

# Marmara Üniversitesi Hastanesi'nde İzole Edilen *Clostridium difficile* Kökenlerinin Antibiyotiklere Direnç Durumu\*

Nurver Toprak Ülger<sup>1</sup>, Arzu İlki<sup>1</sup>, Öncü Akgül<sup>1</sup>, Güner Soyletir<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul-Türkiye

Yazışma Adresi / Address reprint requests to: Nurver Toprak Ülger  
Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul-Türkiye  
Telefon / Phone: +90-216-414-4732 Faks / Fax: +90-216-414-4732 Elektronik posta adresi / E-mail address: nurverulger@yahoo.com  
Kabul tarihi / Date of acceptance: 28 Ekim 2011 / October 28, 2011

## ÖZET

Marmara Üniversitesi Hastanesi'nde izole edilen *clostridium difficile* kökenlerinin antibiyotiklere direnç durumu

**Amaç:** Bu çalışmada Marmara Üniversitesi Hastanesi'nde izole edilen toksijenik *Clostridium difficile* kökenlerinin antibiyotiklere direnç durumunun araştırılması amaçlanmıştır.

**Yöntemler:** Mikrobiyoloji Laboratuvarına Nisan 2008- Ocak 2010 tarihleri arasında, *Clostridium difficile* toksini bakılması isteğiyle gönderilen dışkılarından anaerob kültür yapılmış, izole edilen 50 toksijenik kökenin, CLSI'nın önerdiği (M11-A7) agarda dilüsyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılıkları çalışılmıştır. Antibiyotiklerden metronidazol, vankomisin, meropenem, klindamisin ve ampisilin seçilmiştir. Orta düzeyde dirençli olanlar da dirençliler arasında gösterilmiştir.

**Bulgular:** Tüm kökenler metronidazol, vankomisin ve meropeneme duyarlı bulunmuştur. Kökenlerin %62'sinde klindamisine, %68'inde ise ampisiline direnç saptanmıştır.

**Sonuç:** Elde ettiğimiz sonuçlara göre hastanemizde şu ana kadar, *Clostridium difficile*'ye bağlı ishal tedavisinde en fazla kullanılan antibiyotiklerden metronidazol ve vankomisine karşı bir direnç tehlikesi görülmemektedir. Ayrıca, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutinde kültürü ve antibiyotik duyarlılığı yapılmayan *Clostridium difficile* ile ilgili verilerimiz, ülkemizde yapılacak diğer çalışmalara da ışık tutacaktır.

**Anahtar sözcükler:** *Clostridium difficile*, antibiyotiklere direnç, vankomisin, metronidazol

## ABSTRACT

Antimicrobial resistance patterns of *Clostridium difficile* strains isolated from Marmara University Hospital

**Objective:** This study was designed to investigate antimicrobial resistance patterns of toxigenic *Clostridium difficile* strains isolated from Marmara University Hospital.

**Methods:** The stool specimens ordered for detection of *Clostridium difficile* toxin at the Microbiology Laboratory, between April 2008 and January 2010 were cultured anaerobically. The antimicrobial susceptibility of the isolated 50 toxigenic *Clostridium difficile* strains was determined using the agar dilution protocol in the CLSI guidelines (M11-A7). The investigated antibiotics were metronidazole, vancomycin, meropenem clindamycin, and ampicillin. Breakpoints of susceptibility for each drug were considered according to the levels listed by the CLSI, intermediate strains evaluated as resistant ones.

**Results:** All isolates were sensitive to metronidazole, vancomycin and meropenem. Resistance rates to clindamycin and ampicillin were 62% and 68%, respectively.

**Conclusion:** For now there seems to be no resistance risk for metronidazole and vancomycin, the two agents commonly used to treat *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Our findings determine the current antibiotic susceptibility patterns of the *Clostridium difficile* isolates in our region and also in Turkey, where clinical laboratories do not routinely perform culture and susceptibility testing of the organism.

**Key words:** *Clostridium difficile*, antimicrobial resistance, vancomycin, metronidazole

\*Bu çalışma 7-10 Temmuz 2010 tarihlerinde, Philadelphia, ABD'de düzenlenmiş olan 10. the Anaerobe Society of the Americas Kongresi'nde "Antimicrobial susceptibility pattern of *Clostridium difficile* in a Turkish University Hospital." isimli poster ile sunulmuştur.

