

## DIŞKI KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN CAMPYLOBACTER TÜRLERİNİN ANTİMİKROBİYAL AJANLARA DUYARLILIKLARI\*

M.Sait YILDIRIM, Bülent SÜMERKAN, Şir Ahmet FAZLI

### ÖZET

DıŐki örneklerinden izole edilen *Campylobacter* suşlarının çeşitli antimikrobiyal ajanlara in-vitro duyarlılıkları araştırılmıştır. Bu amaçla, 1995 yılında hastanemiz Merkez Laboratuvarında 2127 dıŐki örneğinden izole edilen 58 *Campylobacter* suŐundan 45'i çalışmaya alınmıŐtır. Suşların 36(%80)'sı *Campylobacter jejuni*, 9 (%20)'u *Campylobacter coli* olarak tiplendirilmiŐtir. Antibiyotik duyarlılık testleri, %5 koyun kanlı Mueller-Hinton agarda agar dilüsyon yöntemi ile yapılmıştır.

Suşların hiçbirinde eritromisin, azitromisin, roksitromisin, klaritromisin, tetrasiklin, kloramfenikol, ampisilin ve ampisilin/sulbaktama direnç görülmezken, siprofloksasine %26 oranında direnç bulunmuştur.

*Campylobacter*'lere bağlı gastroenteritlerin ampirik tedavisinde kinolonlardaki bu direnç gözönünde bulundurulmalıdır.

### SUMMARY

*In-vitro susceptibility of Campylobacter spp. isolated from fecal samples to antimicrobial agents.*

*Campylobacter* spp. isolated from human stools were investigated for in-vitro susceptibilities to various antimicrobial agents. For this purpose, of the 58 *Campylobacter* strains isolated from 2127 fecal samples in 1995, 45 strains were studied. 36 (80%) of the strains were identified as *Campylobacter jejuni* and 9 (20%) as *Campylobacter coli*. Antimicrobial susceptibility testing was performed by agar dilution method on Mueller-Hinton agar supplemented with 5% sheep blood.

No strains were found resistant to erythromycin, azithromycin, clarithromycin, roxithromycin, ampicillin, ampicillin/sulbactam, tetracycline and chloramphenicol. But 26% of the strains were resistant to ciprofloxacin.

The resistance to quinolones should be considered in the treatment of *Campylobacter* gastroenteritis.

### GİRİŐ

BaŐta *Campylobacter jejuni* olmak üzere, termofilik *Campylobacter*'ler sık rastlanan bakteriyel diyare etkenleri arasındadırlar (2,3,4,15). *Campylobacter* diyaresi, çoğunlukla kendi kendini sınırlayan hafif seyirli bir klinik tablodur. Fakat, nadiren de olsa ciddi seyrederek antimikrobiyal tedavi gerektirebilir. Klasik olarak, eritromisin ve kinolonlar, *Campylobacter* türlerinin sebep olduğu infeksiyonlarda ilk

\* 11. Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM) Kongresi'nde sunulmuŐtur (2-6 Haziran 1996, KuŐadaŐı). Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

seçilen antimikrobiyal ajanlardır (2). Ayrıca; yeni makrolidler, özellikle azitromisin, güçlü in-vitro etkinlikleri ve daha iyi farmakolojik özelliklerinden dolayı eritromisine alternatif olabilirler (5,13). Bununla birlikte, bu ilaçların yaygın kullanımı antimikrobiyal direnç sorununu da beraberinde getirmektedir (6,11,13).

1995 yılını kapsayan bir yıllık periyot içinde dışkı örneklerinden izole edilen 45 *Campylobacter* suşunun çeşitli antimikrobiyal ajanlara in-vitro direnç durumu araştırılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

1995 yılında bakteriyel kültür için Amies taşıma ortamıyla gönderilen 2127 dışkı örneği, aynı zamanda *Campylobacter* açısından da değerlendirilmiştir. Bu amaçla; dışkı örnekleri, Blaser-Wang selektif supplement'ı (Oxoid) ve %10 koyun kanı içeren *Brucella* agar besiyerine ekilmiş, %5 O<sub>2</sub>, %10 CO<sub>2</sub> ve %85 N<sub>2</sub> içeren mikroaerofilik atmosferde (Campy-Pack; BBL) ve 42°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. *Campylobacter* cins ve tür ayrımı, standard metodlarla yapılmıştır (2,7,9). Buna göre; 45 suşun 36'sı *C.jejuni*, 9'u *C.coli* olarak tanımlanmıştır.

