

Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesinde Ortaya Çıkan GSBL Pozitif *Klebsiella pneumoniae* Nedenli Nozokomiyal Bir Salgının AP-PCR ile Araştırılması

Investigation of a Nosocomial Outbreak Caused by ESBL Positive *Klebsiella pneumoniae* in Neonatal Intensive Care Unit by AP-PCR

Tuğrul HOŞBUL¹, Mustafa ÖZYURT¹, Ferhan KARADEMİR², Selami SÜLEYMANOĞLU²,
Tunçer HAZNEDAROĞLU¹

¹ Gülhane Askeri Tıp Akademisi Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Servisi, İstanbul.

¹ Gulhane Military Academy of Medicine, Haydarpaşa Training Hospital, Department of Medical Microbiology, İstanbul, Turkey.

² Gülhane Askeri Tıp Akademisi Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Servisi, İstanbul.

² Gulhane Military Academy of Medicine, Haydarpaşa Training Hospital, Department of Pediatrics, İstanbul, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 06.05.2011 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 15.08.2011

ÖZET

Bu çalışmada, bir üçüncü basamak eğitim hastanesi yenidoğan yoğun bakım ünitesi (YBÜ)'nde ortaya çıkan ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten *Klebsiella pneumoniae*'nin neden olduğu bir salgının AP-PCR (Arbitrarily-Primed Polymerase Chain Reaction) yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır. İkisi prematürite ve biri retrognati ve yarı damak takibi nedeniyle yenidoğan YBÜ'de yatan üç olguda nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonu gelişmiştir. Birinci olgunun yatışının beşinci gününde kan ve umbilikal sürüntü kültürlerinden; ikinci olgunun yatışının 15. gününde kan kültüründen ve üçüncü olgunun yatışının yedinci gününde kan kültüründen GSBL pozitif *K.pneumoniae* izolasyonu yapılmıştır. İzolatların tanımlanması, konvansiyonel yöntemlere ek olarak API Rapid ID 32 GN (BioMerieux, Fransa) otomatize sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiş; antibiyotik duyarlılıkları ise Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" önerileri doğrultusunda belirlenmiştir. Olgulara ait toplam dört izolatin aynı antibiyotik duyarlılık paternine sahip olduğu saptanmış; bunun üzerine aktif süreyans kapsamında YBÜ yüzeyleri, laringoskoplar, ventilatör ve ventilatör bağlantıları, stetoskoplar, nebulizatörler, aspiratör uçları, dezenfeksiyon solüsyonları, küvöz ve küvöz nemlendirme sularından çevre örnekleri alınmıştır. Bir küvöz nemlendirme suyu ve bir aspiratör ucu örneğinin kültüründen, olgulara ait izolatlarla benzer antibiyotipte *K.pneumoniae* suşları izole edilmiştir. Olgulardan ve çevre örneklerinden izole

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Tuğrul Hoşbul, GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Servisi, Selimiye Mahallesi, Tıbbiye Caddesi, 34668, Üsküdar, İstanbul, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 216 542 2020, **E-posta (E-mail):** tugrulhosbul@mynet.com

edilen toplam altı *K.pneumoniae* suşunun amoksisilin-klavulanik asit, sefazolin, sefepim, seftriakson, seftazidim, sefuroksim, aztreonam ve trimetoprim-sülfametoksazole dirençli; sefoksitin, imipenem, meropenem, gentamisin, tobramisin, amikasin, netilmisin, tetrasiklin, siprofloksasin ve kloramfenikole duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Hasta ve çevre izolatları arasındaki genetik ilişkinin araştırılması amacıyla M13 primeri kullanılarak AP-PCR yöntemi uygulandığında ise tek bir genotipik patern belirlenmiş ve tüm izolatların aynı genotipte olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, AP-PCR yönteminin ucuz, kolay uygulanabilir ve hızlı sonuç alınabilir olması gibi avantajlarıyla nozokomiyal salgınlara araştırılması ve olası enfeksiyon kaynağının saptanarak yayılımın kontrol edilmesinde başarıyla kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Klebsiella pneumoniae*; genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz; nozokomiyal enfeksiyon; polimeraz zincir reaksiyonu; AP-PCR.

