

Tilmikosin ve Sefkuinomun Tek Başına ve Birlikte Kullanımının Bazı Kanatlı Patojenlerine Karşı *in vitro* Aktivitesi*

Seyyal AK

İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Avcılar, 34851, İstanbul - TÜRKİYE

Oya KELEŞ, Tülay BAKIREL

İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, 34851, İstanbul - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 25.08.2000

Özet: Tilmikosin ve sefkuinomun kanatlı orijinli *P. multocida* ve *O. rhinotracheale*'ye karşı *in vitro* antimikrobiyal etkileri seri dilüsyon şeklinde uygulanan broth makrodilüsyon yöntemi ile incelendi. Her iki antibiyotik yüksek düzeyde antimikrobiyal aktivite gösterdi. Sefkuinomun incelenen bakteriler için minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) 1.562 µg/ml tilmikosinin ise 0.78 µg/ml'dir.

Sefkuinom ve tilmikosinin birlikte kullanımının etkilerini araştırmak için kullanılan fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu (FİK) indeksi, checkerboard deneyi ile saptandı. Antimikrobiyal kombinasyon *P. multocida* (FIC=1) karşı aditif, *O. rhinotracheale*'ye (FIC=2) karşı ise aldırılmazlık şeklinde bir etkiye neden oldu.

Anahtar Sözcükler: Tilmikosin, sefkuinom, kombinasyon, *P. multocida*, *O. rhinotracheale*

In vitro Antibacterial Activities of Tilmicosin and Cefquinome Alone or in Combination Against Certain Poultry Pathogens

Abstract: The antimicrobial activities of cefquinome and tilmicosin were determined *in vitro* against *P. multocida* and *O. rhinotracheale* of poultry origin by serial broth macrodilution. Both antibiotics exhibited good *in vitro* antibacterial activity against the strains tested. The minimum inhibitory concentration (MIC) for cefquinome was 1.562 µg/ml and for tilmicosin was 0.78 µg/ml for both microorganisms. To investigate the effects of a combination of cefquinome and tilmicosin, the fractional inhibitory concentration (FIC) index was determined by checkerboard assay. The antimicrobial combination was additive against *P. multocida* (FIC=1) and indifferent against *O. rhinotracheale* (FIC=2).

Key Words: Tilmicosin, cefquinome, combination, *P. multocida*, *O. rhinotracheale*

Giriş

Pasteurellosis kanatlı yetiştiriciliğinde tartışılmaz ölçüde büyük ekonomik kayıplara neden olan bakteriyel bir infeksiyon olup etiyolojisinde rol oynayan *P. multocida*, sağlıklı hayvanların sindirim sisteminin yanısıra % 50 den daha yüksek düzeylerde üst solunum yollarında fakültatif olarak lokalize olur. Stres koşullarına bağlı olarak doğal direncin kırıldığı durumlarda etken, çeşitli sistemlere yayılarak perakut, akut, septisemik ve kronik formda bulaşıcı ve öldürücü nitelik taşıyan bu hastalığa yol açar (1,2). Pasteurellosisin sağaltımında birçok antibiyotik kullanılmakla beraber bu alanda yeni denenen ve kanatlı yetiştiriciliğinde de kullanıma giren bileşiklerden

biri olan tilmikosin, üstün farmakokinetik özellikleri ve *in vitro* antibakteriyel aktivitesi ile sağaltıcı etkisinin yanısıra koruyucu olarak işlev görmektedir (3,2). Tilmikosin, yine makrolit grubu bir bileşik olan tilosinin Gram pozitif bakteri ve mycoplasmalara yönelik etki spektrumunu genişletmek amacıyla molekül yapısında değişiklik yapılarak elde edilmiş ve Pasteurellalara karşı seçkin bir aktivite kazanmıştır. Pasteurella türlerine karşı tilmikosinin minimum inhibitör konsantrasyonunun (MİK) düşük oluşuna bağlı olarak bu bakterilerin duyarlı olduğu bildirilmekte ve direnç gelişiminin de gözardı edilmemesi gerektiği vurgulanmaktadır (3,4,5). Yapılan bir araştırmada tilmikosinin subletal yoğunluklarını içeren

* Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonunca Desteklenen 1289/050599 no'lu proje kapsamında içerisinde gerçekleştirilmiştir.

