

---

# Nozokomiyal Bir Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* Epidemisinin Arbitrarily-Primed Polymerase Chain Reaction (AP-PCR) ile Analizi

Yeşim ÇETİNKAYA\*, Sesin KOCAGÖZ\*, Murat HAYRAN\*, Güler GÜRSU\*\*, Serhat ÜNAL\*

\* Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İnfeksiyon Hastalıkları Ünitesi,  
\*\* Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı, ANKARA

## ÖZET

Son yıllarda majör bir nozokomiyal patojen haline gelmesi ve epidemilere yol açabilmesi nedeniyle metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), epidemiyolojik çalışmaların odak noktası olmuştur. Günümüzde nozokomiyal epidemilerin analizinde kullanılan tiplendirme yöntemleri MRSA suşları arasındaki fenotipik veya genotipik farklılıkları esas almaktadır. Arbitrarily-primed polymerase chain reaction (AP-PCR), bu amaçla kullanılan ve kompleks genomik DNA'dan karakteristik bant paternleri elde edilmesini sağlayan genotipik bir yöntemdir.

Bu çalışmada Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Erişkin Hastanesi'ndeki bir cerrahi servisinde başlayan MRSA epidemisinin AP-PCR yöntemi kullanılarak incelenmesi, suşlar arasındaki klonal ilişkinin gösterilmesi ve epideminin kaynağının saptanması amaçlanmıştır. Ekim 1995'de ilgili serviste yatmakta olan hastalara ait klinik örneklerden izole edilen MRSA suşlarında artış olduğu dikkati çekmiş ve bu servisten mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden elde edilen tüm MRSA izolatları prospektif olarak 10 hafta süreyle toplanmıştır (10 hastanın yara kültürlerinden toplam 14 MRSA üremesi). Ayrıca servis personelinden (4 araştırma görevlisi, 7 hemşire, 1 sekreter, 1 garsondan burun kültürleri), ortak olarak kullanılan 2 pansuman küveti ve 1 buhar aletinden de kültür alınmıştır. Üç araştırma görevlisinin, 3 hemşirenin ve servis sekreterinin burnu kültürlerinden, pansuman küvetlerinden birinden ve buhar aletinden alınan kültürlerden MRSA izole edilmiştir. AP-PCR analizleri sonucunda klinik örneklerden ve tarama amacıyla alınan kültürlerden elde edilen MRSA izolatlarının çoğunun iki majör klona ait olduğu görülmüştür (A ve B paternleri). Dört klinik örneğe ait MRSA izolatları ve pansuman küvetinden izole edilen MRSA AP-PCR analizlerinde tamamen aynı bant paternleri oluşturmuşlardır (A paterni). B paterni ise 3 klinik örnekte ve bir araştırma görevlisinin burnunda saptanmıştır. AP-PCR analizleri servisteki mini-MRSA epidemisinin pansuman küvetinin MRSA ile kontamine olmasından ve servis personelindeki nazal taşıyıcılıktan kaynaklandığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*, Hastane epidemileri, Arbitrarily-primed polymerase chain reaction

## SUMMARY

### **Analysis of A Nosocomial Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Outbreak by Using Arbitrarily-Primed Polymerase Chain Reaction (AP-PCR)**

In the past decade, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has become a major nosocomial pathogen, causing severe morbidity and mortality at many hospitals worldwide. Because of frequent nosocomial outbreaks of MRSA, this organism has been a focus of epidemiologic studies. Currently, there is no definitive typing system for distinguishing individual strains of MRSA. Most typing methods are based on either phenotypic or genotypic differences among MRSA strains. Arbitrarily primed-polymerase chain reaction (AP-PCR) is a technique for generation of characteristic fingerprints from complex genomic DNA.

In this study, it was planned to identify the source of an MRSA outbreak in a surgical ward at Hacettepe University Hospital and to demonstrate the clonal relationship among MRSA isolates by using AP-PCR. In October 1995, an increase was noticed in the number of MRSA isolates from this surgical ward. All MRSA isolates obtained from clinical specimens of this ward were collected prospectively for 10 weeks (14 MRSA isolates from wound cultures of 10 patients). Surveillance cultures were taken from ward personnel (nose cultures from 4 physicians, 7 nurses, 1 secretary, 1 waiter), 2 surgical dressing containers and nebulizer. MRSA was isolated from one of the surgical dressing containers, nebulizer and nose cultures of 3 physicians, 3 nurses and the secretary. AP-PCR analysis showed that most MRSA isolates belonged to 2 major clones (pattern A, pattern B). Pattern A was the most frequent one and was present in 4 clinical isolates and the surgical dressing container. Pattern B was identified in 3 clinical isolates and nose culture of a physician. Patterns closely resembling pattern A (pattern A') and pattern B (pattern B') were detected in a clinical isolate and nose culture of another physician; another clinical isolate and nose culture of a nurse, respectively.

AP-PCR analysis revealed that this mini-MRSA outbreak was originated from the contamination of common container with MRSA and nasal MRSA carriage in ward staff.

**Key Words:** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Hospital outbreaks, Arbitrarily-primed polymerase chain reaction.

En sık karşılaşılan cilt ve yumuşak doku infeksiyonu, septik artrit, osteomyelit, infektif endokardit, bakteriyemi ve prostetik cihaz infeksiyonu etkenleri arasında yer alan stafilokoklar son yıllarda nozokomiyal infeksiyon etkenleri arasında da ilk sıralarda yer almaya başlamışlardır.

1960 yılında metisilin ve daha sonra da diğer penisilinaz dirençli penisilinlerin kullanıma girmesi ile stafilokokal infeksiyonların tedavisinde önemli bir aşama kaydedilmiştir. Ancak çok kısa bir süre içerisinde (1961) stafilokoklarda metisilin direnci tanımlanmıştır<sup>[1]</sup>. 1970'li yılların sonuna doğru metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşları yaygın olarak kullanılan birçok antibiyotiğe (klindamisin, kloramfenikol, tetrasiklinler, makrolid grubu antibiyotikler, rifampisin, aminoglikozidler, trimetoprim-sulfametoksazol, 1980'li yılların sonunda kinolonlar) karşı dirençli hale gelmeye başlamıştır. Çoklu (multiple) antibiyotik direncinin beraberinde getirdiği tedavi güçlüğü ve nozokomiyal epidemilere yol açabilen bir patojen olması nedeniyle metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) tüm dünyada ciddi bir sağlık sorunu haline gelmiştir.

