

*Urszula Kosikowska<sup>1</sup>, Marek Juda<sup>1</sup>, Anna Malm<sup>1</sup>, Marta Jóźwiakowska<sup>2</sup>, Ewa Tuskiewicz-Misztal<sup>2</sup>*

LEKOWRAŻLIWOŚĆ SZCZEPÓW *HAEMOPHILUS* SP.  
I *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* KOLONIZUJĄCYCH DROGI ODDECHOWE  
U DZIECI Z MUKOWISCYDOZĄ

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej,  
Akademii Medycznej im. prof. F. Skubiszewskiego w Lublinie

Kierownik Zakładu: Anna Malm

<sup>2</sup>Klinika Chorób Płuc i Reumatologii, Dziecięcy Szpital Kliniczny w Lublinie

Kierownik Kliniki: Ewa Tuskiewicz-Misztal

*Dokonano oceny częstości występowania pałeczek hemofilnych i gronkowców złocistych u dzieci z mukowiscydozą. Oceniono lekowrażliwość wyizolowanych szczepów oraz fenotypy oporności na wybrane antybiotyki i chemioterapeutyki.*

*Słowa kluczowe: mukowiscydoza, lekowrażliwość bakterii, fenotypy lekooporności*

*Key words: mucoviscidosis, antimicrobial sensitivity of bacteria, drug resistance phenotypes*

WSTĘP

Mukowiscydoza jest autosomalną, dziedziczną w sposób recesywny chorobą genetyczną, związaną z wytwarzaniem nadmiernie lepkiego, gęstego i zalegającego śluzu. Następstwem tego defektu jest m.in. zaburzenie transportu śluzowo-rzęskowego, podstawowego mechanizmu obronnego w układzie oddechowym, prowadzące do licznych objawów oraz znacznej podatności na nawracające i przewlekłe infekcje dróg oddechowych u ponad 90% chorych (1). Do dodatkowych czynników ryzyka u chorych z mukowiscydozą, znacznie zwiększających podatność na zakażenia, należy częsta hospitalizacja oraz przyjmowanie wielu antybiotyków i chemioterapeutyków.

Zakażenia układu oddechowego poprzedzone są najczęściej kolonizacją nosogardła przez drobnoustroje potencjalnie patogenne i oportunistyczne. Stopień kolonizacji jest w znacznej mierze zależny również od wieku pacjenta, rodzaju drobnoustroju, fazy zakażenia oraz zaawansowania mukowiscydozy (2). Duża różnorodność mikroflory górnych dróg oddechowych u chorych z mukowiscydozą jest potwierdzona licznymi danymi z literatury (2,3,4). Często izolowane są pałeczki Gram-ujemne - zarówno niefermentujące, głównie

*Pseudomonas aeruginosa*, jak i z rodziny *Enterobacteriaceae*, gronkowiec złocisty (*Staphylococcus aureus*), pałeczki hemofilne (głównie nietypujący się *Haemophilus influenzae*) lub atypowe prątki (w większości *Mycobacterium avium* kompleks) oraz grzyby m.in. z rodzaju *Aspergillus* czy *Candida* (2,5). Drobnoustroje te zidentyfikowano jako czynniki etiologiczne zakażeń dróg oddechowych w tej grupie chorych. Zapobieganie lub zwalczanie zakażeń układu oddechowego wymaga m.in. usunięcia nieprawidłowej wydzieliny z dróg oddechowych oraz stosowania często nawet kilku równocześnie antybiotyków i chemioterapeutyków (2,5).

Celem badań była ocena częstości izolacji *S. aureus* oraz *Haemophilus* sp. (w tym *H. influenzae*) oraz lekowrażliwości uzyskanych izolatów, jak również określenie fenotypów oporności na wybrane grupy leków.

