Türkiye’deki Bir Üniversite Eğitim ve Araştırma Hastanesinde Elde Edilen Toksik Clostridioides difficile İzolatlarına Antimikrobiyallerin İn Vitro Etkisi

In Vitro Activities of Antimicrobials Against Toxigenic Clostridioides difficile Isolates Obtained in a University Training and Research Hospital in Turkey

Elvan SAYIN¹(ID), Hüseyin BİLGİN²(ID), Güner SÖYLETİR³(ID), Nurver ÜLGER TOPRAK³(ID)

¹ Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul.

¹ Marmara University Pendik Training and Research Hospital, Microbiology Laboratory, Istanbul, Turkey.

² Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

² Marmara University Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

³ Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

³ Marmara University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.

* Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-TUP-110915-0424 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Makale Atfı: Sayın E, Bilgin H, Söyletir G, Ülger Toprak N. Türkiye’deki bir üniversite eğitim ve araştırma hastanesinde elde edilen toksijenik Clostridioides difficile izolatlarına antimikrobiyallerin in vitro etkisi. Mikrobiyol Bul 2020;54(3):368-377.

ÖZ

Zorunlu anaerop, gram-pozitif sporlu bir basil olan *Clostridioides difficile*, eski taksonomiye göre *Clostridium difficile*, antibiyotik ilişkili diyarenin en önemli etkenidir. *C.difficile* enfeksiyonları birçok ülke için önemli bir sağlık problemi haline almıştır. Dünya genelinde antibiyotiklere dirençli *C.difficile* izolatlarının oranı hızla artmaktadır. Ancak bu konuda ülkemize ait sınırlı veri bulunmaktadır. Bu çalışmada Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilmiş dışkı örneklerinde üretilen *C.difficile* izolatlarının antibiyotiklere duyarlılık profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Serojik ve moleküler yöntemlerle toksijenik olduğu saptanan toplam 93 *C.difficile* izolatı çalışmaya alınmıştır. İzolatların antibiyotik duyarlılık paternleri “Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; M11-A7)” önerileri doğrultusunda agar dilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. *C.difficile* enfeksiyonlarının tedavisinde öncelikle tercih edilen antimikrobiyaller ile birlikte geçmiş epidemiyolojik çalışmalarda yer alan toplam 12 antibiyotik (metronidazol, vankomisin, meropenem, seftriakson, ampicilin-sulbaktam, klindamisin, eritromisin, moksifloksasin, tetrasiklin, doksisisiklin, tigesiklin ve linezolid) test edilmiştir. Minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)” tarafından önerilen sınır değerlere göre yorumlanmıştır. EUCAST rehberinde sınır değerleri bulunmayan seftriakson, klindamisin, tetrasiklin ve moksifloksasin için CLSI tarafından önerilen sınır değerler dikkate alınmıştır. EUCAST ve CLSI rehberlerinde sınır değerleri bulunmayan linezolid, eritromisin, doksisisiklin için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri belirlenmiştir. İzolatların tamamı metronidazol, vankomisin, ampicilin-sulbak-

tam, tetrasiklin ve meropeneme duyarlı bulunmuştur. Seftriakson, klindamisin ve moksifloksasine duyarlılık ise sırasıyla %58.1, %35.5 ve %20.4 oranlarında saptanmıştır. MIC_{50} ve MIC_{90} değerleri tigesiklin, eritromisin, linezolid, doksisisiklin için sırasıyla 0.125-0.25 mg/L, 1-2 mg/L, 2-2 mg/L, 0.062-0.125 mg/L olarak tespit edilmiştir. Bu çalışma, hastanemizdeki *C.difficile* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık paternlerini göstermesinin yanı sıra, ülkemizde rutin uygulamada anaerobik kültür ve antibiyotik duyarlılık testlerinin çalışılmadığı klinik mikrobiyoloji laboratuvarları için de veri kaynağı olacaktır. Sonuç olarak, *C.difficile* enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın kullanılan iki ana antibiyotik ilacın; metronidazol ve vankomisin etkili olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, test edilen diğer bazı antibiyotiklere karşı yüksek direnç varlığı, direnç gelişimini yakından takip etmek için surveyans çalışmalarının gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler: *Clostridioides difficile*; antibiyotik duyarlılık; metronidazol; vankomisin.