besiyerinde, bakterinin seri şekilde 15 kez pasaj yapılması sonucunda aşamalı olarak MİK değerinde 4 kez yükselme saptanmıştır (4). Tilmikosine karşı direnç gelişiminin başka bir boyutu ise makrolit grubu diğer bileşiklere dirençli suşların gelişmesi ile ilişkilidir. Çapraz nitelik gösteren bu durum; bir çok bakteri türünün metilaz salgılaması sonucu 50S alt biriminin bir ögesinin metilasyonundan kaynaklanan plazmid aracılı bir direnç şeklinde olup sonuçta tilosin ve eritromisine dirençli hale gelen patojen etkenler analog olan tilmikosine de direnç kazanabilmektedir. Bu nedenlere bağlı olarak patojen bakterilerin dirençli alt popülasyonlarının gelişimini önlemek ve geciktirmek amacıyla antibiyotiklerin bir arada kullanımı önerilmekte ve özellikle eritromisin ve benzeri makrolitlerin tek başına kullanımlarından kaçınılması gerektiği bildirilmektedir (6,7,8). Yine tilmikosinin sağaltım dozlarında bakteriyostatik bir bileşik olmasına bağlı olarak çabuk bakterisit etki gelişiminin istendiği durumlar için de etkin bir kombinasyon oluşturma gerekliliği duyulmuştur. Bu nedenle araştırmamızda bakterisit etkiye sahip 4. kuşak sefalosporinlerden olan sefkuinom ile kombinasyonu denenmiştir. Bu bileşiğin kullanım alanı sığır yetiştiriciliği ile sınırlı olmasına rağmen solunum sistemi patojenlerine karşı aktivitesi ve bronşiyal sekresyondaki yoğunluklarının seruma oranla yüksek oluşu gibi faktörlerden (9,10) dolayı kanatlılarda da kullanımının söz konusu olabileceği düşünülerek etkinliği değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda incelenen diğer patojen ise son yıllarda önem kazanan ve 1994 yılına kadar Pasteurella-like adıyla bilinen *O. rhinotracheale*'dir. Hindi ve broylerler başta olmak üzere kanatlı türlerinde solunum sistemi hastalıklarının yanısıra büyümenin yavaşlaması ve ölüm oranının artmasıyla karakterize bir enfeksiyona yol açar. *O. rhinotracheale*'ye karşı yukarıda bildirilen antibakteriyel ajanların etkinliği tam bilinmemekle beraber sabit bulgulardan biri yaygın kullanımdaki bileşiklerden birçoğuna duyarlı olduğudur. Bununla birlikte edinsel direnç gelişiminin çok yaygın olduğu da kaçınılmaz bir gerçektir (11,12). Bu gerekçelere bağlı olarak bu çalışmada tilmikosin ve sefkuinomun kanatlı orijinli *P. multocida* ve *O. rhinotracheale*'ye karşı bireysel etkinliklerinin yanısıra kombinasyonun da etkisi incelendi.

Materyal ve Metot

Standart suşlar: *P. multocida* ve *O. rhinotracheale* standart suşları kullanıldı. *P. multocida* suşu Dr. Pat

Blackall, Avustralya'dan, *O. rhinotracheale* suşu Dr. P. C. M. van Empel, Hollanda'dan sağlandı.

Antibiyotik standartları: Tilmikosin (Lilly com., Avusturya) ve Sefkuinom (Hoechst AG, Frankfurt) standartı kullanıldı.

Besiyerleri: Minimum inhibitör yoğunluğun (MİK) ve antibiyotik kombinasyonlarının etkinliğinin saptanmasında *P. multocida* için katyon ilave edilmiş Mueller-Hinton Broth (13) ve *O. rhinotracheale* için peptonlu su (14) besiyerleri kullanıldı.

İnhibisyon Testleri (MİK): MİK testleri broth makrodilüsyon tekniği ile ve her test iki kez tekrarlanarak NCCLS'ye göre yapıldı (15). Sıvı besiyerlerinde antibiyotiklerin, 200 µg/ml'den başlayarak 0,012µg/ml yoğunluğa kadar seri şekilde iki kez dilüsyonları yapıldı. Bakteriyel inokulumların son yoğunluğu yaklaşık 10⁵ cfu/ml olacak şekilde hazırlandı. MİK değeri, bakteriyel üremenin gözle görülebilir düzeyde inhibe edildiği en düşük antibiyotik yoğunluğu olarak belirlendi.