### MATERIAŁY I METODY

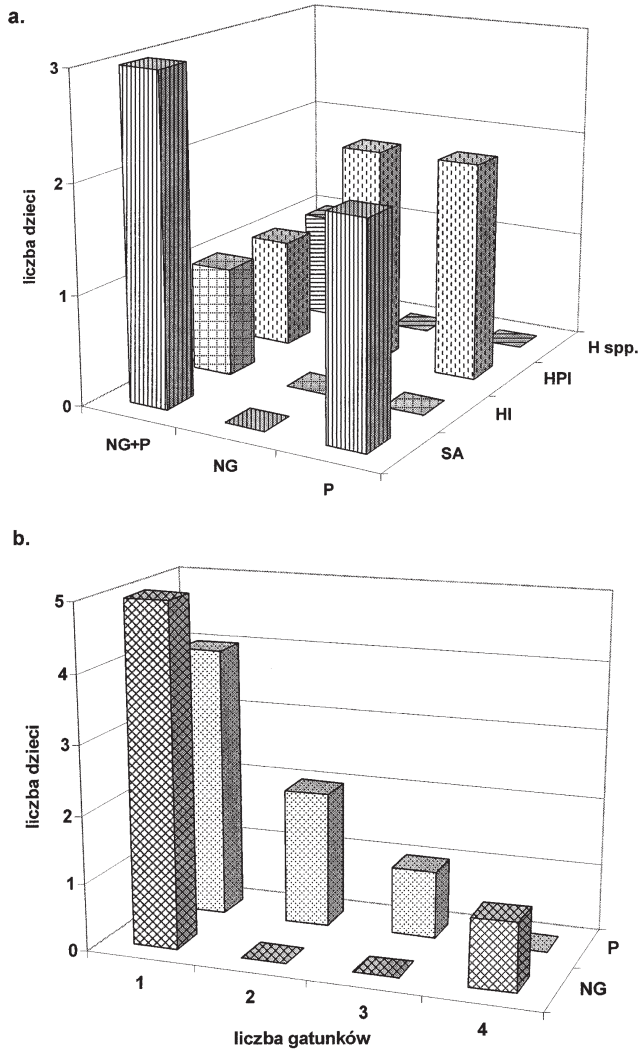
Bakterie izolowano z płwociny oraz wymazów z nosogardła pobranych od 12 hospitalizowanych dzieci z mukowiscydozą (średnia wieku 9,97 roku). Izolaty zidentyfikowano rutynowo stosowanymi metodami diagnostycznymi. Pałeczki hemofilne namnażano na wybiórczym agarze czekoladowym (*Haemophilus* Chocolate Agar, bioMerieux) w temp.  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  w atmosferze tlenowej wzbogaconej 5%  $\text{CO}_2$ ; klasyfikowano do gatunku w oparciu o zapotrzebowanie na czynniki wzrostowe V (NAD) i X (hemina) oraz test API NH (bioMerieux). Identyfikację gronkowców prowadzono w następujących testach: 1) lateksowy Slidex Staph-Kit (bioMerieux); 2) probówkowy na zdolność produkcji koagulazy, przy użyciu osocza liofilizowanego (BIOMED); 3) wykrywający zdolność produkcji termostabilnej dezoksyrybonukleazy, przy użyciu pożywek zawierających DNA (Oxoid).

Aktywność leków przeciwdrobnoustrojowych *in vitro* sprawdzano na podłożu *Haemophilus* Test Medium (HTM, dla pałeczek hemofilnych) lub Mueller-Hinton (dla gronkowców) metodą dyfuzji z krążków bibułowych, zgodnie z rekomendacjami (6). W badaniach oceniono wrażliwość pałeczek hemofilnych na: ampicylinę, amoksycylinę z kwasem klawulanowym, ampicylinę z sulbaktamem, cefazolinę, cefuroksym, cefotaksym, ceftazydym, aztreonam, meropenem, piperacylinę, azytromycynę, tetracyklinę, ciprofloksacyne, kotrimoksazol (trimetoprim/sulfametoksazol), oraz wrażliwość *S. aureus* na: erytromycynę, linkomycynę, klindamycynę, wankomycynę, teikoplaninę, tetracyklinę, chloramfenikol, ciprofloksacyne, rifampicyne, gentamycynę, kotrimoksazol, mupirocynę, kwas fusydowy i amoksycylinę z kwasem klawulanowym.

