

Akut Gastroenteritli Hastalarda *Campylobacter jejuni* Alt Tipleri ile Koenfeksiyon§

Tuba KAYMAN*, Fuat AYDIN**, Seçil ABAY**, Kadir Serdar DİKER***

*Sağlık Bakanlığı, Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği

**Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

***Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, *C. jejuni*'nin farklı alt tiplerine bağlı üç gastroenterit olgusunda saptanan koenfeksiyonun değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Üç hastaya ait fekal örnekten elde edilen izolatların tanımlanmasında fenotipik ve moleküler testlerden yararlanılmıştır. Antibiyotik duyarlılığı, disk difüzyon yöntemi ile değerlendirilmiştir. Testte ampisilin, amikasin, sefotaksim, tetrasiklin, piperasilin-tazobaktam, eritromisin, klindamisin, nalidiksik asit, siprofloksasin ve levofloksasin antibiyotik diskleri kullanılmıştır. Sonuçlar CLSI kriterlerine göre değerlendirilmiştir. İzolatların moleküler tiplendirmesi için ERIC-PCR'den yararlanılmıştır.

Bulgular: Gastroenteritli 3 hastaya ait örneğin kültürel değerlendirmesi sonucunda mCCD agarda üreyen izolatların tümü konvansiyonel ve moleküler yöntemler ile *C. jejuni* olarak tanımlanmışlardır. Her örneğe ait 2 izolatın antibiyotik duyarlılık paternlerinin ve ERIC-PCR'de elde edilen bant profillerinin farklılık gösterdiği saptanmıştır. Araştırmadaki koenfeksiyon oranı %1.7 olarak belirlenmiştir.

Sonuç: Bilgilerimize göre bu araştırma, *C. jejuni* alt tipleri tarafından meydana getirilen koenfeksiyonu tanımlayan ülkemizde yapılmış ilk çalışmadır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarları'nda fekal kültürlerin kampilobakterler yönünden değerlendirilmesinde, petriyelerdeki farklı koloni tiplerinin tümünün göz önünde bulundurulması, tanımlanması, antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması ve klinik tedavinin buna göre yönlendirilmesinin yararlı olacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Campylobacter jejuni*, ERIC-PCR, koenfeksiyon

SUMMARY

Co-infection with *Campylobacter jejuni* Subtypes in Patients with Acute Gastroenteritis

Objective: In this study, it was aimed to evaluate the co-infection detected in three cases with gastroenteritis associated with different subtypes of *C. jejuni*.

Materials and Methods: Phenotypic and molecular tests were used for the identification of isolates obtained from stool samples of three patients. Antibiotic susceptibility was evaluated by disc diffusion method. Ampicillin, amikacin, cefotaxime, tetracycline, piperacillin/tazobactam, erythromycin clindamycin, nalidixic acid, ciprofloxacin and levofloxacin were used in the antibiotic susceptibility testing. Results were evaluated according to the CLSI criteria. ERIC-PCR was used for the molecular typing of the isolates.

Results: As a result of cultural evaluation of the samples belonging to 3 patients with gastroenteritis, all isolates grown on mCCD agar were identified as *C. jejuni* by using conventional and molecular methods. It is revealed that the antibiotic susceptibility patterns and ERIC-PCR band profiles of the two isolates recovered from each sample were different. Co-infection rate in this study was determined to be 1.7%.

Conclusion: To our knowledge, this is the first scientific study conducted in Turkey to define co-infections caused by *C. jejuni* subtypes. It was concluded that it would be beneficial to examine and define all of the different colony types in petri dishes and to determine the antibiotic susceptibilities of all the isolates to guide the antimicrobial therapy accordingly in examining fecal cultures for *Campylobacter* species in clinical microbiology laboratories.

