

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Mateja ARH

**ANALIZA BAKTERIJSKE ODPORNOSTI
NAJPOGOSTEJŠIH POVZROČITELJEV OKUŽB
DIHAL PRI OTROCIH S CISTIČNO FIBROZO
V SLOVENIJI**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Mateja ARH

**ANALIZA BAKTERIJSKE ODPORNOSTI NAJPOGOSTEJŠIH
POVZROČITELJEV OKUŽB DIHAL PRI OTROCIH S CISTIČNO
FIBROZO V SLOVENIJI**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**BACTERIAL RESISTANCE OF THE MOST FREQUENT SPECIES
CAUSING RESPIRATORY INFECTIONS IN CHILDREN WITH
CYSTIC FIBROSIS IN SLOVENIA**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija 2. stopnje Mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Delo je bilo opravljeno na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Katjo Seme in za recenzentko doc. dr. Jernejo Ambrožič Avguštin.

Mentorica: prof. dr. Katja Seme

Recenzentka: doc. dr. Jerneja Ambrožič Avguštin

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Eva RUŽIČ SABLJIČ

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Katja SEME

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: doc. dr. Jerneja AMBROŽIČ AVGUŠTIN

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je magistrsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačano, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravice shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Mateja Arh

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 579.61: 615.33:616-002.17-053.2/.6(497.4)(043)=163.6
KG	bakterijske okužbe dihal/spremljanje odpornosti/ <i>Staphylococcus aureus</i> / <i>Haemophilus influenzae</i> / <i>Pseudomonas aeruginosa</i> /cistična fibroza/otroci s cistično fibrozo/Slovenija
AV	ARH, Mateja, dipl. mikrobiol. (UN)
SA	SEME, Katja (mentorica)/AMBROŽIČ AVGUŠTIN, Jerneja (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI	2016
IN	ANALIZA BAKTERIJSKE ODPORNOSTI NAJPOGOSTEJŠIH POVZROČITELJEV OKUŽB DIHAL PRI OTROCIH S CISTIČNO FIBROZO V SLOVENIJI
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
OP	XII, 70 str., 15 pregl., 10 sl., 8 pril., 91 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Cistična fibroza (CF) je dedna bolezen, ki prizadene več organskih sistemov. Vzrok bolezni je mutacija gena <i>CFTR</i> , ki kodira zapis za kloridni kanal. V dihalih se zaradi omenjene mutacije zmanjša učinkovitost mukociliarnega čiščenja, kar omogoča vzpostavitev ugodnih pogojev za razvoj bakterijskih okužb, ki so glavni vzrok obolevnosti in umrljivosti bolnikov s CF. Z uvedbo antibiotičnega zdravljenja okužb dihal se je izboljšala kakovost življenja in podaljšala pričakovana življenjska doba bolnikov s CF, obenem pa se je povečalo tveganje za pojav bakterijskih sevov, odpornih proti različnim antibiotikom. V magistrskem delu smo želeli ugotoviti, kateri so najpogostejši povzročitelji okužb dihal pri otrocih s CF v Sloveniji, in analizirati njihovo občutljivost za antibiotike. V raziskavo smo vključili 83 otrok s CF, ki jih vodijo v Centru za cistično fibrozo na Pediatrični kliniki Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Retrospektivno smo zajeli vse bakterijske izolate, ki so bili na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani osamljeni iz vzorcev dihal teh bolnikov v letih 2009–2014. Najpogostejši bakterijski izolati so bili <i>Staphylococcus aureus</i> (30,4 %), <i>Haemophilus influenzae</i> (12,5 %) in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (10,8 %). Izolate <i>S. aureus</i> , odporne proti meticilinu, smo v šestletnem obdobju osamili samo pri enem, izolate <i>P. aeruginosa</i> sluznega fenotipa pa pri 12 otrocih s CF. Zbrali smo podatke o občutljivosti najpogostejših vrst za testirane antibiotike. Ugotovili smo, da se občutljivost posameznih bakterijskih izolatov za testirane antibiotike z leti ni bistveno spremenila, prav tako nismo opazili naraščanja odpornosti s časom kolonizacije pri posameznih otrocih s CF. Stopnja odpornosti in delež večkratno odpornih izolatov sta bila najvišja pri izolatih vrste <i>S. aureus</i> , najnižja pa pri izolatih vrste <i>H. influenzae</i> . Odpornost izolatov sluznega fenotipa <i>P. aeruginosa</i> je bila pri otrocih s CF v Sloveniji višja od odpornosti izolatov ne-sluznega fenotipa.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDC 579.61: 615.33:616-002.17-053.2/.6(497.4)(043)=163.6
CX bacterial respiratory tract infections/resistance to antibiotics/*Staphylococcus aureus*/*Haemophilus influenzae*/*Pseudomonas aeruginosa*/cystic fibrosis/children with cystic fibrosis/Slovenia
AU ARH, Mateja
AA SEME, Katja (supervisor)/AMBROŽIČ AVGUŠTIN, Jerneja (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY 2016
TY BACTERIAL RESISTANCE OF THE MOST FREQUENT SPECIES CAUSING RESPIRATORY INFECTIONS IN CHILDREN WITH CYSTIC FIBROSIS IN SLOVENIA
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO XII, 70 p., 15 tab., 10 fig., 8 ann., 91 ref.
LA sl
Al sl/en
AB Cystic fibrosis (CF) is an inherited disease that affects multiple organ systems. It is caused by a mutation of the *CFTR* gene, which encodes a chloride channel. Due to this mutation the effectiveness of the mucociliary clearance in the respiratory system is reduced, allowing the creation of favourable conditions for the development of bacterial infections, which are a major cause of morbidity and mortality in CF patients. Antibiotic treatment of respiratory infections and specialized CF care led to dramatic improvement in survival and the quality of life. However, at the same time also the risk for the development of antibiotic resistance has increased. In the present study we aimed to determine the most frequent bacterial species which cause respiratory infections in children with CF in Slovenia and to analyse their antibiotic susceptibility. The study included 83 children with CF who were treated at the Centre for Cystic Fibrosis, Pediatric Clinic, University Medical Centre Ljubljana. Retrospectively, we included all bacterial isolates that were isolated from the respiratory samples of these patients at the Institute for Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana in the years 2009–2014. The most frequent bacterial isolates were *Staphylococcus aureus* (30,4 %), *Haemophilus influenzae* (12,5 %) and *Pseudomonas aeruginosa* (10,8 %). In the 6-year period methicillin-resistant *S. aureus* was isolated from one child only, whereas *P. aeruginosa* mucoid phenotype was isolated from 12 children. We have found that the susceptibility of the individual bacterial isolates to the tested antibiotics has not significantly changed over the observed period. Furthermore, we haven't registered an increase of the resistance with colonization time in individual children with CF. The degree of resistance and the proportion of multidrug resistant isolates were highest for the isolates of *S. aureus* and lowest for the isolates of *H. influenzae*. The resistance of the isolates of *P. aeruginosa* mucoid phenotype in children with CF in Slovenia was higher than the resistance of the isolates of a non-mucoid phenotype.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 CISTIČNA FIBROZA	3
2.1.1 Klinični znaki	3
2.1.2 Vzrok bolezni	4
2.1.3 Diagnoza	4
2.1.4 Zdravljenje	5
2.2 BAKTERIJSKE OKUŽBE DIHAL BOLNIKOV S CISTIČNO FIBROZO	7
2.3 NAJPOGOSTEJŠI POVZROČITELJI OKUŽB DIHAL PRI OTROCIH S CISTIČNO FIBROZO	9
2.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	9
2.3.2 <i>Haemophilus influenzae</i>	10
2.3.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
2.4 ODPORNOST BAKTERIJ PROTI ANTIBIOTIKOM	13
2.4.1 Antibiotiki	13
2.4.2 Razvoj odpornosti proti antibiotikom	14
2.4.3 Mehanizmi bakterijske odpornosti	15
2.4.3.1 Zmanjšana prepustnost celične membrane	16
2.4.3.2 Aktivno izčrpavanje antibiotikov iz celice	16
2.4.3.3 Modifikacija ali inaktivacija antibiotikov z encimi	16
2.4.3.4 Sprememba tarčnega mesta oz. prijemališča antibiotikov	17
2.4.3.5 Sprememba presnovne poti, na katero antibiotik deluje	17
2.4.3.6 Biofilmi	17
2.4.3.7 Hipermutatorski sevi	18
2.4.4 Odpornost bakterije <i>S. aureus</i>	19
2.4.4.1 <i>S. aureus</i> , odporen proti meticilinu – MRSA	20

2.4.5	Odpornost bakterije <i>H. influenzae</i>	20
2.4.6	Odpornost bakterije <i>P. aeruginosa</i>	22
2.5	DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI ZA ANTIBIOTIKE	24
3	MATERIAL IN METODE	25
3.1	METODE.....	25
3.1.1	Zbiranje podatkov	25
3.1.2	Analiza podatkov	25
3.1.3	Statistična analiza	26
4	REZULTATI	27
4.1	BOLNIKI S CISTIČNO FIBROZO	27
4.2	NAJPOGOSTEJŠI BAKTERIJSKI IZOLATI	28
4.3	DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI IZOLATOV <i>S. aureus</i>	31
4.3.1	Določanje občutljivosti izolatov MRSA	33
4.4	DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI IZOLATOV <i>H. influenzae</i>	34
4.5	DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI IZOLATOV <i>P. aeruginosa</i>	36
4.5.1	Primerjava občutljivosti med različnima fenotipoma <i>P. aeruginosa</i>	38
4.5.2	Pregled odpornosti izolatov <i>P. aeruginosa</i> v odvisnosti od časa kolonizacije	40
4.6	POGOSTOST VEČKRATNO ODPORNIH BAKTERIJ	42
4.7	DOLOČANJE STOPNJE ODPORNOSTI IZOLATOV	43
5	RAZPRAVA	46
5.1	BOLNIKI S CISTIČNO FIBROZO IN NAJPOGOSTEJŠI BAKTERIJSKI IZOLATI.....	46
5.2	OBČUTLJIVOST IZOLATOV <i>S. aureus</i>	49
5.3	OBČUTLJIVOST IZOLATOV <i>H. influenzae</i>	50
5.4	OBČUTLJIVOST IZOLATOV <i>P. aeruginosa</i>	52
5.4.1	Sluzni in ne-sluzni fenotip <i>P. aeruginosa</i>	54
5.4.2	Odpornost izolatov <i>P. aeruginosa</i> v odvisnosti od časa kolonizacije	54
5.5	VEČKRATNO ODPORNE BAKTERIJE	55
5.6	STOPNJA ODPORNOSTI IZOLATOV	56
6	SKLEPI.....	57
7	POVZETEK	58
8	VIRI	61
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Skupine antibiotikov in glavni predstavniki glede na mehanizem delovanja (Seme, 2002a; Beović in Nadrah, 2014).....	13
Preglednica 2:	Število otrok s CF, število vseh bakterijskih izolatov, število prvih bakterijskih izolatov, povprečno število prvih izolatov na otroka s CF na leto in povprečna starost otrok s CF ob prvi vključitvi v raziskavo za obdobje 2009–2014.....	27
Preglednica 3:	Število in delež (%) najpogostejših prvih izolatov, osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.....	28
Preglednica 4:	Število in delež (%) prvih izolatov <i>S. aureus</i> , <i>H. influenzae</i> in <i>P. aeruginosa</i> , osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.....	29
Preglednica 5:	Število in delež (%) prvih izolatov <i>P. aeruginosa</i> ne-sluznega in <i>P. aeruginosa</i> sluznega fenotipa, osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.....	30
Preglednica 6:	Povprečna starost otrok s CF ob prvi osamitvi posamezne bakterijske vrste v letih 2009–2014 na IMI MF UL.....	30
Preglednica 7:	Število in delež (%) za posamezne antibiotike občutljivih izolatov <i>S. aureus</i> glede na leto osamitve iz dihal otrok s CF na IMI MF UL.....	32
Preglednica 8:	Število in delež (%) za posamezne antibiotike občutljivih izolatov <i>H. influenzae</i> glede na leto osamitve iz dihal otrok s CF na IMI MF UL.....	35
Preglednica 9:	Število in delež (%) za posamezne antibiotike občutljivih izolatov <i>P. aeruginosa</i> glede na leto osamitve iz dihal otrok s CF na IMI MF UL.....	37
Preglednica 10:	Število testiranih izolatov ter število in delež (%) za posamezne antibiotike občutljivih izolatov <i>P. aeruginosa</i> sluznega in ne-sluznega fenotipa, osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.....	39

Preglednica 11:	Stopnja občutljivosti (občutljiv/odporen) izolatov <i>P. aeruginosa</i> , osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.....	40
Preglednica 12:	Število in delež (%) večkratno odpornih izolatov <i>H. influenzae</i> , <i>S. aureus</i> in <i>P. aeruginosa</i> , osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.....	42
Preglednica 13:	Največji, povprečni in najmanjši delež (%) občutljivih izolatov <i>S. aureus</i> za posamezen antibiotik v letih 2009–2014.....	44
Preglednica 14:	Največji, povprečni in najmanjši delež (%) občutljivih izolatov <i>H. influenzae</i> za posamezen antibiotik v letih 2009–2014.....	44
Preglednica 15:	Največji, povprečni in najmanjši delež (%) občutljivih izolatov <i>P. aeruginosa</i> za posamezen antibiotik v letih 2009–2014.....	44

KAZALO SLIK

Slika 1:	Prevalenca respiratornih mikroorganizmov pri bolnikih s CF glede na starostno skupino v letu 2014 (CFF, 2015: 33).....	8
Slika 2:	Prevalenca respiratornih mikroorganizmov pri bolnikih s CF v letih 1988–2014 (CFF, 2015: 33).....	9
Slika 3:	Mehanizmi odpornosti bakterij proti antibiotikom (Sherrard in sod., 2014: 706).....	15
Slika 4:	Delež (%) prvih izolatov <i>S. aureus</i> , <i>H. influenzae</i> in <i>P. aeruginosa</i> , osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.....	29
Slika 5:	Delež (%) za posamezne antibiotike občutljivih izolatov <i>S. aureus</i> , osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.....	32
Slika 6:	Delež (%) za posamezne antibiotike občutljivih izolatov <i>H. influenzae</i> , osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.....	35
Slika 7:	Delež (%) za posamezne antibiotike občutljivih izolatov <i>P. aeruginosa</i> , osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.....	37
Slika 8:	Delež (%) za posamezne antibiotike občutljivih izolatov <i>P. aeruginosa</i> ne-sluznega in <i>P. aeruginosa</i> sluznega fenotipa, osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.....	39
Slika 9:	Delež (%) večkratno odpornih izolatov <i>S. aureus</i> , <i>H. influenzae</i> in <i>P. aeruginosa</i> , osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.....	43
Slika 10:	Največji, povprečni in najmanjši delež (%) občutljivih izolatov <i>S. aureus</i> , <i>H. influenzae</i> in <i>P. aeruginosa</i> , osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.....	45

KAZALO PRILOG

- Priloga A:** Število in delež (%) vseh prvih izolatov, osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.
- Priloga B:** Statistična primerjava deležev za posamezne antibiotike občutljivih izolatov *S. aureus*, osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009 in 2014 na IMI MF UL.
- Priloga C:** Statistična primerjava deležev za posamezne antibiotike občutljivih izolatov *H. influenzae*, osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009 in 2014 na IMI MF UL.
- Priloga D:** Statistična primerjava deležev za posamezne antibiotike občutljivih izolatov *P. aeruginosa*, osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009 in 2014 na IMI MF UL.
- Priloga E:** Statistična primerjava deleža občutljivih izolatov *P. aeruginosa* sluznega fenotipa in *P. aeruginosa* ne-sluznega fenotipa, osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.
- Priloga F:** Primerjava interpretacijskih kriterijev CLSI (2014) in EUCAST (2014) za določanje občutljivosti izolatov *S. aureus*.
- Priloga G:** Primerjava interpretacijskih kriterijev CLSI (2014) in EUCAST (2014) za določanje občutljivosti izolatov *H. influenzae*.
- Priloga H:** Primerjava interpretacijskih kriterijev CLSI (2014) in EUCAST (2014) za določanje občutljivosti izolatov *P. aeruginosa*.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AM	ampicilin
AMC	amoksisicilin/klavulanska kislina
AME	aminoglikozid-modificirajoči encimi (angl. Aminoglycoside-Modifying Enzymes)
AN	amikacin
ATM	aztreonam
AZM	azitromicin
BLNAR	betalaktamaza negativni sevi, odporni proti ampicilinu (angl. Beta-Lactamase Negative Ampicillin-Resistant)
BLPACR	betalaktamaza pozitivni sevi, odporni proti amoksisicilinu in klavulanski kislini (angl. Beta-Lactamase Positive Amoxicillin-Clavunate-Resistant)
BLPAR	betalaktamaza pozitivni sevi, odporni proti ampicilinu (angl. Beta-Lactamase Positive Ampicillin-Resistant)
CA-MRSA	zunajbolnišnični <i>Staphylococcus aureus</i> , odporen proti meticilinu (angl. Community Acquired Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
CAZ	ceftazidim
CC	klindamicin
CEC	cefaklor
CF	cistična fibroza
CFTR	regulator transmembranske prevodnosti pri cistični fibrozi (angl. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator)
CIP	ciprofloksacin
CLSI	Inštitut za klinične in laboratorijske standarde (angl. Clinical and Laboratory Standards Institute)
CTX	cefotaksim
CXMp	cefuroksim (parenteralno)
DHFR	dihidrofolat reduktaza
DHPS	dehidropteroat sintetaza
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. Deoxyribonucleic Acid)
E	eritromicin
ESBL	betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja (angl. Extended-Spectrum Beta-Lactamase)
EUCAST	Evropski odbor za testiranje protimikrobne občutljivosti (angl. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
FEP	cefepim
FEV ₁	forsiran izdihan volumen zraka v prvi sekundi (angl. Forced Expiratory Volume 1)
GISA	<i>Staphylococcus aureus</i> , zmerno občutljiv za glikopeptide (angl. Glycopeptide-Intermediate <i>Staphylococcus aureus</i>)
GM	gentamicin
IMI MF UL	Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani
IPM	imipenem
MDR	večkratno odporen (angl. Multidrug-Resistant)
MEM	meropenem
MMR	popravljanje neujemanja (angl. Mismatch Repair).
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> , odporen proti meticilinu (angl. Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> , občutljiv za meticilin (angl. Methicillin Susceptible <i>Staphylococcus aureus</i>)

MXF	moksifloksacin
NN	tobramicin
OX	oksacilin
P	penicilin
PBP	beljakovina, ki veže penicilin (angl. Penicillin-Binding Protein)
QRDR	regija za odpornost proti kinolonom (angl. Quinolone Resistance Determining Region)
QS	zaznavanje celične gostote (angl. Quorum-Sensing)
R	odporen (angl. Resistant)
RA	rifampin
RNA	ribonukleinska kislina (angl. Ribonucleic Acid)
S	občutljiv (angl. Susceptible)
SCC <i>mec</i>	stafilokokna kromosomska kaseta <i>mec</i> (angl. Staphylococcal Cassette Chromosome <i>mec</i>)
SCVs	različice majhnih kolonij (angl. Small-Colony Variants)
SKUOPZ	Slovenska komisija za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila
SXT	trimetoprim/sulfametoksazol
TE	tetraciklin
TEC	teikoplanin
TZP	piperacilin/tazobaktam
VA	vankomicin
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> , zmerno občutljiv za vankomicin (angl. Vancomycin-Intermediate <i>Staphylococcus aureus</i>)
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> , odporen proti vankomicinu (angl. Vancomycin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)

1 UVOD

Cistična fibroza (CF) je najpogostejša avtosomno recesivna dedna bolezen, ki prizadene več organskih sistemov, predvsem dihal, trebušno slinavko, jetra in prebavila. Vzrok bolezni je mutacija gena *CFTR* (angl. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), ki kodira zapis za kloridni kanal. Zaradi mutacije se spremeni prenos kloridnih, bikarbonatnih in natrijevih ionov prek epitelijskih celic (Bowen in Hull, 2015). V dihalih se zaradi omenjene mutacije zmanjša učinkovitost mukociliarnega čiščenja, kar omogoča vzpostavitev ugodnih pogojev za razvoj bakterijskih okužb dihal, ki so glavni vzrok obolevnosti in umrljivosti bolnikov s CF (Khanbabaee in sod., 2012; Ciofu in sod., 2013).

Mikrobne združbe dihal bolnikov s CF predstavljajo kompleksen ekosistem, ki se med posamezniki razlikuje (Rogers in sod., 2004). Večina bolnikov ima značilen vzorec bakterijskih okužb, ki se z napredovanjem bolezni in posledično s starostjo bolnikov spreminja. V zgodnji fazi CF okužbo dihal najpogosteje povzročata *Staphylococcus aureus* in *Haemophilus influenzae*, ko bolezen napreduje, je prevladujoč vzrok okužb predvsem *Pseudomonas aeruginosa* (Ciofu in sod., 2013; Gaspar in sod., 2013).

CF je bolezen, ki zahteva multidisciplinarni pristop k obravnavi in zdravljenju (Borinc Beden in sod., 2008; Proesmans in sod., 2008). Za vzdrževanje dobrega stanja dihal pri bolnikih s CF je poleg redne respiratorne fizioterapije, inhalacije mukolitikov in osmolitov ter drugih ukrepov za izboljševanje vlažnosti dihalnih poti zelo pomembno aktivno iskanje okužb dihal ter njihovo hitro, odločno in usmerjeno antibiotično zdravljenje (Kotnik Pirš in sod., 2014). Z uvedbo antibiotičnega zdravljenja okužb dihal sta se izboljšali kakovost življenja in pričakovana življenjska doba bolnikov s CF, obenem pa se je zaradi pogostega jemanja antibiotikov povečalo tveganje, da se pri bolnikih s CF pojavljajo bakterijski sevi, odporni proti različnim antibiotikom (Döring in sod., 2012; Sherrard in sod., 2014).

Lokalno poznavanje občutljivosti povzročiteljev okužb dihal pri bolnikih s CF je pomembno za preverjanje ustreznosti empiričnega zdravljenja tovrstnih okužb, ki ga priporočajo evropske smernice (Döring in sod., 2012). Trenutno še nimamo sistematičnega pregleda povzročiteljev okužb dihal in njihove občutljivosti za antibiotike pri slovenskih otrocih s CF.

1.1 NAMEN DELA

- Ugotoviti, kateri so najpogostejši bakterijski povzročitelji okužb dihal pri otrocih s CF v Sloveniji.
- Analizirati občutljivost izolatov bakterij *S. aureus*, *H. influenzae* in *P. aeruginosa*, ki so bili osamljeni iz dihal slovenskih otrok s CF v šestletnem obdobju, in ugotoviti, ali se občutljivost izolatov za testirane antibiotike s časom spreminja.
- Primerjati občutljivost izolatov *P. aeruginosa* sluznega in ne-sluznega fenotipa.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Najpogostejši izolati, osamljeni iz dihal otrok s CF v Sloveniji, so *S. aureus*, *H. influenzae* in *P. aeruginosa*.
- Stopnja odpornosti in delež večkratno odpornih izolatov pri otrocih s CF sta v Sloveniji najvišja pri izolatih vrste *P. aeruginosa*.
- Delež MRSA med izolati *S. aureus*, osamljenimi iz dihal otrok s CF v Sloveniji, je nižji od 5 %.
- Občutljivost/odpornost izolatov sluznega fenotipa *P. aeruginosa* je pri otrocih s CF v Sloveniji primerljiva z občutljivostjo/odpornostjo izolatov ne-sluznega fenotipa *P. aeruginosa*.
- Odpornost izolatov *P. aeruginosa* proti nekaterim antibiotikom pri posameznih otrocih s CF s časom narašča.

2 PREGLED OBJAV

2.1 CISTIČNA FIBROZA

Cistična fibroza je najpogostejša avtosomno recesivna dedna bolezen pri belcih (Gaspar in sod., 2013; Kotnik Pirš in sod., 2014). Pojavnost bolezni je v različnih delih sveta različna. Najpogostejša je v osrednjem in vzhodnem delu Evrope, kjer ima CF približno 1 od 3.500 živorojenih otrok. Najvišja opisana pojavnost je na Irskem 1:1.800, medtem ko na Finskem znaša le 1:20.000 (Kotnik Pirš in sod., 2014). Poleg Evrope je največ primerov bolezni v Severni Ameriki in Avstraliji (Elborn, 2016). Na osnovi podatkov o otrocih, ki jih vodijo v Centru za CF na Pediatrični kliniki v Ljubljani, je pojavnost v Sloveniji 1:4.500 živorojenih otrok (Kotnik Pirš in sod., 2014).

2.1.1 Klinični znaki

Bolezen prizadene več organskih sistemov – vpliva na delovanje dihal, trebušne slinavke, jeter, žlez znojnic, rodil in črevesja (Gaspar in sod., 2013; Kotnik Pirš in sod., 2014). Glavni vzrok obolevnosti in smrtnosti pri bolnikih s CF je odpoved pljuč, ki je posledica bakterijske okužbe dihal, predvsem s sluznim fenotipom *P. aeruginosa* (Ciofu in sod., 2013). Pljučna funkcija (predvsem FEV₁ – forsiran izdihan volumen zraka v prvi sekundi) je najpomembnejši klinični napovedni dejavnik pri bolnikih s CF. Kronična okužba prispeva k upadu FEV₁ približno 2 % na leto (Praprotnik in sod., 2015). Poleg spodnjih dihal so zaradi genetske okvare in posledično bolj suhe sluznice prizadeta tudi zgornja dihalna. Prizadetost nosnega organa (nosne in odnosne votline ter nosno žrelo) se kaže z oteženim dihanjem skozi nos, poslabšanjem voaha, kroničnim vnetjem obnosnih votlin, nosno polipozo in kašljem. Dolgotrajno zdravljenje z aminoglikozidnimi antibiotiki lahko privede do okvare notranjega ušesa (Borinc Beden in sod., 2008). Kar 85–90 % bolnikov s CF ima okvarjeno eksokrino delovanje trebušne slinavke, katerega posledica je nezadostno vsrkavanje maščob in vitaminov, topnih v vodi. Zaradi okvarjene absorpcije hranil v črevesju imajo bolniki pogosto težave s podhranjenostjo. Pri približno tretjini bolnikov s CF se razvije bolezen jeter. Pomembna okvara jeter je posledica zapore žolčnih vodov, ki lahko vodi v cirozo jeter. V primeru napredovanja bolezni je potrebna presaditev jeter (Borinc Beden in sod., 2008). Posledica CF je tudi neplodnost. Neplodnih je kar 98 % moških s CF, medtem ko imajo ženske samo zmanjšano plodnost (Bowen in Hull, 2015). Zaradi podaljšanja življenjske dobe bolnikov so pogostejši tudi dodatni zapleti bolnikov, kot sta sladkorna bolezen in zmanjšana kostna gostota ter s tem povečano tveganje za zlome. Sladkorna bolezen, pogojena s CF, se najpogosteje pojavlja med 20. in 30. letom starosti in velja za resno bolezensko stanje, saj ga pogosto spremlja tudi poslabšanje pljučne simptomatike in bolnikovega splošnega stanja, kar je lahko tudi vzrok smrti (Borinc Beden in sod., 2008; Kotnik Pirš in Borinc Beden, 2009).

2.1.2 Vzrok bolezni

Vzrok bolezni je mutacija gena *CFTR* na sedmem kromosomu, ki kodira zapis za beljakovino CFTR (Gaspar in sod., 2013). Odkritih je že več kot 2.000 različnih mutacij gena *CFTR*, vendar za večino še niso potrdili povezave s CF (CFMD, 2016). V okviru projekta CFTR2 (angl. The Clinical and Functional TRanslation of CFTR) so Sosnay in sod. (2013) preiskali 159 mutacij in ugotovili, da med njimi 127 mutacij povzroča bolezen. Glede na vpliv mutacij na celičnem nivoju lahko mutacije gena *CFTR* razdelimo v šest razredov. Od vrste mutacije je odvisna tudi klinična slika bolnika. Mutacije razredov I, II in III onemogočajo sintezo beljakovine CFTR in posledično imajo bolniki s takimi mutacijami resnejšo obliko CF, medtem ko je posledica mutacij razredov IV, V in VI slabše delovanje beljakovine CFTR, zato imajo ti bolniki lažjo obliko bolezni (Elborn, 2016). Najpogostejša mutacija gena, prisotna kar pri 70 % belcev, je delecija aminokisline fenilalanin na mestu 508 (Phe508del ali $\Delta F508$), ki povzroči nastanek spremenjene beljakovine CFTR, in posledično pride do razgradnje s proteazami. Mutacija $\Delta F508$ sodi v razred II mutacij in je povezana z najtežjo klinično sliko (Antonίου in Elston, 2016; Elborn, 2016). Tudi pri otrocih, ki jih vodijo v Centru za CF na Pediatrični kliniki v Ljubljani, je mutacija $\Delta F508$ najpogostejša in je bila v letu 2014 prisotna kar pri 61 % otrok (Kotnik Pirš in sod., 2014).

Membranska beljakovina CFTR tvori kloridni kanal na zunanji površini epiteljskih celic (Sherrard in sod., 2014) in sodeluje pri prenosu kloridnih in bikarbonatnih ionov prek dihalnega epitelijskega (Berkebile in McCray Jr, 2014). Zaradi mutacije gena *CFTR* se zmanjša izločanje kloridnih ionov v sluznico dihal in poveča absorpcija natrijevih ionov, kar vodi v dehidracijo sluzi dihal in kopičenje sputuma, ki je v primerjavi s sputumom zdravih oseb viskoznejši, ker vsebuje večje količine aktina in deoksiribonukleinske kisline (DNA) (Gaspar in sod., 2013). Zaradi prekinjenega prenosa bikarbonatnih ionov se zniža pH-vrednost sluzi na površini dihal, kar vpliva na zmanjšano delovanje protimikrobnih snovi, povečanje deleža mucinov v sluzi in posledično je oslABLjeno tudi odstranjevanje sluzi z migetalkami, t. i. mukociliarno čiščenje, ki sicer predstavlja pomemben obrambni mehanizem pred patogeni. Vsi naštetih dejavniki pomembno prispevajo k nastanku vnetja in ugodnih razmer za razvoj bakterijskih okužb (Berkebile in McCray Jr, 2014; Gaspar in sod., 2013), ki sčasoma privedejo do nastanka bronhiektazij, zamašitev dihalnih poti in nazadnje odpovedi dihal (Antonίου in Elston, 2016).

