

Drug Resistance Pattern of Toxigenic *Clostridium difficile* Isolated from Patients with Diarrhea to Conventional Therapeutic Drugs with Chronic

Mohsen Zargar^{1*}, Mohammad Reza Ghadir², Ali Javadi³,
Abbas Morovvati⁴, Fariba Dastjani Farahani⁵

¹Department of Microbiology, School of Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

²Department of Gastroenterology, Qom University of Medical Science, Qom, Iran.

³Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

⁴Department of Microbiology, Faculty of Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

⁵Department of Microbiology, Faculty of Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

***Corresponding Author:**

Mohsen Zargar;
Department of Microbiology,
School of Sciences. Qom
Branch, Islamic Azad
University, Qom, Iran.

Email:
zmohsen2002@yahoo.com

Received: 21 Oct, 2019
Accepted: 20 Jan, 2020

Abstract

Background and Objectives: *Clostridium difficile* is a gram-positive obligate anaerobic bacillus. Accurate and rapid diagnosis of this bacterium as well as assessment of its drug resistance pattern are one of the important issues in controlling infections caused by *C. difficile*. The purpose of the present study was to detect toxicogenic *C. difficile* and to evaluate drug resistance pattern of these strains to routine therapeutic drugs.

Methods: A total of 68 samples were collected from patients hospitalized in hospitals of Qom province. All samples were rapidly cultured in the specialized CCFA Agar medium. After these procedures, the bacteria were used for DNA extraction and then PCR was performed on the *cdd3* gene for definitive detection of the bacteria. Finally, the presence of A and B toxins' genes was determined by PCR and resistance to metronidazole, vancomycin, and clindamycin, was determined by agar dilution method. Chi-square test was used to analyze the results.

Results: In this study, 6 isolates had A and B toxins, the highest antibiotic resistance was against clindamycin (45.45%) and metronidazole (36.36%), and all the isolates, were sensitive to vancomycin.

Conclusion: Drug resistance pattern in the obtained strains still introduces vancomycin as the treatment of choice.

Keywords: *Clostridium difficile*; Diarrhea; Toxin A; Toxin B; Polymerase chain reaction; Drug resistance.

DOI: 10.29252/qums.13.11.13

الگوی مقاومت دارویی کلستریدیوم دیفیسیل توکسیژنیک جدا شده از مبتلایان به اسهال مزمن ناشی از داروهای رایج درمانی

محسن زرگر^{۱*}، محمدرضا قدیر^۲، علی جوادی^۳، عباس مروتی^۴، فریبا دستجانی فراهانی^۵

چکیده

زمینه و هدف: کلستریدیوم دیفیسیل یک باسیل گرم مثبت، بی‌هوازی و اجباری است. تشخیص دقیق و سریع باکتری و نیز بررسی الگوی مقاومت دارویی آن یکی از مسائل مهم در کنترل عفونت حاصل از این باکتری می‌باشد. در این ارتباط، مطالعه حاضر با هدف تشخیص کلستریدیوم دیفیسیل توکسین‌زا و نیز بررسی مقاومت دارویی این سویه‌ها به داروهای روتین درمانی انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه ۶۸ نمونه از بیماران بستری در بیمارستان‌های قم جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها به سرعت روی محیط (Cefoxitin Cycloserine Fructose Agar) CCFA کشت داده شده و در شرایط بی‌هوازی گرماگذاری گردیدند. پس از این اقدامات، باکتری‌های مورد نظر جهت استخراج DNA و انجام PCR (Polymerase Chain Reaction) در مورد ژن *cdd3* جهت تشخیص قطعی باکتری به کار گرفته شدند. در انتها، حضور ژن توکسین‌های A و B به روش PCR ارزیابی گردید و مقاومت ایزوله‌ها به داروهای مترونیدازول، ونکومايسين و کلیندامایسین با استفاده از روش رقت‌سازی در آگار بررسی شد. از آزمون آماری کای دو جهت آنالیز نتایج استفاده گردید.

نتایج: در این مطالعه شش ایزوله دارای هر دو توکسین A و B بودند. بیشترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک مربوط به کلیندامایسین (۴۵/۴۵ درصد) و مترونیدازول (۳۶/۳۶ درصد) بود و تمام ایزوله‌ها نسبت به ونکومايسين حساس بودند.

نتیجه‌گیری: الگوی مقاومت دارویی در ایزوله‌های به‌دست آمده همچنان داروی ونکومايسين را به‌عنوان انتخاب درمانی معرفی می‌کند.

کلیدواژه‌ها: اسهال؛ توکسین A؛ توکسین B؛ کلستریدیوم دیفیسیل؛ مقاومت دارویی؛ واکنش زنجیره‌ای پلیمرز.

^۱استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران.

^۲استاد گروه گوارش، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

^۳دانشجوی دکتری گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

^۴دانشجوی دکتری گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران.