Antibiyotik kombinasyonlarının etkinliğinin saptanması: Tilmikosin ve sefkuinomun birarada kullanımının etkinliği ise broth makrodilüsyon tekniği kullanılarak checkerboard titrasyonu ile incelendi (16). Antagonist etki olasılığı için antibiyotiklerin MİK değerlerinin dört katı daha yüksek yoğunluklardan başlayarak sulandırılmaları yapıldı ve testler, MİK saptanmasında kullanılan inokulumla iki kez tekrarlanarak gerçekleştirildi. Etkileşimin türü, Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon (FİK) indeksi esas alınarak tanımlandı. Etkileşim dinamiğinin göstergesi olarak bildirilen bu indeks, iki antibiyotiğin bireysel FİK'nunun toplamından oluşmaktadır. FİK ise kombinasyon halinde kullanıldığı zaman elde edilen MİK değerlerinin (A veya B) bireysel MİK (MİK_A veya MİK_B) değerlerine oranıdır. Bu durumda FİK indeksi $A/MİK_A + B/MİK_B$ olarak formüle edilmektedir.

Hesaplanan sonuçların değerlendirilmesinde aşağıda bildirilen kriterler kullanıldı (16).

FİK indeksi ≤0,5 ise sinerjik

FİK indeksi >0,5 ile ≤1,0 ise aditif

FİK indeksi >1,0 ile ≤2 ise aldırılmazlık

FİK indeksi >2 ise antagonist

Araştırmamızda kullanılan diğer bir sınıflandırma ise kombinasyonda yer alan bileşiklerin MİK 'larına göre yapıldı (17).

Her iki antibiyotiğin MİK'nun 4 kat veya daha fazla azalması sinerjik,

Her iki antibiyotiğin MİK'nun 2 kat azalması aditif,
Her iki antibiyotiğin MİK'nun değişmemesi aldirmazlık,

Her iki antibiyotiğin MİK'nun 2 kat artması antagonist etkiye yol açar.

Bulgular

Duyarlılık test sonuçlarında tilmikosinin *P. multocida* ve *O. rhinotracheale*'ye karşı yüksek düzeyde in vitro antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu görüldü. Her iki bakteri için MİK'u 0,78 µg/ml olarak belirlendi. Sefkuinomun ise hem *P. multocida* hem de *O. rhinotracheale* için duyarlılığı tilmikosine göre düşük bulundu ve MİK, iki bakteri için de 1,562 µg/ml olarak saptandı.

Tilmikosin ve sefkuinomun birarada kullanımının *P. multocida* üzerine etkisi incelendiğinde bireysel MİK değerlerinde iki kat azalma görüldü. Tilmikosin ve sefkuinomun MİK değerleri sırasıyla 0,78 ve 1,562 µg/ml iken birarada kullanımları ile tilmikosinin MİK'i 0,39 µg/ml'ye sefkuinomun ise 0,78 µg/ml'ye düştü. Bu sonuçlara göre FIK indeksi 1 olarak saptandı ve kombinasyonun *P. multocida* için aditif etkili olduğu belirlendi. Aynı antibiyotik kombinasyonlarının *O. rhinotracheale* üzerindeki etkisinin denenmesi ile her iki bileşiğin MİK değerlerinde değişiklik saptanmadı. Birarada kullanım sonucunda tilmikosinin MİK' u 0,78 µg/ml, sefkuinomun ise 1, 576 µg/ml olarak bulundu ve *O. rhinotracheale* için aldirmazlık şeklinde etki görüldü (FIK indeksi =2)

Tartışma

Tilmikosin ve sefkuinomun önemli enfeksiyon etkenleri olan *P. multocida* ve *O. rhinotracheale* üzerine bireysel etkilerini doğru olarak saptamak ve antibiyotik kombinasyonlarının olası yararlılığını belirlemek için bakterilerin referans suşları ile çalışıldı.

Antibakteriyel etkinliğin nicel değerlendirilmesini sağlayan MİK, aynı zamanda dozun hesaplanmasında önceliği olan bir kriterdir. MİK saptamak için kullanılan makrodilasyon broth yöntemi ise diğer duyarlılık yöntemlerine göre daha kolay uygulanabilme, çabuk sonuç verme, hem yavaş hem de hızlı üreyen bakterilere uygulanabilme gibi avantajlara sahiptir (18).