2.1.3 Diagnoza

Diagnoza cistične fibroze temelji na značilnih kliničnih znakih bolezni dihalnih poti (kronični produktivni kašelj, prisotnost nosnih polipov, bronhiektazije, ponavljajoče se bakterijske okužbe, atipična astma), prebavil (podhranjenost, pankreatitis, zlatenica, hepatitis, prolaps rektuma, mekonijski ileus) in urogenitalij pri moških (Borinc Beden in

sod., 2008; Farrell in sod., 2008). Merilo za postavitev diagnoze je tudi prisotnost CF pri bližnjem svojcu, zlati standard pa ostaja pilokarpinska iontoforeza, s katero ugotavljamo povišane vrednosti kloridov v znoju. Test je pozitiven, če koncentracija kloridov presega 60 nmol/l. V primeru mejnih vrednosti testa lahko CF potrdimo tudi z analizo mutacij v genu *CFTR* (prisotni morata biti vsaj dve mutaciji) (Farrell in sod., 2008).

Zgodnje prepoznavanje bolezni omogoča takojšnjo obravnavo in čimprejšnje zdravljenje, kar pripomore k izboljšanju bolezenskega stanja, daljši življenjski dobi in kakovosti življenja (Kotnik Pirš in sod., 2014). V večini evropskih držav z visoko prevalenco bolezni so uvedli presejalno testiranje novorojenčkov za CF (Elborn, 2016). Glavni namen je odkriti otroke s CF pred razvojem simptomov in znakov bolezni (Praprotnik in sod., 2015). Raziskave kažejo, da so z uvedbo presejalnega testiranja zmanjšali pogostost resnih zapletov v otroštvu in posledično izboljšali njihovo preživetje, hkrati pa so znižali stroške oskrbe bolnikov. Pri testiranju uporabljajo različne metode. Osnovni test je določanje imunoreaktivnega tripsinogena v kaplji krvi v kombinaciji z analizo DNA za odkrivanje mutacij gena *CFTR*. V primeru pozitivnega presejalnega testa je treba diagnozo potrditi z znojnim testom (Castellani in sod., 2009). Tudi v Sloveniji pripravljajo uvedbo presejalnega testa za odkrivanje CF pri novorojenčkih (Praprotnik in sod., 2015).

2.1.4 Zdravljenje

Zdravljenje bolnikov s CF zahteva multidisciplinarni pristop, v katerem sodelujejo zdravniki z več specialističnih področij, medicinske sestre, psihoterapevti, socialni delavci in dietetiki (Borinc Beden in sod., 2008; Proesmans in sod., 2008). CF je za zdaj še neozdravljiva bolezen, zato je glavni namen zdravljenja zmanjšati simptome ter upočasniti napredovanje bolezni in tako podaljšati življenjsko dobo bolnikov (Gaspar in sod., 2013). CF je bila včasih večinoma bolezen otrok. Leta 1950 je bila pričakovana življenjska doba bolnikov s CF v povprečju nekaj mesecev, glavna vzroka smrti pa sta bila podhranjenost zaradi okvare trebušne slinavke in mekonijski ileus (Davis, 2006). Leta 1974 je bila povprečna starost bolnikov s CF ob smrti osem let (Folkesson in sod., 2012). Zaradi izboljšane obravnave obolelih v dobro organiziranih multidisciplinarnih centrih in uvedbe intenzivnega zdravljenja z antibiotiki danes v razvitih državah bolniki živijo več kot 40 let. Do leta 2025 naj bi se število odraslih s CF v razvitih evropskih državah povečalo kar za 70 % (Elborn, 2016).

Zdravljenje bakterijskih okužb dihal poteka z uporabo različnih antibiotikov. V zadnjih letih se priporoča zdravljenje vseh mikroorganizmov, osamljenih iz kužnin spodnjih dihal, ne glede na to, ali so patogeni ali ne, saj v vsakem primeru povzročajo vnetje in s tem poškodbo dihalnih poti. Pri otrocih s CF blage akutne okužbe, ki jih večinoma povzročata *H. influenzae* in *S. aureus*, zdravimo s peroralnimi antibiotiki dva do tri tedne, če pride do poslabšanja, pa je potrebno zdravljenje s parenteralnimi antibiotiki skupaj z intenzivno

respiratorno fizioterapijo. Izrednega pomena je aktivno iskanje prve okužbe z bakterijo *P. aeruginosa* in takojšnje zdravljenje, še preden bakterija preide v sluzni fenotip, ki ga je zelo težko, včasih tudi nemogoče odstraniti iz pljuč. Pri otrocih, ki še niso kronično kolonizirani s *P. aeruginosa*, zato vsake tri mesece (obdobje, potrebno za razvoj sluznega fenotipa) izvajamo mikrobiološko preiskavo kužnin dihal na patogene bakterije. Če se razvije kronična okužba s *P. aeruginosa*, je treba bolnike doživljenjsko zdraviti z inhalacijskimi antibiotiki (tobramicinom, kolistinom ali aztreonamom), s katerimi dosežemo višje koncentracije antibiotika na mestu okužbe, sistemska izpostavitve in toksičnost pa sta pri tem minimalni. Da bi zmanjšali verjetnost razvoja odpornosti in hkrati spodbudili učinkovito sinergistično delovanje, okužbe s *P. aeruginosa* zdravimo z dvotirno antibiotično terapijo glede na antibiogram, običajno s kombinacijo antipsevdomonasnega penicilina in aminoglikozida (Borinc Beden in sod., 2008; Praprotnik in sod., 2015).

Poleg zdravljenja bakterijskih okužb je pri bolnikih s CF potrebno tudi zdravljenje vnetja in izboljševanje vlažnosti v dihalnih poteh. Vsi otroci s kronično okužbo s *P. aeruginosa* prejemajo protivnetno zdravljenje z azitromicinom. Za izboljšanje mukociliarnega čiščenja in s tem funkcije dihal se uporabljajo še bronhodilatatorji, mukolitiki (DNaze), steroidna in nesteroidna protivnetna zdravila, antioksidanti in osmoliti (fiziološka raztopina, manitol), ki izboljšajo vlažnost dihalnih poti (Proesmans in sod., 2008). Sestavni del zdravljenja sta tudi pravilna prehrana (dodajanje visokokaloričnih prehranskih dopolnil in nadomestnih encimov trebušne slinavke) in t. i. respiratorna fizioterapija, ki pomaga pri odstranjevanju bronhialne sluzi (Kotnik Pirš in sod., 2014). Pri napredovalih oblikah CF je edina možnost, ki izboljša kakovost življenja in pomembno podaljša življenjsko dobo bolnikov s CF, presaditev pljuč (Praprotnik in sod., 2015).

Odkritje gena *CFTR* leta 1989 je med znanstvenike prineslo novo upanje za razvoj genske terapije, ki bi omogočila ozdravitev CF. Zaradi težav pri izbiri ustreznega vektorja gensko zdravljenje žal še vedno ni na voljo, se pa razvijajo zdravila, imenovana modulatorji *CFTR*, ki ciljajo določene mutacije gena *CFTR* in s tem vplivajo na delovanje kanalčka. Prva skupina modulatorjev *CFTR* (med njimi najbolj znan ivakaftor) je primerna za zdravljenje bolnikov s CF, pri katerih je prisotna ena od mutacij spreminjanja prehodnosti kanalčkov celične membrane (mutacije razreda III), saj delujejo tako, da odpirajo kloridne kanalčke in s tem povečajo izločanje kloridnih ionov, medtem ko predstavniki druge skupine (eden od njih je lumakaftor) vplivajo na sestavljanje in pomikanje beljakovine *CFTR* na površino celične membrane in so zato primerni za zdravljenje bolnikov s CF, ki imajo mutacije razreda I in II. Prvo zdravilo, imenovano ivakaftor oz. Kalydeco, so odobrili za zdravljenje bolnikov s CF z mutacijo gena *CFTR* G551D leta 2012, v letu 2015 pa je FDA dovolila uporabo zdravila Orkambi (kombinacija zdravil ivakaftor in lumakaftor) za bolnike s CF, ki imajo mutacijo, imenovano $\Delta F508$, v obeh kopijah gena *CFTR* (Antonίου in Elston, 2016; Bowen in Hull, 2015; Praprotnik in sod., 2015).

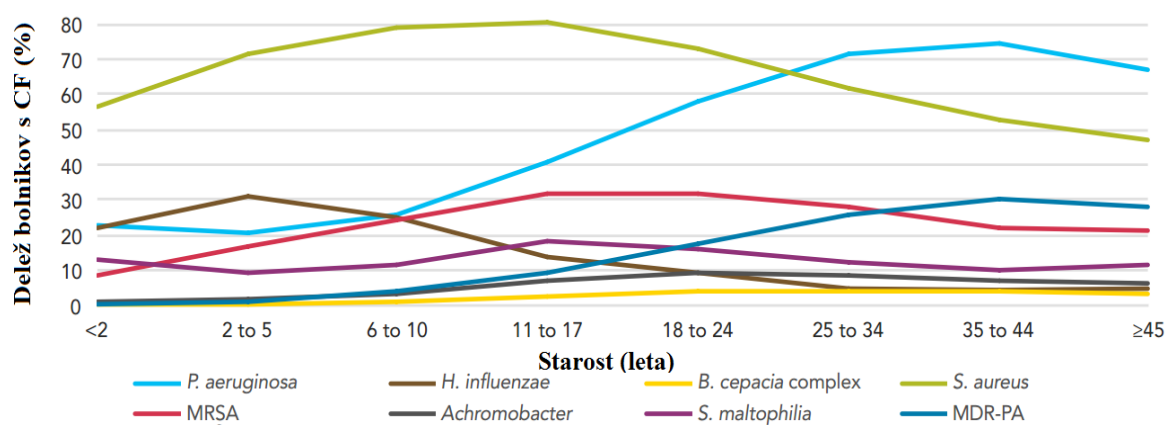
2.2 BAKTERIJSKE OKUŽBE DIHAL BOLNIKOV S CISTIČNO FIBROZO

Glavni vzrok obolevnosti in smrtnosti pri bolnikih s CF je okvara pljuč, ki nastopi kot posledica kroničnega vnetja in bakterijskih okužb (Ciofu in sod., 2013). Bolezni dihal zaradi kronične bakterijske okužbe so vzrok za zgodnjo obolevnost in smrtnost pri 85 % bolnikov s CF (Sherrard in sod., 2014). Bakterijske okužbe dihal so pri bolnikih s CF prisotne vse od zgodnjega otroštva. Skozi življenje se bolniki zaradi kroničnih okužb in vnetja dihal soočajo s pljučnimi eksacerbacijami, obdobji nenadnega poslabšanja, za katera so značilni povečan kašelj in produkcija sluzi, izkašljevanje krvi, zasoplost, izguba apetita in posledično izguba teže ter upad pljučne funkcije (Gilligan, 2014). Pljučna poslabšanja vodijo v poškodbe pljučnega tkiva in so tako povezana s slabšim izidom bolezni (Praprotnik in sod., 2015).

Mikrobne združbe dihal bolnikov s CF predstavljajo kompleksen ekosistem, ki se med posamezniki razlikuje (Rogers in sod., 2004). Večino bakterij bolniki pridobijo iz okoljskih rezervoarjev, v nekaterih primerih pa gre za prenos bakterij med bolniki (Harrison, 2007). Raznolikost mikrobne združbe dihal se s starostjo spreminja – v otroštvu narašča in doseže vrh pri mladih odraslih, nato se zaradi napredovanja bolezni in postopnega upadanja delovanja pljuč s starostjo zmanjšuje. Pri bolnikih s kronično okužbo pljuč pogosto prevladuje ena sama bakterijska vrsta (Chmiel in sod., 2014). Na zmanjšanje raznolikosti bakterijskih vrst vpliva tudi antibiotično zdravljenje (Gaspar in sod., 2013; Cox in sod., 2010; Klepac-Ceraj in sod., 2010; Chmiel in sod., 2014).

Večina bolnikov ima značilen vzorec bakterijskih okužb, ki se s starostjo spreminja. Pri dojenčkih in otrocih sta najpogostejša povzročitelja okužb dihal bakteriji *S. aureus* in *H. influenzae*, medtem ko pri odraslih prevladuje predvsem bakterija *P. aeruginosa* (Ciofu in sod., 2013), ki povzroča okužbo pri približno 80 % bolnikov, starejših od 18 let (Slika 1) (Gaspar in sod., 2013). Poleg *P. aeruginosa* so pri odraslih bolnikih s CF pomembne povzročiteljice okužb dihal tudi druge po Gramu negativne nefermentativne bakterije, kot so *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* in bakterije kompleksa *Burkholderia cepacia* (predvsem *Burkholderia cenocepacia*). Pogosto so del mikrobioma dihal pri bolnikih s CF tudi netuberkulozne mikobakterije (predvsem *Mycobacterium abscessus* in *Mycobacterium avium-intracellulare*), ki so zelo odporne proti antibiotikom, zato je njihovo zdravljenje še toliko težavnejše (Ciofu in sod., 2013; Sherrard in sod., 2014). Občasno okužbe povzročajo tudi bakterije *Burkholderia gladioli* in vrste rodov *Ralstonia*, *Cupriavidus* in *Pandoraea* (LiPuma, 2010). Iz skupine enterobakterij je pri bolnikih s CF najpogostejša *Serratia marcescens* (Rutter in sod., 2016). Pri nekaterih bolnikih k napredovanju bolezni prispevajo tudi okužbe z anaerobnimi bakterijami iz rodov *Prevotella*, *Veillonella*, *Propionibacterium* in *Actinomyces*, vendar njihov klinični pomen še ni pojasnjen.

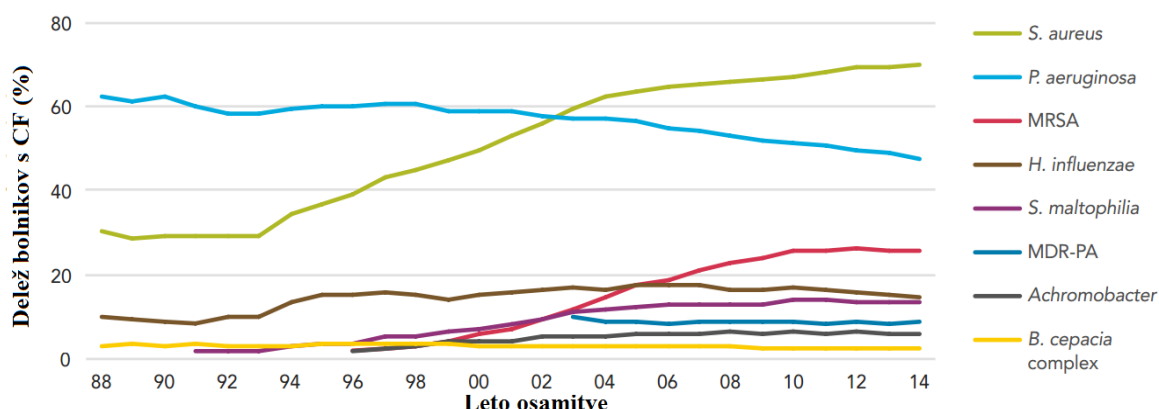
Poleg tega so iz kužnin dihal bolnikov CF osamili bakterijske vrste, ki sicer redko povzročajo okužbe pri človeku, so pa pogoste v naravnih okoljih kot saprofiti ali patogeni živali ali rastlin. Med njimi so *Bordetella hinzii*, *Comamonas testosteroni*, *Moraxella osloensis*, *Rhizobium radiobacter* kot tudi vrste rodu *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Herbaspirillum* in *Xanthomonas*. Nedavne raziskave so pokazale, da naj bi bile del mikrobioma dihal pri bolnikih s CF tudi bakterije skupine *Streptococcus malleri* (LiPuma, 2010; Gaspar in sod., 2013). Razvoj molekularnih metod je omogočil širši vpogled v mikrobiom CF. V zadnjih letih so pri bolnikih s CF odkrili veliko novih vrst mikroorganizmov, a njihova vloga pri patogenezi ostaja nepotrjena (Ciofu in sod., 2013; Elborn, 2016).



Slika 1: Prevalenca respiratornih mikroorganizmov pri bolnikih s CF glede na starostno skupino v letu 2014 (CFF, 2015: 33).

Legenda: MRSA – *S. aureus*, odporen proti meticilinu, MDR-PA – večkratno odporen *P. aeruginosa*.

Trend najpogostejših bakterijskih povzročiteljev okužb dihal pri bolnikih s CF se z leti spreminja (Slika 2). Prevalenca bakterij *P. aeruginosa* se znižuje, kar je delno posledica terapij za preprečevanje začetne okužbe z bakterijami in agresivnega eradikacijskega zdravljenja. Nasprotno delež bakterij *S. aureus* kot tudi delež *S. aureus*, odpornih proti meticilinu (angl. Methicillin-Resistant *S. aureus* – MRSA) narašča, kar je lahko deloma rezultat natančnejših metod za odkrivanje in identifikacijo po Gramu pozitivnih bakterij. V letih 2000–2010 je število bolnikov, koloniziranih z MRSA, naraslo za skoraj petkrat, nato pa je do leta 2014 ostalo približno nespremenjeno, verjetno zaradi povečanega nadzora in izboljšanih ukrepov za preprečevanja prenosa okužb (CFF, 2015; Rutter in sod., 2016).



Slika 2: Prevalenca respiratornih mikroorganizmov pri bolnikih s CF v letih 1988–2014 (CFF, 2015: 33).

Legenda: MRSA – *S. aureus*, odporen proti meticilinu, MDR-PA – večkratno odporen *P. aeruginosa*.

2.3 NAJPOGOSTEJŠI POVZROČITELJI OKUŽB DIHAL PRI OTROCIH S CISTIČNO FIBROZO

2.3.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus je po Gramu pozitiven, negibljiv in nesporogen fakultativno anaeroben kok (Goss in Muhlebach, 2011; Seme, 2002b). Bakterije *S. aureus* sodijo med glavne povzročitelje bolezni po vsem svetu (Reygaert, 2013). Povzročajo tako lokalizirane gnojne okužbe kože, opeklin, kirurških ran, vnetje srednjega ušesa in očesne veznice kot tudi septični artritis, endokarditis, meningitis, osteomielitis in sepsa (Seme, 2002b).

Pri patogenezi bakterije *S. aureus* imajo poglavitno vlogo različni virulentni dejavniki, ki jih lahko razdelimo v dve skupini:

- površinske beljakovine, ki omogočajo kolonizacijo:
 - kolagen in fibronektin-vezavne beljakovine: omogočajo vezavo,
 - beljakovina A: prepreči opsonizacijo,
 - površinski polisaharidi: ščitijo pred fagocitozo;
- beljakovine, ki omogočajo vstop v gostiteljska tkiva in celice:
 - toksini: toksin α (hemolizin), toksin β (hidroliza lipidov celične stene), toksina γ in δ (citolična aktivnost), stafilokokni enterotoksini,
 - encimi: koagulaze, deoksiribonukleaze, hialuronidaze, lipaze, stafilokinaze.

Poleg omenjenih virulentnih dejavnikov so pomembni tudi mehanizmi odpornosti proti antibiotikom ter sposobnost tvorbe biofilmov (Goss in Muhlebach, 2011; Reygaert, 2013).

Vir bakterije *S. aureus* so bolniki in zdravi klicenosci. Približno 30–50 % zdravih oseb je prehodnih ali kroničnih nosilcev te bakterije, največkrat jo imajo v nosu (Goss in

Muhlebach, 2011). *S. aureus* je pogosto prvi in tudi najpogostejši bakterijski patogen, osamljen iz respiratornega trakta novorojenčkov in otrok s CF (LiPuma, 2010). Poleg tega je pred uvedbo antibiotikov veljal za glavnega povzročitelja smrti pri bolnikih s CF (Ciofu in sod., 2013). Glede na podatke registra bolnikov s CF je z bakterijo *S. aureus* okuženih več kot 70 % otrok in najstnikov (CFF, 2015).

S. aureus lahko pri bolnikih s CF povzroča kronične okužbe, ki trajajo več let. Posledica prilagodljivosti *S. aureus* na okoljsko nišo v pljučih je nastanek fenotipskih različic SCVs (angl. Small-Collony Variants) (Hauser in sod., 2011). Značilnosti SCVs so: počasnejša hitrost rasti in posledično tvorba manjših, neobarvanih in nehemolitičnih kolonij na trdem gojišču; odvisnost od timidina, hemina ali menadiona (avksotrofija); zmanjšana sinteza α -toksina; sposobnost znotrajceličnega preživetja in večja odpornost proti antibiotikom (npr. aminoglikozidom) (Besier in sod., 2007; Goss in Muhlebach, 2011; Masoud-Landgraf in sod., 2016). Basier in sod. (2007) so opazili, da je nastanek SCVs pri bolnikih s CF povezan z napredovalo boleznijo pljuč. Ugotovili so tudi, da je v primerjavi z normalnim fenotipom *S. aureus*, fenotip SCV pogostejši pri starejših bolnikih, pogosto koloniziranih z bakterijo *P. aeruginosa*.

V zadnjih desetih letih se je pri bolnikih s CF povečalo število okužb z bakterijo *S. aureus*, odporno proti meticilinu (MRSA), ki v primerjavi z neodporno bakterijo *S. aureus* povzroča še hitrejši upad pljučne funkcije in posledično večjo stopnjo umrljivosti (Goss in Muhlebach, 2011; Hauser in sod., 2011; Harik in sod., 2016). Povečanje pojavnosti okužb z MRSA pri bolnikih s CF se časovno ujema s povečanjem pojavnosti zunajbolnišničnih sevov MRSA (angl. Community-Acquired MRSA – CA-MRSA), vendar ni povsem jasno, ali je pojav CA-MRSA vzrok za porast okužb z MRSA (LiPuma, 2010). Sevi CA-MRSA imajo poleg omenjenih virulentnih dejavnikov še zapis za levkocitolitični toksin, Panton-Valentine levkocidin in lahko povzročajo nekrotizirajočo pljučnico (Goss in Muhlebach, 2011).

2.3.2 *Haemophilus influenzae*

H. influenzae je majhen po Gramu negativen kokobacil. Bakterije so del normalne flore zgornjega respiratornega trakta človeka, kjer živijo kot komenzali (Gilsdorf, 2015). Za rast potrebujejo hemin (faktor X) in nikotinamid adenin dinukleotid (faktor V), zato jih v laboratoriju običajno gojimo na čokoladnem agarju. Glede na prisotnost polisaharidne kapsule jih delimo v dve skupini: kapsulirane in nekapsulirane. Kapsulirani sevi v večini primerov povzročajo sistemske okužbe, kot sta meningitis in bakteriemija, medtem ko so nekapsulirani sevi navadno glavni povzročitelji vnetja srednjega ušesa (otitis media), konjunktivitisa, sinusitisa, bronhitisa in pljučnice (King, 2012; Kostyanov in Sechanova, 2012).

Okužbe dihal pri bolnikih s CF povzročajo nekapsulirani sevi *H. influenzae* (Gilsdorf, 2015), ki imajo različne virulentne dejavnike. Najpomembnejša sta lipooligosaharid, ki deluje kot endotoksin in hkrati ščiti bakterije pred fagocitozo, in proteaze IgA1, ki razkrajajo IgA v sluznici. K patogenosti pomembno prispevajo tudi beljakovine zunanje membrane, pili in različne adhezijske beljakovine, ki sodelujejo pri pritrditvi bakterij na epitelijske celice gostitelja (Kostyanov in Sechanova, 2012; King, 2012). Poleg tega bakterije *H. influenzae* lahko tvorijo biofilme (Starner in sod., 2006) in so sposobne preživeti znotraj makrofagov in epitelijskih celic vsaj 72 ur (Cardines in sod., 2012; King, 2012).

Bakterije *H. influenzae* so pogostejše pri dojenčkih in otrocih (Cardines in sod., 2012). Prevalenca pri otrocih s CF, mlajših od enega leta, je približno 20 %, medtem ko je pogostost okužbe pri odraslih nižja od 10 % (LiPuma, 2010). Pogosta osamitev bakterij pri otrocih s CF niti ni presenetljiva, saj nekapsuliran tip bakterije *H. influenzae* kolonizira zgornji respiratorni trakt zdravih otrok, zato je vloga *H. influenzae* pri napredovanju CF vprašljiva. Znano pa je, da je bakterija pogostejša pri otrocih s CF kot pri otrocih z drugimi boleznimi (npr. astmo). Na podlagi rezultatov raziskav so ugotovili, da lahko *H. influenzae* v spodnjih dihalih sproži vnetje in posledično poškodbo tkiva, ki vodi v upad pljučne funkcije (Hauser in sod., 2011). Kronična okužba z bakterijo *H. influenzae* pri osebah z boleznijo dihal lahko vodi v kronično obstruktivno pljučno bolezen in nastanek bronhiektazij (LiPuma, 2010).

2.3.3 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa je po Gramu negativna fakultativno anaerobna paličasta bakterija, ki jo uvrščamo v razred Gamma-proteobacteria. Bakterije *P. aeruginosa* so ubikvitarne – najdemo jih v naravi (v prsti, v vodi, na rastlinah), pri živalih in ljudeh kot del mikrobiote kože, v bolnišnicah na medicinski opremi, v plavalnih bazenih, umivalnikih in drugje (Mesquita in sod., 2013).

P. aeruginosa je oportunistična bakterija, ki povzroča okužbe dihal, sečil, kože, mehkih tkiv, kosti, sklepov in krvi. Odgovorna je tudi za okužbe pri imunsko oslabljenih osebah z opeklinami, rakom in aidsom (Kerr in Snelling, 2009). Razlog za sposobnost bakterije, da povzroča tako širok spekter okužb, so številni virulentni dejavniki, katerih izražanje nadzoruje sistem zaznavanja celične gostote (QS). Vzpostavitev okužbe ji omogočajo pili, biček, lipopolisaharid in ekstracelularna kapsula iz alginata, ki sodelujejo pri vezavi na epitelijske celice. Po kolonizaciji *P. aeruginosa* sintetizira in izloča različne encime in toksine, s katerimi povzroča poškodbe gostiteljskih celic, tkiv in organov. Elastazi LasA in LasB katalizirata razgradnjo elastina, ki je del pljučnega, žilnega in očesnega tkiva. Poleg omenjenih eksotoksinov bakterija sintetizira tudi pioverdin in piocianin, ki sta med drugim pomembna za vezavo železa in uravnavanje izražanja drugih virulentnih dejavnikov.

P. aeruginosa ima več sekrecijskih sistemov, med katerimi je najpomembnejši sekrecijski sistem tipa III, ki omogoča vnos eksotoksinov iz bakterijske v gostiteljsko celico, kjer bodisi preprečujejo sintezo beljakovin (eksotoksin A) ali pa vplivajo na tvorbo aktinskega citoskeleta, kar vodi v apoptozo (eksotoksini S, T, Y in U). Pri okužbah dihal ima pomembno vlogo tudi biosurfaktant ramnolipid, ki prekine tesne stike med respiratornimi epitelijskimi celicami. Poleg vseh omenjenih virulentnih dejavnikov je *P. aeruginosa* sposobna tvorbe biofilmov, odpornih proti antibiotikom (Mesquita in sod., 2013).

Pri bolnikih s CF velja *P. aeruginosa* za najpomembnejši patogen, tako glede prevalence kot tudi patogenosti (Gaspar in sod., 2013). Prevalenca se spreminja s starostjo, od približno 25 % pri otrocih, mlajših od pet let, do 80 % pri odraslih (LiPuma, 2010). Bolniki s CF se z bakterijo *P. aeruginosa* okužijo v otroštvu, najverjetneje v prvih treh letih življenja (72,5 %) (Burns in sod., 2001). Bakterija lahko kolonizira tako obnosne sinuse kot tudi pljuča (Folkesson in sod., 2012). Sprva so bolniki okuženi z več sevi, sčasoma pa zaradi selekcijskega pritiska prevladuje en sev (LiPuma, 2010). Osebe, kolonizirane z bakterijami *P. aeruginosa*, imajo slabšo prognozo in pogostejše akutne eksacerbacije (Harrison, 2007).

Začetno okužbo običajno povzroči planktonski, ne-sluzni fenotip *P. aeruginosa*, ki lahko prodre skozi sluz zaradi flagelarne aktivnosti. Če začetne okužbe ne zdravimo, lahko ta napreduje v kronično obliko (Gaspar in sod., 2013). V pljučih se vzpostavi selekcijski pritisk, na katerega se *P. aeruginosa* odzove z mutacijami nekaterih genov, ki ji omogočajo vzpostavitev dolgotrajne kronične okužbe. Ena izmed posledic izpostavitve antibiotikom je sprememba fenotipa, ki se odraža kot nastanek morfoloških različic kolonij. Fenotipske različice bakterije *P. aeruginosa* so t. i. majhne kolonije (angl. Small Colony Variants – SCVs) in sluzni sevi, katerih značilnosti so spremenjen metabolizem, zmanjšana imunogenost in višja stopnja odpornosti proti antibiotikom, kar prispeva k večji patogenosti in perzistenci bakterij (Mesquita in sod., 2013). Sprememba ne-sluznega fenotipa *P. aeruginosa* v sluznega je posledica mutacije gena *mucA*. Sluzni sevi imajo sposobnost sinteze zunajceličnega alginata, ki omogoča tvorbo biofilma, znotraj katerega so bakterije zaščitene pred prostimi radikali, fagocitozo (npr. nevtrofilci težko prodirajo skozi sluz) in antibiotiki (Folkesson in sod., 2012; Gaspar in sod., 2013; Gilligan, 2014). Bakterije *P. aeruginosa* so se na hipoksične pogoje znotraj biofilmov prilagodile s spremembo metabolizma in sicer tako, da lahko pridobivajo energijo z denitrifikacijo (Ciofu in sod., 2013).

Posledice dolgotrajne okužbe s sluznim fenotipom so bronhiektazije, emfizem ter postopno upadanje pljučne funkcije (Ciofu in sod., 2013). Kronična okužba s sluznim fenotipom *P. aeruginosa* je pri bolnikih s CF glavni vzrok smrti. Kasneje kot bolnik pride v stik z bakterijo, daljša je njegova pričakovana življenjska doba, zato je zelo pomembno zgodnje odkrivanje okužbe in njeno izkoreninjenje (Gilligan, 2014; Praprotnik in sod., 2015).

2.4 ODPORNOST BAKTERIJ PROTI ANTIBIOTIKOM

2.4.1 Antibiotiki

Odkritje antibiotikov pomeni enega najpomembnejših mejnikov v razvoju medicine v 20. stoletju. Z uvedbo antibiotikov v klinično prakso se je drastično spremenilo zdravljenje in izid infekcijskih bolezni (Kotnik, 2002). Antibiotiki so naravno ali polysintetično pridobljene snovi s protibakterijskim delovanjem, ki jih navadno izdelujejo glive in bakterije. Protimikrobna sredstva, pridobljena s sintetično ali kemijsko modifikacijo naravnega antibiotika, imenujemo kemoterapevtiki (Kotnik, 2002; Beović in Nadrah, 2014). V magistrskem delu bomo za vsa protibakterijska sredstva uporabljali izraz antibiotiki, ne glede na način sinteze.