^۵کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

محسن زرگر، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:

zmohsen2002@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۷/۷/۲۹

تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۰/۳۰

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Zargar M, Ghadir MR, Javadi A, Morovvati A, Dastjani Farahani F, Drug Resistance Pattern of Toxigenic *Clostridium difficile* Isolated from Patients with Diarrhea to Conventional Therapeutic Drugs with Chronic. Qom Univ Med Sci J 2020;13(11):12-23. [Full Text in Persian]

از ۴ درصد از بالغین سالم می‌توانند حامل این ارگانیزم به‌عنوان میکروفلور طبیعی روده خود باشند (۸). شناخت با رنگ گرم در نمونه‌های مدفوعی در تشخیص بیماری ارزشی ندارد. کلستریدیوم دیفیسیل می‌تواند توسط کشت غیر هوازی از مدفوع جدا شود؛ اما استفاده از این روش برای تشخیص کلینیکی بسیار نادر است؛ زیرا سویه‌های توکسیژنیک را از سویه‌های غیر توکسیژنیک تمیز نمی‌دهد (۹-۱۰). یکی دیگر از روش‌های آزمایشگاهی برای تشخیص بیماری، PCR است. این روش باکتری کلستریدیوم را از نظر کمی و نیز تشخیص سریع پاتوژن از باکتری‌های غیر پاتوژن ارزیابی می‌کند. این آزمون حساسیت بالایی داشته و به کارشناسان تکنیکی نیاز دارد (۱۱-۱۲). مهم‌ترین عاملی که در این باکتری موجب آغاز بیماری در یک فرد می‌شود، وجود دو سم قوی A و B است. هر دوی این سموم باعث آسیب مخاطی و ایجاد کولیت و در نتیجه نفوذ نوتروفیل می‌گردند. سم A دارای ویژگی آنروتوکسینی و سم B دارای خاصیت سیتوتوکسینی است. بیمارانی که دچار بیماری زمینه‌ای شدید هستند و نیز افرادی که به مدت طولانی در بیمارستان بستری بوده و از آنتی‌بیوتیک و یا داروهای مهارکننده پمپ پروتون استفاده می‌نمایند، در معرض خطر شدید ابتلا به عفونت با این باکتری قرار دارند. داروهای مورد استفاده برای درمان عفونت ناشی از این باکتری اغلب مترونیدازول و ونکومايسين خوراکی هستند که طول درمان ۱۰ تا ۱۴ روز دارند. با وجود مشاهده مقاومت بالا در سویه‌های جدا شده نسبت به مترونیدازول، هنوز از این دارو به‌عنوان یک داروی مؤثر در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری استفاده می‌شود. با توجه به مطالب بیان‌شده، مطالعه حاضر با هدف تشخیص این باکتری و نیز بررسی توکسین‌های A و B در آن با استفاده از روش PCR به‌عنوان روش شناسایی حساس و دقیق باکتری در این بیماران و همچنین بررسی و مشاهده میزان مقاومت جدایه‌های بالینی کلستریدیوم دیفیسیل علیه آنتی‌بیوتیک‌های ونکومايسين، مترونیدازول و کلیندامایسین انجام شد. رژیم درمانی مرسوم برای درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری، استفاده از مترونیدازول و ونکومايسين به مدت ۱۰ تا ۱۴ روز می‌باشد (۱۳). از آنجایی که مترونیدازول و ونکومايسين خط اول درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری هستند، شناخت مقاومت به این دو دارو از اهمیت بالایی برخوردار است.

کلستریدیوم دیفیسیل یک باسیل گرم مثبت، توکسیژنیک، تولید کننده اسپور و بی‌هوازی است که اندازه آن نسبتاً بزرگ بوده و دارای طولی معادل ۷-۲ میلی‌متر می‌باشد. این باکتری به دلیل جداسازی سخت در آزمایشگاه با این عنوان نام‌گذاری شده است (۱-۲). آلودگی این باکتری با تبدیل اسپور باکتری به شکل رویشی و تولید توکسین در سیستم گوارشی بروز می‌نماید که می‌تواند به اشکال مختلف از بدون علامت در برخی بیماران تا بروز اسهال شدید در برخی دیگر دیده شود. این باکتری دو نوع توکسین تولید می‌کند که با واکنش منوگلیکوزیلاسیون سبب تخریب اتصالات بین سلولی در بدن انسان می‌شود. بیماری اسهال یکی از رایج‌ترین بیماری‌های عفونی و یکی از معضلات بهداشتی در بیشتر کشورهای جهان سوم می‌باشد که در این میان، اسهال ایجاد شده توسط کلستریدیوم دیفیسیل علت مهم اسهال بیمارستانی است (۳). امروزه بیماری ناشی از کلستریدیوم دیفیسیل بدون ارتباط با آنتی‌بیوتیک و شیمی‌درمانی به‌ویژه در بیماران سرپایی و غیر بستری در حال افزایش می‌باشد. علت این امر را نمی‌توان دقیقاً به پیدایش سوش‌های جدید از باکتری با ویژگی‌هایی که به آن‌ها اجازه کلونیزه شدن در حضور باکتری‌های طبیعی را می‌دهد، ربط داد. ممکن است فاکتورهای دیگری به غیر از مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها جمعیت و توازن باکتری‌های طبیعی روده را تحت تأثیر قرار دهند (۴). معمولاً بیماری ناشی از کلستریدیوم دیفیسیل در افرادی مشاهده می‌شود که طی دو گذشته آنتی‌بیوتیک مصرف نموده و اکنون به اسهال مبتلا شده‌اند و یا بیمارانی که پس از ۷۲ ساعت بستری‌بودن در بیمارستان دچار اسهال گردیده‌اند. در بیشتر مواقع بررسی توکسین و یا کشت کلستریدیوم دیفیسیل در یک نمونه مدفوع به‌طور مؤثری تشخیص را مشخص می‌کند و در برخی از موارد نیاز به انجام آندوسکوپی و یا تکرار آزمون وجود دارد (۷-۶). از روش سیتوتوکسیستی به‌عنوان روش رفرانس و روش آنزیم ایمونواسی که در اکثر آزمایشگاه‌ها به خوبی با روش رفرانس مطابقت دارد، استفاده می‌شود (۷). کشت مدفوع نیز می‌تواند برای جداسازی کلستریدیوم دیفیسیل مورد استفاده قرار بگیرد؛ اما وجود ارگانیزم در کشت مدفوع لزوماً به معنای وجود بیماری در آن زمان نیست؛ زیرا بیشتر