ABSTRACT

Clostridioides difficile, a gram-positive, anaerobic, spore forming bacillus known as *Clostridium difficile* according to the previous taxonomy, is the most important agent of antibiotic-associated diarrhea. *C.difficile* infections have become a major health problem for many countries. The rate of antimicrobial resistant *C.difficile* isolates is rapidly increasing all around the world. Yet there is limited data on this subject in our country. The aim of this study was to determine the antimicrobial susceptibility profiles of *C.difficile* strains isolated from stool samples in Marmara University Pendik Training and Research Hospital Microbiology Laboratory. A total of 93 toxigenic *C.difficile*, defined by serological and molecular techniques, were included in this study. Antimicrobial susceptibility profiles of isolates were determined by using agar dilution method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; M11-A7). The following antimicrobials commonly used for the treatment of *C.difficile* infections or applied previously in *C.difficile* epidemiological studies were tested: metronidazole, vancomycin, meropenem, ceftriaxone, ampicillin-sulbactam, clindamycin, erythromycin, moxifloxacin, tetracycline, doxycycline, tigecycline and linezolid. The minimum inhibitory concentration (MIC) results were interpreted according to the breakpoints described by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoints recommended by CLSI were applied for ceftriaxone, clindamycin, tetracycline and moxifloxacin since there were no EUCAST breakpoints for these antimicrobials. MIC_{50} and MIC_{90} values were determined for three antimicrobials (linezolid, erythromycin, doxycycline) whose breakpoints were not described by EUCAST or CLSI guidelines. All isolates were susceptible to metronidazole, vancomycin, ampicillin-sulbactam, meropenem and tetracycline. Susceptibility to ceftriaxone, clindamycin and moxifloxacin was found in 58.1%, 35.5% and 20.4% of the isolates, respectively. MIC_{50} and MIC_{90} values of tigecycline, erythromycin linezolid, doxycycline were 0.125-0.25 mg/L, 1-2 mg/L, 2-2 mg/L, 0.062-0.125 mg/L, respectively. This study shows the current antimicrobial susceptibility patterns of *C.difficile* isolates in our hospital and will also be the reference data for clinical laboratories in our country where anaerobic culture and susceptibility tests are not performed in routine practice. In conclusion, two main antimicrobial agents commonly used in the treatment of *C.difficile* infections, metronidazole and vancomycin, seem to be effective. However, high resistance rates against to the certain tested antimicrobials highlight the need for further surveillance to monitor the emergence of resistance.

Keywords: *Clostridioides difficile*; antimicrobial susceptibility; metronidazole; vancomycin

GİRİŞ

Clostridioides difficile, eski adlandırmaya göre *Clostridium difficile*, antibiyotik ilişkili diyare (AİD)'nin en önemli ve en sık rastlanan etkenidir. Toksikjenik *C.difficile* izolatlarıyla kolonize olmuş, çoğunlukla antimikrobiyal ilaç kullanımı ile bağırsak mikrobiyotasi bozulmuş hastalarda kendiliğinden iyileşen diyareden, yaşamı tehdit eden psödomembranöz kolit, toksik megakolon ve bağırsak perforasyonuna kadar değişen klinik tablolar gelişebilmektedir¹.

Enfeksiyonların patogeneğinde, bakteri tarafından üretilen toksin A ve toksin B büyük rol oynamaktadır². Ayrıca son yıllarda, Kanada, Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve bir-

çok Avrupa ülkesinde, virülansı yüksek yeni *C.difficile* izolatlarına (varyant toksin veya bi-nary toksin üreten) bağlı AİD epidemileri tanımlanmıştır. Virülansı yüksek ribotip 027 ve 078 izolatlarının daha ağır seyirli, tekrarlayan ve ölümcül enfeksiyonlara neden oldukları saptanmıştır. Antibiyotik direnci bu epidemiyolojik değişikliklerin ve yeni tiplerin ortaya çıkmasında önemli paya sahiptir. Geçmişteki endemik durumlarda klindamisine dirençli izolatlar başrolü oynarken, günümüzde *C.difficile* enfeksiyonlarında florokinolonlara dirençli yeni tiplerin öne çıktığı gözlenmektedir. Florokinolonların yoğun kullanılmasının bu antibiyotiklere karşı direnç kazanan *C.difficile* ribotip 027 ve 078 suşlarının ortaya çıkmasını ve yayılmasını kolaylaştırdığı varsayılmaktadır^{3,4}. *C.difficile* enfeksiyonlarının standart antimikrobiyal ilaç tedavisinde ilk seçenek metronidazol veya vankomisindir⁴. Genel olarak bu antibiyotiklerle yapılan tedaviler başarılı sonuç vermektedir, ancak bazı ülkelerde metronidazole dirençli, vankomisine ise azalmış duyarlılık gösteren *C.difficile* izolatlarının varlığı gösterilmiştir^{6,7}. *C.difficile*'nin dirençli olduğu antibiyotiklerin kullanımı çoklu antibiyotik ilaç direnci gösteren izolatların seçilmesini kolaylaştırmaktadır. Epidemik suşların çok sayıda antibiyotiğe direnç gösteriyor olmaları, bunlara bağlı enfeksiyonların tedavisinde zorlukların yaşanmasına neden olmaktadır⁵. Başarılı bir tedavinin gerçekleştirilebilmesi için etken *C.difficile* izolatlarının duyarlılık profilinin bilinmesi gereklidir.