Antibiotiki na bakterije delujejo bakteriostatično (zavrejo razmnoževanje bakterij) ali baktericidno (bakterije poškodujejo tako, da se niso več zmožne razmnoževati). Glede na mehanizem delovanja razlikujemo štiri vrste antibiotikov: antibiotike, ki preprečujejo sintezo celične stene; antibiotike, ki delujejo na sintezo znotrajceličnih beljakovin; antibiotike, ki vplivajo na sintezo nukleinskih kislin in antibiotike, ki ovirajo procese, povezane s celično membrano (Kotnik, 2002). V preglednici 1 so prikazane skupine antibiotikov, ki se uporabljajo za zdravljenje okužb dihal pri bolnikih s CF, njihovi glavni predstavniki in mehanizem delovanja.

Preglednica 1: Skupine antibiotikov in glavni predstavniki glede na mehanizem delovanja (Seme, 2002a; Beović in Nadrah, 2014).

Skupina antibiotikov	Mehanizem delovanja
Betalaktami: penicilini (ampicilin, amoksisicilin, oksacilin, penicilin, piperacilin), cefalosporini (ceftazidim, cefepim, cefuroksim), monobaktami (aztreonam), karbapenemi (imipenem, meropenem), inhibitorji betalaktamaz (klavulanska kislina, tazobaktam)	Zavirajo sintezo celične stene s tem, da se vežejo na karboksipeptidaze in transpeptidaze (t. i. beljakovine, ki vežejo penicilin), ki sodelujejo pri razvrščanju N-acetilmuraminske kisline in N-acetilglukozamina v peptidoglikansko verigo. Posledično pride do nakopičenja osnovnih sestavin bakterijske stene, kar sproži bakterijski avtolitični sistem, ki celico razkroji.
Glikopeptidi (teikoplanin, vankomicin)	Z vezavo na D-alanin-D-alanin muramildipeptida zavirajo vgradnjo N-acetilmuraminske kisline in N-acetilglukozamina v peptidoglikan in s tem preprečijo sintezo celične stene.
Polimiksini (kolistin)	Površinsko delujejo na fosfolipidni dvosloj v celični membrani, kar povzroči poškodbo membrane in posledično celično smrt.
Aminoglikozidi (amikacin, gentamicin, tobramicin)	Z vezavo na ribosomsko podenoto 30S preprečijo vezavo tRNA na ribosomsko podenoto 70S, kar zavira sintezo beljakovin.

se nadaljuje ...

Nadaljevanje Preglednice 1: Skupine antibiotikov in glavni predstavniki glede na mehanizem delovanja (Seme, 2002a; Beović in Nadrah, 2014).

Skupina antibiotikov	Mehanizem delovanja
Makrolidi (azitromicin, eritromicin) Linkozamidi (klindamicin)	Vežejo se z ribosomskima podenotama 23S in 50S in preprečujejo prehod beljakovine skozi ribosom.
Tetraciklini (tetraciklin)	Z vezavo na ribosomsko podenoto 30S preprečijo vezavo amonoacil-tRNA na akceptorsko mesto in tako onemogočijo sintezo beljakovin.
Fluorokinoloni (ciprofloksacin, moksifloksacin)	Delujejo na bakterijske topoizomerase (topoizomerozo IV in DNA-girazo) in s tem zavirajo sintezo nukleinskih kislin.
Sulfonamidi Trimetoprim	Preprečujejo sintezo tetrahidrofolne kisline, potrebne za sintezo purinov in pirimidinov, osnovnih gradnikov nukleinskih kislin.
Rifamicini (rifampicin)	Vežejo se z RNA-polimerazo in preprečujejo sintezo mRNA.

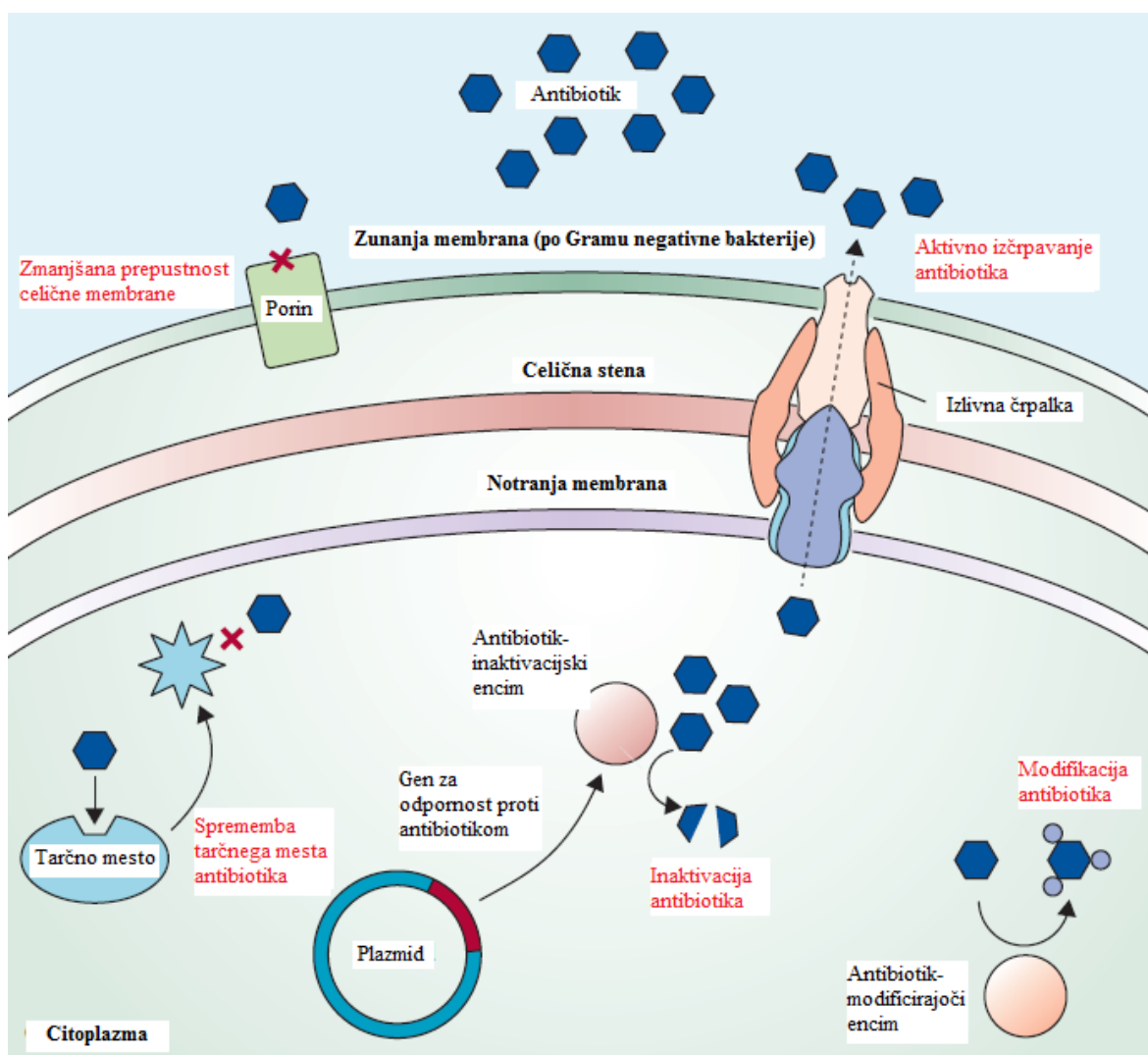
2.4.2 Razvoj odpornosti proti antibiotikom

Antibiotikov ne uporabljamo samo v medicini in veterini za preprečevanje in zdravljenje okužb, ampak tudi v poljedelstvu za zaščito in zdravljenje rastlin. Z množično uporabo antibiotikov so se kmalu začeli pojavljati bakterijski sevi, odporni proti posameznim ali proti več različnim antibiotikom. Danes predstavlja odpornost proti antibiotikom enega najpomembnejših javnozdravstvenih problemov po vsem svetu. Odporne bakterije se ne pojavljajo več samo v bolnišnicah, temveč tudi v domačem okolju. Zaradi vse večje svetovne trgovine in razmaha potovanj prebivalstva pa se odpornost širi med državami in celinami. Poleg tega je višja prevalenca odpornih mikroorganizmov tudi posledica povečevanja porabe antibiotikov v zdravstvu zaradi staranja prebivalstva in vse večjega števila imunsko oslabljenih ljudi.

Odpornost proti antibiotikom je naravni odziv bakterij na izpostavitve antibiotikom. Lahko je naravna (intrinzična) ali pridobljena. Za intrinzično odpornost je značilno, da so proti antibiotiku odporni vsi sevi določene bakterijske vrste ali rodu. Geni za odpornost so prisotni na kromosomu, potrebna je le njihova aktivacija, ki je lahko posledica spontanah genetskih mutacij. Pridobljena odpornost proti antibiotikom je za razliko od intrinzične prisotna samo pri določenih sevih bakterijske vrste ali rodu in je posledica mutacij genov ali pridobitve novih genov za odpornost od drugih bakterij s horizontalnimi genskimi prenosi (plazmidi, bakteriofagi, prevzem tuje DNA) (Reygaert, 2013; Sherrard in sod., 2014).

2.4.3 Mehanizmi bakterijske odpornosti

Bakterije so razvile različne mehanizme odpornosti. Poznamo pet osnovnih mehanizmov bakterijske odpornosti proti antibiotikom: zmanjšana prepustnost celične membrane za antibiotik; aktivno izčrpavanje antibiotika iz bakterijske celice (izlivne črpalke); modifikacija ali inaktivacija antibiotika z encimi; sprememba tarčnega mesta oz. prijemališča antibiotika in sprememba presnovne poti, na katero antibiotik deluje (Reygaert, 2013; Seme, 2002a; Sherrard in sod., 2014). Mehanizmi odpornosti so prikazani na sliki 3.



Slika 3: Mehanizmi odpornosti bakterij proti antibiotikom (Sherrard in sod., 2014: 706).

2.4.3.1 Zmanjšana prepustnost celične membrane

Vse glavne skupine antibiotikov (betalaktami, aminoglikozidi in fluorokinoloni), ki se uporabljajo za zdravljenje okužb dihal pri bolnikih s CF, morajo prečkati bakterijsko celično steno, da dosežejo svoje tarčno mesto delovanja. Aminoglikozidi vstopajo v celico tako, da se vežejo na lipopolisaharid zunanje membrane in s tem inducirajo svoj prevzem, medtem ko majhni hidrofilni antibiotiki (betalaktami in fluorokinoloni) lahko prečkajo zunanjo membrano le z difuzijo skozi vodne kanalčke, sestavljene iz porinov. Mutacije, ki privedejo do zmanjšanega izražanja ali spremembe porinov, so torej razlog za nižjo občutljivost bakterij za antibiotike (Lambert, 2002).

2.4.3.2 Aktivno izčrpavanje antibiotikov iz celice

Za aktivno izčrpavanje antibiotikov iz celice so odgovorne izlivne črpalke. Sestavljajo jih tri beljakovinske komponente: porin v zunanji membrani, energetska odvisna črpalka v celični membrani in povezovalna beljakovina v periplazmi, ki povezuje omenjeni membranski komponenti (Lambert, 2002). Bakterije imajo pet različnih družin izlivnih črpalk, ki izčrpavajo antibiotike iz celice (Poole, 2011).

2.4.3.3 Modifikacija ali inaktivacija antibiotikov z encimi

Delovanje antibiotikov lahko zavirajo različni encimi, med katerimi so najpomembnejše betalaktamaze, ki posredujejo odpornost proti betalaktamom, in aminoglikozid-modificirajoči encimi (AME), ki so odgovorni za odpornost proti aminoglikozidom (Reygaert, 2013). Betalaktamaze so hidrolitični encimi, ki razgradijo amidno vez betalaktamskega obroča in s tem inaktivirajo antibiotik. So glavni mehanizem odpornosti proti betalaktamom pri po Gramu negativnih bakterijah, vključno z bakterijo *P. aeruginosa* (Poole, 2011). Poznani so štirje razredi encimov (A–D). V razredih A, C in D so serinske betalaktamaze, za katere je značilna aminokislina serin v aktivnem mestu encima, s pomočjo katere cepijo amidno vez, v razred B pa spadajo metalo-betalaktamaze, ki imajo v aktivnem mestu kot kofaktor kovinski ion, večinoma cink (Poole, 2011). Encimi AME prenašajo fosfatne, acetilne in adenilne skupine na amino in hidroksi substituent antibiotikov, kar zmanjša afiniteto vezave aminoglikozidov na tarčno mesto (Lambert, 2002). Glede na način modifikacije aminoglikozidov encime delimo v tri skupine: aminoglikozid fosforiltransferaze, ki fosforilirajo, aminoglikozid adeniltransferaze, ki adenilirajo in aminoglikozid acetiltransferaze, ki acetilirajo aminoglikozide (Poole, 2011). Zapisi za encime AME so na plazmidih in transpozonih, kar omogoča prenos odpornosti tudi med različnimi rodovi bakterij (Seme, 2002a). Za razliko od kromosomskih betalaktamaz zato spontane mutacije v celici zaradi pritiska antibiotikov ne povečajo izražanja encimov AME (Lambert, 2002).

2.4.3.4 Sprememba tarčnega mesta oz. prijemališča antibiotikov

Glavni mehanizem odpornosti, pri katerem pride do spremembe tarčnega mesta delovanja antibiotikov, je mehanizem odpornosti proti fluorokinolonom (Lambert, 2002). Fluorokinoloni vplivajo na delovanje topoizomeraz (topoizomeraze IV in DNA-giraze), ki so odgovorne za vnos in/ali odstranjevanje supernavojev in katenacijo/dekatenacijo DNA, ter tako igrajo pomembno vlogo pri podvajanju, prepisovanju, rekombinaciji in popravljanju DNA (Poole, 2011; Gaspar in sod., 2013). Obe topoizomerazi sta sestavljeni iz dveh podenot: DNA-giraza iz GyrA in GyrB, topoizomeraza IV pa iz ParC in ParE. Do mutacij običajno pride v regijah QRDR (angl. Quinolone Resistance Determining Region) na katalitičnih podenotah GyrA in/ali ParC (Poole, 2011).

Drugi primer je odpornost proti betalaktamom zaradi spremembe beljakovin, ki vežejo penicilin (angl. Penicillin-Binding Protein – PBP), na katere se vežejo betalaktami in s tem zavirajo njihovo delovanje. PBP so encimi, odgovorni za sintezo peptidoglikana, osnovne sestavine bakterijske celične stene. Bakterije so s PBP razvile dve različici odpornosti proti betalaktamom: razvoj alternativne poti sinteze peptidoglikana z novimi PBP, ki jih betalaktami ne zavirajo (vzrok za odpornost stafilokokov proti meticilinu) in preoblikovanje že obstoječih PBP, kar zmanjšuje afiniteto vezave penicilinov (vzrok za odpornost *H. influenzae* proti aminopenicilinom) (Seme, 2002a).

2.4.3.5 Sprememba presnovne poti, na katero antibiotik deluje

Odpornost proti sulfonamidom in trimetoprimu je posledica preprečene sinteze timina v bakterijski celici (Seme, 2002a). Antibiotika zavirata sintezo folne kisline, ki je pomemben kofaktor pri sintezi bakterijskega timidina, osnovnega gradnika nukleinskih kislin. Sulfonamidi so kemijsko podobni paraaminobenzojevi kislini in tekmujejo za ista vezavna mesta na encimu dehidropteroat sintetazi (DHPS), ki je pomemben pri sintezi dihidrofolne kisline, medtem ko trimetoprim zavira encim dihidrofolat reduktazo (DHFR) in s tem preprečuje sintezo tetrahidrofolne kisline (Kotnik, 2002). Pridobljena bakterijska odpornost proti sulfonamidom oz. trimetoprimu je lahko posledica kromosomskih mutacij, kar povzroči zmanjšano afiniteto encimov DHPS oz. DHFR do antibiotikov, ali pridobitve plazmidnega gena, ki kodira encim DHPS oz. DHFR, odporen proti omenjenim antibiotikom (Seme, 2002a).

2.4.3.6 Biofilmi

Bakterije, ki povzročajo okužbe dihal pri bolnikih s CF, imajo pogosto sposobnost tvorbe biofilmov. Biofilmi so agregati bakterij, pritrjeni na površino in obdani z matriksom iz polisaharidov, proteinov in DNA (Poole, 2011). Pomembna lastnost vseh biofilmov je njihova odpornost in posledično je okužbe, ki jih povzročajo bakterije, sposobne tvorbe

biofilmov, zelo težko izkoreniniti (Lambert, 2002). Bakterije, ki tvorijo biofilm, so bolj odporne proti antibiotikom v primerjavi z bakterijami, ki rastejo v planktonski obliki. Pogosto so bakterije znotraj biofilmov večkratno odporne (Poole, 2011).

Za visoko stopnjo odpornosti bakterij znotraj biofilmov je možnih več razlogov. Biofilmski matriks deluje kot fizična pregrada, ki onemogoča prehod antibiotikov. Poleg tega se lahko negativno nabite komponente v biofilmu vežejo s pozitivno nabitimi antibiotiki (npr. aminoglikozidi) in tako preprečijo njihovo difuzijo (Sherrard in sod., 2014). V nekaterih raziskavah so potrdili, da so bakterije *P. aeruginosa* znotraj biofilmov metabolno manj aktivne in rastejo počasneje v primerjavi z bakterijami na obrobju biofilmov, kar je prav tako lahko razlog za večjo odpornost, saj antibiotiki običajno delujejo na metabolno aktivne celice. Bakterije *P. aeruginosa* lahko znotraj biofilmov rastejo anaerobno, veliko antibiotikov pa je v anaerobnih pogojih manj aktivnih ali pa so celo neaktivni (npr. aminoglikozidi) (Poole, 2011). Hipoksični pogoji naj bi pri bakterijah *P. aeruginosa* povečali izražanje aktivnih črpalk, ki posredujejo odpornost proti penicilinom in cefalosporinom (Sherrard in sod., 2014).

2.4.3.7 Hipermutatorski sevi

Hipermutatorski sevi so sevi, ki imajo visoko stopnjo spontanah mutacij (20–1.000-krat pogosteje) zaradi sprememb v eni od komponent sistema za popravljanja neujemanja v DNA (angl. Mismatch Repair – MMR). Najpogosteje je vzrok za hipermutabilnost mutacija gena *mutS* (Watson in sod., 2004; Oliver in Mena, 2010; Hauser in sod., 2011). Sistem MMR je odgovoren za popravljanje nukleotidnih neujemanj med podvajanjem DNA in predstavlja glavno oviro za medvrstne rekombinacije. Zaradi okvar sistema MMR se torej poveča frekvenca horizontalnih prenosov genov, kar je pomemben mehanizem pridobljene odpornosti pri bakterijah (Watson in sod., 2004; Lutz in sod., 2013).

Pljuča bolnikov s CF so edinstveno okolje za razvoj hipermutatorskih fenotipov bakterij, predvsem zaradi pogoste izpostavljenosti antibiotični terapiji (Watson in sod., 2004). V različnih raziskavah so potrdili, da je delež hipermutatorskih izolatov pri bolnikih s CF višji v primerjavi z bolniki, ki nimajo CF: 37–54 % proti 1 % pri izolatih *P. aeruginosa* (Hauser in sod., 2011); 14 % proti 1 % pri izolatih *S. aureus* (Prunier in sod., 2003) in 14,5 % proti 1,4 % pri izolatih *H. influenzae* (Román in sod., 2004). Poleg tega so ugotovili, da imajo hipermutatorski sevi višjo stopnjo odpornosti proti antibiotikom, čeprav vzročna povezava med hipermutabilnostjo in bakterijsko odpornostjo še ni povsem potrjena (Lutz in sod., 2013). Prednost hipermutatorskih sevov je, da se hitro prilagodijo na spremembe v okolju, kar je v pljučih bolnikov s CF zelo pomembno (Watson in sod., 2004). Poleg tega naj bi imeli hipermutatorski sevi pomembno vlogo pri virulenci, genskih adaptacijah, perzistentni kolonizaciji in morda tudi pri upadu pljučne funkcije (Oliver in Mena, 2010).

2.4.4 Odpornost bakterije *S. aureus*

Bakterija *S. aureus* povzroča širok spekter bolezni, od blagih okužb kože do septicemije. Uspešnost zdravljenja okužb z antibiotiki ovira razvoj različnih mehanizmov odpornosti bakterije proti antibiotikom (Howden in sod., 2014). Prvi sevi *S. aureus*, odporni proti penicilinu, so se pojavili kmalu po letu 1940 z uvedbo penicilina v klinično prakso. Do leta 1960 je bilo že 80 % izolatov *S. aureus* odpornih proti penicilinu. (Lowy, 2003; Goss in sod., 2011). Odpornost posredujejo betalaktamaze (imenovane tudi penicilinaze), ki hidrolizirajo peptidno vez betalaktamskega obroča antibiotika in s tem onemogočijo vezavo betalaktamov na tarčno mesto – beljakovino, ki veže penicilin (PBP) (Reygaert, 2013). Zapis za betalaktamaze kodira gen *blaZ*, ki ga najdemo na plazmidu poleg drugih genov za odpornost (npr. za odpornost proti gentamicinu in eritomicinu) (Lowy, 2003).

Glede na stopnjo odpornosti proti vankomicinu, ločimo dve skupini sevov: seve *S. aureus*, zmerno občutljive za vankomicin (angl. Vancomycin-Intermediate *S. aureus* – VISA), in seve *S. aureus*, odporne proti vankomicinu (angl. Vancomycin-Resistant *S. aureus* – VRSA) (Reygaert, 2013). Zmanjšana občutljivost sevov VISA je posledica sprememb v biosintezi peptidoglikana in s tem razvoja debelejšje celične stene, ki ovira dostop vankomicina do tarčnega mesta v celični membrani (Gilligan, 2014; Howden in sod., 2014; Lowy, 2003). Odpornost sevov VRSA pa je posledica pridobitve gena *vanA* iz enterokokov, zaradi katerega pride do spremembe tarčnega mesta za vankomicin, na katerega se vankomicin ne more vezati (Reygaert, 2013). Seve VISA so prvič izolirali leta 1997 na Japonskem, v letu 2002 pa so v ZDA odkrili seve VRSA (Howden in sod., 2014).

Odpornost bakterij *S. aureus* proti aminoglikozidom so opazili že v 1960. letih. Za odpornost proti aminoglikozidom (gentamicin, tobramicin) so odgovorni aminoglikozid-modificirajoči encimi, ki kemijsko spremenijo antibiotik in s tem zmanjšajo sposobnost vezave na tarčno mesto (30S ribosomska podenota). Odpornost proti tetraciklinom posredujejo dva mehanizma: aktivno izčrpavanje antibiotika z izlivnimi črpalkami (gen *tetK*) in kompetitivna vezava ribosom-varovalne beljakovine (gen *tetM*), na 30S podenoto, kar onemogoči vezavo antibiotika. Tako odpornost proti aminoglikozidom kot tudi odpornost proti tetraciklinom je pridobljena s plazmidi (Reygaert, 2013).

Odpornost proti linkozamidom (klindamicinu) in makrolidom (eritromicinu) je posledica metilacije in s tem konformacijske spremembe 50S ribosomske podenote, kar zmanjša sposobnost vezave antibiotikov (Reygaert, 2013). Odpornost proti fluorokinolonom (ciprofloksacinu) omogočajo spontane mutacije tarčnega mesta antibiotikov, podenote giraze (gen *gyrA*) ali podenote topoizomerase IV (gen *grlA*) in izlivne črpalke (gen *norA*) (Lowy, 2003).

Izolati *S. aureus* so odporni tudi proti trimetoprimu s sulfametoksazolom. Razlog je mutacija genov, ki sodeluje v biosintezi folata (Lowy, 2003). Poleg tega so proti trimetoprimu s sulfametoksazolom odporni tudi sevi fenotipa SCVs, saj lahko uporabljajo timidin iz okolja (Gilligan, 2014).

2.4.4.1 *S. aureus*, odporen proti meticilinu – MRSA

Kmalu po uvedbi zdravljenja z meticilinom so leta 1961 v Veliki Britaniji odkrili prvi sev MRSA. Sprva so bili sevi poznani kot bolnišnični patogeni, v zadnjih letih pa so vse pogostejši tudi v domačem okolju (Lowy, 2003). Na nekaterih področjih je več kot 60 % izolatov *S. aureus* odpornih proti meticilinu (Reygaert, 2013). Za odpornost sevov MRSA je odgovoren gen *mecA*, ki je del genskega elementa, imenovanega stafilokokna kromosomska kaseta (angl. Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* – SCC*mec*). Gen *mecA* ima zapis za dodatno beljakovino PBP2a z zmanjšano afiniteto za meticilin in druge betalaktamske antibiotike, vključno s cefalosporini, ki stafilokokom ob prisotnosti betalaktamov omogoča preživetje (Lowy, 2003; Reygaert, 2013). Izvor gena *mecA* ni popolnoma znan, vendar predvidevajo, da izhaja iz koagulaza negativnih stafilokokov, saj med sevi MSSA niso našli homolognega gena (Lowy, 2003).

Sevi MRSA so poleg meticilina odporni tudi proti vsem drugim betalaktamskim antibiotikom, vključno s cefalosporini in karbapenemi. Poleg tega lahko sevi MRSA spontano in povsem neodvisno od enterokoknih genov postopoma razvijejo odpornost proti glikopeptidom. Širjenje sevov MRSA, odpornih proti glikopeptidom, je zaskrbljujoče, saj bi jih z antibiotiki, ki so trenutno na voljo, težko obvladali (Seme, 2002a). V zadnjih letih so v različnih evropskih državah tako pri ljudeh kot tudi pri živalih odkrili seve MRSA, pri katerih je odpornost kodirana z nekoliko drugačnim genom *mec*, ki so ga poimenovali *mecC* (Paterson in sod., 2014).

2.4.5 Odpornost bakterije *H. influenzae*

Pri bakteriji *H. influenzae* je poznanih je več mehanizmov odpornosti proti antibiotikom (Kostyanov in Sechanova, 2012). Bakterije so odporne proti različnim antibiotikom, ki se uporabljajo za zdravljenje okužb dihal: makrolidom, tetraciklinom, fluorokinolonom in trimetoprimu s sulfametoksazolom. Največjo težavo predstavlja naraščanje pojavnosti odpornosti proti aminopenicilinom (Kostyanov in Sechanova, 2012). K višji stopnji odpornosti prispevata tudi sposobnost tvorbe biofilmov in pojav hipermutatorskih sevov (Starner in sod., 2006; Hauser in sod., 2011).

Največ bakterij *H. influenzae* je odpornih proti betalaktamskim antibiotikom. Prvi sevi, odporni proti ampicilinu, so se pojavili že v 1970. letih. Odpornost izolatov *H. influenzae*

proti betalaktamom je v kar 30 % primerov posledica produkcije dveh betalaktamaz TEM-1 in ROB-1 (Tristram in sod., 2007). Obe betalaktamazi sodita v razred A med serinske betalaktamaze (Gilsdorf, 2015). Ti sevi se imenujejo betalaktamaza pozitivni sevi, odporni proti ampicilinu (angl. Beta-Lactamase Positive Ampicillin-Resistant – BLPAR). Drugi mehanizem odpornosti proti betalaktamom je sprememba (zamenjava aminokislin) tarčne beljakovine na bakteriji, in sicer transpeptidaze PBP3, odgovorne za sintezo peptidoglikana, kar zmanjša afiniteto vezave za peniciline kot tudi za nekatere cefalosporine (npr. cefaklor). Ti sevi se imenujejo betalaktamaza negativni sevi, odporni proti ampicilinu (angl. Beta-Lactamase Negative Ampicillin-Resistant – BLNAR). Zelo majhen delež sevov *H. influenzae* ima oba mehanizma odpornosti, opisana zgoraj. Ti sevi so betalaktamaza pozitivni sevi, odporni proti amoksicilinu in klavulanski kislini (angl. Beta-Lactamase Positive Amoxicillin-Clavunate-Resistant – BLPACR) (Tristram in sod., 2007).

Pridobljena odpornost bakterij proti makrolidom (azitromicinu in eritromicinu) je posledica aktivnega črpanja makrolidov iz celice (gen *mefA*, ki kodira izlivno črpalko) ali spremembe njihovega tarčnega mesta zaradi metilacije ribosomov (geni *erm* za encime, ki metilirajo adeninske ostanke v podenoti rRNA 23S), mutacije genov L4 in L22, ki kodirajo ribosomske proteine ali mutacije genov z zapisom za 23S rRNA. Geni za odpornost proti makrolidom (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *ermF* in *mefA*) so na mobilnih elementih in zato jih sevi *H. influenzae* lahko pridobijo od drugih bakterij s horizontalnimi prenosi (Kostyanov in Sechanova, 2012; Roberts in sod., 2011; Seme, 2002a). Prav tako je odpornost proti tetraciklinom posledica aktivnega izčrpavanja antibiotika iz celice s posebnimi črpalkami, ki jih kodirajo geni, pridobljeni z genskim prenosom. Zapis za izlivno črpalko pri bakterijah *H. influenzae* nosi gen *tetB*, ki je običajno na konjugativnem plazmidu (Kostyanov in Sechanova, 2012; Tristram in sod., 2007).

Pogosta je tudi odpornost proti trimetoprimu s sulfametoksazolom. Odpornost sevov *H. influenzae* proti sulfametoksazolu je posledica mutacije gena *dhps* z zapisom za encim DHPS, kar zmanjša vezavo sulfametoksazola na ta encim in hkrati omogoči vezavo 4-aminobenzojske kisline ter njeno pretvorbo v dihidrofolat, medtem ko je odpornost proti trimetoprimu posledica povečane sinteze mutirane DHFR (katalizira pretvorbo dihidrofolata v tetrahidrofolat) z zmanjšano afiniteto za trimetoprim (Kostyanov in Sechanova, 2012; Reygaert, 2013). Odpornost sevov *H. influenzae* proti fluorokinolonom je redka. Nastane zaradi mutacij genov z zapisom za DNA-girazo in topoizomerozo IV (Kostyanov in Sechanova, 2012).

