

## Epidemiološke odlike sojeva *Pseudomonas aeruginosa* izoliranih iz različitih kliničkih materijala

Jasmina Vraneš, Mira Horonitz, Boris Gmajnički i Jasminka Talapko

Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Stručni rad

UDK 616.9-036.21

Prispjelo: 25. kolovoza 1999.

U istraživanje je uključeno ukupno 140 *Pseudomonas aeruginosa* sojeva izoliranih za vrijeme 1998. godine u Zavodu za javno zdravstvo Županije osječko-baranjske u Osijeku. Sojevi su bili raspoređeni u pretežno sedam O-serogrupa: O11, O6, O3, O4, O1, O2 i O16, s odgovarajućom učestalošću od 33,6% 17,1%, 8,5%, 8,5%, 5,0%, 5,0% i 5,6%. Serogrupe O11 i O6 bile su endemične u Kliničkoj bolnici Osijek.

**Ključne riječi:** epidemiološke odlike, *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* tipična je oportunistička bakterija i čest uzročnik bolničkih infekcija. Rijetko izaziva bolest u zdravih osoba. U većini slučajeva infekcija nastaje zbog oštećenja ili zaobilaženja normalne obrane organizma, kao što je prekid cjelovitosti kože i sluznica, ili njihova zaobilaženja putem intravenskih i urinarnih katetera te endotrahealnih tubusa.

Razlog nastanka infekcije može biti i pridruženo oštećenje specifične imunosti organizma, kao što je neutropenija, hipogamaglobulinemija, manjak komplementa ili iatrogena imunosupresija. Ekološka raširenost *P. aeruginosa* doprinosi njegovoj patogenosti, a brojni čimbenici virulencije razlogom su širokom spektru infekcija koje izaziva - od infekcija kože, do vrlo teških infekcija, kao što su endokarditis i sepsa (13).

Određivanje tipa sojeva *P. aeruginosa*, izoliranih u različitim infekcijama ljudi, ima veliko epidemiološko i kliničko značenje. Često se određuje serotip, biotip, fagotip, piocinski tip, rezistotip (rezistencija na pojedine antibiotike), a u novije doba uključuju se i druge, sofisticirane metode u određivanje značajki sojeva *P. aeruginosa*, kao što su metode analize bakterijske deoksiribonukleinske kiseline (DNK) ili određivanje izoenzimnog profila sojeva (2,4,10). Tako epidemiološki nadzor postaje znatno lakši, a moguće je i utvrditi je li riječ o reinfekciji ili recidivu izazvanom istim sojem *P. aeruginosa*, što samim određivanjem specijesa nije moguće. Pravilo je, da što je soj rašireniji u prirodi, to je potrebnije supspecijesno određivanje, tj. tipiziranje soja (10). To posebice vrijedi za *P. aeruginosa* koji je jako raširen u prirodi, a često kolonizira organizam čovjeka ne izazivajući infekciju. Zato je potrebno odrediti bar serogrupu izoliranog soja, jer je metoda dostupna svakom laboratoriju i vrlo jednostavna, ne zahtijeva dodatnu opremu, a dijagnostički serumi postoje na našem tržištu. U ovom radu prikazana je zastupljenost pojedinih serogrupa *P. aeruginosa* među sojevima izoliranim iz različitih kliničkih materijala u Zavodu za javno zdravstvo Županije osječko-baranjske u Osijeku. Uspoređena je zastupljenost pojedinih serogrupa *P. aeruginosa* u ovisnosti o materijalu iz kojega je soj izoliran, te u ovisnosti o podrijetlu soja.

### MATERIJAL I METODE

#### Bakterijski sojevi

U istraživanje je uključeno 140 sojeva *P. aeruginosa*, izoliranih tijekom 1998. godine u Zavodu za javno zdravstvo u Osijeku.