İlk nozokomiyal MRSA epidemisinin 1963 yılında tanımlanmasını takiben her yıl giderek artan sayıda MRSA epidemisi bildirilmiş ve günümüzde bu mikroorganizma birçok hastanede endemik hale gelmiştir<sup>[2-7]</sup>. Henüz MRSA için kesin bir tiplendirme sistemi tanımlanmamış, nozokomiyal epidemilerin analizinde kullanılabilecek standart bir yöntem belirlenmemiştir. Günümüzde nozokomiyal epidemilerin analizinde kullanılan tiplendirme yöntemleri MRSA suşları arasındaki fenotipik (antibiyotik duyarlılığı, bakteriyofaj tiplendirmesi, kapsül tiplendirmesi, multilokus enzim elektroforez, protein elektroforez/immunoblotting vb.) veya genotipik (plazmid fingerprinting, Southern-blotting, arbitrarily primed-polymerase chain reaction, pulsed field gel electrophoresis vb.) farklılıkları esas almaktadır<sup>[8]</sup>.

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi (HÜTF) Erişkin Hastanesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Servisi'nde yatmakta olan hastalardan mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden rapor edilen MRSA üremelerinde Ekim 1995 tarihinden itibaren artış olduğu dikkati çekmiştir. 1995'in ilk 9 ayında bu servisten gönderilen klinik örneklerden toplam 17 MRSA (13 hastadan), 4 MSSA (2 hasta-

dan) üremesi rapor edilmiş, 24.10.1995-10.11.1995 arasında ise antibiyotik duyarlılık paternleri aynı olan 5 MRSA üremesi (4 hastadan) bildirilmiştir (Tablo 1). Bunun üzerine Kasım 1995 ortasından itibaren aynı servisten mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen örneklerde üreyen ve serviste alınan tarama kültürlerinden elde edilen MRSA izolatlarının nozokomiyal epidemilerin analizinde yeni kullanılmaya başlanan yöntemlerden biri olan AP-PCR (arbitrarily primed-polymerase chain reaction) ile analizi planlanmıştır.

İnfeksiyon kontrol komitesine ulaşan verilere göre ilgili serviste 1996'nın ilk 9 ayında saptanan 9 yara infeksiyonundan 3'ünde etken MRSA'dır (nozokomiyal infeksiyon oranı %4).

### MATERYAL ve METOD

İlgili servisten mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden 24.10.1995'ten başlayarak üç haftalık bir dönem içinde antibiyotik duyarlılık paternleri aynı olan toplam 5 MRSA üremesi (4 hastadan) bildirilmiştir (Tablo 2). 1995 yılının ilk 9 ayında aynı servise ait MRSA üremeleri gözden geçirildiğinde (Tablo 1) bunun bir MRSA epidemisinin başlangıcı olabileceği düşünülmüş ve 15.11.1995'den itibaren bu servisten erişkin mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden rapor edilen tüm MRSA üremeleri toplanmış, Şubat 1996'da ilgili servisten hiç MRSA üremesi rapor edilmemesi nedeniyle bu tarihte bakteri toplama işlemine son verilmiştir. Bakteriler infeksiyon hastalıkları ünitesi araştırma laboratuvarında, -20°C'de glikserol-Mueller Hinton broth içinde saklanmıştır.

MRSA üremesi olan tüm hastaların dosya bilgileri (yaş, cinsiyet, yatış tarihi, yatış nedeni, oda numarası, geçirdiği operasyon, aldığı antibiyotik profilaksisi ve/veya tedavisi, MRSA üremesinin olduğu tarih vb.) toplanarak kayıt edilmiştir.

MRSA üremelerinin ait olduğu servisin doktorları (4 araştırma görevlisi, 1 intern doktor), hemşireleri<sup>[7]</sup>, sekreteri<sup>[1]</sup> ve garsonundan<sup>[1]</sup> burun kültürleri (sağ ve sol burun deliklerinden) alınmış ve transport

besi yeri kullanmadan direkt olarak koyun kanlı agar ekimleri yapılmıştır. Ayrıca, buhar aleti ve 2 pansuman küvetinden alınan örnekler de aynı şekilde ekilmiştir.

Tarama çalışmaları sırasında alınan ve koyun kanlı agar ekimi yapılan örneklerin 35°C'de 24 saat süreyle inkübasyonunu takiben saptanan tüm üremelere önce katalaz testi uygulanmıştır. Katalaz pozitif bulunan izolatlara HÜTF Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan sağlanan tavşan plazması ile tüp koagülaz testi uygulanmıştır.

Servis personeli, buhar aleti ve 2 pansuman küvetinden yapılan kültürlerde katalaz ve koagülaz pozitifliği ile *S. aureus* olduğu belirlenen tüm üremelerin ve hasta suşlarının NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)'e uygun olarak mikrodilüsyon yöntemiyle oksasilin, sulbaktam-ampisilin, sefazolin, siprofloksasin, trimetoprim-sulfametoksazol ve vankomisin için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri saptanmıştır<sup>[9]</sup>.

**PCR:** Bakteri DNA'sının hazırlanmasında Ünal ve arkadaşları tarafından stafilkoklar için tanımlanmış olan hızlı lizis protokolü modifiye edilerek kullanılmıştır<sup>[10]</sup>. İşlem öncesinde tüm MRSA izolatlarının Mueller-Hinton sıvı besiyerine ekimi yapılmıştır. 35°C'de bir gecelik inkübasyonu takiben 5000 rpm'de 20 dakikalık santrifüjle bakterilerin çökmesi sağlanmış ve üst sıvı uzaklaştırılmıştır. Bakteri çökelikleri steril koşullarda ependorf tüplere aktarılmış ve 14000 rpm'de 5 dakika daha santrifüj edilmiştir. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra kalan bakteri çökeleğinin üzerine 50 µL lizostafin (Sigma, 1 µg/mL) eklenip 5 dakika 37°C'de bekletilmiştir. Daha sonra bu süspansiyonun üzerine 50 µL proteinaz K (Sigma, 10 mg/mL) eklenmiş ve 5 dakika daha 37°C'de bekletilmiştir. Tüpler kaynar su içinde 15 dakika bekletildikten sonra 1 dakika 14000 rpm'de santrifüj edilmiş ve üst sıvı yeni bir ependorf tüpe aktararak -20°C'de saklanmıştır. Hazırlanan bakteri DNA süspansiyonununun 1 µL'si 50 µL PCR karışımı içinde amplifikasyona alınmıştır.