Zdolność bakterii do syntezy beta-laktamaz zidentyfikowano, wykorzystując krążek z nitrocefina (Cefinase, Becton Dickinson). Metacyliooporność gronkowców określano stosując krążek z cefoksytyną, fenotypy oporności typu  $\text{MLS}_B$  (*macrolides-lincosamides-streptogramins B*) oznaczano dla wszystkich szczepów gronkowców niewrażliwych na erytromycynę, stosując tzw. test indukowania erytromycyną (D-test) przy użyciu krążków nasyconych linkomycyną, erytromycyną i klindamycyną (7). Oporność indukcyjną typu  $\text{MLS}_B$  (inducible  $\text{MLS}_B$ , i $\text{MLS}_B$ ) określano w przypadku spłaszczenia strefy zahamowania wzrostu wokół krążków z klindamycyną i/lub linkomycyną od strony krążka nasyconego erytromycyną. Jeżeli badany szczep był odporny na erytromycynę oraz linkozamidy, izolat klasyfikowano jako wykazujący oporność konstytutywną typu  $\text{MLS}_B$  (constitutive  $\text{MLS}_B$ , c $\text{MLS}_B$ ).

WYNIKI

Badaniami objęto 12 pacjentów pediatrycznych z mukowiscydozą. Obok mukowiscydozy do chorób mających wpływ na hospitalizację należały: zapalenie zatok obocznych nosa - 1 przypadek, zapalenie zatok szczękowych - 2, stan po operacji zatok szczękowych,



Ryc. 1. Izolacja *Staphylococcus aureus* i pałeczek z rodzaju *Haemophilus* u dzieci z mukowiscydozą (NG - nosogardziel, P - płwocina, SA - *Staphylococcus aureus*, HI - *Haemophilus influenzae*, HPI - *Haemophilus parainfluenzae*, H spp. - *Haemophilus spp.*)

Fig. 1. Isolation of *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus spp.* Strains in children with mucoviscidosis (NG - nasopharynx, P - sputum, SA - *Staphylococcus aureus*, HI - *Haemophilus influenzae*, HPI - *Haemophilus parainfluenzae*, H spp. - *Haemophilus spp.*)

zapalenie płuc, niedokrwistość i astma - 1, zaostrzenie płucne - 2, zapalenie płuc - 1, niewydolność oddechowa - 1, polipy nosa - 1.

W badanej grupie w 7/12 (58,33%) dzieci stwierdzono kolonizację przez poszukiwane bakterie, w tym 6/12 (50,0%) przez pałeczki hemofilne (łącznie 12 izolatów: 8 - *H. parainfluenzae*, 2 - *H. influenzae* i 2 - *Haemophilus* sp.) oraz 5/12 (41,67%) przez *S. aureus* (8 izolatów). Bakterie te występowały w nosogardle lub w płwocinie, albo izolowano je jednocześnie z obydwu materiałów pobranych od jednego dziecka (ryc. 1a). Liczba gatunków i szczepów izolowanych zarówno w wymazach jak i w płwocinie od pojedynczego dziecka była bardzo zróżnicowana (ryc. 1b) - identyfikowano od 1 do 4 szczepów *Haemophilus* sp. i/lub od 1 do 3 szczepów *S. aureus*. Wśród 7 dzieci, u których izolowano poszukiwane bakterie, w 3 przypadkach wyosobniono równocześnie po 2 lub 3 gatunki; pojedynczo *H. parainfluenzae* lub *S. aureus* wyosobniono odpowiednio u 3 (25,0%) i 2 (16,67%) dzieci.

Na podstawie uzyskanych informacji stwierdzono, że dzieci te w ciągu roku przed hospitalizacją przyjmowały od 1 do 12 antybiotyków z różnych grup, zarówno o wąskim jak i szerokim spektrum działania. Były to m.in. aminoglikozydy: amikacyna, gentamycyna, tobramycyna, netylmycyna; penicyliny: ampicylina, amoksycylina lub tykarcylina z kwasem klawulanowym, piperacylina z tazobaktamem; karbapenemy: meropenem i imipenem z cyklastatyną; cefalosporyny: cefepim, cefaklor, ceftazydym, cefuroksym, cefotaksym; monobaktamy: aztreonam; linkozamidy: klindamycyna; makrolidy: klarytromycyna, azytromycyna; glikopeptydy: wankomycyna. Niezależnie od częstości i rodzaju przyjmowanych leków 9 spośród wyosobnionych izolatów pałeczek hemofilnych 75% było wrażliwych na badane antybiotyki i chemioterapeutyki. Od 1 dziecka wyosobniono 2 pałeczki hemofilne odporne na ampicylinę i niewytwarzające beta-laktamaz - 1 izolat *H. parainfluenzae* (oporny również na amoksycylinę z kwasem klawulanowym, cefuroksym i piperacylinę) oraz 1 szczep *Haemophilus* sp. oporny *in vitro* na wszystkie badane antybiotyki beta-laktamowe (tab. I). Uwagę zwraca brak ampicylioopornych izolatów wytwarzających beta-laktamazy (tab. I). W porównaniu z pałeczkami hemofilnymi, izolaty *S. aureus* były odporne na większą

