

SALMONELLA ENTERICA KÖKENLERİNDE AZALMIŞ SİPROFLOKSASİN DUYARLILIĞI VE NALİDİKSİK ASİT TARAMA TESTİ

DECREASED CIPROFLOXACIN SUSCEPTIBILITY IN SALMONELLA ENTERICA AND NALIDIXIC ACID SCREENING TEST

Feriha ÇİLLİ Şöhret AYDEMİR Pınar AKINCI Alper TÜNGER

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Anahtar Sözcükler: *Salmonella enterica*, siprofloksasin, azalmış duyarlılık, nalidiksik asit tarama testi

Keywords: *Salmonella enterica*, ciprofloxacin, decreased susceptibility, nalidixic acid screening test

Geliş: 01 Temmuz 2005

Kabul: 13 Haziran 2006

ÖZET

İnvazif *Salmonella* infeksiyonlarında florokinolonların ilk seçilecek ilaçlar olmasına karşın son zamanlarda bir çok ülkeden azalmış duyarlılık ve buna bağlı tedavi başarısızlıkları bildirilmektedir. Bu çalışmanın amacı, *Salmonella enterica* kökenlerinde azalmış siprofloksasin duyarlılığını araştırmaktır. Çalışmada 1997-2005 yılları arasında soyutlanan 133 *S. enterica* kökeni retrospektif olarak incelendi. Nalidiksik asit ve siprofloksasin duyarlılıkları Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda disk difüzyon, siprofloksasin MİK değerleri ise E-test yöntemi ile belirlendi. Azalmış siprofloksasin duyarlılığı, siprofloksasin MİK ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$ - ≥ 0.125 $\mu\text{g/ml}$ olması olarak tanımlandı. İncelenen kökenlerin siprofloksasin MİK değerleri 0.004-0.25 $\mu\text{g/ml}$ arasında bulundu. Kökenlerin 22'si nalidiksik aside dirençli, 111'i duyarlı idi. Duyarlı 111 kökenin siprofloksasin MİK'leri ≤ 0.064 $\mu\text{g/ml}$, dirençli 22 kökenin ise 0.125-0.25 $\mu\text{g/ml}$ arasındaydı. Siprofloksasin MİK'leri ≤ 0.064 $\mu\text{g/ml}$ olan kökenlerin disk difüzyon yöntemindeki nalidiksik asit inhibisyon zon çapları ≥ 33 mm bulundu. Siprofloksasine azalmış duyarlılık görülen kökenlerin zon çapları ise 25-32 mm arasında idi. Soyutlanan *S. enterica* kökenleri arasında %16.5 oranında azalmış siprofloksasasin duyarlılığı belirlendi. Disk difüzyon yöntemi ile nalidiksik asit direnci araştırmanın azalmış siprofloksasin duyarlılığı olan kökenleri belirlemede yararlı olduğu görüldü.

SUMMARY

Although the fluoroquinolones are the drugs of choice for invasive *Salmonella* infections, recently reduced ciprofloxacin susceptibility and therapeutic failures have been reported from many countries. The purpose of this study was to determine reduced ciprofloxacin susceptibility among *Salmonella enterica* strains isolated in the routine laboratory. A total of 133 *Salmonella enterica* isolates collected between 1997-2005 were studied retrospectively. Nalidixic acid and ciprofloxacin susceptibilities were investigated by disk diffusion method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines, also ciprofloxacin MIC values were determined by E-test. Reduced ciprofloxacin susceptibility was described as MIC values ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$ - ≥ 0.125 $\mu\text{g/ml}$. Ciprofloxacin MIC values of all 133 isolates were between 0.004-0.25 $\mu\text{g/ml}$. Twenty two isolates were classified as nalidixic acid resistant while the rest 111 were evaluated as sensitive. Ciprofloxacin MIC values of these 111 strains were ≤ 0.064 $\mu\text{g/ml}$ and 22 isolates had MIC's between 0.125-0.25 $\mu\text{g/ml}$. Isolates for which the ciprofloxacin MICs were ≤ 0.064 $\mu\text{g/ml}$ had inhibition zone diameters ≥ 33 mm for nalidixic acid whereas isolates showing decreased ciprofloxacin susceptibility had zone diameters of 25-32 mm. Among the *S. enterica* strains isolated in the laboratory 16.5% reduced ciprofloxacin susceptibility and nalidixic acid resistance were detected. To determine the reduced ciprofloxacin susceptibility, screening nalidixic acid resistance by disk diffusion was observed to be helpful.