Dvadeset sojeva izolirano je iz mokraćne, 25 iz obriska rane, 17 iz obriska ždrijela, devet iz obriska uha, 20 iz bronhalnog sekreta, 22 iz obriska traheje, sedam iz iskašljaja, te 20 iz različitih materijala kao što su obrisak drena, kanile, katetera itd. Nakon biokemijske identifikacije, sojevi su inokulirani u dubinu pričuvnog agara, te su pohranjeni na + 4° u Zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

#### Određivanje serogrupe *P. aeruginosa*

Svakom od 140 istraživanih sojeva određena je serogrupa standardnom metodom aglutinacije na predmetnici uz pomoć dijagnostičkih O-antisera za identifikaciju serološke grupe (Imunološki zavod, Zagreb). Komplet dijagnostičkih seruma Imunološkog zavoda sastoji se od tri polivalentna seruma označena slovima, A, B i C, šest trovalentnih i 17 monovalentnih seruma označenih brojkama. Nakon supkultivacije na triptikaza-soja agaru (TSA, bioMérieux, Lyon, Francuska), sojevi su suspendirani prvo u polivalentnim, a zatim u odgovarajućim trovalentnim i monovalentnim serumima. Pozitivan rezultat je aglutinacija uočljiva nakon blagog rotiranja predmetnice unutar jedne minute (1).

#### Statistička obrada

Rezultati istraživanja prikazani su uz pomoć tablica kontingencije, a zastupljenost pojedinih sojeva izražena je postocima. Značajnost opaženih razlika testirana je pomoću X<sup>2</sup>-testa.

### REZULTATI

Od ukupno 140 istraživanih sojeva *P. aeruginosa* izoliranih iz različitih kliničkih materijala, O11 serogrupa utvrđena je u 47, odnosno 33,61% sojeva (1. i 2. tablica). Po učestalosti slijede serogrupe O6 (17,12%) te O3 i O4 (po 8,54 %). Serogrupe O1, O2 i O16 utvrđene su sa učestalošću od 5%. Samo jedan soj nije bilo moguće serotipizirati zbog toga jer je aglutinirao u više upotrijebljenih dijagnostičkih seruma (poliaglutinabilan, PA soj), a sedam sojeva (4,98%) nije aglutiniralo niti u jednom upotrebjenom serumu (netipizirani, NT sojevi). Serogrupe O7, O10, O13, O15 i O17 nisu utvrđene niti jednom.

Tablica 1. pokazuje zastupljenost pojedinih O-serogrupa među sojevima izoliranim iz materijala. Uočena je statistički značajna razlika u zastupljenosti sojeva u kojih je utvrđena O11 serogrupa ( $\chi^2=26,96$ ;  $p<0,01$ ). Razlika je nastupila uslijed značajno veće zastupljenosti ove serogrupe među sojevima izoliranim iz bronhalnog sekreta i obriska traheje, dok je među sojevima, izoliranim iz obriska ždrijela, obriska uha i iskašljaja O11 serogrupa utvrđena vrlo rijetko.

Tablica 2. pokazuje zastupljenost O-serogrupa među istraživanim sojevima u ovisnosti o podrijetlu soja. Sedamnaest sojeva (12,51%) izolirano je iz različitih materijala uzetih od ambulanih bolesnika, dok su ostali sojevi izolirani iz različitih materijala bolesnika hospitaliziranih u Kliničkoj bolnici (KB) Osijek. Statistički značajna razlika opažena je u raspodjeli sojeva u kojih je utvrđena O11 serogrupa ( $\chi^2=8,65$ ;  $p<0,01$ ). Ovi su sojevi uglavnom izolirani u bolesnika liječenih na Plućnom odjelu KB Osijek, te u Jedinici intenzivnog liječenja (Jil) KB Osijek, dok su na drugim odjelima, te u ambulanih bolesnika, utvrđeni vrlo rijetko. Statistički značajna razlika uočena je također u raspodjeli sojeva u kojih je utvrđena O6 serogrupa, ali su ovi sojevi značajno češće izolirani u ambulanih bolesnika, na Dječjem odjelu i drugim odjelima KB Osijek, ali vrlo rijetko na Plućnom odjelu i Jedinici intenzivnog liječenja.

## RASPRAVA

Određivanje antigene strukture pomoću dijagnostičkih seruma često se koristi u identifikaciji bakterija. Negdje, primjerice za salmonelle, neophodno je za identifikaciju vrste, dok se za druge gram- bakterije određivanje O (somatskog), K (kapsularnog) i H (flagelarnog) O:K:H serotipa koristi da bi se izolirana vrsta dodatno izdiferencirala i važan je epidemiološki marker.

