

Yoğun Bakım Ünitesinde Çoğul Dirençli *Pseudomonas aeruginosa*'ya Bağlı Bir Hastane İnfeksiyonu Salgınının İncelenmesi#

Dr. Zeynep GÜLAY*, Dr. İ. Mehmet Ali ÖKTEM*,
Dr. Tuncer TOKLU*, Dr. Ayşe YÜCE**

* Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,

** Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Bakteriyo-
loji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir.

ÖZET

Mayıs 1997'de 1 haftalık bir zaman diliminde anestezi ve reanimasyon yoğun bakım ünitesinde yatan 7 hastanın çoğul dirençli *Pseudomonas aeruginosa* ile enfekte veya kolonize olduğu belirlenmiştir. Olguların zaman ve yer açısından gruplaşmaları nedeniyle, bir hastane salgını olduğu düşünülmüş ve el yıkama ile ilgili önlemlerin artırılması ile dirençli suşun yayılımı kontrol altına alınmıştır. Salgın döneminde stoklanan izolatların antibiyotik duyarlılıkları, beta-laktamaz paternleri ve "Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)" ile makrorestriksiyon profilleri retrospektif olarak incelenmiş ve bu salgın sırasında antibiyogram paternleri aynı olan iki farklı klonun izole edildiği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, Makrorestriksiyon Analizi, Hastane İnfeksiyonu.

SUMMARY

Evaluation of a Nosocomial Outbreak Due to Multi-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Intensive Care Unit

During a week's period in May 1997 seven patients who were hospitalized in the intensive care of the anesthesiology and reanimation unit were either colonized or in-

fectured by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. Space and time clustering of the cases indicated an outbreak and the transmission of the resistant isolate ceased after strict application of hand washing practices. Typing of the isolates by antibiotyping, identification of beta-lactamase patterns and macrorestriction analysis by Pulsed Field Gel Electrophoresis revealed that two distinct clones were involved in the outbreak.

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa*, Macrorestriction Analysis, Nosocomial Infection.

Bu çalışma, XXVIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (1998 Belek, Antalya)'nde sunulmuştur.

• İzolatların PFGE analizi Dr. Zeynep GÜLAY tarafından Edinburgh Üniversitesi, Moleküler Direnç Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa, özellikle yoğun bakım hastalarında kolonizasyona ve yaşamı tehdit edici boyuttaki infeksiyonlara yol açabilmektedir (1,2). Bu izolatların çoğunlukla çoğul dirençli olması bu infeksiyonların sağaltımını da güçleştirmektedir (1-3). Mayıs 1997'de hastanemiz anestezi yoğun bakım ünitesinden gönderilen bir yara kültüründe, amikasin hariç tüm antipsödomonal antibiyotiklere (imipenem, meropenem, 3. kuşak sefalosporinler, aztreonam, siprofloksasin ve gentamisin) dirençli bir *P. aeruginosa* suşu üretildi. İzolatın amikasin duyarlılığı ise orta (intermediate) olarak değerlendirildi. Bu ilk

izolasyonu izleyen 3. günden başlayarak 1 haftalık bir zaman diliminde aynı üniteye yatan 6 hastadan gönderilen çeşitli örneklerden de antibiyogram paterni aynı olan 8 *P. aeruginosa* suşu izole edildi. Çoğul dirençli bir suşun aynı üniteye yatan farklı hastalardan izole edilmesi bir hastane salgını olarak değerlendirildi. Bunun doğrulanması amacıyla, dirençli izolatlar stoklanarak fenotipik ve genotipik özellikleri çeşitli yöntemlerle incelendi. Bu amaçla, izolatların çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları ve izoelektrik odaklama yöntemi ile beta-laktamaz tipleri saptandı. Bunların yanısıra, değişimli alan elektroforezi [Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)] yöntemi ile Xba I makrorestriksiyon analizi yapılarak izolatların klonal yakınlığı araştırıldı.

MATERYAL ve METOD

Hastanemiz, 724 yataklı bir üniversite hastanesi olup anestezi yoğun bakım ünitesi 11 yatak içermektedir.

