

МИКРОБИОЛОГИЧНИ АСПЕКТИ НА БРОНХОПУЛМОНАЛНИТЕ ИНФЕКЦИИ ПРИ ПАЦИЕНТИ С МУКОВИСЦИДОЗА

оригинални
статии

Торакална Медицина
Том IV, август 2012, бр.2

Т. Стратева¹, Г. Петрова², Д. Атанасова¹, И. Митов¹, П. Переновска²

Катедра по медицинска микробиология, Медицински факултет, Медицински университет,
София¹

Клиника по детски болести, УМБАЛ "Александровска", Медицински университет, София²

Резюме

Цел: Да се проучат етиологичната структура на бронхопулмоналните инфекции (БПИ) и антимикробната чувствителност на етиологичните причинители при пациенти с муковисцидоза (МВ).

Пациенти и методи: За периода 2006–2011 г., микроскопски и културелно бяха изследвани храчки от 54 пациенти (23 момичета и 31 момчета), на възраст от 5 до 27 години. Антибиотичната чувствителност на клинично значимите изолати беше определяна чрез Дифузионния дисков метод.

Резултати: Водещите причинители на БПИ бяха *Pseudomonas aeruginosa* (изолиран при 31 пациенти - 57.4%) и *Staphylococcus aureus* (19 - 35.2%), следвани от *Candida* spp. (16 - 29.6%), група *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* (6 - 11.1%), *Haemophilus influenzae* (5 - 9.3%), *Burkholderia cepacia* complex (3 - 5.5%) и др. Беше отчетено възрастово нарастване на относителния дял колонизирани с *P. aeruginosa* – от 42.1% преди 10-годишна възраст до 83.3% при пациентите над 16 години ($p < 0.01$). При *S. aureus* бяха установени 42.1% колонизация до 10 години и 25.0% след 16 години. Разпределението по пол показва значимо по-висока честота на инфекцията с *P. aeruginosa* при момчетата (73.9% срещу 45.2% при момчетата – $p < 0.05$), както и преобладаване при тях на инфекциите със *S. aureus* (43.5% - 29.0%). Беше установена сравнително ниска антимикробна резистентност на *P. aeruginosa* – cefepime (6.5%), imipenem (9.7%), meropenem (6.5%), amikacin (12.9%), gentamicin (16.1%), tobramycin (9.7%) и ciprofloxacin (9.7%). Три от изолираните общо 19 щамма *S. aureus* (15.8%) бяха methicillin-резистентни.

Заклучение: Настоящото проучване потвърждава световните тенденции за динамична промяна на респираторната микробна флора с нарастване на възрастта на пациентите с МВ – рязко повишаване на колонизацията с *P. aeruginosa* и съответно намаляване на колонизацията със *S. aureus* след 16-годишна възраст. Непрекъснатият микробиологичен контрол гарантира адекватна антибиотична терапия на БПИ, особено в случаите на доказване на микроорганизми с вродена резистентност към аминогликозиди (като *B. cepacia* complex и *Stenotrophomonas maltophilia*), което налага изключването на инхалаторния tobramycin от схемата на лечение. Успешната ерадикация на първоначалната и следващите БПИ в ранна възраст подобрява качеството на живот и преживяемостта на пациентите с МВ.

Ключови думи: муковисцидоза, бронхопулмонални инфекции, етиология, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

MICROBIOLOGICAL ASPECTS OF BRONCHOPULMONARY INFECTIONS IN CYSTIC FIBROSIS PATIENTS

T. Strateva¹, G. Petrova², D. Atanasova¹, I. Mitov¹, P. Perenovska²

Department of Medical Microbiology, Medical Faculty, Medical University of Sofia¹

Pediatric clinic, Alexandrovska University Hospital, Medical University of Sofia²

Abstract

Aim: To explore the etiological structure of bronchopulmonary infections (BPI) and antimicrobial susceptibility of the etiological agents in cystic fibrosis (CF) patients.

Patients and methods: During 2006–2011 sputum smear microscopy and culture were accomplished among 54 patients (23 females and 31 males), aged 5–27 years. Antimicrobial susceptibility testing of the clinically relevant isolates was performed by the Disk diffusion method.

Results: The most frequent pathogens causing BPI were *Pseudomonas aeruginosa* (isolated in 31 patients - 57.4%) and *Staphylococcus aureus* (19 - 35.2%), followed by *Candida* spp. (16 - 29.6%), *Klebsiella*–*Enterobacter*–*Serratia* group (6 - 11.1%), *Haemophilus influenzae* (5 - 9.3%), *Burkholderia cepacia* complex (3 - 5.5%) etc. The relative part of patients colonized with *P. aeruginosa* increased with age – from 42.1% before 10-year age to 83.3% among 16+ years-old patients ($p < 0.01$). Regarding *S. aureus* colonization, the following frequencies were established: 42.1% in small children (before 10 years) and 25.0% in adolescent/adult age group (16+ years). The gender distribution showed a significantly higher prevalence of *P. aeruginosa* infections in girls (73.9% vs. 45.2% among boys – $p < 0.05$), as well as a female predominance of *S. aureus* infections (43.5% / 29.0%). There were relatively low resistance rates of *P. aeruginosa* to the following antibiotics: cefepime (6.5%), imipenem (9.7%), meropenem (6.5%), amikacin (12.9%), gentamicin (16.1%), tobramycin (9.7%) and ciprofloxacin (9.7%). A total of 3 of the 19 *S. aureus* isolates (15.8%) were methicillin-resistant.