ABSTRACT

In the present study, we describe an outbreak caused by extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Klebsiella pneumoniae* in the neonatal intensive care unit (NICU) of a tertiary-care hospital. Nosocomial blood-stream infections were detected in three patients hospitalized in NICU. Two of the cases were transferred to NICU due to premature birth and the other due to the presence of cleft palate and retrognathia. *K.pneumoniae* was isolated on the 5th day of hospitalization of the first patient from umbilical swab and blood culture; on the 15th day of hospitalization of the second patient from blood culture and on the 7th day of hospitalization of the third patient from blood culture. The isolates were identified by automated API Rapid ID 32 Staph (BioMerieux, France) system in addition to conventional laboratory methods. Antibiotic susceptibilities of the isolates were determined by using Kirby-Bauer disk diffusion method according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) criteria. The same antibiotic susceptibility patterns were detected in all isolates. Active surveillance cultures included environmental sampling from surfaces of NICU, laryngoscopes, ventilators and connections of ventilators, stethoscopes, nebulizers, aspiration tubings, disinfectant solutions, couveuse and couveuse distilled water. Two ESBL producing *K.pneumoniae* strains, presenting the same antibiotic susceptibility pattern with the clinical strains, were isolated from one couveuse distilled water sample and one aspiration tubing. All of the *K.pneumoniae* isolates were resistant to amoxycillin-clavulonic acid, cefazolin, cefepime, ceftazidime, cefuroxime, aztreonam and trimetoprim-sulphamethoxazole and susceptible to cefoxitin, imipenem, meropenem, gentamicin, tobramycin, amikacin, netilmisin, tetracycline, ciprofloxacin and chloramphenicol. Arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) analysis done with M13 primer revealed the same genotype for the patient and environmental *K.pneumoniae* isolates. It was concluded that AP-PCR which is a simple, rapid and cheap method for the determination of genetic relatedness between isolates, can be applied for the detailed evaluation of nosocomial outbreaks to detect the source of infection and control the dissemination of the outbreak.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; extended spectrum beta-lactamase; nosocomial infection; polymerase chain reaction; AP-PCR.

GİRİŞ

Klebsiella pneumoniae, morbidite ve mortaliteden en çok sorumlu tutulan ve hastane enfeksiyonlarından en sık izole edilen *Klebsiella* türüdür. Erişkin ve pediatrik yoğun bakım üniteleri (YBÜ)'nde yatan hastalar, diyabet ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi hastalıkların eşlik ettiği immün sistemi baskılanmış hastalar, damar içi katater ve idrar sondası uygulananlar ile geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi alan hastalar *K.pneumoniae* nedenli enfeksiyonların gelişimi açısından risk altındadırlar¹⁻³.

Son yıllarda tıbbi mikrobiyolojide epidemilerin araştırılması, olası enfeksiyon kaynağının saptanması ve enfeksiyonun yayılmasında rolü olabilecek etkenlerin ortaya konulmasında konvansiyonel yöntemlerin yanı sıra “Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction (AP-PCR)” gibi çok sayıda moleküler biyolojik yöntem sıklıkla ve başarıyla kullanılmaktadır⁴⁻⁶. Bu çalışmada, bir üçüncü basamak eğitim hastanesi olan hastanemizin yenidoğan YBÜ’de, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten *K.pneumoniae*’nın etken olduğu nozokomiyal enfeksiyon gelişen üç olgu tanımlanmış ve enfeksiyon kaynağının saptanarak epideminin yayılımının önlenmesinde AP-PCR yönteminin etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hastalar ve İzolatlar

Prematürite nedeniyle yenidoğan YBÜ’ye yatırılan birinci olgunun yatışının beşinci gününde yapılan kan kültürü ve umbilikal sürüntü örneklerinden; yine prematürite nedeniyle yenidoğan YBÜ’ye yatırılan ikinci olgunun yatışının 15. gününde alınan kan kültüründen; retrognati ve yarı damak nedeniyle yenidoğan YBÜ’ye yatırılan üçüncü olgunun ise yatışının yedinci gününde alınan kan kültüründen *K.pneumoniae* suşları izole edildi.

Aktif surveians kapsamında, YBÜ yüzeyleri, laringoskoplara, ventilatör ve ventilatör bağlantıları, stetoskoplar, nebulizatörler, aspiratör uçları, dezenfeksiyon solüsyonları, küvöz ve küvöz nemlendirme sularından çevre örnekleri alındı.

Olgulardan izole edilen dört suş ile çevre örneklerden izole edilen iki suş olmak üzere toplam altı *K.pneumoniae* izolatı, konvansiyonel yöntemlere ek olarak ticari API Rapid ID 32 GN (BioMerieux, Fransa) sistemiyle tanımlandı.

İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları

İzolatların amoksisilin-klavulanik asit, sefazolin, sefepim, seftriakson, seftazidim, sefoksitin, sefuroksim, aztreonam, imipenem, meropenem, gentamisin, tobramisin, amikasin, netilmisin, tetrasiklin, siprofloksasin, trimetoprim-sülfametoksazol ve kloramfenikole karşı duyarlılıkları “Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)” önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile araştırıldı⁷. GSBL üretimi çift disk sinerji testiyle saptandı.

AP-PCR

İzolatlardan nükleik asitlerin elde edilmesinde kaynatma yöntemi kullanıldı⁸. M13 primerinin (5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3') kullanıldığı AP-PCR yöntemi, Ayan ve arkadaşlarının⁹ çalışmalarında tarif ettikleri şekilde gerçekleştirildi. PCR ürünleri %1.5 konsantrasyonundaki agaroz jelle pipetlendi ve 100 V akım altında bir saat süreyle yürütüldü. Agaroz jel etidyum bromürle boyandı ve görüntüleme cihazında (Molecular Imager Gel Doc XR+, BioRad, USA) incelendi. İzolatlar arası benzerlik restriksiyon paternlerinin görsel olarak değerlendirilmesiyle belirlendi. Bant farkı izlenmeyen izolatlar aynı genotip olarak kabul edildi.

BULGULAR

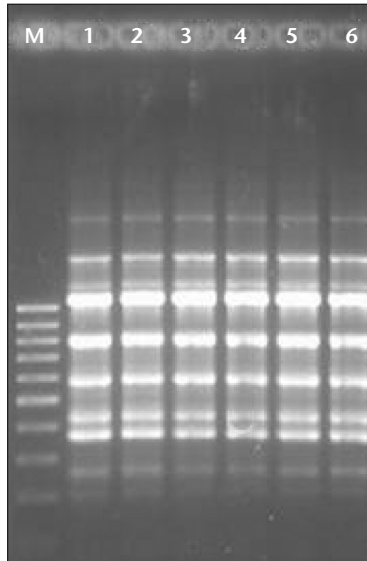
Hastanemizin yenidoğan YBÜ’de gelişen epidemiden üç olgunun etkilendiği izlenmiştir. Birinci ve ikinci olguda düşük doğum ağırlığı, mekanik ventilasyon, total parenteral beslenme, santral venöz kateterizasyon ve bakteriyemi öncesinde birinci olguda amikasin ve meropenem, ikinci olguda ampicilin, sefotaksim ve meropenem kullanımı olduğu belirlenmiş; üçüncü olguya sadece intravenöz sıvı uygulandığı saptanmıştır.

Süveyans kültürleri sonrası bir küvöz nemlendirme suyu ve bir aspiratör ucu örneğinden, olgulardaki izolatlara benzer fenotipte *K.pneumoniae* suşları izole edilmiştir. Tüm izolatlarda aynı antibiyotip paterni gözlenmiş ve izolatların amoksisilin-klavulanik asit, sefazolin, sefepim, seftriakson, seftazidim, sefuoksım, aztreonam ve trimetoprim-sülfametoksazole dirençli; sefoksitin, imipenem, meropenem, gentamisin, tobramisin, amikasin, netilmisin, tetrasiklin, siprofloksasin ve kloramfenikole duyarlı olduğu tespit edilmiştir. İzolatların tamamında GSBL üretimi saptanmıştır.

Olgulara ait suşlar ile çevre örneklerinden izole edilen suşlar arasındaki genetik ilişkinin AP-PCR ile değerlendirilmesi sonunda tek bir genotipik patern belirlenmiş ve tüm izolatların aynı genotipte olduğu görülmüştür (Resim 1).