Tabela I. Lekooporność izolatów z rodzaju *Haemophilus* oraz *Staphylococcus aureus* wyosobnionych z dróg oddechowych u dzieci z mukowiscydozą

Table I. Drug resistance of *Haemophilus* spp. and *Staphylococcus aureus* isolates from respiratory tract of children with mucoviscidosis

Ma- teriał	Gatunki	Profil lekooporności	Fenotyp
NG	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	AmAmcCxmPip	β-laktamazo-ujemny
P	<i>Haemophilus</i> spp.	AmAmcSamCxmCtxCazAtmMemPip	β-laktamazo-ujemny
NG	<i>Staphylococcus aureus</i> MSSA	ETeCipGm	iMLS <sub>B</sub>
P	<i>Staphylococcus aureus</i> MSSA	ELCcTeCipC	cMLS <sub>B</sub>
NG	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	AmcFoxELCcGm	cMLS <sub>B</sub>
P	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	AmcFoxELCcTeGm	cMLS <sub>B</sub>

Legenda: NG – nosogardziel, P – płwocina, Am – ampicylina, Amc – amoksycylina z kwasem klawulanowym, Sam – ampicylina z sulbaktamem, Cxm – cefuroksym, Ctx – cefotaksym, Caz – ceftazydym, Atm – aztreonam, Mem – meropenem, Pip – piperacylina, E – erytromycyna, L – linkomycyna, Te – tetracyklina, Cip – ciprofloksacyna, Gm – gentamycyna, Cc – klindamycyna, C – chloramfenikol, Fox – cefoksytyna.

liczbę antybiotyków i chemioterapeutyków. Poza izolatami MSSA (Methicillin Susceptible *Staphylococcus aureus*) uzyskanymi od 3 pacjentów i wrażliwymi na wszystkie badane leki lub opornymi tylko na jeden z nich, u 1 dziecka zarówno w gardle jak i w płwocinie zidentyfikowano wielolekooporne szczepy MSSA, o fenotypie oporności MLS<sub>B</sub>, zarówno konstytutywnym jak i indukcyjnym oraz u 1 pacjenta w obydwu materiałach wyosobniono *S. aureus* MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) wykazujący konstytutywną oporność MLS<sub>B</sub> (tab. I).

## DYSKUSJA

Narastanie i rozprzestrzenianie się lekooporności wśród mikroorganizmów zmusza do stałego kontrolowania zarówno środowisk szpitalnych jak i pozaszpitalnych (6). Dane z literatury wskazują na wysoką zdolność kolonizacji błon śluzowych układu oddechowego pacjentów z mukowiscydozą, zarówno przez powszechnie znane patogeny dróg oddechowych jak i przez drobnoustroje oportunistyczne (2). Czynniki sprzyjającymi zakażeniom lub kolonizacji jest zarówno młody wiek pacjentów jak i skład śluzu, który jest gęsty, trudny do usunięcia i stanowi doskonałą pożywkę nawet dla bardzo wybrednych mikroorganizmów (1). Zakażeniom bakteryjnym i grzybiczym sprzyja ponadto szeroko i nie zawsze odpowiednio stosowana antybiotyko- czy chemioterapia, bardzo istotna w zwalczaniu zakażeń, częstych u osób chorych na mukowiscydozę (2). Zgodnie z literaturą, podczas zwalczania infekcji u tych pacjentów powinno się brać pod uwagę zarówno wyniki okresowych badań mikrobiologicznych jak i znajomość profilu lekowrażliwości wyizolowanych u nich drobnoustrojów (2,5). Zarówno dawkowanie jak i czas podawania antybiotyków powinny być skorelowane z objawami i przebiegiem choroby tak, aby zminimalizować niebezpieczeństwo selekcji i rozprzestrzeniania się szczepów opornych, zwłaszcza w środowisku szpitalnym (2).