Conclusion: The current study confirms the global trends of dynamic change of respiratory microbial flora as the CF patient's age increases – a considerable increase in *P. aeruginosa* colonization and decrease in *S. aureus* colonization after 16 years of age. The continuous microbiological monitoring of BPI guarantees their adequate antibiotic therapy, especially in the cases of isolation of intrinsically resistant to aminoglycosides microorganisms such as *B. cepacia* complex and *Stenotrophomonas maltophilia* that requires the exclusion of treatment with inhaled tobramycin. Successful eradication of the initial and subsequent BPI in the early years of CF patients improves the quality of life and survival of these individuals.

Key words: cystic fibrosis, bronchopulmonary infections, etiology, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

ВЪВЕДЕНИЕ

Муковисцидозата (МВ) е автозомно-рецесивно наследствено заболяване, при което е нарушена секреторната функция на всички екзокринни жлези. Клиничните симптоми са многообразни, но при по-голямата част от пациентите водещи са респираторните. Патологичните промени в белия дроб се проявяват изключително като хронични инфекции. Те обуславят прогресивното влошаване на белодробната функция и въпреки, че понастоящем средната продължителност на живота при пациенти с муковисцидоза е увеличена значително (главно поради подобряване на антимикробната терапия), хроничната бронхопулмонална инфекция (БПИ) остава една от основните причини за летален изход (16).

Спектърът от микроорганизми, причиняващи инфекции на дихателните пътища (ДП) при пациентите с МВ, е разнообразен. Най-често респираторният тракт е колонизиран или инфектиран със *Staphylococcus aureus* и *Haemophilus influenzae* в ранна детска възраст и с *Pseudomonas aeruginosa* при пациентите след 16-18 годишна възраст (1). Други типични патогени са Грам-отрицателни бактерии, като *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia pseudomallei*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Ralstonia pickettii*, *Pandorea apista* и др. (9), които представляват сериозно терапевтично предизвикателство, поради своята вродена резистентност към много от съвременните антимикробни лекарства. В ДП бактериите обикновено формират микроколонии, растящи в биофилм (тип растеж, при който отделните бактериални клетки са включени в общ извънклетъчен матрикс). Този биофилм се явява бариера, пречатваща действието на АМЛС и имунните механизми, и по този начин се поддържа бактериалната персистенция (7). Веднъж установила се, такава инфекция рядко и трудно може да бъде изкоренена (12).

В ДП бактериите обикновено формират микроколонии, растящи в биофилм (тип растеж, при който отделните бактериални клетки са включени в общ извънклетъчен матрикс). Този биофилм се явява бариера, пречатваща действието на АМЛС и имунните механизми, и по този начин се поддържа бактериалната персистенция (7). Веднъж установила се, такава инфекция рядко и трудно може да бъде изкоренена (12).

Целта на настоящото проучване беше: анализ на етиологичната структура на БПИ и определяне на чувствителността към АМЛС на етиологичните причинители при пациенти с МВ.

ПАЦИЕНТИ, МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Изследвани пациенти

За периода 2006–2011 г., бяха изследвани 54 пациенти (23 момичета и 31 момчета) с генетично потвърдена диагноза МВ, на възраст от 5 до 27 години. Разпределението по пол и възраст е представено на Фиг. 1, а данните от генетичното изследване – в Табл. 1.

Клиничен материал за microbiологично изследване

След издухване на носа, изплакване на устата и преглъщане на вода, пациентът спонтанно отделяше храчка в стерилен контейнер. При някои деца, след функционално изследване на дишането (спирометрия), беше използван

INTRODUCTION

Cystic fibrosis (CF) is autosomal recessive inherited disorder characterized by abnormal secretory function of all exocrine glands. Clinical symptoms vary with the severity of the disease and according to the organs involved, but the most common ones are respiratory tract involved. Pathological lung changes are mainly presented as chronic infections. These infections are the major reason for progressive decreasing of lung function. Even though recently life-expectancy for CF patients is notably prolonged (mainly due to better antimicrobial therapy), the chronic bronchopulmonary infection (BPI) still are one of the leading causes for mortality (16).

The spectrum of microorganisms, causing airway infections in CF patients is manifold. The most common respiratory tract colonising and/or infecting agents are *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus influenzae* in early childhood and *Pseudomonas aeruginosa* for patients aged over 16-18 years (1). Other typical pathogens include: Gram-negative bacteria, such as *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia pseudomallei*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Ralstonia pickettii*, *Pandorea apista* etc. (9), all of them posing a serious therapeutic challenge, due to their congenital resistance towards many of the contemporary antimicrobial agents (AA) used for BPI treatment in CF cases.

In air-ways bacteria mold micro-colonies from growing biofilm (type of growth where individual bacterial cells are included in one common extracellular matrix). This biofilm represents a barrier which prevented the action AA and immune mechanisms, and thus it maintains the bacterial persistence (7). This infection, once established is rarely and difficult to be eradicated (12).

The aim of our study was: to analyze and explore the etiological structure of BPI and antimicrobial susceptibility of the etiological agents in CF patients.

PATIENTS AND METHODS

Patients

During 2006–2011 period we examined 54 patients (23 females and 31 males), aged 5-27 years, with genetically confirmed CF disease. Gender and age distribution of the patients is shown in Figure 1, and CF-genetic confirmation results in Table 1.

