

ÇEŞİTLİ KAYNAKLARDAN SOYUTLANAN PSEUDOMONAS AERUGINOSA SUŞLARININ FAJ TİPLENDİRMEŐİ

PHAGE TYPING OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA STRAINS FROM VARIOUS SOURCES

Glten KANTARCI*

zet: Bu çalışmada, çeşitli hastalık materyalinden elde edilen 103 *Pseudomonas aeruginosa* suşu, 22 adet fajdan oluŐan set ile faj tiplendirme yöntemi kullanılarak tiplendirilmiŐtir. Tiplendirme iŐlemi sonucunda, 29 değişik faj modeli saptanmıştır. 103 suŐtan, 91'i tiplendirilmiŐ (% 88.3), diğer 12 suş (% 11.6) ise çalışılan hiçbir faja duyarlı bulunmadığından tiplendirilememiştir.

Çalışma sonucunda *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının epidemiyolojik yayılımının izlenmesi için faj tiplendirme yönteminin baŐarılı olduğu, ancak elde edilen faj modellerinin yöresel olarak değerlendirilebileceği grlmŐtir.

Summary: In this study, 103 strains of *P.aeruginosa*, isolated from various clinical specimens were typed by phage technique with a set of 22 phages. Phage typing procedure gave 29 different phage patterns. Ninety one of 103 *P.aeruginosa* strains could be typed, the other 12 strains could not be typed because of they have no sensitivity against test phages, studied.

As a result of this study, phage typing technique is useful for the observation of epidemiological *P.aeruginosa* infections, but phage patterns have got significance only for the local environments.

G İ R İ Ő

Pseudomonas aeruginosa hastane enfeksiyonlarında byk nem taŐıyan bir etkidir. Hastane ortamında kolaylıkla geliŐip barınabilir. Hastanelerdeki eŐitli evre rneklerinin % 5'inde *Pseudomonas* izole etmek olasıdır (4). Ameliyathane fırçalarının kavanozundan, fırçalar üzerinden, trakeal katater ve kanüllerin içinde durduğu zefiranlı sulardan bile *P.aeruginosa* retildeĐi bildirilmiŐtir (5). Hastanede yatan hastaların ortalama % 20'sinin

* Dr., Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı AraŐtırma Görevlisi, (Mikrobiyoloji Doktoru).

dışkısında, derisinde ve üst solunum yollarında görülür ve hastanede kalış süresi uzadıkça bu değer daha yükseklere ulaşır (9). Cerrahi, doğum servisinde ve özellikle yanık koğuşlarında bu bakteriye rastlama olasılığı artmaktadır (4).

Pseudomonas aeruginosa'nın epidemiyolojisi, serotiplendirme (5, 12), faj ve piyosin tiplendirme (2, 3, 7, 13, 14) yöntemleriyle saptanabilir. Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen *P.aeruginosa* bakterilerinin faj tiplendirme yöntemiyle epidemiyolojisi araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteriler: Çalışmada kullanılan 103 *P.aeruginosa* suşu, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarından temin edildi ve özgün mikrobiyolojik yöntemler uygulanarak türlerinin kesin identifikasyonu yapıldı (6, 8, 10, 11).

Bakteriyofaj Tiplendirme Yöntemi: Bakterilerin faj tiplendirimi için gereken 22 faj seti ve konak suşlar, National Bacteriological Laboratory, Stockholm, Sweden (Dr. L. Sjöberg) tarafından temin edildi. Gönderilen faj örnekleri, aşağıda belirtildiği gibi, daha fazla miktarlarda elde edilerek kullanıldı. Fajların çoğaltılması ve faj tiplendirme yöntemi, National Bacteriological Laboratory sorumlularıyla kişisel yazışmayla temin edilerek uygulandı.