Key words: *Campylobacter jejuni*, ERIC-PCR, co-infection

Alındığı tarih: 22.01.2016

Kabul tarihi: 09.04.2016

Yazışma adresi: Tuba Kayman, Sağlık Bakanlığı, Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Şişli / İstanbul

e-posta: tubakayman@hotmail.com

§Bu araştırma XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (3-7 Kasım 2012, Kuşadası Aydın)'nde poster olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Kampilobakterler, Gram negatif, hareketli, mikroaerofilik, kapsülsüz, sporsuz, aside dirençli olmayan, kıvrımlı çomakçıklar şeklinde mikroskopik görünümüne sahip mikroorganizmalardır. Sahip oldukları kıvrımların sayısına göre mikroskopta “S”, “virgül” veya “martı kanadı” şeklinde görülürler. *Campylobacter jejuni*, cins içerisinde yer alan en önemli tür olup, insanlarda başta endüstrileşmiş ülkeler olmak üzere tüm dünyada gastroenteritlerin önemli bir etkenidir. Kampilobakter enfeksiyonları için en önemli bulaş yolu kontamine et, süt ve sudur. Bunun yanı sıra memeli ve kanatlı hayvanlar da enfeksiyon kaynağıdır ve bu hayvanlarla direkt temasla da bulaş gerçekleşmektedir⁽¹⁻⁵⁾.

Kampilobakter bulaşı için önemli kaynak olan, pişmemiş tavuk, koyun ve domuz etlerinden, farklı kampilobakter türlerinin izolasyonu yapıldığı gibi, tek bir örnekten *C. jejuni*'nin çok sayıda alt tipinin saptandığı da bildirilmiştir⁽⁶⁾. Benzer şekilde insan kampilobakteriyoz olgularında, bir bireyde, eşzamanlı olarak, kampilobakter türlerinin birden fazla alt tipi, etken olarak saptanabilmektedir⁽⁷⁾. Bu durum hayvan enfeksiyonları için de rapor edilmiştir^(8,9). Birden fazla tür veya bir türün alt tipleri ile meydana gelen enfeksiyon olgularının, gerek antibakteriyel duyarlılık ve gerekse hastalığın epidemiyolojisi açısından önemli olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada, *Campylobacter* spp. yönünden pozitif olan 179 gastroenterit olgusunun 3'ünde saptanan *C. jejuni*'nin farklı alt tipleri ile koenfeksiyonunun bildirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada kullanılan izolatlar, Mart 2010-Mart 2011 döneminde gastroenteritli hastalardan kampilobakter prevalansının araştırıldığı çalış-

mada elde edilmişlerdir⁽¹⁰⁾. Üç örneğin her birinde 2'şer adet farklı morfolojiye sahip koloni (mCCD-modified cefoperazone charcoal deoxycholate agar'da biri gri renkli, metalik refle veren ve diğeri de beyaz-gri renkli, mukoid özellikte olan) gözlenmiş ve bunlar ayrı ayrı değerlendirmeye alınmıştır. İzolatların tanımlanmasında fenotipik⁽²⁾ ve moleküler (multiplex Polymerase Chain Reaction, mPCR) testlerden yararlanılmıştır⁽¹¹⁾.

İzolatların antibiyotik duyarlılığı, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Duyarlılık testinde, ampisilin (10 µg), amikasin (30 µg), sefotaksim (30 µg), tetrasiklin (30 µg), piperasilin-tazobaktam (100/10 µg), eritromisin (15 µg), klindamisin (2 µg), nalidiksik asit (30 µg), siprofloksasin (5 µg) ve levofloksasin (5 µg) (Oxoid, İngiltere) antibiyotik diskleri kullanılmıştır. Sonuçlar Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kriterlerine göre değerlendirilmiştir^(12,13). Moleküler tiplendirme için Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR) kullanılmıştır⁽¹⁴⁾. Analizde 1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3') ve 2 (5'-AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG-3') primerleri kullanılmıştır. Amplifikasyon için PCR karışımı, 5 µl 10xPCR buffer A (Fermentas, Litvanya), 4 mM MgCl₂ (Fermentas, Litvanya), 5 U Taq DNA polymerase (Fermentas, Litvanya), final konsantrasyonu 0.2 mM olacak şekilde dNTP (Fermentas, Litvanya) karışımı, 25 pmol primerler (Sentromer DNA Teknolojileri, İstanbul, Türkiye) ve 1 µl template DNA içeren toplam 50 µl hacimden oluşmuştur. Amplifikasyon koşulları ilk denatürasyon (94°C'de 5 dk.) basamağını takiben 40 amplifikasyon siklusundan ve her bir siklus, 94°C'de 1 dk., 25°C'de 1 dk. ve 72°C'de 2 dk. aşamalarından oluşmuştur (Touchgene Gradient, Techne, İngiltere). Elde edilen PCR ürünleri, %2'lik agaroz jel içerisinde yürütülmüş (Thermo EC 330, ABD) ve oluşan