Bakteriler

Çalışmaya klinik mikrobiyoloji laboratuvarında 15 Mayıs 1997-25 Mayıs 1997 tarihleri arasında anestezi yoğun bakım ünitesinde yatan 7 hastadan izole edilen 9 *P. aeruginosa* suşu alındı. İzolatların 4'ü trakeal sekret, 2'si yara, 2'si kan, 1'i ise periton sıvısından üretildi. Bakteriler koloni yapısı, pigment oluşumu ve biyokimyasal özelliklerine göre tanımlandı. Tür tayinleri API 20NE (BioMerieux) ile doğrulandı.

Antibiyotik Duyarlılık Testleri

İzolatların imipenem, meropenem, seftazidim, sefotaksim, aztreonam, siprofloksasin, gentamisin ve amikasin duyarlılıkları, disk difüzyon ve/veya agar dilüsyon testi ile incelendi. Antibiyotik duyarlılık testlerinin uygulanmasında "National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)"ın önerilerine uyuldu (4,5).

Beta-Laktamazların Değerlendirilmesi

Bakterilerin nutrient agardaki (oxid) kültürleri 1 mL 50 mM fosfat tamponu ile yıkanarak toplandı. Bakteriler sonikatörde (soniprep 150) parçalandı. Sonikat 4°C'de, 10.000 rpm'de, 10 dakika santrifüj edilerek beta-laktamazları içeren üst sıvı toplandı ve -20°C'de saklandı. Sonik ekstrede beta-laktamaz varlığı nitrosefin yöntemi ile saptandı. Bu amaçla 30 µL sonik ekstre, 100 µL nitrosefin (Glaxo, Greenwood, UK) çözeltisi (50 µg/mL) ile karşılaştırılarak substratın renginin sarıdan kırmızıya dönüşümü izlendi (6).

Beta-laktamazlar izoelektrik odaklama [Isoelectric Focusing (IEF)] yöntemi ile incelendi (6). Sonik ekstre, poliakrilamid jelde, güç 1 watt, voltaj 500 V, akım 20 mAmp olacak şekilde yürütüldükten sonra, enzim bantları nitrosefin yardımıyla görünür hale getirildi. İzoelektrik noktalar (pI) referans enzim (TEM-1 pI: 5.4) ve proteinler (pI calibration kit®, BDH) ile karşılaştırılarak saptandı.

PFGE Analizi

Makrorestriksiyon analizi için bakteriler 10 mL nutrient broth içerisine aktarıldı ve sürekli çalkalanarak 37°C'de 16 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda besiyerleri santrifüje edilerek dipteki bakteri çöküntüsü iki kez SE tamponu (100 mM NaCl, 25 mM EDTA, pH 7.5) ile yıkandı ve yine aynı tampon içerisinde süspansiyon haline getirildi. Bakteri yoğunluğu, spektrofotometre yardımıyla (Spectronic 20, Bausch & Lomb) optik dansitesi 1.0'e eşit olacak şekilde ayarlandı. Bakteri süspansiyonları 1:1 oranında %1 agaroz ile karıştırılarak kalıplar içine aktarıldı. Kalıplardaki agaroz katılınca, agaroz-bakteri karışımı steril tüplere aktarıldı ve bakterilerin parçalanmasını sağlamak amacıyla tüp içerisine proteinaz K içeren lizis tamponu eklenerek 56°C'de su banyosunda 2 gece bekletildi. Bu süre sonunda agaroz parçaları TE tamponu (10 mM tris, 10 mM disodyum EDTA, pH 7.5) ile 5 kez yıkandı ve steril bir mikrosantrifüj tüpü içine aktararak Xba I ile (37°C su banyosunda, 1 gece tutularak) agaroz içindeki bakteri DNA'sının kesilmesi sağlandı. Parçalar, %1 PFGE agarozuna aktararak elektroforez uygulandı. Bu amaçla CHEF DR II sistemi (Bio-Rad Lab) kullanıldı. Elektroforez sonunda ürünler etidyum bromür ile boyanıp görsel olarak değerlendirildi. İzolatlar, tüm bantlar uyumluysa aynı suş; 1-3 bant açısından farklı ise aynı suşun alt tipleri; 4-6 bant açısından farklı ise olasılıkla ilişkili suşlar; 7 ve daha fazla bant açısından farklı ise değişik suş olarak kabul edildi (7,8).