مضرس و با قطر ۳-۱ میلی متر قابل مشاهده می باشند. مورفولوژی پرگنه های کلستریدیوم دیفیسیل در ارتباط با محیط های مختلف، بسیار متفاوت می باشد. در این مطالعه در مرحله اول از کلونی های مشکوک، لام تهیه گردید و پس از رنگ آمیزی گرم مورد بررسی قرار گرفت. اگر در طول انکوباسیون اسپور تشکیل شود، اسپورها به صورت بیضی با هاله ای شفاف نزدیک به انتهای باکتری و اندکی بزرگتر از عرض باکتری مشاهده می شوند. در پژوهش حاضر از آزمون بیوشیمیایی پرولین آمینوپتیداز برای شناسایی استفاده گردید (۱۴). یکی دیگر از ویژگی های اولیه در تشخیص مقدماتی باکتری، بوی کلونی است که شبیه به بوی اسطبل اسب می باشد (۱۴). پس از تشخیص اولیه کلستریدیوم دیفیسیل به روش کشت، کلونی های باکتری برای تشخیص قطعی مورد ارزیابی مولکولی به روش PCR قرار گرفتند.

انجام PCR برای ژن *cdd3*

برای انجام هر واکنش PCR، ابتدا مخلوط واکنش در یک حجم ۲۵ میکرولیتری تهیه شد: ۱۲/۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (جدول ۱)، ۵ میکرولیتر از DNA و ۵/۵ میکرولیتر از آب. دو نمونه به عنوان کنترل مثبت و کنترل منفی استفاده گردید. در کنترل مثبت از DNA باکتری واجد ژن و در کنترل منفی به جای DNA، حجم معادل آن آب اضافه می شود، کنترل منفی برای چک کردن عدم آلودگی مواد PCR است در هر واکنش کنار آزمون ها انجام شد. باید خاطرنشان ساخت که ژن *cdd3* جهت تعیین هویت کلستریدیوم دیفیسیل به عنوان یک ژن حفظ شده در تمام سویه ها شناسایی می شود و دارای اندازه ۶۲۲ جفت باز می باشد. واکنش PCR ژن *cdd3* در شرایط ۹۵ درجه ۵ دقیقه، ۹۵ درجه ۱ دقیقه، ۵۵ درجه ۱ دقیقه، ۷۲ درجه ۱ دقیقه و ۷۲ درجه پایانی ۵ دقیقه انجام شد. نمونه ها پس از انجام واکنش به منظور مشاهده روی چاهک ژل آگارز ۱ درصد برده شدند (۱۵).

انجام PCR جهت تشخیص حضور ژن های *tcdA* و *tcdB*

در این مطالعه تشخیص حضور ژن های توکسین A و B در ارتباط با نمونه های کشت مثبت صورت گرفت. پرایمرهای این ژن ها با استفاده از توالی ثبت شده آن ها در بانک اطلاعاتی NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) جمع آوری گردید و

در این راستا، هدف از انجام مطالعه حاضر علاوه بر شناسایی حضور ایزوله های توکسیژنیک کلستریدیوم دیفیسیل در بین افراد مبتلا به اسهال مزمن، بررسی مقاومت ایزوله ها نسبت به داروهای رایج درمانی می باشد.