**Tablo 1. Ocak 1995-Şubat 1996 arasında ilgili servisten mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen klinik örneklerdeki *S. aureus* üremelerinin dağılımı**

Tarih	MRSA (sayı)	MSSA (sayı)
Ocak 1995-Eylül 1995	17 (13 hastadan)	4 (2 hastadan)
Ekim 1995-Ocak 1996	19 (13 hastadan)	0
Şubat 1996	0	0

Amplifikasyonlarda *Mycobacterium tuberculosis*'e özgül primerler (5' CCTGTGG GGTC-CGGGCTTTC 3', 5' GATCTGCGGGTCGTCC-CAGGT 3') ile M13 universal primeri (sequencing primer: 5' TTATGTAACGACGGCCAGT 3'; reverse sequencing primer: 5' GGAAACAGCTAT-GACCATG 3') kullanılmıştır. Her tüpte 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), %0.1 TritonX-100, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, her dNTP'den 0.2 mM, 1 ünite taq polimeraz enzimi (Epicentre) ve 50 pmol primer olacak şekilde reaksiyon karışımları hazırlanmıştır. Her MRSA AP-PCR çalışmasında, örneklerin *M. tuberculosis*'e özgül primerlerden biri ile amplifikasyonu yapılmıştır. DNA amplifikasyonları DNA "thermocycler" da (Stuart) üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapılmıştır. Amplifikasyonda şu parametreler kullanılmıştır:

- "Low-stringency" sikluslar (3 siklus):  
Denatürasyon 94°C 1 dakika  
"Low-stringency annealing" 30°C 1 dakika  
Extension 72°C 1 dakika

- High-stringency" sikluslar (45 siklus)

Denatürasyon 94°C 1 dakika

"High-stringency annealing" 55°C 1 dakika

Extension 72°C 1 dakika

Elde edilen amplifikasyon ürünlerinin 10 µL'si, 5 µL Orange-G boyası içeren yüklem tamponu ile karıştırılmış ve %2'lik agaroz jelde çukurlara aktarılmıştır. Bir çukura standart DNA büyüklük işareti ekledikten sonra 120 volt/saat'de elektroforezi (Consort) yapılmıştır. Elektroforez Orange-G boyası jelin sonuna geldiğinde tamamlanmış ve jel etidyum bromid (0.1 µg/ml) ile 15 dakika muamele edilmiştir. Jel distile su ile yıkandıktan sonra oluşan bantlar UV (ultraviyole) lamba (Consort) altında analiz edilmiştir. Her AP-PCR çalışmasında bir negatif, bir de pozitif kontrol kullanılmıştır.

### SONUÇLAR

Ekim 1995-Şubat 1996 tarihleri arasında ilgili cerrahi servisten mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden 13 hastaya ait toplam 19 MRSA üremesi rapor edilmiştir. Bu üremelerin liste-

**Tablo 2. Ekim 1995-Ocak 1996 arasında ilgili servisten mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden rapor edilen MRSA üremeleri (disk diffüzyon)**

Tarih	Hasta	Püy Kültürü	Penisilin	Metisilin	Sefazolin	CAM	NOR	T/S
04.10.95	DS	MRSA	D	D	D	D	D	H
28.10.95	GK	MRSA	D	D	D	D	D	H
31.10.95	AA	MRSA	D	D	D	D	D	H
09.11.95	DS	MRSA	D	D	D	D	D	H
10.11.95	TÖ	MRSA	D	D	D	D	D	H
15.11.95	MC	MRSA	D	D	D	D	D	H
05.11.95	HA	MRSA	D	D	D	D	D	H
15.11.95	DS	MRSA	D	D	D	D	D	H
16.11.95	HA	MRSA	D	D	D	D	D	H
23.11.95	NT	MRSA	D	D	D	D	D	H
27.11.95	FB	MRSA	D	D	D	D	D	H
02.12.95	HY	MRSA	D	D	D	D	D	H
13.12.95	SE	MRSA	D	D	D	D	D	H
29.12.95	HÇ	MRSA	D	D	D	D	D	H
02.01.96	HAG	MRSA	D	D	D	D	D	H
09.01.96	HÇ	MRSA	D	D	D	D	D	H
13.01.96	İÖ	MRSA	D	D	D	D	D	H
15.01.96	HÇ	MRSA*	D	D	D	D	D	H
24.01.96	İÖ	MRSA	D	D	D	D	D	H

\*Boğaz kültürü NOR: Norfloksasin CAM: Amoksisilin-klavulanik asit T/S: Trimetoprim-sulfametoksazol

si Tablo 2'de verilmiştir. Şubat 1996 boyunca bu servisten hiç MRSA üremesi rapor edilmemiş ve 15.11.1995-24.01.1996 arasındaki, 10 hastaya ait 14 MRSA üremesinin AP-PCR ile incelemesi yapılmıştır.

AP-PCR ile incelemelerinin yapılması amacıyla üremelerin toplanmaya başladığı tarih olan 15.11.1995'ten itibaren mikrobiyoloji laboratuvarında disk diffüzyon yöntemi kullanılarak MRSA olduğu rapor edilen tüm bakterilerin antibiyotik duyarlılık testleri (oksasilin, sulbaktam-ampisilin, sefazolin, siprofloksasin, trimetoprim-sulfametoksazol ve vankomisin) mikrodilüsyon yöntemiyle tekrarlanmış ve sonuçlar Tablo 3'de verilmiştir. Mikrodilüsyon yöntemiyle de izolatların metisiline dirençli olduğu doğrulanmış ve metisilin direncinin yüksek derecede olduğu dikkati çekmiştir.

MRSA üremesi olan hastalarla ilgili bazı bilgiler (yaş, cinsiyet, yatış-ilk MRSA üremesi arasında geçen süre, ilk MRSA üremesi öncesinde antibiyotik kullanımı) Tablo 4'de özetlenmiştir. Hastaların yatışlarından ilk MRSA üremesine kadar geçen ortalama süre 34.5 gün (sınır 20-53 gün) olarak bulunmuş, bu süre içinde tüm hastalara oral ya da intravenöz sulbaktam-ampisilin veya 1. kuşak sefalosporin tedavisi verildiği saptanmıştır. Hastaların yarısından çoğunu çocukların oluşturduğu (7 çocuk, 3 erişkin, yaş

ortalaması= 18.9), 9 hastaya travma, yanık, konjenital anomali gibi nedenlerle rekonstrüktif cerrahi uygulandığı, 1 hastanın ise malignansi nedeniyle opere edildiği dikkati çekmiştir.