## GİRİŞ

Gram pozitif, zorunlu anaerob bir çomak olan *Clostridium difficile*, hastane kaynaklı ishallerin en önemli sebeple-

rinden biridir. Genellikle antibiyotik kullanımına bağlı gelişen hastalığın bulguları hafif ishalden, yaşamı tehdit eden psödomembranöz kolite kadar farklılık gösterebilir. Hastalığın tedavisi, hastanın almakta olduğu antibiyotiğin kesil-

mesi, gerekiyorsa metronidazol veya oral vankomisin ampirik tedavisinin uygulanmasıdır (1).

Ülkelere ve merkezlere göre değişiklik göstermekle beraber, son dönemlerde *C.difficile* enfeksiyonlarının morbidite ve mortalitesinde belirgin bir artış gözlenmektedir. Bu artışta, mikroorganizmanın virülansı ve uygulanan antibiyotik politikası önemli rol oynamaktadır (2). Özellikle 2000'li yılların ilk yarısında, dünyanın çeşitli ülkelerinden virülansı yüksek *C.difficile* O27/NAP1/BI kökenine bağlı ölüm oranı yüksek salgınlar bildirilmiştir (3-5).

Hastalığın laboratuvar tanısı genellikle serolojik testlerle, dışkıda *C.difficile* toksinin varlığı gösterilerek konur (1). Klinik laboratuvarlarda rutin olarak *C.difficile* kültürü, dolayısıyla antibiyotik duyarlılık testleri yapılmamaktadır. Aerop ve fakültatif anaerop bakterilere uygulanan basit antibiyotik duyarlılık testleri anaerop bakteriler için uygun bulunmamaktadır. Anaerop bakteriler için kabul edilen agarda dilüsyon yönteminin ise rutin laboratuvarlarda kolaylıkla uygulanabilir yanı yoktur. Diğer yandan anaerop bakterilerin kültürü zor, zahmetli, özel çaba ve koşulları gerektirmektedir. Tüm bu zorluklar *C.difficile*'nin üretilmesini ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması engellemektedir (6,7). Dünyada belirli merkezlerde yapıldığı kadarıyla *C. difficile* kökenlerinin, metronidazol ve vankomisine duyarlı oldukları gösterilmiştir (8,9). Ancak, son yıllarda bu antibiyotiklerle yapılan tedavilerde klinik yanıtızsızlıklar ya da dirençli kökenlerin varlığı bildirilmiştir (10-13). Bu veriler, *C.difficile* kökenlerinin en azından belirli aralıklarla antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılmasını ve direnç gelişimine karşı dikkatli olunmasını gerektiğini göstermektedir.

Ülkemizde yapılmış, *C.difficile* kökenlerinde herhangi bir in vitro duyarlılık çalışmasına rastlanmamıştır. Bu çalışmada Marmara Üniversitesi Hastanesi'nde üretilmiş etken toksijenik *C.difficile* kökenlerinin antibiyotiklere direnç durumları araştırılmıştır

## GEREÇ ve YÖNTEM

Marmara Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji bölümüne, Nisan 2008 - Ocak 2010 tarihleri arasında, *C.difficile* toksin varlığının araştırılması istemiyle gönderilen dışkı örnekleri çalışmaya alınmıştır. Toksin varlığı ImmunoCard (Meridian) enzim immunoassay (EIA) yöntemiyle çalışılmış, eş zamanlı olarak dışkı örnekleri siklose-rin-sefoksitin-fruktoz agara (CCFA - BioMerieux) ekilerek

anaerop koşullarda inkübe edilmiştir. İzole edilen kökenler, geleneksel yöntemler (koloni morfolojisi (Resim 1), karakteristik kötü koku, mikroskopik görünüm) ve Rapid ID 32A (BioMerieux, Fransa) kiti ile biyokimyasal reaksiyonları değerlendirilerek tanımlanmıştır. Bakteride toksin varlığı da ImmunoCard (Meridian) EIA yöntemiyle belirlenmiştir (14).

