

Piliç Boyun Derilerinden İzole Edilen *C. perfringens*'lerin Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi

Güzin İplikçioğlu Çil¹, F. Seda Bilir Ormancı¹

¹ Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 23.06.2016, Kabul Tarihi / Accepted: 12.07.2016

Özet: Mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı geliştirdikleri direnç, halen tüm dünyada önemini koruyan bir halk sağlığı sorunudur. Antibiyotik direnç ile mücadelede patojen mikroorganizmaların, gıdalarda güvenilir metotlarla tespiti, identifikasyonu ve antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmanın amacı, üç farklı kanatlı kesimhanesinden alınan 180 piliç boyun derisi örneğinden izole edilen 35 *Clostridium perfringens* suşunun antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesidir. İzolatların antibiyotik direnç profillerinin tespitinde CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) tarafından bildirilen disk difüzyon metodu kullanılmıştır. İzolatların 35'inin de (%100) en az bir antibiyotiğe dirençli olduğu, ayrıca 31 (% 88,5) *C. perfringens* izolatının 1'den fazla antibiyotiğe direnç gösterdiği tespit edilmiştir. İzolatların tamamının (% 100) dirençli olduğu antibiyotik trimetoprim olarak belirlenmiş, bu antibiyotik yanında, % 65,7 ile tetrasiklin, % 62,8 oranında gentamisin direncin yüksek oranda tespit edildiği diğer antibiyotikler olmuştur. Elde edilen veriler izolatların hepsinin vankomisine duyarlı olduğunu da ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik direnç, *C. perfringens*, disk difüzyon, piliç eti.

Antibacterial Resistance of *C. perfringens* Isolated From Chicken Neck Samples

Abstract: Antibacterial resistance is still an important public health problem, worldwide. Identification and detection of antibacterial resistance of pathogen microorganisms from foods are essential for prevention. The aim of this study was to detect the antibiotic resistance of 35 *Clostridium perfringens*, which are isolated from 180 chicken neck samples obtained from three slaughterhouses. For this purpose disc diffusion method was used according to the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). As a result, all (100 %) of the isolates were found to be resistant at least one of the 9 antibiotics also, 31 (88,5 %) of them were showed resistance to more than one antibiotic. 35 isolates was resistant to trimetoprim (100 %). In addition, high level of resistance was also determined against tetracycline (65,7 %) and gentamycin (62,8 %). All the isolates were found to be susceptible to vancomycin (100 %).

Keywords: Antibiotic resistance, chicken meat, *C. perfringens*, disc diffusion.

Giriş

Antibiyotikler; hayvan yetiştiriciliğinde, bakteriyel infeksiyonların tedavisinde, hastalıklar yönünden risk taşıyan hayvanlarda koruyucu olarak veya gelişimi ve verimi arttırmak amacıyla yem katkıları şeklinde kullanılmaktadır. Bu olumlu etkileri yanında antibiyotik kullanımının neden olduğu en büyük problem de mikroorganizmalarda şekillenen direnç gelişimidir [3]. Mikroorganizmalarda gelişen direnç nedeniyle bazı hastalıkların tedavisi zorlaşmakta, kullanılan antibiyotikler etkisiz kalmaktadır. Ayrıca dirençli türlerin oluşması ile yeni hastane infeksiyonları ortaya çıkmaktadır. Her yıl Avrupa'da yaklaşık 25 000 insanın antibiyotik dirençli bakteriyel infeksiyonlar yüzünden hayatını kaybettiği bildirilmektedir. Benzer şekilde Amerika'da yılda 2 milyon kişinin bu etkenler nedeniyle hastalandığı ve 23

000 kişinin de hayatını kaybettiği rapor edilmektedir. Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç gelişimi temelde iki şekilde olmaktadır, direnci oluşturan genlerin spontan ya da indüklenen mutasyonları veya direnç genlerinin başka bakterilerden transfer edilmesi. Özellikle genetik aktarım yolu, kazanılan direncin ileride farklı bakterilere geçmesi açısından önemlidir. Gelecekte korkulan bir diğer tabloda kullanılan antibiyotiklerin yararlı mikroorganizmalardaki etkilerinin tam olarak bilinmemesi, bunlarda şekillenmesi muhtemel bir direnç gelişiminin patojenlere aktarılmasıdır [4,12].

