

BİR YENİDOĞAN YOĞUN BAKIM ÜNİTESİNDE ORTAYA ÇIKAN KLEBSIELLA OXYTOCA SALGINININ MİKROBİYOLOJİK OLARAK ARAŞTIRILMASI

Mehmet Burak Selek,¹ Tuğrul Hoşbul,² Bayhan Bektöre,¹ Barış Yalçın,³ Orhan BAYLAN,¹ Mustafa Özyurt¹

¹ GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Servisi, İstanbul, Türkiye

² Gölcük Askeri Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Servisi, İzmit, Türkiye

³ Girne Askeri Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Servisi, Girne, KKTC

ÖZET

Amaç: Çalışmamızda hastanemiz yenidoğan yoğun bakım ünitesinde (YYBÜ) üç aylık dönemde geniş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üreten Klebsiella oxytoca'nın etken olduğu nozokomiyal üriner sistem enfeksiyonu gelişen sekiz olgu tespit edilmiştir. Bu çalışmada, muhtemel bir salgının kaynağının ortaya konması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: İdentifikasyon, VITEK 2 otomatize tanımlama cihazı kullanılarak doğrulandı. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kriterleri doğrultusunda araştırıldı. Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üretimi sefotaksim ve seftazidim diskleri ve bunların klavulanik asit ile kombinasyonları kullanılarak doğrulandı. Nükleik asit ekstraksiyonu kaynatma ile yapıldı. "Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction" (AP-PCR) daha önceden tanımlanan metoda uygun şekilde M13 primeri (5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3') kullanılarak gerçekleştirildi.

Bulgular: Salgın sekiz hastayı etkiledi. Yapılan araştırma, hastalardan izole edilen sekiz izolatu aynı fe-

notipik ve genotipik paterne sahip olduğunu gösterdi. Çevresel örneklemeler sonrası bir inkübatörden ve bir sağlık çalışanının elinden izole edilen suşlar ise hasta örnekleri ile benzer fenotipik paterne sahip fakat genotipik olarak farklı bulundular. AP-PCR ile olgulara ait tüm izolatlarda aynı genotipik patern saptanırken, çevresel izolat ve sağlık çalışanın el izolatının genotipik paterni farklı bulundu.

Sonuç: AP-PCR sonuçları salgının tek bir izolattan kaynaklandığını fakat aynı zamanda çevresel izolatlardan salgın izolatından farklı olduğunu gösterdi. Salgının kesin kaynağını gösterememiş olsak da, Klebsiella türleri ile inkübatörlerin, enteral besleme solüsyonlarının ve bebek mamalarının kolonize oldukları bilinmektedir ve diğer çalışmalarda bu tip kolonizasyonlar bildirilmiştir. Enfeksiyon kontrol komitesi tarafından alınan kontrol tedbirlerinin katı bir şekilde uygulanması sonrasında YYBÜ'den gelen hiçbir idrar kültüründe aynı K. oxytoca suşu izole edilmemiştir.

Anahtar Kelimeler:Yenidoğan yoğun bakım ünitesi, Klebsiella oxytoca, random amplified polimorfik DNA tekniği, üriner sistem enfeksiyonu. Nobel Med 2014; 10(1): 43-46

MICROBIOLOGICAL INVESTIGATION OF EMERGING *K. OXYTOCA* OUTBREAK IN A NEONATAL INTENSIVE CARE UNIT

ABSTRACT

Objective: We detected eight cases with urinary tract infection due to Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Klebsiella oxytoca* in neonatal intensive care unit (NICU) of our hospital within a three-months period. We aimed to detect the source of an possible outbreak.

Material and Method: Identification was confirmed by VITEK 2 bacterial identification system. Antibiotic susceptibility of the isolates were tested according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) criteria. ESBL production was confirmed using cefotaxime and ceftazidime discs and their combination with clavulanic acid. Nucleic acids were extracted by boiling. Arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) was performed by using M13 primer (5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3') as described before.