Clinical material for microbiological examination

After blowing the nose, rinsing the mouth and swallowing the rest of the water, the patient spontaneously expectorated sputum into a sterile container. In some children, unable to expectorate spontaneously a standard method of sputum

original articles

MICROBIOLOGICAL ASPECTS OF BRONCHOPULMONARY INFECTIONS IN CYSTIC FIBROSIS PATIENTS

Thoracic Medicine
Volume IV, August 2012, Issue 2

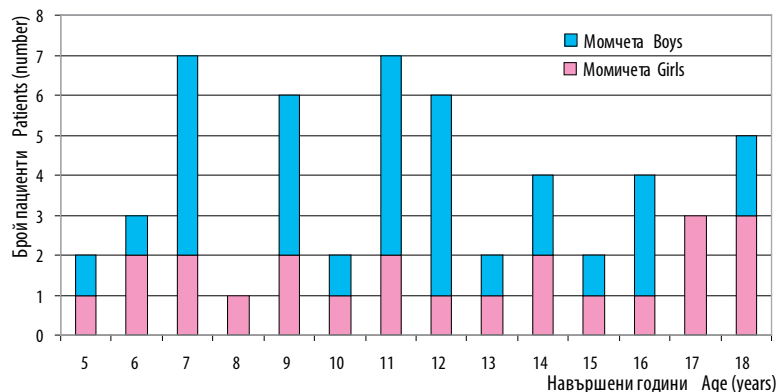
оригинални статии

МИКРОБИОЛОГИЧНИ АСПЕКТИ
НА БРОНХОПУЛМОНАЛНИТЕ
ИНФЕКЦИИ ПРИ ПАЦИЕНТИ
С МУКОВИСЦИДОЗА

Торакална Медицина
Том IV, август 2012, бр.2

Фиг. 1. Разпределение по пол и възраст на изследваните пациенти с МВ.

Fig. 1. Gender and age distribution of the examined CF patients.



стандартен метод за индукция на храчка. За целта инхалаторно беше прилаган изотоничен разтвор на натриев хлорид, при премедикация с 2.5–5 mg салбутамол за избягване на възможността от бронхоспазм в процеса на индуциране на храчка при рискови пациенти (17).

Микробиологично изследване

В зависимост от консистенцията, някои храчки (жилавите) бяха поставяни първоначално в термостат на 37°C, за 30 min., с добавен панкреатин за втечняване. От храчките бяха приготвяни натривки, които след оцветяване по Грам бяха микроскопирани. След вортексиране за 15 sec., храчките бяха посявани на следните хранителни среди: кръвен агар, шоколадов агар, агар на МакКонки и селективна среда за изолиране на дрожди (Сабура). Направените посявки бяха култивирани в продължение на 24-48 часа, на 37°C. Клинично значимите микроорганизми бяха идентифицирани с биохимични тестове и беше определяна тяхната антимикробна чувствителност.

Определяне на чувствителността към АМЛС

Чувствителността към АМЛС беше определяна чрез Дифузионния дисков метод, в съответствие с препоръките на Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (4).

induction was used after performing pulmonary function tests (spirometry). For this purpose inhalation of isotonic sodium chloride solution was administered after premedication with 2.5-5 mg salbutamol to avoid the possibility of bronchospasm during sputum induction (7).

Microbiological examination

Depending on the texture, some sputum (the thick and sticky ones) were initially placed in an incubator at 37°C, for 30 min with added pancreatin for liquefaction. Sputum smears were investigated by Gram stain and examined with light microscope. The rest of the sputum was rotated on vortex for 15 sec. and seeded the following nutritional bases: blood agar, chocolate agar, McConkie's agar and selective medium for isolation of yeasts (Sabouraud). The samples were cultivated for 24-48 hours at 37°C. Clinically significant microorganisms were identified by biochemical tests and their antimicrobial susceptibility was determined.

Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility testing of the clinically relevant isolates was performed by the Disk diffusion method according recommendations of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (4).

Табл. 1. Доказани мутации при изследваните пациенти с муковисцидоза.

Мутации на CFTR гена*	Брой пациенти	Процент от общия брой
delF508 / delF508	26	48.1
delF508 / N1303K	6	11.1
delF508 / G542X	4	7.4
delF508 / неизвестна	4	7.4
delF508 / R1070Q	3	5.6
delF508 / delTA1677	2	3.7
delF508 / 306delTAGA	2	3.7
delF508 / 3849+10KB C-T	1	1.85
delF508 / G1069R+L88X	1	1.85
delF508 / Q220X	1	1.85
Q220X / 2183G->A (2184DAexB)	1	1.85
R1070Q / 2184insA	1	1.85
R347P / Q220X+875+40G->APOC->A	1	1.85
R375P / Q220X	1	1.85

* Кодирание на синтез на патологичен протеин, който блокира хлорните канали в мембраните на епителните клетки, наречен кистилен фиброзен трансмембранен регулатор (CFTR).

Table 1. Established genetic defects in the patients.

CFTR mutation *	Number of patients	Percentage of total count
delF508 / delF508	26	48.1
delF508 / N1303K	6	11.1
delF508 / G542X	4	7.4
delF508 / unknown	4	7.4
delF508 / R1070Q	3	5.6
delF508 / delTA1677	2	3.7
delF508 / 306delTAGA	2	3.7
delF508 / 3849+10KB C-T	1	1.85
delF508 / G1069R+L88X	1	1.85
delF508 / Q220X	1	1.85
Q220X / 2183G->A (2184DAexB)	1	1.85
R1070Q / 2184insA	1	1.85
R347P / Q220X+875+40G->APOC->A	1	1.85
R375P / Q220X	1	1.85

* The mutated gene encodes a pathologic form of the protein, which is called the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) that blocks the transport of chloride ions across epithelial cell membranes.

