ОРИГИНАЛНИ СТАТИИ
ORIGINAL ARTICLES

Резистентност към trimethoprim/sulfamethoxazole в клинични изолати Stenotrophomonas maltophilia

М. Божкова[1], Т. Стоева[1], Р. Марковска[2] и И. Митов[2]

[1]Катедра по микробиология и вирусология, Медицински университет – Варна
[2]Катедра по медицинска микробиология, Медицински университет – София

Resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole in clinical isolates of Stenotrophomonas maltophilia

M. Bozhkova[1], T. Stoeva[1], R. Markovska[2] and I. Mitov[2]

[1]Medical University – Varna, Department of Microbiology and Virology
[2]Medical University – Sofia, Department of Medical Microbiology

Резюме:

Stenotrophomonas maltophilia е типичен опортюнистичен патоген, често асоцииран с тежки, включително инвазивни инфекции. Този бактериален вид е особено проблематичен за лечение заради вродената си антибиотична полирезистентност. Цел на настоящата работа е да се проучат нивата и механизмите на устойчивост към сочения за средство на първи избор препарат trimethoprim/sulfamethoxazole сред 77 клинични изолата *S. maltophilia*, както и да се сравнят нивата на резистентност към други антибиотични групи сред trimethoprim/sulfamethoxazole-чувствителните и trimethoprim/sulfamethoxazole-резистентните изолати. Резултатите показват високи нива на чувствителност към trimethoprim/sulfamethoxazole – 94.8%. Изолатите, резистентни на този препарат, демонстрират множествена резистентност. Всички trimethoprim/sulfamethoxazole-резистентни изолати са носители на *sul* 1 гена, който се идентифицира като основен механизъм, медииращ резистентността към този препарат.

Ключови думи: Stenotrophomonas maltophilia, trimethoprim/sulfamethoxazole, sul 1 ген

Адрес за кореспонденция: *д-р Милена Божкова, дм, Катедра по микробиология и вирусология, Медицински университет, ул. "Марин Дринов" 55, 9002 Варна, тел: +359 887 997 762, e-mail: Milena.Bozhkova@mu-varna.bg*

Summary:

Stenotrophomonas maltophilia is a typical opportunistic pathogen, frequently associated with severe infections, including invasive ones. Because of its intrinsic antimicrobial multidrug resistance, the therapy of infections associated with this bacterial species is especially problematic. The aim of this study is to investigate the level and mechanisms of resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole (the drug of first therapeutic choice) among 77 clinical isolates of *S. maltophilia*, as well as to compare the resistance levels to other antibiotic groups in the group of trimethoprim/sulfamethoxazole susceptible and trimethoprim/sulfamethoxazole resistant isolates. The results reveal a high rate of susceptibility to trimethoprim/sulfamethoxazole – 94.8%. The isolates, resistant to this agent, demonstrate multidrug resistance. All trimethoprim/sulfamethoxazole resistant isolates carry *sul* 1 gene which is the major mechanism that mediates the resistance to this drug.

Key words: Stenotrophomonas maltophilia, trimethoprim/sulfamethoxazole, sul 1 gene

Адрес за кореспонденция: *Dr Milena Bozhkova, MD, Medical University, Department of Microbiology and Virology, 55 "Marin Drinov" Str., 9002 Varna, tel.: +359 887 997 762, e-mail: Milena.Bozhkova@mu-varna.bg*

Увод

Stenotrophomonas maltophilia принадлежи към групата на глюкоза неферментиращите Грам-отрицателни бактериални видове. Сред тях той заема трето място по честота на изолиране от клинични материали, непосредствено след *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*. Той е типичен опортюнистичен патоген, широко разпространен в природата и нерядко изолиран от болничната среда. Въпреки че традиционно е възприеман като бактериален вид с ниска степен на вирулентност, днес е ясно, че при определени обстоятелства той е способен да причини сериозни, включително инвазивни заболявания. Най-честата клинична проява на *S. maltophilia* са бронхо-пулмоналните инфекции – основно пневмонии, асоциирани с апаратна вентилация, инфекции при пациенти с муковисцидоза и с други подлежащи заболявания на респираторния тракт. Освен тях нерядко се доказват бактериемии, уроинфекции, раневи и очни инфекции, инфекции на централната нервна система и др.