Antimikrobiyal duyarlılık testleri için %20 gliserinli Trypton Soy Broth'da -20°C'de saklanmış olan izolatlar, çalışmaya alınmadan önce %5 koyun kanlı Columbia agara iki kere pasaj edilmiştir. Antimikrobiyal duyarlılık testleri, %5 koyun kanlı Mueller-Hinton agar kullanılarak agar dilüsyon metoduyla yapılmış, eritromisin, azitromisin, klaritromisin, roksitromisin, siprofloksasin, ampisilin, ampisilin/sulbaktam, tetrasiklin ve kloramfenikol denenmiştir. Her antimikrobiyal ajan için 0.003-64 µg/ml arasında toplam 12 ayrı dilüsyon ilaç içeren besiyerleri hazırlanmıştır. Her ilacın iki katlı dilüsyonlarını içeren plaklara ve ilaçsız bir plağa (kontrol) bakteriler 5x10<sup>4</sup> cfu/spot olacak şekilde ekilmiştir. Mikroaerofilik atmosferde ve 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Mikroaerofilik atmosfer, yüksek CO<sub>2</sub> oranından dolayı besiyerinin pH'sını azaltabileceğinden ve dolayısıyla makrolidlerin MIC'ini yükseltebileceğinden (1,13), makrolidleri test ederken besiyerinin pH'sı 8'e ayarlanmıştır.

Kalite kontrolü, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 kullanılmak suretiyle yapılmıştır. Duyarlılık ve dirençlilik sınırları NCCLS (10) kriterlerine göre belirlenmiştir (Tablo 1). Roksitromisinin sınır değerleri NCCLS tarafından henüz belirlenmediği için, direnç oranı saptanamamıştır.

Ayrıca, nitrosefin diski ile bu suşların beta-laktamaz üretip üretmediklerine de bakılmıştır.

Tablo 1. Duyarlılık, orta duyarlılık ve dirençlilik için MIC standartları ( µg/ml).

Antibiyotikler	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
Eritromisin	≤0.5	1-4	≥8
Azitromisin	≤2	4	≥8
Klaritromisin	≤2	4	≥8
Roksitromisin	-	-	-
Siprofloksasin	≤1	2	≥4
Ampisilin	≤8	16	≥32
Amp/sulb.	≤8/4	16/8	≥32/16
Tetrasiklin	≤4	8	≥16
Kloramfenikol	≤8	16	≥32

## BULGULAR

Çalışma periyodunda 2127 dışkı örneği incelenmiş, 58 (%2.7) *Campylobacter* suşu izole edilmiştir. Bunların 48 (%83)'i *C.jejuni* ve 10 (%17)'u *C.coli* olarak tanımlanmıştır. Bunlardan 36 *C.jejuni* ve 9 *C.coli* olmak üzere toplam 45 *Campylobacter* suşu çalışmaya alınmış, 13 suş tekrar üretilmediği için çalışma dışı bırakılmıştır. Duyarlılık testleri sonuçları tablo 2, 3 ve 4'de görülmektedir.

Tablo 2. *Campylobacter* suşlarının MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub> değerleri ve MIC aralıkları (µg/ml).

Antibiyotikler	C.jejuni			C.coli		
	MIC aralığı	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MIC aralığı	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
Eritromisin	0.03-2	0.5	1	0.125-4	1	4
Azitromisin	0.03-0.25	0.06	0.125	0.03-0.25	0.06	0.25
Klaritromisin	0.25-4	1	2	0.25-2	1	2
Roksitromisin	0.25-8	1	2	1-8	1	8
Siprofloksasin	0.03-32	0.25	16	0.125-4	0.5	4
Ampisilin	0.25-16	4	16	2-16	8	16
Amp/sulb.	0.125-16	2	8	2-16	4	16
Tetrasiklin	0.03-0.5	0.06	0.25	0.06-0.5	0.125	0.5
Kloramfenikol	0.25-8	2	8	2-8	8	8

Tablo 3. *C.jejuni* ve *C.coli* suşlarının dirençlilik oranları.

Antibiyotikler	C.jejuni (n=36)			C.coli (n=9)		
	Duyarlı Sayı(%)	Orta duyarlı Sayı(%)	Dirençli Sayı(%)	Duyarlı Sayı(%)	Orta duyarlı Sayı(%)	Dirençli Sayı (%)
Eritromisin	26(72)	10(28)	0(0)	4(44)	5(56)	0(0)
Azitromisin	36(100)	0(0)	0(0)	9(100)	0(0)	0(0)
Klaritromisin	33(92)	3(8)	0(0)	9(100)	0(0)	0(0)
Roksitromisin	-	-	-	-	-	-
Siprofloksasin	25(69)	1(3)	10(28)	6(67)	1(11)	2(22)
Ampisilin	29(80)	7(20)	0(0)	7(78)	2(22)	0(0)
Amp/sulb.	33(92)	3(8)	0(0)	8(89)	1(11)	0(0)
Tetrasiklin	36(100)	0(0)	0(0)	9(100)	0(0)	0(0)
Kloramfenikol	36(100)	0(0)	0(0)	9(100)	0(0)	0(0)

Tablo 4. *Campylobacter* suşlarının toplu olarak dirençlilik oranları (n=45).