Ülkemizde çok az sayıda laboratuvar rutin olarak *C.difficile* kültürü yapılmaktadır, dolayısıyla bu mikroorganizmaların antibiyotiklere duyarlılıkları konusunda ülkemize ait çok az veri bulunmaktadır⁸⁻¹⁰. *C.difficile* izolatlarının duyarlılıklarını tespit etmek için agar dilüsyon yöntemi referans yöntemdir. Günlük laboratuvar işleyişinde uygulanması pek mümkün olmayan bu yöntem daha çok epidemiyolojik veri elde etmek amacıyla kullanılmaktadır. Hastalardan izole edilen patojenler toplanarak belli zaman aralıklarında duyarlılıklarının çalışılması önerilmektedir¹¹.

Bu çalışmada, Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesinde dört yılda üretilmiş patojen toksijenik *C.difficile* izolatlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 01.09.2015 ve Karar no: 70737436-050.06.04).

Clostridioides difficile İzolatları

Bu çalışmaya, 2012-2016 yılları arasında Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına dışkıda toksin varlığının test edilmesi amacıyla gönderilen veya dışkı kültürü öncesinde yapılan mikroskopik incelemede lökosit görülen klinik örneklerden elde edilen toksijenik *C.difficile* izolatları dahil edildi. Aynı dönem içinde aynı hastaya ait birden fazla dışkı örneğinde üreyen izolatlardan yalnız biri çalışmaya alındı. İki yaş altındaki hasta örneklerinden elde edilen izolatlar çalışma dışında bırakıldı. İzolatlar "Skim milk" besiyerinde -80°C'de saklandı.

Dışkı örnekleri doğrudan ve alkol şok işlemi uygulandıktan sonra sikloserin-sefoksitin-fruktoz agara (CCFA; BioMerieux, Fransa) ekilerek anaerop ortamda 48 saat süreyle inkübe edildi. Elde edilen zorunlu anaerop bakteriler VITEK MS® (bioMerieux, Fransa) sistemiyle tanımlandı. *C.difficile* olarak tanımlanan izolatlar beyin-kalp-infüzyon sıvı besiyerine (BHIB; Becton Dickinson, Almanya) ekilerek, anaerop ortamda beş gün inkübe edildikten sonra 3000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi ve üst sıvısı alınarak toksin varlığı VIDAS *C.difficile* Toxin A & B (BioMerieux, Fransa) kiti ile araştırıldı.

İzolatların DNA izolasyonu, *Brucella* agardaki taze kültürden "Ultraclean™ microbial DNA izolasyon kiti (Qiagen, Almanya)" ile gerçekleştirildi. Toksin A, toksin B ve "binary" toksin genleri, özgül primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle araştırıldı⁸ (Tablo I). Pozitif kontrol olarak toksin A ve B için *C.difficile* NCTC 11223 izolatı; binary toksin için *C.difficile* HU 10010 izolatı kullanıldı.

Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Serolojik testle pozitif bulunan, toksin A ve toksin B genlerine sahip olduğu, binary toksin geni barındırmadığı saptanan izolatlara antibiyotik duyarlılık testi uygulandı. "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" ve "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)" önerileri doğrultusunda 12 antibiyotik; metronidazol, vankomisin, meropenem, seftriakson, ampicilin-sulbaktam, moksifloksasin, klindamisin, eritromisin, linezolid, tigesiklin, tetrasiklin ve doksisisiklin olarak seçildi. CLSI (M11-A7) önerileri doğrultusunda; hemin, K vitamini ve %5 koyun kanı bulunduran *Brucella* agar kullanılarak agar dilüsyon yöntemi uygulandı. Taze kültürden 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonu 1/10 oranında seyreltilerek antibiyotik içeren *Brucella* agara ekildi ve plaklar anaerobik ortamda 37°C'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası üremenin inhibe olduğu en düşük konsantrasyon minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değeri olarak kabul edildi¹¹. İzolatların antibiyotiklere duyarlılık durumu EUCAST klinik sınır değerlerine göre yorumlandı¹². EUCAST klinik sınır değeri bulunmayan antibiyotikler için CLSI sınır değerleri kullanıldı. EUCAST ve CLSI'nın

