

# **Zakażenia krzyżowe dróg oddechowych o etiologii *Pseudomonas aeruginosa* u dzieci chorujących na mukowiscydozę**

Justyna Milczewska

## **STRESZCZENIE**

### **Wprowadzenie**

Mukowiscydoza (ang. cysticfibrosis - CF) jest chorobą uwarunkowaną genetycznie o przewlekłe postępującym przebiegu. Za wystąpienie objawów klinicznych odpowiadają mutacje w obu allelach genu *CFTR*, co skutkuje nieprawidłową produkcją białka CFTR i w konsekwencji zaburzeniami transportu jonowego na szczytowej powierzchni nabłonka wydzielniczego. Kumulacja gęstej i lepkiej wydzieliny prowadzi do upośledzenia drożności, przewlekłego stanu zapalnego i destrukcji przewodów wyprowadzających gruczołów zewnątrzwydzielniczych. Zaburzenia dotyczą wielu narządów i układów, jednak przyczyną największej chorobowości i śmiertelności jest rozwój przewlekłej choroby oskrzelowo-płucnej. W tym procesie bardzo istotną rolę odgrywają zakażenia bakteryjne układu oddechowego, w tym pałeczką ropy błękitnej (*Pseudomonas aeruginosa*), jednym z najczęstszych w tej grupie pacjentów. Liczne doniesienia wykazały, że przewlekła infekcja tym patogenem w istotny sposób pogarsza rokowanie i przyczynia się do skrócenia przeżycia. Dowiedziono, że nabycie zakażenia szczepem *Pseudomonas aeruginosa* pochodzącym od innego chorego, a zatem posiadającym zdolność tworzenia biofilmu i charakteryzującym się różnego stopnia antybiotykoopornością (zakażenie krzyżowe), w wielu przypadkach jest bardziej obciążające dla pacjenta niż zakażenie szczepem pochodzącym ze środowiska naturalnego.

W latach dziewięćdziesiątych XX wieku odkryto i dokładnie przebadano szczepy *Pseudomonas aeruginosa*, które wywołały zakażenia krzyżowe u dużych grup pacjentów. Niektóre z nich wykazywały się znaczną zjadliwością, np. szczep epidemiczny z Liverpoolu. Problem transmisji szczepów epidemicznych skłonił klinicystów do wprowadzenia zasad izolacji pacjentów, a także programów mających na celu nadzór epidemiologiczny polegających na rutynowym typowaniu genetycznym szczepów hodowanych od pacjentów z mukowiscydozą.

## Cel

Celem pracy była ocena częstości występowania zakażeń krzyżowych o etiologii *Pseudomonas aeruginosa* dzieci i młodzieży z mukowiscydozą poprzez określenie podobieństwa genetycznego izolowanych od nich szczepów przy użyciu metody makrogenomowej analizy restrykcyjnej chromosomowego DNA z elektroforezą w zmiennym polu elektrycznym (REA-PFGE).

## Material i metody

Do badania włączono pacjentów chorujących na mukowiscydozę, pozostających pod opieką Instytutu Matki i Dziecka, u których w latach 2011-2012 wyhodowano z dróg oddechowych przynajmniej jeden lub więcej szczepów *Pseudomonas aeruginosa*, które udało się skutecznie przechować i poddać typowaniu genetycznemu.

Szczepy bakteryjne hodowano w sposób typowy na podłożach stałych. Ich identyfikacja obejmowała analizę właściwości fenotypowych (typ wzrostu, morfologia kolonii), wykonanie testu na obecność oksydazy cytochromowej i ocenę właściwości biochemicznych z wykorzystaniem komercyjnego zestawu do automatycznej identyfikacji pałeczek Gram-ujemnych. Wrażliwość na antybiotyki oznaczano metodą dyfuzyjno-krażkową. Przeprowadzono typowanie genetyczne kolekcji izolatów metodą makrogenomowej analizy restrykcyjnej chromosomowego DNA z elektroforezą w zmiennym polu elektrycznym (REA-PFGE).

Przeprowadzono szczegółowe wywiady od pacjentów i ich rodziców dotyczące kontaktów z innymi chorymi, na podstawie dokumentacji medycznej prześledzono wspólne okresy hospitalizacji pacjentów (w latach 2010-2012). W celu scharakteryzowania pacjentów wchodzących w skład grupy badanej, na podstawie zebranych wywiadów, oceny klinicznej, badań dodatkowych, analizowano następujące dane: wiek, płeć, czas trwania zakażenia *Pseudomonas aeruginosa*, wiek rozpoznania, rodzaj mutacji w genie *CFTR*, stan odżywienia, punktacja w skali oceny klinicznej Shwachmana-Kulczyckiego, stopień zaawansowania choroby oskrzelowo-płucnej, wyniki badań czynnościowych układu oddechowego oraz badań radiologicznych klatki piersiowej.