TARTIŞMA

Ülkelere göre değişmekle birlikte *K.pneumoniae*, nozokomiyal enfeksiyonların %2-5’inden sorumlu olan bir patojendir⁶. “National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS)”ın 1986-2003 yılları arasındaki verilerinin incelendiği bir çalışmada, *K.pneumoniae* YBÜ’lerde yatan hastalarda gelişen pnömoninin dördüncü ve bakteremilerin de en sık beşinci nede-



Resim 1. İzolatlara ait AP-PCR jel görüntüsü [M: Büyüklük belirteci (100-1000 baz çifti); Sıra 1 ve 2: Birinci olguya ait kan ve umbilikal sürüntü örneklerinden; Sıra 3 ve 4: İkinci ve üçüncü olgulara ait kan örneklerinden; Sıra 5 ve 6: Küvöz nemlendirme suyu ve aspiratör ucu örneklerinden izole edilen suşlar].

ni olarak bildirilmiştir¹⁰. Yenidoğan ve erişkin YBÜ'de yatan hastalar, *Klebsiella* enfeksiyonlarına yol açabilecek uygulamaların birçoğuna maruz kaldıklarından, epidemilerin oluşması açısından diğer birimlerde yatan hastalara göre daha büyük risk altındadırlar^{2,11,12}.

Çalışmamızda, olgulardan ve epideminin görüldüğü dönemde yapılan çevre kültürlerinden izole edilen suşların aynı antibiyotipe sahip olduğu belirlenmiş; bu izolatların AP-PCR ile yapılan değerlendirmelerinde de aynı genotip oldukları saptanmıştır. Bu durum, etken patojenin olgular arası yayılımında tıbbi cihazların ve/veya kontamine sıvıların rol oynadığını düşündürmektedir. Hastane Enfeksiyon Kontrol Komitesi tarafından alınan önlemler sonrası çevresel kaynaklardan yapılan kontrol örneklemelerinde aynı etkenin saptanmamış olması ve sonraki dönemde benzer bir epideminin görülmeyişi bu hipotezi destekler niteliktedir. Aynı zamanda uygun antibiyotik tedavisinden sonra olgulara ait kontrol örneklerinin kültürlerinde de üreme olmamış ve hastalar şifa ile taburcu edilmişlerdir.

Son yıllarda tıbbi mikrobiyolojide olası bir epidemide kaynak araştırmasına yönelik yürütülen çalışmalarda, birçok moleküler biyolojik yöntem geniş bir kullanım alanı bulmuştur⁴⁻⁶. Çalışmamızda da nozokomiyal enfeksiyon kaynağının belirlenmesi amacıyla kullanılan AP-PCR yönteminin, kolay uygulanabilir, ucuz ve hızlı sonuç veren bir yöntem olması gibi avantajları nedeniyle, epidemilerin değerlendirilmesinde tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarında başarıyla uygulanabileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Gupta A, Della-Latta P, Todd B, et al. Outbreak of extended spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit linked to artificial nails. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004; 25(3): 210-5.
2. Cengiz AB. Yenidoğan sepsisi. *Çocuk Enf Derg* 2009; 3(4): 174-81.
3. Marra AR, Wey SB, Castelo A, et al. Nosocomial bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*: impact of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) production on clinical outcome in a hospital with high ESBL prevalence. *BMC Infect Dis* 2006; 6: 24.
4. Ben-Hamouda T, Foulon T, Cheikh-Masmoudi AB, Fendri C, Belhadj O, Ben-Mahrez K. Molecular epidemiology of an outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a Tunisian neonatal ward. *J Med Microbiol* 2003; 52(Pt 5): 427-33.
5. Durmaz R. Moleküler epidemiyolojinin prensipleri, s: 139-49. Durmaz R (ed), *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*. 2001, 2. baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
6. Cartelle M, del Mar Tomas M, Pertega S, et al. Risk factors for colonization and infection in a hospital outbreak caused by a strain of *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins. *J Clin Microbiol* 2004; 42(9): 4242-9.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Nineteenth Informational Supplement. M100-S19, 2009. CLSI, Wayne, Pa.
8. Gulmez D, Hascelik G. *Stenotrophomonas maltophilia*: antimicrobial resistance and molecular typing of an emerging pathogen in a Turkish university hospital. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11(11): 880-6.
9. Ayan M, Kuzucu C, Durmaz R, Aktas E, Cizmeci Z. Analysis of three outbreaks due to *Klebsiella* species in a neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003; 24(7): 495-500.
10. Gaynes R, Edwards JR; National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis* 2005; 41(6): 848-54.
11. Sardan YC, Zarakolu P, Altun B, et al. A cluster of nosocomial *Klebsiella oxytoca* bloodstream infections in a university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004; 25(10): 878-82.
12. Richards C, Alonso-Echanove J, Caicedo Y, Jarvis WR. *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections among neonates in a high risk nursery in Cali, Colombia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004; 25(3): 221-5.