Статистическа обработка

Получените резултати за честотата на БПИ (обща, по възраст, пол и генетичен дефект) бяха сравнени и анализирани чрез t-тест на Стьюдент. За статистически значими бяха приемани стойности на $p < 0.05$.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Етиологична структура на БПИ при изследваните пациенти с МВ.

1.1. Обща етиологична структура на БПИ.

Общата етиологична структура на установените БПИ при изследваните 54 пациенти с МВ е представена на Фиг. 2. При 2 пациенти (3.7%) не бяха доказани етиологични причинители на инфекции на ДП (нормална микрофлора). Както е видно от фигурата, водещите етиологични причинители бяха: *P. aeruginosa* и *S. aureus*, следвани от *Candida* spp., група *Klebsiella-Enterobacter-Serratia*, *H. influenzae* и др.

Честотата на инфекциите, причинени от *P. aeruginosa* (57.4%), беше много близка до докладваната от Фондация Муковисцидоза в САЩ през 2009–2010 г. (51.7%), за разлика от установената честота на разпространение на *S. aureus* (35.2%) спрямо честотата в САЩ – 51.3% (2009 г.) и 67.0% (2010 г.) (5, 6).

Коинфекция с 2 или 3 микроорганизма беше установена при 22 пациента (40.7%). Най-често бяха доказвани *P. aeruginosa* + *Candida* spp., *S. aureus* + *Candida* spp., *S. aureus* + *H. influenzae* и *S. aureus* + *P. aeruginosa*.

При изследването на 20.3% от пациентите бяха изолирани Грам-отрицателни неферментиращи глюкозата бактерии, различни от *P. aeruginosa* – *Acinetobacter baumannii*, *B. cepacia* complex, *S. maltophilia*, *Pseudomonas fluorescens*, *A. xylosoxidans*. Установената честота на *B. cepacia* complex (5.5%) беше малко по-висока от тази в САЩ за 2009–2010 г. (съотв., 2.7% и 2.5%), докато на *S. maltophilia* (3.3%) – по-ниска (съотв., 12.7% и 13.8%) (5, 6).

1.2. Етиологична структура на БПИ по генетичен дефект.

Не беше установена зависимост между изолирания микроорганизъм и доказвания гене-

Statistical analysis

All the results for BPI frequency (total, age, gender or genetic mutation controlled) were compared and analyzed with Student's t-test. We considered p values of ≤ 0.05 to indicate statistical significance.

RESULTS AND DISCUSSION

1. Etiological structure of BPI in CF patients

1.1. Total etiological structure

The total etiology structure of BPI in all 54 examined patients is shown in Figure 2. In 2 patients (3.7%) there were not any pathogens causing BPI isolated (they are noted as patients with normal microflora). As it could be seen from the figure, the leading pathogens causing BPI were: *P. aeruginosa* and *S. aureus*, followed by *Candida* spp., *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group, *H. influenzae*, etc.

The frequency of the infections caused by *P. aeruginosa* (57.4%), was very close to the one reported by USA Cystic fibrosis Foundation in 2009–2010 (51.7%), on the contrary the distribution frequency of *S. aureus* (35.2%) is lower compared to the one in USA – 51.3% (2009) and 67.0% (2010) (5, 6).

Co-infection of 2 or 3 microorganisms was found in 22 patients (40.7%). The most commonly isolated combinations were *P. aeruginosa* + *Candida* spp., *S. aureus* + *Candida* spp., *S. aureus* + *H. influenzae* and *S. aureus* + *P. aeruginosa*.

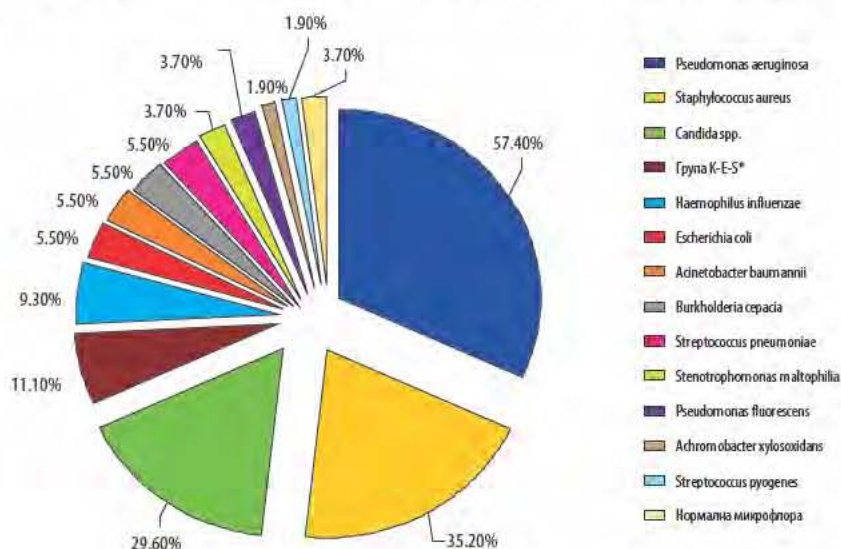
In this study 20.3% from the patients had non-fermentative gram-negative bacteria different from *P. aeruginosa* isolated. This group included *Acinetobacter baumannii*, *B. cepacia* complex, *S. maltophilia*, *Pseudomonas fluorescens*, *A. xylosoxidans*. Our established frequency of *B. cepacia* complex (5.5%) was slightly higher than the one reported in USA for 2009–2010 (2.7% and 2.5% respectively), while *S. maltophilia*'s one (3.3%) was lower (12.7% and 13.8% respectively) (5, 6).