Tablo I. *C.difficile* Toksin Genlerine Özgül Primerler ve Reaksiyon Koşulları

Primer	DNA dizisi	Reaksiyon koşulları
<i>TcdA</i> R	5'-GGAAGAAAAGAACTTCTGGCTCATCAGGT-3'	95°C'de 20 sn
<i>TcdA</i> Fw	5'-CCCAATAGAAGATTCAATATTAAGCTT-3'	56°C'de 2 dk
<i>TcdB</i> R	5'-CAC TTA GCT CTT TGA TTG CTG CAC CT-3'	72°C'de 1 dk
<i>TcdB</i> Fw	5'-GTG TAG CAA TGA AAG TCC AAG TTT ACG C-3'	74°C'de 5 dk
<i>CdtA</i> R	5'-AGG ATT ATT TAC TGG ACC ATT TG-3'	94°C'de 45 sn
<i>CdtA</i> Fw	5'-TGA ACC TGG AAA AGG TGA TG-3'	52°C'de 1 dk
<i>CdtB</i> R	5'-AAC GGA TCT CTT GCT TCA GTC-3'	75°C'de 80 sn
<i>CdtB</i> Fw	5'-CTT AAT GCA AGT AAA TAC TGA G-3'	

sınır değeri bildirmediği ancak direnç profili epidemiyolojik açıdan önem arz eden üç antibiyotik (linezolid, eritromisin, doksisisiklin) için $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerleri belirlendi. Antibiyotik duyarlılık yöntemi sırasında pozitif kontrol olarak *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 kullanıldı.

İstatistiksel Analiz

Yaş gruplarına (3-17 yaş, 18-64 yaş, 65 yaş ve üstü) göre antibiyotiklerin (moksifloksasin, klindamisin ve seftriakson) duyarlılık oranlarını değerlendirmek için üçten fazla bağımsız değişkenin karşılaştırıldığı analizde Kruskal Wallis varyans testi kullanıldı.

BULGULAR

Bu çalışmaya, dört yıllık zaman diliminde uygun dışkı örneklerinden izole edilen, toksijenik olduğu belirlenmiş olan, ayrıca aynı hastaya ait örneklerden izole edilen ancak izolasyon tarihleri arasında iki ay ya da daha fazla zaman farkı bulunan üç hastaya ait ikişer izolatın çalışmaya dahil edilmesi nedeniyle, toplam 90 hastadan elde edilen 93 toksijenik *C.difficile* izolat alınmıştır.

Çocuk yaş grubundaki hastaların %47.7 (n= 21)'si kız, %52.3 (n= 23)'ü erkek; erişkin yaş grubunda ise %58.7 (n= 27)'si kadın, %41.3 (n= 19)'ü erkek olarak belirlenmiştir.

C.difficile izolatlarının %19.4 (n= 18)'ü poliklinik, %80.6 (n= 75)'si ise yatan hastalardan elde edilmiştir. Yaş gruplarına göre hastaların dağılımları incelendiğinde izolatların 47 (%50.5)'si çocuk, 27 (%29)'si 18-64 yaş grubu erişkin hastalardan, 19 (%20.5)'ü ise 65 yaş ve üstü erişkin hastalardan üretilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen tüm izolatlar (n= 93) metronidazol, vankomisin, ampisilin-sulbaktam, tetrasiklin ve meropenem duyarlı bulunmuştur. Klindamisin, seftriakson ve moksifloksasine ise önemli oranda direnç tespit edilmiş, bu antibiyotiklere duyarlılık oranları sırasıyla, %35.5, %58.1 ve %20.4 olarak bulunmuştur.

EUCAST ve CLSI'da sınır değeri bildirilmeyen antibiyotiklerden tigesiklin, eritromisin, linezolid ve doksisisiklin için $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerleri sırasıyla, 0.125 ve 0.25 mg/L, 1 ve 2 mg/L, 2 ve 2 mg/L, 0.062 ve 0.125 mg/L olarak saptanmıştır. Test edilen 93 izolatın antibiyotik duyarlılıkları Tablo II'de gösterilmiştir.

En fazla direnç saptanan üç antibiyotiğe (seftriakson, moksifloksasin ve klindamisin) duyarlılık oranları, yaş gruplarına göre incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir.