2.4.6 Odpornost bakterije *P. aeruginosa*

Bakterije *P. aeruginosa* imajo prirojeno in pridobljeno odpornost proti antibiotikom, ki jim omogoča, da kljub antibiotičnemu zdravljenju in mehanizmu obrambe gostitelja lahko preživijo v pljučih bolnikov s CF več let (Gaspar in sod., 2013). Naravno odpornost omogočajo kromosomske betalaktamaze in zmanjšana prepustnost celične membrane, medtem ko je pridobljena odpornost posledica kromosomskih mutacij ali prenosa genov za odpornost z drugih bakterij preko plazmidov, transpozonov, integronov in bakteriofagov (Poole, 2011; Mesquita in sod., 2013). Bakterije *P. aeruginosa* pogosto kot odziv na antibiotike kombinirajo različne mehanizme odpornosti. Kombinacije teh mehanizmov skupaj s pridobljenimi geni za odpornost vodijo v razvoj večkratno odpornih sevov (Gaspar in sod., 2013, Mesquita in sod., 2013). Pri bolnikih s CF kronične okužbe dihal povzročajo sevi *P. aeruginosa* sluznega fenotipa, ki imajo sposobnost tvorbe biofilmov, za katere je značilna visoka stopnja odpornosti (Gaspar in sod., 2013). Pojavljajo se tudi hipermutatorski sevi, predvsem pri bolnikih s kronično okužbo (Livermore, 2002; Poole, 2011).

Betalaktami se pogosto uporabljajo za zdravljenje okužb z bakterijo *P. aeruginosa*, zato ni presenetljivo, da odpornost proti tem antibiotikom narašča (Poole, 2011). Odpornost je posledica različnih mehanizmov: zmanjšane prepustnosti membrane, aktivnega izčrpavanja in hidrolize z betalaktamazami (Gaspar in sod., 2013). Slabša prepustnost zunanje membrane zaradi izgube porina OprD, ki tvori transmembranski kanalček, je razlog za odpornost proti karbapenemom (Livermore, 2002). *P. aeruginosa* ima 12 izlivnih črpalk, med katerimi so za 3 tipe (MexAB-OprM, MexCD-OprJ in MexXY-OprM) dokazali, da aktivno izčrpavajo betalaktame iz celice in tako omogočajo odpornost proti tem antibiotikom (Poole, 2011).

Bakterije *P. aeruginosa* so naravno odporne proti nekaterim betalaktamom. Odpornost posreduje kromosomski betalaktamazi: cefalosporinaza razreda C (AmpC), ki je odgovorna za odpornost proti betalaktamom pri kliničnih izolatih, in oksacilinaza razreda D (PoxB), za katero so zaenkrat opazili, da je bila izražena samo pri laboratorijskih mutantih *ampC* (Mesquita in sod., 2013). Nizke koncentracije inducibilne betalaktamaze AmpC omogočajo naravno odpornost proti ozkospektralnemu cefalosporinu in aminopenicilinu. Mutacije v represorski regiji gena *ampC* (*ampR*) in posledično povečano izražanje tega encima lahko vodi do odpornosti proti vsem betalaktamskim antibiotikom razen karbapenemom (Poole, 2011). Poleg endogene betalaktamaze nekateri sevi *P. aeruginosa* s horizontalnimi prenosi pridobijo plazmide ali transpozone z zapisi za betalaktamaze (Gaspar in sod., 2013). Prvotno so pri bakterijah *P. aeruginosa* našli betalaktamaze razreda A z omejenim spektrom aktivnosti, nedavno pa so opisali pridobljene betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja (angl. Extended-Spectrum Beta-Lactamase – ESBL), ki lahko hidrolizirajo tudi monobaktame, širokospektralne

cefalosporine in betalaktame v kombinaciji z inhibitorji (npr. piperacilin s tazobaktamom) ter karbapenemaze (serinske in metalo-betalaktamaze), ki hidrolizirajo večino betalaktamov, vključno s karbapenemi, ne pa aztreonama (Lambert, 2002; Poole, 2011).

Okužbe dihal z bakterijo *P. aeruginosa* pri bolnikih s CF pogosto zdravimo z različnimi aminoglikozidi, kot so tobramicin, gentamicin in amikacin (Poole, 2011). Bakterije se na večletno zdravljenje z antibiotiki prilagodijo z razvojem odpornosti, ki je večinoma posledica kromosomskih sprememb, redkeje pridobitve genskih elementov (npr. plazmidov) s horizontalnimi prenosi (Islam in sod., 2009). Odpornost proti aminoglikozidom je pogosto povezana z zmanjšanim kopičenjem antibiotika. Sprva so menili, da je vzrok za to zmanjšana prepustnost celične membrane, zato so jo imenovali »neprepustnostna odpornost« (angl. impermeability resistance). Kasneje so v različnih raziskavah potrdili, da je ta odpornost posledica izčrpavanja antibiotika s sistemom MexXY-OprM. Sistem MexXY-OprM kodira operon *mexXY*, njegovo izražanje pa je pod nadzorom represorja MexZ. Mutacije gena *mexZ* in posledično povečana ekspresija *mexXY* je najpogostejši mehanizem odpornosti proti aminoglikozidom pri kliničnih izolatih *P. aeruginosa* bolnikov s CF (Islam in sod., 2009; Poole, 2011). Poleg aktivnega izčrpavanja z izlivnimi črpalkami odpornost omogočajo tudi aminoglikozid-modificirajoči encimi. Encimi AME se nahajajo na mobilnih genskih elementih, ki nosijo zapise za druge gene za odpornost (npr. betalaktamaze, kloramfenikol acetiltransferaze), zato so proti aminoglikozidom odporni izolati običajno odporni še proti drugim skupinam antibiotikov. Nedavno so opisali odpornost, posredovano z metilazami 16S rRNA, ki metilirajo vezavna mesta aminoglikozidov, ribosomske podenote 30S na 16S rRNA, kar zmanjša afiniteto vezave antibiotika (Mesquita in sod., 2013).

Za zdravljenje okužb z bakterijami *P. aeruginosa* se med fluorokinoloni najpogosteje uporablja ciprofloksacin (Poole, 2011). Odpornost proti tem antibiotikom je v glavnem posledica mutacije v podenotah DNA-giraze in topoizomeraze IV, pomemben prispevek pa ima tudi aktivno izčrpavanje antibiotika, pogosto v kombinaciji z mutacijami tarčnega mesta (Gaspar in sod., 2013; Mesquita in sod., 2013). Preferenčna tarča fluorokinolonov pri *P. aeruginosa* in drugih po Gramu negativnih bakterijah je DNA-giraza, medtem ko so pri sevih z visoko odpornostjo opazili tudi dodatne mutacije v topoizomerazi IV. *P. aeruginosa* ima štiri sisteme izlivnih črpalk MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN in MexX-OprM, ki bodisi vplivajo na zmanjšanje občutljivosti ali pa so odgovorni za odpornost proti fluorokinolonom (Poole, 2011).

2.5 DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI ZA ANTIBIOTIKE

Antibiotike uporabljamo za zdravljenje bolezni, ki jih povzročajo bakterije. Zdravljenje je lahko izkustveno ali racionalno. Pri racionalnem zdravljenju zdravnik pred uvedbo antibiotika bolniku z značilnega mesta odvzame vzorec kužnine in ga pošlje v mikrobiološki laboratorij, kjer določijo povzročitelja in njegovo občutljivost za antibiotike. Na ta način zdravnik dobi podatek, kateri antibiotik je najučinkovitejši *in vitro*, kar je pomembno za uspešno zdravljenje (Kotnik, 2002). Poleg zagotovitve občutljivosti patogena za izbran antibiotik lahko z metodami za določanje občutljivosti odkrijemo morebitne odpornosti bakterijskih izolatov proti antibiotikom (Jorgensen in Ferraro, 2009). Spremljanje odpornosti in racionalno zdravljenje pa sta v današnjih časih, ko se soočamo z naraščanjem odpornosti bakterij, ključnega pomena za preprečevanje pojava in širjenja odpornih sevov (Seme, 2002a).

Za določanje občutljivosti oz. odpornosti bakterij se uporabljajo različne laboratorijske metode: fenotipske (na ravni lastnosti bakterij) in genotipske (na ravni genov). S fenotipskimi metodami občutljivost določamo tako, da opazujemo rast bakterij ob prisotnosti antibiotikov (npr. antibiogram), medtem ko pri genotipskih določamo prisotnost genov za odpornost (npr. masna spektrometrija, verižna reakcija s polimerazo). Pri fenotipskih metodah je potrebna osamitev bakterije iz vzorca kužnine v čisti kulturi in inkubacija, kar pomeni, da lahko mine med 24 in 72 ur, preden dobimo rezultat. Zaradi omenjene slabosti se v zadnjih letih razvijajo nove genotipske metode za hitro določanje odpornosti bakterijskih patogenov, s katerimi bi skrajšali čas empiričnega zdravljenja in posledično tudi izboljšali izid bolezni. Kljub temu zlati standard v rutinskih medicinskih mikrobioloških laboratorijih ostajajo fenotipske metode: mikrodilucija, metoda difuzijskega gradienta, difuzijska metoda z diski in različni komercialno dostopni avtomatizirani sistemi (npr. sistem Vitek), ki so izpeljani iz standardnih mikrodilucijskih metod (Pulido in sod., 2013; Štrumbelj in sod., 2016). Glavna prednost omenjenih metod, poleg visoke občutljivosti, je njihova standardizacija – enotne mednarodne smernice za določanje protimikrobne občutljivosti (Pulido in sod., 2013).

Metode so lahko kvalitativne (npr. difuzijska metoda z diski) ali kvantitativne (npr. dilucijske metode, E-test). S kvalitativnimi metodami lahko določimo le stopnjo občutljivosti izolata (občutljiv, zmerno občutljiv ali odporen), medtem ko s kvantitativnimi metodami določimo minimalno inhibitorno koncentracijo, to je najnižjo koncentracijo antibiotika, ki še zavira rast mikroorganizma (Jorgensen in Ferraro, 2009).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 METODE

3.1.1 Zbiranje podatkov

V raziskavo smo vključili 83 slovenskih otrok s CF, ki jih vodijo v Centru za cistično fibrozo na Pediatrični kliniki Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. S pomočjo laboratorijskega računalniškega programa MBL (Infonet, Kranj) smo retrospektivno zajeli vse bakterijske izolate, ki so bili na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani (IMI MF UL) osamljeni iz vzorcev dihal otrok s CF med 1. 1. 2009 in 31. 12. 2014. Zbrali smo podatke o občutljivosti najpogostejših vrst (*H. influenzae*, *S. aureus* in *P. aeruginosa*) in primerjali deleže občutljivosti po letih.

Pri vseh izolatih je bila občutljivost za antibiotike določena z uporabo difuzijskega antibiograma z diski. Pri tem so upoštevali ameriška merila Inštituta za klinične in laboratorijske standarde (angl. Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI), od 1. 4. 2014 naprej pa smernice Evropskega odbora za testiranje protimikrobne občutljivosti (angl. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST). Kategorije po CLSI in EUCAST so: občutljiv (angl. Susceptible– S), zmerno občutljiv (angl. Intermediate – I) in odporen (angl. Resistant – R) (Štrumbelj in sod., 2016).

3.1.2 Analiza podatkov

Bakterijske izolate smo analizirali glede na leto osamitve. Pri izračunih smo upoštevali samo izolate, osamljene iz vzorcev dihal (sputum, bris nosu, bris žrela, aspirat žrela, aspirat traheje, aspirat nosu) in samo prve izolate posamezne bakterijske vrste pri eni osebi. Najprej smo ugotovili število posameznih izolatov in tako določili najpogostejše izolate, osamljene iz dihal otrok s CF. Nato smo ločeno analizirali občutljivost posamezne bakterijske vrste (*H. influenzae*, *S. aureus* in *P. aeruginosa*) za antibiotike glede na leto osamitve (2009–2014). V primerih, ko smo imeli v istem vzorcu dva ali več izolatov ene bakterijske vrste z različnim antibiogramom, smo upoštevali vse izolate z različnim antibiogramom, sicer smo upoštevali samo enega. Kategoriji odpornosti I in R smo združili v kategorijo R. Pri izolatih *P. aeruginosa* smo primerjali občutljivost med različnima fenotipoma in pregledali, ali se odpornost proti antibiotikom pri posameznih otrocih s CF spreminja. Določili smo tudi delež izolatov MRSA ter stopnjo odpornosti in deleže večkratno odpornih izolatov.

3.1.3 Statistična analiza

Razlike v občutljivosti za določene antibiotike med posameznimi skupinami izolatov smo statistično ovrednotili s preizkusom χ^2 na kontingenčnih tabelah.

Pri preizkusu χ^2 na osnovi zbranih podatkov preverjamo domnevo o verjetnostni porazdelitvi. Mero ujemanja dejanskih in pričakovanih frekvenc imenujemo Pearsonova χ^2 -statistika:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(f_i - f'_i)^2}{f'_i} \quad \dots (1)$$

Če je ničelna domneva pravilna, je Pearsonova χ^2 -statistika (pri stopnji značilnosti α) porazdeljena približno po χ^2 -porazdelitvi s $k - 1$ stopinjami prostosti (SP). Torej velja:

$$\chi^2 \leq \chi^2_{\alpha} \text{ (SP = } k - 1 \text{)} \rightarrow \text{ničelno domnevo obdržimo,} \quad \dots (2)$$

$$\chi^2 > \chi^2_{\alpha} \text{ (SP = } k - 1 \text{)} \rightarrow \text{ničelno domnevo zavrnamo.} \quad \dots (3)$$

Rezultat potrdimo s p -vrednostjo, ki predstavlja verjetnost, da ob predpostavki pravilnosti ničelne domneve za testno statistiko dobimo vrednosti, ki so bolj v korist alternativne domneve kot izračunane vrednosti testne statistike. Stopnja značilnosti α je zgornja meja tveganja (Košmelj, 2007). p -vrednost izraža, v kolikšni meri so vzorčni podatki v skladu z ničelno domnevo:

$$p\text{-vrednost} < \alpha \rightarrow \text{podatki so statistično značilni,}$$

$$p\text{-vrednost} \geq \alpha \rightarrow \text{podatki niso statistično značilni.}$$

Podatke smo računalniško analizirali s programom Excel iz zbirke Microsoft Office 2010. Za statistično analizo smo uporabili JavaStat. Za stopnjo značilnosti α smo si izbrali 0,05.

4 REZULTATI

4.1 BOLNIKI S CISTIČNO FIBROZO

V raziskavo smo vključili 83 otrok (42 dečkov in 41 deklic) s CF iz Centra za cistično fibrozo na Pediatrični kliniki UKC Ljubljana, kjer vodijo vse slovenske otroke s CF. V celotnem šestletnem obdobju smo spremljali 46 (55,4 %) otrok s CF. V povprečju je bilo na leto 62 otrok. Leta 2009 jih je bilo 57, leta 2014 pa že 72.

Letno smo iz dihal otrok s CF na IMI MF UL osamili od 409 do 504 bakterijske izolate oz. od 153 do 206 prvih bakterijskih izolatov. Podrobnejši podatki o številu otrok s CF in njihovih bakterijskih izolatih v posameznem letu so prikazani v preglednici 2. Pri posameznem otroku smo v povprečju osamili tri prve izolate na leto. Povprečna starost otrok ob prvi vključitvi v raziskavo je bila med 9,6 in 11,3 leta. Najmlajši otrok je bil star manj kot en mesec, najstarejši pa 22,4 leta.

Preglednica 2: Število otrok s CF, število vseh bakterijskih izolatov, število prvih bakterijskih izolatov, povprečno število prvih izolatov na otroka s CF na leto in povprečna starost otrok s CF ob prvi vključitvi v raziskavo za obdobje 2009–2014.

Leto	Število otrok s CF	Število vseh bakterijskih izolatov	Število prvih bakterijskih izolatov	Povprečno število prvih izolatov/otroka s CF/leto	Povprečna starost otrok s CF (leta)
2009	57	409	153	2,7	9,8
2010	63	487	197	3,1	9,6
2011	58	472	172	3,0	9,8
2012	60	504	176	2,9	10,7
2013	63	468	169	2,7	11,3
2014	72	496	206	2,9	10,4
2009–2014	373	2836	1073		

4.2 NAJPOGOSTEJŠI BAKTERIJSKI IZOLATI

Najprej smo izračunali število in delež prvih izolatov, osamljenih iz dihal otrok s CF, v celotnem obdobju 2009–2014, nato pa za vsako leto posebej. Pri izračunu smo upoštevali samo prve izolate posamezne bakterijske vrste, osamljene iz dihal otrok s CF, neodvisno od vrste kužnine v tekočem letu.

V letih 2009–2014 smo iz dihal otrok s CF osamili 62 različnih patogenih vrst bakterij. Najpogostejši bakterijski izolati so bili *S. aureus* (326 izolatov), *H. influenzae* (134 izolatov) in *P. aeruginosa* (116 izolatov). Poleg teh velja omeniti še vrsti *Stenotrophomonas maltophilia* (75 izolatov) in *Streptococcus pneumoniae* (57 izolatov). Deleži ostalih bakterijskih vrst so bili nižji od 5 %. Seznam vseh prvih bakterijskih izolatov je prikazan v prilogi A.

Delež izolatov *S. aureus* je bil 30,4 %, kar je skoraj tretjina vseh bakterijskih izolatov. Delež izolatov *H. influenzae* je bil 12,5 %, delež izolatov *P. aeruginosa* pa 10,8 %. V skupnem so vrste *S. aureus*, *H. influenzae* in *P. aeruginosa* predstavljale več kot polovico (53,7 %) vseh bakterijskih izolatov. Podrobnejši podatki so prikazani v preglednici 3.

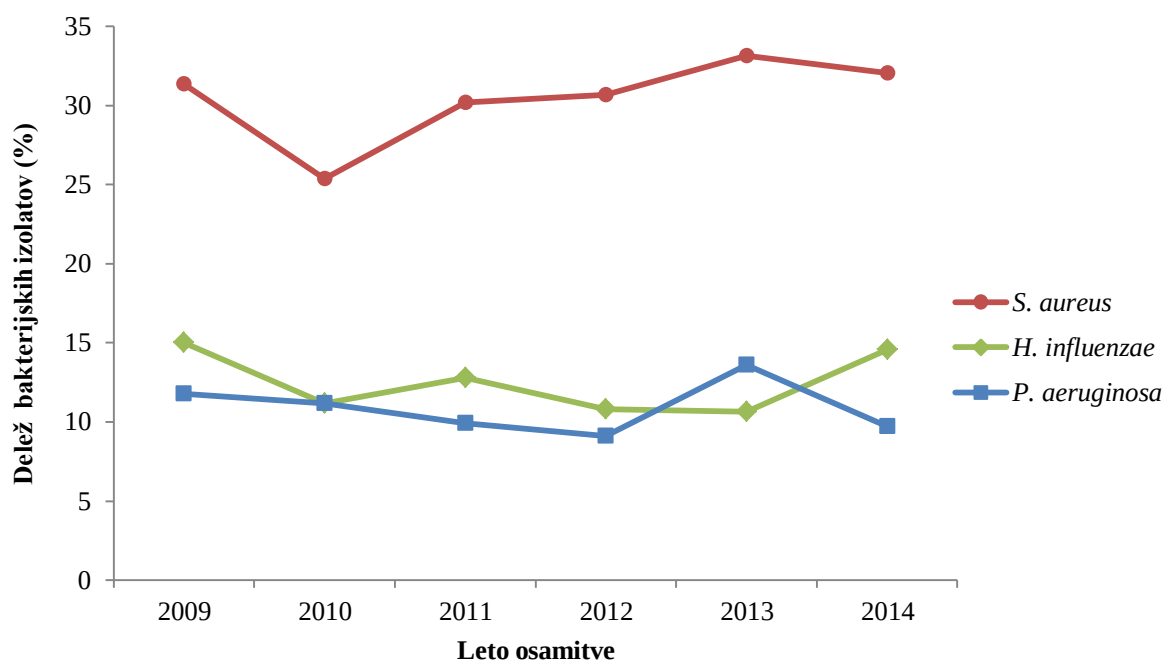
Preglednica 3: Število in delež (%) najpogostejših prvih izolatov, osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.

Izolat	Število izolatov	Delež (%) izolatov
<i>S. aureus</i>	326	30,4
<i>H. influenzae</i>	134	12,5
<i>P. aeruginosa</i>	116	10,8
<i>S. maltophilia</i>	75	7,0
<i>S. pneumoniae</i>	57	5,3
druge bakterijske vrste	365	34,0
SKUPAJ	1073	100

V preglednici 4 so zbrani podatki o številu in deležu (%) prvih izolatov glede na leto osamitve. Na sliki 4 so podatki predstavljeni še grafično. V vseh letih je bil največji delež izolatov *S. aureus* in je predstavljal približno tretjino vseh bakterijskih izolatov. V letu 2010 je delež izolatov *S. aureus* upadel (25,4 %) na račun povečanja deleža drugih bakterijskih vrst. Deleža izolatov *H. influenzae* in *P. aeruginosa* sta bila v celotnem obdobju podobna (od 9,1 % do 15,0 %). Vsa leta (z izjemo leta 2013) je bil delež izolatov *H. influenzae* nekoliko višji kot delež izolatov *P. aeruginosa*, medtem ko sta bila leta 2010 deleža osamljenih izolatov *H. influenzae* in *P. aeruginosa* enaka.

Preglednica 4: Število in delež (%) prvih izolatov *S. aureus*, *H. influenzae* in *P. aeruginosa*, osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.

Leto	Število in delež (%) izolatov <i>S. aureus</i>	Število in delež (%) izolatov <i>H. influenzae</i>	Število in delež (%) izolatov <i>P. aeruginosa</i>
2009	48 (31,4)	23 (15,0)	18 (11,8)
2010	50 (25,4)	22 (11,2)	22 (11,2)
2011	52 (30,2)	22 (12,8)	17 (9,9)
2012	54 (30,7)	19 (10,8)	16 (9,1)
2013	56 (33,1)	18 (10,7)	23 (13,6)
2014	66 (32,0)	30 (14,6)	20 (9,7)



Slika 4: Delež (%) prvih izolatov *S. aureus*, *H. influenzae* in *P. aeruginosa*, osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.

Izolate *P. aeruginosa* smo ločili glede na fenotip: sluzni in ne-sluzni. Pri nekaterih otrocih s CF smo v posameznem letu osamili oba fenotipa, medtem ko so bili nekateri kolonizirani samo s sluznim in drugi samo z ne-sluznim fenotipom *P. aeruginosa*. V preglednici 5 so zbrani podatki o številu in deležu (%) prvih izolatov *P. aeruginosa* obeh fenotipov. Delež izolatov ne-sluznega fenotipa je med šestletnima obdobjem nekoliko upadal (z 9,4 % v letu 2009 na 7,3 % leta 2014). Izjema je leto 2013, ko je bil delež izolatov 12,6 %. Podobno je tudi pri izolatih sluznega fenotipa, kjer se je delež zmanjšal s 6,3 % v letu 2009 na 2,9 % v letu 2014.

Preglednica 5: Število in delež (%) prvih izolatov *P. aeruginosa* ne-sluznega in *P. aeruginosa* sluznega fenotipa, osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.

Leto	Število in delež (%) izolatov <i>P. aeruginosa</i> ne-sluznega fenotipa	Število in delež (%) izolatov <i>P. aeruginosa</i> sluznega fenotipa
2009	15 (9,4)	10 (6,3)
2010	19 (9,4)	8 (4,0)
2011	15 (8,5)	7 (4,0)
2012	14 (7,7)	7 (3,9)
2013	22 (12,6)	7 (4,0)
2014	15 (7,3)	6 (2,9)

Izračunali smo tudi povprečno starost otrok s CF ob prvi osamitvi posamezne bakterijske vrste v opazovanem obdobju. Podatki so zbrani v preglednici 6. Otroci s CF, pri katerih smo osamili izolate *S. aureus* in *H. influenzae*, so bili v povprečju stari 8,6 leta, medtem ko je bila povprečna starost otrok s CF ob prvi osamitvi izolatov *P. aeruginosa* ne-sluznega fenotipa 10,9 leta. Najstarejši so bili otroci s CF, pri katerih smo osamili izolate *P. aeruginosa* sluznega fenotipa, in sicer je povprečna starost znašala 13,3 leta.

Preglednica 6: Povprečna starost otrok s CF ob prvi osamitvi posamezne bakterijske vrste v letih 2009–2014 na IMI MF UL.

Bakterijska vrsta	Povprečna starost otrok s CF ob prvi osamitvi bakterije (leta)
<i>S. aureus</i>	8,6
<i>H. influenzae</i>	8,6
<i>P. aeruginosa</i> (oba fenotipa)	10,8
<i>P. aeruginosa</i> (ne-sluzni fenotip)	10,9
<i>P. aeruginosa</i> (sluzni fenotip)	13,3

4.3 DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI IZOLATOV *S. aureus*

Bakterijo *S. aureus* smo v letih 2009–2014 osamili kar pri 78 (94,0 %) otrocih s CF. V povprečju smo letno testirali približno 57 izolatov *S. aureus*. Leta 2009 smo imeli 48 izolatov, leta 2014 jih je bilo že 66. Podatki o številu testiranih izolatov ter številu in deležu (%) izolatov *S. aureus*, občutljivih za posamezen antibiotik, v letih 2009–2014 so zbrani v preglednici 7. Grafično so podatki prikazani na sliki 5. V prilogi B so podani izračuni Pearsonove χ^2 -statistike in p -vrednosti.

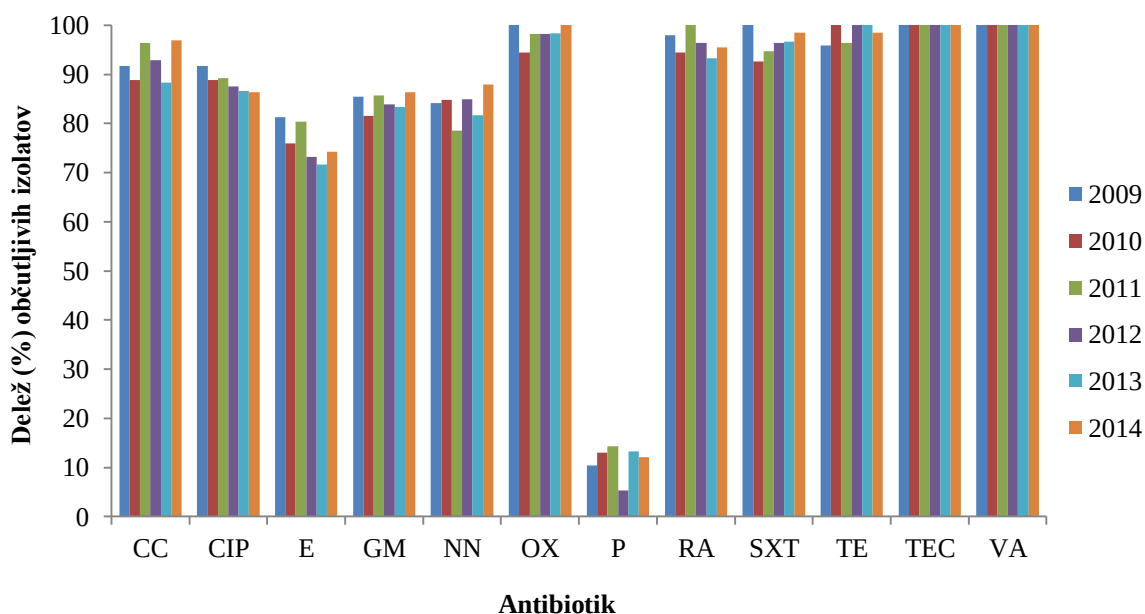
Vsi testirani izolati v šestletnem obdobju so bili občutljivi za teikoplanin in vankomicin. Največ izolatov je bilo odpornih proti penicilinu. V vseh letih je bil delež proti penicilinu odpornih izolatov višji od 85 %, v letu 2012 celo višji od 94 % (osamili smo samo tri za penicilin občutljive izolate). Občutljivost za oksacilin, rifampin, trimetoprim s sulfametoksazolom in tetraciklin je bila v celotnem obdobju testiranja višja od 90 %. Med posameznimi leti ni bilo statistično značilnih razlik v občutljivosti.

Delež za ciprofloksacin občutljivih izolatov je z 91,7 % v letu 2009 v obdobju raziskave padel na 86,4 % v letu 2014. Občutljivost za testirane aminoglikozide je bila v povprečju 84,0 %. Delež za gentamicin občutljivih izolatov je ostajal konstanten, medtem ko je bil delež za tobramicin občutljivih izolatov v letih 2009, 2010 in 2012 približno 85 %, leta 2011 se je zmanjšal na 78,6 %, v letu 2014 pa se je delež povečal na 87,9 %. Občutljivost izolatov za klindamicin in eritromicin se je z leti spreminjala. Delež za klindamicin občutljivih izolatov je iz 91,7 % v letu 2009 narastel na 97,0 % v letu 2014. Delež za eritromicin občutljivih izolatov je bil nekoliko nižji (v povprečju 76,1 %). Opazen je rahel trend naraščanja odpornosti. Leta 2009 smo osamili 18,7 % izolatov, odpornih proti eritromicinu, v letu 2014 pa že 25,8 %, vendar razlike v občutljivosti statistično niso pomembne ($p > 0,05$).

Preglednica 7: Število in delež (%) za posamezne antibiotike občutljivih izolatov *S. aureus* glede na leto osamitve iz dihal otrok s CF na IMI MF UL.

		Število in delež (%) občutljivih izolatov glede na skupno število testiranih v posameznih letih					
Leto osamitve		2009	2010	2011	2012	2013	2014
Število testiranih izolatov		48	54	56	56	60	66
ANTIBIOTIK	Klindamicin	44 (91,7)	48 (88,9)	54 (96,4)	52 (92,9)	53 (88,3)	64 (97,0)
	Ciprofloksacin	44 (91,7)	48 (88,9)	50 (89,3)	49 (87,5)	52 (86,7)	57 (86,4)
	Eritromicin	39 (81,3)	41 (75,9)	45 (80,4)	41 (73,2)	43 (71,7)	49 (74,2)
	Gentamicin	41 (85,4)	44 (81,5)	48 (85,7)	47 (83,9)	50 (83,3)	57 (86,4)
	Tobramicin	37 (84,1)*	39 (84,8)*	44 (78,6*)	45 (84,9)*	49 (81,7)	58 (87,9)
	Oksacilin	48 (100)	51 (94,4)	55 (98,2)	55 (98,2)	59 (98,3)	66 (100)
	Penicilin	5 (10,4)	7 (13,0)	8 (14,3)	3 (5,4)	8 (13,3)	8 (12,1)
	Rifampin	47 (97,9)	51 (94,4)	56 (100)	54 (96,4)	56 (93,3)	63 (95,5)
	Trimetoprim/ sulfametoksazol	48 (100)	50 (92,6)	53 (94,6)	54 (96,4)	58 (96,7)	65 (98,5)
	Tetraciklin	46 (95,8)	54 (100)	54 (96,4)	56 (100)	60 (100)	65 (98,5)
	Teikoplanin	48 (100)	54 (100)	56 (100)	56 (100)	60 (100)	66 (100)
	Vankomicin	48 (100)	54 (100)	56 (100)	56 (100)	60 (100)	66 (100)

*Za antibiotik tobramicin smo leta 2009 testirali 44 izolatov, leta 2010 46, leta 2011 in 2013 pa 53 izolatov.