GİRİŞ

Salmonella türleri dünyanın bir çok yerinde besin yoluyla bulaşan infeksiyonların en önde gelen nedeni olup, insan ve hayvanlarda ciddi hastalıklara yol açabilen patojenlerdir (1). Kinolon grubu antimikrobiklerin, özellikle de florokinolonların *Salmonella* türleri tarafından oluşturulan infeksiyonlarda ilk seçenek olmasına karşın son bir kaç yıldır siprofloksasine karşı azalmış duyarlılığa bağlı bir çok tedavi başarısızlığı bildirilmiştir (2-7). Florokinolon direnci birden farklı mekanizma ile gelişebilir. Ancak *Salmonellalarda* direnç gelişimi en sık DNA giraz enziminin *gyrA* alt biriminde amino asit değişikliklerine yol açan mutasyonlar sonucunda görülmektedir (5, 8, 9-11). *Salmonella* kökenlerinde florokinolonlara azalmış duyarlılık, siprofloksasin MİK değerinin $\geq 0.125 - \leq 1$ µg/ml olması şeklinde tanımlanmaktadır. Bu kökenlerde tipik olarak DNA girazın *gyrA* alt biriminde tek bir amino asit değişikliği gösterilmiş ve hemen her zaman nalidiksik aside karşı direnç olduğu saptanmıştır (5, 7, 8, 12).

Nalidiksik asit direncinin *Salmonella* serotiplerinde azalmış siprofloksasin duyarlılığının göstergesi olabileceği bildirilmiştir (5,12,13). Bu çalışmada, laboratuvarında klinik örneklerden soyutlanmış *Salmonella* kökenlerinde azalmış siprofloksasin duyarlılığının, nalidiksik asit direnci ve siprofloksasin MİK değerleri incelenerek retrospektif olarak araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada Ocak 1997 ile Şubat 2005 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden soyutlanan 133 *Salmonella enterica* kökeni incelendi. Kanlı ve EMB agarda kuşku koloni oluşturan kökenler standart yöntemler ile biyokimyasal özellikleri ve antijenik yapıları incelenerek tanımlandı (14). Tüm kökenlerin siprofloksasin ve nalidiksik asit duyarlılıkları, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda 5 µg'lık siprofloksasin, 30 µg'lık nalidiksik asit diskleri (Oxoid, İngiltere) kullanılarak disk difüzyon yöntemiyle araştırıldı (15). Siprofloksasin MİK değerleri E-test (AB Biodisk, Solna, İsveç) ile belirlendi. Azalmış siprofloksasin duyarlılığı, siprofloksasin MİK değerlerinin ≤ 1 µg/ml - ≥ 0.125 µg/ml olması olarak tanımlandı (12). Çalışmada kontrol kökeni olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 kullanıldı.

BULGULAR

İncelenen tüm kökenler için E-test ile siprofloksasin MİK değerleri 0.004 ile 0.25 µg/ml arasında dağılım gösterdi.

Kökenler için siprofloksasin MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 0.023 ve 0.19 µg/ml olarak saptandı. Değerlendirmede CLSI kriterleri gözönüne alındığında, kökenlerin tümü siprofloksasine duyarlı bulundu. Disk difüzyon yöntemiyle nalidiksik asit duyarlılığı araştırıldı ve 133 kökenin 22 (%16.54)'sinin inhibisyon zon çapları ≤ 13 mm, geri kalan 111 (%83.46) kökenin ise ≥ 19 mm olarak ölçüldü. Nalidiksik aside duyarlı bulunan bu 111 kökenin tümü için siprofloksasin MİK değerleri ≤ 0.064 µg/ml bulunurken, dirençli 22 köken için siprofloksasin MİK değerleri 0.125-0.25 µg/ml arasında saptandı. E-test ile siprofloksasin MİK değerleri ≤ 0.064 µg/ml olan kökenler disk difüzyon yöntemiyle incelendiğinde siprofloksasin inhibisyon zon çaplarının ≥ 33 mm olduğu görüldü. Azalmış siprofloksasin duyarlılığı saptanan kökenlerin disk difüzyon yönteminde siprofloksasin inhibisyon zon çapları 25-32 mm arasında bulundu.