Kako su flagelarni antigeni jako podložni faznoj varijaciji, rijetko se rutinski određuju, pa se serotipiziranje *P. aeruginosa* najčešće svodi na utvrđivanje serogrupe (O-antigena), uz pomoć dijagnostičkih seruma koji sadržavaju protutijela za varijabilni polisaharidni dio lipopolisaharida ove bakterije. Već 1957. godine Habsova je opisala 12 različitih O-antigenih tipova *P. aeruginosa* (5). Od tada je predloženo najmanje osam drugih shema s različitim brojem O-antigenih tipova (9, 10, 12), da bi se osamdesetih godina postigao dogovor između američkih i europskih istraživača zbog podudarnosti pojedinih tipova označenih različito u različitim shemama (10). Liu i suradnici predložili su shemu koja obuhvaća 17 O-antigenih tipova (engl. The International Antigen Typing Scheme, IATS), koja uključuje 12 originalnih O-antigenih tipova koje je opisala Habsova, zatim O13 - originalno Sandvikov tip II, O14 - Verderov i Evansov, O15 - Lanyijev O12, O16 - Lanyijev Psll, te O17 - Meitertov X tip (7). Dijagnostički serumi, koji sadržavaju protutijela za ovih 17 antigenih tipova komercijalno su dostupni i u nas.

Pored ovih dijagnostičkih seruma, koji sadržavaju poliklonska protutijela, postoje i dijagnostički serumi s monoklonskim protutijelima, pri čemu se koristi shema koju je uveo Homma, po kojoj se tipovi *P. aeruginosa* razvrstavaju u 14 tipova koji nisu označeni brojkama već slovima, od A do N (6).

Zastupljenost pojedinih O-serogrupa varira zavisno od zemlje u kojoj je provedeno istraživanje, a međusobna usporedba rezultata različitih istraživanja znatno je otežana jer su često upotrebljavane različite sheme za određivanje O-antigene pripadnosti. Premda danas znamo koji brojevi u različitim shemama odgovaraju pojedinom O-antigenom tipu *P. aeruginosa*, uvijek ne možemo biti sigurni. Primjerice, IATS O1 je ekvivalentan

Lanyijevom O6 antigenom tipu, ali ne i identičan (10). Također su u nekim studijama svi izolati *P. aeruginosa* iz uzastopnih kultura uključeni u istraživanje, te nije pravilno prosuđena učestalost pojedinog antigenog tipa. U ovo istraživanje uključen je po jedan izolat od svakog bolesnika, čime je izbjegnuto dupliciranje sojeva. Najčešće utvrđena serogrupa bila je O11 (33,61%), zatim serogrupa O6 (17,12%), a s učestalošću manjom od 10% serogrupe O3, O4, O1, O2, O16, te manjom od 5% serogrupe O5, O8, O9 i O12.

Podaci za Veliku Britaniju pokazuju da je 1980. i 1986. godine najzastupljenija serogrupa bila O6 (23,8%, odnosno 21,6%), a slijedila ju je serogrupa O11 (17,4%, odnosno 12,7%), dok je porast učestalosti zabilježen među izolatima O1 i O3 serogrupe (od 5,0 na 8,7%, te od 6,5 na 8,6%) (10). U istraživanju Stricklarda i suradnika najučestalija serogrupa *P. aeruginosa* bila je O6 (22,4%), a slijedile su je serogrupe O11 (13,2%), O1 (8,7%), O3 (8,2%), te O2 (5,5%) (11). Veća zastupljenost O11 serogrupe u našem istraživanju odraz je činjenice da nisu analizirani izolati iz fecesa, krvi i likvora, te da je razmjerno veliki broj izolata potjecao iz sekreta bronha i obriska traheje.

Najveću zastupljenost serogrupe O11 i O6 zapazili su, također, Grigis i suradnici, analizirajući epidemiološke odlike sojeva *P. aeruginosa* izoliranih kroz godinu dana u jednoj talijanskoj općoj bolnici (3). Ukupna zastupljenost sojeva, u kojih je utvrđena O11 serogrupa, u njihovom istraživanju bila je 24,7%, a O6 serogrupa utvrđena je s učestalošću od 14,2%, no sojevi serogrupe O11 bili su endemični na neurokirurgiji i hematologiji, a sojevi serogrupe O6 na pedijatriji.