1.2. BPI etiology and genetic defect

We could not establish any correlation between the isolated pathogen and proven genetic defect,

Фиг. 2. Обща етиологична структура на БПИ.

Fig. 2. Total etiology structure of BPI.



* *Klebsiella-Enterobacter-Serratia*.

original
articles

MICROBIOLOGICAL ASPECTS OF
BRONCHOPULMONARY INFECTIONS
IN CYSTIC FIBROSIS PATIENTS

Thoracic Medicine
Volume IV, August 2012, Issue 2

тичен дефект, което потвърждава данните за липса на връзка между генетичния дефект и белодробното засягане при пациентите с МВ (3).

1.3. Етиологична структура на БПИ по възраст.

Беше отчетено сигнификантно възрастово нарастване на относителния дял колонизирани с *P. aeruginosa* – от 42.1% преди 10-годишна възраст до 83.3% при пациентите над 16 години ($p < 0.01$) – Фиг. 3. При *S. aureus* бяха установени 42.1% колонизация до 10 години и 25% след 16 години. Нарастването на процента на изолиране на *Candida* spp. с възрастта логично се свързва с по-продължителната употреба на АМЛС за лечение на БПИ при по-големите пациенти.

За сравнение, в САЩ честотата на колонизация с *P. aeruginosa* рязко нараства след 6-тата година – около 25% при 6 годишните, 65% при 18 годишните и близо 80% при достигане на 25 годишна възраст. Колонизацията на респираторния тракт със *S. aureus* (средно около 70% между 6 и 17 годишна възраст) се покачва стръмно до 10-тата година, бележи лек спад при пациентите между 11 и 17 години и значително намаляване на процента след 17 години (6).

which confirms the previously reported data for lack of connection between the mutation of the patients and severity of their lungs involvement and damage from CF (3).

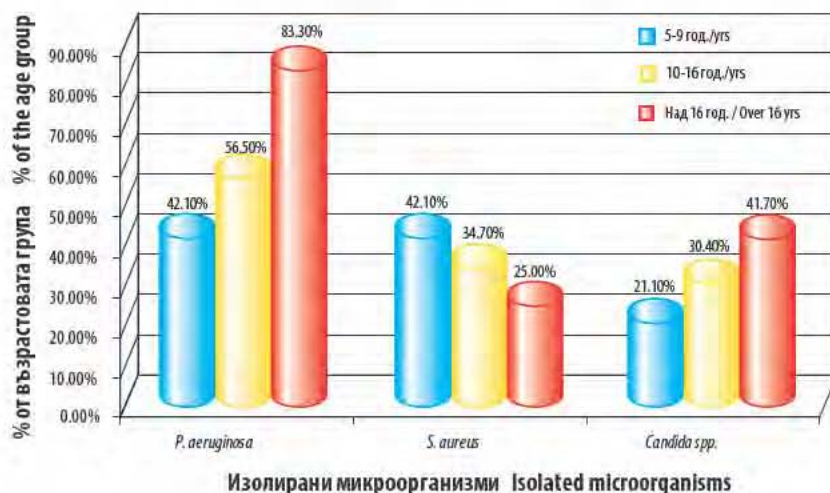
1.3. Age distribution and etiology of BPI.

We found a significant increase of the relative part of patients colonized with *P. aeruginosa* – from 42.1% in patients 10 years and younger up to 83.3% in patients over 16 years of age ($p < 0.01$) – Figure. 3. For younger patients under 10 years in 42.1% *S. aureus* was isolated, while the percentage drops to 25% for patients aged 16 years or more. Increasing of the *Candida* spp. isolation with increasing of the age is logic and could be related to the more extended and prolonged use of AA for BPI in adolescent patients.

In comparison with data from USA the relative part of patients colonized with *P. aeruginosa* abruptly increase after 6th year from 25% to 65% in 18 years old, up to 80% when patients reach 25 years of age. Respiratory tract colonization with *S. aureus* (average around 70% between 6th and 17th year) is steadily increasing up to 10th year then slowly decreases between 11th and 17th year to significant decrease after 17th year (6).

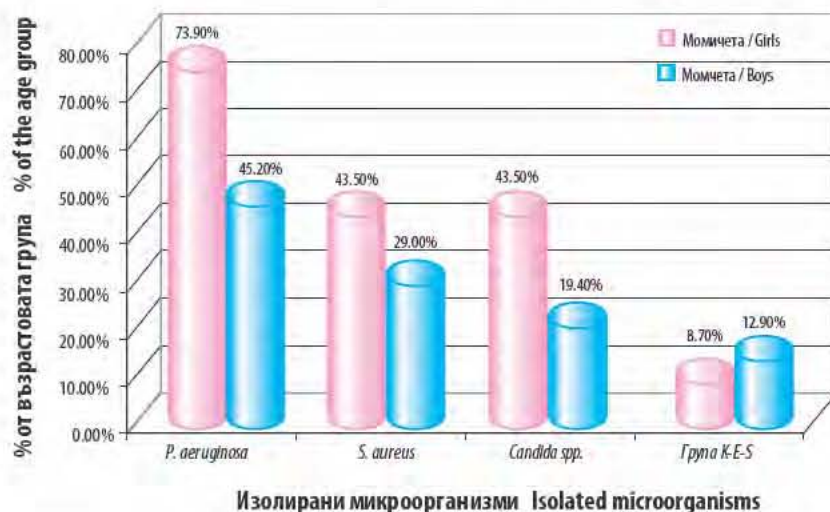
Фиг. 3. Честота на трите най-чести причинители на БПИ според възрастта на пациентите.