bantlar jel dökümantasyon sisteminde (Vilber Lourmat, Fransa) incelenmiştir.

BULGULAR

Gastroenteritli 3 hastaya ait örneğin kültürel değerlendirmesi sonucu mCCD agarda üreyen izolatların tümü konvansiyonel ve moleküler yöntemler ile *C. jejuni* olarak tanımlanmıştır.

Üç örneğin her birine ait 2 izolatın antibiyotik duyarlılık paternlerinin ve ERIC-PCR'da elde edilen bant profillerinin farklılık gösterdiği saptanmıştır (Tablo 1, Şekil 1).

TARTIŞMA

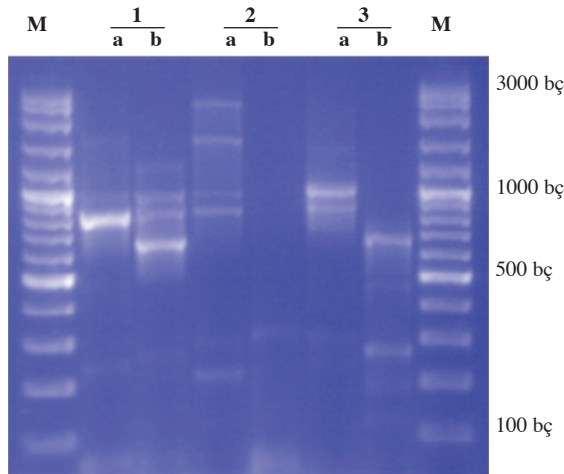
Kampilobakter cinsinin gerek farklı türleriyle⁽¹⁵⁾ ve gerekse bir türün farklı alt tipleriyle insan^(7,16) ve hayvanlarda^(8,9) meydana gelen enfeksiyon olguları çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir.

İnsanlarda *C. jejuni*'nin alt tipleri ile meydana gelen enfeksiyonu tanımlamak amacıyla en kapsamlı araştırma Richardson ve ark.⁽⁷⁾ tarafından gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar, kampilobakter yönünden pozitif olduğu belirlenen 53 gastroen-

Tablo 1. Üç örnekten izole edilen *C. jejuni* izolatlarının antibiyotik duyarlılık profilleri.

Antibiyotik	1 Nolu örnek		2 Nolu örnek		3 Nolu örnek	
	a	b	a	b	a	b
Amikasin	S	S	S	S	S	S
Ampisillin	R	S	R	S	S	S
Eritromisin	S	S	S	S	S	S
Klindamisin	S	S	S	S	S	S
Levofloksasin	R	R	R	S	R	S
Nalidiksik asit	R	R	R	S	R	S
Piperasilin/tazobaktam	S	S	S	I	S	S
Sefotaksim	S	R	S	S	I	S
Siprofloksasin	R	R	R	S	R	S
Tetrasiklin	I	R	S	S	S	S

I: Orta duyarlı; R: Dirençli; S: Duyarlı



Şekil 1. Üç örnekten izole edilen *Campylobacter jejuni* izolatlarına ait ERIC-PCR sonuçları (% 1.5'lik agaroz jeldeki görüntü). M:100 bp Plus DNA ladder (Vivantis). 1 nolu örneğe ait izolatlar (a ve b). 2 nolu örneğe ait izolatlar (a ve b). 3 nolu örneğe ait izolatlar (a ve b).