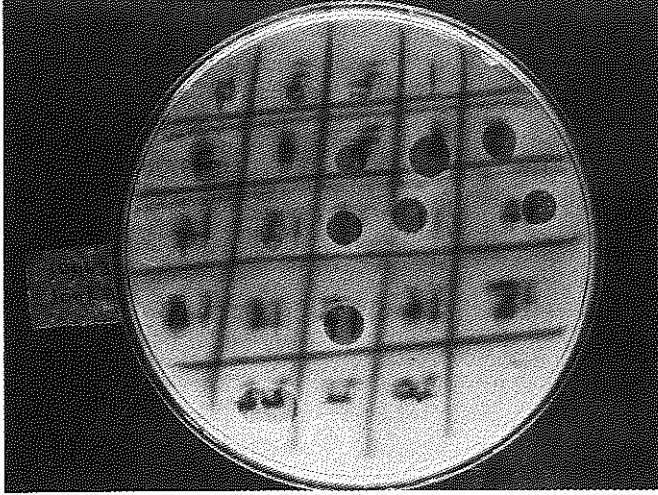
Fajların Çoğaltılması: Konak suşlar, TSB (Triptic Soy Broth) besiyerinde 37 °C'de 1 gece inkübe edildi. 30 ml. Triptic Soy Broth besiyerine, 0.5 ml. faj kültüründen ve 0.5 ml. bir gece inkübe edilmiş konak suş kültüründen ekim yapıldı. Daha sonra, 37 °C'de, su banyosunda 4-5 saat süreyle çalkalayarak inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, 3000 devirde 5 dakika süreyle santrifüj edilerek bakteriler çöktürüldü, üst kısımdaki faj kültürü alındı. Faj kültürü, kalıntı bakterileri ortamdaki gidermek için milipor filtreden süzülerek saflaştırıldı. Daha sonra herbir faj kültürünün Rutin Test Dilüsyonu (RTD), konak suşlara karşı filtre edilerek saptandı.

Rutin Test Dilüsyonunun (RTD) Saptanması: Konak suşlarının herbiri, TSB besiyerinde 4-5 h süreyle 37 °C'de inkübe edildi ve sonra TSA besiyerine ekildi. Peptonlu suda seri olarak dilüe edilen fajlar, konak suşun ekilmiş olduğu TSA plaklarına, her damlasında 20 µl damlatan pipetlerle tatbik edildi. Plaklar 30 °C'de 1 gece inkübe edildi. Tam lizis veren sulandırım RTD (Rutin Test Dilüsyonu) olarak saptandı.

Faj Tiplendirme Yöntemi: Tiplendirilecek *P.aeruginosa* suşları, TSB besiyerinde 37 °C'de, su banyosunda 4-5 h çalkalayarak inkübe edildi.

Herbir tiplendirilecek kökenin TSB kültürü, iki adet TSA besiyerine akıtılarak ekildi. Birkaç dakika beklendikten sonra plaklardaki fazla kültür dökülerek plaklar kurutuldu. Bu plaklar üzerine RTD ve 100 RTD faj süspansiyonları her damlasında 20 µl damlatan pipetlerle tatbik edildi. RTD sulandırım için bir plak, 100 RTD sulandırım için, aynı konak süşun ekildiği diğer plak kullanıldı (Resim 1). Plaklar 30 °C'de bir gece inkübe edildi ve aşağıda belirtildiği gibi değerlendirildi.

- +++ Tam lizis - yarı tam lizis
- ++ 30 plak - yarı tam lizis
- + 15 - 30 plak
- +/- 5 - 15 plak
- lizis yok
- 0 faj tarafından yapılmayan üreme inhibisyonu



Resim 1
100 RTD faj sulandırımı kullanılarak yapılan faj tiplendirmesi.

B U L G U L A R

Çalışılan 103 adet *P.aeruginosa* bakterilerinin faj tiplendirmesiyle ilgili sonuçlar Tablo 1'de özetlenmiştir.

P.aeruginosa bakterilerinin duyarlı oldukları faj tiplerinin incelenmesiyle yapılan gruplandırmada 29 çeşit faj modelinin oluştuğu gözlenmiştir

P.AERUGINOSA'DA FAJ TİPLENDİRMESİ

(Tablo 1). İncelenen 103 suşdan 12 adedi kullanılan fajlardan hiçbirisine duyarlı bulunmadığından tiplendirilememiştir.

Tablo 1

Çalışılan P.aeruginosa bakterilerinin ait oldukları faj modelleri

Faj Modeli No.	Faj Modeli	Bakteri Adedi
1	68	10
2	M6	5
3	C188	6
4	352	1
5	F8	1
6	31	1
7	119x	3
8	F7	2
9	1214	2
10	21/352	4
11	44/1214	2
12	24/C11	2
13	1214/C11	2
14	44/109	3
15	44/119x/M6	4
16	44/1214/119x/M6	1
17	21/68/119x/F7	3
18	2/68/352/21	2
19	2/21/24/68/352	1
20	21/1214/119x/F7	7
21	21/1214/119x/F7/C188	2
22	21/68/352/119x/M4/C11	3
23	44/1214/68/119x/F8	4
24	16/44/1214/109/F8	6
25	2/21/44/1214/352/119x/F8	6
26	2/16/21/24/31/44/1214/68/109/352/119x/F8	5
27	16/21/24/31/1214/73/352/119x/F8/F10	1
28	2/21/24/352/M4/C11	1
29	7/21/44/1214/68/109/352/119x/F8/M4/M6	1
30	T	12