Servis personelinden, buhar aleti ve 2 pansuman küvetinin birinden alınan toplam 17 kültürün hepsinde üreyen mikroorganizmalar katalaz pozitif bulunmuştur. Diğer pansuman küvetinden alınan kültürde üreme olmamıştır. Tüp koagülaz testi uygulandığında 4 araştırma görevlisinden 3'ünün, 7 hemşireden 3'ünün ve sekreterin burun kültürlerinde üreyen stafilokoklarla, pansuman küveti ve buhar aletinden üreyen stafilokokların koagülaz pozitif (*S. aureus*) olduğu saptanmıştır (Tablo 5).

Bu testler sonucunda *S. aureus* olduğu gösterilen tüm bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları mikrodilüsyon yöntemiyle çalışılmış ve hepsinin metisiline dirençli olduğu gözlenmiştir (Tablo 6).

MRSA izolatlarının (14 hasta izolatu + tarama kültürlerinde saptanan 9 izolat) *M. tuberculosis*'e özgül primerler kullanılarak yapılan AP-PCR analizlerinin sonuçları birbiriyle uyumlu bulunmuştur. Elde edilen band paternleri incelendiğinde 23 izolattan 9'unun 2 ayrı klonu (A paterni ve B paterni) ait olduğu düşünülmüştür. Resim 1 ve Resim 2'de 5 GATCTGCGGGTCGTCCCAGGT 3 primeri kullanılarak elde edilen band paternleri görülmektedir.

**Tablo 3. AP-PCR'la analizi planlanan hasta izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları (MİK= µg/mL)**

Tarih	Hasta	Oksasilin	SAM	Sefazolin	Cip	T/S	Vankomisin
15.11.95	MC	128	64	256	16	0.5	< 0.125
15.11.95	HA	256	64	256	16	1	0.5
15.11.95	DS	256	64	256	16	1	0.5
16.11.95	HA	64	128	64	> 16	0.5	0.25
23.11.95	NT	32	64	128	16	0.5	0.25
27.11.95	FB	256	128	> 256	8	1	0.125
02.12.95	HY	128	128	128	16	0.5	0.5
13.12.95	SE	128	128	> 256	> 16	0.25	< 0.125
29.12.95	HÇ	256	64	128	16	0.5	0.5
02.01.96	HAG	256	> 256	128	16	0.5	< 0.125
09.01.96	HÇ	128	> 256	> 256	> 16	0.5	
13.01.96	IÖ	64	128	128	16	1	0.5
15.01.96	HÇ	128	> 256	128	16	1	< 0.125
24.01.96	IÖ	64	128	64	> 16	1	1
Kontrol	ATCC 29213	0.5	2	2	1	1	0.125

SAM: sulbaktam-ampisilin Cip: siprofloksasin

**Tablo 4. MRSA üremesi olan hastalarla ilgili bilgiler**

Tarih	Hasta	Püyükültürü	Yaş/cinsiyet	Yatış-ilk MRSA üremesi	1. MRSA üremesi öncesinde antibiyotik kullanımı
15.11.95	MC	MRSA	45/E	21 gün	21 gün (SAM, siprofloksasin)
15.11.95	HA	MRSA	52/E	43 gün	33 gün (rifampisin, SAM)
15.11.95	DS	MRSA	6/K	27 gün	14 gün (sefazolin, SAM)
16.11.95	HA	MRSA	52/E	43 gün	33 gün (rifampisin, SAM)
23.11.95	NT	MRSA	15/E	20 gün	10 gün (sefazolin)
27.11.95	FB	MRSA	4/E	24 gün	20 gün (SAM)
02.12.95	HY	MRSA	3/K	28 gün	23 gün (sefazolin, SAM)
13.12.95	SE	MRSA	6/E	37 gün	7 gün (sefazolin)
29.12.95	HÇ	MRSA	3/K	43 gün	18 gün (SAM + amikasin)
02.01.96	HA	MRSA	8/E	53 gün	60 gün (sefazolin, SAM)
09.01.96	HÇ	MRSA	3/K	43 gün	18 gün (SAM + amikasin)
13.01.96	İÖ	MRSA	43/E	49 gün	40 gün (SAM, amikasin)
15.01.96	HÇ	MRSA	3/K	43 gün	18 gün (SAM + amikasin)
24.01.96	İÖ	MRSA	43/E	49 gün	40 gün (SAM, amikasin)

**Tablo 5. Tarama kültürlerinin sonuçları**

Kültürün alındığı yer	Katalaz	Koagülaz
Buhar aleti	+	+
Pansuman küveti-1	+	+
Araştırma görevlisi-1*	+	+
Araştırma görevlisi-2*	+	+
Araştırma görevlisi-3*	+	+
Araştırma görevlisi-4*	+	-
İntern doktor*	+	-
Hemşire-1*	+	+
Hemşire-2*	+	+
Hemşire-3*	+	+
Hemşire-4*	+	-
Hemşire-5*	+	-
Hemşire-6*	+	-
Hemşire-7*	+	-
Sekreter*	+	+
Garson*	+	-
Pansuman küveti-2	Üreme yok	

\*Burun kültürü

Üç hastadan (4 örnek) ve pansuman küvetinden elde edilen MRSA izolatlarında A paterni (toplam 5 izolatta) saptanmıştır (Tablo 7A). Aynı band paternini vermeleri nedeniyle bu izolatların birbiriyle aynı olduğu (aynı klonla ait olduğu) sonucuna varılmıştır.

İki hastanın püyükültürlerinden (3 örnek) ve 1 araştırma görevlisinin burun kültüründen elde edilen MRSA izolatlarında ise B paterni (toplam 4 izolatta) saptanmıştır (Tablo 7B). Band paternlerinin tamamen aynı olması nedeniyle bu izolatların da aynı klonla ait olduğu düşünülmüştür.