Results: The outbreak involved eight patients. The conducted research showed, eight isolates from patients having the same phenotypic and genotypic patterns. The strains isolated from a healthcare worker and an incubator after environmental screening cultures, showed the same antibiotic susceptibility pattern as the patient isolates but had a distinct genotypic pattern.

Conclusion: The evaluation of AP-PCR results indicated that the outbreak was caused by a single isolate, but results also showed different genotypic patterns apart from outbreak isolate for environmental isolates. Although we could not reveal the exact source of the outbreak, colonization of incubators, enteral feeding solutions and baby formulas by *Klebsiella* species is a known fact and also this kind of contamination findings are reported in other researches. After strict implementation of control measures by hospital infection control committee none of the urine cultures from NICU yielded the same *K. oxytoca* strain.

Key Words: Neonatal intensive care unit, *Klebsiella oxytoca*, random amplified polymorphic DNA technique, urinary tract infection *Nobel Med 2014; 10(1): 43-46*

GİRİŞ

Klebsiella türleri yoğun bakım ünitelerinde özellikle pediatrik hastalarda sepsis, pnömoni, üriner sistem enfeksiyonları, yumuşak doku enfeksiyonları gibi ağır enfeksiyonlara yol açabilen hastane enfeksiyonu etkenlerinden biridir. *Klebsiella pneumoniae* morbidite ve mortaliteden en çok sorumlu tutulan ve hastane enfeksiyonlarından en sık soyutlanan *Klebsiella* türüdür. *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*), *K. pneumoniae*'ya nazaran daha nadir görülen diğer bir türdür. *Klebsiella* türleri Avrupa ve ABD'de nozokomiyal bakteriyel enfeksiyonların %8'inde etken olarak bulunmuştur. Bu enfeksiyonlar içinde en sık sebep olduğu enfeksiyon ise üriner sistem enfeksiyonudur. Nozokomiyal üriner sistem enfeksiyonlarının %6-17'sinde *Klebsiella* türlerinin etken olduğu bulunmuştur. Pediatrik hastalarda özellikle yoğun bakım ünitesinde yatan prematür bebeklerde önemli bir enfeksiyon etkenidir.^{1,2} Bununla birlikte erişkin ve pediatrik yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalar, diyabet ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi hastalıkların eşlik ettiği immün sistemi baskılanmış hastalar, damar içi kateter ve idrar sondasına sahip hastalar ile geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi alan hastalar *Klebsiella* türlerine bağlı enfeksiyonların gelişimi açısından risk altındadırlar.^{2,3}

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 yöntemler sıklıkla ve de başarıyla kullanılmaktadır.^{1,4}

Çalışmamızda hastanemiz yenidoğan yoğun bakım ünitesinde (YYBÜ) üç aylık dönemde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten *K. oxytoca*'nın etken olduğu nozokomiyal enfeksiyon gelişen sekiz olgu araştırılmıştır. Çalışmamızda muhtemel bir salgının varlığı ortaya konarak kaynağının saptanması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Yenidoğan yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların sekizinde yapılan üriner sisteme ait örneklerin kültürlerinde GSBL üreten *K. oxytoca* suşları izole edildi. Bunun üzerine yoğun bakım ünitesi yüzeyleri, larinoskoplar, ventilatör ve ventilatör bağlantıları, stetoskoplar, nebülizatörler, aspiratör uçları, dezenfeksiyon solüsyonları ile küvöz ve küvöz nemlendirme suları gibi çevresel örnekleme yapıldı. Olgulardan sekiz, çevre örneklemelelerinden iki olmak üzere toplam on *K. oxytoca* suşu izole edildi. İzolatların tanımlanması konvansiyonel yöntemlere ilave olarak VITEK 2 Compact (BioMerieux, Marcy L'Etoile, Fransa) otomatik tanımlama sistemi ile gerçekleştirildi.

İzolatların amoksisilin klavulanik asit, sefazolin, sefepim, seftriakson, seftazidim, sefoksitin, sefuroksim, aztreonam, imipenem, meropenem, gentamisin, tobramisin, amikasin, netilmisin, tetrasiklin, siprofloksasin, trimetoprim-sülfametoksazol ve kloramfenikole →

olan duyarlılıkları Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)'ün kriterleri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile araştırıldı.⁵ Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretimi çift disk sinerji testi ile saptandı.