T: Tiplendirilemeyen

Çalışılan *Pseudomonas* suşlarının elde edildikleri kliniklere göre faj tiplerinin dağılımı değerlendirildiğinde (Tablo 2), K.B.B. kliniğinden elde edilen 37 adet *P.aeruginosa* suşunun, çoğunlukla, 24, 25, 26, 22 faj modellerine ait olduğu gözlenmiştir. Çocuk Cerrahisi Kliniğinden elde edilen 19 *P.aeruginosa* suşu arasında 20, 2, 26 ve 15 faj modelleri çoğunluktadır. Bunlara karşın, Üroloji kliniğinden elde edilen 13, İç Hastalıkları kliniğinden elde edilen 9 ve diğer çeşitli kliniklerden elde edilen daha az sayıdaki *P.aeruginosa* suşlarının değişik faj modellerine ait oldukları saptanmıştır.

Tablo 2

P.aeruginosa Suşlarının Elde Edildikleri Kliniklere Göre Faj Tipleri

Klinik	Bakteri Adedi	Faj Model No. (Tablo 1)	Klinik	Bakteri Adedi	Faj Model No. (Tablo 1)		
K.B.B.	1	1	Çocuk Cerrahisi	1	1		
	1	2		3	2		
	2	3		2	15		
	1	5		4	20		
	1	6		1	23		
	1	7		1	25		
	1	8		2	26		
	1	9		5	T		
	1	11		Üroloji	3	1	
	1	12			1	3	
	1	14			1	9	
	2	17			1	10	
	1	18			2	13	
	1	19			1	14	
	1	20			1	15	
	1	21			1	20	
	3	22			1	27	
	1	23			1	T	
	6	24		Çocuk Sağlığı Cerrahi	2	10	
5	25	1	T				
3	26	1	1				
1	29	1	23				
İç Hastalıkları	1	1	Nöroloji	1	1		
	1	14		1	3		
	1	15		Diğer Klinikler	1	1	
	1	17			1	2	
	1	18			1	4	
	1	20			1	7	
	1	23			1	10	
	2	T			1	11	
	Kadın Doğum	1			1	1	15
		1			3	1	20
1		7	1	28			
1		8	1	T			
1		12					
3	T						

T: Tiplendirilemeyen

P.AERUGINOSA'DA FAJ TIPLENDİRMESİ

Pseudomonas aeruginosa bakterilerinin elde edildikleri hastalık materyaline göre faj tipi dağılımı değerlendirildiğinde (Tablo 3), kulak salgısından elde edilen suşların çoğunun, 24, 25, 26 ve 22 faj modellerine uydukları görülmüştür. Özellikle yanık materyallerinden elde edilen 9 *P.aeruginosa* kökeninden, faj tiplendirmesi yapılabilen 5 adedinden 4'ünün 20 faj modeline ait olduğu dikkati çekmektedir.

Tablo 3

P.aeruginosa Suşlarının Elde Edildikleri Kliniklere Göre Faj Tipleri

Klinik	Bakteri Adedi	Faj Model No. (Tablo 1)	Klinik	Bakteri Adedi	Faj Model No. (Tablo 1)
Kulak Akıntısı	1	1	İdrar	2	1
	1	2		1	3
	1	3		1	4
	1	5		1	9
	1	6		1	10
	1	7		2	12
	1	8		1	14
	1	9		3	15
	1	12		1	17
	1	14		1	18
	1	18		1	20
	1	19		1	27
	3	22		1	28
	1	23		3	T
	5	24		İrin	3
3	25	1	2		
3	26	1	3		
1	29	1	11		
1	20	1	14		
Yanık	1	23	2	17	
	4	T	1	20	
Boğaz	1	1	2	21	
	1	2	2	25	
	2	10	1	T	
	1	25	Kan	1	2
	2	26		1	23
Vajinal Akıntı	1	3	Diğer Örnekler	3	1
	1	11		1	3
Balgam	1	20	2	7	
	1	2	1	8	
	1	24	1	10	
Yara	1	3	1	12	
	1	15	1	23	
	1	16	3	T	
	1	T			

T: Tiplendirilemeyen

T A R T I Ş M A

Pseudomonas bakterilerinin epidemiyolojisinin faj tiplendirmesi ile araştırılması konusunda bir çok çalışma yapılmıştır. Çeşitli araştırmacılar, değişik faj setleri kullanarak faj tiplendirmesi yapmışlardır (1, 2, 3).