Ard arda gönderilen dışkı örneklerinden üretilen aynı hastaya ait *C.difficile* izolatlarından birisi çalışmaya alınmıştır. İki yaş altındaki hastalara ait örnekler çalışma dışında tutulmuştur.

Bu zaman diliminde izole edilip stoklanmış 50 toksijenik *C.difficile* kökeninin, CLSI'nın önerdiği (M11-A7) agarda dilüsyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılıkları çalışılmıştır. Antibiyotiklerden metronidazol (32 - 0.125 mg/L konsantrasyon aralığında), vankomisin (16 - 0.125 mg/L), meropenem (32 - 0.125 mg/L), klindamisin (256-0.125 mg/L) ve ampisilin (16 - 0.125 mg/L) seçilmiştir (6).

## BULGULAR

Antibiyotiklerin minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri, CLSI'nın klavuzuna göre; metronidazol için  $\leq 8$  mg /L vankomisin için  $\leq 2$  mg /L, meropenem için  $\leq 4$  mg /L, klindamisin için  $\leq 2$  mg /L ve ampisilin için  $\leq 0,5$  mg /L duyarlılık sınırı olarak alınmış, orta düzeyde dirençli olanlar da dirençliler arasında gösterilmiştir (6).

Bakterilerin hepsi metronidazol, vankomisin ve meropeneme duyarlı bulunmuş, ve MİK<sub>50</sub> / MİK<sub>90</sub> değerleri sırasıyla; 0,125 - 0,125 mg /L, 1 - 0,5 mg /L ve 2 - 1 mg /L olarak saptanmıştır. Kökenlerin % 62'si klindamisine direnç gösterirken MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri 4 ve 16 mg/L olarak elde edilmiştir. Benzer şekilde ampisiline de yüksek oranda direnç (%68) tespit edilmiş ve MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri aynı (1 mg/L) bulunmuştur (Tablo1).



Resim 1: CCFA besiyerinde *C.difficile* koloni görünümü

**Tablo 1:** *Clostridium difficile* Kökenlerinin (n:50) Antibiyotiklere Direnç Durumu, MİK aralıkları, MİK<sub>50</sub> / MİK<sub>90</sub> değerleri

Antibiyotikler	MİK Aralıkları mg/L	MİK <sub>50</sub> mg/L	MİK <sub>90</sub> mg/L	Direnç (orta direnç) %
Metronidazol	<0.125 - 0.5	0.125	0,25	0
Vankomisin	<0.125 - 1	0,5	1	0
Meropenem	<0.125 - 2	1	2	0
Klindamisin	<0.125 - >256	4	16	62 (30)
Ampisilin	<0.125 - 2	1	2	68 (6)

## TARTIŞMA

Son yıllarda küçük değişiklikler yapılmakla beraber, metronidazol veya vankomisin *C. difficile* enfeksiyonlarının standart tedavisinde kullanılan antibiyotiklerdir. Her iki antibiyotiğin eşit etkiye sahip olduğu, her ikisinin kullanımında %15 - 35 oranında rekürrens gerçekleştiği bildirilmiştir. Pahalı olması, sadece ağızdan alındığında etkinliğini göstermesi ve vankomisine dirençli enterokokların seçilmesine yol açması nedeniyle vankomisin tedavide ilk seçenek olmamakta, metronidazolün kullanılması daha çok tercih edilmektedir (1,15).

Bazı merkezlerde tedavide metronidazolün kullanılması sırasında klinik yanısızlıklar söz konusu olmuştur. Palaez ve ark. (16), ilki 1994 yılında yapılan iki farklı çalışmada %6 ile %9 oranında metronidazole dirençli bakteri saptamışlardır. İsrail'de yapılan bir çalışmada ise %2 oranında direnç bildirilmiştir (17). Klinik yanıt ile in vitro duyarlılık testleri arasında her zaman tam bir uyumluluk görülmemektedir. Uyumsuzluk, duyarlılık testlerinde serum ilaç konsantrasyonlarına göre kırılma noktası değerlerinin esas alınmasına bağlanabilir. Nitekim antibiyotiklere yanıt vermeyen olgularda üretilen kökenlerin antibiyotiklere in vitro duyarlı oldukları görülmüştür. Bu olgularda dışkıda ki metronidazol miktarının daha fazla belirleyici olduğu savunulmuş, ishalin şiddetine göre 1 gram dışkıda 0.8 µg ile 24.2 µg arasında değişen antibiyotik bulunduğu gösterilmiştir (15).