Fig 3. Frequency of the three most common BPI pathogens distributed according the age of the patients.



Фиг. 4. Честота на най-честите причинители на БПИ според пола.

Fig. 4. Frequency of the most common pathogens distributed by gender.



* Група К-Е-С – група Klebsiella–Enterobacter–Serratia.

* K-E-S group – Klebsiella–Enterobacter–Serratia group.

1.4. Етиологична структура на БПИ по пол.

Беше установена значимо по-висока честота на инфекцията с *P. aeruginosa* при момчетата (73.9% срещу 45.2% при момчетата – $p < 0.05$), както и преобладаване при тях на инфекциите със *S. aureus* (43.5 срещу 29.0%) и *Candida spp.* (43.5% / 19.4%) – Фиг. 4. Честотата на БПИ, причинени от група *Klebsiella-Enterobacter-Serratia*, при двата пола беше сходна.

Доказаното от други автори полово различие във времето на настъпване на хронична инфекция с *P. aeruginosa* – средно 1 година и 7 месеца по-рано при момчетата (8), би могло да обясни изолирането на *P. aeruginosa* в по-голям процент при изследваните от нас момчета.

Наскоро проведено проучване за търсене на полови различия по отношение на клинични параметри, особености на проведеното лечение и годишен болничен престой сред скандинавската популация пациенти с МВ показва често възникване на нова хронична инфекция с *P. aeruginosa* при жените (30.3%), в сравнение с мъжете (7.1%), за анализиращия 1-годишен период. Освен това, при възрастните пациенти от женски пол беше установен по-висок риск за развитие на инфекции, причинени от *P. aeruginosa* и *Burkholderia spp* (14).

2. Антимикробна чувствителност (АЧ) на водещите етиологични причинители на БПИ.

На Табл. 2 и Табл. 3 са изложени данните за АЧ на водещите етиологични причинители на БПИ при изследваните пациенти с МВ – съответно *P. aeruginosa* и *S. aureus*.

АЧ на проучените респираторни изолати *P. aeruginosa* беше по-висока от тази на МВ-изолати от Западна Европа и САЩ в последните десет години (2, 13, 15). В Испания, Англия и Дания бяха открити colistin-резистентни изолати *P. Aeruginosa* (11, 13, 15).

По-високата АЧ на изследваните в настоящото проучване щамове *P. aeruginosa* се свързва с преобладаването на пациенти в добро до умерено-тежко клинично състояние (с интер-

1.4. BPI etiology and gender distribution

The gender distribution showed a significantly higher prevalence of *P. aeruginosa* infections in girls (73.9% vs. 45.2% among boys – $p < 0.05$), as well as a female predominance of *S. aureus* infections (43.5% / 29.0%) and *Candida spp.* (43.5% / 19.4%) – Figure. 4. The frequency of BPI, caused by *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group pathogens was similar in both genders.

Well proven by other authors gender difference in the onset of chronic infection с *P. aeruginosa* – average 1 year and 7 months earlier for the girls (8), could explain our results for higher percentage of *P. aeruginosa* in girls compared to the boys.

A recently conveyed survey aiming to search for gender differences in clinical characteristics, treatment plans and conducted and annual hospitalization records among the Scandinavian population of CF patients, revealed more frequent occurrence of new chronic infection with *P. aeruginosa* in females (30.3%) compared with the males (7.1%) analyzed for period of 1-year. Furthermore, in adult female patients a higher risk for infections caused by *P. aeruginosa* and *Burkholderia spp.* was established (14).

2. Antimicrobial susceptibility (AS) of the leading BPI etiologic agents

We showed in table 2 and 3 our data for AS of the leading BPI etiologic agents in studied CF patients – namely *P. aeruginosa* and *S. aureus*.

AS of the studied *P. aeruginosa* isolated from the air-ways was higher than AS of CF-isolates from Western Europe and the US in the last 10 years (2, 13, 15). Colistin-resistant isolates of *P. aeruginosa* were reported in Spain, United Kingdom and Denmark (11, 13, 15).

Higher AS expressed from *P. aeruginosa* strains in this study is probably associated with the prevalence of patients in light to moderate severe clinical condition (with intermittent or chronic

Табл. 2. Антимикробна чувствителност на *P. aeruginosa*.

Table 2. Antibiotic sensitivity of *P. aeruginosa* strains.

