

## POJAVA REZISTENCIJE KOD BAKTERIJA *CAMPYLOBACTER JEJUNI* I *CAMPYLOBACTER COLI*

Ljiljana Ristić, Tatjana Babić, Branislava Kocić i Biljana Miljković-Selimović

Od 18 vrsta koje pripadaju rodu *Campylobacter* (rRNK grupa I) termofilne su: *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* i *Campylobacter upsaliensis*. Cilj našeg ispitivanja bio je utvrđivanje osetljivosti termofilnih vrsta kampilobaktera izolovanih iz humanog fecesa na antibiotike koji se koriste u praksi. Ispitivanjem je obuhvaćeno 50 humanih izolata *C. jejuni/coli* izolovanih u Centru za mikrobiologiju Instituta za javno zdravlje u Nišu. Osetljivost je testirana primenom disk difuzione metode na 7 antibiotika (eritromicin, gentamicin, tetraciklin, ciprofloksacin, hloramfenikol, cefaleksin i nalidiksična kiselina). Rezultati su pokazali nisku rezistentnost na eritromicin, gentamicin i tetraciklin (2%), što odgovara studijama sprovedenim u svetu i govori u prilog tome da se eritromicin i dalje može smatrati lekom izbora u lečenju dijareja izazvanih kampilobakterom na našim prostorima. Rezistentnost na fluorokvinolone i nalidiksičnu kiselinu iznosila je 44%, pri čemu su veću rezistentnost pokazali izolati *C. coli*, u odnosu na *C. jejuni*, ali statistički značajna razlika nije dokazana. *Acta Medica Medianae* 2009;48(2):14-17.

**Ključne reči:** *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, rezistencija, disk difuzija, antibiotici

Institut za javno zdravlje u Nišu, Centar za mikrobiologiju

Kontakt: Ljiljana Ristić  
Institut za javno zdravlje u Nišu, Centar za mikrobiologiju  
Bul. dr Zorana Đinđića 50  
18000 Niš  
Tel: 060 7000337  
E-mail: rileiljija@yahoo.com

### Uvod

Od 18 vrsta koje pripadaju rodu *Campylobacter* (rRNK grupa I), termofilne su: *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* i *Campylobacter upsaliensis* (1). Ove bakterije najbolji porast ostvaruju na temperaturi od 42°C (2).

*Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) i *Campylobacter coli* (*C. coli*) su važni uzročnici dijareje svuda u svetu (3). U svim starosnim grupama uzrokuju od 4-15% dijareja, a takođe, važan su uzročnik putničke dijareje (3). U SAD je infekcijom kampilobakterom godišnje zahvaćeno 1% populacije (4), odnosno javlja se kod 2,4 miliona osoba godišnje (5). Studije su pokazale da je više od 90% infekcija u Engleskoj uzrokovano *C. jejuni*, a u preostalim slučajevima dominira *C. coli*. *C. lari* učestvuje u manje od 1% infekcija (6).

Kampilobakterioza je primarno zoonoza, a sirovo ili termički nedovoljno obrađeno pileće meso smatra se važnim izvorom infekcije kampilobakterom. Nepasterizovano mleko, kontaminirana voda, svinjetina, jagnjetina, teletina i morska hrana, takođe, dovode do infekcije. *C. coli* predstavlja deo normalne crevne flore kod svinja (7), *C. jejuni* kod

ptica (2), a *C. upsaliensis* je najčešće dokazan kod pasa (3).

Međutim, učestalost i način pojavljivanja infekcije kampilobakterom se razlikuje u razvijenim i zemljama u razvoju (pre svega, razlike se odnose na starosnu dob i sezonski karakter infekcija). U zemljama u razvoju najveći broj prijavljenih infekcija je kod dece, a u razvijenim zemljama kod odraslih. Prijavljena prevalenca *Campylobacter spp.* kod dece u jugoistočnoj Aziji nalazi se u opsegu 2,9 - 15% (8).

Najčešći simptomi kampilobakterioze kod ljudi su: dijareja, povišena telesna temperatura, abdominalni bolovi, čelijski eksudat i krv u stolici. Međutim, bolest se može manifestovati kao septikemija ili kao miokarditis, pankreatitis, meningitis, holecistitis, artritis i nodozni eritem. Kliničke komplikacije infekcije uključuju toksični megakolon, hemolitičko uremički sindrom (HUS), Reiterov sindrom i Guillan-Barré-ov sindrom (9).

