

Ewa Augustynowicz-Kopeć¹, Wojciech Skorupa²

¹Zakład Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc
Kierownik: prof. dr hab. n. med. E. Augustynowicz-Kopeć

²I Klinika Chorób Płuc Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc
Kierownik: prof. dr hab. n. med. J. Kuś

Diagnostyka mikrobiologiczna u chorych na mukowiscydozę

Microbiological diagnostics in the patients with cystic fibrosis

Praca nie była finansowana

Pneumonol. Alergol. Pol. 2014; 82: 327–329

Mukowiscydoza, inaczej zwłóknienie torbielowate (łac. *mucoviscidosis*, ang. *cystic fibrosis* [CF]), jest najczęściej występującą wśród rasy kaukaskiej chorobą monogenową dziedziczną w sposób autosomalny recesywny. Występuje ona średnio z częstością 1 na 2500 żywych urodzin. Gen kodujący strukturę białka CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) jest umiejscowiony na długim ramieniu 7 chromosomu. Białko CFTR jest kanałem chlorkowym zależnym cAMP odpowiedzialnym za przepływ jonów przez błonę komórkową komórek nabłonka w wielu narządach. W zależności od rodzaju mutacji dochodzi do zaburzeń syntezy, budowy i funkcji białka CFTR, co z kolei prowadzi do występowania objawów choroby.

Do typowego obrazu mukowiscydozy należy przewlekła choroba oskrzelowo-płucna, niewydolność zewnątrzwydzielnicza trzustki i niepłodność męska [1, 2].

Najczęstszą przyczyną zgonów chorych na mukowiscydozę jest niewydolność oddychania spowodowana postępującym uszkodzeniem płuc związanym z przewlekłym zakażeniem układu oddechowego [1, 2].

W większości przypadków mukowiscydoza jest rozpoznawana we wczesnym dzieciństwie. Obecnie w wielu krajach, w tym w Polsce, prowadzone są badania przesiewowe noworodków

w kierunku mukowiscydozy. Przypadki o nietypowym, łagodniejszym przebiegu bywają rozpoznawane później, po 18. roku życia [1, 2].

W krajach o rozwiniętym systemie opieki zdrowotnej, odsetek dorosłych w grupie chorych na mukowiscydozę sięga prawie 50%. W Wielkiej Brytanii, według raportu z 2012 roku, 57,6% to chorzy powyżej 16. roku życia. W latach 30. XX w. około 70% dzieci chorych na mukowiscydozę umierało w pierwszym roku życia. Średnia przewidywana długość życia obecnie urodzonych dzieci chorych na mukowiscydozę sięga 40 lat.

Mutacje w genie *CFTR* powodują zaburzenia przepływu jonów przez błonę komórkową komórek nabłonka układu oddechowego, co prowadzi do wytwarzania zagęszczonego śluzu okołorzęskowego, upośledzenia oczyszczania śluzowo-rzęskowego i przewlekłego zakażenia. Rozwija się przewlekły stan zapalny, w którym biorą udział komórki bakteryjne, napływające komórki obronne gospodarza i substancje z nich uwalniane, co prowadzi do postępującego uszkodzenia oskrzeli i mięszu płuc [1, 3, 4].

Zakażenia bakteryjne u chorych na mukowiscydozę stanowią poważny problem diagnostyczny i terapeutyczny. Zastosowanie właściwej i intensywnej antybiotykoterapii zmniejsza częstość zaostrzeń, spowalnia postęp choroby i przedłuża życie chorych. Diagnostyka mikrobiologiczna po-

Adres do korespondencji: prof. dr hab. n. med. Ewa Augustynowicz-Kopeć, Zakład Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc, ul. Płocka 26, 01–138 Warszawa,

e-mail: e.kopec@igichp.edu.pl

DOI: 10.5603/PIAP.2014.0040

Praca wpłynęła do Redakcji: 15.06.2014 r.

Copyright © 2014 PTChP

ISSN 0867–7077

winna być prowadzona na podstawie standardów i wytycznych dla mukowiscydozy [5–8].

Etiologia zakażeń bakteryjnych zmienia się z wiekiem chorego i zależy od stopnia zaawansowania choroby [9]. Z materiałów diagnostycznych pochodzących od dzieci izoluje się przede wszystkim bakterie z gatunku *Staphylococcus aureus* wrażliwe na metycylinę (MSSA). Często izolowane są również szczepy *Haemophilus influenzae* — najczęściej bezotoczkowe, przed którymi nie chroni szczepionka przeciwko zakażeniu *Haemophilus influenzae* typu b. Od chorych dorosłych, wraz z rozwojem choroby izolowane są głównie pałeczki *Pseudomonas aeruginosa*, rzadziej *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia complex (Bcc)* lub *Achromobacter spp.* [10–12]. U chorych z zaawansowaną chorobą oskrzelowo-płucną częstszy jest odsetek zakażeń *Staphylococcus aureus* opornych na metycylinę (MRSA).