Заради вродената си резистентност към по-голямата част от рутинно прилаганите антибактериални препарати (бета-лактами, вкл. карбапенеми, аминогликозиди и др.), инфекциите, причинени от този бактериален вид, са сложен терапевтичен проблем. Понастоящем trimethoprim/sulfamethoxazole е единодушно възприет като средство на първи избор за лечение на инфекции, причинени от *S. maltophilia*, прилаган самостоятелно или в условията на комбиниран антибиотичен режим. Напоследък тревога будят нарастващите нива на резистентност към този препарат, което допълнително ограничава подходящите терапевтични алтернативи.

Цели на настоящото проучване са: да се определи чувствителността на 77 клинични изолата *S. maltophilia* към trimethoprim/sulfamethoxazole, да се идентифицират механизмите на устойчивост към този препарат и да се сравнят нивата на резистентност към други антибиотични групи сред trimethoprim/sulfamethoxazole-чувствителните и trimethoprim/sulfamethoxazole-резистентните изолати.

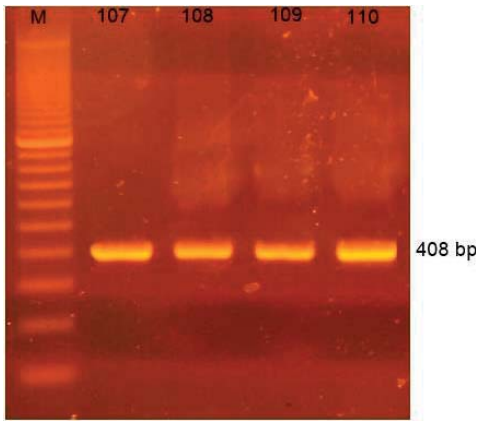
Материал и методи

Проучени са общо 77 клинични изолата *S. maltophilia*, изолирани в периода 2007-2015 г. от пациенти, хоспитализирани в УМБАЛ „Света Марина" – Варна. Преобладаващата част от клиничните материали, от които е изолиран *S. maltophilia,* са от респираторен тракт – 55 изолата (71.4%) (в т.ч. храчки, n = 25; бронхо-алвеоларни лаважи/трахеални секрети, n = 19; плеврални пунктати, n = 5; носогърлени секрети, n = 6), основно от пациенти с пневмония (вкл. асоциирана с механична вентилация), бронхиектазии, хронична обструктивна белодробна болест и муковисцидоза. Значително по-малък е относителният дял на инвазивните изолати – 9.1% (n = 7) от хемокултури и 1.3% (n = 1) от ликвор. Останалите 14 изолата са от раневи секрети (n = 5), асцитна течност (n = 6) и урини (n = 3). Чувствителността към trimethoprim/sulfamethoxazole, ciprofloxacin, levofloxacin, doxycycline, tigecycline, colistin, chloramphenicol, ceftazidime и ticarcillin/clavulanic acid е определена чрез Е-тест съгласно критериите на EUCAST [5]. При всички изолати, определени като резистентни към trimethoprim/sulfamethoxazole, е извършена полимеразна верижна реакция (PCR) за доказване на *sul* 1 ген при използване на праймерите: F – GTA TTG CGC CGC TCT TAG AC; R – CCG ACT TCA GCT TTT GAA GG [11]. Амплификацията се проведе при следните условия: начална денатурация на 95° C за 5 мин, последвана от 35 цикъла, състоящи се от денатурация 45 сек. на 95° C, хибридизация 30 сек на 55° C, елонгация 45 сек на 72° C и крайна елонгация на 72° C за 5 мин. Визуализирането на получения продукт се извърши след електрофореза в 1.2% агарозов гел, съдържащ етидиум бромид на 120 V за 45 мин.

Резултати

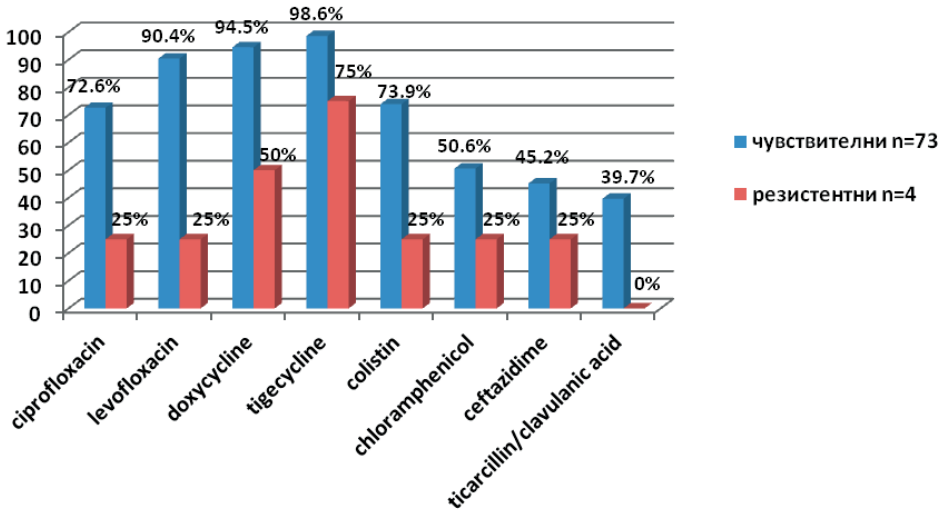
Чувствителност към trimethoprim/sulfamethoxazole установихме при 73 изолата, съставляващи