TARTIŞMA

Dünyanın her yerinde hem *S. typhi* hem de diğer *Salmonella* türlerine karşı geleneksel ilk seçenek antimikrobikler arasında olan ampisilin, kloramfenikol ve trimetoprim-sülfametoksazol gibi ilaçlara direnç gelişmiştir. Bunun sonucunda 1980'li yıllardan beri florokinolonlar invazif salmonelloz tedavisinde ilk seçenek haline gelmişlerdir (9). Ancak son yıllarda dünyanın bir çok bölgesinden nalidiksik aside direnç ve siprofloksasine karşı da azalmış duyarlılık gösteren *Salmonella* kökenleri ve bu kökenlerin etken olduğu infeksiyonlarda ortaya çıkan tedavi başarısızlıkları bildirilmektedir (2, 3, 6, 9, 10). Özellikle bağırsak dışı *S. typhi* ve *typhi* dışı serotiplerinin oluşturduğu infeksiyonlarda uygun antimikrobiyal seçimi ve bunların zammı kaybetmeden kullanımı mortalitenin azaltılması için önemlidir (9). Bu çalışmada laboratuvarında yazarlarca soyutlanan *Salmonella* kökenleri retrospektif olarak incelenmiş ve siprofloksasine karşı azalmış duyarlılık araştırılmıştır.

Bakterilerde kinolonlara direnç gelişiminde en sık olarak *gyrA*, *gyrB*, *parC* ve *parE* gibi kromozomal genlerde spontan olarak ortaya çıkan nokta mutasyonlar sorumlu tutulmaktadır (5, 7-9, 12). Tek bir kromozomal nokta mutasyonun amino asit değişikliği yaparak nalidiksik asit direncine yol açmaya yeterli olduğu gösterilmiştir. Siprofloksasin direncinin gelişmesi için ise genellikle iki ya da daha fazla kromozomal nokta mutasyon gerekmektedir (16).

Clinical and Laboratory Standards Institute *Salmonella enterica*'yı da kapsayan Enterobacteriaceae üyeleri için siprofloksasin duyarlılık ve direnç eşik sınırlarını sırasıyla MİK ≤ 1 ve ≥ 4 µg/ml olarak belirlemiştir.

Nadiren siprofloksasine dirençli *S. typhi* ve typhi olmayan *Salmonella* kökenleri de bulunmakla birlikte, siprofloksasine duyarlı ancak nalidiksik aside dirençli kökenler daha sık ve giderek artan oranda soyutlanmaktadır (9). Bu kökenler CLSI kriterlerine göre duyarlılık sınırları içinde bulunmasına karşın siprofloksasin MİK değerleri genellikle ≤ 1 ile ≥ 0.125 $\mu\text{g/ml}$ arasında bulunmaktadır (2, 3, 5). Bu şekilde azalmış kinolon duyarlılığı gösteren kökenler ile gelişen bağırsak dışı *Salmonella* infeksiyonlarında siprofloksasin uygulamasına yeterli yanıt alınmamaktadır. Son yıllarda çok sayıda yayın ile bu tür olgular ve tedavi başarısızlıkları bildirilmiştir (2-4, 6, 9).

Nalidiksik asit ilk geliştirilen kinolon olup bir çok ülkede 1960'ların ortalarından beri bulunmaktadır. Ancak günümüzde bu ilaca dirençli *Salmonella*'ların artan prevalansı nedeniyle çok nadir kullanılmaktadır (9). Nalidiksik aside direnç prevalansı özellikle *S. enterica* serovar Hadar gibi bazı serovarlarda ya da epidemik *S. typhimurium* klonlarında yüksek bildirilmiştir (10).

Madhulika ve ark. (13) Hindistan'da nalidiksik asit dirençli olan *S. typhi* kökenlerinin siprofloksasine de azalmış duyarlılık gösterdiğini saptamışlardır. Araştırmacılar zaman alıcı dilüsyon yöntemleri yerine basit disk difüzyon yöntemi ile nalidiksik asit direnci araştırmanın, azalmış kinolon direncini hızla öngöreceğini ve dolayısıyla tedavi başarısızlıklarının önlenilebileceğini bildirmişlerdir (13).