Tek vankomisine dirençli köken 1991 yılında Polonya'da disk diffüzyon yöntemiyle yapılan çalışmada görülmüştür (10). İlk yüksek vankomisin MİK düzeyine sahip *C. difficile* kökeni ise 1996'da tanımlanmıştır (18). Daha sonra Peláez ve ark. (16), tarafından yapılan çalışmada %3.1 oranında azalmış duyarlılık oranı bildirilmiştir O zamandan günümüze azalmış duyarlılığa sahip kökenlerin sayısında yavaş ama gittikçe yükselen bir artış söz konusudur. İngiltere'de Mutlu ve ark. (19), MİK değeri 4mg / L olan kökenlerin 1999 - 2000 yıllarında %2,7 iken, 2005 yılında %21,6'ya yükseldiğini göstermişlerdir.

Kökenlerimizde metronidazole ve vankomisine diren-

cin görülmemesi ve düşük MİK aralıklarına sahip olmaları yüz güldürücüdür. Benzer şekilde bütün kökenlerimiz meropeneme duyarlı bulunmuştur. Dünyanın çeşitli ülkelerinde yapılan çalışmalarda meropenemin de *C. difficile* kökenleri üzerine etkili olduğu gösterilmiş, dirençli herhangi bir köken bildirilmemiştir (8,9,17).

Diğer antibiyotiklere direnç ülkelere göre farklılık göstermekle beraber değişik oranlarda bildirilmiştir. En fazla direnç klindamisin - eritromisin grubunda görülmekte ve yıllar içinde giderek artmaktadır. Klindamisine direnç, Almanya'da 2003 yılında %36 iken 2007 yılında %65, İsveç'te 2006 yılında %43,7 iken 2009 yılında %65, Kanada'da 2006 yılında %14,7 iken 2008 yılında %90,9 bulunmuştur (15,20). Çin'de 2007 yılında yapılmış olan bir yıllık çalışmada ise klindamisine %71,4 oranında direnç saptanmıştır (21). Bizim çalışmamızda klindamisine direnç oranı %62 ile diğer ülkelerin direnç oranlarına benzerlik göstermektedir.

Her geçen gün dünyanın çeşitli ülkelerinden virülanı yüksek ve antibiyotiklere daha dirençli *C. difficile* kökenlerine bağlı yeni hastane salgınları ve yüksek ölüm oranları bildirilmektedir (22). Epidemiyolojik analizlerin yapılabilmesi ve antibiyotiklere duyarlılık durumlarının saptanabilmesi için, kültürün rutin olarak yapılması ve bakterilerin izole edilerek özelliklerinin yakından takip edilmesi büyük önem taşır. Hedefimizde, yaptığımız çalışmaları devam ettirmek, izole edilen *C. difficile* kökenlerinin zaman içinde antibiyotik duyarlılık değerlerini yakından takip etmek, moleküler yöntemlerle direnç mekanizmalarını ve epidemiyolojik özelliklerini belirlemek bulunmaktadır.

Sonuçlarımız hastanemiz için, *C. difficile* kökenlerinin antibiyotiklere duyarlılıklarıyla ilgili bir veri tabanı oluşturmaktadır. Şimdilik, *C. difficile*'ye bağlı ishal tedavisinde en fazla kullanılan metronidazol ve vankomisine karşı bir direnç tehlikesi görülmemektedir. Ancak, kökenlerimiz klindamisin ve ampisiline yüksek oranda dirençli bulunmuştur. Çalışmaların son derece kısıtlı olduğu ülkemizde verilerimizin, diğer çalışmalara da ışık tutacağına inanıyoruz.