Slika 5: Delež (%) za posamezne antibiotike občutljivih izolatov *S. aureus*, osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.

Legenda: CC – klindamicin, CIP – ciprofloksacin, E – eritromicin, GM – gentamicin, NN – tobramicin, OX – oksacilin, P – penicilin, RA – rifampin, SXT – trimetoprim/sulfametoksazol, TE – tetraciklin, TEC – teikoplanin, VA – vankomicin.

4.3.1 Določanje občutljivosti izolatov MRSA

Izolate *S. aureus*, odporne proti meticilinu, smo osamili samo pri enem otroku s CF. Otrok je bil v vseh letih koloniziran tako z občutljivimi (sevi MSSA) kot tudi z odpornimi sevi *S. aureus* (sevi MRSA). V šestletnem obdobju smo iz vzorcev dihal bolnika osamili šest prvih izolatov MRSA. Leta 2010 smo osamili tri, v letih 2011–2013 pa po en prvi izolat MRSA. V letih 2009 in 2014 iz prvega vzorca dihal izolatov MRSA nismo osamili. Vseh prvih izolatov *S. aureus* je bilo v letih 2009–2014 340, kar pomeni, da je bil delež izolatov MRSA 1,8 %.

Vsi prvi izolati MRSA, osamljeni iz bolnika s CF, so bili odporni proti klindamicinu, ciprofloksacinu, eritromicinu, gentamicinu, tobramicinu, oksacilinu in penicilinu. Občutljivost MRSA za rifampin in trimetoprim s sulfametoksazolom se je z leti spreminjala. MRSA, odporne proti rifampinu, smo osamili leta 2010 (dva izolata) in po en izolat v letih 2012 in 2013, medtem ko smo MRSA, odporne proti trimetoprimu s sulfametoksazolom, osamili v letih 2010 in 2011. Občutljivost MRSA za tetraciklin, teikoplanin in vankomicin je bila vseh šest let 100 %.

4.4 DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI IZOLATOV *H. influenzae*

Bakterijo *H. influenzae* smo osamili pri 57 (68,7 %) otrocih s CF. V letih 2009–2013 je bilo približno 20 prvih izolatov *H. influenzae* letno, leta 2014 pa se je število povečalo na 30 izolatov. V preglednici 8 so zbrani podatki o številu in deležu (%) za posamezne antibiotike občutljivih izolatov *H. influenzae*. Na sliki 6 so podatki predstavljeni še grafično. Razberemo lahko, da so bili vsi izolati v celotnem šestletnem obdobju občutljivi za cefotaksim in moksifloksacin. Prav tako so bili vsi izolati občutljivi za parenteralni cefuroksim, z izjemo leta 2014, ko je delež občutljivih sevov padel na 86,7 %. *H. influenzae* je tudi dobro občutljiv za amoksicilin s klavulansko kislino. V letih 2010–2013 so bili vsi izolati občutljivi za amoksicilin s klavulansko kislino, medtem ko smo leta 2009 osamili en, v letu 2014 pa tri odporne seve.

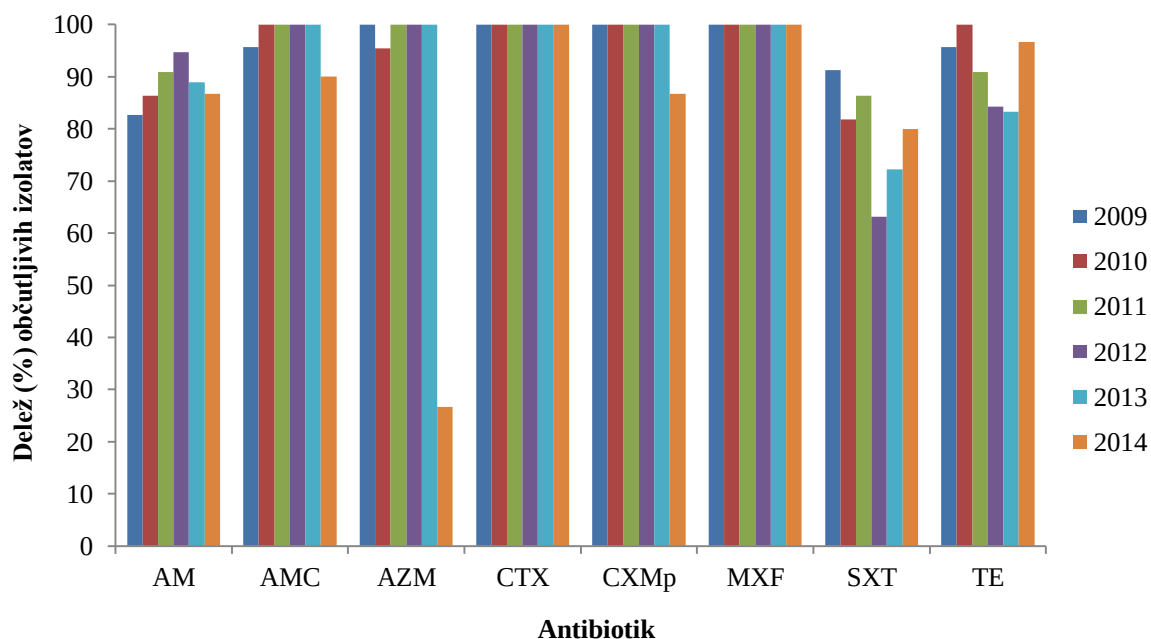
Večji delež izolatov *H. influenzae* je bil odporen proti ampicilinu, trimetoprimu s sulfametoksazolom in tetraciklinu, vendar v nobenem primeru delež odpornih izolatov ni višji od 40 %. V celotnem obdobju smo iz dihal otrok s CF osamili največ proti trimetoprimu s sulfametoksazolom odpornih izolatov *H. influenzae*. Delež za trimetoprim s sulfametoksazolom občutljivih izolatov se je z 91,3 % v letu 2009 zmanjšal na 63,2 % v letu 2012 ($p = 0,027$), nato pa počasi naraščal do leta 2014 (80,0 %). Deleži za ampicilin in tetraciklin občutljivih izolatov so bili v vseh letih višji od 80,0 %.

Občutljivost izolatov *H. influenzae* za azitromicin je bila v letih 2009–2013 višja od 95,5 %. Proti azitromicinu odporen sev smo osamili samo leta 2010. V letu 2014 pa se je delež občutljivih izolatov *H. influenzae* statistično pomembno zmanjšal na 26,7 % ($p = 0,000$).

Razlike v občutljivosti izolatov *H. influenzae* za ostale antibiotike med letoma 2009 in 2014 statistično niso bile pomembne (p -vrednost je bila v vseh primerih večja od 0,05). Izračuni Pearsonove χ^2 -statistike in p -vrednosti so podani v prilogi C.

Preglednica 8: Število in delež (%) za posamezne antibiotike občutljivih izolatov *H. influenzae* glede na leto osamitve iz dihal otrok s CF na IMI MF UL.

		Število in delež (%) občutljivih izolatov glede na skupno število testiranih v posameznih letih					
Leto osamitve		2009	2010	2011	2012	2013	2014
Število testiranih izolatov		23	22	22	19	18	30
ANTIBIOTIK	Ampicilin	19 (82,6)	19 (86,4)	20 (90,9)	18 (94,7)	16 (88,9)	26 (86,7)
	Amoksisicilin/klavulanska kislina	22 (95,7)	22 (100)	22 (100)	19 (100)	18 (100)	27 (90,0)
	Azitromicin/eritromicin	23(100)	21 (95,5)	22 (100)	19 (100)	18 (100)	8 (26,7)
	Cefotaksim	23 (100)	22 (100)	22 (100)	19 (100)	18 (100)	30 (100)
	Cefuroksim (parenteralno)	23 (100)	22 (100)	22 (100)	19 (100)	18 (100)	26 (86,7)
	Moksifloksacin	23 (100)	22 (100)	22 (100)	19 (100)	18 (100)	30 (100)
	Trimetoprim/sulfametoksazol	21 (91,3)	18 (81,8)	19 (86,4)	12 (63,2)	13 (72,2)	24 (80,0)
	Tetraciklin	22 (95,7)	22 (100)	20 (90,9)	16 (84,2)	15 (83,3)	29 (96,7)



Slika 6: Delež (%) za posamezne antibiotike občutljivih izolatov *H. influenzae*, osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.

Legenda: AM – ampicilin; AMC – amoksisicilin/klavulanska kislina, AZM – azitromicin, CTX – cefotaksim, CXMp – cefuroksim (parenteralno), MXF – moksifloksacin, SXT – trimetoprim/sulfametoksazol, TE – tetraciklin.

4.5 DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI IZOLATOV *P. aeruginosa*

Najprej smo analizirali občutljivost prvih izolatov *P. aeruginosa*, pri čemer izolatov nismo ločili glede na fenotip, kar pomeni, da je v nekaterih primerih prvi izolat *P. aeruginosa* sluznega fenotipa, v drugih primerih pa ne-sluznega. V preglednici 9 so zbrani podatki o številu testiranih izolatov ter številu in deležu (%) za posamezen antibiotik občutljivih izolatov *P. aeruginosa*. Grafično so deleži občutljivih izolatov prikazani na sliki 7.

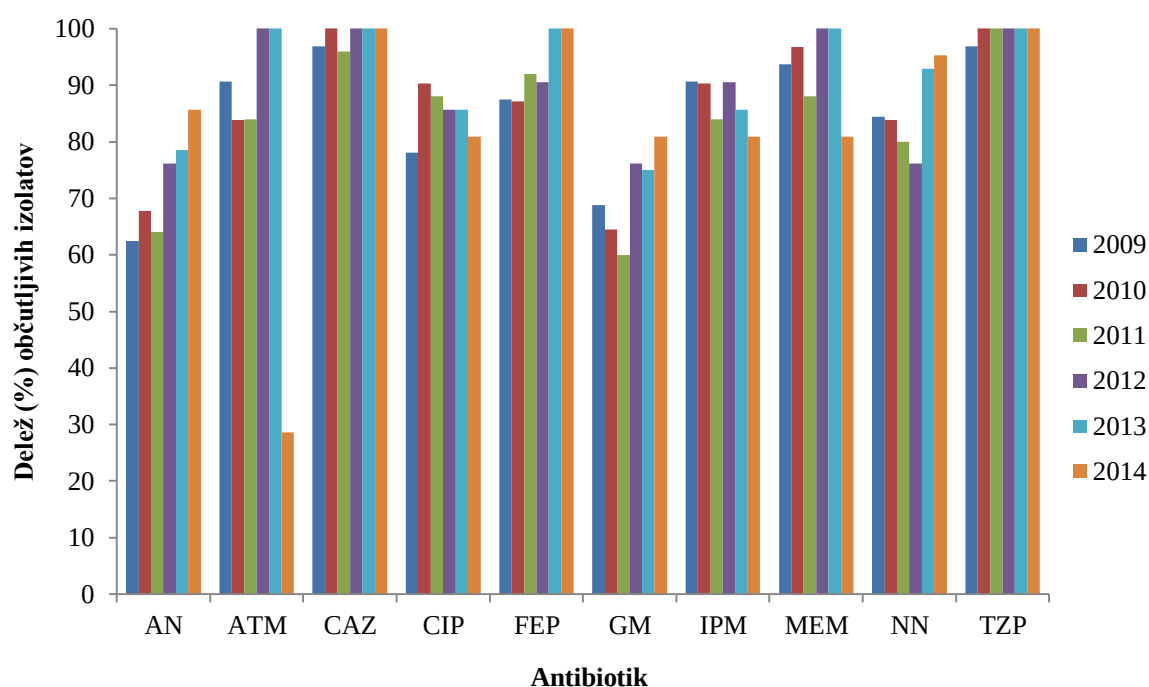
Izolate *P. aeruginosa* smo v letih 2009–2014 vsaj enkrat osamili pri 45 (54,2 %) otrocih s CF. Skoraj vsi testirani izolati so bili občutljivi za ceftazidim in piperacilin s tazobaktamom. V letu 2009 smo osamili en izolat, odporen proti piperacilinu s tazobaktamom. Proti ceftazidimu odporna izolata smo osamili leta 2009 in 2011. Delež za amikacin občutljivih izolatov je bil v letih 2009–2011 v povprečju 64,7 %, v letu 2012 se je povišal na 76,2 %, leta 2013 je bilo 78,6 % občutljivih izolatov, leta 2014 pa že 85,7 %. Občutljivost za ciprofloksacin je z 78,1 % v letu 2009 narasla na 90,3 % v letu 2010, nato pa je z leti padala do 81,0 % leta 2014. Delež proti cefepimu odpornih izolatov *P. aeruginosa* se je med šestletnim obdobjem zmanjševal. Leta 2009 in 2010 smo osamili štiri odporne izolate, naslednje dve leti po dva odporna izolata, medtem ko so bili leta 2013 in 2014 vsi izolati občutljivi.

Statistično pomembna razlika v občutljivosti se je pojavila le pri aztreonamu. Občutljivost za aztreonam je bila v prvih petih letih testiranja višja od 83,9 % (leta 2012 in 2013 celo ni bilo odpornih izolatov), v letu 2014 pa se je zmanjšala na 28,6 %, pri tem je $p = 0,000$. Pri ostalih antibiotikih so bile razlike v občutljivosti med letoma 2009 in 2014 manjše in statistično niso bile značilne. Izračuni Pearsonove χ^2 -statistike in p -vrednosti so podani v prilogi D. Večji padec v občutljivosti izolatov *P. aeruginosa* je v zadnjem letu opazen tudi pri meropenemu. V obdobju 2009–2013 je bila občutljivost izolatov nad 88,0 % (leta 2012 in 2013 je bila 100 %), v letu 2014 pa se je znižala na 81,0 %.

Odpornost proti gentamicinu in tobramicinu je v prvih letih testiranja nekoliko narasla, nato pa do leta 2014 zopet padla. V letu 2009 je bila skoraj tretjina izolatov odporna proti gentamicinu, v letu 2011 pa kar 40,0 %. V naslednjih treh letih se je delež odpornih izolatov zmanjšal na 19,0 %. Proti tobramicinu je bilo leta 2009 odpornih 15,6 % izolatov, do leta 2012 se je delež povečal na 23,8 %, v letu 2014 pa je bilo takšnih izolatov le 4,8 %. Občutljivost za imipenem je bila v vseh šestih letih med 81,0 % in 90,6 %. V zadnjih treh letih je opazno rahlo naraščanje odpornosti (z 8,5 % v letu 2012 na 19,0 % leta 2014), vendar razlike statistično niso pomembne.

Preglednica 9: Število in delež (%) za posamezne antibiotike občutljivih izolatov *P. aeruginosa* glede na leto osamitve iz dihal otrok s CF na IMI MF UL.

		Število in delež (%) občutljivih izolatov glede na skupno število testiranih v posameznih letih					
Leto osamitve		2009	2010	2011	2012	2013	2014
Število testiranih izolatov		32	31	25	21	28	21
ANTIBIOTIK	Amikacin	20 (62,5)	21 (67,7)	16 (64,0)	16 (76,2)	22 (78,6)	18 (85,7)
	Aztreonam	29 (90,6)	26 (83,9)	21 (84,0)	21 (100)	28 (100)	6 (28,6)
	Ceftazidim	31 (96,9)	31 (100)	24 (96,0)	21 (100)	28 (100)	21 (100)
	Ciprofloksacin	25 (78,1)	28 (90,3)	22 (88,0)	18 (85,7)	24 (85,7)	17 (81,0)
	Cefepim	28 (87,5)	27 (87,1)	23 (92,0)	19 (90,5)	28 (100)	21 (100)
	Gentamicin	22 (68,8)	20 (64,5)	15 (60,0)	16 (76,2)	21 (75,0)	17 (81,0)
	Imipenem	29 (90,6)	28 (90,3)	21 (84,0)	19 (90,5)	24 (85,7)	17 (81,0)
	Meropenem	30 (93,8)	30 (96,8)	22 (88,0)	21 (100)	28 (100)	17 (81,0)
	Tobramicin	27 (84,4)	26 (83,9)	20 (80,0)	16 (76,2)	26 (92,9)	20 (95,2)
	Piperacilin/tazobaktam	31 (96,9)	31 (100)	25 (100)	21 (100)	28 (100)	21 (100)



Slika 7: Delež (%) za posamezne antibiotike občutljivih izolatov *P. aeruginosa*, osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.

Legenda: AN – amikacin, ATM – aztreonam, CAZ – ceftazidim, CIP – ciprofloksacin, FEP – cefepim, GM – gentamicin, IPM – imipenem, MEM – meropenem, NN – tobramicin, TZP – piperacilin/tazobaktam.

4.5.1 Primerjava občutljivosti med različnima fenotipoma *P. aeruginosa*

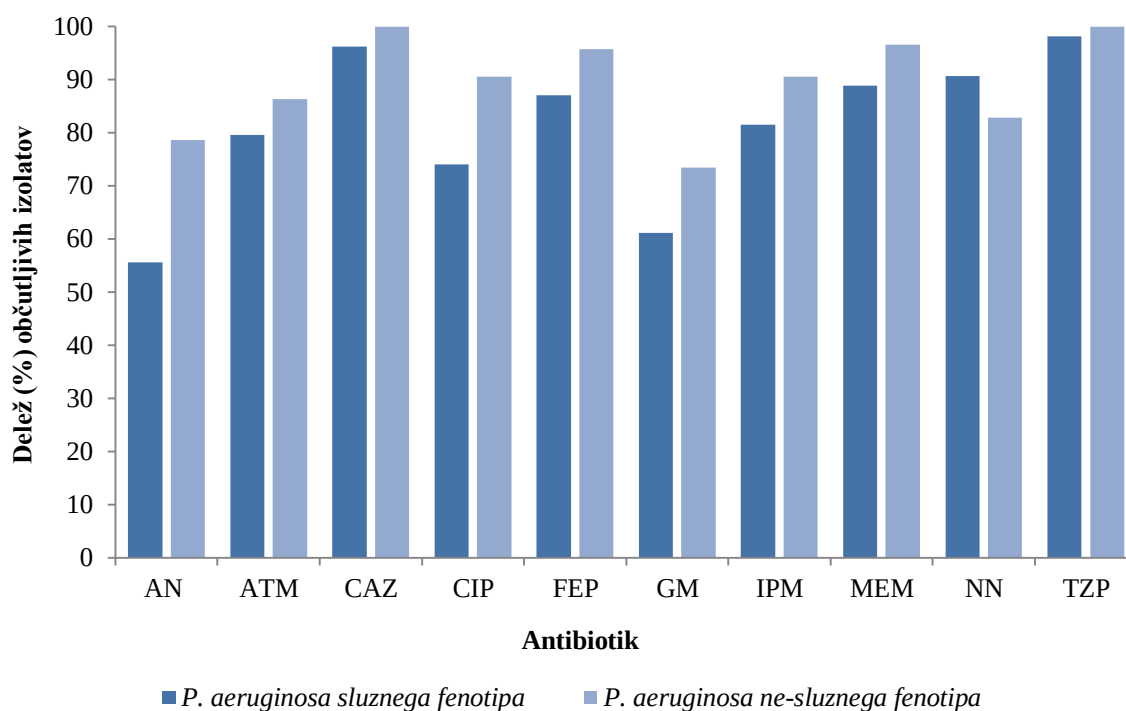
Izolate *P. aeruginosa* smo ločili glede na fenotip – sluzni in ne-sluzni ter za vsak fenotip posebej izračunali število in delež (%) za posamezne antibiotike občutljivih izolatov. Zaradi premajhnega števila izolatov sluznega fenotipa v posameznem letu, smo združili vse prve izolate, ki so jih iz dihal bolnikov s CF osamili v letih 2009–2014. Podrobnejši podatki so prikazani v preglednici 10, grafično pa na sliki 8. V prilogi E so podani izračuni Pearsonove χ^2 -statistike in p -vrednosti.

Izolate *P. aeruginosa* ne-sluznega fenotipa smo osamili pri 42 (50,6 %), izolate sluznega fenotipa pa pri 12 (14,5 %) slovenskih otrocih s CF. Skupno smo v letih 2009–2014 osamili 117 izolatov ne-sluznega in 54 izolatov sluznega fenotipa *P. aeruginosa*. Kot je razvidno s slike 8, so izolati sluznega fenotipa odpornejši proti vsem testiranim antibiotikom. Izjema je antibiotik tobramicin, kjer je večji delež odpornih izolatov ne-sluznega fenotipa, vendar razlika statistično ni pomembna ($p = 0,171$). Največja razlika v občutljivosti med fenotipoma se pojavi pri amikacinu ($p = 0,002$) in ciprofloksacinu ($p = 0,004$). Za amikacin je bilo občutljivih 55,6 % izolatov sluznega in 78,6 % izolatov ne-sluznega fenotipa, za ciprofloksacin pa 74,1 % izolatov sluznega in 90,6 % izolatov ne-sluznega fenotipa. Statistično pomembne razlike v občutljivosti med fenotipoma so bile še pri ceftazidimu ($p = 0,036$), cefepimu ($p = 0,039$) in meropenemu ($p = 0,046$), medtem ko razlike v občutljivosti med fenotipoma za aztreonam, gentamicin, imipenem, tobramicin in piperacilin s tazobaktamom statistično niso značilne.

Občutljivost izolatov ne-sluznega tipa je bila za vse antibiotike, razen za amikacin (78,6 %) in gentamicin (73,5 %), višja od 80 %. Vsi izolati ne-sluznega fenotipa so bili občutljivi za ceftazidim in piperacilin s tazobaktamom. Izolati sluznega fenotipa so bili najbolj občutljivi za tazobaktam (98,2 %) in ceftazidim (96,3 %). Več kot tri četrtine izolatov je bilo občutljivih tudi za aztreonam (79,6 %), cefepim (86,8 %), imipenem (81,5 %) in meropenem (88,9 %).

Preglednica 10: Število testiranih izolatov ter število in delež (%) za posamezne antibiotike občutljivih izolatov *P. aeruginosa* sluznega in ne-sluznega fenotipa, osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.

Število in delež (%) občutljivih izolatov glede na skupno število testiranih			
Izolat		<i>P. aeruginosa</i> ne-sluznega fenotipa	<i>P. aeruginosa</i> sluznega fenotipa
Število testiranih izolatov		117	54
ANTIBIOTIK	Amikacin	92 (78,6)	30 (55,6)
	Aztreonam	101 (86,3)	43 (79,6)
	Ceftazidim	117 (100)	52 (96,3)
	Ciprofloksacin	106 (90,6)	40 (74,1)
	Cefepim	112 (95,7)	47 (87,0)
	Gentamicin	86 (73,5)	33 (61,1)
	Imipenem	106 (90,6)	44 (81,5)
	Meropenem	113 (96,6)	48 (88,9)
	Tobramicin	97 (82,9)	49 (90,7)
	Piperacilin/tazobaktam	117 (100)	53 (98,2)



Slika 8: Delež (%) za posamezne antibiotike občutljivih izolatov *P. aeruginosa* ne-sluznega in *P. aeruginosa* sluznega fenotipa, osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.

Legenda: AN – amikacin, ATM – aztreonam, CAZ – ceftazidim, CIP – ciprofloksacin, FEP – cefepim, GM – gentamicin, IPM – imipenem, MEM – meropenem, NN – tobramicin, TZP – piperacilin/tazobaktam.

4.5.2 Pregled odpornosti izolatov *P. aeruginosa* v odvisnosti od časa kolonizacije

Podrobneje smo analizirali otroke s CF, pri katerih smo osamili izolate *P. aeruginosa*. Želeli smo preveriti, ali se odpornost izolatov proti kateremu izmed testiranih antibiotikov pri posameznem otroku z leti spreminja. Med vsemi otroki s CF smo izbrali tiste, pri katerih smo vsaj enkrat v letih 2009–2014 osamili bakterijo *P. aeruginosa* in smo jih spremljali vseh šest let. Celoten seznam 39 otrok, ki so ustrezali izbranim kriterijem, je prikazan v preglednici 11.

Pri 18 (46,2 %) otrocih s CF smo v letih 2009–2014 osamili izolate *P. aeruginosa*, občutljive za vse testirane antibiotike. Med njimi nihče ni bil koloniziran z bakterijo *P. aeruginosa* v celotnem obdobju raziskave. Pri devetih (23,1 %) otrocih s CF smo leta 2014 osamili izolate *P. aeruginosa*, odporne proti aztreonamu. Vseh šest let so bili z večkratno odpornimi izolati kolonizirani trije otroci s CF (Preglednica 11, bolniki z zaporednimi številkami 37, 38 in 39). Največ osamljenih izolatov je bilo odpornih proti aminoglikozidom in ciprofloksacinu. Pojav izolatov, odpornih proti karbapenemom (imipenemu in meropenemu), smo pri petih otrocih s CF (Preglednica 11, bolniki z zaporednimi številkami 29, 30, 34, 35 in 38) opazili šele po letu 2011.

Preglednica 11: Stopnja občutljivosti (občutljiv/odporen) izolatov *P. aeruginosa*, osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.

Zaporedna številka	Bolnik	2009	2010	2011	2012	2013	2014
1	047457200	S	X	S	S	S	X
2	052473357	X	S	S	S	X	X
3	042522262	X	X	S	X	S	X
4	045328248	X	X	X	X	S	X
5	042222334	X	X	X	S	X	X
6	044140412	X	X	X	X	S	S
7	050238236	X	S	X	X	S	X
8	049753821	X	S	X	X	S	X
9	045037173	X	X	X	X	S	X
10	042123866	X	X	X	S	S	X
11	044362836	X	X	X	X	S	S
12	050275999	X	X	S	X	X	X
13	047414533	X	X	S	X	X	X
14	041904321	S	S	X	S	X	X
15	045475911	X	S	X	X	X	X
16	045009724	X	S	X	X	X	X

se nadaljuje ...

Nadaljevanje Preglednice 11: Stopnja občutljivosti (občutljiv/odporen) izolatov *P. aeruginosa*, osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.

Zaporedna številka	Bolnik	2009	2010	2011	2012	2013	2014
17	044363356	X	S	X	X	X	X
18	048278295	S	X	X	X	S	X
19	046868018	S	X	X	X	X	ATM
20	043844451	X	X	X	X	X	ATM
21	050163503	X	X	X	X	X	ATM
22	045148598	S	S	S	S	S	ATM
23	048153850	X	X	X	X	S	ATM
24	045319111	S	X	X	S	S	ATM
25	045421540	X	X	S	X	X	ATM
26	046004180	X	S	X	X	X	ATM
27	046725161	X	X	X	X	X	ATM
28	045722119	X	X	X	X	X	ATM, MEM
29	052462571	X	S	S	S	IPM	S
30	045484528	X	S	X	X	IPM	X
31	041505820	S	X	S	S	AN, GM	X
32	041904335	S	ATM	S	NN	S	X
33	042469960	S	AN, ATM, CIP, FEP, GM, NN	S	X	X	X
34	044936403	S	S	AN, CIP, GM	AN, CIP, IPM	IPM	X
35	042322621	AN, GM	S	AN, ATM, GM	S	S	ATM, IPM, MEM
36	044363615	AN, CIP, GM	AN, ATM, GM, IPM, MEM	AN, ATM, CAZ, FEP, GM, IPM, MEM, NN	S	S	ATM, CIP
37	042106199	AN, CIP, GM, NN	AN, GM, IPM, NN	AN, CIP, GM, IPM, NN	GM, IPM, NN	AN, CIP, GM, NN	AN, CIP, GM, IPM, MEM, NN
38	043838230	AN, GM, NN	AN, GM, NN	AN, CIP, GM, NN	AN, CIP, GM, NN	AN, CIP, GM, IPM	AN, CIP, GM, IPM, MEM
39	045684627	AN, ATM, FEP, GM, NN	AN, ATM, GM, FEP, IPM, NN	AN, FEP, GM, NN	AN, CIP, FEP, GM, NN	AN, CIP, GM, NN	AN, GM

Legenda: AN – amikacin, ATM – aztreonam, CAZ – ceftazidim, CIP – ciprofloksacin, FEP – cefepim, GM – gentamicin, IPM – imipenem, MEM – meropenem, NN – tobramicin; R – odporen; S – občutljiv; X – v tem letu pri bolniku nismo osamili bakterije *P. aeruginosa*.

Modra barva: bolniki, kolonizirani z občutljivimi izolati *P. aeruginosa*; zelena barva: bolniki, pri katerih smo samo leta 2014 osamili proti aztreonamu odporne izolate *P. aeruginosa*; rumena barva: bolniki, pri kateri smo vsaj enkrat v letih 2009–2014 osamili odporne izolate *P. aeruginosa*.

4.6 POGOSTOST VEČKRATNO ODPORNIH BAKTERIJ

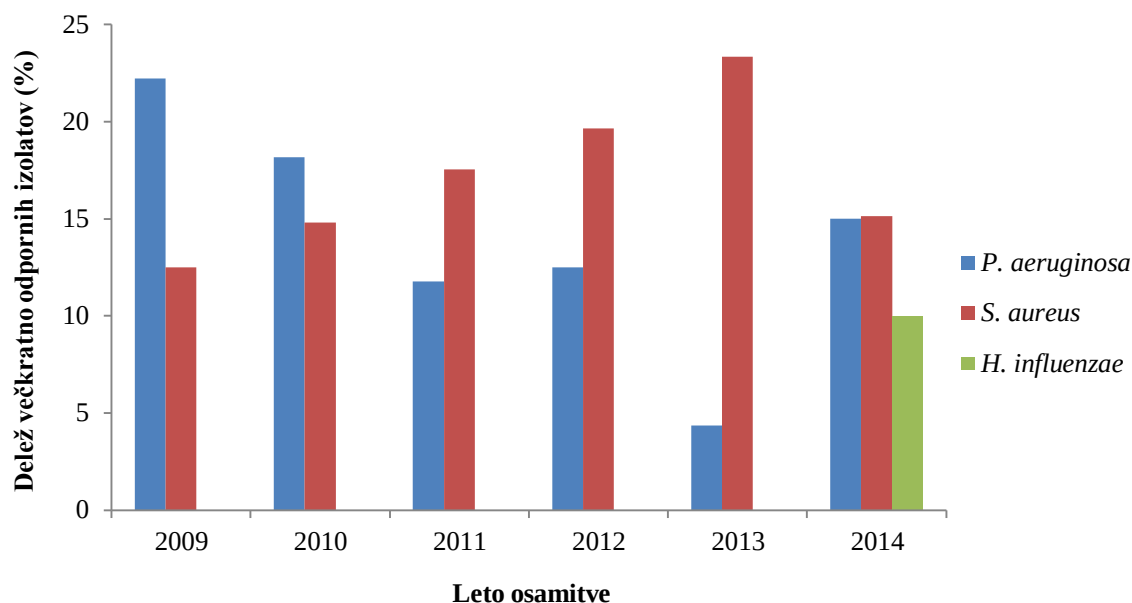
Kot večkratno odporne (angl. Multidrug-Resistant – MDR) bakterije smo opredelili izolate, ki so odporni proti najmanj enemu antibiotiku v treh ali več kategorijah antibiotikov (Magiorakos in sod., 2012). Za posamezno leto smo izračunali število in delež (%) večkratno odpornih izolatov *H. influenzae*, *S. aureus* in *P. aeruginosa*. Podatki so zbrani v preglednici 12, grafično pa prikazani na sliki 9.