Antibiyotikler	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)
Eritromisin	30(67)	15(33)	0(0)
Azitromisin	45(100)	0(0)	0(0)
Klaritromisin	42(93)	3(7)	0(0)
Roksitromisin	-	-	-
Siprofloksasin	31(69)	2(5)	12(26)
Ampisilin	36(80)	9(20)	0(0)
Amp/sulb.	41(91)	4(9)	0(0)
Tetrasiklin	45(100)	0(0)	0(0)
Kloramfenikol	45(100)	0(0)	0(0)

*C.jejuni* suşlarının %70'inin, *C.coli* suşlarının %45'inin ve iki tür beraber değerlendirildiğinde suşların %65'inin beta-laktamaz ürettiği saptanmıştır.

#### TARTIŞMA

*Campylobacter* türleri birçok ülkede, bakteriyel diyarenin en sık rastlanan nedenleri arasındadırlar. *Campylobacter* diyarelerinin tedavisinde ilk düşünülecek antibiyotikler eritromisin ve alternatif olarak kinolonlardır. Son zamanlarda, bu ilaçlara karşı direncin arttığı gözlenmektedir.

Değişik çalışmalarda %1-10 oranında eritromisin direnci bildirilmiştir (12,13). Çoğu çalışmada makrolid direncinin *C.coli* suşlarında daha yüksek olduğu gösterilmiştir (5,13). Endtz ve ark. (5)'in çalışmasında *C.jejuni* için eritromisin, azitromisin, klaritromisin ve roksitromisinin MIC<sub>90</sub> değerleri sırasıyla 4, 0.5, 4 ve 16 µg/ml olarak saptanmıştır. Sánchez ve ark. (13) ise MIC<sub>50</sub> ve MIC<sub>90</sub> değerlerini eritromisin için 0.25 ve 2, azitromisin için 0.06 ve 0.125, klaritromisin için 0.5 ve 1, roksitromisin için 2 ve 8 µg/ml bulmuşlardır. Bu çalışmalarda, *C.coli* için bu değerlerin daha yüksek olduğu gözlenmektedir. Sonuçlarımız da bunu doğrulamaktadır. Çalışmamızda, *C.jejuni* için MIC<sub>50</sub> ve MIC<sub>90</sub> değerleri eritromisin için 0.5 ve 1, azitromisin için 0.06 ve 0.125, klaritromisin için 1 ve 2 ve roksitromisin için 1 ve 2 µg/ml; *C.coli* için ise aynı değerler eritromisin için 1 ve 4, azitromisin için 0.06 ve 0.25, klaritromisin için 1 ve 2 ve roksitromisin için 1 ve 8 µg/ml bulunmuştur. Bu bulgular, *C.coli* suşlarının makrolidlere daha dirençli olduğu kanısını güçlendirmektedir. Azitromisinin diğer makrolidlerden çok daha güçlü in-vitro aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Klaritromisin, eritromisine yakın aktivite gösterirken, roksitromisin en az aktivite gösteren makrolid olarak gözlenmiştir.

1987'ye kadar yapılmış olan *Campylobacter*'lerin antibiyotik duyarlılığına ilişkin çalışmalar, kinolonlara dirençli *Campylobacter* suşlarının pratik olarak mevcut olmadığını göstermiştir (6,13). Oysa bugün, % 50'lere varan kinolon direnci bildirilmektedir. Sánchez ve ark. (13) 1988'de %0, 1992'de %49.5 oranında siprofloksasine direnç saptamışlardır. Endtz ve ark. (6) 1982-1983'te %0, 1987-1988'de



%8 ve 1989'da insan suşlarında %11, kümes hayvanları suşlarında %14 oranında siprofloksasine direnç tesbit etmişlerdir. Çalışmamızda ise *C.jejuni* suşlarında %28, *C.coli* suşlarında %22 ve toplu olarak da %26 oranında siprofloksasine direnç saptanmıştır. Kinolonların klinik kullanıma girmesi, kinolonlara dirençli suş sayısında artışa neden olmuştur. 1987'den itibaren veteriner kullanıma enrofloksasinin girişi bu süreci hızlandırmıştır (6). Kümes hayvanları *Campylobacter*'lerin insanlara bulaşmasında önemli rol oynadıkları için, enrofloksasinin kümes hayvanlarında kullanılmasının, kinolon direncinin gelişmesinde önemli rol oynadığı sanılmaktadır (6).