## KAYNAKLAR

- Bartlett J.G. Antibiotic associated diarrhea. *N Engl J Med.* 2002; 346:334-339.
- Redelings MD, Sorvillo F, Mascola L. Increase in *Clostridium difficile*-related mortality rates, United States, 1999-2004. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13: 1417-1419.
- Kuijper EJ, Coignard B, Tüll P, ESCMID Study Group for *Clostridium difficile*; EU Member States; European Centre for Disease Prevention and Control. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12(Suppl 6): 2-18.
- Gilca R, Hubert B, Fortin E, Gaulin C, Dionne M. Epidemiological patterns and hospital characteristics associated with increased incidence of *Clostridium difficile* infection in Quebec, Canada, 1998-2006. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010; 31: 939-947.
- O'Connor JR, Johnson S, Gerding DN. *Clostridium difficile* infection caused by the epidemic BI/NAP1/027 strain. *Gastroenterology* 2009;136: 1913-1924.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria, Approved Standards-7<sup>th</sup> Edition, M11-A7, CLSI, Pennsylvania, USA, 2007.*
- Leroi M.J, Siarakas S, Gottlieb TE. Test susceptibility testing of nosocomial *Clostridium difficile* isolates against metronidazole, vancomycin, fusidic acid and the novel agents moxifloxacin, gatifloxacin, and linezolid. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002;21: 72-74.
- Hecht D.W, Galang M.A, Sambol S.P, Osmolski J.R, Johnson S, Gerding D.N. In vitro activities of 15 antimicrobial agents against 110 toxigenic *Clostridium difficile* clinical isolates collected from 1983 to 2004. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51: 2716-2719.
- Barbut F, Mastrantonio P, Delmée M, Brazier J, Kuijper E, Poxton I and European Study Group on *Clostridium difficile* (ESGCD). Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13: 1048-1057.
- Dworczyński A, Sokół B, Meisel-Mikołajczyk F. Antibiotic resistance of *Clostridium difficile* isolates. *Cytobios.* 1991;65:149-153.
- Brazier J. S, Fawley W, Freeman J, Wilcox MH. Reduced susceptibility of *Clostridium difficile* to metronidazole. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 48:741-742.
- Drummond LJ, McCoubrey J, Smith D.G, Starr JM, Poxton IR. Changes in sensitivity patterns to selected antibiotics in *Clostridium difficile* in geriatric in-patients over an 18-month period. *J Med Microbiol.* 2003; 52: 259-263.
- Peláez T, Cercenado E, Alcalá L, Marín M, Martín-López A, Martínez-Alarcón J. Metronidazole resistance in *Clostridium difficile* is heterogeneous. *J Clin Microbiol.* 2008;46: 3028-3032.
- Deniz U, Ülger N, Aksu B, Karavuş M, Söyletir G. Marmara Üniversitesi Hastanesinde yatan ishalleri hastalardan izole edilen *Clostridium difficile* kökenlerinde toksin genlerinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul.* 2011;45:1-10.
- Huanga H, Weintraub A, Fang H, Nord CE. Antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 34: 516-522.
- Peláez T, Alcalá L, Alonso R, Rodríguez-Créixems M, García-Lechuz JM, Bouza E. Reassessment of *Clostridium difficile* susceptibility to metronidazole and vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46: 1647-1650.
- Bisharaa J, Bloch Y, Garty M, Behor J, Samrac Z. Antimicrobial resistance of *Clostridium difficile* isolates in a tertiary medical center, Israel. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006; 54: 141-144
- Wong SS, Woo PC, Luk WK, Yuen KY. Susceptibility testing of *Clostridium difficile* against metronidazole and vancomycin by disk diffusion and Etest, *Diagn. Microbiol Infect Dis.* 1999;34; 1-6.
- Mutlu E, Wroe AJ, Sanchez-Hurtado K, Brazier JS, Poxton IR. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility patterns of *Clostridium difficile* strains isolated from hospitals in south-east Scotland. *J Med Microbiol.* 2007;56: 921-929.
- Bourgault AM, Lamothe F, Loo VG, Poirier L, and CDAD-CSI Study Group. In vitro susceptibility of *Clostridium difficile* clinical isolates from a multi-institutional outbreak in Southern Québec, Canada. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50: 3473-3475.
- Huang H, Wu S, Wang M, Zhang Y, Fang H, Palmgren AC et al., *Clostridium difficile* infections in a Shanghai hospital: antimicrobial resistance, toxin profiles and ribotypes. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 33: 339-342.
- Kelly CP, LaMont JT. *Clostridium difficile*—more difficult than ever. *N Engl J Med.* 2008;359: 1932-1940.