94.8% от всички, а резистентност – съответно в 4 изолата (5.2%). При четирите, определени като резистентни, изолата се установиха високи стойности на минималната потискаща концентрация (МПК) над 32 μg/ml (при гранични стойности за резистентност към trimethoprim/sulfamethoxazole ≥ 4 μg/ml). Проведените PCR експерименти доказаха наличието на *sul* 1 гена при всички резистентни на trimethoprim/sulfamethoxazole изолати (фиг. 1).



Фиг. 1. Положителен резултат от PCR реакцията за детекция на sul 1 ген при 4 изолата *S. maltophilia*, резистентни на trimethoprim/sulfamethoxazole

На фиг. 2 са представени сравнително нивата на чувствителност към ciprofloxacin, levofloxacin, doxycycline, tigecycline, colistin, chloramphenicol, ceftazidime и ticarcillin/clavulanic acid в trimethoprim/sulfamethoxazole-чувствителните и trimethoprim/sulfamethoxazole-резистентните изолати *S. maltophilia*.



Фиг. 2. Нива на чувствителност към антибактериални лекарствени средства сред trimethoprim/sulfamethoxazole-чувствителни и trimethoprim/sulfamethoxazole-резистентни изолати *S. maltophilia* (в %)

Обсъждане

Антимикробният препарат trimethoprim/sulfamethoxazole е сочен за средство на първи избор при лечение на заболяванията, причинени от *S. maltophilia*. Лабораторното установяване на резистентност и реакциите на свръхчувствителност към препарата са сред малкото противопоказания за включването му в лечебната схема.

Комбинацията между trimethoprim и sulfamethoxazole (всеки един от които с бактериостатичен ефект при самостоятелно приложение) е бактерицидна в обичайни дозировки спрямо повечето патогени. По отношение на *S. maltophilia* комбинираният препарат проявява чисто бактериостатично действие, което налага при лечение на тежки инфекции прилагането му във високи дози, а това често отключва реакции на непоносимост. Според повечето проучвания дори при пациенти с анамнеза за свръхчувствителност следва да се пристъпи към бърза десенсибилизация с цел включване на trimethoprim/sulfamethoxazole в терапевтичната схема с оглед високата му активност спрямо този бактериален вид [7, 17, 18].

Обобщените данни от мащабни световни проучвания като SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2003 г.) върху 2076 щама сочат, че относителният дял на чувствителните към trimethoprim/sulfamethoxazole изолати е много висок и надхвърля 95% [12]. Съществуват географски различия в нивата на резистентност, като значително по-високи са регистрирани при проучвания в Турция (15%), Тайван (25%) и Испания (27%). През 2015 г. проучване в Испания върху чувствителността на *S. maltophilia* към trimethoprim/sulfamethoxazole при пациенти с муковисцидоза съобщава за тревожно високи нива на резистентност – 45% [4].

Резистентността на *S. maltophilia* към trimethoprim/sulfamethoxazole вече е документирана и у нас. Още през 1998 г. Събчева съобщава за 93.3% относителен дял на чувствител-

ни към trimethoprim/sulfamethoxazole изолати *S. maltophilia* – нива, напълно съизмерими с нашите резултати. В това проучване са анализирани нивата на резистентност на 45 изолата *S. maltophilia* от пациенти с онкологични заболявания, като 43 от тях са били изолирани в интензивни реанимационни звена [1]. В проучване на С. Михайлова се съобщава за 15 изолата от периода 1999-2007 г., устойчиви на trimethoprim/sulfamethoxazole, всички с високи МПК над 32 μg/ml, определени първоначално чрез VITEC 2 и по-късно потвърдени чрез Е-тест. Авторите съобщават, че доминиращата част от изолатите са от интензивни клиники [9]. До този момент обаче у нас точните механизми на развитие на устойчивост не са задълбочено проучвани.