İzolatlar ait nükleik asitler kaynatma yöntemi ile elde edildi.⁶ Bu yöntem, M13 primeri (5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3') kullanılarak gerçekleştirildi. AP-PCR yöntemi, Ayan ve arkadaşlarının çalışmalarında tarif ettikleri şekilde gerçekleştirildi.⁷ PCR ürünleri, %1,5 konsantrasyonundaki agaroz jeli pipetlendi ve 100 volt akım altında bir saat süreyle yürütüldü. Agaroz jel etidyum bromid ile boyandı ve görüntüleme cihazında (Molecular Imager Gel Doc XR+, BioRad, USA) incelendi. İzolatlar arası benzerlik restriksiyon paternlerinin görsel olarak değerlendirilmesiyle ortaya kondu. Bant farkı izlenmeyen izolatlar genotip olarak aynı, bant farkı üçten fazla olan izolatlar ise farklı genotip olarak kabul edildi.

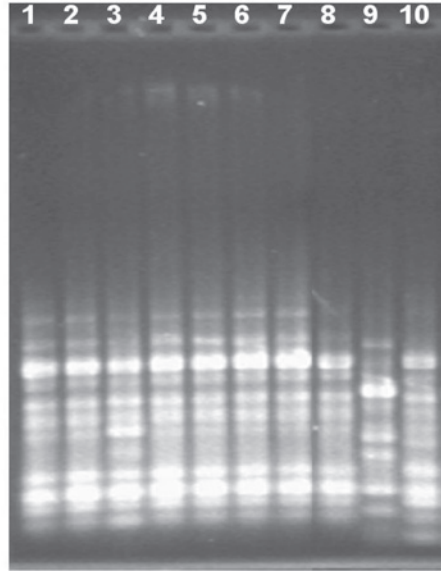
BULGULAR

Prematürite ve düşük doğum ağırlığı sebebiyle YYBÜ'de yatan sekiz hastada görülen enfeksiyon bulguları (CRP yüksekliği gibi) sebebiyle enfeksiyon kaynağına yönelik alınan idrar kültürlerinde GSBL üreten *K. oxytoca* suşları izole edildi. Yapılan değerlendirmeler sonrası olgulara ait sekiz izolatu aynı fenotip ve genotipe sahip oldukları saptandı. (Tablo 1, Şekil 1) Kaynağın saptanmasına yönelik alınan çevresel örneklerden bir sağlık çalışanına ve küvöz nemiendirme suyuna ait iki çevresel örnekte hasta izolatlarıyla aynı fenotip ve antibiyotik duyarlılığına sahip fakat farklı genotipte *K. oxytoca* suşları izole edildi. İzolatlar amoksisilin klavulanik asit, sefazolin, sefepim, seftriakson, seftazidim, sefuroksim, aztreonam ve trimetoprim-sülfametoksazole dirençli; imipenem, meropenem, gentamisin, tobramisin, amikasin, netilmisin, tetrasiklin ve siprofloksasine, duyarlı olarak saptandı (Tablo 1). İzolatların tamamında GSBL üretimi tespit edildi.

TARTIŞMA

Klebsiella oxytoca, *K. pneumoniae*'ye nazaran daha nadir görülen diğer bir tür olmakla birlikte GSBL gelişiminin de daha nadir olarak gözleendiği bir *Klebsiella* türüdür. Yenidoğan ve erişkin yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalar, *Klebsiella* enfeksiyonlarının gelişiminde rol oynayabilen risk faktörlerine sahip olmaları nedeniyle salgın gelişme olasılığı diğer birimlerde yatan hastalara göre daha yüksektir.^{1,3,8-11}

Salgın bir hastalığın ya da bu çalışmada olduğu gibi belirli bir etkene bağlı hastalığın belirli bir coğrafyada ve toplulukta belirli bir dönemde daha fazla olarak