Delež MDR izolatov je bil v letih 2009 in 2010 največji pri izolatih *P. aeruginosa*, medtem ko je bil v letih 2011–2014 največji pri izolatih *S. aureus*. V obdobju 2009–2013 je delež MDR izolatov *S. aureus* naraščal (od 12,5 % leta 2009 do 23,3 % leta 2013); medtem ko je delež MDR izolatov *P. aeruginosa* upadal (od 22,2 % leta 2009 do 4,3 % leta 2013). Leta 2014 sta bila deleža MDR izolatov *S. aureus* in *P. aeruginosa* skoraj enaka.

Večkratno odporne izolate *H. influenzae* smo osamili samo v letu 2014, in sicer pri treh otrocih s CF. MDR izolate *S. aureus* smo v obdobju 2009–2014 osamili pri 19 (24,4 %) otrocih s CF, MDR *P. aeruginosa* pa pri osmih (17,8 %) otrocih s CF.

Preglednica 12: Število in delež (%) večkratno odpornih izolatov *H. influenzae*, *S. aureus* in *P. aeruginosa*, osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.

Število in delež (%) večkratno odpornih izolatov			
Leto	<i>S. aureus</i>	<i>H. influenzae</i>	<i>P. aeruginosa</i>
2009	6 (12,5)	0 (0,0)	4 (22,2)
2010	8 (14,8)	0 (0,0)	4 (18,2)
2011	10 (17,5)	0 (0,0)	2 (11,8)
2012	11 (19,6)	0 (0,0)	2 (12,5)
2013	14 (23,3)	0 (0,0)	1 (4,3)
2014	10 (15,2)	3 (10,0)	3 (15,0)
2009–2014	59 (18,1)	3 (2,2)	16 (13,8)



Slika 9: Delež (%) večkratno odpornih izolatov *S. aureus*, *H. influenzae* in *P. aeruginosa*, osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.

4.7 DOLOČANJE STOPNJE ODPORNOSTI IZOLATOV

Za vsako bakterijsko vrsto posebej smo izračunali povprečni ter najmanjši in največji delež (%) za posamezen antibiotik občutljivih izolatov v celotnem šestletnem obdobju (2009–2014). Podatki so zbrani v preglednicah 13, 14 in 15. S slike 10 je razvidno, da je stopnja odpornosti najnižja pri izolatih *H. influenzae*, saj je kar pri 6/8 testiranih antibiotikov povprečni delež občutljivih izolatov višji od 90 %. Odpornost izolatov *S. aureus* in *P. aeruginosa* je višja. Povprečni delež občutljivih izolatov *S. aureus* je bil višji od 90 % pri 7/12 testiranih antibiotikov, medtem ko so bili izolati *P. aeruginosa* več kot 90 % občutljivi za 4/10 testiranih antibiotikov. Pri izolatih *P. aeruginosa* so v primerjavi z izolati *S. aureus* vidne večje razlike v občutljivosti med posameznimi leti. Pri izolatih *P. aeruginosa* je bila razlika med najmanjšim in največjim deležem občutljivih izolatov tudi več kot 70 % pri aztreonamu, medtem ko je bila pri izolatih *S. aureus* največja razlika 10,7 % pri tobramicinu. Stopnja odpornosti *S. aureus* je višja zaradi visokega deleža proti penicilinu odpornih izolatov.

Preglednica 13: Največji, povprečni in najmanjši delež (%) občutljivih izolatov *S. aureus* za posamezen antibiotik v letih 2009–2014.

Antibiotik	CC	CIP	E	GM	NN	OX	P	RA	SXT	TE	TEC	VA
Maksimum	97,0	91,7	81,3	86,4	87,9	100	14,0	100	100	100	100	100
Povprečje	92,3	88,2	75,9	84,1	83,4	97,9	11,4	96,3	96,2	98,5	100	100
Minimum	88,3	86,4	71,7	81,5	77,2	94,4	5,4	93,3	92,6	95,8	100	100

Legenda: CC – klindamicin, CIP – ciprofloksacin, E – eritromicin, GM – gentamicin, NN – tobramicin, OX – oksacilin, P – penicilin, RA – rifampin, SXT – trimetoprim/sulfametoksazol, TE – tetraciklin, TEC – teikoplanin, VA – vankomicin.

Preglednica 14: Največji, povprečni in najmanjši delež (%) občutljivih izolatov *H. influenzae* za posamezen antibiotik v letih 2009–2014.

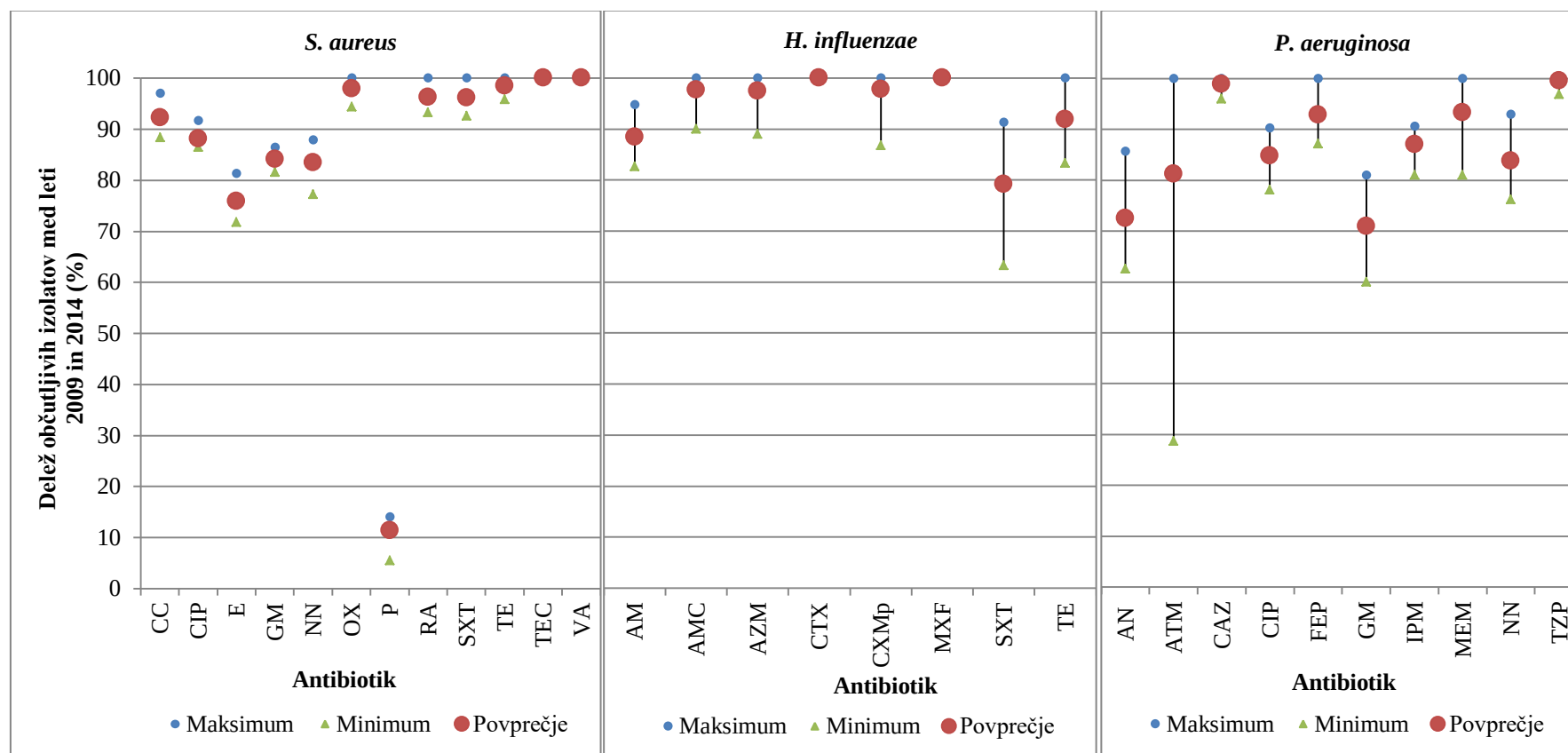
Antibiotik	AM	AMC	AZM	CTX	CXMp	MXF	SXT	TE
Maksimum	94,7	100	100	100	100	100	91,3	100
Povprečje	88,4	97,6	97,4	100	97,8	100	79,2	91,8
Minimum	82,6	90,0	88,9	100	86,7	100	63,2	83,3

Legenda: AM – ampicilin; AMC – amoksisicilin/klavulanska kislina, AZM – azitromicin, CTX – cefotaksim, CXMp – cefuroksim (parenteralno), MXF – moksifloksacin, SXT – trimetoprim/sulfametoksazol, TE – tetraciklin.

Preglednica 15: Največji, povprečni in najmanjši delež (%) občutljivih izolatov *P. aeruginosa* za posamezen antibiotik v letih 2009–2014.

Antibiotik	AN	ATM	CAZ	CIP	FEP	GM	IPM	MEM	NN	TZP
Maksimum	85,7	100	100	90,3	100	81,0	90,6	100	92,9	100
Povprečje	72,5	81,2	98,8	84,8	92,9	70,9	87,0	93,3	83,8	99,5
Minimum	62,5	28,6	96,0	78,1	87,1	60,0	81,0	81,0	76,2	96,9

Legenda: AN – amikacin, ATM – aztreonam, CAZ – ceftazidim, CIP – ciprofloksacin, FEP – cefepim, GM – gentamicin, IPM – imipenem, MEM – meropenem, NN – tobramicin, TZP – piperacilin/tazobaktam.



Slika 10: Največji, povprečni in najmanjši delež (%) občutljivih izolatov *S. aureus*, *H. influenzae* in *P. aeruginosa*, osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.

Legenda: AM – ampicilin; AMC – amoksisicilin/klavulanska kislina, AN – amikacin, ATM – aztreonam, AZM – azitromicin, CAZ – ceftazidim, CC – klindamicin, CIP – ciprofloksacin, CTX – cefotaksim, CXMp – cefuroksim (parenteralno), E – eritromicin, FEP – cefepim, GM – gentamicin, IPM – imipenem, MEM – meropenem, MXF – moksifloksacin, NN – tobramicin, OX – oksacilin, P – penicilin, RA – rifampin, SXT – trimetoprim/sulfametoksazol, TE – tetraciklin, TEC – teikoplanin, TZP – piperacilin/tazobaktam, VA – vankomicin.

5 RAZPRAVA

Cistična fibroza je večorganska bolezen, katere izid je odvisen predvsem od okvare pljuč, ki so prizadeta zaradi kroničnega vnetja in kronične okužbe (Borinc Beden in sod., 2008). Zaradi napredka v zdravljenju tako z antibiotiki kot tudi z nadomestki encimov trebušne slinavke, izboljšane podpornega prehranskega zdravljenja in tehnik respiratorne fizioterapije ter multidisciplinarne obravnave v centrih za CF se je pričakovana življenjska doba bolnikov s CF močno podaljšala, a kljub temu bolezen ostaja neozdravljiva (Praprotnik in sod., 2015).

Zaradi pogostih bakterijskih okužb dihal bolniki s CF prejemajo večje količine antibiotikov v primerjavi z drugimi bolniki, kar poveča možnosti za razvoj odpornosti (Lambert, 2002; Ebbing in sod., 2015). Okužbe z odpornimi bakterijami so povezane s podaljšanim, včasih tudi neuspešnim zdravljenjem, daljšim bivanjem v bolnišnici in pogostejšimi zapleti. Naraščanje deleža odpornih bakterijskih sevov je predvsem posledica množične in mnogokrat nekritične uporabe antibiotikov (Seme, 2002a).

Spremljanje porabe antibiotikov in odpornosti bakterij je ključnega pomena za oceno stanja odpornosti v posamezni državi. Sistematični pregledi o povzročiteljih okužb dihal in njihovi odpornosti proti antibiotikom lahko pomembno prispevajo k ustrežnejšemu predpisovanju antibiotikov in posledično učinkovitejšemu zdravljenju bolnikov s CF (Döring in sod., 2012; Ebbing in sod., 2015). V Sloveniji zaenkrat še nimamo takega pregleda, zato smo v naši raziskavi najprej določili najpogostejše bakterijske povzročitelje okužb dihal pri otrocih s CF v Sloveniji, nato pa analizirali njihovo občutljivost za antibiotike in primerjali trend odpornosti v šestletnem obdobju.

5.1 BOLNIKI S CISTIČNO FIBROZO IN NAJPOGOSTEJŠI BAKTERIJSKI IZOLATI

V Sloveniji otroke s CF do dopolnjenega 19. leta starosti vodijo in zdravijo v Centru za cistično fibrozo na Pediatrični kliniki UKC Ljubljana (Kotnik Pirš in Borinc Beden, 2009; Oštir, 2009). V skladu s priporočili Evropskega združenja za cistično fibrozo izvajajo redne preglede otrok s CF vsake tri mesece, pri novoodkritih bolnikih in novorojenčkih v začetnem obdobju tudi pogosteje. Poleg tega pri vsakem otroku enkrat na leto opravijo letni pregled, ki obsega pregled vseh organskih sistemov (Oštir, 2009). Ob rednem pregledu poleg kliničnega pregleda otroka, meritve teže, višine, zasičenosti hemoglobina s kisikom in spirometrije opravijo tudi mikrobiološki pregled kužnine, odvzete iz dihal (največkrat je to sputum ali aspirat žrela) (Borinc Beden in sod., 2008). V sklopu delovanja Centra za CF že od leta 1985 vodijo register novoodkritih bolnikov s CF, od leta 2006 pa je slovenski register vključen tudi v Evropski register bolnikov s CF. V okviru registra poleg osnovnih demografskih podatkov spremljajo tudi podatke o genetiki, zdravljenju,

mikrobiološkem in prehranskem statusu, pljučni funkciji ter zapletih, kot so sladkorna bolezen, nosna polipoza, zmanjšana kostna gostota in bolezni jeter (Kotnik Pirš in Borinc Beden, 2009).

V naši raziskavi smo retrospektivno zajeli podatke o bakterijskih izolatih, osamljenih iz dihal 83 otrok s CF v letih 2009–2014. V celotnem obdobju smo osamili 2836 bakterijskih izolatov oz. 1073 prvih bakterijskih izolatov (Preglednica 3), kar v povprečju pomeni tri prve izolate pri posameznem otroku. Starost otrok s CF ob prvi vključitvi v raziskavo je bila v povprečju med 9,6 in 11,3 leta. Najmlajši otrok je bil star manj kot en mesec, najstarejši pa 22,4 leta.

Dihala bolnikov s CF so zaradi posledic genetske okvare kloridnega kanalčka (gosta in suha sluz ter s tem okvarjeno mukociliarno čiščenje) idealna okoljska niša za razvoj kroničnih bakterijskih okužb, ki so glavni vzrok prezgodnje smrti teh bolnikov (Gilligan, 2014). Razširjenost mikroorganizmov, osamljenih iz dihal bolnikov s CF, so opisali v različnih raziskavah (Valenza in sod., 2008; Paixão in sod., 2010; Chibabhai in Lowman, 2016), manj pa je raziskav, ki bi se osredotočile samo na otroke s CF. V šestletnem obdobju smo pri slovenskih otrocih s CF osamili 62 različnih patogenih vrst bakterij (Priloga A), med katerimi so bili najpogostejši izolati *S. aureus*, *H. influenzae* in *P. aeruginosa*, kar je v skladu z našo hipotezo. Bakterija *S. aureus* je predstavljala skoraj tretjino vseh bakterijskih izolatov (30,4 %), medtem ko so skupno vrste *S. aureus*, *H. influenzae* in *P. aeruginosa* predstavljale več kot polovico (53,7 %) vseh bakterijskih izolatov (Preglednica 4). Bakterijo *H. influenzae* smo osamili pri 12,5 % otrok s CF. Podobno prevalenco (12,0 %) so odkrili tudi Ebbing in sod. (2015) v obdobju 1998–2012 pri avstralskih otrocih s CF, medtem ko so Cardines in sod. (2012) v letih 2004–2009 izolate *H. influenzae* osamili pri 20,3 % italijanskih otrok s CF.

Poleg omenjenih treh bakterijskih vrst smo v večjem deležu osamili še bakteriji *S. maltophilia* (7,0 %) in *S. pneumoniae* (5,3 %). Bakterija *S. maltophilia* pogosto kolonizira dihal bolnikov s CF, vendar še vedno ni povsem jasno, ali sodi med prave patogene (Hansen, 2012). Izolate *S. maltophilia* smo osamili pri 40 (48,2 %), izolate *S. pneumoniae* pa pri 37 (44,6 %) otrocih s CF. Delež bakterij *S. pneumoniae* ni presenetljiv, saj so bakterije del normalne flore nosnožrelne sluznice pri približno 15 % otrok, hkrati pa so pomembne povzročiteljice okužb dihal. Med bakterijskimi pljučnicami je kar 60 % pnevmokoknih (Ihan, 2002). Esposito in sod. (2016) so v raziskavi, v katero je bilo vključenih 212 otrok in mladostnikov s CF, pnevmokoke osamili pri 42 (19,8 %). Med tipične oportunistične patogene pri bolnikih s CF štejemo tudi bakterije kompleksa *B. cepacia* in *A. xylosoxidans* (Ciofu in sod., 2013; Sherrard in sod., 2014). V naši raziskavi smo v letih 2009–2014 izolate *A. xylosoxidans* osamili pri sedmih (8,4 %), izolate *Burkholderia multivorans* pa pri dveh (2,4 %) otrocih s CF.

Znano je, da se prevalenca posameznih vrst respiratornih mikroorganizmov pri bolnikih s CF z leti spreminja (Slika 2). Glede na podatke CFF (2015) se prevalenca bakterij *S. aureus* povečuje, medtem ko se prevalenca bakterij *P. aeruginosa* v zadnjih letih zmanjšuje. Opazen je tudi rahel trend upadanja izolatov *H. influenzae*. Pri slovenskih otrocih s CF se deleži treh najpogostejših bakterijskih vrst v šestletnem obdobju niso pomembno spremenili (Slika 4). V vseh letih smo osamili največ izolatov *S. aureus* (med 25,4 % in 33,1 %). Deleži izolatov *P. aeruginosa* in *H. influenzae* so bili podobni in so znašali 9,1 %–15,0 %.

V letih 2009–2014 smo izolate *P. aeruginosa* vsaj enkrat osamili pri 45 (54,2 %), izolate *H. influenzae* pri 57 (68,7 %), izolate *S. aureus* pa kar pri 78 (94,0 %) otrocih s CF. Sluzni fenotip *P. aeruginosa* smo osamili pri 12 (14,5 %) otrocih s CF, od katerih smo jih v celotnem obdobju spremljali sedem. Vseh sedem otrok je bilo vsa leta raziskave koloniziranih tako s sluznim fenotipom *P. aeruginosa* kot tudi s *S. aureus*, medtem ko smo izolate *H. influenzae* osamili samo pri 1/7 otrok, in sicer samo leta 2009. Iz tega je razvidno že znano dejstvo, da bakterije *H. influenzae* povzročajo akutne okužbe dihal v začetnih fazah CF pri mlajših otrocih, bakterije *P. aeruginosa* sluznega fenotipa pa se pojavijo pozneje, ko so pljuča bolnikov že poškodovana zaradi kroničnega vnetja (Elborn, 2016).

Prevalenca MRSA pri bolnikih s CF je glede na objave tujih raziskovalcev v zadnjem desetletju dramatično narasla. V ZDA je delež izolatov MRSA, osamljenih iz dihal bolnikov s CF, višji od 25 %, medtem ko je razširjenost v Kanadi in Evropi nižja, in sicer med 3 in 11 % (Chmiel in sod., 2014). Po podatkih Slovenske komisije za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila (SKUOPZ) je bil delež MRSA v Sloveniji v letih 2011–2014 med 6 in 7 % (Štrumbelj in sod., 2012, 2013, 2014, 2016).

Trend naraščanja prevalence izolatov MRSA je opazen tudi pri otrocih s CF (Harik in sod., 2016). Miall in sod. (2001) so v svoji raziskavi ugotovili, da je prevalenca MRSA pri otrocih s CF narasla z 0 % leta 1992 na 2,3 % leta 1998. Podobno so Solís in sod. (2003) v retrospektivni raziskavi seve MRSA med leti 1988–1998 osamili samo pri posameznih otrocih s CF, medtem ko je prevalenca v letih 1998 in 1999 narasla na 6,5 %. Trend naraščanja prevalence MRSA so opazili tudi v enem od centrov za otroke s CF v ZDA, kjer je bila prevalenca MRSA leta 1997 1 %, do leta 2001 se je delež povečal na 15 %, v letu 2009 pa je prevalenca MRSA znašala že 49 % (Harik in sod., 2016). Razlike v prevalenci MRSA pri bolnikih s CF bi lahko bile domnevno povezane s splošno prevalenco MRSA v posamezni državi (Paixão in sod., 2010). Med slovenskimi otroki s CF smo v letih 2009–2014 MRSA našli samo pri enem otroku s CF, kar nakazuje na dobro izvajanje ukrepov za preprečevanje prenosa mikroorganizmov med bolniki. V Centru za CF na Pediatrični kliniki skrbijo, da se poti otrok s CF na križajo. Večino dejavnosti opravijo v enem prostoru, vsi pregledi pa so skrbno načrtovani. Otroci so hospitalizirani v

enoposteljnih sobah, če je možno z lastnimi toaletnimi prostori, da je možnost prenosa okužbe čim manjša (Borinc Beden in sod., 2008; Praprotnik in sod., 2015). Delež izolatov MRSA, osamljenih iz otrok s CF v Sloveniji med letoma 2009 in 2014, znaša torej 1,8 %, s čimer smo potrdili našo hipotezo.

Večina bolnikov s CF ima značilen vzorec bakterijskih okužb, ki se s starostjo spreminja (Slika 1). Medtem ko pri otrocih najpogosteje povzročata okužbe *H. influenzae* in *S. aureus*, pri odraslih prevladuje bakterija *P. aeruginosa* (Ciofu in sod., 2013; Valenza in sod., 2008). Tudi v naši raziskavi smo opazili razliko med povprečno starostjo otrok s CF, pri katerih smo osamili izolate *P. aeruginosa*, in povprečno starostjo otrok s CF, pri katerih smo osamili izolate *S. aureus* in *H. influenzae* (Preglednica 6). V povprečju so bili otroci s CF ob prvi osamitvi bakterije *P. aeruginosa* 2,2 leti starejši od otrok s CF, pri katerih smo osamili izolate *S. aureus* in *H. influenzae*. Po pričakovanjih je bila najvišja povprečna starost otrok s CF, pri katerih smo osamili izolate *P. aeruginosa* sluznega fenotipa.

5.2 OBČUTLJIVOST IZOLATOV *S. aureus*

Večina bakterij *S. aureus* je že odpornih proti penicilinu (Beović in Nadrah, 2014). Nizka občutljivost je posledica betalaktamaz (penicilaz), ki jih ima več kot 90 % sevov (Lowy, 2003). V skladu s pričakovanji smo tudi pri bolnikih s CF v Sloveniji osamili največ proti penicilinu odpornih izolatov *S. aureus*. V vseh letih je bila odpornost proti penicilinu višja od 85 %, v letu 2012 celo višja od 94 %, saj smo osamili samo tri izolate, ki so bili občutljivi za penicilin. Zaradi visoke stopnje odpornosti proti penicilinu se za zdravljenje okužb uporabljajo protistafilokokni penicilini (npr. flukloksacilin) (Beović in Nadrah, 2014).

Prisotnost proti glikopeptidom (vankomicinu in teikoplaninu) odpornih izolatov *S. aureus* pri bolnikih s CF do sedaj ni bila opisana, pojavljajo pa se sevi z zmanjšano občutljivostjo (Goss in sod., 2011). Prvi sev VISA so pri bolniku s CF odkrili leta 2002 v Belgiji. V naslednjih letih so v več raziskavah poročali o dodatnih primerih sevov z zmerno občutljivostjo za glikopeptide (angl. Glycopeptide-Intermediate *S. aureus* – GISA), kar nakazuje na naraščanje pojavnosti sevov z zmanjšano občutljivostjo za glikopeptide med bolniki s CF (Denis in sod., 2002; Filleron in sod., 2011). V naši raziskavi so bili vsi osamljeni izolati *S. aureus* občutljivi tako za vankomicin kot tudi za teikoplanin. Prav tako smo osamili zelo malo izolatov, odpornih proti rifampinu, tetraciklinu in trimetoprimu s sulfametoksazolom. Občutljivost za te antibiotike je bila v vseh letih višja od 90 %, med posameznimi leti pa ni bilo statistično pomembnih razlik. Gibanje deleža izolatov *S. aureus*, občutljivih za ciprofloksacin, v opazovanem šestletnem obdobju kaže na rahel trend padanja. V letu 2009 je delež znašal 91,7 %, leta 2014 pa 86,4 %.

Občutljivost izolatov, osamljenih iz dihal otrok s CF, za aminoglikozide (gentamicin in tobramicin) je bila v povprečju 84 %, za klindamicin pa kar 92,6 %. Deleži občutljivih izolatov se med leti niso bistveno spreminjali. Višji delež izolatov *S. aureus* je bil odporen proti makrolidom. V povprečju smo v letih 2009–2014 iz dihal otrok s CF na IMI MF osamili 23,9 % izolatov *S. aureus*, odpornih proti eritromicinu. Opazen je rahel trend naraščanja odpornosti. V letu 2009 je bil delež odpornih izolatov 18,7 %, leta 2014 pa je bila odporna že več kot četrtina izolatov (25,8 %). Naraščanje odpornosti proti makrolidom bi lahko bila posledica selekcije odpornih sevov zaradi protivnetnega zdravljenja z azitromicinom (Samson in sod., 2016).

V primerjavi s podatki SKUOPZ o občutljivosti *S. aureus* v Sloveniji so bili izolati *S. aureus*, osamljeni iz spodnjih dihal otrok s CF, bolj odporni proti antibiotikom. Največja razlika je opazna pri občutljivosti za eritromicin in gentamicin. Po podatkih SKUOPZ je bila občutljivost izolatov *S. aureus* v letih 2011–2014 za eritromicin v povprečju 89 %, za gentamicin pa 95 %, medtem ko je bila občutljivost naših izolatov *S. aureus* v enakem obdobju v povprečju 75 % za eritromicin in 85 % za gentamicin. Poleg tega smo v naši raziskavi pri otrocih s CF osamili večji delež izolatov, odpornih proti ciprofloksacinu, trimetoprimu s sulfametoksazolom in rifampinu (Štrumbelj in sod., 2012, 2013, 2014, 2016).

Odpornost izolatov *S. aureus* proti oksacilinu nakazuje na delež izolatov MRSA. Med slovenskimi otroki s CF smo v letih 2009–2014 izolate MRSA osamili samo pri enem otroku s CF, ki je bil vseh šest let koloniziran tako z MRSA kot tudi z MSSA. Spreminjanje deleža občutljivih izolatov (Slika 5) je posledica dejstva, da so bili nekateri prvi izolati MRSA, nekateri pa MSSA. Poleg tega smo leta 2010 osamili tri prve izolate MRSA. Glede na objave drugih raziskovalcev imajo izolati MRSA višjo stopnjo odpornosti proti antibiotikom kot izolati MSSA (Valenza in sod., 2008), kar smo sicer samo na osnovi enega seva MRSA potrdili tudi v naši raziskavi. S primerjavo občutljivosti MRSA in MSSA, osamljenih iz slovenskega otroka s CF, smo namreč opazili, da je bil sev MRSA vsa leta odporen proti klindamicinu, ciprofloksacinu, eritromicinu, gentamicinu, tobramicinu, oksacilinu in penicilinu, medtem ko so bili izolati MSSA občutljivi za vse testirane antibiotike z izjemo penicilina, rifampina in trimetoprima s sulfametoksazolom. Tako MRSA kot MSSA pa sta bila v celotnem obdobju občutljiva za tetraciklin, teikoplanin in vankomicin.

5.3 OBČUTLJIVOST IZOLATOV *H. influenzae*

Občutljivost izolatov *H. influenzae*, ki smo jih v letih 2009–2014 osamili iz dihal otrok s CF na IMI MF, je bila za večino testiranih antibiotikov višja od 80 % (Slika 6). Nekoliko nižji delež občutljivosti se pojavlja pri trimetoprimu s sulfametoksazolom. Vsi testirani izolati so bili po pričakovanju občutljivi za fluorokinolone (moksifloksacin), saj je

odpornost *H. influenzae* proti kinolonom redka (Kostyanov in Sechanova, 2012). Prav tako so bili vsi izolati občutljivi za cefalosporine III. (cefotaksim) in II. (parenteralnemu cefuroksimu) generacije, z izjemo leta 2014, ko smo osamili štiri izolate, odporne proti parenteralnemu cefuroksimu. Ker so bili vsi odporni izolati osamljeni po 1. aprilu 2014, je najverjetnejši razlog za večji delež odpornih izolatov prehod na evropske smernice EUCAST, ki imajo pri testiranju za parenteralni cefuroksim strožji kriterij za občutljivost (Priloga G).

Občutljivost bakterij *H. influenzae* za vse peniciline običajno določamo na podlagi občutljivosti za ampicilin. Odpornost bakterij *H. influenzae* proti ampicilinu enakomerno narašča vse od odkritja prvih odpornih sevov v začetku sedemdesetih let 20. stoletja (Tristram in sod., 2007). Glavni mehanizem, odgovoren za odpornost, je izločanje betalaktamaz. Stopnja odpornosti se med posameznimi geografskimi območji razlikuje, od 3 % v Nemčiji do 65 % v Koreji (Bae in sod., 2010). Pri otrocih s CF v Sloveniji smo v šestih letih osamili 11,6 % proti ampicilinu odpornih izolatov *H. influenzae*. Trenda naraščanja odpornosti med obdobjem testiranja nismo opazili. V prvih štirih letih je delež odpornih izolatov celo upadel (s 17,4 % leta 2009 na 5,3 % leta 2012), nato pa je v zadnjih dveh letih zopet narasel na 13,3 %. Zaradi odpornosti bakterij se danes pri zdravljenju okužb dihal aminopenicilini pogosto uporabljajo v kombinaciji z zaviralcem betalaktamaz (klavulanska kislina, sulbaktam) (Beović in Nadrah, 2014). Višjo učinkovitost amoksicilina s klavulansko kislino proti bakterijam *H. influenzae* kažejo tudi naši rezultati. Občutljivost izolatov *H. influenzae*, osamljenih iz dihal otrok s CF, za amoksicilin s klavulansko kislino je bila v vseh letih višja od 90 %. Leta 2009 smo osamili en sev, odporen proti amoksicilinu s klavulansko kislino, v letu 2014 pa tri. Porast odpornosti proti ampicilinu in amoksicilinu s klavulansko kislino je podobno kot pri cefuroksimu verjetno posledica testiranja občutljivosti po smernicah EUCAST. Metode in interpretacija rezultatov po smernicah EUCAST mnogo bolje kot smernice CLSI odkrivajo izolate *H. influenzae*, odporne proti betalaktamom (Štrumbelj in sod., 2016).