Pošto se kampilobakterioze uglavnom manifestuju kao blagi enteritis, koji najčešće spontano prolazi, antibiotska terapija se ne preporučuje. Primenu terapije zahtevaju teži klinički oblici (produženi enteritis, septikemija i druge ekstraintestinalne manifestacije) (4). Takođe, terapija je neophodna kod imunodeficientnih bolesnika (10).

U slučaju primene terapije, lek izbora je eritromicin, a alternativni lekovi su fluorokvinoloni, tetraciklini, hloramfenikol, ampicilin i gentamicin (4). Poslednjih godina zapaža se porast rezistencije bakterija roda *Campylobacter* na antibiotike, posebno na eritromicin, fluorokvinolone i beta-

laktame. Pojava rezistencije se povezuje sa primenom makrolida i kvinolona u veterini (5). U terapiji enteritisa izazvanih kampilobakterom 80-tih godina prošlog veka uvode se fluorokvinoloni, koji su u početku pokazivali visoku aktivnost *in vitro* prema termofilnim sojevima kampilobaktera, kao i prema ostalim članovima porodice Enterobacteriaceae. Ubrzo je postalo jasno da otpornost vrsta kampilobaktera prema ovim antibioticima raste već posle samo nekoliko tretmana kao i da dijareja izazvana rezistentnim sojevima ima produženo trajanje (4).

### Cilj rada

Cilj rada bio je određivanje otpornosti *C. jejuni* i *C. coli* prema eritromicinu, gentamicinu, tetraciklinu, ciprofloksacinu i hloramfenikolu, koji se koriste u terapiji i cefaleksinu i nalidiksičnoj kiselini, koji se primenjuju za identifikaciju.

### Materijal i metode

Ispitivanjem je obuhvaćeno 50 sojeva izolovanih i identifikovanih iz fecesa ljudi u periodu 2003-2007. godine u Institutu za javno zdravlje u Nišu. Izolacija termofilnih vrsta kampilobaktera vršena je zasejavanjem uzorkovanog materijala na Skirow agar (bioMérieux, Francuska) i inkubiranjem na temperaturi od 42°C u mikroaerofilnim uslovima u toku 48 sati. Za identifikaciju sojeva korišćeni su izgled kolonija (sitne, glatke, sjajne, pljosnate ili konveksne kolonije koje se mogu slivati kada imaju izgled kapi vode), mikroskopski preparat (Gram-negativni, savijeni bacili, oblika galebovih krila), biohemijski testovi (testovi oksidaze, katalaze, hidrolize hipurata i automatski identifikacioni sistem API-Campy, bioMérieux, Francuska).

Osetljivost sojeva na antibiotike ispitivana je disk-difuzionom metodom na krvnom agaru obogaćenom sa 5% ovčije krvi. Suspenzija je pripremana inokulacijom pune eze u 5 ml sterilnog fiziološkog rastvora i podešavanjem gustine koja odgovara 5 McFarland standardu. Diskovi su aplikovani pincetom, pri čemu je razmak između centara dva susedna diska iznosio 3 cm, a udaljenost diskova od ivice ploče 1 cm. Ploče su inkubirane na 37°C mikroaerofilno, primenom GasPak-sistema (bioMérieux, Francuska) u toku 48 sati. S obzirom da veličina zone inhibicije i granične vrednosti nisu standardizovane, korišćena su uputstva za *Staphylococcus aureus*, standard za eritromicin i standard za Enterobacteriaceae za ostale antibiotike po preporuci Clinical Laboratory Standards Institute USA (CLSI) iz 2008. godine (11). U radu su primenjeni diskovi tetraciklina (30 µg) (Bioanalyse, Turska) i diskovi eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), nalidiksične kiseline (30 µg), ciprofloksacina (5 µg), hloramfenikola (30 µg) i cefaleksina (30 µg) (Neo sensitabstm, Rosco-Diagnostica, Danska).

Statistička obrada podataka vršena je softverom Epi info, verzija 5.

### Rezultati

Od ukupno 50 testiranih sojeva, ispitano je 35 sojeva *C. jejuni* i 15 sojeva *C. coli*. Rezistenciju

na jedan antibiotik ispoljilo je 27 izolata, 2 izolata na dva i 19 izolata bilo je rezistentno na tri antibiotika.