Genelde termofilik *Campylobacter*'ler, beta-laktam antibiyotiklerin çoğuna dirençlidirler. Ampisilin için direnç oranları %0-52 arasında bildirilmektedir. Reina ve ark. (12) %51.8, Sjögren ve ark. (14) *C.jejuni* için %20.9 ve *C.coli* için %25.9 oranında ampisilin direnci tesbit etmişlerdir. NCCLS kriterleri gözönünde bulundurulduğunda, suşlarımızda ampisiline direnç saptanmamıştır. Fakat %20 oranında orta duyarlılık bulunmuştur. Beta-laktamlara karşı dirençte rol alan başlıca mekanizma beta-laktamaz üretimidir (16). Bu tip enzim üreten suşların oranı, değişik çalışmalarda %83-92 arasında bulunmuştur (8,12). İzole ettiğimiz 45 *Campylobacter* suşunun %65'inin beta-laktamaz ürettiği saptanmıştır.

Çalışmamızda, MIC değerleri gözönünde bulundurulduğunda tetrasiklinin in-vitro etkinliğinin çok yüksek olduğu, buna karşın kloramfenikolün daha az etkinlik gösterdiği gözlenmiştir (MIC<sub>50</sub> ve MIC<sub>90</sub> değerleri tetrasiklin için 0.06 ve 0.25, kloramfenikol için 2 ve 8 µg/ml).

Sonuç olarak, ciddi *Campylobacter* infeksiyonlarının tedavisinde eritromisin ilk seçenek olmaya devam etmektedir. Daha güçlü in-vitro etkinliği ve daha uygun farmakolojik özellikleriyle azitromisin güçlü bir alternatif olarak ön plana çıkmaktadır. Kinolon direncinin gittikçe artması, bu ilaçların gelişigüzel kullanımına karşı daha dikkatli olmamızı gerektirmektedir.

#### KAYNAKLAR

- 1- Andreasen JJ: In vitro susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated in Denmark to fourteen antimicrobial agents, *Acta Path Microbiol Immunol Scand (Sect.B)* 95: 189 (1987).
- 2- Blaser MJ: *Campylobacter* and related species, "Mandell GL, Bennett JE, Dolin R(eds): *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 4. baskı" kitabında s.1948, Churchill Livingstone Inc, New York (1995).
- 3- Blaser MJ, Wells JG, Feldman RS, Pollard RA, Allen JR: *Campylobacter* enteritis in the United States. A multicenter study, *Ann Intern Med* 98: 360 (1983).
- 4- Bok HE, Greeff AS, Crewe-Brown HH: Incidence of toxigenic *Campylobacter* strains in South Africa, *J Clin Microbiol* 29: 1262 (1991).
- 5- Endtz HP, Broeren M, Mouton RP: In vitro susceptibility of quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* to new macrolide antibiotics, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 12: 48 (1993).
- 6- Endtz HP, Mouton RP, Reyden TV, Ruijs GJ, Biever M: Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* spp isolated from human stools and poultry products, *Lancet* 335: 787 (1990).
- 7- Koneman EW: *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 4.baskı, J.B.Lippincott Co, Philadelphia (1992).

- 8- Lachance N, Gaudreau C, Lamothe F, Larivière LA: Role of the  $\beta$ -lactamase of *Campylobacter jejuni* in resistance to  $\beta$ -lactam agents, *Antimicrob Agents Chemother* 35: 813 (1991).
- 9- Nachamkin I: *Campylobacter* and *Arcobacter*, "Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, 6. baskı" kitabında s.483, Am Soc Microbiol, Washington (1995).
- 10- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fourth Information Supplement*, NCCLS Document M100-S4, NCCLS, Villanova (1992).
- 11- Reina J, Borrell N, Serra A: Emergence of resistance to erythromycin and fluoroquinolones in thermotolerant *Campylobacter* strains isolated from feces 1987-1991, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 11: 1163 (1992).
- 12- Reina J, Ros MJ, Serra A: Susceptibilities to 10 antimicrobial agents of 1220 *Campylobacter* strains isolated from 1987 to 1993 from feces of pediatric patients, *Antimicrob Agents Chemother* 38: 2917 (1994).
- 13- Sánchez R, Fernández-Baca V, Diaz MD, Muñoz P, Rodríguez-Crèixems M, Bouza E: Evolution of susceptibilities of *Campylobacter* spp to quinolones and macrolides, *Antimicrob Agents Chemother* 38: 1879 (1994).
- 14- Sjögren E, Kaijser B, Werner M: Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated in Sweden: A 10-year follow-up report, *Antimicrob Agents Chemother* 36: 2847 (1992).
- 15- Skirrow MB: *Campylobacter*, *Lancet* 336: 921 (1990).
- 16- Taylor DE, Courvalin P: Mechanisms of antibiotic resistance in *Campylobacter* species, *Antimicrob Agents Chemother* 32: 1107 (1988).