W niniejszej pracy wykazano, że pomimo młodego wieku pacjentów z mukowiscydozą, u 50% z nich nie zidentyfikowano pałeczek hemofilnych, które są ważnym składnikiem naturalnej flory dróg oddechowych, takich jak np. *H. parainfluenzae*. Wstępne obserwacje wskazują, że większość wyizolowanych bakterii hemofilnych była wrażliwa *in vitro* na badane leki.

Jak wynika z danych z piśmiennictwa, zarówno w środowisku szpitalnym jak i pozaszpitalnym wśród bakterii hemofilnych (głównie *H. influenzae*) dominuje oporność na antybiotyki beta-laktamowe związana z wytwarzaniem beta-laktamaz (6,8). Obydwa opisane w pracy ampicylinooporne izolaty z rodzaju *Haemophilus* (inne niż *H. influenzae*) charakteryzowały się mechanizmem oporności znacznie rzadziej spotykanym i wynikającym najprawdopodobniej ze zmian w białkach receptorowych wiążących penicylinę (*Penicillin Binding Protein*, PBP) (6,8,9). Wykrycie i jednoznaczne określenie takiego typu oporności wymaga jednak stosowania metod biologii molekularnej, obok metod fenotypowych (10).

Częstość izolacji *S. aureus* w grupie, z materiałów pobranych z dróg oddechowych badanych dzieci z mukowiscydozą wynosiła około 40%, co jest zbliżone do wyników uzyskanych u takich pacjentów przez innych autorów (3). Jak wynika z danych z piśmiennictwa, u zdrowych dzieci nosicielstwo gronkowca złocistego waha się w granicach od 20 do 40%, podczas gdy w środowisku szpitalnym może osiągać nawet 90% (11,12).

Dane na temat częstości występowania fenotypów oporności cMLS<sub>B</sub> i iMLS<sub>B</sub> u gronkowca złocistego są bardzo zróżnicowane i w dużej mierze zależne od ośrodków, w których prowadzono badania. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy, dotyczące pacjentów pediatrycznych z mukowiscydozą, sugerują, że fenotyp cMLS<sub>B</sub> może być dominujący wśród opornych na erytromycynę *S. aureus*, zarówno MRSA jak i MSSA. Podobne rezultaty uzyskiwali inni autorzy (13-15). Można przyjąć, że występowanie lekooporności indukcyjnej w środowisku szpitalnym jest rzadsze niż konstytutywnej (15). W przeciwieństwie do tego, w środowisku pozaszpitalnym bardzo rzadko są izolowane szczepy MRSA, a wśród gronkowców MSSA dominuje fenotyp oporności iMLS<sub>B</sub>, co wykazały badania prowadzone na izolatach uzyskanych od zdrowych dzieci (16,17).

Wstępne wyniki uzyskane w pracy sugerują, że u pacjentów z mukowiscydozą występuje selekcja niektórych gatunków bakterii o fenotypach oporności odmiennych niż najczęściej identyfikowane wśród bakterii izolowanych od dzieci zdrowych lub w leczeniu ambulatoryjnym. Najprawdopodobniej wynika to zarówno z przebiegu choroby jak i z większej presji wywieranej przez używane w dużej ilości leki przeciwbakteryjne.

## WNIOSKI

Większość pałeczek hemofilnych izolowanych z układu oddechowego u dzieci z mukowiscydozą była wrażliwa na rutynowo stosowane leki przeciwdrobnoustrojowe, sporadycznie występowały również szczepy ampicylinooporne beta-laktamazo-ujemne. Wyosobniono szczepy *S. aureus* MSSA i MRSA, które wykazywały konstytutywną albo indukcyjną oporność na makrolidy i linkozamidy. Określanie lekowrażliwości i mechanizmów oporności ma duże znaczenie w racjonalnej antybiotykoterapii hospitalizowanych dzieci z mukowiscydozą.

*U Kosikowska, M Juda, A Malm, M Józwiakowska, E Tuszkiewicz-Misztal*

## DRUG SUSCEPTIBILITY OF *HAEMOPHILUS* SP. AND *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS COLONIZING RESPIRATORY TRACT IN CHILDREN WITH MUCOVISCIDOSIS

### SUMMARY

Objective: The aim of our studies was to isolate haemophilic rods and *S. aureus* from children with mucoviscidosis and to assess antimicrobial agent susceptibility of the isolates.