Ayrıca 1 hasta ve 1 araştırma görevlisine ait 2 izolat A'ya (A' paterni), 1 hasta ve 1 servis hemşiresine ait 2 izolat da B'ye (B' paterni) çok benzeyen band paterni vermiştir (Tablo 7C).

*M. tuberculosis*'e özgül primerler kullanılarak aynı olup olmadığı anlaşılamayan bu izolatların (A' ve B' paterni veren izolatlar) M13 universal primeri kullanılarak yeniden AP-PCR analizi yapılmıştır. Bu analiz sonucunda elde edilen band paternlerine bakılarak A' paterni veren izolatların birbiriyle aynı ve A paterni veren izolatlardan farklı olduğu görülmüştür. B' paterni veren izolatların da birbiriyle aynı ve B paterni verenlerden farklı olduğu sonucuna varılmıştır (Tablo 7D).

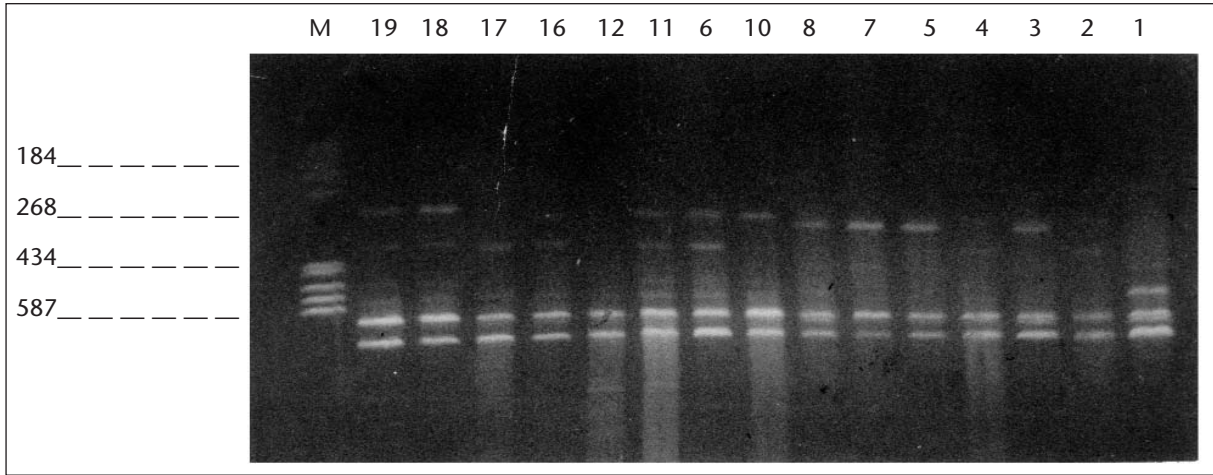
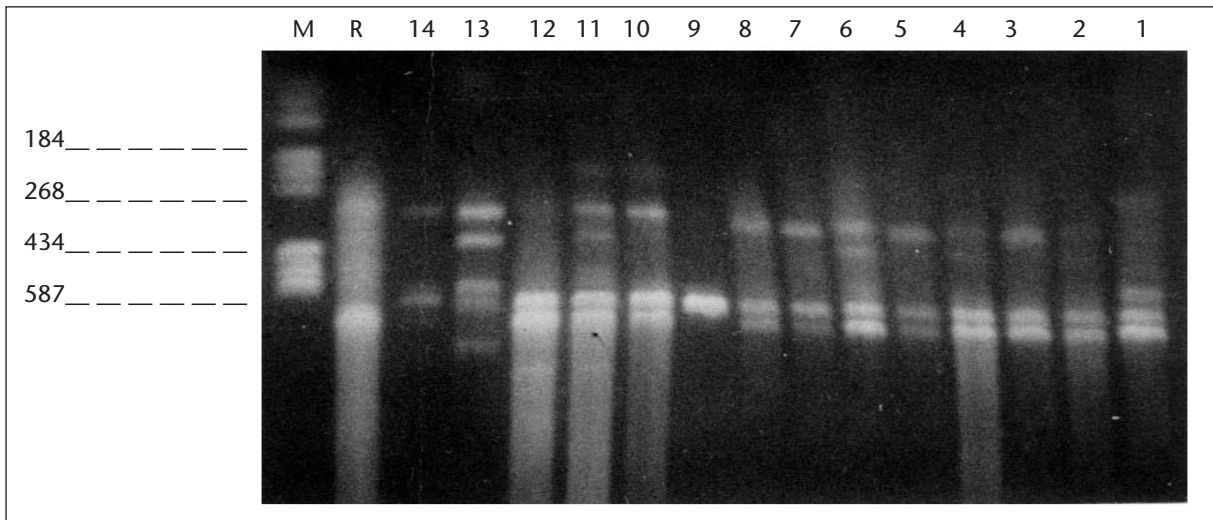
*M. tuberculosis*'e özgül primerlerle birbirlerinden ve diğer MRSA izolatlarından tamamen farklı



**Tablo 6. Tarama kültürlerinden izole edilen *S. aureus*'ların antibiyotik duyarlılıkları (MİK= µg/mL)**

Kültürün alındığı yer	Oksasilin	SAM	Sefazolin	Cip	T/S	Vankomisin
Buhar aleti	128	64	128	> 16	2	0.5
Pansuman küveti-1	64	128	64	> 16	1	0.125
Hemşire-1*	64	64	128	8	1	0.125
Hemşire-2*	128	128	> 256	> 16	1	0.125
Hemşire-3*	32	32	32	16	1	0.125
Ar. Gör.-1*	256	128	128	16	0.5	< 0.125
Ar. Gör.-2*	128	> 256	> 256	8	1	< 0.125
Ar. Gör.-3*	128	128	128	8	0.5	0.125
Sekreter*	32	64	64	16	1	0.125

\*Burun kültürü SAM: sulbaktam-ampisilin Cip: siprofloksasin T/S: trimetoprim-sulfametoksazol