Od 35 izolata *C. jejuni*, 19 je bilo rezistentno na jedan antibiotik (54,3%), 2 su bila rezistentna na dva antibiotika (5,7%) i 12 je bilo rezistentno na tri antibiotika (34,3%). Od 15 izolata *C. coli*, 8 je bilo rezistentno na jedan antibiotik (53,3%), a 7 je bilo rezistentno na tri antibiotika (46,7%).

Tabela 1. Osetljivost termofilnih *Campylobacter spp.* na ispitivane antibiotike

Antibiotik	Osetljivost sojeva			
	S		R	
	broj izolata	%	broj izolata	%
eritromicin	49	98	1	2
gentamicin	49	98	1	2
tetraciklin	49	98	1	2
ciprofloksacin	28	56	22	44
nalidiksična kiselina	28	56	22	44
hloramfenikol	48	96	2	4
cefaleksin	7	14	43	86

S-Senzitivno

R-Rezistentno

Rezistencija na eritromicin, gentamicin i tetraciklin bila je zastupljena u malom procentu (Tabela 1). Rezistencija na nalidiksičnu kiselinu i ciprofloksacin bila je dokazana kod *C. jejuni* u 42,8%, a kod *C. coli* u 46,7% (Tabela 2). Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika između osetljivosti na nalidiksičnu kiselinu i ciprofloksacin kod *C. jejuni* i *C. coli* ( $P=0,8773907$   $\chi^2=0,02$ ).

Tabela 2. Osetljivost sojeva *C. jejuni/coli* na ispitivane antibiotike

Antibiotik	Osetljivost sojeva			
	<i>C. jejuni</i>		<i>C. coli</i>	
	%		%	
	S	R	S	R
eritromicin	97,1	2,9	100	0
gentamicin	97,1	2,9	100	0
tetraciklin	97,1	2,9	100	0
ciprofloksacin	57,2	42,8	53,3	46,7
nalidiksična kiselina	57,2	42,8	53,3	46,7
hloramfenikol	94,4	5,6	100	0
cefaleksin	20	80	0	100

S-Senzitivno

R-Rezistentno

U starosnoj grupi do sedam godina (27 bolesnika), rezistentnost na ciprofloksacin iznosila je 44,4%. U starosnoj grupi od sedam do petnaest godina (7 bolesnika), rezistentnost na ciprofloksacin je iznosila 28,6%. Kod odraslih (16 bolesnika), rezistentnost na ciprofloksacin je iznosila 50%. Primenom  $\chi^2$  testa utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u rezistenciji prema ciprofloksacinu u odnosu na starosno doba.

### Diskusija

Rezistencija naših sojeva bila je niska za eritromicin, gentamicin i tetraciklin (2%). Podaci

o rezistenciji izolovanih *C. jejuni* i *C. coli* na eritromicin su različiti u različitim delovima sveta. Većina studija ukazuje na veću rezistenciju *C. coli* (do 68,4%) na eritromicin u odnosu na *C. jejuni* (do 11%), što ovim ispitivanjem nije potvrđeno. Nizak i stabilan nivo otpornosti kampilobaktera na eritromicin prisutan je u Japanu, Kanadi i Finskoj, ali je rezistencija u porastu u Švedskoj i na Tajlandu (2). Studije sprovedene u regionu Arapskog zaliva, pokazale su visok stepen osetljivosti izolovanih sojeva na eritromicin, pa je on i dalje lek izbora za enteritis izazvan kampilobakterom (12). Sa druge strane, u Severnoj Irskoj primećen je blagi porast rezistencije na eritromicin (4,2%) u ljudskoj populaciji (13).

Prema podacima nekih ispitivanja izgleda da je rezistencija sojeva kampilobaktera na gentamicin niska. U studiji koju su sproveli Ge Beilei i saradnici, kojom je obuhvaćeno: 81 izolat *C. jejuni* i 54 izolata *C. coli* dobijenih iz svežeg mesa u maloprodaji, nije primećena rezistencija na gentamicin (5). U studiji sprovedenoj u Španiji, u periodu od 1997. do 1998. godine, rezistencija humanih izolata na gentamicin iznosila je 0,4% za *C. Jejuni*, odnosno 8,6% za *C. coli* (14). Slična studija, takođe u Španiji, sprovedena kod pedijatrijskih bolesnika, govori o rezistenciji na gentamicin kod 1% izolovanih sojeva (15).