Антибиотици	Процент (брой) чувствителни щамове	Antibiotic	Percentage (number) of sensitive strains
Carbenicillin	87.1 (27)	Carbenicillin	87.1 (27)
Azlocillin	90.3 (28)	Azlocillin	90.3 (28)
Piperacillin	90.3 (28)	Piperacillin	90.3 (28)
Piperacillin+tazobactam	100 (31)	Piperacillin+tazobactam	100 (31)
Ceftazidime	96.8 (30)	Ceftazidime	96.8 (30)
Cefepime	93.5 (29)	Cefepime	93.5 (29)
Cefpirome	93.5 (29)	Cefpirome	93.5 (29)
Aztreonam	87.1 (27)	Aztreonam	87.1 (27)
Imipenem	90.3 (28)	Imipenem	90.3 (28)
Meropenem	93.5 (29)	Meropenem	93.5 (29)
Amikacin	83.9 (26)	Amikacin	83.9 (26)
Gentamicin	80.6 (25)	Gentamicin	80.6 (25)
Tobramycin	87.1 (27)	Tobramycin	87.1 (27)
Netilmicin	77.4 (24)	Netilmicin	77.4 (24)
Ciprofloxacin	83.9 (26)	Ciprofloxacin	83.9 (26)
Colistin	100 (31)	Colistin	100 (31)

Табл. 3. Антимикробна чувствителност на *S. aureus*.

Table 3. Antibiotic sensitivity of *S. aureus* strains.

Антибиотици	Процент (брой) чувствителни щамове	Antibiotic	Percentage (number) of sensitive strains
Penicillin*	10.5 (2)	Penicillin*	10.5 (2)
Amoxicillin+clavulanic acid	84.2 (16)	Amoxicillin+clavulanic acid	84.2 (16)
Oxacillin**	84.2 (16)	Oxacillin**	84.2 (16)
Erythromycin	73.7 (14)	Erythromycin	73.7 (14)
Clindamycin	78.9 (15)	Clindamycin	78.9 (15)
Gentamicin	100 (19)	Gentamicin	100 (19)
Ciprofloxacin	89.5 (17)	Ciprofloxacin	89.5 (17)
Tetracycline	100 (19)	Tetracycline	100 (19)
Rifampicin	94.7 (18)	Rifampicin	94.7 (18)
Sulfamethoxazole + trimethoprim	94.7% (18)	Sulfamethoxazole + trimethoprim	94.7% (18)
Chloramphenicol	100 (19)	Chloramphenicol	100 (19)
Linezolid	100 (19)	Linezolid	100 (19)
Vancomycin	100 (19)	Vancomycin	100 (19)

* Резистентните на penicillin *S. aureus* са резистентни и на ampicillin (amoxicillin).

** Резистентните на oxacillin са резистентни на всички β -лактами.

* Penicillin-resistant *S. aureus* have also antibiotic tolerance to ampicillin (amoxicillin).

** Oxacillin-resistant strains are resistant to all β -lactam antibiotics

митентна или хронична колонизация/инфекция, без склонност към чести екзацербации), които не се нуждаят от продължително антибиотично лечение, както и с някои особености на антибиотичната политика в България: емпирично лечение предимно с перорални антибиотици; трудно осигуряване на инхалаторен тобрамицин до средата на 2008 г. (преди включването му в Позитивния лекарствен списък); липса на клинично приложение на colistin и др.

В настоящото проучване бяха открити 3 methicillin-резистентни щамове *S. aureus* (MRSA) – при 5.6% от всички пациенти, които съставляваха 15.8% от общия брой изолирани *S. aureus*. Сравнена с обобщени данни за разпространението на MRSA сред пациенти с МВ в САЩ и Европа през 2007–2008 г., установената в това проучване честота е близка до докладваната в Белгия, по-висока от тази в Австралия, Канада и Англия, където варира от 2.5% до 3.5%, и по-ниска спрямо САЩ, Ирландия и Франция (между 8.5% и 23.7%) (10).

Изолирането на *B. cepacia* complex (5.5%) и *S. maltophilia* (3.7%) корелираше с трудно терапевтично повлияване на инфекцията поради вродената антибиотична резистентност на причинителите съответно към аминогликозиди и colistin, и аминогликозиди и β -лактами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящото проучване потвърждава световните тенденции в етиологичната структура на БПИ при пациенти с МВ, касаещи честотата на разпространение на водещите причинители и динамичната промяна на респираторната микробна флора с нарастване на възрастта – рязко повишаване на колонизацията с *P. aeruginosa* и съответно намаляване на колонизацията със *S. aureus* след 16 годишна възраст.

Установената необичайно висока чувствителност към АМЛС на водещия етиологичен причинител на БПИ – *P. aeruginosa*, за разлика

colonization/infection, not prone to frequent exacerbations) that do not require prolonged antibiotic treatment. The other reason was based on some characteristics of the antibiotic policy in Bulgaria: mainly empirical treatment with oral antibiotics; difficult supply of inhaled tobramycin in the middle of 2008 (prior to its inclusion on the positive drug list, that is fully reimbursed by the ministry of health), lack of clinical use of colistin (not registered for use in Bulgaria) and so on.

In this study, we could isolate three methicillin-resistant strains of *S. aureus* (MRSA) - 5.6% of all patients who accounted for 15.8% of the total number of isolated *S. aureus*. Compared with the aggregated data on the prevalence of MRSA among CF patients world-wide in 2007-2008, the incidence we found is similar to the one in Belgium; higher than the one in Australia, Canada and England, where the reports are ranging from 2.5% to 3.5% and lower than the data from USA, Ireland and France (between 8.5% and 23.7%) (10).

Isolation of *B. cepacia* complex (5.5%) and *S. maltophilia* (3.7%) correlated with cases with poor therapeutic response, due to congenital causes of antibiotic resistance to aminoglycosides, respectively, colistin, aminoglycosides, and β -lactams of the etiologic pathogens.

CONCLUSION

The current study confirms the global trends in etiologic structure of the leading pathogens in the airways and the dynamic changes found in respiratory microbial flora as the CF patient's age increases – a considerable increase in *P. aeruginosa* colonization and decrease in *S. aureus* colonization after 16 years of age.