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları, aynı faj setiyle çalışmış olan Dr. Bernstein ve ark. sonuçlarıyla karşılaştırmak olasıdır (3). Bernstein ve ark. İsrail'de yaptıkları çalışmada, bizim saptadığımız faj modellerinin 2 adedi dışında değişik faj modelleri saptamışlardır. Çalışmamızda, 100 RTD dikkate alınarak yapılan değerlendirmede, 103 bakterinin 91'i (% 88.3) tiplendirilebilmiştir. Bernstein ve ark. yaptığı çalışmada ise tiplendirilebilme oranı daha yüksek (% 92.3) olarak bulunmuştur (3).

Çalışmamızda saptanan faj tip modelleri, elde edildikleri klinikler içerisinde sınırlı olarak anlamlı sayılabilirlerse de, tüm kliniklerde ve gerekse inceleme yapılan aynı hastanenin diğer kliniklerinde egemen sayılabilecek *Pseudomonas aeruginosa* faj modeli saptanmamıştır.

Hastalık materyaline göre, faj tipi dağılımında ise oldukça ilginç sonuçlar gözlenmiştir. Kulak akıntısından elde edilen kökenlerin çoğunun 24, 25, 26 ve 22 faj modellerine ait olmalarının yanısıra, özellikle yanık materyalinden elde edilen 9 *P.aeruginosa* kökeninden 4'ünün 20 faj modeline uyması dikkate değerdir. Bu bulgu, yanık yaralarının enfeksiyonlarının hastane enfeksiyonu niteliğinde oluşması olasılığını arttırmaktadır.

Çalışma sonucunda, *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının epidemiyolojik yayılımının izlenmesi için faj tiplendirme yönteminin kullanılabilirliği kanısı elde edilmiştir. Bu yöntem uygulanarak elde edilen faj modelleri ancak yöresel olarak değerlendirilebilir.

T E Ş E K K Ü R

Faj setini temin ederek, bu çalışmayı gerçekleştirmeme yardımcı olan Dr. L. Sjöberg ve National Bacteriological Laboratory (Stockholm) sorumlularına teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

1. Bergan T: A new bacteriophage typing set for *Pseudomonas aeruginosa* (Selection procedure). Acta Path Microbiol Scand. Section B. 80, 2, 177-188, 1972.
2. Bergan T: A new bacteriophage typing set for *Pseudomonas aeruginosa* (Characterisation and Comparisons of New and Previous typing sets). Acta Path Microbiol Scand Section B. 80, 2, 189-201, 1972.
3. Bernstein R, Mushin R, Rabinowitz K: Typing of *Pseudomonas aeruginosa*; Comparison of the phage procedure with the pyocine technique. J Hyg Camb, 71, 403, 1973.

P.AERUGINOSA'DA FAJ TIPLENDİRMESİ

4. Bilgehan H: Klinik Mikrobiyoloji, E.Ü. Tıp Fakültesi Yayınları, 1983.
5. Çakır N: Hastanelerde hasta dışı ortamdan soyutulan *Pseudomonas aeruginosa*'ların serotipleri. Uzmanlık tezi, 1978.
6. Cruickshank R, Duguid JP, Marmion BP, Swain RHA: Medical Microbiology, Vol. 2, 444, 1975.
7. Darell JH, Wahba AH: Pyocine-typing of hospital strains of *Pseudomonas pyocyanea*. J Clin Path, 17, 236, 1964.
8. Gilardi GL: Practical schema for the identification of nonfermentative gram negative bacteria encountered in medical bacteriology, American Journal of Medical Technology, Volume: 38, Number: 3, March 1972.
9. Lowbury EJJ: Ecological importance of *Pseudomonas aeruginosa*: Medical Aspects, in Clarke PH, Richmond MH (ed): Genetics and Biochemistry of *Pseudomonas*. New York, John Wiley and Sons, s. 137, 1975.
10. Oberhofer TR: Characteristics of human isolates of unidentified fluorescent *Pseudomonas* capable of growth at 42 °C. J Clin Microbiol Nov. 492-495, 1981.
11. Philips I: Identification of *Pseudomonas aeruginosa* in the Clinical Laboratory. J Med Microbiol, Vol. 2, 9-15, 1969.
12. Verder E, Evans J: A proposed antigenic schema for the identification of strains of *Pseudomonas aeruginosa*. J Infect Dis, 109: 183, 1961.
13. Yumul Ç: Diyarbakır'da hastalardan izole edilen *P.aeruginosa*'ların piyosin tipleri, Mikrobiyoloji Bülteni, Cilt: 14, Sayı: 2, Nisan 1980.
14. Yumul Ç: *Pseudomonas aeruginosa*'yı tiplendirme yöntemleri 2. Ulusal Kükem Kongresi, 1981.