Podaci iz Švedske govore da je u periodu od 2000. do 2002. godine rezistencija na tetraciklin iznosila 4%, u odnosu na druge evropske države kod kojih se ona kretala do 39%, odnosno na zemlje Azije kod kojih je iznosila 87% (16). Najviši nivo rezistencije zabeležen je u SAD i on je iznosio 85,2%, za sojeve *C. jejuni*, odnosno 77,8% za sojeve *C. coli* (5).

Otpornost naših sojeva na ciprofloksacin je iznosila 44%. Inače, rezistencija na fluorokvinolone je znatno povećana od 1989. godine uvođenjem enrofloksacina u veterinarsku medicinu kao i širokom primenom fluorokvinolona u humanoj medicini u Evropi (Holandija, Francuska, Španija).

U ovim regionima gde je otpornost na fluorokvinolone endemska, ovi antibiotici se ne preporučuju u terapiji dijareja (2). U Severnoj Irskoj, rezistencija na fluorokvinolone je 1993. godine iznosila 3,8%, a 1995. je porasla do 10% (13).

Rezistencija naših sojeva na nalidiksičnu kiselinu iznosila je 44%. U Severnoj Irskoj, u periodu od 1980. do 1991. godine, nije otkrivena rezistencija na nalidiksičnu kiselinu (13). Podaci iz SAD ukazuju na rezistenciju koja se kreće od 1,3% (1992) do 10,2% (1998) (8), dok studije iz Baskije, Severna Španija iz 2005. godine, pokazuju rezistenciju koja se kreće čak do 76% (17).

Osetljivost naših sojeva na hloramfenikol je visoka (98%). Različite studije su pokazale visoku *in vitro* aktivnost hloramfenikola za većinu sojeva kampilobaktera. Sagara i saradnici ističu značajne razlike u osetljivosti između sojeva *C. jejuni* i *C. Coli*: dok se kod *C. jejuni* ne javlja rezistencija, kod *C. coli* iznosi i do 10% (15). U Severnoj Irskoj, rezistencija na hloramfenikol je prvi put primećena 1993. godine i javljala se kod 1,4% ispitanih sojeva. U Keniji je 24% sojeva kampilobaktera bilo rezistentno na ovaj antibiotik (8).

Naši sojevi *C. jejuni* bili su u 80% izolata rezistentni na cefaleksin, dok je 100% izolata *C. coli* bilo rezistentno na ovaj antibiotik. Pezzotti i saradnici su utvrdili da je 100% ispitivanih sojeva humanog porekla otporno na cefalosporine prve generacije (18).

## Zaključak

S obzirom da je većina ispitivanih izolata osetljiva na eritromicin, tetraciklin, hloramfenikol i gentamicin, pored eritromicina kao leka izbora i ovi antibiotici se mogu koristiti u terapiji dijareje izazvane termofilnim kampilobakterima. Međutim, rezistencija na kvinolone ograničava njihovu primenu i nameće neophodnost testiranja osetljivosti, a rezistencija na nalidiksičnu kiselinu umanjuje mogućnost njenog korišćenja u identifikaciji naših sojeva.