Občutljivost izolatov *H. influenzae* za tetracikline je bila v povprečju višja od 90 %. Največ izolatov je bilo odpornih proti trimetoprimu s sulfametoksazolom (v povprečju 20,9 %). Delež občutljivih izolatov je z 91,3 % v letu 2009 statistično pomembno upadel na 63,2 % leta 2012 ($p = 0,027$), nato pa je v zadnjih dveh letih opazovanega obdobja zopet narasel na 80,0 %. Razlog za visoko stopnjo odpornosti bi lahko bila povečana raba teh antibiotikov zaradi pojava izolatov, odpornih proti betalaktamom – antibiotikom prve izbire pri zdravljenju okužb dihal.

V zadnjih letih je delež sevov *H. influenzae*, odpornih proti makrolidom, narasel tudi pri bolnikih s CF (Roberts in sod., 2011). Prisotnost genov za odpornost proti makrolidom pri bakterijah *H. influenzae* so prvi opisali Roberts in sod. (2011). Med izolati, osamljenimi iz otrok s CF, je bilo 25,5 % izolatov odpornih, 73,6 % izolatov pa zmerno občutljivih za

testirane makrolide (azitromicin, eritromicin), medtem ko so vsaj en gen za odpornost proti makrolidom (*ermA*, *ermC* ali *ermF*) našli pri vseh izolatih. V naši raziskavi smo v letih 2009–2013 osamili samo en sev *H. influenzae*, odporen proti azitromicinu, medtem ko je v letu 2014 delež odpornih izolatov statistično pomembno narasel na 73,3 % ($p = 0,000$). Razlika v občutljivosti med letoma 2013 in 2014 je posledica razlik v smernicah CLSI in EUCAST. Po smernicah EUCAST namreč ni več kategorije občutljiv, temveč sta samo še kategoriji odporen in zmerno občutljiv (EUCAST, 2014). Občutljivost za makrolide določamo s testiranjem občutljivosti za eritromicin (rezultat velja tudi za azitromicin in klaritromicin) (EUCAST, 2014; Štrumbelj in sod., 2016).

O odpornosti bakterij *H. influenzae* proti antibiotikom in njenem časovnem spreminjanju pri bolnikih s CF je malo znanega (Cardines in sod., 2012; Ebbing in sod., 2015). Cardines in sod. (2012) so v raziskavi analizirali občutljivost izolatov *H. influenzae*, osamljenih iz kužnin dihal 64 otrok s CF v Rimu. Vsi izolati so bili občutljivi za cefalosporine (cefotaksim) in ciprofloksacin, prav tako kot izolati, osamljeni iz slovenskih otrok s CF. Primerljivi so tudi deleži izolatov, odpornih proti ampicilinu (13,9 % pri italijanskih in 11,6 % pri slovenskih otrocih s CF), medtem ko je bil delež izolatov, odpornih proti amoksicilinu s klavulansko kislino, pri slovenskih otrocih nižji (2,4 % pri slovenskih in 10,1 % pri italijanskih otrocih s CF). Prvo raziskavo o trendu odpornosti bakterij *H. influenzae* pri bolnikih s CF so objavili Ebbing in sod. (2015). Pri analizi odpornosti izolatov *H. influenzae*, osamljenih iz dihal otrok s CF med leti 1998 in 2012 v Avstraliji, so ugotovili, da je bilo največ izolatov odpornih proti ampicilinu (34,4 %), medtem ko je bila odpornost proti amoksicilinu s klavulansko kislino in cefotaksimu nizka (1,7 % in 0,2 %). Pri primerjavi naših izolatov *H. influenzae*, osamljenih iz vzorcev dihal otrok s CF, z izolati *H. influenzae*, osamljenimi iz različnih kliničnih vzorcev drugih slovenskih bolnikov v istem obdobju, nismo opazili večjih razlik v občutljivosti za testirane antibiotike (Štrumbelj in sod., 2012, 2013, 2014, 2016).

5.4 OBČUTLJIVOST IZOLATOV *P. aeruginosa*

V različnih raziskavah so potrdili, da so izolati *P. aeruginosa*, osamljeni iz bolnikov s CF, pomembno bolj odporni proti antibiotikom v primerjavi z drugimi izolati enake vrste (Lambert, 2002; Rao in sod., 2012). Prav tako so bili izolati *P. aeruginosa*, osamljeni iz slovenskih otrok s CF, pomembno bolj odporni proti testiranim aminoglikozidom v primerjavi z izolati *P. aeruginosa*, osamljenimi iz različnih kliničnih vzorcev slovenskih bolnikov v enakem časovnem obdobju. Po podatkih SKUOPZ je bila občutljivost izolatov *P. aeruginosa* za amikacin v letih 2011–2014 v povprečju 94 %, za gentamicin pa 90 %, medtem ko je bila v enakem obdobju občutljivost naših izolatov za amikacin v povprečju 76 %, za gentamicin pa 73 % (Štrumbelj in sod., 2012, 2013, 2014; 2016).

Med izolati *P. aeruginosa*, osamljenimi iz dihal otrok s CF v Sloveniji, je bilo v povprečju največ izolatov odpornih proti aminoglikozidom (gentamicinu, amikacinu in tobramicinu) in fluorokinolonom (ciprofloksacinu). Delež izolatov, občutljivih za vse testirane aminoglikozide, je bil leta 2014 višji v primerjavi z letom 2009 (Slika 7), vendar razlike statistično niso pomembne. V letu 2009 smo osamili kar 37,5 % izolatov, odpornih proti amikacinu, leta 2012 23,8 %, v letu 2014 pa je delež padel na 14,3 %. Odpornost proti gentamicinu in tobramicinu je v prvih letih testiranja nekoliko narasla, nato pa do leta 2014 zopet padla. Leta 2011 je bilo kar 40,0 % izolatov *P. aeruginosa* odpornih proti gentamicinu. Velika poraba določene vrste antibiotikov je pomemben dejavnik tveganja za nastanek bakterijske odpornosti proti tem antibiotikom. Okužbe dihal s *P. aeruginosa* pri otrocih s CF na Pediatrični kliniki najpogosteje zdravijo s kombinacijo peroralnega ciprofloksacina in inhalatornega tobramicina (Kotnik Pirš in Borinc Beden, 2009), kar bi lahko bil razlog za visok delež izolatov, odpornih proti tem antibiotikom.

Zaskrbljujoče je postopno naraščanje deleža izolatov, odpornih proti karbapenemom. V povprečju je bila občutljivost izolatov za imipenem 87,0 %, za meropenem pa 93,3 %. Delež izolatov, odpornih proti meropenemu, je v letu 2014 narasel. Razlog je lahko sprememba smernic (Priloga H), zato ne moremo trditi, da se je stopnja odpornosti proti meropenemu povečala. Opazili smo rahel trend naraščanja odpornosti proti imipenemu (z 8,5 % leta 2012 na 19 % leta 2014). Po podatkih SKOUPZ je bil delež izolatov *P. aeruginosa*, odpornih proti imipenemu, v letu 2012 10 %, leta 2014 pa 13 % (Štrumbelj in sod., 2013, 2016).

Največ izolatov je bilo občutljivih za piperacilin s tazobaktamom in ceftazidim. V vseh letih smo osamili samo en sev, odporen proti piperacilinu s tazobaktamom, (leta 2009) in dva izolata, odporna proti ceftazidimu, (leta 2009 in 2011). Največjo občutljivost izolatov *P. aeruginosa*, osamljenih iz dihal bolnikov s CF med letoma 2010 in 2014, za omenjena antibiotika so v svoji raziskavi opisali tudi Rutter in sod. (2016). Delež izolatov, občutljivih za cefepim, je znašal v povprečju 92,9 %. Opazen je trend naraščanja občutljivosti, s 87,5 % v letu 2009 na 100 % leta 2014. Občutljivost izolatov za ciprofloksacin je bila v povprečju 84,8 %. Občutljivost naših izolatov za cefepim in ciprofloksacin je primerljiva z občutljivostjo izolatov *P. aeruginosa* na nacionalni ravni (Štrumbelj in sod., 2012, 2013, 2014, 2016).

Statistično pomembna razlika v občutljivosti med leti se je pojavila le pri aztreonamu. Medtem ko je bila občutljivost v prvih petih letih testiranja višja od 83,9 % (leta 2012 in 2013 celo ni bilo odpornih izolatov), je v letu 2014 padla na 28,6 % ($p = 0,000$). Vsekakor je tu razlog za povečanja deleža odpornih izolatov sprememba smernic (Priloga H) in s tem kriterijev za posamezne kategorije občutljivosti (enako kot pri občutljivosti izolatov *H. influenzae* za azitromicin). Po merilih EUCAST je spodnja meja za občutljivost precej višje (≥ 50 mm) kot po merilih CLSI (≥ 22 mm). Kar 14 (66,7 %) izolatov *P. aeruginosa*

smo namreč osamili po aprilu 2014 in med njimi so bili vsi zmerno občutljivi za aztreonam.

5.4.1 Sluzni in ne-sluzni fenotip *P. aeruginosa*

P. aeruginosa je zelo prilagodljiv organizem, ki lahko raste na različnih substratih. Na okoljske spremembe se odzove s spremembo fenotipskih lastnosti (Lambert, 2002). Ena izmed prilagoditev je sprememba ne-sluznega v sluzni fenotip, ki je odpornejši proti antibiotikom in mehanizmom obrambe gostitelja, predvsem zaradi sposobnosti tvorbe biofilmov (Hector in sod., 2016). Med slovenskimi otroki s CF smo izolate *P. aeruginosa* sluznega fenotipa osamili pri 12 (14,5 %) otrocih.

Zaradi majhnega števila izolatov sluznega fenotipa nismo določali občutljivosti za antibiotike v posameznem letu, ampak smo združili vse prve izolate, ki smo jih iz dihal otrok s CF osamili v šestih letih. Izolati *P. aeruginosa* sluznega fenotipa so bili v primerjavi z izolati ne-sluznega fenotipa bolj odporni proti vsem testiranim antibiotikom, razen proti tobramcinu (Slika 8). Največjo razliko v občutljivosti med fenotipoma smo opazili pri amikacinu ($p = 0,002$) in ciprofloksacinu ($p = 0,004$). Statistično pomembne razlike pa so se pojavile tudi pri ceftazidimu, cefepimu in meropenemu (Priloga E). Glede na rezultate lahko le delno potrdimo hipotezo, postavljeno na začetku, da je občutljivost/odpornost izolatov sluznega fenotipa *P. aeruginosa* pri otrocih s CF primerljiva z občutljivostjo/odpornostjo izolatov ne-sluznega fenotipa *P. aeruginosa*.

Paixão in sod. (2010) so v svoji raziskavi bolnikov s CF v Braziliji (julij–december 2006) ugotovili, da so proti testiranim antibiotikom bolj odporni sevi sluznega fenotipa (večji delež odpornih sevov proti amikacinu, aztreonamu, ceftazidimu, imipenemu in tobramicinu). Največ izolatov obeh fenotipov je bilo odpornih proti gentamicinu (44 % in 45 %), kar je skladno z našimi rezultati. Nasprotno so Valenza in sod. (2008) v svoji raziskavi pokazali, da so proti vsem testiranim antibiotikom odpornejši izolati ne-sluznega fenotipa. Ciofu in sod. (2001) so kot možen razlog za večjo občutljivost izolatov sluznega tipa navedli, da izolati obeh fenotipov živijo v simbiozi znotraj biofilmov, pri čemer sevi sluznega fenotipa proizvajajo alginat in tako tvorijo biofilm, medtem ko imajo sevi ne-sluznega fenotipa vlogo zaščite pred antibiotiki.

5.4.2 Odpornost izolatov *P. aeruginosa* v odvisnosti od časa kolonizacije

P. aeruginosa je najpomembnejši bakterijski patogen pri bolnikih s CF tako glede razširjenosti kot tudi patogenosti (Gaspar in sod., 2013), zato je za uspešno zdravljenje okužb še toliko bolj pomembno spremljati razvoj odpornosti izolatov *P. aeruginosa* pri posameznem bolniku. Med slovenskimi otroki s CF, ki smo jih spremljali v celotnem obdobju, smo vsaj enkrat osamili izolate *P. aeruginosa* pri 39 (47,0 %) otrocih (Preglednica 11). Kar 18 (46,2 %) otrok s CF je bilo vseh šest let koloniziranih s sevi

P. aeruginosa, občutljivimi za vse testirane antibiotike, medtem ko smo pri 9 (23,1 %) otrocih samo v letu 2014 osamili izolate *P. aeruginosa*, odporne proti aztreonamu (kot že omenjeno je razlog za višji delež proti aztreonamu odpornih izolatov prehod na smernice EUCAST). Trije otroci s CF so bili v celotnem obdobju kolonizirani z večkratno odpornimi izolati *P. aeruginosa* sluznega fenotipa, pri ostalih devetih pa smo odporne izolate osamili samo v posameznih letih. Ugotovili smo, da se odpornost izolatov *P. aeruginosa* za posamezne antibiotike pri večini bolnikov s časom bistveno ne spreminja in s tem ovrgli na začetku postavljeno hipotezo. V šestih letih spremljanja odpornosti smo samo pri petih (12,8 %) otrocih s CF zaznali razvoj odpornosti proti karbapenemu, ki je na začetku testiranja ni bilo.

5.5 VEČKRATNO ODPORNE BAKTERIJE

Obstajajo različne definicije pojma večkratno odpornih bakterij. V naši raziskavi smo za opredelitev MDR bakterij izbrali standardno mednarodno definicijo, ki večkratno odpornost definira kot neobčutljivost (I ali R) za vsaj en antibiotik iz treh ali več skupin antibiotikov. Okužbe z MDR bakterijami so zaradi omejenega izbora antibiotikov težje ozdravljive in posledično pogosto povezane s slabšim izidom bolnikov (Magiorakos in sod., 2012). Pri bolnikih s CF veljata za najpogostejša večkratno odporna patogena *P. aeruginosa* in *S. aureus* (Rutter in sod., 2016), kar smo potrdili tudi v naši raziskavi. Med izolati, ki smo jih v šestletnem obdobju osamili iz dihal otrok s CF, je bilo 59 (18,1 %) MDR izolatov *S. aureus* in 16 (13,8 %) MDR izolatov *P. aeruginosa*, od tega jih je bilo sedem ne-sluznega in devet sluznega fenotipa. Rezultati ne potrjujejo hipoteze, postavljene na začetku, saj smo predvidevali, da bo delež MDR izolatov pri slovenskih otrocih s CF največji pri izolatih *P. aeruginosa*.

V letih 2009–2013 je delež MDR izolatov *S. aureus* naraščal (z 12,5 % leta 2009 na 23,3 % leta 2013), medtem ko je delež MDR izolatov *P. aeruginosa* upadal (z 22,2 % leta 2009 na 4,3 % leta 2013). Leta 2014 sta bila deleža MDR izolatov skoraj enaka (cca. 15 %). Zmanjševanje deleža MDR izolatov *P. aeruginosa* bi lahko bilo posledica izboljšane dvotirnega zdravljenja prvih okužb s *P. aeruginosa* in s tem preprečitve razvoja ali odložitve začetka kronične okužbe s sluznim fenotipom. Vsi osamljeni izolati MRSA so bili večkratno odporni. MDR izolate *H. influenzae* smo osamili samo v letu 2014 pri treh otrocih s CF, kar lahko nakazuje na verjetnost pridobitve novih odpornosti in posledično možnost naraščanja prevalence MDR sevov *H. influenzae* v prihodnjih letih. O nizkem deležu MDR izolatov *H. influenzae* poročajo tudi Cardines in sod. (2012). Kolonizacijo z MDR izolati so v petletnem obdobju opazili samo pri 1/300 otrok s CF (Cardines in sod., 2012). Z MDR sevi *S. aureus* je bilo koloniziranih 19 (24,4 %), z MDR sevi *P. aeruginosa* pa osem (17,8 %) otrok s CF. Predvidevamo lahko, da bi bil delež MDR izolatov še večji, če bi izolate testirali za vse antibiotike v vseh skupinah antibiotikov.

5.6 STOPNJA ODPORNOSTI IZOLATOV

Stopnjo odpornosti treh najpogostejših izolatov smo določili z izračunom povprečnega, najmanjšega in največjega deleža (%) za posamezen antibiotik občutljivih izolatov v celotnem obdobju testiranja. Prav tako kot delež MDR izolatov, je bila tudi stopnja odpornosti po pričakovanjih najnižja pri izolatih *H. influenzae*, saj je bil povprečni delež občutljivih izolatov v letih 2009–2014 višji od 90 % kar pri 6/8 testiranih antibiotikov. Odpornost izolatov *S. aureus* in *P. aeruginosa* je bila višja. S slike 10 je razvidno, da so bile razlike med najmanjšim in največjim deležem občutljivih izolatov pri vrsti *P. aeruginosa* večje, kar je lahko posledica manjšega števila osamljenih izolatov. Zaradi visokega deleža izolatov, odpornih proti penicilinu, bi lahko rekli, da je bila stopnja odpornosti izolatov *S. aureus* višja v primerjavi z izolati *P. aeruginosa*, kar ni v skladu z našo hipotezo.

6 SKLEPI

- Najpogostejši izolati, osamljeni iz dihal otrok s CF v Sloveniji, so bili *S. aureus*, *H. influenzae* in *P. aeruginosa*.
- Povprečna starost otrok s CF, pri katerih smo v opazovanem obdobju osamili izolate *P. aeruginosa*, je bila višja od povprečne starosti otrok s CF, pri katerih smo osamili izolate *S. aureus* in *H. influenzae*.
- Vsi izolati *S. aureus* so bili občutljivi za teikoplanin in vankomicin. V povprečju je bila občutljivost *S. aureus* za rifampin, trimetoprim s sulfametoksazolom in tetraciklin v celotnem obdobju višja od 90 %, medtem ko je bil delež sevov *S. aureus*, odpornih proti penicilinu, v vseh letih višji od 85 %.
- Izolate MRSA smo osamili samo pri enem otroku s CF. Delež MRSA med izolati *S. aureus*, osamljenimi iz dihal otrok s CF v Sloveniji, je bil 1,8 %.
- Vsi izolati *H. influenzae* so bili občutljivi za cefotaksim in moksifloksacin. Prav tako je bila občutljivost *H. influenzae* za ampicilin s klavulansko kislino v vseh letih višja od 90 %. V povprečju je bilo največ izolatov odpornih proti trimetoprimu s sulfametoksazolom (20,9 %), sledijo izolati, odporni proti ampicilinu (11,6 %) in tetraciklinu (8,2 %).
- Najvišjo stopnjo odpornosti *P. aeruginosa* smo opazili proti aminoglikozidom (amikacinu, gentamicinu, tobramicinu) in ciprofloksacinu, medtem ko je bilo v povprečju največ izolatov *P. aeruginosa* občutljivih za ceftazidim (99,8 %) in piperacilin s tazobaktamom (99,5 %).
- S sluznim fenotipom *P. aeruginosa* je bilo koloniziranih 12 (4,5 %) otrok s CF. Odpornost izolatov sluznega fenotipa *P. aeruginosa* je bila pri otrocih s CF v Sloveniji višja od odpornosti izolatov ne-sluznega fenotipa.
- Odpornost izolatov *P. aeruginosa* proti večini antibiotikov se pri posameznih otrocih s CF s časom ni spremenila. Pri petih otrocih s CF smo med raziskavo opazili pojav proti karbapenemom odpornih izolatov *P. aeruginosa*.
- Stopnja odpornosti in delež večkratno odpornih izolatov pri slovenskih otrocih s CF sta bila največja pri izolatih vrste *S. aureus*.

7 POVZETEK

Cistična fibroza je najpogostejša avtosomno recesivna dedna bolezen, ki vpliva na delovanje različnih organskih sistemov, predvsem dihal, prebavil, trebušne slinavke in jeter. Klinični znaki bolezni so posledica mutacije gena *CFTR*, ki nosi zapis za kloridni kanalček na zunanji membrani epitelijskih celic. Zaradi mutacije se poruši elektrolitsko ravnovesje, ki v dihalih povzroči kopičenje in zastajanje sluzi, kar ustvari ugodne pogoje za razvoj patogenov. Bakterijske okužbe dihal so glavni vzrok obolevnosti in umrljivosti bolnikov s CF. V začetni fazi bolezni (pri novorojenčkih in otrocih) sta najpogostejša povzročitelja okužb dihal *S. aureus* in *H. influenzae*, pozneje v otroštvu, ko bolezen napreduje, pa pride do kolonizacije dihal z bakterijo *P. aeruginosa*, ki je v primeru kronične okužbe glavni krivec za postopno upadanje pljučne funkcije. Poleg omenjenih bakterijskih vrst med tipične oportunistične bakterije pri bolnikih s CF sodijo še *S. maltophilia*, *A. xylosoxidans*, bakterije kompleksa *B. cepacia* in netuberkulozne mikobakterije.

Zdravljenje bolnikov s CF zahteva multidisciplinarni pristop, ki vključuje tako zdravnike in medicinske sestre kot tudi psihologe, dietetike in socialne delavce. Zaradi napredka v zdravljenju z antibiotiki in nadomestki pankreatičnih encimov, podpornega prehranskega zdravljenja in celovite obravnave v centrih za CF sta se v zadnjem desetletju pomembno izboljšali kvaliteta in pričakovana življenjska doba bolnikov, a kljub temu CF še vedno ostaja neozdravljiva bolezen. Za vzdrževanje dobrega stanja dihal je poleg ostalih ukrepov pomembno aktivno iskanje okužb in njihovo hitro in usmerjeno antibiotično zdravljenje. Pljuča bolnikov s CF predstavljajo posebno okolje, na katerega so se bakterije prilagodile s spremembo genotipskih in posledično fenotipskih lastnosti. Sposobnost povzročanja okužbe jim omogočajo številni virulentni dejavniki, za neovirano rast in razmnoževanje v prisotnosti antibiotikov pa so razvile različne mehanizme odpornosti proti antibiotikom, kot so zmanjšana prepustnost celične membrane za antibiotike, aktivno izčrpavanje antibiotikov iz celice, encimska modifikacija in inaktivacija antibiotikov, sprememba tarčnega mesta oz. prijemališča antibiotika in sprememba presnovne poti, na katero antibiotik deluje.

Poznavanje občutljivosti povzročiteljev okužb dihal pri bolnikih s CF je pomembno za preverjanje ustreznosti empiričnega zdravljenja v skladu z evropskimi smernicami. Ker v Sloveniji zaenkrat še nimamo sistematičnega pregleda povzročiteljev okužb dihal in njihove občutljivosti za antibiotike pri slovenskih otrocih s CF, smo se odločili, da bomo to analizirali v naši magistrski nalogi. V raziskavo smo vključili 83 otrok s CF, ki jih vodijo v Centru za cistično fibrozo na Pediatrični kliniki Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Retrospektivno smo zajeli vse bakterijske izolate, ki so bili na IMI MF UL osamljeni iz vzorcev dihal teh bolnikov v letih 2009–2014.

V celotnem obdobju smo iz dihal otrok s CF osamili 1073 prvih izolatov, ki so pripadali 62 različnim vrstam patogenih bakterij. Najpogostejši bakterijski izolati so bili *S. aureus*, *H. influenzae* in *P. aeruginosa*, ki so v skupnem predstavljali več kot polovico vseh izolatov. Izolate *S. aureus* smo osamili kar pri 78 (94,0 %) otrocih s CF. Z bakterijo *H. influenzae* je bilo koloniziranih 57 (68,7 %), s *P. aeruginosa* pa 45 (54,2 %) otrok s CF. Izolate MRSA smo osamili samo pri enem, izolate *P. aeruginosa* sluznega fenotipa pa pri 12 otrocih s CF. Ugotovili smo, da so bili otroci s CF ob prvi osamitvi *P. aeruginosa* v povprečju starejši od otrok s CF, pri katerih smo osamili vrsti *S. aureus* in *H. influenzae*.

V drugem delu raziskave smo analizirali občutljivost najpogostejših bakterijskih vrst za antibiotike in primerjali deleže občutljivosti glede na leto osamitve. Pri vseh izolatih je bila občutljivost za antibiotike že določena z metodo difuzijskega antibiograma z diski med rutinskimi preiskavami. Razlike v občutljivosti za določene antibiotike med posameznimi skupinami smo statistično ovrednotili s testom χ^2 na kontingenčnih tabelah.

Največ izolatov *S. aureus* je bilo po pričakovanju odpornih proti penicilinu, in sicer je bil delež proti penicilinu odpornih izolatov v vseh letih večji od 85 %. Nasprotno so bili vsi izolati občutljivi za teikoplanin in vankomicin, občutljivost za rifampin, trimetoprim s sulfametoksazolom in tetraciklin pa je bila v celotnem obdobju raziskave višja od 90 %. Delež za ciprofloksacin občutljivih izolatov je z leti upadel, medtem ko smo pri eritromicinu opazili rahel trend naraščanja odpornosti. Deleži izolatov *S. aureus*, občutljivih za klindamicin, gentamicin in tobramicin, med leti nihajo, vendar pri tem razlike niso statistično značilne. V primerjavi s podatki SKUOPZ o občutljivosti *S. aureus* v Sloveniji so bili izolati *S. aureus*, osamljeni iz otrok s CF, bolj odporni proti večini testiranih antibiotikov.

Občutljivost izolatov *H. influenzae*, osamljenih iz dihal otrok s CF, je bila za večino testiranih antibiotikov višja od 80 %. Vsi izolati so bili občutljivi za cefotaksim in moksifloksacin, prav tako smo v vseh šestih letih osamili samo štiri izolate, odporne proti amoksicilinu s klavulansko kislino, in štiri izolate, odporne proti parenteralnemu cefuroksimu. V povprečju je bilo največ izolatov odpornih proti trimetoprimu s sulfametoksazolom (20,9 %), sledijo izolati, odporni proti ampicilinu (11,6 %) in tetraciklinu (8,2 %). Statistično pomembno zmanjšanje občutljivosti smo opazili pri azitromicinu, saj je delež občutljivih izolatov *H. influenzae* s 100 % v letih 2011–2013 padel na 26,7 % v letu 2014, kar pa je najverjetneje posledica prehoda s smernic CLSI na EUCAST. Glede na podatke SKUOPZ je bila občutljivost naših izolatov primerljiva z občutljivostjo *H. influenzae* v Sloveniji.

Izolati *P. aeruginosa*, osamljeni iz otrok s CF, so bili pomembno bolj odporni proti antibiotikom v primerjavi z izolati *P. aeruginosa* iz kliničnih vzorcev drugih bolnikov v Sloveniji. Najvišjo stopnjo odpornosti *P. aeruginosa* smo opazili proti aminoglikozidom

(amikacinu, gentamicinu, tobramicinu) in ciprofloksacinu, medtem ko je bilo v povprečju največ izolatov občutljivih za ceftazidim in piperacilin s tazobaktamom (> 99 %). Občutljivost izolatov *P. aeruginosa* je bila za vse testirane aminoglikozide v letu 2014 višja kot leta 2009, vendar razlike niso statistično značilne. Statistično pomembna razlika v občutljivosti se je pojavila samo pri aztreonamu v zadnjem letu raziskave, ko je delež občutljivih izolatov padel na 28,6 %, vendar je ta posledica spremembe smernic. Rahel trend naraščanja občutljivosti smo opazili tudi pri cefepimu, medtem ko gibanje deleža izolatov, občutljivih za meropenem in imipenem, kaže trend padanja. Pri primerjavi občutljivosti izolatov *P. aeruginosa* različnih fenotipov smo opazili, da so izolati sluznega fenotipa pri otrocih s CF v Sloveniji odpornejši proti vsem testiranim antibiotikom, z izjemo tobramicina. Odpornost izolatov *P. aeruginosa* proti večini antibiotikov se pri posameznih otrocih s CF s časom kolonizacije ni bistveno spremenila. Pri petih otrocih s CF smo med raziskavo opazili pojav izolatov *P. aeruginosa*, odpornih proti karbapenemom.

Stopnja odpornosti in delež MDR izolatov sta bila najvišja pri izolatih vrste *S. aureus*, kar ni v skladu z našo začetno hipotezo. Predvidevali smo, da bomo pri otrocih s CF osamili največ MDR izolatov *P. aeruginosa*. Tako delež MDR izolatov kot tudi stopnja odpornosti sta bila po pričakovanjih najnižja pri izolatih *H. influenzae*.