TARTIŞMA

Bu çalışmada dört yıllık bir zaman diliminde laboratuvarımızda elde edilmiş toksijenik *C.difficile* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları saptanmıştır. İzolatlarımızın tamamı *C.difficile* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan ilk seçenek antibiyotikler olan metronidazol veya vankomisine duyarlı bulunmuştur. Klindamisin, seftriakson ve moksifloksasine ise önemli oranda direnç saptanmıştır. Moleküler test sonuçlarına göre izolatlarımızın

Tablo II. C. difficile İzolatlarının Antibiyotiklere Duyarlılık Profili, MİK Aralıkları, MİK₅₀ ve MİK₉₀ Değerleri ve Klinik Sınır Değerler

Antimikrobiyal ilaç	Klinik sınır değerler (mg/L)			MİK aralıkları (mg/L)	MİK ₅₀ (mg/L)	MİK ₉₀ (mg/L)	Duyarlılık profili n (%)		
	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli				Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
Metronidazol	≤ 4		> 4	0.125-1	0.5	0.5	93 (100)	0	0
Vankomisin	≤ 2		> 2	0.125-1	0.25	0.5	93 (100)	0	0
Meropenem	≤ 2		> 8	0.5-2	2	2	93 (100)	0	0
Ampisilin sulbaktam	≤ 4		> 8	0.25-2	1	2	93 (100)	0	1
Seftriakson*	≤ 16	32	≥ 64	4-64	16	32	54 (58.1)	37 (39.8)	2 (2.1)
Tetrasiklin*	≤ 4	8	≥ 16	0.125-0.5	0.25	0.5	93 (100)	0	0
Moksifloksasin*	≤ 2	4	≥ 8	2-64	4	4	19 (20.4)	71 (76.3)	3 (3.3)
Klindamisin*	≤ 2	4	≥ 8	1-> 256	4	8	33 (35.5)	40 (43)	20 (21.5)
Tigesiklin	-	-	-	0.062-0.25	0.125	0.25	-	-	-
Eritromisin	-	-	-	0.5-> 64	1	2	-	-	-
Linezolid	-	-	-	0.5-4	2	2	-	-	-
Doksisisiklin	-	-	-	0.031-2	0.062	0.125	-	-	-

* Seftriakson, tetrasiklin, moksifloksasin ve klindamisin için değerlendirilmede CLSI (M11-A7) sınır değerleri kullanılmıştır.

hepsinde toksin A ve toksin B genleri tespit edilmiş, hiçbirinde binary toksin genlerine rastlanmamıştır.

Dünya genelinde *C.difficile* izolatlarının antibiyotiklere direnç oranları, coğrafi bölgelere, yerel veya ulusal antimikrobiyal uygulama politikalarına bağlı olarak merkezlere, kullanılan test yöntemine göre farklılıklar göstermektedir. Ülkemizde anaerob bakterilerin antibiyotiklere duyarlılık durumları çok az merkezde çalışılmaktadır^{9,10}. Dolayısıyla sonuçlarımızı kıyaslayabilmek için fazla veriye ulaşamamıştır.

Hafif ve orta derece *C.difficile* enfeksiyonlarının tedavisinde ilk seçilen antimikrobiyal metronidazoldür¹³. Birçok ülkede *C.difficile* izolatlarının tamamının metronidazole duyarlı olduğu bildirilmiştir¹⁴⁻¹⁶. Diğer yandan metronidazol tedavisine klinik yanısızlık gösteren olgular olmuş, bazı in vitro çalışmalarda dirençli izolatlar saptanmıştır. ABD'de 271 izolatla yapılan bir araştırmada %13.3 oranında direnç, İran'da 75 izolatla yapılan bir çalışmada ise %5.3 oranında direnç tespit edilmiştir^{6,17}. Çalışmamızda izolatlarımızın tamamı metronidazole duyarlı ve MİK değerleri ECOFF (2 mg/L) değerinin altında bulunmuştur. Bu sonuç hastanemizde metronidazolün *C.difficile* enfeksiyonlarında güvenle kullanılabilceğini göstermektedir.

Benzer şekilde izolatlarımız, *C.difficile* enfeksiyonlarının tedavisinde sık kullanılan bir diğer antimikrobiyal vankomisine de %100 oranında duyarlı ve MİK değerleri ECOFF (2 mg/L) değerinin altında bulunmuştur. Dünya genelinde yapılan çalışmalar vankomisinin *C.difficile* izolatlarına etkili olduğunu göstermektedir. Ancak, özellikle Doğu Asya ülkelerinde vankomisine azalmış duyarlılık profiline sahip suşlar (MİK aralığı > 2-16) bildirilmiştir^{7,18}. Adler ve arkadaşlarının İsrail'de yaptığı çalışmada ise 65 adet ribotip 027 izolatından 57'sinin vankomisine azalmış duyarlılık gösterdiği saptanmıştır¹⁹.