روش بررسی

در پژوهش مقطعی حاضر (Cross Sectional) ۶۸ نمونه مدفوعی از بیماران مبتلا به اسهال مزمن و آبکی ناشی از مصرف آنتی بیوتیک بستری شده در بخش های عفونی و جراحی مردان و زنان بیمارستان های "کامکار"، "بهشتی" و "گلپایگانی" شهر قم که بیش از یک هفته اسهال آبکی همراه با درد شکمی داشتند، جمع آوری گردید. نمونه ها در ظروف مخصوص نمونه گیری جمع آوری شدند و طی حداکثر دو ساعت به آزمایشگاه منتقل گردیدند. تمامی نمونه ها به سرعت در محیط CCFA (شرکت Merck، آلمان) کشت داده شدند. با توجه به اینکه کلستریدیوم دیفیسیل یک باکتری اسپوردار می باشد، به منظور کاهش میزان آلودگی فلور باکتریایی در نمونه های مدفوع از دو روش استفاده شد: استفاده از حرارت (دمای ۶۰-۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه) و استفاده از متانول (شرکت Merck، آلمان). جهت انجام پژوهش در یک لوله آزمایش ۵۰۰ میکرولیتر محیط BHI Broth (Brain Heart Infusion) (شرکت Merck، آلمان) حاوی عصاره مخمر به عنوان یک محیط غنی کننده و در لوله دیگر ۵۰۰ میکرولیتر متانول ریخته شد. در ادامه، دو سوآپ از مدفوع گرفته شد که هر یک در لوله ها قرار گرفت و ورتکس گردید. سوآپ موجود در لوله محیط BHI Broth حاوی عصاره مخمر پس از ۳۰ ثانیه و سوآپ موجود در لوله حاوی الکل پس از ۱ دقیقه (به منظور شوک دادن الکلی به سایر باکتری های موجود در مدفوع) روی محیط کلستریدیوم دیفیسیل آگار (CCFA) (شرکت Merck، آلمان) کشت داده شدند. پس از کشت نمونه ها در محیط CCFA و سپری شدن دوره انکوباسیون، در شرایط بی هوازی در جار بی هوازی حاوی گاز پک نوع A (شرکت Merck، آلمان) به مشاهده و بررسی پرگنه های مشکوک به کلستریدیوم دیفیسیل پرداخته شد. این پرگنه ها در محیط CCFA به رنگ سفید تا زرد به صورت محدب و گرد با حاشیه کاملاً

اندازه ۴۷۳ جفت باز بود. واکنش PCR ژن توکسین A در شرایط ۹۵ درجه ۴ دقیقه، ۹۵ درجه ۴۰ ثانیه، ۵۲ درجه ۴۰ ثانیه، ۷۲ درجه ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه پایانی ۵ دقیقه انجام شد. نمونه‌ها پس از انجام واکنش برای مشاهده روی چاهک ژل آگارز ۱/۵ درصد انتقال داده شدند. باید خاطر نشان ساخت که از ژن *tcdB* جهت تعیین ژن توکسین B کلستریدیوم دیفیسیل در سویه‌های این باکتری استفاده می‌شود که دارای اندازه ۲۷۲ جفت باز می‌باشد. واکنش PCR ژن توکسین B در شرایط ۹۵ درجه ۴ دقیقه، ۹۵ درجه ۴۰ ثانیه، ۵۲ درجه ۴۰ ثانیه، ۷۲ درجه ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه پایانی ۵ دقیقه انجام شد. نمونه‌ها پس از انجام واکنش برای مشاهده روی چاهک ژل آگارز ۲ درصد انتقال داده شدند.

این پرایمرها در نرم‌افزار CLC Sequence Viewer 8.0 (شرکت CLC bio، Aarhus، Denmark) زیر یکدیگر قرار گرفتند. برای ژن توکسین A، ۳۲ سکانس و برای توکسین B، ۲۵ سکانس از بانک اطلاعاتی NCBI استخراج گردید. در ادامه براساس نواحی ثابت هریک از این ژن‌ها، توالی‌های مورد نظر انتخاب شد و برای بررسی اختصاصیت در بخش Primer-BLAST بررسی و مشخص گردید که این پرایمرها بطور اختصاصی به ژن‌های مورد نظر متصل می‌شود. طبق پرایمرهای طراحی شده، برای توکسین A قطعه مورد نظر ۴۷۳ جفت باز و برای توکسین B قطعه ۲۷۲ جفت باز را تکثیر می‌دهد (جدول ۱). ژن *tcdA* جهت تعیین توکسین A کلستریدیوم دیفیسیل در تمام سویه‌ها شناسایی گردید که دارای

جدول شماره ۱: پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

نام پرایمر	توالی اولیگونوکلئوتید	نقطه ذوب	طول محصول	منابع
cdd3F	TCCAATATAATAAATTAGCATTCCA	۵۵	622 جفت باز	۱۴
cdd3R	GGCTATTACACGTAATCCAGATA	۵۵		
tcdAF	GGACTAGACCGTTGGGAAATG	۵۲	473 جفت باز	در این مطالعه
tcdAR	GTGGAGCGAGCTTCTGGC	۵۲		
tcdBF	GAAACTAAAAAAGCATGCAAAGG	۵۲	272 جفت باز	در این مطالعه
tcdBR	CCCTCAAATTCTCATCCAAAG	۵۲		