BULGULAR

Disk difüzyon yöntemiyle izolatların tümü amikasin orta duyarlı; imipenem, meropenem, sefotaksim, seftazidim, aztreonam, siprofloksasin ve gentamisin dirençli olarak değerlendirildi.

Agar dilüsyon testi ile antibiyotik duyarlılıkları incelendiğinde, bakterilerin tümünün seftazidim, sefotaksim ve siprofloksasine dirençli ol-

duğu saptandı. İmipenem ve meropenem minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerlerinin ise, orta duyarlı ve dirençli kategorileri arasında değiştiği gözlemlendi (Tablo 1).

Beta-laktamaz değerlendirilmesinde suşların 7 (%78)'sinde pl 5.2, 6.4, 8.5 ve/veya 8.7 olan enzimler saptandı. İki suşun ise pl 8.5 olan enzimlerin oluşturduğu silik bir bant görülmekle birlikte esas olarak pl 6.2 olan bir beta-laktamaz üretimi belirlendi (Resim 1).

Bakteri DNA'sının Xba I makrorestriksiyon paternleri incelendiğinde iki ana patern saptandı (Resim 2). Bu iki grup arasında antibiyotiklere göre belirli bir ayırım yapılamamaktaydı. Buna karşın, makrorestriksiyon paternleri farklı olan suşların (protokol no. 11948 ve 11877) beta-laktamaz tiplerinin de farklı olduğu, ayrıca bunların aynı hastanın farklı kültürlerinden izole edildiği belirlendi. Bu bulgulara dayanarak, kısa bir süre içinde aynı üniteye yatan 11 hastanın 7'sinden aynı kökenin üretilmesi, dirençli suşun klonal yayılımı lehinde yorumlandı. DNA makrorestriksiyon ve beta-laktamaz analizlerine ilişkin bulgularımız Tablo 1'de özetlendi.

TARTIŞMA

Son yıllarda, oksiminosefalosporinler ve karbapenemler gibi geniş spektrumlu beta-laktam ajanlara dirençli gram-negatif nonfermentatif basillerin etken olduğu hastane infeksiyonları giderek artan oranlarda bildirilmektedir (1,9,10). Bu etkenler arasında en önde geleni *P. aeruginosa*'dır. *P. aeruginosa*'nın beta-laktam ajanlara di-

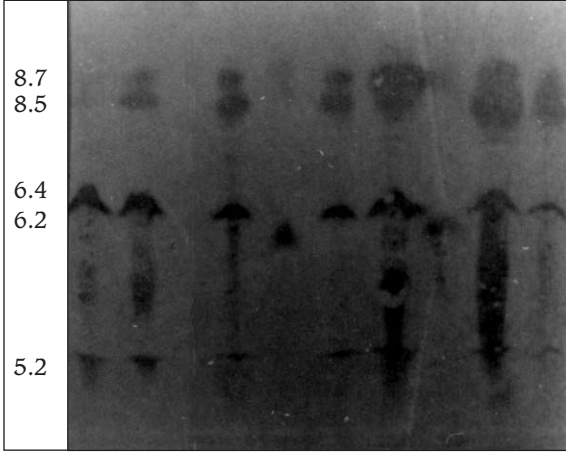
renç mekanizmaları arasında AmpC tipi kromozomal beta-laktamazların ve PER-1, TEM-24, SHV-2a gibi genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların üretimi, dış membran proteinlerinin kaybı veya değişimi ve beta-laktam ajanların hücre içerisinde etkin konsantrasyona ulaşmasını engelleyen aktif pompa sistemleri sayılabilir (11-16). Karbapenem direncinin ise özellikle OprD mutasyonlarına ve/veya kromozomal beta-laktamazların aşırı üretimine bağlı olduğu bildirilmektedir (1,17).