Çalışmamızda meropenem tüm izolatlar üzerine dar MİK₅₀-MİK₉₀ aralığıyla etkili bulunmuştur (Tablo II). Farklı araştırmalarda da meropenemin *C.difficile* izolatları üzerinde etkili olduğu gösterilmiş, sınırlı sayıda dirençli izolat saptanmıştır^{20,21}.

Metronidazol, vankomisin ve meropenem duyarlılık sonuçlarımız, 2008-2010 yılları arasında hastanemizde izole edilen *C.difficile* izolatları ile yapılan çalışma sonuçlarıyla benzer bulunmuştur⁹. Her iki çalışmada, belirtilen antibiyotiklere %100 oranında duyarlılık saptanmıştır ancak MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerinde çalışmalar arasında farklılıklar gözlenmiştir. Metronidazol için 0.125 mg/L olan MİK₅₀ değeri ve 0.25 mg/L olan MİK₉₀ değerlerinin her ikisi de 0.5 mg/L'ye yükselmiştir. Vankomisin için ise 0.5 mg/L ve 1 mg/L olan MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri birer dilüsyon azalarak 0.25 mg/L ve 0.5 mg/L'ye inmiştir. Meropenemin ise MİK₉₀ değeri aynı kalırken, MİK₅₀ değeri bir dilüsyon artmıştır⁹. İzolatlarımızın metronidazol ve meropenem MİK değerlerindeki artışı az oranda olmakla birlikte, hastanemizde bu antibiyotiklerin sık kullanılıyor olması bakterilerimizdeki duyarlılık profilinde zaman içinde değişimlerin olabileceği izlenimi vermektedir, bu da duyarlılık durumlarının yakından izlenmesini gerekli kılmaktadır.

Klindamisin, sefalosporinler ve daha yakın zamanda florokinolonların kullanılmasının *C.difficile* enfeksiyonu gelişmesinde diğer antibiyotiklere göre daha fazla risk oluşturduğu gösterilmiştir^{3,5}.

Klindamisin kullanımının *C.difficile* enfeksiyonu gelişmesinde önemli bir risk faktörü olduğunun anlaşıldığı 1970'lerden bu yana, klindamisine dirençli *C.difficile* izolatlarına bağlı birçok salgın gerçekleşmiştir^{22,23}. ABD ve Avrupa'da klindamisin kullanımını kontrol etmek için antimikrobiyal yönetim politikaları uygulanmış, zaman içinde klindamisin ile ilişkilendirilen *C.difficile* enfeksiyonu oranında azalma sağlanmış olmakla birlikte *C.difficile* izolatlarında %55'lere varan oranda direnç bildirilmiştir^{5,24}. Çalışmamızda klindamisine duyarlı olmayan izolatlarımızın oranı %64.5 olarak bulunmuştur. Bu sonuç, hastanemizde 2008-2010 yılları arasında elde edilen *C.difficile* izolatlarındaki %62'lik orana göre daha yüksek saptanmıştır⁹.

Sefalosporinlerin 1980-1990 yıllarında hastanelerde sık kullanılmasıyla *C.difficile* enfeksiyonlarında artış gözlenmiştir. Avrupa genelinde hastalardan izole edilen *C.difficile* izolatlarının ortalama %51'inde, Japonya'da %49'unda, Avustralya'da ise %86'sında sefalosporinlere direnç bildirilmiştir^{20,25}. Çalışmamızda izolatlarımızın yarısından azı, %41.9'u, seftriaksona duyarlı bulunmuştur.

İzolatlarımızın sadece %20.4'ü moksifloksasine duyarlı bulunmuştur. Yüksek MİK₉₀ (4 mg/L) değeriyle moksifloksasinin hastanemiz izolatlarına etkisiz olacağı öngörülebilir. Dünya genelinde florokinolonlara direnç yüksektir; siprofloksasine %99, moksifloksasin ve dördüncü kuşak florokinolonlara ise %47'leri aşan oranda direnç bildirilmiştir. 2000'li yıllarda bu grup antibiyotiklere gelişen direnç, ribotip 027 *C.difficile* izolatına bağlı *C.difficile* enfeksiyonlarının ortaya çıkması ve giderek artan insidansı ile paralel gerçekleşmiştir. Almanya ve Fransa'da yapılan çalışmada moksifloksasine direnç oranı %68 bulunmuştur²⁶. Polonya'da ise binary toksin üreten 027 ve 176 ribotiplerinden oluşan 17 izolatın tamamında moksifloksasine direnç saptanmıştır²⁷. İzolatlarımızın binary toksin genine sahip olmaması sevindirici olmakla birlikte, %80'e varan oranda moksifloksasine duyarlı olmayan izolatın var olması ileride bu tür virülen ve dirençli bakterilerle gelişecek *C.difficile* enfeksiyon sıklığının yüksek olacağını düşündürmektedir.