Ниските нива на устойчивост към trimethoprim/sulfamethoxazole, установени и в настоящото проучване, са индикация за отличната ефективност на препарата по отношение на *S. maltophilia*.

Развитието на резистентност към trimethoprim/sulfamethoxazole се свързва най-често с гените *sul* 1 и *sul* 2, кодиращи форми на дехидроптероат синтетаза, нечувствителни към въздействието на препарата. Плазмидната локализация на тези гени, както и разполагането им върху лесно мобилни структури като клас 1 интегрони и ISCR (insertion sequence common region) елементи, прави възможен хоризонталния им трансфер вътре- и междувидово [16]. Този факт буди опасения от възможно значително повишаване на резистентността в бъдеще [2, 8, 15, 16].

При проучване на механизмите на резистентност към trimethoprim/sulfamethoxazole, Toleman и сътр. установяват sul 1 гени, локализирани на клас 1 интегрон в 17 от общо 25-те резистентни към препарата изолати, а всички чувствителни към препарата изолати са доказани като негативни за sul 1. Позитивните за sul 1 изолати *S. maltophilia* произхождат от различни географски райони (Северна и Южна Америка, Испания, Турция, Италия, Германия) и всички те са били свързани с клас 1 интегрони. Документирано е първостепенното значение на този ген за развитие на устойчивост към препарата, като за сравнение броят на *sul* 2 позитивните резистентни на trimethoprim/sulfamethoxazole изолати е едва 9 от 25-те, т.е. почти двукратно по-нисък в сравнение със *sul* 1 положителните [16]. Подобни данни са документирани от Song и сътр. при анализ на механизмите за резистентност сред 120 клинични изолата *S. maltophilia*. Установена е статистически достоверна зависимост между резистентността към trimethoprim/sulfamethoxazole и наличието на sul 1 и клас 1 интегрони. Този механизъм е посочен от авторите като водещ за детерминирането на резистентност към trimethoprim/sulfamethoxazole. В генни касети, включени в състава на клас 1 интегроните, са доказани различни кодиращи резистентност гени като *aacA4*, *aadA1*, *aac6'-II*, които се асоциират с множествената резистентност сред trimethoprim/sulfamethoxazole-резистентните *S. maltophilia* [14]. Аналогични феномени вероятно са причината за установената и от нашето проучване полирезистентност на trimethoprim/sulfamethoxazole-устойчивите изолати и значително по-ниските им нива на чувствителност (в сравнение с тази на trimethoprim/sulfamethoxazole-чувствителните изолати) към други антибиотични групи (ciprofloxacin, 25%; levofloxacin, 25%; doxycycline, 50%; tigecycline, 75%; colistin, 25%; chloramphenicol, 25%; ceftazidime, 25%; ticarcillin/clavulanic acid, 0%) (фиг. 2).

Подобни са и данните на Chang и сътр., които установяват, че в 81% от изолатите, демонстриращи устойчивост към trimethoprim/sulfamethoxazole, се доказват *sul* 1 гени и клас 1 интегрони. В тях са идентифицирани генни касети, съдържащи гени, кодиращи резистентност към аминогликозиди, chloramphenicol и кватернерни амониеви съединения [3]. При проучване на антибиотичната чувствителност на 64 изолата *S. maltophilia* в Малайзия през 2012 г. е установена отличната ефективност на препарата с едва един високостепенно устойчив изолат (МПК >32 μg/ml), който впоследствие е установен като sul 1-позитивен [10].

Макар и по-рядко, резистентността към trimethoprim/sulfamethoxazole се асоциира с генни касети *dfrA*, които са локализирани на клас 1 интегрони и кодират ензима дехидрофолат редуктаза [6]. През последните години се доказва и ролята на свръхекспресията на някои от ефлуксните помпи, типични за този бактериален вид в развитието на резистентност към комбинирания препарат [13].

Полученият от нас положителен резултат от PCR експериментите за детекция на *sul* 1 гена при всички trimethoprim/sulfamethoxazole-резистентни изолати потвърждава водещото значение на този механизъм за развитието на in vitro резистентност към препарата сред клиничните изолати *S. maltophilia*. Мобилността на тези гени заради честото им асоцииране с клас 1 интегрони прави възможно разпространението им в рамките на вида и увеличаване на локалните нива на резис-

тентност към trimethoprim/sulfamethoxazole. От важно значение за превенцията на тези процеси е въвеждането на детекцията на *sul* гените чрез PCR в клиничната практика. Предвид високата ефективност на trimethoprim/sulfamethoxazole нарастването на нивата на устойчивост сред *S. maltophilia* би имало значими неблагоприятни последствия за лечението на причиняваните от този бактериален вид заболявания.