Wraz z postępem choroby i koniecznością częstszego stosowania antybiotyków dochodzi do rozwoju lekooporności na stosowane antybiotyki. W tej grupie chorych często stwierdza się występowanie zakażeń mieszanych [13]. W badaniach własnych zespołu Zakładu Mikrobiologii IGiChP opublikowanych w „Pneumonologii i Alergologii Polskiej” w 2013 roku, przeważali chorzy, od których izolowano: dwa patogeny (44%) oraz trzy patogeny (32%) [14]. Najmniejszą grupę stanowili ci, od których izolowano wyłącznie jeden patogen (24%).

Jak już wspomniano, u chorych na mukowiscydozę szczególne znaczenie mają zakażenia wywołane pałeczką ropy błękitnej *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). W początkowej fazie choroby następuje kolonizacja dróg oddechowych nieśluzowymi szczepami *P. aeruginosa*. W procesie przewlekłego zakażenia obserwuje się u szczepów pałeczki ropy błękitnej konwersję do postaci śluzowej. Konwersja fenotypu jest możliwa dzięki wzmocnionej biosyntezie alginianu, tworzącego śluzową otoczkę komórki bakteryjnej. Zmiana fenotypu bakterii zapewniająca ochronę komórek przed utratą wody, opsonizacją i fagocytozą, zachodzi pod wpływem mikrośrodowiska panującego w płucach chorych na mukowiscydozę. Zjawisko to utrudnia przenikanie antybiotyków do wnętrza komórki, a także jest podstawą tworzenia biofilmu.

Jeżeli cząsteczka leku przedostanie się przez grubą warstwę alginianu, to komórka bakteryjna może uruchomić system działania bakteryjnych pomp (*multidrug-efflux pumps*) usuwając lek z komórki [15]. Wykrycie po raz pierwszy *P. aeruginosa* jest wskazaniem do rozpoczęcia procedury eradykacyjnej w celu uniemożliwienia przejścia zakażenia w formę przewlekłą [1].

Iwańska i wsp. [14] obserwowali w przeważającej grupie chorych na mukowiscydozę infekcje o etiologii *P. aeruginosa*, (83,1% chorych). Szczepy te wykazywały głównie fenotyp nieśluzowy (61% chorych) i wyższą oporność na leki niż szczepy śluzowe. Podobne wyniki uzyskali Srifung i wsp. [16] oraz Valenza i wsp. [17]. W badaniach Paixão i wsp. [9] wykazano natomiast większą wrażliwość na antybiotyki szczepów *P. aeruginosa* o fenotypie nieśluzowym.

Niezależnie od fenotypu oporności, izolowanie od chorych szczepów o fenotypie śluzowym jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym, ponieważ szczepy te wytwarzając egzopolisacharydową otoczkę i tworząc biofilm, stają się odporne na fagocytozę [1].

Wobec sprzecznych wyników badań przedstawionych powyżej, we wszystkich przypadkach powinno wykonywać się badania mikrobiologiczne. Dostarczają one wiedzy o gatunkach patogenów izolowanych od chorych i ich lekooporności, co ma szczególnie znaczenie w leczeniu empirycznym.

Wiarygodność wyniku mikrobiologicznego uzależniona jest od wielu czynników. Zbyt długi czas upływający między pobraniem materiału a wykonaniem badania oraz niewłaściwe warunki przechowywania i transportu próbek mogą spowodować brak wzrostu niektórych drobnoustrojów. Poza tym ocena mikrobiologiczna materiału z dróg oddechowych jest niezwykle trudna gdyż obecność bogatej flory bakteryjnej w materiale utrudnia określenie czynnika etiologicznego zakażenia. W związku z tym trwają poszukiwania alternatywnych metod mogących poprawić diagnostykę, aby zapewnić właściwą opiekę nad chorymi na mukowiscydozę.

W aktualnym numerze „Pneumonologii i Alergologii Polskiej” ukazała się praca Gawła i wsp. [18] dotycząca próby zastosowania metod immunologicznych (przeciwciała przeciwko różnym antygenom *P. aeruginosa*) do wczesnej identyfikacji zakażenia tym patogenem u chorych na mukowiscydozę. Autorzy, porównując wyniki badań immunologicznych z badaniami mikrobiologicznymi, stwierdzili, że poziom przeciwciał antypseudomonalnych był znamienne statystycznie wyższy w grupie chorych, u których zakażenie *P. aeruginosa* potwierdzono hodowlą. Natomiast u części chorych skolonizowanych i przewlekle zakażonych *P. aeruginosa* nie stwierdzano obecności przeciwciał.

Wiele czynników, jak na przykład wiek, faza zakażenia oraz obecność chorób współtowarzyszących wpływa na wiarygodność oznaczania

przeciwciał. Uzyskanie wyniku ujemnego nie jest równoznaczne z brakiem zakażenia. Zbyt mała liczba bakterii w organizmie chorego może okazać się niewystarczająca dla uzyskania wystarczającej odpowiedzi immunologicznej.