8 VIRI

- Antoniou S., Elston C. 2016. Cystic fibrosis. *Medicine*, 44, 5: 321–325
- Bae S., Lee J., Lee J., Kim E., Lee S., Yu J., Kang Y. 2010. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae* respiratory tract isolates in Korea: results of a nationwide acute respiratory infections surveillance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 1: 65–71
- Beović B., Nadrah K. 2014. Protibakterijska zdravila. V: Infekcijske bolezni. Tomažič J., Strle F. (ur.). 1. izd. Ljubljana, Združenje za infektologijo, Slovensko zdravniško društvo: 48–67
- Berkebile A. R., McCray P. B. Jr. 2014. Effects of airway surface liquid pH on host defense in cystic fibrosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 52: 124–129
- Besier S., Smaczny C., von Mallinckrodt C., Krahel A., Ackermann H., Brade V., Wichelhaus T. A. 2007. Prevalence and clinical significance of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis lung disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 1: 168–172
- Borinc Beden A., Breclj J., Bratanič N., Homan M., Homšak M., Jenko K., Kenig A., Oštir M., Skočir L., Širca Čampa A. 2008. Smernice za obravnavo otrok s cistično fibrozo. *Zdravniški vestnik*, 77, 10: 679–692
- Bowen S. J., Hull J. 2015. The basic science of cystic fibrosis. *Paediatrics and Child Health*, 25, 4: 159–164
- Burns J. L., Gibson R. L., McNamara S., Yim D., Emerson J., Rosenfeld M., Hiatt P., McCoy K., Castile R., Smith A. L., Ramsey B. W. 2001. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 183, 3: 444–452
- Cardines R., Giufrè M., Pompilio A., Fiscarelli E., Ricciotti G., Di Bonaventura G., Cerquetti M. 2012. *Haemophilus influenzae* in children with cystic fibrosis: antimicrobial susceptibility, molecular epidemiology, distribution of adhesins and biofilm formation. *International Journal of Medical Microbiology*, 302, 1: 45–52

- Castellani C., Southern K. W., Brownlee K., Dankert Roelse J., Duff A., Farrell M., Mehta A., Munck A., Pollitt R., Sermet-Gaudelus I., Wilcken B., Ballmann M., Corbetta C., de Monestrol I., Farrell P., Feilcke M., Férec C., Gartner S., Gaskin K., Hammermann J., Kashirskaya N., Loeber G., Macek M. Jr., Mehta G., Reiman A., Rizzotti P., Sammon A., Sands D., Smyth A., Sommerburg O., Torresani T., Travert G., Vernooij A., Elborn S. 2009. European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening. *Journal of Cystic Fibrosis*, 8, 3: 153–173
- CFF. 2015. Cystic Fibrosis Foundation patient registry annual data report 2014. Bethesda, Maryland, Cystic Fibrosis Foundation: 90 str.
<https://www.cff.org/2014-Annual-Data-Report.pdf> (junij 2016)
- CFMD. 2016. CFMDB statistics. Toronto, Cystic Fibrosis Mutation Database: 2 str.
<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html> (junij 2016)
- Champion E. A., Miller M. B., Popowitch E. B., Hobbs M. M., Saiman L. S. 2014. Antimicrobial susceptibility and molecular typing of MRSA in cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology*, 49, 3: 230–237
- Chibabhai V., Lowman W. 2016. Epidemiology of cystic fibrosis respiratory pathogens isolated at a South African Hospital, 2006–2010. *Southern African Journal of Infectious Diseases*, 1, 1, doi: 10.1080/23120053.2016.1156864: 6 str.
- Chmiel J. F., Aksamit T. R., Chotirmall S. H., Dasenbrook E. C., Elborn J. S., LiPuma J. J., Ranganathan S. C., Waters V. J., Ratjen F. A. 2014. Antibiotic management of lung infections in cystic fibrosis. I. The microbiome, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, gram-negative bacteria, and multiple infections. *Annals of the American Thoracic Society*, 11, 7: 1120–1129
- Ciofu O., Fussing V., Bagge N., Koch C., Høiby N. 2001. Characterization of paired mucoid/non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Danish cystic fibrosis patients: antibiotic resistance, beta-lactamase activity and RiboPrinting. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 3: 391–396
- Ciofu O., Hansen C. R., Høiby N. 2013. Respiratory bacterial infections in cystic fibrosis. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 19, 3: 251–258
- CLSI. 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fourth informational supplement. M100-S24. Wayne, Clinical and Laboratory Standards Institute: 230 str.
<http://microbiolab-bg.com/wp-content/uploads/2015/05/CLSI-2014.pdf> (junij 2016)

- Cox M. J., Allgaier M., Taylor B., Baek M. S., Huang Y. J., Daly R. A., Karaoz U., Andersen G. L., Brown R., Fujimura K. E., Wu1 B., Tran D., Koff J., Kleinhenz M. E., Nielson D., Brodie E. L., Lynch S. V. 2010. Airway microbiota and pathogen abundance in age-stratified cystic fibrosis patients. PLoS ONE, 5, 6: e11044, doi: 10.1371/journal.pone.0011044: 10 str.
- Davis P. B. 2006. Cystic fibrosis since 1938. The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 173, 5: 475–482
- Denis O., Nonhoff C., Byl B., Knoop C., Bobin-Dubreux S., Struelens M. J. 2002. Emergence of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a Belgian hospital: microbiological and clinical features. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 50, 3: 383–391
- Döring G., Flume P., Heijerman H., Elborn J. S. 2012. Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: current and future strategies. Journal of Cystic Fibrosis, 11, 6: 461–479
- Ebbing R., Robertson C. F., Robinson P. J. 2015. *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* in cystic fibrosis: 15 years experience. Journal of Medical Microbiology & Diagnosis, S5, 004, doi: 10.4172/2161-0703.S5-004: 5 str.
- Elborn J. S. 2016. Cystic fibrosis. The Lancet, doi:10.1016/S0140-6736(16)00576-6: 13 str., [v tisku]
- Esposito S., Colombo C., Tosco A., Montemitro E., Volpi S., Ruggiero L., Lelii M., Bisogno A., Pelucchi C., Principi N. 2016. *Streptococcus pneumoniae* oropharyngeal colonization in children and adolescents with cystic fibrosis. Journal of Cystic Fibrosis, 15, 3: 366–371
- EUCAST. 2014. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0. Växjö, The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: 80 str. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_4.0.pdf (junij 2016)
- Farrell P. M., Rosenstein B. J., White T. B., Accurso F. J., Castellani C., Cutting G. R., Durie P. R., Legrys V. A., Massie J., Parad R. B., Rock M. J., Campbell P. W. 2008. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. The Journal of Pediatrics, 153, 2: S4–S14

- Filleron A., Chiron R., Reverdy M. E., Jean-Pierre H., Dumitrescu O., Aleyrangues L., Counil F., Jumas-Bilak E., Marchandin H. 2011. *Staphylococcus aureus* with decreased susceptibility to glycopeptides in cystic fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis*, 10, 5: 377–382
- Folkesson A., Jelsbak L., Yang L., Johansen H. K., Ciofu O., Høiby N., Molin S. 2012. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 12: 841–851
- Gaspar M. C., Couet W., Olivier J. C., Pais A. A., Sousa J. J. 2013. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis lung disease and new perspectives of treatment: a review. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 32, 10: 1231–1252
- Gilligan P. H. 2014. Infections in patients with cystic fibrosis: diagnostic microbiology update. *Clinics in Laboratory Medicine*, 34, 2: 197–217
- Gilsdorf J. R. 2015. What the pediatrician should know about non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Journal of Infection*, 71, Suppl. 1: S10-S14
- Goss C. H., Muhlebach M. S. 2011. *Staphylococcus aureus* and MRSA in cystic fibrosis, review. *Journal of Cystic Fibrosis*, 10, 5: 298–306
- Hansen C. R. 2012. *Stenotrophomonas maltophilia*: to be or not to be a cystic fibrosis pathogen. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 18, 6: 628–631
- Harik N. S., Com G., Tang X., Melguizo Castro M., Stemper M. E., Carroll J. L. 2016. Clinical characteristics and epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in children with cystic fibrosis from a center with a high MRSA prevalence. *American Journal of Infection Control*, 44, 4: 409–415
- Harrison F. 2007. Microbial ecology of the cystic fibrosis. *Microbiology*, 153, 4: 917–923
- Hauser A. R., Jain M., Bar-Meir M., McColley S. A. 2011. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 24, 1: 29–70
- Hector A., Frey N., Hartl D. 2016. Update on host-pathogen interactions in cystic fibrosis lung disease. *Molecular and Cellular Pediatrics*, 3, 12, doi: 10.1186/s40348-016-0039-5: 3 str.
- Howden B. P., Peleg A. Y., Stinear T. P. 2014. The evolution of vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogenous-VISA. *Infection, Genetics and Evolution*, 21: 575–582

- Ihan A. 2002. Pnevmonok. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 155–158
- Islam S., Oh H., Jalal S., Karpati F., Ciofu O., Høiby N., Wretling B. 2009. Chromosomal mechanisms of aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Clinical Microbiology and Infection*, 15, 1: 60–66
- Jorgensen J. H., Ferraro M. J. 2009. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49, 11: 1749–1755
- Kerr K. G., Snelling A. M. 2009. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *Journal of Hospital Infection*, 73, 4: 338–344
- Khanbabaee G., Akbarizadeh M., Sayyari A., Ashayeri-Panah M., Abdollahgorji F., Sheibani K., Rezaei N. 2012. A survey on pulmonary pathogens and their antibiotic susceptibility among cystic fibrosis patients. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16, 2: 122–128
- King P. 2012. *Haemophilus influenzae* and the lung (*Haemophilus* and the lung). *Clinical and Translational Medicine*, 1, 10, doi: 10.1186/2001-1326-1-10: 9 str.
- Klepac-Ceraj V., Lemon K. P., Martin T. R., Allgaier M., Kembel S. W., Knapp A. A., Lory S., Brodie E. L., Lynch S. V., Bohannon B. J., Green J. L., Maurer B. A., Kolter R. 2010. Relationship between cystic fibrosis respiratory tract bacterial communities and age, genotype, antibiotics and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 12, 5: 1293–1303
- Kostyanov T. S., Sechanova L. P. 2012. Virulence factors and mechanisms of antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae*. *Folia Medica*, 54, 1: 19–23
- Košmelj K. 2007. Uporabna statistika. 2. dopolnjena izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 239 str.
http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2721/Uporabna_statistika_okt_2007/Uporabna_statistika_01.pdf
(oktober 2015)
- Kotnik Pirš A., Borinc Beden A. 2009. Slovenski register otrok s cistično fibrozo in zgodnje eradikacijsko zdravljenje okužbe z bakterijo *Pseudomonas aeruginosa*. V: Zbornik Golniški simpozij 2009, Golnik, Bled, 1.–3. oktober 2009. Košnik M. (ur.). Golnik, Bolnišnica, Klinika za pljučne bolezni in alergijo: 35–37

- Kotnik Pirš A., Praprotnik M., Trebušak Podkrajšek K., Seme K., Aldeco M., Lepej D., Brecelj J., Bratanič N., Krivec U. 2014. Značilnosti otrok in mladostnikov s cistično fibrozo v Sloveniji. *Slovenska pediatrija*, 21, 2: 164–171
- Kotnik V. 2002. Antibiotiki in kemoterapevtiki. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 427–438
- Lambert P. A. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 95, Supl. 41: 22–26
- LiPuma J. J. 2010. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 23, 2: 299–323
- Livermore D. M. 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clinical Infectious Diseases*, 34, 5: 634–640
- Lowy F. D. 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation*, 111, 9: 1265–1273
- Lutz L., Leão R. S., Ferreira A. G., Pereira D. C., Raupp C., Pitt T., Marques E. A., Barth A. L. 2013. Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients from two Brazilian cities. *Journal of Clinical Microbiology*, 51, 3: 927–930
- Magiorakos A. P., Srinivasan A., Carey R. B., Carmeli Y., Falagas M. E., Giske C. G., Harbarth S., Hindler J. F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D. L., Rice L. B., Stelling J., Struelens M. J., Vatopoulos A., Weber J. T., Monnet D. L. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, 3: 268–281
- Masoud-Landgraf L., Zarfel G., Kaschnigg T., Friedl S., Feierl G., Wagner-Eibel U., Eber E., Grisold A. J., Kittinger C. 2016. Analysis and characterization of *Staphylococcus aureus* small colony variants isolated from cystic fibrosis patients in Austria. *Current Microbiology*, 72, 5: 606–611
- Mesquita C. S., Soares-Castro P., Santos P. M. 2013. *Pseudomonas aeruginosa*: phenotypic flexibility and antimicrobial resistance. V: *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Méndez-Vilas A. (ed.). Badajoz, Formatex Research Center: 650–665
- Miall L. S., McGinley N. T., Brownlee K. G., Conway S. P. 2001. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in cystic fibrosis. *Archives of Disease in Childhood*, 84, 2: 160–162

- Oliver A., Mena A. 2010. Bacterial hypermutation in cystic fibrosis, not only for antibiotic resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 16, 7: 798–808
- Oštir M., 2009. Vodenje otrok s cistično fibrozo na Pediatrični kliniki Ljubljana. V: Zdravstvena obravnava bolnika z obstruktivno boleznijo pljuč in cističnih fibroz. Zbornik predavanj: program za medicinske sestre in zdravstvene tehnike. 7. Golniški simpozij, Golnik, 2.–3. oktober 2009. Kadivec S. (ur.). Golnik, Bolnišnica, Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo: 81–84
- Paixão V. A., Barros T. F., Mota C. M., Moreira T. F., Santana M. A., Reis J. N. 2010. Prevalence and antimicrobial susceptibility of respiratory pathogens in patients with cystic fibrosis. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 14, 4: 406–409
- Paterson G. K., Harrison E. M., Holmes M. A. 2014. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, 22, 1: 42–47
- Poole K. 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Frontiers in Microbiology*, 2, 65, doi: 10.3389/fmicb.2011.00065: 13 str.
- Praprotnik M., Kotnik Pirš A., Salobir B., Oštir M., Turel M., Krivec U. 2015. Novosti v obravnavi pljučne bolezni pri otrocih in mladostnikih s cistično fibrozo. *Zdravniški vestnik*, 84, 2: 143–152
- Proesmans M., Vermeulen F., De Boeck K. 2008. What's new in cystic fibrosis? From treating symptoms to correction of the basic defect. *European Journal of Pediatrics*, 167, 8: 839–849
- Proesmans M., Vermeulen F., Boulanger L., Verhaegen J., De Boeck K. 2013. Comparison of two treatment regimens for eradication of *Pseudomonas aeruginosa* infection in children with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 12, 1: 29–34
- Prunier A. L., Malbruny B., Laurans M., Brouard J., Duhamel J. F., Leclercq R. 2003. High rate of macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* strains from patients with cystic fibrosis reveals high proportions of hypermutable strains. *The Journal of Infectious Diseases*, 187, 11: 1709–1716
- Pulido M. R., García-Quintanilla M., Martín-Peña R., Cisneros J. M., McConnell M. J. 2013. Progress on the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68, 12: 2710–2717

- Rao P., McCaughan J., McCalmont M., Goldsmith C. E., Hall V., Millar B. C., McCann M. A., Downey D. G., Rendall J. C., Elborn J. S., Moore J. E. 2012. Comparison of antibiotic susceptibility patterns in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from adult patients with cystic fibrosis (CF) with invasive *Pseudomonas aeruginosa* from non-CF patients. *Journal of Cystic Fibrosis*, 11, 4: 349–352
- Reygaert W. C. 2013. Antimicrobial resistance mechanisms of *Staphylococcus aureus*. V: *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Méndez-Vilas A. (ed.). Badajoz, Formatex Research Center: 297–305
- Roberts M. C., Soge O. O., No D. B. 2011. Characterization of macrolide resistance genes in *Haemophilus influenzae* isolated from children with cystic fibrosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 1: 100–104
- Rogers G. B., Carroll M. P., Serisier D. J., Hockey P. M., Jones G., Bruce K. D. 2004. Characterization of bacterial community diversity in cystic fibrosis lung infections by use of 16S ribosomal DNA terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 11: 5176–5183
- Román F., Cantón R., Pérez-Vázquez M., Baquero F., Campos J. 2004. Dynamics of long-term colonization of respiratory tract by *Haemophilus influenzae* in cystic fibrosis patients shows a marked increase in hypermutable strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 4: 1450–1459
- Rutter W. C., Burgess D. R., Burgess D. S. 2016. Increasing incidence of multidrug resistance among cystic fibrosis respiratory bacterial isolates. *Microbial Drug Resistance*, doi: 10.1089/mdr.2016.0048: 5 str., [v tisku]
- Samson C., Tamalet A., Thien H. V., Taytard J., Perisson C., Nathan N., Clement A., Boelle P. Y., Corvol H. 2016. Long-term effects of azithromycin in patients with cystic fibrosis. *Respiratory Medicine*, 117, doi: 10.1016/j.rmed.2016.05.025: 6 str.
- Seme K. 2002a. Mehanizmi bakterijske odpornosti proti antibiotikom. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 439–446
- Seme K. 2002b. Stafilokoki. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 139–145
- Sherrard L. J., Tunney M. M., Elborn J. S. 2014. Antimicrobial resistance in the respiratory microbiota of people with cystic fibrosis. *The Lancet*, 384, 9944: 703–713

- Solís A., Brown D., Hughes J., Van Saene H. K. F, Heaf D. P. 2003. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with cystic fibrosis: an eradication protocol. *Pediatric Pulmonology*, 36, 3: 189–195
- Sosnay P. R., Siklosi K. R., Van Goor F., Kaniecki K., Yu H., Sharma N., Ramalho A. S., Amaral M. D., Dorfman R., Zielenski J., Masica D. L., Karchin R., Millen L., Thomas P. J., Patrinos G. P., Corey M., Lewis M. H., Rommens J. M., Castellani C., Penland C. M., Cutting G. R. 2013. Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nature Genetics*, 45, 10: 1160–1167
- Starner T. D., Zhang N., Kim G., Apicella M. A., McCray P. B. Jr. 2006. *Haemophilus influenzae* forms biofilms on airway epithelia: implications in cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 174, 2: 213–220
- Štrumbelj I., Berce I., Čretnik-Žohar T., Harlander T., Jeverica S., Kavčič M., Kolman J., Lorenčič-Robnik S., Mueller-Premru M., Paragi M., Piltaver Vajdec I., Pirš M., Ribič H., Seme K., Tomič V., Zdolšek B., Žolnir-Dovč M. 2012. Pregled občutljivosti bakterij za antibiotike – Slovenija 2011. 1. izd. Ljubljana, Slovenska komisija za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila: 33 str.
<http://www.imi.si/strokovna-zdruzenja/skuopz/dokumenti/bakterijska-obcutljivost-v-sloveniji-2011.pdf> (julij 2016)
- Štrumbelj I., Berce I., Čretnik-Žohar T., Harlander T., Jeverica S., Kavčič M., Kolman J., Lorenčič-Robnik S., Mueller-Premru M., Paragi M., Piltaver Vajdec I., Pirš M., Ribič H., Seme K., Tomič V., Zdolšek B., Žolnir-Dovč M. 2013. Pregled občutljivosti bakterij za antibiotike – Slovenija 2012. 1. izd. Ljubljana, Slovenska komisija za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila: 34 str.
http://www.imi.si/strokovna-zdruzenja/skuopz/dokumenti/novo_bakterijska-obcutljivost-v-sloveniji-2012_final.pdf (julij 2016)
- Štrumbelj I., Berce I., Harlander T., Jeverica S., Kavčič M., Kolman J., Lorenčič Robnik S., Mueller-Premru M., Paragi M., Piltaver Vajdec I., Pirš M., Ribič H., Seme K., Štorman A., Tomič V., Zdolšek B., Žolnir-Dovč M. 2014. Pregled občutljivosti bakterij za antibiotike – Slovenija 2013. 1. izd. Ljubljana, Slovenska komisija za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila: 32 str.
http://www.imi.si/strokovna-zdruzenja/skuopz/dokumenti/skoupoz_porocilo_2013.pdf (julij 2016)

- Štrumbelj I., Ribič H., Pirš M. 2015. Kratka pojasnila – uporaba evropskih smernic za antibiogram – EUCAST 2015. Ljubljana, Slovenska komisija za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila: 15 str.
<http://www.imi.si/strokovna-zdruzenja/skuopz/dokumenti/NOVO%202015%20Kratka%20pojasnila%20-%20uporaba%20evropskih%20smernic%20za%20antibiogram%20-%20EUCAST%202015.pdf> (junij 2016)
- Štrumbelj I., Pirš M., Berce I., Fišer J., Golle A., Harlander T., Jeverica S., Kavčič M., Kolman J., Lorenčič-Robnik S., Matos T., Mioč V., Mueller-Premru M., Paragi M., Piltaver Vajdec I., Ribič H., Seme K., Štorman A., Tomič V., Zdolšek B., Žolnir-Dovč M. 2016. Pregled občutljivosti bakterij za antibiotike – Slovenija 2014. 1. izd. Ljubljana, Slovenska komisija za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila: 37 str.
http://www.imi.si/strokovna-zdruzenja/skuopz/dokumenti/skoupz_porocilo_2014.pdf (julij 2016)
- Tristram S., Jacobs M. R., Appelbaum P. C. 2007. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clinical Microbiology Reviews*, 20, 2: 368–389
- Valenza G., Tappe D., Turnwald D., Frosch M., König C., Hebestreit H., Abele-Horn M. 2008. Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 7, 2: 123–127
- Watson M. E. Jr., Burns J. L., Smith A. L. 2004. Hypermutable *Haemophilus influenzae* with mutations in *mutS* are found in cystic fibrosis sputum. *Microbiology*, 150, 9: 2947–2958

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Katji Seme za prevzem mentorstva in strokovno vodenje tekom izdelave magistrske naloge. Hvala za prijaznost, posredovano znanje in dragocene nasvete.

Iskrena hvala recenzentki doc. dr. Jerneji Ambrožič Avguštin
za recenzijo magistrske naloge.

Hvala Katji za natančno lektoriranje.

Najlepša hvala staršem, ki so mi omogočili brezskrben študij. Hvala za
vso podporo in pomoč pri uresničevanju mojih ciljev.

Hvala sošolkam Andreji, Nataši in Tini za pomoč pri študiju in popestritev študentskih let.

Hvala tudi vsem prijateljem, sodelavcem in predvsem Hani za razumevanje in
spodbudne misli med pisanjem magistrske naloge.

In na koncu posebna zahvala možu Klemenu za vso potrpežljivost. Hvala, ker ves čas
verjameš vame, me spodbujaš in mi stojiš ob strani. S tabo je vse lažje.

*»Ko hodiš, pojdi zmeraj do konca. Spomladi do rožne cvetice, poleti do zrele pšenice,
jeseni do polne police, pozimi do snežne kraljice, v knjigi do zadnje vrstice, v življenju do
prave resnice, a v sebi – do rdečice čez eno in drugo lice. A če ne prideš ne prvič, ne
drugič do krova in pravega kova poskusi: vnovič in zopet in znova.«*

Tone Pavček

PRILOGE

Priloga A: Število in delež (%) vseh prvih izolatov, osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.

Izolat	Število izolatov	Delež (%) izolatov
<i>Staphylococcus aureus</i>	326	30,4
<i>Haemophilus influenzae</i>	134	12,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	116	10,8
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	75	7,0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	57	5,3
<i>Moraxella catarrhalis</i>	47	4,4
<i>Enterobacter cloacae</i>	42	3,9
<i>Streptococcus pyogenes</i>	39	3,6
<i>Escherichia coli</i>	30	2,8
<i>Klebsiella oxytoca</i>	22	2,1
<i>Serratia marcescens</i>	16	1,5
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	12	1,1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>	11	1,0
<i>Enterobacter asburiae</i>	10	0,9
<i>Acinetobacter baumannii</i>	9	0,8
<i>Citrobacter freundii</i>	8	0,7
<i>Achromobacter denitrificans</i>	6	0,6
<i>Burkholderia gladioli</i>	6	0,6
<i>Proteus mirabilis</i>	6	0,6
<i>Streptococcus agalactiae</i>	6	0,6
<i>Citrobacter koseri</i>	5	0,5
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5	0,5
<i>Pseudomonas putida</i>	5	0,5
<i>Rhizobium radiobacter</i>	5	0,5
Beta-hemolitični streptokok skupine G	5	0,5
<i>Acinetobacter junii</i>	4	0,4
<i>Aeromonas caviae</i>	4	0,4
<i>Burkholderia multivorans</i>	4	0,4
<i>Enterococcus faecalis</i>	4	0,4
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	4	0,4
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	3	0,3
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	3	0,3
<i>Delftia acidovorans</i>	3	0,3
<i>Neisseria meningitidis</i>	3	0,3
<i>Serratia liquefaciens</i>	3	0,3

se nadaljuje ...

Nadaljevanje Priloge A: Število in delež (%) vseh prvih izolatov, osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.

Izolat	Število izolatov	Delež (%) izolatov
<i>Acinetobacter pittii</i>	2	0,2
<i>Citrobacter youngae</i>	2	0,2
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	2	0,2
<i>Hafnia alvei</i>	2	0,2
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	2	0,2
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2	0,2
<i>Streptococcus salivarius</i>	2	0,2
Beta-hemolitični streptokok skupine C	2	0,2
<i>Achromobacter piechaudii</i>	1	0,1
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1	0,1
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	1	0,1
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	1	0,1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0,1
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	1	0,1
<i>Enterobacter kobei</i>	1	0,1
<i>Enterobacter ludwigii</i>	1	0,1
<i>Escherichia hermannii</i>	1	0,1
<i>Flavimonas oryzae</i>	1	0,1
<i>Morganella morganii</i> ssp. <i>morganii</i>	1	0,1
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	1	0,1
<i>Pseudomonas libanensis</i>	1	0,1
<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	1	0,1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	0,1
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	1	0,1
<i>Streptococcus vestibularis</i>	1	0,1
<i>Veillonella atypica</i>	1	0,1
<i>Veillonella dispar</i>	1	0,1
SKUPAJ	1073	100

Priloga B: Statistična primerjava deležev za posamezne antibiotike občutljivih izolatov *S. aureus*, osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009 in 2014 na IMI MF UL.

ANTIBIOTIK	χ^2 -statistika	<i>p</i> -vrednost
Klindamicin	1,567	0,211
Ciprofloksacin	0,774	0,379
Eritromicin	0,775	0,379
Gentamicin	0,021	0,886
Tobramicin	0,322	0,571
Oksacilin	0,000	1,000
Penicilin	0,080	0,777
Rifampin	0,498	0,481
Trimetoprim/sulfametoksazol	0,734	0,392
Tetraciklin	0,763	0,383
Teikoplanin	0,000	1,000
Vankomicin	0,000	1,000

Priloga C: Statistična primerjava deležev za posamezne antibiotike občutljivih izolatov *H. influenzae*, osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009 in 2014 na IMI MF UL.

ANTIBIOTIK	χ^2 -statistika	<i>p</i> -vrednost
Ampicilin	0,167	0,683
Amoksisicilin/klavulanska kislina	0,596	0,440
Azitromicin	28,837	0,000*
Cefotaksim	0,000	1,000
Cefuroksim (parenteralno)	3,317	0,069
Moksifloksacin	0,000	1,000
Trimetoprim/sulfametoksazol	1,298	0,255
Tetraciklin	0,037	0,848

* statistično pomembna razlika, $p < 0,05$.

Priloga D: Statistična primerjava deležev za posamezne antibiotike občutljivih izolatov *P. aeruginosa*, osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009 in 2014 na IMI MF UL.

ANTIBIOTIK	χ^2 -statistika	<i>p</i> -vrednost
Amikacin	3,367	0,067
Aztreonam	21,769	0,000*
Ceftazidim	0,669	0,413
Ciprofloksacin	0,062	0,804
Cefepim	2,839	0,092
Gentamicin	0,971	0,324
Imipenem	1,007	0,316
Meropenem	2,068	0,150
Tobramicin	1,490	0,222
Piperacilin/tazobaktam	0,669	0,413

* statistično pomembna razlika, $p < 0,05$.

Priloga E: Statistična primerjava deleža občutljivih izolatov *P. aeruginosa* sluznega fenotipa in *P. aeruginosa* ne-sluznega fenotipa, osamljenih iz dihal otrok s CF v letih 2009–2014 na IMI MF UL.

ANTIBIOTIK	χ^2 -statistika	<i>p</i> -vrednost
Amikacin	9,624	0,002*
Aztreonam	1,246	0,264
Ceftazidim	4,385	0,036*
Ciprofloksacin	8,082	0,004*
Cefepim	4,276	0,039*
Gentamicin	2,682	0,102
Imipenem	2,851	0,091
Meropenem	3,971	0,046*
Tobramicin	1,817	0,178
Piperacilin/tazobaktam	2,179	0,140

* statistično pomembne razlike, $p < 0,05$.

Priloga F: Primerjava interpretacijskih kriterijev CLSI (2014) in EUCAST (2014) za določanje občutljivosti izolatov *S. aureus*.

	CLSI, 2014		EUCAST, 2014	
	Premer cone (mm)		Premer cone (mm)	
Antibiotik	S ≥	R ≤	S ≥	R <
Penicilin	29	28	26	26
Oksacilin	¹	¹	¹	¹
Ciprofloksacin	21	15	20	20
Gentamicin	15	12	18	18
Tobramicin	15	12	18	18
Teikoplanin	14	10	²	²
Vankomicin	²	²	²	²
Eritromicin	23	13	21	18
Klindamicin	21	14	22	19
Tetraciklin	19	14	22	19
Rifampin	20	16	26	23
Trimetoprim/sulfametoksazol	16	10	17	14

Legenda: S – občutljiv; R – Odporen.

Opombe:

¹Odpornost proti oksacilinu določamo z difuzijsko metodo s cefoksitinskim diskom ali z mikrodilucijo.

²Občutljivost za glikopeptide (teikoplanin, vankomicin) ugotavljamo z metodo mikrodilucije v bujonu, kjer določimo minimalno inhibitorno koncentracijo.

Priloga G: Primerjava interpretacijskih kriterijev CLSI (2014) in EUCAST (2014) za določanje občutljivosti izolatov *H. influenzae*.

	CLSI, 2014		EUCAST, 2014	
	Premer cone (mm)		Premer cone (mm)	
Antibiotik	S ≥	R ≤	S ≥	R <
Ampicilin	22	18	16	16
Amoksicilin/klavulanska kislina	20	19	15	15
Cefaklor	20	16	¹	¹
Cefotaksim	26	¹	26	26
Cefuroksim (parenteralno)	20	16	26	25
Ciprofloksacin	21	¹	26	26
Moksifloksacin	18	¹	25	25
Azitromicin	12	¹	50 ³	10 ³
Tetraciklin	29	25	25	22
Trimetoprim/sulfametoksazol	16	10	23	20

Legenda: S – občutljiv; R – odporen.

Opombe:

¹Kategorija odpornosti ni definirana. Izolate opredelimo kot občutljive ali neobčutljive (CLSI, 2014).

²Cefaklor je klinično neučinkovit, zato ga ne testiramo (Štrumbelj in sod., 2015).

³Pri makrolidih je rezultat lahko le zmerno občutljiv ali odporen, kategorije občutljivosti ni. Testiramo samo občutljivost za eritromicin, rezultat velja tudi za azitromicin in klaritromicin (Štrumbelj in sod., 2015).

Priloga H: Primerjava interpretacijskih kriterijev CLSI (2014) in EUCAST (2014) za določanje občutljivosti izolatov *P. aeruginosa*.

	CLSI, 2014		EUCAST, 2014	
	Premer cone (mm)		Premer cone (mm)	
Antibiotik	S ≥	R ≤	S ≥	R <
Piperacilin/tazobaktam	21	14	18	18
Ceftazidim	18	14	16	16
Cefepim	18	14	19	19
Aztreonam	22	15	50 ¹	16
Imipenem	19	15	20	17
Meropenem	19	15	24	18
Amikacin	17	14	18	15
Gentamicin	15	12	15	15
Tobramicin	15	12	16	16
Ciprofloksacin	21	15	25	22

Legenda: S – občutljiv; R – odporen.

Opombe:

¹Visoka spodnja meja za občutljivost, ker so izolati divjega tipa zmerno občutljivi za aztreonam (EUCAST, 2014).