Hakanen ve ark. (5) siprofloksasin MİK değerleri 0.125 ile 0.5 $\mu\text{g/ml}$ arasında değişen *Salmonella* kökenlerinin tümünün nalidiksik aside dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar azalmış ofloksasin ve norfloksasin duyarlılığının da nalidiksik asit direnci ile benzer şekilde ilişkili olduğunu gözlemişlerdir. Disk difüzyon yönteminde 30 μg 'lık nalidiksik asit diski ile direnç bulunmasının azalmış kinolon duyarlılığını saptamada %100 duyarlı, %87 özgül olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca azalmış siprofloksasin duyarlılığı olan kökenlerin tümünde *gyrA* geninde mutasyon olduğunu göstermişlerdir (5). Sunulan çalışmada da benzer şekilde siprofloksasin MİK değerleri 0.125 ile 0.25 $\mu\text{g/ml}$ arasında bulunan kökenlerin tümünün nalidiksik aside direnç gösterdiği saptanmıştır. Türkiye'den Albayrak ve ark. (17) *Salmonella* kökenlerinde %12.3 oranında nalidiksik asit direnci bildirmişlerdir. Araştırma-

cılar disk difüzyon yöntemi ile nalidiksik asit direnci taramanın azalmış siprofloksasin duyarlılığını göstermede duyarlılığını %100, özgüllüğünü ise %98.4 oranında bulmuşlardır (17). Yine Türkiye'den Eşel ve ark. (18) da disk difüzyon yöntemiyle ile nalidiksik asit direnci saptanan *Salmonella* kökenlerinde E test ile azalmış siprofloksasin duyarlılığı bulduklarının bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada 1999-2001 yılları arasında 10 Avrupa ülkesinde azalmış siprofloksasin duyarlılığının *S. typhi* için % 20'den % 26'ya; *S. paratyphi A* için ise % 9'dan % 26'ya yükseldiği bildirilmiştir. Azalmış siprofloksasin duyarlılığı görülen kökenlerin %89'unun nalidiksik asite dirençli olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada azalmış siprofloksasin duyarlılığı MİK 0.25-1.0 $\mu\text{g/ml}$ olarak tanımlanmıştır (19).

Sunulan çalışmada laboratuvarda yazarlarca soyutlanan *S. enterica* kökenlerinin tümü için siprofloksasin MİK değerleri < 1 $\mu\text{g/ml}$ bulunmuş ve CLSI kriterlerine göre siprofloksasine duyarlı bulunmuştur. Kökenlerin % 83.5'i nalidiksik aside duyarlı bulunmuş ve nalidiksik aside duyarlı olan kökenlerin siprofloksasasin MİK değerleri ≤ 0.064 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptanmıştır. İncelenen kökenlerin %16.5'inde nalidiksik asit direnci belirlenmiş ve nalidiksik asit dirençli kökenlerin tümünde önceki çalışmalar (5, 9, 12, 13) ile uyumlu olarak siprofloksasin MİK değerlerinin < 1 $\mu\text{g/ml}$ olduğu ancak 0.125 ile 0.25 $\mu\text{g/ml}$ arasında değiştiği gözlenmiştir. Siprofloksasine azalmış duyarlılık gösteren bu kökenlerin siprofloksasin inhibisyon zon çaplarının da nalidiksik asit duyarlı olanlara göre daha dar olduğu gözlenmiştir.

Bu çalışmada laboratuvarda soyutlanan *Salmonella enterica* kökenleri arasında %16.5 oranında nalidiksik asit direnci ve azalmış siprofloksasasin duyarlılığı olduğu saptanmıştır. Yine çalışmada disk difüzyon yöntemi ile nalidiksik asit direnci araştırmanın azalmış siprofloksasin duyarlılığı olan kökenleri belirlemede yararlı olduğu görülmüştür. Klinik önemleri nedeniyle özellikle bağırsak dışı salmonellozlarda tedavi başarısızlıklarını önlemek amacıyla klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında azalmış kinolon duyarlılığı gösteren *Salmonella* kökenlerinin rutin olarak aranması ve saptananların klinisyenlere haber verilerek uyarılması uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Malorny B, Schroeter A, Reiner H. Incidence of quinolone resistance over the period 1986 to 1998 in veterinary *Salmonella* isolates from Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2278-82.
2. Slinger R, Desjardins M, McCarthy AE, et al. Suboptimal clinical response to ciprofloxacin in patients with enteric fever due to *Salmonella* spp. with reduced fluoroquinolone susceptibility: a case series. *BMJ Infectious Diseases* 2004; 4: 36-9.
3. Butt T, Nadeem A, Mahmood A, Zaidi S. Ciprofloxacin treatment failure in typhoid fever case, Pakistan. *Emerging Infect Dis* 2003; 9: 1621-22.