The established unusually higher sensitivity of AA of the leading BPI etiologic agent - *P. aeruginosa*, which was in contrast of the data for Western Europe and USA, mainly correlated with

от данните за Западна Европа и САЩ, корелира с изследването предимно на пациенти в стабилно клинично състояние, както и с някои особености на антибиотичната политика в България, отнасящи се главно до приложението на инхалаторните tobramycin и colistin при пациентите с МВ.

Непрекъснатият микробиологичен контрол гарантира адекватна терапия на БПИ при пациенти с МВ, особено в случаите на доказване на микроорганизми с вродена резистентност към аминогликозиди (като *B. cepacia* complex и *S. maltophilia*), което налага изключването на инхалаторния tobramycin от схемата на лечение.

Успешната ерадикация на първоначалната и следващите БПИ (особено на *P. aeruginosa* инфекцията) в ранна възраст подобрява качеството на живот и преживяемостта на пациентите с МВ.

included in our study CF patients in stable clinical condition, and some peculiarities of the antibiotic policy in Bulgaria, mainly concerning the administration of inhaled tobramycin and colistin for CF patients.

The continuous microbiological monitoring of BPI guarantees an adequate antibiotic therapy for BPI, especially in the cases of isolation of intrinsically resistant to aminoglycosides microorganisms such as *B. cepacia* complex and *Stenotrophomonas maltophilia* that requires the exclusion of treatment with inhaled tobramycin.

Successful eradication of the initial and subsequent BPI (especially *P. aeruginosa* infection) in the early years of CF patients improves the quality of life and survival of these individuals.

original articles

MICROBIOLOGICAL ASPECTS OF BRONCHOPULMONARY INFECTIONS IN CYSTIC FIBROSIS PATIENTS

Thoracic Medicine
Volume IV, August 2012, Issue 2

Книгопис:

References:

- Burns J. L., Emerson J., Stapp J. R., Yim D. L., Krzewinski J., Loudon L., Ramsey B. W., Clausen C. R. (1998). Microbiology of sputum from patients at cystic fibrosis centers in the United States. *Clin Infect Dis*; 27: 158-163.
- Burns J. L., Saiman L., Whittier S., Larone D., Krzewinski J., Liu Z., Marshall S. A., Jones R. N. (2000). Comparison of agar diffusion methodologies for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 38: 1818-1822.
- Chillón M., Casals T., Nunes V., Giménez J., Pérez Ruiz E., Estivill X. (1993). Identification of a new missense mutation (P205S) in the first transmembrane domain of the CFTR gene associated with a mild cystic fibrosis phenotype. *Hum Mol Genet*; 2: 1741-1742.
- CLSI. (2010). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100-S20. CLSI, Wayne P. A.
- Cystic Fibrosis Foundation (2010). Patient Registry: Annual Data Report 2009.
- Cystic Fibrosis Foundation (2011). Patient Registry: Annual Data Report 2010.
- Davies J. C. & Bilton D. (2009). Bugs, biofilms, and resistance in cystic fibrosis. *Respir Care*; 54: 628-640.
- Demko C. A., Byard P. J., Davis P. B. (1995). Gender differences in cystic fibrosis: *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Clin Epidemiol*; 48: 1041-1049.
- Foweraker J. (2009). Recent advances in the microbiology of respiratory tract infection in cystic fibrosis. *Br Med Bull*; 89: 93-110.
- Goss C. H. & Muhlebach M. S. (2011). Review: *Staphylococcus aureus* and MRSA in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*; 10: 298-306.
- Johansen H. K., Moskowitz S. M., Ciofu O., Pressler T., Hoiby N. (2008). Spread of colistin-resistant non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* among chronically infected Danish cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*; 7: 391-397.
- Lykzak J. B., Cannon C. L., Pier G. B. (2002). Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*; 15: 194-222.
- Morosini M. I., Garcia-Castillo M., Loza E., Perez-Vazquez M., Baquero F., Canton R. (2005). Breakpoints for predicting *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility to inhaled tobramycin in cystic fibrosis patients: use of high-range E-test strips. *J Clin Microbiol* 43: 4480-4485.
- Olesen H. V., Pressler T., Hjelte L., Mared L., Lindblad A., Knudsen P. K., Laerum B. N., Johannesson M. & Scandinavian Cystic Fibrosis Study Consortium. (2010). Gender differences in the Scandinavian cystic fibrosis population. *Pediatr Pulmonol*; 45: 959-965.
- Pitt T. L., Sparrow M., Stefanidou M. (2003). Survey of resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from UK patients with cystic fibrosis to six commonly prescribed antimicrobial agents. *Thorax* 58: 794-796.
- Ratjen F. & Döring G. (2003). Cystic fibrosis. *Lancet*; 361: 681-689.
- Wark P. A., Simpson J. L., Hensley M. J., Gibson P. G. (2001). Safety of sputum induction with isotonic saline in adults with acute severe asthma. *Clin Exp Allergy*; 31: 1745-1753.

Кореспонденция:

Доц. д-р Таня Стратева, д.м.
Катедра по медицинска микробиология
Медицински университет – София
ул. "Здраве" № 2
1431 София

Correspondence:

Assoc. Prof. Tanya Strateva, MD, PhD
Department of Medical Microbiology
Medical University of Sofia
2, Zdrave Street
1431 Sofia

e-mail: dr.strateva@abv.bg