie MRSA izolowano od 7,6 vs 6% chorych. Natomiast w Stanach Zjednoczonych i Hiszpanii częstość izolacji MRSA była wyższa odpowiednio 18,8 vs 18,0% (37-39).

Autorzy wielu badań sugerują, że rozpowszechnienie wystąpienia szczepów *S. aureus* MRSA u chorych na mukowiscydozę koreluje z częstością występowania zakażeń o etiologii MRSA w innych grupach chorych w danym kraju (9, 13, 39). Wśród analizowanych szczepów *S. aureus* 293 (82,3%) było wrażliwych na cefoksytynę, co oznacza wrażliwość na penicyliny z inhibitorem i cefalosporyny aktywne wobec *Staphy-*

lococcus. W badanym materiale wszystkie szczepy *S. aureus* wrażliwe były na glikopeptydy oraz linezolid. Podobne wyniki uzyskali Valenza i wsp. oraz Paixão i wsp. (31, 40).

W wielu pracach stwierdzono u dorosłych chorych w wydzielinach dróg oddechowych obecność patogenów z gatunku *Stenotrophomonas maltophilia* i *Achromobacter* spp. Potwierdziły to wyniki naszych badań, w których częstość występowania *Achromobacter* spp. wynosiła 5,1%, a *S. maltophilia* 1,1% (5, 6, 9-11, 13, 17). Wyższe odsetki dla *S. maltophilia* (10,3%) i *Achromobacter* spp. (8,7%) stwierdzili w swoich badaniach Burns i wsp. (37). W ostatnich latach wśród chorych na mukowiscydozę leczonych w IGIChP zauważono wzrost częstości izolacji *Achromobacter* spp. z 1,9% (2011) do 5,1% (2014) (35). Nie jest znany wpływ wymienionych patogenów na przebieg choroby oraz długość życia chorych. Obserwowany wzrost częstości izolacji tych gatunków bakterii może prawdopodobnie wynikać z ułatwionej kolonizacji przez ten patogen dróg oddechowych chorych (5, 6, 9-11).

H. influenzae często izolowany jest od dzieci chorych na mukowiscydozę. Wśród dorosłych chorych odsetki są zdecydowanie niższe. Wyniki uzyskane w pracy potwierdzają, że w grupie dorosłych chorych odsetek izolowanych szczepów pałeczek *Haemophilus* wynosił tylko 4,2% chorych (4 osoby). Według danych literaturowych odsetek chorych, od których izoluje się pałeczki *Haemophilus*, waha się od 6,0 do 34,0% (6, 11, 31).

Od początku lat 80. postęp w metodach różnicowania bakterii umożliwił identyfikację u chorych na mukowiscydozę pałeczek z rodzaju *Burkholderia*, w tym najczęściej *B. cenocepacia* i *B. multivorans*. Pomimo że częstość występowania *Burkholderia* jest niewielka, to jednak ze względu na wrodzoną oporność na wiele antybiotyków oraz niektóre środki dezynfekcyj-

ne stwierdzenie tego gatunku bakterii u chorych jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym, związanym z pogorszeniem funkcji płuc. W przedstawionej pracy od jednego chorego wyizolowano jeden (0,2%) szczep *B. gladioli*. W pracach innych autorów odsetek izolacji pałeczek *Burkholderia* wahał się od 1,8 do 21,3% (26, 27, 41, 42).

Diagnostyka mikrobiologiczna mukowiscydozy jest trudna, wymaga rzetelnej i szerokiej wiedzy mikrobiologa. Prowadzenie diagnostyki możliwe jest dzięki znajomości czynników etiologicznych zakażeń, mechanizmów oporności na antybiotyki i interakcji drobnoustrojów-gospodarz. Tylko wiarygodny wynik badania mikrobiologicznego umożliwia zastosowanie intensywnej, właściwej dla danego zakażenia antybiotykoterapii, dlatego tak ważna jest ścisła współpraca lekarza z mikrobiologiem, gwarantująca wysoką jakość i wiarygodność badania. Prawidłowa diagnostyka mikrobiologiczna to między innymi identyfikacja drobnoustrojów do gatunku, co stanowi cenną wskazówkę dla lekarza klinicysty odnośnie terapii empirycznej (3, 6, 10, 16).