Заключение

In vitro активността на комбинирания препарат trimethoprim/sulfamethoxazole спрямо *S. maltophilia* е отлична. При резистентните към препарата изолати, водещ механизъм на развитие на устойчивост са *sul* 1 гените. Възможността за хоризонтален трансфер на тези гени буди опасения от възможно увеличаване на резистентността в бъдеще. Постоянното мониториране на чувствителността към trimethoprim/sulfamethoxazole и идентифицирането на механизмите на резистентност към този препарат са необходими условия за ограничаване на устойчивостта сред клиничните изолати *S. maltophilia*.

Библиография

1. Събчева, С. Чувствителност към бета-лактамни антибиотици, ципрофлоксацин и триметоприм-сулфаметоксазол на *Stenotrophomonas maltophilia* – причинител на инфекциозни процеси при болни със злокачествени новообразования. Онкологичен преглед, 1998, № 5, 8-12.
2. Barbolla, R. et al. Class 1 integrons increase trimethoprim-sulfamethoxazole mics against epidemiologically unrelated *Stenotrophomonas maltophilia isolates*. Antimicrob Agents Chemother, 48 , 2004, 666-669.
3. Chang, L. L. et al. Increased incidence of class 1 integrons intrimethoprim/sulfamethoxazole-resistant clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. J Antimicrob Chemother, 59, 2007, 1038-1039.
4. De Dios Caballero, J. et al. Bronchopulmonary infection–colonization patterns in Spanish cystic fibrosis patients: Results from a national multicenter study. J Cyst Fibros. 2015, http://dx.doi.org/10.1016/j.jcf.2015.09.004
5. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Clinical breakpoints – bacteria (version 6.0); http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
6. Hu, L. F., et al. *Stenotrophomonas maltophilia* resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole mediated by acquisition of sul and dfrA genes in a plasmid-mediated class1 integron. Int J Antimicrob Agents, 37, 2011, 230-234.
7. Garrison, M. W. et al. *Stenotrophomonas maltophilia*: emergence of multidrug-resistant strains during therapy and in an in vitro pharmacodynamic chamber model. Antimicrob Agents Chemother, 40, 1996, 2859-64.
8. Marzouq Al-Jasser, A. *Stenotrophomonas maltophilia* resistant to trimethoprim–sulfamethoxazole: an increasing problem. Annals Clin Microbiol Antimicrob, 5, 2006, 23.
9. Mihaylova, S. et al. Emergence of clinical strains of *Stenotrophomonas maltophilia* resistant to trimethoprime–sulfametoxazole in a Bulgarian university hospital. J Biomed Clin Research, 1, 2008, 18-25.
10. Neela, V. et al. *Stenotrophomonas maltophilia* in Malaysia: molecular epidemiology and trimethoprim–sulfamethoxazole resistance. Int J Infect Dis, 16, 2012, 603-607.
11. Rosser, S.J., H. K. Young. Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. J Antimicrob Chemother, 44, 1999, 11-18.
12. Sader, H. S., R. N. Jonesa. Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric Gram-negative bacilli. Int J Antimicrob Agents, 25, 2005, 95-109.
13. Sánchez, MB, Martínez JL. The efflux pump SmeDEF contributes to trimethoprim-sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother, 59, 2015, 4347-4348.
14. Song, J. H., et al. Analysis of acquired resistance genes in *Stenotrophomonas maltophilia*. Korean J Lab Med, 30, 2010, 295-300.
15. Toleman, M. A., et al. Global emergence of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of sul genes. Emerg Infect Dis, 13, 2007, 559-563.
16. Toleman, M., et al. Resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of sul genes. Emerg Infect Dis, 13, 2007, 559-565.
17. Yilmaz, M., A, F. Celik, A. Mert. Successfully treated nosocomial *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia following desensitization to trimethoprim-sulfamethoxazole. J Infect Chemother, 13, 2007, 122-123.
18. Zelenitsky, S. A. et al Antibiotic combination significantly more active than monotherapy in an in-vitro infection model of *Stenotrophomonas maltophilia*. Diagn Microbiol Infect Dis, 51, 2005, 39-43.

Постъпила за печат на 27 октомври 2016 г.