teritli hastaya ait fekal örneği, hem CAT selektif agar (direkt yöntem) hem de pasif filtrasyon metodu (selektif olmayan yöntem) kullanarak yeniden kültüre etmişlerdir. Her örnek için CAT agar ve kanlı agardan 5'er adet olmak üzere toplam 10 koloni seçilerek fenotipik testler, serotiplendirme, faj tiplendirmesi, antibiyotik duyarlılık testi, PFGE ve flagellin gen tiplendirmesi yapmışlardır. Bu yöntemlerle yeniden test edilen 53 hastaya ait fekal örneğin, 52'sinden *C. jejuni* 1'inden de *C. coli* izole edilmiştir. *C. jejuni* pozitif olan 52 örneğin 48'inde tek tip suş izole edilirken, bu örneklerin 4'ünden (%7.5) fenotipik ve moleküler özellikleri farklı olan 2'ser suş tanımlamışlardır. Lawson ve ark.⁽¹⁵⁾ 3738 gastroenteritli hastaya ait fekal örneğin 543'ünü moleküler yöntemler ile *Campylobacter* spp. yönünden pozitif bulmuşlardır. Araştırmacılar bu pozitif örneklerin %3.6'sının, 2 farklı kampilobakter türü ile meydana geldiğini, ancak bir türün alt tipleriyle enfeksiyona rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Yurdumuzda *C. jejuni* alt tipleri ile ilişkili herhangi bir koenfeksiyon olgusu bildirilmemiştir.

Bir örnekte birden fazla kampilobakter türünün ve alt tiplerinin varlığı, benzer şekilde gıda örneklerinde⁽⁶⁾ ve hayvan enfeksiyonlarında da bildirilmiştir^(8,9). Bu çalışmalarda, ekim yapılan petriyelerdeki kolonilerin değerlendirilerek farklı morfolojiye sahip birden fazla koloninin seçilmesi ve test edilmesinin kampilobakteriyoz epidemiyolojisinde önemli role sahip olduğu vurgulanmıştır.

Çalışmamızda *Campylobacter* spp pozitif 179 örneğin 176'sından tek bir suş izole edilmesine karşın; 3 örnekte (%1.7) 2'ser adet *C. jejuni* izole edilmiştir. Bu oranın Richardson ve ark.⁽⁷⁾ ve Ruberg ve ark.'nın⁽¹⁶⁾ bildirdikleri orandan düşük olduğu gözlenmektedir. Bu durumun, incelenen örnek sayısına ve anılan çalışmaların kampilobakter pozitif örnekler üzerinden yürütülmesine bağlı olabileceği

düşünülmektedir. Keza çalışmamızda kampilobakter pozitif fekal örnekler yeniden analize tabi tutulmamışlardır.

Antibiyotik duyarlılık testi ve ERIC-PCR sonuçları, bu üç bireyin, *C. jejuni*'nin 2 farklı alt tipi ile infekte olduğunu göstermektedir. Aynı hastada, tek bir örnekten, farklı alt tiplerin izole edilebilmesi, antibakteriyel tedavi açısından önem taşımaktadır. Kampilobakter enfeksiyonlarının tedavisinde eritromisin ve kinolonlar tercih edilen antibiyotiklerdir. Ancak son yıllarda kinolonlara karşı önemli oranda bir direnç gelişimi söz konusudur^(10,17). Kültür değerlendirmesi sonucunda farklı morfolojik özellikler taşıyan kolonilerin antibakteriyel duyarlılıklarının her biri için ayrı ayrı yapılmaması, kültürde yer alan dirençli izolatin da duyarlı olarak raporlanmasına neden olabilir. Bu durum tedavi başarısızlığına ya da komplikasyonlara yol açabilir. Nitekim reaktif artrit ve Guillain-Barré sendromu *C. jejuni*'nin önemli komplikasyonları arasında yer almaktadır⁽¹⁷⁾.

Bilgilerimize göre, *C. jejuni* alt tipleri tarafından meydana getirilen koenfeksiyonu tanımlayan bu araştırma, yurdumuzda bu konuda yapılmış ilk bilimsel çalışmadır.

Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarları'nda fekal kültürlerin kampilobakterler yönünden değerlendirilmesinde, petriyelerdeki farklı koloni tiplerinin tümünün göz önünde bulundurulması, antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması ve klinik tedavinin buna göre yönlendirilmesinin yararlı olacağı sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. **Smibert RM.** *Campylobacter* genus. In: Krieg NR, Holt JG, eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 1st ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984: 111-8.
2. **Diker KS.** Gram negatif mikroaerofilik hareketli bakteriler. In: Arda M, Minbay A, Leloğlu N, Aydın N, Kahraman M, Akay Ö, Ilgaz A, İzgür, M., Diker KS ed.

- Özel Mikrobiyoloji, Epidemiyoloji, Bakteriyel ve Mikotik İnfeksiyonlar. Ankara: Medisan Yayın Serisi No.26, 1997:125-46.
3. **Gormley FJ, MacRae M, Forbes KJ, Ogden ID, Dallas JF, Strachan NJC.** Has retail chicken played a role in the decline of human campylobacteriosis? *Appl Environ Microbiol* 2008; 74:383-90.
<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01455-07>
 4. **Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR.** *Campylobacter* species. In: Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR (eds). *Clinical Veterinary Microbiology* Londra: Mosby, 1998:268-72.
 5. **Debruyne L, Gevers D, Vandamme P.** Taxonomy of the family *Campylobacteriaceae*. In: Nachamkin I, Szymanski CM, Blaser MJ eds. *Campylobacter*. Washington DC, ASM Press, 2008:3-25.
<http://dx.doi.org/10.1128/9781555815554.ch1>
 6. **Kramer JM, Frost JA, Bolton FJ, Wareing DRA.** *Campylobacter* contamination of raw meat and poultry at retail sale: identification of multiple types and comparison with isolates from human infection. *J Food Protect* 2000; 63:1654-9.
 7. **Richardson JF, Frost JA, Kramer JM, et al.** Coinfection with *Campylobacter* species: an epidemiological problem? *J Appl Microbiol* 2001;91:206-11.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01377.x>
 8. **Koene MG, Houwers DJ, Dijkstra JR, Duim B, Wagenaar JA.** Simultaneous presence of multiple *Campylobacter* species in dogs. *J Clin Microbiol* 2004; 42:819-21.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.2.819-821.2004>
 9. **Koene MG, Houwers DJ, Dijkstra JR, Duim B, Wagenaar JA.** Strain variation within *Campylobacter* species in fecal samples from dogs and cats. *Vet Microbiol* 2009; 133:199-205.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.06.022>
 10. **Kayman T, Abay S, Hızlısoy H.** *Campylobacter* türlerinin fenotipik yöntemler ve multipleks polimeraz zincir reaksiyonu ile tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıkları. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47:230-9.
<http://dx.doi.org/10.5578/mb.4532>
 11. **Wang G, Clark CG, Taylor TM, et al.** Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J Clin Microbiol* 2002; 40:4744-7.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.12.4744-4747.2002>
 12. CLSI. Methods for antimicrobial dilution and disc susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. Approved guideline, M45-A, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2006.
 13. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 20th informational supplement M100-S20, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2010.
 14. **Houf K, de Zutter L, van Hoof J, Vandamme P.** Assessment of the genetic diversity among arcobacters isolated from poultry products by using two PCR-based typing methods. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68:2172-8.
<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.5.2172-2178.2002>
 15. **Lawson AJ, Logan JM, O'neill GL, Desai M, Stanley J.** Large-scale survey of *Campylobacter* species in human gastroenteritis by PCR and PCR-enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3860-4.
 16. **Ruberg F, Steinbrückner B, Kist M.** The simultaneous detection of different *Campylobacter* strains during human infection is rare. In: Lasticova, AJ, Newell D, Lasticova EE, eds. *Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms*. Pinelands, South Africa: The Rustica Press, 1998:65-7.
 17. Centers for Disease Control and Prevention. *Campylobacter*, General Information. How common is *Campylobacter*? <http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/Campylobacter/> [Erişim tarihi (Ocak 2016)]