Bu olumsuz etkileri göz önüne alınarak Avrupa Birliği ilk olarak 1997'de avoparsinin gelişmeyi artırıcı amaçla kullanımını yasaklamıştır. 1999'da da insanlarda kullanılan antibiyotiklerle gösterdiği benzerlik nedeniyle basitrasın, spiramisin, tiylosin

ve virginiamisininin hayvanlarda tedavi dışında kullanımını yasaklanmıştır. Avrupa Birliği ile uyum sürecinde olan Türkiye'de de aynı politika izlenmektedir [5].

Gıda kaynaklı hastalıklara neden olan bakterilerin antibiyotiklere karşı geliştirdiği direnç önemli bir halk sağlığı sorunudur. Özellikle kanatlı yetiştiriciliğinde su ve yeme katılarak, hastalıktan korunmak ve gelişmeyi arttırmak amacıyla kullanılan antibiyotikler, birçok gıda patojeninde direnç gelişimine neden olmaktadır [8,14].

Clostridium perfringens, doğada, hayvanların ve insanların bağırsaklarında yaygın olarak bulunan bir bakteridir. Her yerde bulunabilme özelliği, sporlu olması ve çevresel şartlara direnç göstermesi, gıdaların etkenle kontaminasyon riskini arttırırken, korunma ve kontrolünü zorlaştırmaktadır [2]. *C. perfringens*, ürettiği çeşitli toksinler ile insanlarda gazlı gangrene ve birbirinden farklı iki tip gıda enfeksiyonuna neden olurken, birçok hayvan türünde enterotoksemi, nekrotik enteritis gibi değişik hastalıklar meydana getirmektedir [16]. Etken, gelişmek ve çoğalmak için ihtiyacı olan 13-14 aminoasit ile 5-6 vitamin ve mineral maddeyi kendi sentezleyemediği için dışarıdan almak zorundadır. Bu nedenle sıklıkla bu maddeleri yeterli oranda içeren, et veya et ürünlerinde bulunur [7]. *C. perfringens* oranı kanatlı eti ve ürünlerinde de, kanatlıların bağırsak kanalında olduğu gibi yüksektir [17].

C. perfringens'in florokinolonlar gibi genellikle anaerob mikroorganizmalara karşı kullanılan antibiyotiklere duyarlı olduğu bilinmektedir [6]. Rood ve ark. 1978 yılında ilk kez etkenin çoklu antibiyotik direncinin olduğunu (tetrasiklin, eritromisin, linkomisin, klindamisin) domuz dışkısından izole ettikleri örneklerde ortaya koymuştur [19]. Ancak *C. perfringens* için bilinen en tipik direnç tetrasiklene karşı geliştirdiğidir [23]. *C. perfringens*'in tetrasiklin direncinde etkili olan genetik determinantlar *tetP*, *tetM*, *tetK*, *tetL* olarak belirlenmiştir [13]. *C. perfringens*'in metronidazole dirençli olduğunu gösteren az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bunun yanında *catQ* ve *catP* genlerini taşıyan izolatlarda, kloramfenikol asetiltransferaz üretimi ile kloramfenikole, *ermQ* ve *ermP* geni tespit edilenlerinde klindamisine karşı direnç olduğu bildirilmektedir. Eritromisine direnç, klindamisin ve linkomisin direnci ile beraber görülmektedir [9]. Anaerob mikroorga-

nizmalarda en yaygın direncin aminoglikozidlere karşı olduğu bilinmektedir [18].

C. perfringens'in gıdalarda güvenilir metotlarla tespiti, identifikasyon ve antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi halk sağlığının korunması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu doğrultudan hareketle bu çalışmanın amacı, üç farklı kanatlı kesimhanesinden alınan 180 piliç boyun derisi örneğinden izole edilen 35 *Clostridium perfringens* suşunun antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesidir.

Materyal ve Metot

Materyal

Bu çalışmada, üç farklı kanatlı kesimhanesinden alınan 180 piliç boyun derisi örneğinden izole edilen 35 *C. perfringens* suşu materyal olarak kullanıldı. Boyun derilerinden klasik kültür yöntemi ile izole ve identifiye edilen *C. perfringens* 'ler, daha sonra *cpa* geni baz alınarak PCR ile doğrulandı.

Metot

İzolatların antibiyotik direnç profilleri CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) tarafından bildirilen disk difüzyon testine göre belirlendi [1]. Disk difüzyon yönteminde ampicillin (Oxoid CT0003B-10 µg), chloramphenicol (Oxoid CT0013B-30 µg), ciprofloxacin (Oxoid CT0425B-5 µg), gentamicin (Oxoid CT0794B-120 µg), nalidixic acid (CT0031B-30 µg), penicillin G (Oxoid CT0043B-10 U), tetracycline (Oxoid CT0054B-30 µg), trimethoprim (Oxoid CT0076B-5 µg), vancomycin (Oxoid CT0058B-30 µg) antibiyotikleri kullanıldı.