Çalışmamızda, 1997 yılında 1 haftalık bir zaman diliminde yoğun bakım hastalarından izole edilen ve amikasin duyarlılığının orta olması dışında tüm antipsödomonal antibiyotiklere dirençli bulunan 8 *P. aeruginosa* izolatının birbirleri ile benzerliği çeşitli yöntemlerle araştırılmış, böylelikle hem izolasyon sıklığındaki artışın bir salgın göstergesi olup olmadığının saptanması hem de kullanılan yöntemlerin birbirleri ile kıyaslanması amaçlanmıştır. Çalışmaya alınan suşların antibiyogramlarının benzer olduğu gözlemlenmiş, seftazidim ve imipenem MİK₅₀ değerleri sırası ile > 128 mg/L ve 32 mg/L olarak bulunmuştur. İzolatların beta-laktamaz paternleri ise iki farklı tiptedir. Bunlardan ilkinde esas olarak pl değeri 6.2 olan bir enzim üretilmektedir. Farklı 6 hastadan izole edilen diğer suşların ise pl 5.2, 6.4, 8.5 ve 8.7 olan beta-laktamazlar içerdiği gözlemlenmiştir. Literatürde bildirilenden biraz daha düşük bulunmakla birlikte pl 5.2 olan enzimin Türkiye kökenli suşlarda görülebilen PER-1 enzimi; pl 6.2 ve 6.4 olan enzimlerin ise yine genişle-

Tablo 1. *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Duyarlılık, PFGE ve IEF Sonuçları.

İzolat no	MİK (µg/mL)					PFGE	IEF
	CAZ	IMP	MEM	CTX	CIP		
10170	> 128	8	8	128	16	I	5.2, 6.4, 8.5-8.7
11947	> 128	32	16	128	16	I	5.2, 6.4, 8.5-8.7
11948	> 128	16	8	> 128	32	IIa	6.2
11943	128	16	16	< 128	16	I	5.2, 6.4, 8.5-8.7
11877	> 128	32	16	> 128	16	II	6.2
11878	> 128	32	32	> 128	16	I	5.2, 6.4, 8.5-8.7
11884	> 128	32	16	> 128	16	I	5.2, 6.4, 8.5-8.7
11885	> 128	32	32	> 128	16	Ia	5.2, 6.4, 8.5-8.7
13760	> 128	8	4	> 128	64	I	5.2, 6.4, 8.5-8.7

CAZ: Seftazidim, IMP: İmipenem, MEM: Meropenem, CTX: Sefotaksim, CIP: Siprofloksasin.

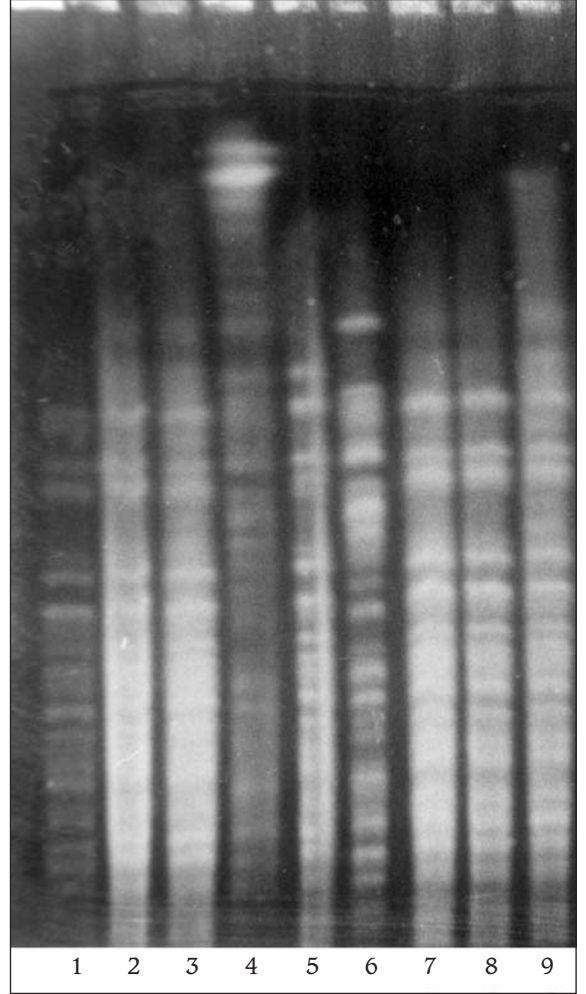


Resim 1. *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Beta-Laktamazları (izolat no: 1-13760, 2-10170, 3-11878, 4-11948, 5-11885, 6-11877, 7-11943, 8-11947, 9-11884).