## Wyniki

W latach 2011-2012 od 75 pacjentów wyhodowano 170 szczepów *Pseudomonas aeruginosa*, które zostały poddane analizie pokrewieństwa genetycznego. W toku analizy metodą PFGE 170 izolatów *Pseudomonas aeruginosa* wyodrębniono 23 grupy klonalne. Największa z nich, grupa 19, zawierała 49 (28,8%) szczepów wyhodowanych od 21 (28,0%) pacjentów. Druga pod względem wielkości grupa składała się z 12 (7,1%) izolatów

pochodzących od 7 (9,3%) chorych. Od dwóch chłopców wyhodowano szczepy należące zarówno do grupy klonalnej 18, jak i 19. Trzy grupy klonalne zawierały izolaty pochodzące od 3 par niespokrewnionych ze sobą dzieci, a kolejne trzy – szczepy pochodzące od 3 par rodzeństw. Ponadto wyodrębniono 15 grup klonalnych, z których każda obejmowała izolatów wyhodowanych od tego samego pacjenta. Analiza wykazała, że 39 szczepów pochodzących od 26 chorych nie było przypisanych do żadnej grupy klonalnej, czyli nie wykazywało podobieństwa genetycznego do pozostałych izolatów.

U pacjentów grup 18 i 19 mediana liczby dni hospitalizacji wynosiła 42 (zakres 0 – 240). Natomiast u pozostałych pacjentów, czyli w grupie „szczepów niespokrewnionych” była ona równa 14 (zakres 0 – 114) ( $p=0,001$ ).

Wszystkie dzieci, od których hodowane szczepy *Pseudomonas aeruginosa* należały do grup klonalnych 18 i 19, w trakcie trwania badania wykonywały badania czynnościowe układu oddechowego. W grupie 26 dzieci zakażonych szczepami należącymi łącznie do grup 18 i 19 mediana FEV1 wyniosła 69,5% (zakres 23 – 113). Wśród 39 pacjentów wykonujących badanie spirometryczne, zakażonych „szczepami niespokrewnionymi” mediana FEV1 to 87% (zakres 23 – 122) ( $p=0,01$ ).

## **Wnioski**

1. U rodzeństw chorujących na mukowiscydozę z zakażeniem dróg oddechowych *Pseudomonas aeruginosa* izolowane szczepy wykazują bardzo duże podobieństwo genetyczne.
2. W przypadku większości pacjentów, u których wielokrotnie w trakcie trwania badania z dróg oddechowych hodowano *Pseudomonas aeruginosa*, szczepy od nich izolowane wykazują między sobą duży stopień podobieństwa genetycznego.
3. Wyniki typowania genetycznego w połączeniu z danymi klinicznymi wskazują na wystąpienie zakażeń krzyżowych u części pacjentów pozostających pod opieką Instytutu Matki i Dziecka.
4. W badanej grupie pacjentów wystąpienie zakażenia krzyżowego *Pseudomonas aeruginosa* wiąże się z dłuższym łącznym czasem trwania hospitalizacji w ciągu dwóch lat badania, a także z gorszą czynnością układu oddechowego, niższą punktacją w skali oceny klinicznej Shwachmana-Kulczyckiego oraz gorszymi niektórymi parametrami rozwoju fizycznego.
5. Przynależność szczepów *Pseudomonas aeruginosa* do największych grup klonalnych jest związane ze znaczną antybiotykoopornością.

6. Intensyfikacja działań mających na celu zapobieganie zakażeniom krzyżowym, takich jak środki higieny, izolacja chorych, realizacja w Polsce programu domowej antybiotykoterapii dożylniej, a także dalsza edukacja pacjentów i ich rodziców odnośnie dróg transmisji zakażeń bakteryjnych, prawdopodobnie przyczynią się do poprawy sytuacji epidemiologicznej w naszym ośrodku.

**Słowa kluczowe:** mukowiscydoza, *Pseudomonas aeruginosa*, analiza restrykcyjna chromosomowego DNA z elektroforezą w zmiennym polu elektrycznym (REA-PFGE), zakażenie krzyżowe