Şekil 1: İzolatlar ait AP-PCR jel görüntüsü. (Sıra 1-8: Olgulara ait idrar izolatlari, Sıra 9: Sağlık çalışanı el izolatu, Sıra 10: Küvöz nemiendirme sıvısı izolatu)

Tablo 1: İzolatların antibiyotik duyarlılıkları

AMC	CZ	FEP	CRO	CAZ	CXM	AZT	IIMP	MEM	GEN	TOB	AK	NET	TET	CIP	SXT
R	R	R	R	R	R	R	D	D	D	D	D	D	D	D	R

AMC: Amoksisilin klavulanik asit, CZ: Sefazolin, FEP: Sefepim, CRO: Seftriakson, CAZ: Seftazidim, CXM: Sefuroksim, AZT: Aztreonam, IIMP: Imipenem, MEM: Meropenem, GEN: Gentamisin, TOB: Tobramisin, AK: Amikasin, NET: Netilmisin, TET: Tetrasiklin, CIP: Siprofloksasin, SXT: Trimetoprim-Sülfametoksazol. D: Duyarlı, R: Dirençli.

görülmesi olarak tanımlanabilir.¹² Bu çalışmada da YYBÜ'den gelen idrar kültürlerinde aynı antibiyogram paternine sahip GSBL üreten *K. oxytoca* üremelerinin sayısal olarak artması laboratuvarın dikkatini çekmiş ve enfeksiyon kontrol komitesi de uyarılarak araştırmaya başlanmıştır.

Çalışmamızda olgulardan ve epideminin görüldüğü dönemde yapılan çevre örneklemelerinden soyutlanan izolatlarda da aynı antibiyotik paterni saptandı. Bu durum, etken patojenin olgular arası yayılımında tıbbi cihazların ve/veya kontamine sıvıların rolünün olabileceğini düşündürmekteydi. Bunun üzerine tüm izolatların (olgu izolatları ve çevresel izolatlar) AP-PCR ile yapılan değerlendirmelerinde çevresel izolatlar dışında aynı genotipik paternde oldukları belirlenmiş ve salgının kaynağı tespit edilememekle birlikte olgu izolatlarındaki identiklik bunun bir salgın olduğunu genotipik olarak da ortaya koymuştur. Her ne kadar bu salgının kaynağı ortaya konamamış olsa da bazı çalışmalarda da bildirildiği gibi, yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde küvöz gibi kullanılan cihazlarla birlikte enteral besleme sıvıları, bebek mamalarının, *Klebsiella* türlerine bağlı nozokomiyal kolonizasyonlara ve enfeksiyonların gelişiminde önemli rol oynadığı bilinmektedir.^{13,14} →

BİR YENİDOĞAN YOĞUN BAKIM ÜNİTESİNDE ORTAYA ÇIKAN KLEBSIELLA OXYTOCA SALGINININ MİKROBİYOLOJİK OLARAK ARAŞTIRILMASI

Bu saptamanın sonucunda hastane enfeksiyon kontrol komitesinin bilgilendirilmesi ve aldığı önlemler sonrası çevresel kaynaklardan yapılan kontrol örneklemelerinde aynı etkenin saptanmamış olması ve sonraki periyotta benzer bir salgının görülmeyişi bu hipotezi destekler niteliktedir. Aynı zamanda uygun antibiyoterapi sonrası olgulara ait kontrol örneklerinin kültürlerinde de üreme olmamış ve hastalar şifa ile taburcu edilmiştir.