پس از حل کردن کلنی با ورتکس، سوسپانسیون معادل لوله مک‌فارلند از باکتری ساخته شد. سپس کشت در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک ونکومايسين با غلظت ۲-۰/۰۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر، محیط حاوی مترونیدازول با غلظت ۰/۰۱۵-۰/۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و محیط حاوی ۰/۰۱۵-۰/۰۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر کلیندامایسین انجام شد و پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه در شرایط بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری گردیدند. طبق استانداردهای CLSI، غلظت بیش از ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای ونکومايسين و مترونیدازول مقاوم بوده و غلظت بیش از ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای کلیندامایسین مقاوم محسوب می‌گردد (۱۶).

تعیین MIC (Minimum Inhibitory Concentration) به روش آگار دایلوژن

پس از جداسازی نمونه‌ها طبق استانداردهای CLSI (Laboratory Standards Institute & Clinical) از روش آگار دایلوژن برای انجام آزمون MIC استفاده شد. جهت بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها از آنتی‌بیوتیک‌های مترونیدازول، ونکومايسين و کلیندامایسین استفاده گردید. برای انجام این آزمایش، ابتدا ایزوله‌های ذخیره شده در محیط Broth Meat Cooked (Merck، آلمان) روی محیط کلستریدیوم دیفیسیل غنی گشته و با ۷ درصد خون گوسفند کشت داده شدند. پس از رشد این جدایه‌ها، تعداد مناسبی از کلنی باکتری در داخل لوله حاوی نرمال سالین انتقال داده شد.

آنالیز آماری

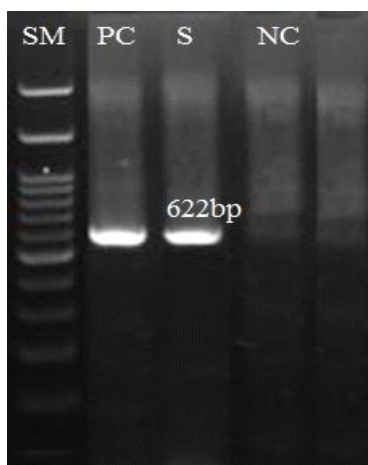
بررسی ارتباط بین حضور ژن، بخش بیماران بستری و وجود مقاومت با استفاده از نرم افزار SPSS 21 و آزمون کای دو صورت گرفت. سطح معناداری نیز معادل ($P < 0.05$) در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

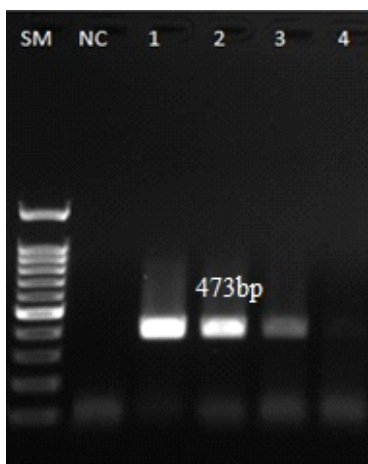
در این مطالعه ۱۱ ایزوله به روش فنوتیپی جدا شد. ایزوله‌هایی که در محیط کشت CCFA دارای رنگ سفید تا زرد به صورت محذب و گرد با حاشیه کاملاً مضرس و قطر ۳-۱ میلی متر با بوی کلونی مشابه با بوی اسطبل اسب بودند به عنوان کاندید کشت مثبت انتخاب شدند. آزمون پرولین آمینوپتیداز هر ۱۱ ایزوله مثبت بود. این ۱۱ نمونه کشت مثبت به لحاظ تأیید قطعی حضور کلستریدیوم دیفیسیل تحت PCR قرار گرفتند.

نتایج PCR

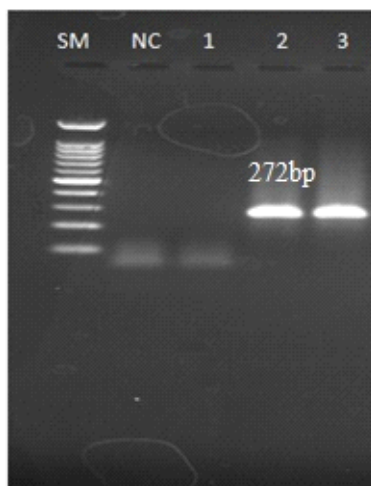
بر اساس نتایج PCR برای بررسی حضور ژن *cdd3* از مجموع ۶۸ نمونه مدفوع، ۱۱ کشت مثبت به دست آمد. ۱۱ ایزوله کلستریدیوم دیفیسیل از نظر حضور ژن *cdd3* مثبت بودند. این ژن به منظور تعیین هویت کلستریدیوم دیفیسیل به عنوان یک ژن حفظ شده در تمام سویه‌ها شناسایی می‌شود و محصول PCR آن دارای قطعه ۶۲۲ جفت باز نوکلئوتید می‌باشد (شکل ۱). مطابق با واکنش PCR، هر ۱۱ ایزوله دارای توکسین B بودند که از این تعداد، شش ایزوله (۵۴/۵۴ درصد) برای هر دو توکسین A و B مثبت گزارش شدند (B^+A^-). شایان ذکر است که ایزوله B^+A^- مشاهده نشد (شکل‌های ۲ و ۳).