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy i dane zawarte w publikacjach poświęconych mukowiscydozie potwierdzają konieczność prowadzenia badań mikrobiologicznych w tej jednostce chorobowej.

WNIOSKI

1. Przeprowadzona analiza mikrobiologiczna materiałów pochodzących od 92 dorosłych chorych na mukowiscydozę wykazała dominację *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*.
2. Wśród chorych zakażonych *P. aeruginosa* 55% stanowili chorzy, od których izolowano fenotyp śluzowy i nieśluzowy.
3. Nie wykazano różnic w lekooporności pałeczek *Pseudomonas* pomiędzy fenotypem śluzowym i nieśluzowym.

PIŚMIENNICTWO

1. Zhao J, Schloss PD, Kalikin LM et al.: Decade-long bacterial community dynamics in cystic fibrosis airways. Proc Natl Acad Sci U S A 2012; 109: 5809-5814.
2. Bittar F, Rolain JM: Detection and accurate identification of new or emerging bacteria in cystic fibrosis patients. Clin Microbiol Infect 2010; 16: 809-820.
3. Burns JL, Rolain JM: Culture-based diagnostic microbiology in cystic fibrosis: can we simplify the complexity? J Cyst Fibros 2014; 13: 1-9.
4. Clunes MT, Boucher RC: Cystic Fibrosis: The mechanism of pathogenesis of an inherited lung disorder. Drug Discov Today Dis Mech 2007; 4: 63-72.
5. Kiska DL, Riddell SW: Practical Laboratory Aspects of Cystic Fibrosis Microbiology: an Update. Part I. Clinical Microbiology Newsletter 2012; 34: 27-31.
6. Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M, McColley SA: Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev 2011; 24: 29-70.
7. Renders N, Verbrugh H, Van Belkum A: Dynamics of bacterial colonisation in the respiratory tract of patients with cystic fibrosis. Infect Genet Evol 2001; 1: 29-39.
8. <http://www.cff.org/UploadedFiles/research/ClinicalResearch/PatientRegistryReport/2012-CFF-Patient-Registry.pdf>
9. LiPuma JJ: The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev 2010; 23: 299-323.
10. Gilligan PH: Infections in patients with cystic fibrosis: diagnostic microbiology update. Clin Lab Med 2014; 34: 197-217.
11. Harrison F: Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. Microbiology 2007; 153: 917-923.
12. Kiska DL, Riddell SW: Practical Laboratory Aspects of Cystic Fibrosis Microbiology: an Update. Part II. Clinical Microbiology Newsletter 2012; 34: 35-41.
13. Foweraker J: Recent advances in the microbiology of respiratory tract infection in cystic fibrosis. Br Med Bull 2009; 89: 93-110.
14. LiPuma JJ: The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev 2010; 23: 299-323.
15. Hansena CR, Pressler T, Nielsen KG et al.: Inflammation in *Achromobacter xylosoxidans* infected cystic fibrosis patients. J Cyst Fibros 2010; 9: 51-58.
16. LiPuma JJ: Burkholderia and emerging pathogens in cystic fibrosis. Semin Respir Crit Care Med 2003; 24: 681-692.
17. De Baets F, Schelstraete P, Van Daele S et al.: *Achromobacter xylosoxidans* in cystic fibrosis: prevalence and clinical relevance. J Cyst Fibros 2007; 6: 75-78.
18. Hansen CR, Pressler T, Ridderberg W et al.: *Achromobacter* species in cystic fibrosis: cross-infection caused by indirect patient-to-patient contact. J Cyst Fibros 2013; 12: 609-615.
19. Bar-On O, Mussaffi H, Mei-Zahav M et al.: Increasing nontuberculous mycobacteria infection in cystic fibrosis. J Cyst Fibros 2015; 14: 53-62.