miş spektrumlu beta-laktamlara etkili OXA tipi enzimler olabileceği düşünülmüştür (18-20). Ayrıca çalışmamızda, enzimlerle ilgili olarak miktar ve DNA dizgi tayinleri yapılmamış olmasına rağmen, IEF'deki bantların yoğunluğu incelendiğinde suşların çoğunluğu tarafından üretilen pI 8.5-8.7 olan enzimlerin oldukça aktif olduğu gözlenmiştir. Bu enzimlerin karbapenem direncinden sorumlu kromozomal enzimler olabileceği düşünülmüştür. Senda ve arkadaşları da, *P. aeruginosa* suşlarında karbapenem direncini inceledikleri çalışmalarında, karbapenemaz niteliğindeki IMP-1 enziminin (pI 9.5) bulunmadığı imipenem dirençli suşlarda, bu direncin kromozomal enzimlerin aşırı üretiminden kaynaklandığını belirtmektedir (21).

Suşların PFGE sonuçları incelendiğinde, beta-laktamaz profilleri ile uyumlu olarak iki ayrı patern saptanmıştır. Suşların çoğunda (7 suş) I ve Ia paterni gözleendiği için dirençli suşun klonal yayılımı düşünülmüştür.

Hastanemiz, 724 yataklı bir üniversite hastanesi olup, anesteziyoloji ve reanimasyon ünitesi yoğun bakımında 11 yatak bulunmaktadır. Ocak 1997-Haziran 1997 tarihleri arasında bu üniteye yatan hastaların çeşitli örneklerinden amikasin dışındaki tüm antipsödomonal ajanlara dirençli 17 *P. aeruginosa* suşu izole edilmiştir. Mayıs ayında daha önce sözü edilen 1 haftalık zaman diliminde izolat sayısının çok arttığı ve üniteye yatan hastaların 7 (%64)'sini etkilediği gözlenmiştir. Çalışmamızda bu hastalardan elde edilen izolatların klonal yakınlığı değerlendirilmiştir. Labora-



Resim 2. İzolatların PFGE Paternleri (izolat no: 1-13760, 2-10170, 3-11947, 4-11948, 5-11943, 6-11877, 7-11878, 8-11884, 9-11885).

tuvar kayıtlarının retrospektif incelenmesinde de aynı üniteye benzer özellikteki izolatların 1996 başından beri ayda bir izolat sıklığında üretildiği, 1997 yılı başından itibaren sıklığın ayda 2-3 olacak şekilde arttığı belirlenmiştir. Bu dönemlerde olgu tanımı, tanımlama ve sürveyans teknikleri ile ilgili bir değişiklik yapılmamıştır.

Erken dönemde fark edilmesi nedeniyle çalışmamızda bildirdiğimiz yayılım, el yıkama ve bariyer önlemlerinin artırılması ve kontrolü ile önlenmiş, izolat sayısı endemik düzeye (0-1 izolat/ay) inmiştir. Bu endemik dönemde izole edilen suşların da önceki suşlar gibi yine tüm antipsödomonallere dirençli olduğu gözlenmiştir. Bir başka deyişle, endemik dönem izolatlarının antibiyotik duyarlılık paternleri incelenen dönemdeki izolatlarla aynıdır. Salgın düşünülen dö-

nemde, personelden ve ortamdan tarama kültürleri yapılmasına rağmen benzer antibiyotik paterninde bir suş izole edilmemiştir. Bu nedenle kesin kaynak saptanamamıştır. Ancak, el yıkama önlemleri ile yayılımın kontrol altına alınması yayılımın personelin elleri aracılığıyla olabileceğini düşündürmüştür. Teknik nedenlerle endemik dönemdeki izolatlarda PFGE uygulanamamış bu nedenle de salgın klonları ile karşılaştırılması mümkün olmamıştır.