شکل شماره ۱: نتایج الکتروفورز حضور ژن *cdd3* در ایزوله‌های کشت مثبت (از چپ به راست: سایز مارکر ۱۰۰ جفت باز؛ PC: کنترل مثبت؛ S: ایزوله؛ NC: کنترل منفی)



شکل شماره ۲: نتایج تکثیر توالی با استفاده از PCR برای ژن *tcdA* (از چپ به راست: سایز مارکر ۱۰۰ جفت باز؛ NC: کنترل منفی؛ نمونه ۱: کنترل مثبت؛ نمونه‌های ۲ و ۳: ایزوله کلستریدیوم دیفیسیل؛ نمونه ۴: کنترل منفی)



شکل شماره ۳: نتایج تکثیر توالی با استفاده از PCR برای ژن *tcdB* (از چپ به راست: سایز مارکر ۱۰۰ جفت باز؛ NC: کنترل منفی؛ نمونه ۱: نمونه منفی؛ نمونه ۲: کنترل مثبت؛ نمونه ۳: ایزوله دارای این ژن)

نتایج تعیین MIC برای داروهای رایج درمانی

در ۱۱ نمونه جدا شده، بیشترین میزان مقاومت نسبت به کلیندامایسین و بیشترین میزان حساسیت نسبت به ونکومایسین مشاهده شد. تمام ایزوله‌ها (۱۰۰ درصد) نسبت به ونکومایسین حساس بودند و چهار ایزوله (۳۶/۳۶ درصد) نسبت به مترونیدازول و پنج ایزوله (۴۵/۴۵ درصد) نسبت به کلیندامایسین مقاوم بودند (جدول ۲). مقاومت در بین بیماران بستری در بخش عفونی که بیش از پنج روز در بیمارستان بستری بودند، بیشتر بود و تمامی

ایزوله‌های مقاوم به مترونیدازول و کلیندامایسین از نمونه‌های مدفوع این بیماران جدا سازی شدند ($P < 0/05$). از نظر حضور ژن و ارتباط آن با مقاومت، تمامی ایزوله‌ها دارای ژن توکسین B بودند ($P < 0/05$). در این مطالعه در چهار ایزوله مقاوم به مترونیدازول، توکسین A و در یک مورد از ایزوله‌های حساس به ونکومایسین و یک مورد از ایزوله‌های مقاوم به کلیندامایسین، توکسین A مشاهده شد. بر مبنای نتایج، ارتباط معناداری بین حضور توکسین A و مقاومت وجود نداشت.

جدول شماره ۲: الگوی مقاومتی ایزوله‌های کلستریدیوم دیفیسیل جدا شده در این مطالعه

ونکومایسین تعداد=۱۱		مترونیدازول تعداد=۱۱		کلیندامایسین تعداد=۱۱	
MIC	تعداد	MIC	تعداد	MIC	تعداد
(میکروگرم بر میلی لیتر)		(میکروگرم بر میلی لیتر)		(میکروگرم بر میلی لیتر)	
۵	۴	۵	۴	۱	۱
۱	۷	۱	۳	۲	۲
۲	۰	۲	۰	۴	۳
۴	۰	۴	۲	۸	۰
۸	۰	۸	۲	۱۶	۵