20. Esther CR Jr, Esserman DA, Gilligan P et al.: Chronic *Mycobacterium abscessus* infection and lung function decline in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2010; 9: 117-123.
21. Callaghan M, McClean S: Bacterial host interactions in cystic fibrosis. *Curr Opin Microbiol* 2012; 15: 71-77.
22. Tang AC, Turvey SE, Alves MP et al.: Current concepts: host-pathogen interactions in cystic fibrosis airways disease. *Eur Respir Rev* 2014; 23: 320-332.
23. Górecka D, Nowiński A, Augustynowicz-Kopeć E: Mikrobiom układu oddechowego. *Pneumonol Alergol Pol* 2014; 82: 481-485.
24. Mayer-Hamblett N, Rosenfeld M, Gibson RL et al.: *Pseudomonas aeruginosa* *in vitro* phenotypes distinguish cystic fibrosis infection stages and outcomes. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 190: 289-297.
25. Davies JC: *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: pathogenesis and persistence. *Paediatr Respir Rev* 2002; 3: 128-134.
26. Courtney JM, Dunbar KE, McDowell A et al.: Clinical outcome of *Burkholderia cepacia* complex infection in cystic fibrosis adults. *J Cyst Fibros* 2004; 3: 93-98.
27. France MW, Dodd ME, Govan JR et al.: The changing epidemiology of *Burkholderia* species infection at an adult cystic fibrosis centre. *J Cyst Fibros* 2008; 7: 368-372.
28. Złosnik JE, Costa PS, Brant R et al.: Mucoïd and nonmucoïd *Burkholderia cepacia* complex bacteria in cystic fibrosis infections. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: 67-72.
29. Moore JE, Shaw A, Millar BC et al.: Microbial ecology of the cystic fibrosis lung: does microflora type influence microbial loading? *Br J Biomed Sci* 2005; 62(4): 175-178.
30. Hubert D, Réglie-Poupet H, Sermet-Gaudelus I et al.: Association between *Staphylococcus aureus* alone or combined with *Pseudomonas aeruginosa* and the clinical condition of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2013; 12: 497-503.
31. Valenza G, Tappe D, Turnwald D et al.: Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganism isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2008; 7: 123-127.
32. Mayer-Hamblett N, Rosenfeld M, Gibson RL et al.: *Pseudomonas aeruginosa in vitro* phenotypes distinguish cystic fibrosis infection stages and outcomes. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 190: 289-297.
33. Manno G, Cruciani M, Romano L et al.: Antimicrobial use and *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility profile in a cystic fibrosis centre. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25: 193-197.
34. Owlia P, Nosrati R, Alaghebandan R, Lari AR: Antimicrobial susceptibility differences among mucoïd and non-mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Hyg Infect Control* 2014; 19: Doc13.
35. Iwańska A, Nowak J, Skorupa W, Augustynowicz-Kopeć E: Mikrobiologiczna analiza i ocena lekowrażliwości drobnoustrojów izolowanych z dróg oddechowych dorosłych chorych na mukowiscydozę leczonych w Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc w latach 2008-2010. *Pneumonol Alergol Pol* 2013; 81: 105-113.
36. Goodrich JS, Sutton-Shields TN, Kerr A et al.: Prevalence of community-associated methicillin-resistant. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1231-1233.
37. Burns JL, Emerson J, Stapp JR et al.: Microbiology of sputum from patients at cystic fibrosis centers in the United States. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 158-163.
38. García AD, Ibarra A, Rodríguez FC, Casal M: Antimicrobial susceptibility of bacterial isolates from patients with cystic fibrosis. *Rev Esp Quimioter* 2004; 17: 332-335.
39. Campana S, Cocchi P, Döring G et al.: Emergence of an epidemic clone of community-associated methicillin-resistant panton-valentine leucocidin-negative *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis patient populations. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 3146-3147.
40. Paixão VA, Barros TF, Mota CM et al.: Prevalence and antimicrobial susceptibility of respiratory pathogens in patients with cystic fibrosis. *Braz J Infect Dis* 2010; 14: 406-409.
41. Paschoal IA, de Oliveira Villalba W, Bertuzzo CS et al.: Cystic fibrosis in adults. *Lung* 2007; 185: 81-87.
42. Steinkamp G, Wiedemann B, Rietschel E et al.: Emerging Bacteria Study Group. Prospective evaluation of emerging bacteria in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2005; 4: 41-48.

otrzymano/received: 30.01.2015
 zaakceptowano/accepted: 05.03.2015