**Resim 1. *M. tuberculosis*'e özgül primerler ile elde edilen AP-PCR band paternleri A Paterni; Çukur 3, 5, 7, 8, 14, B Paterni; Çukur 16, 17, 18, 19, A' Paterni; Çukur 2, 4, B' Paterni; Çukur 6, 11, Farklı bant paternleri: Çukur 1, 9, 10, 12, 13, 15, M: DNA weight marker (Bsh I and Msp I digested pHC314 DNA), R: *S. aureus* positive control****Resim 2. *M. tuberculosis*'e özgül primerler ile elde edilen AP-PCR band paternleri A Paterni; Çukur 3, 5, 7, 8, 14, B Paterni; Çukur 16, 17, 18, 19, A' Paterni; Çukur 2, 4, B' Paterni; Çukur 6, 11, Farklı bant paternleri: Çukur 1, 9, 10, 12, 13, 15, M: DNA weight marker (Bsh I and Msp I digested pHC314 DNA), R: *S. aureus* positive control**

**Tablo 7A. AP-PCR analizlerinin sonuçları: A paterni**

AP-PCR sonucu	MRSA izolatının kaynağı
A paterni ( <i>M. tuberculosis</i> 'e özgül primerlerle)	MC (hasta) HÇ (hasta, 09.01.1996) Pansuman küveti-1 HAG (hasta) HÇ (hasta, 29.12.1995)

**Tablo 7B. AP-PCR analizlerinin sonuçları: B paterni**

AP-PCR sonucu	MRSA izolatının kaynağı
B paterni ( <i>M. tuberculosis</i> 'e özgül primerlerle)	İÖ (hasta, 13.01.1996) İÖ (hasta, 24.01.1996) SE (hasta) Araştırma görevlisi-3

**Tablo 7C. AP-PCR analizlerinin sonuçları: A' ve B' paternleri**

AP-PCR sonucu	MRSA izolatının kaynağı
A' paterni ( <i>M. tuberculosis</i> 'e özgül primerlerle)	Araştırma görevlisi-1 DS (hasta)
B' paterni ( <i>M. tuberculosis</i> 'e özgül primerlerle)	HÇ (hasta, 15.01.1996) Hemşire-2

**Tablo 7D. AP-PCR analizlerinin sonuçları: A' ve B' paternleri**

AP-PCR sonucu	Yorum
A' paterni (M13 universal primeri ile)	Araştırma görevlisi-1 ve DS birbiriyle aynı, A paterninden farklı
B' paterni (M13 universal primeri ile)	HÇ ve hemşire-2 birbiriyle aynı, B paterninden farklı

band paterni veren 5 hasta (6 izolat), sekreter, 1 araştırma görevlisi, 2 hemşire ve buhar aletine ait MRSA izolatlarının farklı klonlara ait olduğu düşünülmüştür (Tablo 7E).

### TARTIŞMA

Son yıllarda stafilokoklar nozokomiyal infeksiyon etkenleri arasında ilk sıralarda yer almaya başlamışlardır. Stafilokoklarda metisiline direnç oranı yönün-

den ülkeler ve hastaneler arasında önemli farklılıklar mevcuttur. Günümüzde tüm dünyada ciddi bir sağlık sorunu haline gelen MRSA, nozokomiyal epidemilere yol açabilen ve herhangi bir sağlık kurumunda endemik hale geldiği takdirde eradikasyonu çok güç olan bir nozokomiyal patojendir.

MRSA taşıyan hastaları saptamaya yönelik süreyans metodları ile ilgili en önemli çalışmalardan bi-



**Tablo 7E. AP-PCR sonuçlarının analizi: Farklı band paternleri**

AP-PCR sonucu	MRSA izolatının kaynağı
Tamamen farklı band paterni verenler ( <i>M. tuberculosis</i> 'e özgül primerlerle)	Sekreter
	HA (hasta, 15.11.1995)
	HA (hasta, 16.11.1995)
	NT (hasta)
	FB (hasta)
	HY (hasta)
	Hemşire-1
	Hemşire-3
	Araştırma görevlisi-2
	Buhar aleti

ri 1982'de Thompson ve arkadaşları tarafından yapılmıştır<sup>[11]</sup>. Bu çalışmada MRSA infeksiyonlarını saptamak ve kontrol altına almak amacıyla üç değişik sürveyans yöntemi uygulanmıştır:

1. Klinik laboratuvar sürveyansı
2. Yüksek riskli hastaların aylık prospektif mikrobiyolojik sürveyansı
3. Daha önceye ait MRSA infeksiyonu ya da kolonizasyonu olan hastaların saptanması ve bu hastalar yeniden hastaneye yattığında kültür sonuçları belli olana kadar izolasyonları.

Bu üç yaklaşımın her biriyle MRSA olgularının yaklaşık 1/3'ünü saptamak mümkün olmuştur. Sürveyans çalışmaları ve kontrol önlemlerinin kombine edilmesiyle MRSA infeksiyonlarının insidans ve prevalansında belirgin bir azalma sağlanabileceği saptanmıştır.

Stafilokoklarda metisiline direnç oranı hastaneler arasında değişkenlik gösterir. Hastanenin herhangi bir servisinde MRSA ile infekte ve/veya kolonize olan hastaların sayısında artış saptanması o servisteki bir MRSA epidemisinin habercisi olabilir. Sürveyans çalışmaları (klinik laboratuvar sürveyansı, tarama kültürleri, infekte ve/veya kolonize hastalarla ilgili dosya bilgilerinin toplanması gibi) bu tür bir epideminin erken dönemde fark edilmesi, kaynağının saptanması ve kontrol önlemlerinin alınması açısından büyük önem taşır.

MRSA'nın endemik olduğu hastanelerde bu mikroorganizma ile infekte veya kolonize hasta sayısının fazlalığı nedeniyle klinik laboratuvar sürveyansının Thompson ve arkadaşları tarafından tanımlanan di-

ğer iki yönleme oranla daha fazla önem taşıdığı düşünülebilir<sup>[11]</sup>. Mikrobiyoloji laboratuvarına servislerden gönderilen klinik örneklerden rapor edilen üremelerin günlük takibi ve bu verilerin kaydedilmesi ile her servisteki MRSA (ya da başka bir nozokomiyal patojen) sorunu hakkında bilgi edinilebilir. Bu tür bir çalışmayla MRSA üremelerindeki herhangi bir artışın erken dönemde farkedilmesi ve endemik bir ortamda gelişen bir MRSA epidemisinin saptanması mümkün olabilir. Herhangi bir epideminin erken dönemde saptanması, kaynağın bulunmasını ve epideminin kontrol altına alınmasını daha kolay hale getirecektir.