داشتند. در بررسی‌های انجام شده در اسپانیا در ارتباط با ۴۱۵ باکتری کلستریدیوم جدا شده در دوره‌ای هشت ساله، ایزوله‌هایی با حساسیت کاهش یافته نسبت به ونکومايسين مشاهده شدند. در این مطالعه ۳/۱ درصد از ایزوله‌ها به شکل نیمه حساس گزارش شدند و ۲۶ ایزوله (۶/۳ درصد) نسبت به مترونیدازول مقاوم بودند (۲۴). کلستریدیوم دیفیسیل مهم‌ترین عامل شناسایی شده اسهال و کولیت غشای کاذب وابسته به مصرف آنتی‌بیوتیک و عامل بیماری نازوکومیال است. این باکتری با استفاده از آزمون‌های سرولوژی، محیط‌های کشت و آزمون‌های روتین آزمایشگاهی قابل جداسازی می‌باشد (۲۳). تظاهرات بالینی این باکتری متفاوت بوده و از بیماری بدون علائم تا مگا کولون سمی را شامل می‌شود. این ارگانيسم در کشت مغزی، توکسین‌های بالقوه‌ای را ایجاد می‌کند. این باکتری در مدفوع نوزادان سالم نیز مشاهده شده است. در دهه‌های ۱۹۶۰ و ۱۹۷۰، کولیت غشای کاذب به یک مشکل بالینی مهم تبدیل شد. تقریباً تمام آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توانند عفونت کلستریدیوم دیفیسیل را به وجود آورند؛ اما آنتی‌بیوتیک‌های با طیف گسترده همچون لینکومايسين و کلیندامايسين تقریباً در ۱۰ درصد از بیماران، اسهال و در ۱ درصد کولیت غشای کاذب را ایجاد می‌کنند. شایان ذکر است که بیماری در ۱ تا ۵ درصد شدید بوده و منجر به کولکتومی یا مرگ می‌شود. رویدادهایی که در ادامه ذکر می‌گردند، در کولیت غشای کاذب رخ می‌دهند: تخریب فلورای نرمال باکتری کولون، کلونی‌سازی با باکتری کلستریدیوم دیفیسیل و ترشح توکسین‌هایی که به مخاط آسیب می‌زنند. کولون انسان حاوی ۵۰۰ نوع باکتری است. مدفوع نرمال نیز حاوی ۱۰۱۲ باکتری در هر گرم می‌باشد. در این راستا، در مطالعه‌ای که توسط فولادی و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام گرفت، با استفاده از روش PCR، میزان ۲/۲ درصد نمونه‌های بیماران از مجموع ۱۳۶ نمونه مدفوع جمع آوری شده از مراکز ICU (Intensive Care Unit) از نظر وجود این باکتری مثبت بودند (۱۴). انتقال بیماری به صورت مدفوعی - دهانی رخ می‌دهد. کلستریدیوم دیفیسیل، اسپورهای مقاوم به گرمایی را تولید می‌کند که چند ماه تا چند سال در محیط دوام می‌آورند. اسپورها در محیط اسیدی معده زنده می‌مانند و در روده به شکل زایشی تبدیل می‌شوند.

با توجه به رژیم‌های تجویز دارو علیه اسهال‌های ایجاد شده در اثر مصرف آنتی‌بیوتیک در ایران و نیز الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به نظر می‌رسد که مترونیدازول همچنان یک داروی اثرگذار بر رفع عفونت‌های ناشی از باکتری کلستریدیوم دیفیسیل در ایران می‌باشد؛ اما به منظور جلوگیری از گسترش جدایه‌های مقاوم و ایجاد عفونت‌های باکتریایی، نظارت مستمر بر چگونگی وضعیت مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها امری ضروری به نظر می‌رسد. با بررسی‌های انجام شده مشخص شده است که مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند یکی از مهم‌ترین عوامل اثرگذار بر ایجاد اسهال باشد. بهترین درمان در راستای توقف این نوع اسهال، مصرف مترونیدازول و ونکومايسين است که در حال حاضر سویه‌های مقاوم به این آنتی‌بیوتیک‌ها را در سراسر دنیا دچار چالش ساخته است. مترونیدازول یک نوع آنتی‌بیوتیک از خانواده نیتروایمیدازول می‌باشد که به طور معمول برای درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های بی‌هوازی و پروتوزوآ به کار رفته و به عنوان یک داروی انتخابی برای درمان عفونت‌های ابتدایی ناشی از این باکتری مورد استفاده قرار می‌گیرد. متداول‌ترین داروهای آنتی‌بیوتیکی برای درمان عفونت حاصل از کلستریدیوم دیفیسیل، وانکومايسين و مترونیدازول می‌باشند. باید خاطر نشان ساخت که میزان مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها در حال افزایش بوده و در اسپانیا حدود ۶۳ درصد (نسبت به مترونیدازول) گزارش شده است (۲۴). در بررسی‌های Wong و همکاران، مقاومت بالایی در باکتری جدا شده نسبت به داروهای رایج نشان داده شد (۲۵). میزان مقاومت در مقابل این آنتی‌بیوتیک در کشورهای مختلف، متفاوت می‌باشد؛ برای مثال در پژوهشی در ایران، ۳۵ ایزوله کلستریدیوم دیفیسیل از ۲۵۰ نمونه مدفوعی جداسازی گردید که ۱۸ مورد مقاوم به کلیندامايسين، دو مورد مقاوم به مترونیدازول و سه مورد مقاوم به ونکومايسين بودند. در این مطالعه میزان مقاومت در مقابل کلیندامايسين معادل ۵۱/۴۲ درصد گزارش شد که تقریباً مشابه با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد (۲۳). در پژوهش حاضر تمامی ایزوله‌ها (۱۰۰ درصد) نسبت به ونکومايسين حساس بودند. علاوه بر این، چهار ایزوله (۳۶/۳۶ درصد) در مقابل مترونیدازول و پنج ایزوله (۴۵/۴۵ درصد) در مقابل کلیندامايسين مقاومت