Bu amaçla izolatların Cooked Meat Medium'dan (Oxoid CM0081) alınan taze kültürleri, 5 ml'lik Tryptone Soya Brothda (TSB, Oxoid CM0129) 37°C'de, 0,5 McFarland (2 x 10⁸ kob/ml) türbidite oluşana kadar, inkübe edildi. Türbidite kontrolü NanoDrop spektrofotometrede (NanoDrop ND-100, Delaware, ABD) 625 nm dalga boyunda absorbanları 0,08-0,10 olacak şekilde yapıldı.

Zenginleştirilen suşlar steril svap yardımı ile 90 mm'lik petrilere 4 mm kalınlığında dökülen Mueller Hinton Agara (Oxoid CM 337) yayıldı. Svap ile ekimin ardından 3-5 dakika petrilere yüzeyindeki fazla sıvıyı çekmesi beklendikten sonra her petriye merkezden çevreye uzaklıkları 24 mm olacak şekil-

de antibiyotik diskleri yerleştirildi. Petriler 37°C'de anaerob ortamda 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda antibiyotik disklerinin etrafındaki inhibisyon zonlarının çapları ölçüldü. Elde edilen zon çapları, CLSI'daki standartlar ile karşılaştırılarak suşlar antibiyotiklere karşı duyarlı, orta dirençli veya dirençli olarak sınıflandırıldı (Şekil 1).



Şekil 1. *C. perfringens*'in Mueller Hinton agarda disk difüzyon testi görünümü

Bulgular

PCR ile doğrulanan 35 *C. perfringens* izolatının 9 farklı antibiyotiğe karşı direnç profillerinin araştırıldığı çalışma sonunda izolatların 35'inin de (%100) en az bir antibiyotiğe dirençli olduğu tespit edildi. Ayrıca 31 (% 88,5) *C. perfringens* izolatının 1'den fazla antibiyotiğe direnç gösterdiği belirlendi.

Çizelge 1. *C. perfringens* izolatlarının antibiyotik direnç profilleri

Antibiyotik	n (%)		
	Dirençli	Orta Dirençli	Duyarlı
Nalidiksik Asit	6 (17,1)	13 (37,1)	16 (45,7)
Penisilin	1 (2,8)	0	34 (97,1)
Gentamisin	22 (62,8)	4 (11,4)	9 (25,7)
Vankomisin	0	0	35 (100)
Kloramfenikol	0	4 (11,4)	31 (88,5)
Trimetoprim	35 (100)	0	0
Tetrasiklin	23 (65,7)	1 (2,8)	11 (31,4)
Ciprofloksasin	11 (31,4)	17 (48,5)	7 (20)
Ampisilin	1 (2,8)	0	34 (97,1)

n: izolat sayısı

İzolatların tamamının (% 100) dirençli olduğu antibiyotik trimetoprim olarak tespit edildi. Bu antibiyotik yanında, % 65,7 ile tetrasiklin, % 62,8 oranında gentamisin direncin yüksek oranda tespit edildiği diğer antibiyotikler olarak belirlendi. Elde edilen veriler izolatların hepsinin vankomisine duyarlı olduğunu da ortaya koydu (Çizelge 1).

Tartışma ve Sonuç

Kanatlı yetiştiriciliğinde antibakteriyel ilaçlar, hastalıkların tedavisi dışında koruyucu olarak ve verimi artırmak amacıyla da kullanılmaktadır. Bu amaçla düşük dozda, kısa süre uygulanan antibiyotikler, önemli bir halk sağlığı problemi olan antibiyotik direncine yol açmaktadır. Dirençli suşların hem kanatlılardan hem gıdalardan hem de insanlardan izole edildiği bildirilmektedir. *C. perfringens*'in de tetrasiklin başta olmak üzere kanatlı yetiştiriciliğinde kullanılan çeşitli antibiyotiklere karşı direnç gösterdiği bilinmektedir [15].