Methods: Sputa and nasopharynx swabs from 12 children with mucoviscidosis were screened for the prevalence of *Haemophilus* sp. and *S. aureus*. Susceptibility to antimicrobial agents was performed by agar diffusion method using appropriate media. Beta-lactamase activity was determined with the nitrocefin discs, macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance using D-test.

Main observations: Of 12 mucoviscidosis-positive patients, 7 (58.33%) were colonised by haemophilic rods (a total of 8 *H. parainfluenzae*, 2 *H. influenzae* or 2 *Haemophilus* sp. isolates) and by *S. aureus* (8 isolates), in these species were isolated alone or in mixed cultures. Two ampicillin-resistant *Haemophilus* sp. but without beta-lactamases production were obtained. Also two methicillin resistant *S. aureus* with constitutive phenotype of resistance to macrolides-lincosamides and streptogramins



B isolates and two methicillin-sensitive (with constitutive and inducible resistance to macrolides-lincosamides and streptogramins B) were isolated.

## PIŚMIENNICTWO

1. Mukowiscydoza, serwis Fundacji MATIO. <http://www.mukowiscydoza.pl/index.php?sub=2&page=0>.
2. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:918-951.
3. Anzaudo MM, Busquets NP, Ronchi S, i in. Isolated pathogen microorganisms in respiratory samples from children with cystic fibrosis. *Rev Argent Microbiol* 2005;37:129-134.
4. Hogardt M, Trebesius K, Geiger A, i in. Specific and rapid detection by fluorescent in situ hybridization of bacteria in clinical samples obtained from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2000;38:818-825.
5. Ratjen F. Changes in strategies for optimal antibacterial therapy in cystic fibrosis. *Int J Antimicrob Agents* 2001;17:93-96.
6. Hryniewicz W, Sulikowska A, Szczypa K, i in. Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki. *Post Mikrobiol* 2005;44:175-192.
7. Siberry GK, Tekle T, Carroll K, i in. Failure of clindamycin treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance in vitro. *Clin Infect Dis* 2003;37:1257-1260.
8. Gazagne L, Delmas C, Bingen E, i in. Molecular epidemiology of ampicillin-resistant non- $\beta$ -lactamase-producing *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 1998;36:3629-3635.
9. Morikawa Y, Kitazato M, Mitsuyama J, i in. In vitro activities of piperacillin against  $\beta$ -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1229-1234.
10. Hryniewicz W, Sulikowska A, Szczypa K, i in. Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki. *Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego* 2006.
11. Kluytmans J., Van Belkum A., Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:505-520.
12. Von Eiff Ch, i in. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *New Engl J Med* 2001;34:11-16.
13. Schreckenberger PC, Ilendo E, Ristow KL. Incidence of constitutive and inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococci* in a community and a tertiary care hospital. *J Clin Microbiol* 2004;42:2777-2779.
14. Lewis JS., Jorgensen JH. Inducible clindamycin resistance in staphylococci: should clinicals and microbiologists be concerned? *Clin Infect Dis* 2005;40:280-285.
15. Delialioglu N, Aslan G, Ozturk C, i in. Inducible clindamycin resistance in staphylococci isolated from clinical samples. *Jpn J Infect Dis* 2005;58:104-106.
16. Chylak J., Kopka A. Lekooporność gronkowców izolowanych od chorych leczonych ambulatoryjnie. *Med Dośw Mikrobiol* 2002;54:97-101.
17. Juda M, Grzegorzczak A, Biernasiuk A, i in. Lekowrażliwość szczepów *Staphylococcus aureus* kolonizujących nosogardziel u zdrowych dzieci w wieku przedszkolnym. *Pediatr Pol* 2006;81:413-417.

Otrzymano: 9.03. 2007 r.

**Adres autora:**

Urszula Kosikowska  
Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej  
Akademii Medycznej  
im. Prof. F. Skubiszewskiego w Lublinie  
20-093 Lublin  
Ul. Dr W. Chodźki 1  
Tel. 081 7405817, 081 7405549  
e-mail: u.kosikowska@am.lublin.pl