## Literatura

1. Matsuda M, Moore JE. Urease-positive thermophilic *Campylobacter* species. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70(8):4415-8.
2. Barros-Velázquez J, Jiménez A, Villa TG. Isolation and typing methods for the epidemiologic investigation of thermotolerant campylobacters. *Int Microbiol* 1999; 2(4):217-26.
3. *Campylobacter* Enteritis Surveillance Protocol. West Virginia Department of Health and Human Resources, Bureau for Public Health, 2002; 2-5.
4. Engberg J, Aarestrup FM, Taylor DE, Gerner-Smidt P, Nachamkin I. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(1):24-34.
5. Ge B, Bodeis S, Walker RD, White DG, Zhao S, McDermott PF et al. Comparison of the Etest and agar dilution for in vitro antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter*. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 487-94.
6. Thwaites RT, Frost JA. Drug resistance in *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, and *C. lari* isolated from humans in North West England and Wales, 1997. *J Clin Pathol* 1999; 52(11):812-14.
7. Varela NP, Friendship R, Dewey C, Valdivieso A. Comparison of agar dilution and E-test for antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter coli* isolates recovered from 80 Ontario swine farms. *Can J Vet Res* 2008; 72(2):168-74.
8. Padungton P and Kaneene BJ. *Campylobacter* spp. in Human, Chickens, Pigs and Their Antimicrobial Resistance. *J Vet Med Sci* 2003; 65(2): 161-70.
9. Gillespie AI, O'Brien JS, Frost AJ, Adak KG, Horby P, Swan VA, Painter JM, Neal RK and the *Campylobacter* Sentinel Surveillance Scheme Collaborators. A Case Case Comparison of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* infection: A Tool for Generating Hypotheses. *Emerg Infect Dis* 2002; 8(9): 1-14.
10. Lubber P, Wagner J, Hahn H and Bartelt E. Antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Strains Isolated in 1991 and 2001-2002 from Poultry and Humans in Berlin, Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 3825-30.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Eighteenth informational supplement. M100-S18.28 (1) CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.

12. Abiola S, Ahmed Y, Waleed M, Eman S, Khalid B, El-Amin E, Botta G. Pattern of Antibiotic Susceptibility in *Campylobacter jejuni* Isolates of Human and Poultry Origin. Jpn J Infect Dis 2007; 60 (1): 1-4.
13. Moore EJ, Crowe M, Heaney N, Crothers E. Antibiotic resistance in *Campylobacter* spp. isolated from human faeces (1980-2000) and foods (1997-2000) in Northern Ireland: an update. J Antimicrob Chemother 2001; 48: 445-58.
14. Sáenz Y, Zarazaga M, Lantero M, Gastañares MJ, Baquero F and Torres C. Antibiotic Resistance in *Campylobacter* Strains Isolated from Animals, Foods, and Humans in Spain in 1997-1998. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44(2): 267-71.
15. Reina J, Ros MJ and Serra A. Susceptibilities to 10 Antimicrobial Agents of 1,220 *Campylobacter* Strains Isolated from 1987 to 1993 from Feces of Pediatric Patients. Antimicrob Agents And Chemother 1994; 38(12): 2917-20.
16. Österlund A, Hermann M and Kahlmeter G. Antibiotic Resistance Among *Campylobacter jejuni/coli* Strains Acquired in Sweden and Abroad: A Longitudinal Study. Scan J Infect Dis 2003; 35: 478-81.
17. De Vega G, Estibaliz M, Fernández de Aranguiz A, Colom K, Alonso R and Fernández-Astorga A. Antimicrobial Susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Strains Isolated from Humans and Poultry in North Spain. J Biol Sci 2005; 5(5):643-47.
18. Pezzotti G, Serafin A, Luzzi I, Mioni R, Milan M and Perin R. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. Int J Food Microbiol 2003; 82: 281-7.

## PRESENCE OF RESISTANCE IN *CAMPYLOBACTER JEJUNI* AND *CAMPYLOBACTER COLI*

*Ljiljana Ristic, Tatjana Babic, Branislava Kocic and Biljana Miljkovic-Selimovic*

There are 18 species belonging to the genus of *Campylobacter* (rRNA group I), of which thermophilic ones are the following: *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*. The aim of our research was to determine the sensitivity of *Campylobacter* species, isolated from human feces, to antibiotics being used in practice. The study involved 50 human strains of *C. jejuni/coli* isolated from feces in the Centre for Microbiology in the Public Health Institute Nis. Sensitivity was tested by applying the disk diffusion method on seven antibiotics (erythromycin, gentamicin, tetracycline, ciprofloxacin, chloramphenicol, cephalexin and nalidixic acid). Our results showed low resistance to erythromycin, gentamicin and tetracycline (2%), which corresponds to the studies conducted in the world. Moreover, these findings indicate that erythromycin may be considered the drug of choice in the treatment of *Campylobacter diarrhea* in this region. Resistance to fluoroquinolone and nalidixic acid was 44%, and *C. coli* showed higher resistance compared to *C. jejuni*, though statistical significance was not proved. *Acta Medica Medianae* 2009;48(2):14-17.

**Key words:** *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, resistance, disk diffusion, antibiotics