U većini istraživanja serogrupe O13-O17 su rijetko utvrđene, što je podudarno s rezultatima našeg istraživanja, a postotak sojeva u kojih serogrupa nije utvrđena (NT sojevi) sve je veći. Godine 1980. Pitt je utvrdio učestalost NT sojeva od 3,0%, a već 1986. godine njihova učestalost u Velikoj Britaniji bila je 11,2% (10). U našem istraživanju učestalost netipiziranih sojeva bila je 4,98%. Pitt drži da je povećanje učestalosti NT sojeva dijelom rezultat sve većeg broja izolata *P. aeruginosa* iz donjeg respiratornog sustava bolesnika oboljelih od kroničnih plućnih infekcija i od cistične fibroze, gdje se u pravilu izoliraju sojevi koji su bilo neaglutinabilni ili poliaglutinabilni (8, 10). Te je sojeve moguće serotipizirati nakon termičke obrade, ili uzastopnim kulturacijama, te njihovom aglutinacijom na predmetnici (1).

## ZAKLJUČAK

Serogrupe O11 i O6 utvrđene su s najvećom zastupljenošću među sojevima *P. aeruginosa*, izoliranim tijekom 1998. godine iz različitih uzoraka uzetih od bolesnika liječenih u Kliničkoj bolnici Osijek. Samo određivanje serogrupe nije dovoljno za precizno epidemiološko istraživanje kruženja sojeva *P. aeruginosa* na bolničkim odjelima, te je potrebno uključiti i druge tipizacijske metode da bi se pojasnilo da li je riječ o jednom ili više različitih klonova *P. aeruginosa*.

## ZAHVALA

Autori se zahvaljuju gđi. Vesni Šušković-Mihiček na pomoći prilikom pripreme teksta.

**TABLICA 1.**

Zastupljenost O-serogrupa među sojevima *Pseudomonas aeruginosa* izoliranim iz različitih kliničkih materijala

**TABLE 1.**

Distribution of O-serotypes among *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from various clinical specimens

MATERIJAL	PA		NT		O11		O6		O4		Ostalo		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Mokraća	1	0,71	0	0	3	2,14	4	2,85	2	1,42	10	7,15	20	14,29
Obrisak rane	0	0	2	1,42	9	6,46	4	2,85	4	2,85	6	4,29	25	17,85
Obrisak ždrijela	0	0	1	0,72	1	0,71	5	3,58	2	1,42	8	5,72	17	12,15
Bronhalni sekret	0	0	0	0	13	9,31	1	0,71	0	0	6	4,29	20	14,29
Obrisak traheje	0	0	2	1,42	8	5,72	3	2,14	1	0,72	8	5,72	22	15,71
Iskašljaj	0	0	2	1,42	2	1,42	1	0,71	0	0	2	1,43	7	5
Obrisak uha	0	0	0	0	1	0,71	3	2,14	1	0,71	4	2,86	9	6,42
Ostali materijali	0	0	0	0	10	7,15	3	2,14	2	1,42	5	3,58	20	14,29
Ukupno	1	0,71	7	4,98	47	33,61	24	17,12	12	8,54	49	35,04	140	100

PA = poliaglutinabilan soj

NT = ne može se tipizirati uotriieblenim serumima

PA = polyagglutinable strain NT = non-typifiable by the sera used

MATERIJAL / SPECIMEN: Mokraća / Urine, Obrisak rane / Wound smear, Obrisak ždrijela / Laryngeal smear, Bronhalni sekret / Bronchial secretion, Obrisak traheje / Tracheal smear, Iskašljaj / Sputum, Obrisak uha / Ear smear, Ostali materijali / Other, Ukupno / Total Ostalo / Other

**TABLICA 2.**

Zastupljenost serogrupa među sojevima *Pseudomonas aeruginosa* izoliranim iz različitog podrijetla

**TABLE 2.**

Distribution of serotypes among *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from specimens from various sources