MRSA'nın endemik olduğu hastanelerde yatan hastalarda kolonizasyon oranının %0.4-1'e kadar yükseldiği ve bu hastaların %30-60'ında MRSA infeksiyonu geliştiği bildirilmiştir<sup>[11]</sup>. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Erişkin Hastanesi'nde 1994 verilerine göre metisiline direnç oranı koagülaz pozitif stafilokoklarda %32, koagülaz negatif stafilokoklarda %41'dir. Bu veriler MRSA'nın HÜTF Erişkin Hastanesi'nde endemik nozokomiyal bir patojen olduğunu göstermektedir.

Erişkin hastanesindeki bir cerrahi servisten mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden rapor edilen MRSA üremelerinde Ekim 1995'den itibaren önemli oranda artış saptanması ve tüm MRSA'ların aynı antibiyotik duyarlılık paternini göstermesi üzerine bunun bir epideminin başlangıcı olabileceği düşünülmüştür. Servis personelindeki taşıyıcılığı, ortak kullanılan buhar aleti ve pansuman küvetlerindeki kolonizasyonu saptamak amacıyla tarama kültürleri alınmıştır.

MRSA infeksiyonlarının epidemiyolojik incelemesinde tarama amacıyla alınacak kültürlerin MRSA ile kolonize olan herkesi saptayabilmesi ve yalnızca pozitif sonuç vermemesi gerektiği bilinmektedir [duyarlılık ve negatif prediktif değer (NPD)'in %100'e yakın olması]<sup>[12,13]</sup>. MRSA taşıyıcılarını saptamak için tarama amacıyla kullanıldığında burun kültürlerinin duyarlılığı ve NPD'si yüksektir<sup>[14-15]</sup>. Bu nedenle servis personelinden burun kültürü alınması tercih edilmiştir. Kültür sonuçları servis personelinde nazal MRSA taşıyıcılık oranının yüksek olduğunu göstermiştir (7 hemşireden 4'ü, 4 araştırma görevlisinden 3'ü). Pansuman küvetlerinden biri ve buhar aletinin de MRSA ile kolonize olduğu saptanmıştır.

Servisteki mini-MRSA epidemisinin kaynağını ortaya çıkarabilmek amacıyla hasta izolatları (15 Kasım 1995-Şubat 1996 arasında izole edilen) ile tarama kültürlerinden elde edilen MRSA izolatları arasındaki ilişkinin araştırılması planlanmıştır. Bu araştırma için uygun koşullarda uygulandığında rezolüsyonunun PFGE kadar yüksek olduğu gösterilen bir yöntem olan AP-PCR seçilmiştir. AP-PCR'in pahalı ve zahmetli bir yöntem olan PFGE'ye oranla çok daha çabuk sonuç veren, daha basit ve ucuz bir yöntem olması nedeniyle bu yönde bir seçim yapılmıştır.

AP-PCR analizlerinin sonucunda bazı hasta izolatları ile pansuman küvetinden, bazıları ile de hemşire veya doktorların burunlarından izole edilen MRSA'ların aynı olduğu sonucuna varılmıştır (Tablo 7A, 7B, 7C, 7D). Tüm MRSA izolatlarının aynı duyarlılık paternini vermelerine rağmen genotipik olarak farklı olduklarının saptanması yalnızca antibiyotik duyarlılığına bakılarak MRSA'ların tiplendirilemeyeceğini ya da aralarında klonal bir ilişkiden söz edilemeyeceğini göstermektedir. AP-PCR analizinde sonuçları etkilediği bilinen faktörlere dikkat edildiğinde (her analizde bu faktörler sabit tutularak) elde edilen band paternlerinin tekrarlanabilir (reproducible) olduğu görülmüştür. Üç farklı primer kullanılarak hasta izolatları ile tarama çalışmaları sırasında elde edilen MRSA izolatları arasındaki ilişki net bir şekilde ortaya çıkarılmıştır.

MRSA infeksiyonları ciddi, ancak önlenbilir infeksiyonlardır. MRSA ile kolonizasyon ve infeksiyon için en önemli risk faktörleri yaş, altta yatan hastalıklar, nazal kolonizasyon ve yabancı cisimlerdir (kater, trakeostomi, nazogastrik tüp)<sup>[16]</sup>. Bilinen en önemli yayılım mekanizması hastane personelinin ellerinde geçici süreyle MRSA taşınmasıdır<sup>[17,18]</sup>. Bir hastanede ya da serviste MRSA yayılımının fazla olması el yıkama gibi basit infeksiyon kontrol önlemlerine yeterince uyulmadığının bir göstergesidir<sup>[19]</sup>.

Sağlık personelindeki nazal *S. aureus* taşıyıcılık oranı değişkenlik gösterir (%0.8-90)<sup>[20-22]</sup>. Nazal *S. aureus* kolonizasyonunu arttırdığı bilinen birçok faktör vardır<sup>[22]</sup>. Ancak nazal taşıyıcılığın genellikle epidemilere neden olmadığı bilinmektedir. Hastane personelindeki yüksek nazal taşıyıcılık oranına paralel bir sıklıkta epidemi görülmemesi de bunu destekler niteliktedir. Nazal taşıyıcıların epidemiyeye neden olma ihtimalleri çevreye mikroorganizma yayma kapasitelerine bağlıdır. Sağlıklı nazal *S. aureus* taşıyıcılarının %10'undan daha azının havaya mikroorganizma yaydığı bildirilmiştir<sup>[22]</sup>. Bu nedenle AP-PCR sonuçlarına göre hasta izolatları ile aynı olduğu saptanan burun MRSA izolatlarının hastalara geçişinin hava yoluyla gerçekleşmiş olması ihtimali azdır.

Normal koşullarda çevreye *S. aureus* yaymayan nazal taşıyıcı bebeklerin viral üst solunum yolu infeksiyonları sırasında havaya bol miktarda mikroorganizma (*S. aureus*) saçtıkları saptanmış (cloud baby) ve bu yolla gelişen epidemiler tanımlanmıştır<sup>[23]</sup>. Aynı mekanizmanın erişkinlerde de geçerli olduğu Sherrert RJ ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmayla gösterilmiştir<sup>[22]</sup>. Servis personelinden bu yönde bir öykü alınamamış olması nedeniyle hastalara MRSA geçişinin bu mekanizmayla da açıklanamayacağı düşünülmüştür.