Son yıllarda tıbbi mikrobiyolojide olası bir salgında, kaynak araştırmasına yönelik yürütülen çalışmalarda pek çok moleküler biyolojik yöntemler geniş bir kullanım alanı bulmuştur.^{4,15,16} Moleküler tiplendirme yöntemleriyle epidemiyolojik olarak ilişkili, aynı tür içindeki izolatların genetik olarak da ilişkili olup olmadıkları araştırılmaktadır. Olası bir klonal ilişkinin gösterilmesi ile salgın izolatları, sporadik veya endemik olanlardan ayrılmakta, salgının kapsamı, kaynak ve rezervuarı hakkında bilgi edinilebilmektedir. AP-PCR, PCR temelli bir tiplendirme metodudur. Uygulama kolaylığı, ucuz ve hızlı sonuç alınabilir olmaları gibi nedenlerle salgınların değerlendirilmesinde tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarında sıklıkla ve başarıyla kullanılmaktadır.⁴ Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) ise kromozomun bütünlüğü bozulmadan elde edilmesi sonrası restriksiyon enzimleri ile kesilerek değişken akım veren özel bir elektroforez işlemi ile DNA bant profilleri oluşturulmasına dayalı bir tiplendirme yöntemidir. Zaman alıcı ve pahalıdır, ancak ayırım gücü oldukça yüksektir. Birçok bakterinin tiplendirilmesinde altın standart kabul edilmektedir.¹⁷ Bizim çalışmamızda ise izolatlar arası klonal ilişkinin gösterilebilmesi amacıyla ucuz ve kendi laboratuvarımızda yapılabilecek bir yöntem olan AP-PCR yöntemi başarı ile uygulanmıştır.

İ İLETİŞİM İÇİN: Mehmet Burak Selek GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Servisi, Selimiye Mah., Tıbbiye Cad., 34668, Üsküdar, İstanbul mbselek@gata.edu.tr
✓ GÖNDERDİĞİ TARİH: 02 / 05 / 2013 • KABUL TARİHİ: 03 / 09 / 2013

KAYNAKLAR

1. 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: 878-882.
2. Podschun R, Ullmann U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 589-603.
3. Cengiz AB. Yenidoğan sepsisi. *J Pediatr Inf* 2009; 3: 174-181.
4. Durmaz R. Moleküler epidemiyolojinin prensipleri. In: Durmaz R [ed], *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*. 2001, 2nd ed. Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti., İstanbul. pp 139-156.
5. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Nineteenth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute. Pennsylvania, 2009; 29: M100-S19.
6. Gülmez D, Hascelik G. Stenotrophomonas maltophilia: antimicrobial resistance and molecular typing of an emerging pathogen in a Turkish university hospital. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 880-886.
7. 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: 495-500.
8. Decré D, Burghoffer B, Gautier B, Petit JC, Arlet G. Outbreak of multi-resistant Klebsiella oxytoca involving strains with extended-spectrum beta-lactamases and strains with extended-spectrum activity of the chromosomal beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 881-888.
9. Jeong SH, Kim WM, Chang CL, et al. Neonatal intensive care unit outbreak caused by a strain of Klebsiella oxytoca resistant to aztreonam due to overproduction of chromosomal β -lactamase. *J Hosp Infect* 2001; 48: 281-288.
10. Schulz-Stübner S, Kniehl E. Transmission of extended-spectrum β -lactamase Klebsiella oxytoca via the breathing circuit of a transport ventilator: root cause analysis and infection control recommendations. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2011; 32: 828-829.
11. Zárte MS, Gales AC, Picão RC, et al. Outbreak of OXY-2-producing Klebsiella oxytoca in a renal transplant unit. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2099-2101.
12. Ergönül Ö. Salgın Analizi. *Klinik Gelişim* 2010; 23: 3-7.
13. Berthelot P, Grattard F, Patural H, et al. Nosocomial colonization of premature babies with Klebsiella oxytoca: probable role of enteral feeding procedure in transmission and control of the outbreak with the use of gloves. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001; 22: 148-151.
14. Riser E, Noone P, Howard FM. Epidemiological study of klebsiella infection in the special care baby unit of a London hospital. *J Clin Pathol* 1980; 33: 400-407.
15. Cartelle M, Tomas MM, 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: 4242-4249.
16. Kristóf K, Szabó DJ, Marsh W, et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Klebsiella spp. in a neonatal intensive care unit: risk factors for the infection and the dynamics of the molecular epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26: 563-570.
17. Durmaz R. Hastane enfeksiyonu salgınında moleküler biyolojik yöntemler. *Hastane Enfeksiyonları Dergisi* 2005; 9: 196-202.