ODJELI	PA		NT		O11		O6		O4		Ostalo		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Dom zdravlja Osijek	0	0	1	0,71	3	2,14	7	5	0	0	6	4,28	17	12,51
Klinička bolnica Osijek (JIL)	0	0	2	1,42	10	7,15	1	0,71	2	1,42	7	5	22	15,71
Klinička bolnica Osijek (Kirurgija)	0	0	1	0,71	5	3,58	2	1,42	4	2,85	9	6,42	21	15
Klinička bolnica Osijek (Plućni)	0	0	1	0,71	12	8,59	1	0,71	0	0	6	4,28	20	14,29
Klinička bolnica Osijek (Dječji)	0	0	0	0	1	0,71	5	3,57	2	1,42	7	5	15	10,35
Ostalo	1	0,71	2	1,42	16	11,44	8	5,71	4	2,85	15	10,06	45	32,14
Ukupno	1	0,71	7	4,98	47	33,61	24	17,12	12	8,54	49	35,04	140	100

ODJELI / DEPARTMENTS: Dom zdravlja Osijek / Health Centre, Osijek; Klinička bolnica Osijek (JIL) / Osijek Clinical Hospital (Intensive Care Unit); Klinička bolnica Osijek (Kirurgija) / Osijek Clinical Hospital (Surgery); Klinička bolnica Osijek (Plućni) / Osijek Clinical Hospital (Pulmology); Klinička bolnica Osijek (Dječji) / Osijek Clinical Hospital (Paediatrics); Ostalo / Other Ukupno / Total

LITERATURA

- Gmajnički B. Usmeno priopćenje.
- Grattard F, Pozzetto B, Ros A, Gaudin OG. Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* strains by ribotyping: high discriminatory power by using a single restriction endonuclease. *J Med Microbiol* 1994;40:275-81.
- Grigis A, Farina C, Moiola F, Parea M, Cirillo DM, Goglio A, Marchiaro G. Epidemiological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains causing infection in an Italian general hospital. *Eur J Epidemiol* 1995;11:339-44.
- Grundmann H, Schneider C, Daschner FD. Fluorescence-based DNA fingerprinting elucidates nosocomial transmission of phenotypically variable *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:1057-62.
- Habs I. Untersuchungen über die O-antigene von *Pseudomonas aeruginosa*. *Z Hyg* 1957;144:218-28.
- Homma JY, Kim KS, Yamada H, Ito M, Shionoya H, Kawabe Y. Serological typing *Pseudomonas aeruginosa* and its cross-infection. *J Exp Med* 1970;40:347-59.
- Liu PV, Matsumoto H, Kusama H, Bergan T. Survey of heat stable, major somatic antigens *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Syst Bacteriol* 1983;33:256-64.
- Ojeniyi B, Lam JS, Hoiby N, Rosdahl VT. A comparison of the efficiency in serotyping of *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients using monoclonal and polyclonal antibodies. *APMIS* 1989;97:631-6.
- Parker MT. *Pseudomonas*. U: Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 7. izd, vol. 2, London: Edward Arnold, 1984:254.

10. Pitt TL. Epidemiological typing of *Pseudomonas aeruginosa*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1988; 7: 238-47.
11. Strickland MA, Gaston MA, Pitt TL. Comparison of polyclonal rabbit antisera with monoclonal antibodies for serological typing of *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol 1988;26:768-9.
12. Verder E, Evans J. A proposed antigenic schema for the identification of strains of *Pseudomonas aeruginosa*. J Infect Dis 1961;109:183-93.
13. Vraneš J. *Pseudomonas*. Acinetobacter. U: Kalenić S, i sur. Medicinska bakteriologija i mikologija, Zagreb: Prehrambeno-tehnološki inženjering, 1995;237-46.

## EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA STRAINS ISOLATED FROM DIFFERENT CLINICAL SPECIMENS

Jasmina Vraneš, Mira Horonitz, Boris Gmajnički and Jasminka Talapko  
School of Medicine University "J. J. Strossmayer" in Osijek

### ABSTRACT

A total of 140 strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated during 1998 in the Institute of Public Health in Osijek during 1988 were included in this study. Those strains were distributed in seven predominant O-serotypes, i.e. O11, O6, O3, O4, O1, O2 and O16, which accounted for 33.6, 17.1, 8.5, 8.5, 5.0, 5.0 and 5.6% of isolates, respectively. Serotypes O11 and O6 were endemic in the Osijek Clinical Hospital.

**Key words:** epidemiological markers, *Pseudomonas aeruginosa*