4. **Threlfall EJ, Ward LR.** Decreased susceptibility to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serotype Typhi, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* **2001**; 7: 448–50.
5. **Hakanen A, Kotilainen P, Huovinen P, Helenius H, Siitonen A.** Reduced fluoroquinolone susceptibility in *Salmonella enterica* serotypes in travelers returning from Southeast Asia. *Emerg Infect Dis* **2001**; 7: 996–1003.
6. **Shakespeare WA, Davie D, Tonnerre C, Rubin MA, Strong M, Petti CA.** Nalidixic acid resistant *Salmonella enterica* serotype typhi presenting as a primary psoas abscess: case report and review of the literature. *J Clin Microbiol* **2005**; 43: 996-8.
7. **Aerestrup FM, Wiuff C, Kare M, Threlfall EJ.** Letters to the Editor: Is it time to change fluoroquinolone breakpoints for *Salmonella* spp.? *Antimicrob Agents Chemother* **2003**; 47: 827-9.
8. **Hirose K, Tamura K, Watanabe H.** Screening method for *Salmonella enterica* serotype typhi and serovar paratyphi A with reduced susceptibility to fluoroquinolones by PCR-restriction fragment length polymorphism. *Microbiol Immunol* **2003**; 47: 161-5.
9. **Crump JA, Barrett TJ, Nelson JT, Angulo FJ.** Reevaluating fluoroquinolone breakpoints for *Salmonella enterica* serotype typhi and non-typhi salmonellae. *Clin Infect Dis* **2003**; 37: 75-81.
10. **Giraud E, Cloeckaert A, baucheron S, Mouline C, Dancla EC.** Fitness cost of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype typhimurium. *J Med Microbiol* **2003**; 52: 697-703.
11. **Guerra B, Malorny B, Schroeter A, Helmuth R.** Multiple resistance mechanisms in fluoroquinolone resistant *Salmonella* isolates from Germany. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**; 47: 2059.
12. **Poutanen SM, Low DE.** Is it time to change fluoroquinolone MIC breakpoints for *Salmonella* spp.? *Clin Microbiol Newslett* **2003**; 25: 97-102.
13. **Madhulika U, Harish BN, Parija SC.** Current pattern in antimicrobial susceptibility of *Salmonella typhi* isolates in Pondichery. *Indian J Med Res* **2004**; 111-4.
14. **Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC.** *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott, **1997**: 200-3.
15. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*. Fifteenth Informational Supplement. CLSI Document M100-S15. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standarts Institute, **2005**.
16. **Yoshida H, Bogaki M, Nakamura S.** Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* *norA* gene, which confers resistance to quinolones. *J Bacteriol* **1990**; 172: 6942–9.
17. **Albayrak F, Cokca F, Aysev AD.** Predictive value of nalidixic acid resistance for detecting salmonellae with decreased ciprofloxacin susceptibility. *Int J Antimicrob Agents* **2004**; 23: 332-6.
18. **Eşel D, Telli M, Sümerkan B, Karaca N, Aygen B.** Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Salmonella* spp. in Kayseri. *İnfek Derg* **2002**; 3: 335-7.
19. **Threlfall EJ, Fisher IST, Berghold C, et al.** Trends in antimicrobial drug resistance *Salmonella enterica* serotypes typhi and paratyphi A isolated in Europe, 1999-2001. *Int J Antimicrob Agents* **2003**; 22: 487-91.

İLETİŞİM

Prof. Dr. Feriha ÇİLLİ
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
35100 Bornova, İZMİR
e-posta: feriha.cilli@ege.edu.tr