Tilmikosine karşı kanatlı kökenli *P. multocida* isolatlarının duyarlılığını saptamak amacıyla yapılan araştırmalarda agar ve broth mikrodilasyon yöntemleri kullanılmış ve MİK ≤ 6,25 µg/ml olarak bulunmuştur. İn vitro bulguların yanısıra kanatlılarda deneysel Pasteurella enfeksiyonlarını da başarılı bir şekilde kontrol altına alması bu bakteriye karşı duyarlılığı kanıtlamıştır (3,4). Bu çalışmada MİK'nun daha düşük oluşu kullanılan süşun duyarlılığını göstermekle beraber saptama yöntemlerinin farklılığına bağlı olabilir; makrodilasyon yöntemi ile kıyaslandığında mikrodilasyon yönteminde üremenin en az olduğu duyarlılık noktasının kolaylıkla gözlenememesi ve inokulum yoğunluğunun daha düşük oluşu gibi nedenler sonuçların farklı oluşunu açıklayabilir (18).

Sefkuinomun sığırlardan izole edilen Pasteurella türlerine karşı MİK değerinin 2 µg/ml den daha düşük olduğu bildirilmektedir (19). Araştırmamızda kullanılan kanatlı kökenli *P. multocida* 'nın duyarlılığı da aynı sınırlar içinde yer almaktadır. *O. rhinotracheale*'nin ise son yıllarda identifiye edilen bakteri olmasına bağlı olarak duyarlılığı ile ilgili çok az çalışma yapılmıştır. Buna rağmen yayınlanmış bir araştırmada mikroorganizmanın β laktamaz ürettiği ve bu özelliğine bağlı olarak dirençli türlerin sadece sefalosporinlere duyarlı olabildiği bildirilmiştir. Direnç kazanmamış türlerin ise makrolit grubu da dahil olmak üzere birçok antibiyotikden etkilendiği vurgulanmıştır (11). Bu araştırmada sefkuinomun gerek *O. rhinotracheale* gerekse *P. multocida* üzerindeki MİK değerlerine bağlı olarak, bu bakterilerin sefkuinoma duyarlı olduğu belirlenmiştir. Sefkuinomun Gram negatif bakterilere karşı bu duyarlılığının, sefalosporin çekirdeğinin açıl yan zincirine aminothiazol metoxy iminoacetamide grubunun eklenmesinden kaynaklandığı bildirilmektedir (10).

Antibiyotiklerin bireysel etkilerinin yanısıra birarada kullanımları ile *P. multocida* üzerine aditif, *O. rhinotracheale*'ye ise aldirmazlık şeklinde etkileşme gösterdikleri belirlendi. Manten ve Wisse tarafından yayınlanan çizelgede, etkileri incelenen bileşiklerin ait oldukları makrolit ve sefalosporin grubunun birarada kullanımının antagonist etkiye neden olduğu bildirilmiştir. Diğer bir sınıflama şeklinde ise antibiyotikler bakteriyostatik ve bakterisit olarak iki gruba ayrılmıştır. Bakteriyostatik etkili makrolitler ile bakterisit etkili sefalosporinlerin birarada kullanımlarının genellikle antagonizmaya ve çok seyrek olarak sinerjizmaya neden olabileceği belirtilmiştir. Etkileşim mekanizmasına yönelik

incelemelerde sefalosporinler gibi bakteri hücre duvarının sentezini inhibe eden ilaçların etkisinin, protein sentezini inhibe eden ilaçlar tarafından engellendiği ve bu durumun mukopeptidazların sentezinin bozulmasından kaynaklanabileceği saptanmıştır. Ayrıca sefalosporinlerin etkisi ile hücre duvarı sentezinin engellenmesi ve duvarsız kalan bakterilerin protein sentezini inhibe eden ilaçlar tarafından gelişip parçalanamamaları ile de antagonizma geliştiği ileri sürülmektedir (6,7,8). Buna karşın β laktamazların protein yapısında olmasından dolayı protein sentezini inhibe eden ilaçların β laktamaz üretimini de inhibe edebildiği bu durumda β laktamlar ile sinerjik etkileşime neden olabildiği ileri sürülmektedir (20). Bu çalışmada antagonist yada sinerjik etkiden farklı olarak aynı kombinasyon, iki ayrı bakteri üzerinde farklı

etkileşime neden olmuştur. Bu durumun bakteri türlerinin farklı oluşu ile ilgili olduğu düşünülmüştür. Yapılan araştırmalarda iki antibiyotik arasındaki etkileşimin ortamdaki konsantrasyonlarına ve bakteri türlerine bağlı olarak değiştiği ve aynı kombinasyonun bazı bakteri türlerine sinerjik bazılarında da antagonist olarak etki ettiği bildirilmiştir (7).