Silva ve ark. [20] yapmış oldukları çalışmada, kesimhanelerden alınan broyler bağırsaklarından izole edilmiş 55 *C. perfringens* izolatının antibiyotik direnç profilini belirlemiştir. İzolatların % 47,3'ü basitrasine, % 41,8'i tetrasikline dirençli bulunmuştur. Araştırılan antibiyotikler arasında en etkili olanlar ise penisilin, narasin ve monensin olarak saptanmıştır. Basitrasinin antikoksidial etkisinden dolayı, kanatlı yetiştiriciliğinde kullanımı yaygınlaşan bir antibiyotiktir. Bu nedenle direncin bu antibiyotikte yüksek olduğu düşünülmektedir.

Watkins ve ark. [24]'in araştırmasında da broyler kümelerinden elde edilen *C. perfringens* izolatları antibiyotik direnç yönünden değerlendirilmiştir. Benzer şekilde en yüksek direncin basitrasinin ve linkomisininde tespit edildiği bildirilmiştir. Linkomisinin, kanatlılarda nekrotik enteritise bağlı ölümleri engellemek için koruyucu amaçla kullanıldığı bilinmektedir.

Johansson ve ark. [10] Danimarka, Norveç ve İsveç'te tavuklardan izole edilen 102 *C. perfringens* izolatının, yetiştiricilikte kullanılan 8 farklı antibakteriyel ve antikoksidial karşı direncini araştırmıştır. Bu çalışmayla benzer olarak izolatların duyarlı olduğu antibiyotikler arasında eritromisin ve vankomisin yer almıştır. Antikoksidial ve anticlostridial etkilerinden dolayı bu ülkelerde sıklıkla kullanılan

narasine karşı henüz bir direnç tespit etmediklerini bildirmişlerdir. Tetrasiklin direnci ise İsveç'te % 76, Danimarka'da % 10 ve Norveç'te % 29 oranında tespit edilmiştir. Belçika'da Martel ve ark. [13]'ün yapmış olduğu benzer bir çalışmada da, 31 farklı çiftlikteki broylerlerden elde edilen izolatların, monensin ve narasin gibi antikoksidallere duyarlı olduğu, oksitetrasiklin ve klortetrasikline karşı % 66 oranında direnç gösterdiği bildirilmiştir.

Singh ve ark. [21]'nin çalışmasında bufalo, keçi ve tavuk etlerinden izole edilmiş *C. perfringens* suşlarının 16 farklı antibiyotiğe direnci araştırılmıştır. Diğer çalışmalardan farklı olarak bu izolatların en duyarlı olduğu antibiyotikler siprofloksasin (% 96,9) ve ofloksasin (% 87,8) olarak belirlenmiş ve bunları % 71 ile tetrasiklin izlemiştir. İncelenen bütün suşların streptomisin ve seftazidim'e karşı dirençli olduğu da ortaya konmuştur. Khan ve ark. [11]'nin yapmış olduğu benzer bir çalışmada da koyun, sığır ve tavuk etlerinden elde edilen *C. perfringens*'lerin antibiyotik dirençlilikleri araştırılmıştır. Toksin oluşturma yeteneğine sahip 6 izolatın hepsinin kloramfenikol, siprofloksasin, metranidazol ve ceftriaksona duyarlı olduğu, 5 tanesinin amoksisiline, 2'ser tanesinin amoksisilin ve vankomisine dirençli olduğu ortaya konmuştur. Her iki çalışmada da antibiyotik dirençlilik hayvan türleri arasında ayrılmadan belirtilmiştir, direnç profilinin farklılığının bundan ve ülkeler arası antibiyotik seçiminden ileri geldiği düşünülmektedir.

Tansuphasiri ve ark. [22] çalışmalarında insanlardan, hayvanlardan ve gıdalardan izole ettikleri *C. perfringens* suşlarının direnç profillerini karşılaştırmıştır. İnsanlardan izole edilen suşlarda en yüksek direnç % 44,9 ile tetrasiklinde görülmüştür. Buna paralel bir şekilde gıda örneklerindeki izolatlar içerisinde en yüksek direnç % 28 ile tetrasikline karşı tespit edilmiştir.

Çalışmada elde edilen izolatların, antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesiyle, büyük bir kısmının bir veya birden fazla antibiyotiğe direnç gösterdiği saptanmıştır. Bu durum, antibiyotik kullanımını sonucu mikroorganizmalarda gelişen direncin takip edilmesi ve dirençli suşların gelişmesinin önlenmesi amacıyla gıda üretiminde kullanılan hayvanlarda profilaktik ve büyütme faktörü olarak antibiyotik kullanımına ilişkin yasal düzenlemelere bağlı kalınmasının ve resmi otorite tarafından ulusal

kalıntı izleme programının etkin olarak yürütülmesinin ne kadar önemli olduğunu ortaya koymuştur.