EUCAST rehberinde tigesiklin, doksisisiklin, eritromisin ve linezolidde ait MİK sınır değerleri verilmemiştir. Sonuçlarımız dirençli veya duyarlı şeklinde yorumlanamamıştır, ancak ileride yapılacak çalışmalara ışık tutması, zaman içinde gelişebilecek MİK değişiklikleri veya MİK kaymasını göstermesi açısından MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri verilmiştir. İzolatlarımızın tamamı ampisilin-sulbaktama duyarlı bulunmuştur, sonuçlarımız ülkemizde ve yurt dışında yapılan çalışma verileriyle uyumluluk göstermektedir^{9,28}. Tetrasikline %100 duyarlılık oranıyla farklı ülkelerde yapılan çalışma verilerine (%2-41 direnç) göre daha iyi bir konumda bulunmaktayız^{7,23}.

Sonuç olarak, çalışmamızda *C.difficile* enfeksiyonlarına yol açan izolatlar toksin A ve toksin B genlerine sahip bulunmuştur. Virülansı yüksek binary toksin geni taşıyan suşlar saptanmamıştır. İzolatlarımızın *C.difficile* enfeksiyonları tedavisinde öncelikli olarak

kullanılan metronidazol ve vankomisine duyarlı olması yüz güldürücüdür. Meropenem, ampicilin-sulbaktam ve tetrasikline izolatlarımızın hepsi dar MİK aralıklarıyla duyarlı bulunmuştur. Ancak, klindamisin, seftriakson ve moksifloksasine ise yüksek oranda direnç saptanmıştır. Bu durum herhangi bir nedenle bu antibiyotiklerin kullanılması halinde bağırsak mikrobiyotasının zarar görebileceği, toksijenik *C.difficile* izolatlarının baskın hale gelerek *C.difficile* enfeksiyonları oluşturabileceği ihtimalini akla getirmektedir. İzolatlarımızın yaklaşık %80'inin moksifloksasine duyarlı olmaması virülen ve dirençli organizmaların gelecekte önemli problem oluşturacağı kaygısını yaratmaktadır. Bu durum, *C.difficile* izolatlarımızın duyarlılık profillerinin yakından izlenmesini gerekli kılmaktadır.

TEŞEKKÜR

C.difficile HU 10010 izolatının temini için Prof. Dr. E. Nagy (Szeged Üniversitesi, Klinik Mikrobiyoloji Enstitüsü, Macaristan)'e teşekkür ederiz.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 01.09.2015 ve Karar no: 70737436-050.06.04).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL, Finegold SM. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe* 2016; 40: 95-9.
2. Kılıç A. *Clostridium difficile* enfeksiyonu: epidemiyoloji, risk faktörleri, patogenezi, klinik özellikler, tanı ve tedavi. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47(3): 556-66.
3. Schäffler H, Breitrück A. *Clostridium difficile*- from colonization to infection. *Front Microbiol* 2018; 646(9): 1-12.
4. McDonald LC, Diekema DJ. Point-counterpoint: active surveillance for carriers of toxigenic *Clostridium difficile* should be performed to guide prevention efforts. *J Clin Microbiol* 2018; 56(8): e00782-18.
5. Spigaglia P. Recent advances in the understanding of antibiotic resistance in *Clostridium difficile* infection. *Ther Adv Infect Dis* 2016; 3(1): 23-42.
6. Norman K, Scott H, Harvey R, Norby B, Hume M. Comparison of antimicrobial susceptibility among *Clostridium difficile* isolated from an integrated human and swine population in Texas. *Foodborne Pathog Dis* 2014; 11: 257-64.
7. Dong D, Zhang L, Chen X, Jiang C, Yu B, Wang X, et al. Antimicrobial susceptibility and resistance mechanisms of clinical *Clostridium difficile* from a Chinese tertiary hospital. *Int J Antimicrob Agents* 2013; 41(1): 80-4.
8. Deniz U, Ülger N, Aksu B, Karavuş M, Söyletir G. Marmara Üniversitesi Hastanesi'nde yatan ishallerli hastalardan izole edilen *Clostridium difficile* kökenlerinde toksin genlerinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(1): 1-10.
9. Ülger N, İlki A, Akgül Ö, Söyletir G. Marmara Üniversitesi Hastanesinde izole edilen *Clostridium difficile* kökenlerinin antimikrobiyallere direnç durumu. *MÜSBED* 2011; 1(3): 162-5.
10. Salman E, Levent B, Karahan ZC. Toksin pozitif *Clostridium difficile* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılıkları ve moleküler karakterizasyonu: Türkiye'den hipervirülen suşların varlığı ile ilişkili ilk bildirim. *Mikrobiyol Bul* 2017; 51(3): 236-46.