Sonuç olarak tilmikosin ve sefkuinomun birarada kullanımı, *P. multocida*'ya bağlı infeksiyonlarda alternatif bir sağaltım seçeneği olabileceği belirlenmiştir. *O. rhinotracheale*'den ileri gelen infeksiyonlarında ise aldırılmazlık şeklindeki etkinin sonucu olarak sağaltım maliyeti ile ilişkili ekonomik kayıpların yanısıra toksisite oranını da yükseltebileceğinden yararlı bir uygulama olarak görülmemiştir.

Kaynaklar

1. Arda, M. ve ark: Kanatlı Hayvan Hastalıkları. Medisan yayın serisi,1990.No: 14, 86-89.
2. McKay, S.G., Morck, D.W., Merrill, J.K., Olson, M.E., Chan, S.C., Pap, K.: Use of tilmicosin for treatment of pasteurellosis in rabbits. AJVR, 1996; 57, 8, 1180-1184.
3. Kirst, H.A., Ose, E.E., Toth, J.E., Willard, K.E., Debone, M., Felty-Duckworth, A.M., Pekarek, R.S.: In vitro and in vivo evaluations of C-20- and C-23- modified derivatives of tylosin against veterinary pathogens. The Journal of Antibiotics, 1988; 41, 7, 938-948.
4. Ose, E. E.: In vitro antibacterial properties of EL-870, a new semi-synthetic macrolide antibiotic. The Journal of Antibiotics,1987; 40, 2, 190-194.
5. Ose, E.E., Tonkinson, L.V.: Single-dose treatment of neonatal calf pneumonia with the new macrolide antibiotic tilmicosin. The Veterinary Record, 1988; 1, 123, 367-369.
6. Kaya, S.: Kemoterapötikler. In: S.KAYA, İ.PİRİNÇÇİ, A.BİLGİLİ, Veteriner Uygulamalı Farmakoloji., cilt 2, s. 283-398. Medisan Yayın serisi No: 28, 1997; ANKARA
7. Kayaalp, O.: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 1.cilt, 7.nci baskı, Feryal matbaacılık,1994.
8. Şanlı, Y.: Veteriner Klinik Farmakoloji ve ilaçla sağaltım ilkeleri. Medisan Yayınevi, 1999, Ankara.
9. Barker, S., Kappel, L.C., Short, C.R.: Tissue distribution and clearance of cefquinome in the bovine. Proceedings XVIII World Buiatric Congress, Bologna:1994.
10. Limbert, M., Isert, D., Klesel, N., Markus, A., Seeger, K., Seibert, G., Schrunner, E.: Antibacterial activities in vitro and in vivo and pharmacokinetics of cefquinome. a new broad-spectrum cephalosporin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1991; 35, 1, 14-19.
11. Devriese, L.A., Hommez, J., Vandamme, P., Kersters, K., Haesebrouck F.: In vitro antibiotic sensitivity of Ornithobacterium rhinotracheale strains from poultry and wild birds. Veterinary Record, 1995; 21, 435-436.
12. Empel, P. Van., Bosch, H. Van. Den., Loeffen, P.: Identification and serotyping of *O. rhinotracheale*. J. Clin. Microbiol., 1997; 35: 2, 418-421.
13. Isenberg, H.D.: Clinical Microbiology Procedures Handbook. Vol. 1, American Society for Microbiology 1325 Massachusetts,1992.
14. Hafez, H.M.: Current status of the laboratory diagnosis of *Ornithobacterium rhinotracheale* "ORT" in poultry. Berl. Münch. Tierarztl. Wschr., 1998; 111,143-145.
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Eighth informational supplement. NCCLS document M 100-S7, vol. 17 No 1 and No 2, 1997 National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
16. Eliopoulos, G.M., Moellering R.C.: Antimicrobial combinations. In: Lorian, V. (Editor), Antibiotics in laboratory medicine. Williams and Wilkins, Baltimore, USA, 1991; 432-492.
17. Jones, R.N., Johnos D.M.: Combinations of orally administered B-lactams to maximize spectrum and activity against drug-resistant respiratory tract pathogens: I. synergy studies of amoxicillin and cefixime with *S.pneumoniae*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 1998; 31, 373-376.
18. Amsterdam, D.: Susceptibility testing of antimicrobials in Liquid Media. In: Lorian, V. (Editor), Antibiotics in laboratory medicine. Williams and Wilkins, Baltimore, USA, 1991; 53-105.
19. Böttner, A., Schmid, B., Humke, R.: In vitro efficacy of cefquinome and other antiinfective drugs against bovine bacterial isolates from Belgium, France, Germany, Netherlands and United Kingdom. J. Vet. Med., 1995; 42, 377-383.