Kaynaklar

1. Anonim, (2003). CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria, Volume 24 Number 2 ISSN 0273-3099 Approved Standard-Sixth Edition. M11-A6 Pennsylvania. USA.
2. Bhunia AK, (2008). Foodborne Microbial Pathogens. Mechanisms and Pathogenesis. New York: Springer Publishing, p. 158.
3. Bogaard AE, Stobberingh EE, (1999). Antibiotic usage in animals impact on bacterial resistance and public health. *Drugs*. 58(4), 589-607.
4. Capita R, Alonso-Calleja C, (2013). Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Critical Rev Food Sci Nut*. 53(1), 11-48.
5. Casewell M, Friis C, Marco E, McMullin P, Phillips I, (2003). The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *J Antimicrob Chemother*. 52, 159-161.
6. Ellie JC, Goldstein MD, Diane M, (2011). Resistance trends in antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria, part 1. *Clin Microbiol Newsl*. 33(1), 1-8.
7. Erol İ, (2007). Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. Ankara: Pozitif Matbaacılık, p.154.
8. Gaskins HR, Collier CT, Anderson DB, (2002). Antibiotics as growth promotants: mode of action. *Anim Biotechnol*. 13(1), 29-42.
9. Hecht DW, Vedantam G, Osmolski JR, (1999). Antibiotic resistance among anaerobes: what does it mean?. *Anaerobe*. 5, 421-429.
10. Johansson A, Greko C, Engström BE, Karlsson M, (2004). Antimicrobial susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish isolates of *Clostridium perfringens* from poultry, and distribution of tetracycline resistance genes. *Vet Microbiol*. 99, 251-257.
11. Khan M, Nazir J, Anjum AA, Nawaz M, Shabbir MZ, (2015). Toxinotyping and antimicrobial susceptibility of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolates from mutton, beef and chicken meat. *J Food Sci Tech*. 52(8), 5323-5328.
12. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N, Greko C, (2013). Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect Dis*, 13(12), 1057-1098.
13. Martel A, Devriese La, Cauwerts K, De Gussem K, Decostere A, Haesebrouck F, (2004). Susceptibility of *Clostridium perfringens* strains from broiler chickens to antibiotics and anticoccidials. *Avian Pathol*. 33(1), 3-7.
14. McDermott PF, Zhao S, Wagner DD, Simjee S, Walker RD, White DG, (2002). The food safety perspective of antibiotic resistance. *Anim Biotech*. 13(1), 71-84.

15. McEwen SA, Fedorka-Cray PJ, (2002). Antimicrobial use and resistance in animals. Clin Infect Dis. 34(3), 93-106.
16. Novak JS, Juneja VK, (2002). *Clostridium perfringens*: hazards in new generation foods. Innov Food Sci Emerg. 3(2), 127-132.
17. Nowell VJ, Poppe C, Parreira VR, Jiang Y, Reid-Smith R, Prescott JF, (2010). *Clostridium perfringens* in retail chicken. Anaerobe. 16, 314-315.
18. Rasmussen BA, Bush K, Tally FP, (1997). Antimicrobial resistance in anaerobes. Clin Infect Dis. 24(1), 110-120.
19. Rood JI, Maher EA, Somers EB, Campos E, Duncan CL, (1978). Isolation and characterization of multiply antibiotic-resistant *Clostridium perfringens* strains from porcine feces. Antimicrob Agents Chemother. 13(5), 871-880.
20. Silva ROS, Salvarani FM, Assis RA, Martins NRS, Pires PS, Lobato FCF, (2009). Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* strains isolated from broiler chickens. Braz. J Microbiol. 40(2), 262-264.
21. Singh RV, Bhilegaonkar KN, Agarwal RK, (2005). Studies on occurrence and characterization of *Clostridium perfringens* from select meats. J Food Safety. 25, 146-156.
22. Tansuphasiri U, Matra W, Sangsuk L, (2005). Antimicrobial resistance among *Clostridium perfringens* isolated from various sources in Thailand Southeast Asian. J Trop Med Public Health. 36(4), 954-961.
23. Teuber M, (1999). Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. Cell Mol Life Sci. 56, 755-763.
24. Watkins KL, Shryock TR, Dearth, RN, Saif, YM, (1997). In-vitro antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from commercial turkey and broiler chicken origin. Vet Microbiol. 54, 195-200.