11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria, Approved Standards-7th Edition, M11-A7, CLSI, Pennsylvania, USA, 2007.
12. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, 2017. <http://www.eucast.org>.
13. Debast S, Bauer M, Kuijper E. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect 2014; 20(Suppl 2): 1-26.
14. Chatedaki C, Voulgaridi I, Kachrimanidou M, Hrabak J, Papagiannitsis CC, Petinaki E. Antimicrobial susceptibility and mechanisms of resistance of Greek *Clostridium difficile* clinical isolates. J Glob Antimicrob Resist 2019; 16: 53-8.
15. Putsathit P, Maneerattanaporn M, Piewngam P, Knight DR, Kiratisin P, Riley TV. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated in Thailand. Antimicrob Resist Infect Control 2017; 8(6): 58.
16. Kociolek LK, Gerding DN, Osmolski JR, Patel SJ, Snyderman DR, McDermott LA, et al. Differences in the molecular epidemiology and antibiotic susceptibility of *Clostridium difficile* isolates in pediatric and adult patients. Antimicrob Agents Chemother 2016; 60(8): 4896-900.
17. Goudarzi M, Goudarzi H, Alebouyeh M, Azimi Rad M, Shayegan Mehr FS, Zali MR, et al. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* clinical isolates in iran. Iran Red Crescent Med J 2013; 15(8): 704-11.
18. Chia J, Lai H, Su L, Kuo A, Wu T. Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* at a medical center in Taiwan: persistence of genetically clustering of A-B+ isolates and increase of A+B+ isolates. PLoS One 2013; 8(10): e75471.
19. Adler A, Miller-Roll T, Bradenstein R, Block C, Mendelson B, Parizade M, et al. A national survey of the molecular epidemiology of *Clostridium difficile* in Israel: the dissemination of the ribotype 027 strain with reduced susceptibility to vancomycin and metronidazole. Diagn Microbiol Infect Dis 2015; 83(1): 21-4.
20. Kuwata Y, Tanimoto S, Sawabe E, Shima M, Takahashi Y, Ushizawa H, et al. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from a university teaching hospital in Japan. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2015; 34(4): 763-72.
21. Hecht DW, Galang MA, Sambol SP, Osmolski JR, Johnson S, Gerding DN. In vitro activities of 15 antimicrobial agents against 110 toxigenic *Clostridium difficile* clinical isolates collected from 1983 to 2004. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51(8): 2716-9.
22. Bartlett JG, Onderdonk AB, Cisneros RL, Kasper DL. Clindamycin-associated colitis due to a toxin-producing species of *Clostridium* in hamsters. J Infect Dis 1977; 136(5): 701-5.
23. Boyanova L, Kolarov R, Mitov I. Recent evolution of antibiotic resistance in the anaerobes as compared to previous decades. Anaerobe 2015; 31: 4-10.
24. Tenover FC, Tickler IA, Persing DH. Antimicrobial-resistant strains of *Clostridium difficile* from North America. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56(6): 2929-32.
25. Knight D, Giglio S, Huntington P, Korman T, Kotsanas D, Moore C. Surveillance for antimicrobial resistance in Australian isolates of *Clostridium difficile*, 2013-2014. Int J Antimicrob Chemother 2015; 70: 2992-9.
26. Reil M, Hensgens M, Kuijper E, Jakobiak T, Gruber H, Kist M, et al. Seasonality of *Clostridium difficile* infections in Southern Germany. Epidemiol Infect 2012; 140: 1787-93.
27. Woszczatynska PO, Lachowicz D, Schneiderb A, Molb A, Pawlowskac J, Milked OE, et al. Occurrence of *Clostridium difficile* PCR-ribotype 027 and it's closely related PCR-ribotype 176 in hospitals in Poland in 2008-2010. Anaerobe 2014; 28: 13-7.
28. Kim H, Jeong SH, Roh KH, Hong SG, Kim JW, Shin MG, et al. Investigation of toxin gene diversity, molecular epidemiology, and antimicrobial resistance of *Clostridium difficile* isolated from 12 hospitals in south Korea. Korean J Lab Med 2010; 30(5): 491-7.