Otrzymanie wyniku pozytywnego może świadczyć o aktywnym zakażeniu, kolonizacji, ale może również wskazywać na kontakt chorego z bakterią w przeszłości. Kontakt ten mógł pozostawić tak zwany „śląd immunologiczny”, ponieważ przeciwciała utrzymują się we krwi od kilku miesięcy do nawet kilku lat. W tej grupie chorych z klinicznego punktu widzenia duże znaczenie może mieć wykazanie w trakcie obserwacji wzrostu miana przeciwciał antypseudomonalnych. Szczególną wartością prezentowanej pracy [18] jest poszukiwanie nowych metod diagnostycznych do wczesnej identyfikacji zakażenia *P. aeruginosa* u chorych na mukowiscydozę.

W Polsce do chwili obecnej nie opracowano jeszcze zaleceń dotyczących diagnostyki mikrobiologicznej chorych na mukowiscydozę. Ogromne nadzieje wiąże się zatem z inicjatywą ośrodka poznańskiego, który wspólnie z Polskim Towarzystwem Mukowiscydozy rozpoczął cykl spotkań mikrobiologów i klinicystów zajmujących się tą tematyką. Diagnostyka i leczenie mukowiscydozy stanowi bowiem nadal poważne wyzwanie dla współczesnej medycyny i tylko ścisła współpraca klinicystów i mikrobiologów może dać pożądane efekty.

Konflikt interesów

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

Piśmiennictwo:

1. Ratjen F., Döring G. Cystic fibrosis. *Lancet* 2003; 361: 681–689.
2. Witt M., Majka L. Mukowiscydoza, choroba dobrze poznana, jednak ciągle zagadkowa. *Alergia Astma Immunologia* 1997; 2: 157–161.
3. O'Malley C.A. Infection control in cystic fibrosis: cohorting, cross-contamination, and the respiratory therapist. *Respir. Care* 2009; 54: 641–657.
4. Michaels M.G., Gondor M. Respiratory infections in patients with cystic fibrosis. 1998; 9: 234–242.
5. Smyth A.R., Bell S.C., Bojan S. i wsp. European Cystic Fibrosis Society standards of care: best practice guidelines. *J. Cystic Fibros.* 2014; 13 (supl. 1): s23–s42.
6. Balke B., Schmoltdt S., Häussler S., Suerbaum S., Heesemann J., Hogardt M. A German external quality survey of diagnostic microbiology of respiratory tract infections in patients with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 2008; 7: 7–14
7. Walkowiak J., Pogorzelski A., Sands D. i wsp. Zasady rozpoznawania i leczenia mukowiscydozy. *Standardy medyczne. Pediatria* 2009; 6: 352–378.
8. The UK Cystic Fibrosis Trust Microbiology Laboratory Standards Working Group, September 2010.
9. Paixão V.A., Barros T.F., Mota C.M., Moreira T.F., Santana M.A., Reis J.N. Prevalence and antimicrobial susceptibility of respiratory pathogens in patients with cystic fibrosis. *Braz. J. Infect. Dis.* 2010; 14: 406–409.
10. McManus T.E., McDowell A., Moore J.E., Elborn J.S. Organisms isolated from adults with cystic fibrosis. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrobials* 2004; 3: 26–31.
11. de Vrankrijker A.M., Wolfs T.F., van der Ent C.K. Challenging and emerging pathogens in cystic fibrosis. *Paediatr. Respir. Rev.* 2010; 11: 246–254.
12. Govan J.R. Infection control in cystic fibrosis: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and the *Burkholderia cepacia* complex. *J. R. Soc. Med.* 2000; 93: 40–45.
13. Mainz J.G., Naehrlich L., Schien M. i wsp. Concordant genotype of upper and lower airways *P. aeruginosa* and *S. aureus* isolates in cystic fibrosis. *Thorax* 2009; 64: 535–540.
14. Iwańska A., Nowak J., Skorupa W., Augustynowicz-Kopeć E. Analiza częstości izolacji i profil lekooporności drobnoustrojów izolowanych z dróg oddechowych dorosłych chorych na mukowiscydozę leczonych w Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc w latach 2008–2011. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2013; 81: 105–113.
15. Yang L., Rau M.H., Yang L., Høiby N., Molin S., Jelsbak L. Bacterial adaptation during chronic infection revealed by independent component analysis of transcriptomic data. *BMC Microbiol.* 2011; 11: 184.
16. Srfuengfung S., Tiensasitorn C., Yungyuen T., Dhiraputra C. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid and non-mucoid type. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 2004; 35: 893–896.
17. Valenza G., Tappe D., Turnwald D. i wsp. Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganism isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 2008; 7: 123–127.
18. Gawel J., Pogorzelski A., Działek-Smętek E. i wsp. Występowanie przeciwciał dla wybranych antygenów *Pseudomonas aeruginosa* u dzieci i młodych dorosłych chorych na mukowiscydozę. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2014; 82: 335–340.