Nazal taşıyıcıların ellerinde geçici *S. aureus* kolonizasyonunun sık görüldüğü bilinmektedir<sup>[24]</sup>. Bundan yola çıkarak hasta izolatlarıyla aynı olduğu saptanan burun MRSA izolatlarının hastalara personelin ellerindeki geçici kolonizasyon yoluyla ulaştığı ileri sürülebilir.

Pansuman küvetinin MRSA ile kolonize olması ve bu MRSA suşunun bazı hasta izolatları ile aynı olması yara bakımı ile ilgili genel kurallara uyulmasının gerekliliğini göstermektedir.

İlgili servisteki MRSA epidemisinin kontrolüne yönelik herhangi bir girişimde bulunulmamasına rağmen sonuçların bildirilmesini takiben Şubat 1996'da bu servisten hiç MRSA üremesi rapor edilmemesi ve Mart 1996'dan itibaren eski oranlara geri dönülmesi basit infeksiyon kontrol önlemlerine uyulması ve yara bakımı ile ilgili genel kurallara daha fazla özen gösterilmesi sonucunda servisteki MRSA yayılımının azaldığını düşündürmüştür.

Sözkonusu hastaların yatış sürelerinin uzun olması, altta yatan problemlerin varlığı ve MRSA üremesi öncesinde uzun süreli antibiyotik kullanımı MRSA ile infeksiyon ve kolonizasyon riskini arttıran faktörlerdir. Ancak bu faktörlerde daha önceki dönemlere oranla herhangi bir değişiklik olmadığı hal-

de MRSA üremelerinde artış saptanması nedeniyle bunun bir epidemi olduğu düşünülmüş ve AP-PCR analiziyle izolatlar arasındaki ilişki kanıtlanmıştır. Muhtemelen ilgili serviste infeksiyon kontrol önlemlerinin arttırılmasıyla bu mini-epidemi sonlanmıştır.

Epidemiyolojik inceleme ve epideminin kaynağının bulunması, alınacak önlemlerin belirlenmesi ve MRSA epidemilerinin sonlandırılması açısından büyük önem taşır. Bu tür bir incelemede AP-PCR ilk tercih edilecek yöntemlerden biri olabilir. Eğer kaynak saptanamazsa yoğun tarama ve izolasyon çalışmalarının yapılması gerekir. MRSA'nın endemik olduğu hastanelerde klinik laboratuvar süreyansı epidemilerin erken dönemde saptanmasında büyük önem taşımaktadır. Ayrıca mikrobiyoloji laboratuvarından rapor edilen MRSA üremelerinin toplanarak saklanması bir epidemiden şüphelenilen durumlarda geriye dönük çalışma yapma imkanını da sağlayacaktır.

#### KAYNAKLAR

- Jevons MP. "Celbenin"-resistant staphylococci. *BMJ* 1961;i:124-5.
- Stewart GT, Holt RJ. Evolution of natural resistance to the newer penicillin. *BMJ* 1963;1:308-11.
- Benner EJ, Kayser FH. Growing clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 1968;2:741-4.
- Brumfitt W, Hamilton-Miller J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 1987;24:275-81.
- Peacock JE Jr, Marsik FJ, Wenzel RP. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: introduction and spread within a hospital. *Ann Intern Med* 1980;93:526-32.
- Hall LM, Jordens JZ, Wang F. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from China characterized by digestion of total DNA with restriction enzymes. *Epidemiol Infect* 1989;103:183-92.
- Lyon BR, Skurray R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiol Rev* 1987;51:88-134.
- Mulligan ME, Arbeit RD. Epidemiologic and clinical utility of typing systems for differentiating among strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1991;12:20-8.
- NCCLS, Antimicrobial Susceptibility Testing/SC3 Third Edition. The National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS Document M2-A4. Vilanova, Pa. 10:M7-A2, Dilution Testing (Aerobes) and M2-A4, Disc Testing, 1990.
- Ünal S, Hosskins J, Flokowsch JE, Ernie Wu CY, Preston DA, Skatrud PL. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:1685-91.
- Thompson RL, Cabezu I, Wenzel RP. Epidemiology of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Intern Med* 1982;97:309-17.
- Valls V, Gomez-Herruz P, Gonzales-Palacios R, Cuadros JA, Romanyk JP, Ena J. Long-term efficacy of a program to control methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:90-5.
- Jewell M. Cost-containment using an outcome-based best practice model for the management of MRSA. *J Chemother* 1994;6(Suppl 2):35-9.
- Sanford MD, Widmer AF, Bale MJ, Jones RN, Wenzel RP. Effective detection and long-term persistence of the carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 1994;19:1123-8.
- Coello R, Jimenez J, Garcia M, et al. Prospective study of infection colonization and carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an outbreak affecting 990 patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:74-81.
- Bradley SF. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Geriatr Med* 1992;8:853-68.
- Mulligan ME, Murray-Leisure KA, Ribner BS et al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management. *Am J Med* 1993;94:313-28.
- Wenzel RP, Nettleman MD, Jones RN, Pfaller MA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: implications for the 1990's and effective control measures. *Am J Med* 1991;91:221-7.
- Lacey RW. Multi-resistant *Staphylococcus aureus*-a case suitable for inactivity. *J Hosp Infect* 1987;9:103-5.
- Crossley K, Kandesman B, Zuske D. An outbreak of infections caused by strains of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin and aminoglycosides. II. Epidemiologic studies. *J Infect Dis* 1979;139:280-7.
- Opal SM, Mayer KH, Stuber MJ, et al. Frequent acquisition of multiple strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by health workers in an endemic hospital environment. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1990;11:479-85.
- Sherertz RJ, Reagan DR, Hampton KD, et al. A cloud adult: The *Staphylococcus aureus*-virus interaction revisited. *Ann Intern Med* 1996;124:539-47.
- Eichenwald H, Kotsevalov O, Fasso LA. The "cloud baby": an example of bacterial-viral interaction. *Am Dis Child* 1960;100:161-73.
- Casewell MW, Hill RLR. The carrier state: methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1986;18(Suppl A):1-12.

#### Yazışma Adresi:

Prof. Dr. Serhat ÜNAL

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

İç Hastalıkları Anabilim Dalı,

İnfeksiyon Hastalıkları Ünitesi

Sihhiye-ANKARA

Makalenin Geliş Tarihi: 29.10.1997 Kabul Tarihi: 26.04.1998