Sonuç olarak, çevre şartlarının uygunluğu ve hastaların klinik özellikleri nedeniyle, yoğun bakım ünitelerinde çoklu dirençli mikroorganizmalarla salgınlar oluşabilmektedir. Burada sunulan olguda görüldüğü gibi, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında antibiyotikleri benzer bakterilerin normalden yüksek sıklıkta izole edilmesi böyle bir salgın açısından uyarıcı olabilmektedir. Ancak, izolatların aynı köken olup olmadığının saptanmasında antibiyotik duyarlılıkları yanısıra PFGE ile DNA analizi gibi genotipik yöntemlerin kullanılması gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Hancock REW. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. Clin Infect Dis 1998;27(Suppl 1): 93-9.
2. Pollack M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. New York: Churchill Livingstone, 1995:1980-2003.
3. Wolff M, Brun-Buisson C, Lode H, Mathai D, Lewi D, Pittet D. The changing epidemiology of severe infections in the ICU. Clin Microbiol Infect Dis 1997;3(Suppl 1):36-47.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 4th ed. Approved standart, M7-A4, Wayne Pa 1997.
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standarts for antimicrobial disk susceptibility tests. 6th ed. Approved standart, M2-A6, Wayne Pa 1997.
6. Shanahan PMA, Thomson CJ, Amyes SGB. Beta-lactam resistance in aerobic commensal faecal flora. Int J Antimicrob Agents 1994;3:259-66.
7. Maslow J, Slutsky AM, Arbeit RD. The application of pulsed field gel electrophoresis to molecular epidemiology. In: Persing DH, et al (eds). Diagnostic Molecular Microbiology; Principles and Applications. Washington DC: ASM Press, 1993: 563-72.
8. Tenover RC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995; 33:2233-9.
9. Harris A, Torres-Viera C, Venkataraman L, de Girolami P, Samore M, Carmeli Y. Epidemiology and clinical outcomes of patients with multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis 1999;28: 1128-33.
10. Hsueh PR, Teng LJ, Yang PC, Ho SW, Luh KT. Persistence of a multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in an intensive care burn unit. J Clin Microbiol 1998;36:1347-51.
11. Chen HY, Yuan M, Livermore DM. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in UK in 1993. J Med Microbiol 1995;43:300-9.
12. Nordmann P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y, Labia R. Characterization of a novel extended spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37:962-9.
13. Marchandin H, Jean-Pierre H, de Champs C, et al. Production of a TEM-24 plasmid mediated extended spectrum beta-lactamase by a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:213-6.
14. Naas T, Philippon L, Poirel L, Ronco E, Nordmann P. An SHV-derived extended spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:1281-4.
15. Büscher KH, Callman W, Dick W, Opferkuch W. Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* resulting from diminished expression of an outer membrane protein. Antimicrob Agents Chemother 1987;31:703-8.
16. Köhler T, Hamzehpour MM, Epp SF, Pechere JC. Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: Respective contributions of OprD and efflux systems. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43:424-7.
17. Quinn JP. Imipenem resistance among gram-negative bacilli. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994; 13:203-4.
18. Vahaboğlu H, Öztürk R, Aygün F, et al. Widespread detection of PER-1 type extended spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: A nation wide multi-center study. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:2265-9.
19. Hall LMC, Livermore DM, Gür D, Akova M, Akalın HE. OXA-11 an extended spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1993;37:1637-44.
20. Danel F, Hall LMC, Gür D, Livermore DM. OXA-14 another extended spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:1881-4.
21. Senda K, Arakawa Y, Nakashima K, et al. Multifocal outbreaks of metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad spectrum beta-lactams, including carbapenems. Antimicrob Agents Chemother 1996;40:349-53.

YAZIŞMA ADRESİ

Doç. Dr. Zeynep GÜLAY

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

35340 İnciraltı - İZMİR

Makalenin Geliş Tarihi: 17.02.2000 Kabul Tarihi: 23.04.2001