به‌عنوان استاندارد برای این باکتری محسوب می‌شود؛ اما این روش امکان جداسازی سویه‌های توکسین‌زا از غیر توکسین‌زا را ندارد. باید توجه داشت که روش‌های سنتی بسیار وقت‌گیر و زما نبر می‌باشند (۲۰-۱۹). در این راستا در مطالعه‌ای که توسط اصلانی و همکاران در ارتباط با ۹۸ نمونه مدفوع از بیماران مشکوک به عفونت کلستریدیوم دیفیسیل در بیمارستان‌های تهران انجام شد، نمونه‌ها پس از جداسازی روی محیط کشت CCFA کشت داده شدند و باکتری‌ها جداسازی گردیدند. در این مطالعه از پرایمرهای عمومی و اختصاصی برای توکسین‌های A و B استفاده شد. بر مبنای نتایج از ۳۹ نمونه مثبت، ۱۵ سویه توکسین‌زا تشخیص داده شدند که ۱۲/۲ درصد از نمونه‌ها هر دو توکسین را داشتند، دو سویه دارای توکسین A و یک سویه دارای توکسین B بودند (۲۱، ۲۲). در این مطالعه جهت تشخیص کلستریدیوم دیفیسیل از کشت ارگانسیم در محیط CCFA و سپس انجام PCR در مورد ژن *cdd3* یا *Universal* جهت تشخیص کلستریدیوم دیفیسیل استفاده شد و نتیجه قطعی در زمینه تشخیص باکتری بیان گردید. در ادامه جهت تعیین سویه‌های توکسیژنیک، PCR برای ژن‌های توکسین انجام گردید. PCR روشی برای تشخیص سریع باکتری کلستریدیوم دیفیسیل بوده که در زمان کمتری انجام می‌شود و از اختصاصیت بالایی برخوردار می‌باشد. در این مطالعه با استفاده از روش‌های کشت، از ۶۸ نمونه مدفوع، ۱۱ نمونه جداسازی شد؛ این درحالی است که بر مبنای روش PCR، ۱۶ نمونه دارای ژن مربوط به این باکتری بودند. در این پژوهش براساس حضور ژن‌های توکسین A و B، باکتری مورد مطالعه قرار گرفت و برای هر یک از ژن‌ها پرایمرهای اختصاصی طراحی گردید. در جدایه‌ها چهار باکتری دارای توکسین A و سه باکتری دارای توکسین B بودند و هر شش باکتری هر دو توکسین A و B را داشتند. PCR یک آزمون قوی در روش‌های آزمایشگاهی است که برای تشخیص ارگانسیم‌های پاتوژنیک متنوع به کار می‌رود؛ به طوری که برای تأیید اولیه و تشخیص سریع سویه‌های تولیدکننده توکسین و مدیریت بهینه بیمارانی که دچار عفونت‌های وابسته به کلستریدیوم دیفیسیل هستند و همچنین برای جداسازی سویه‌های پاتوژن از سویه‌های غیر پاتوژن مورد استفاده قرار می‌گیرد.

آلودگی با کلستریدیوم دیفیسیل در بیمارستان بسیار شایع است. این ارگانسیم را می‌توان از زمین، تخت خواب و اثاثیه بیمارستان جدا کرد؛ به‌ویژه در اتاق‌های بیمارستان و یا بخش‌هایی که بیماران مبتلا به عفونت کلستریدیوم دیفیسیل در آن بستری هستند. کارکنان پزشکی این باکتری را با دستان خود، زیر انگشت خود و یا در استتوسکوپ‌ها به مکان‌های مختلف حمل می‌کنند؛ اما حاملین مدفوعی در این کارکنان نادر هستند. شایان توجه است که کلنی‌سازی در نوزادان شایع می‌باشد؛ اما با وجود اینکه میزان سیتوتوکسین موجود در مدفوع نوزادان مشابه با بزرگسالانی است که به کولیت شدید دچار هستند، اغلب این بیماری در نوزادان بدون علامت است (۱۵). کلستریدیوم دیفیسیل باعث بروز اختلالات گوارشی و کولیت وابسته به آنتی‌بیوتیک می‌گردد. جایگاه استقرار باکتری که توأم با بروز علائم بیماری است، در قسمت‌های انتهایی دستگاه گوارش می‌باشد. عفونت ناشی از کلستریدیوم دیفیسیل می‌تواند به‌عنوان یک مشکل عمده در برخی از بیمارستان‌ها به‌ویژه در مراکزی که دارای بخش‌های شیمی درمانی بوده و یا بیماران نیازمند بستری طولانی مدت دارند، مطرح باشند. فاکتورهای مستعدکننده ابتلا به CDAD عبارت هستند از: سن بالا، بیماری‌های زمینه‌ای، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و بستری بودن در بیمارستان به مدت طولانی (۱۶). هرچند در گذشته اعتقاد بر این بود که منشأ این ارگانسیم داخلی (اندوژن) می‌باشد؛ اما شیوع اپیدمی‌های متعدد از CDAD در بیمارستان‌های مختلف نشان می‌دهد که منشأ این ارگانسیم سایر بیماران، کارکنان و یا محیط بیمارستان می‌باشد. به خوبی اثبات شده است که این عفونت یک عفونت بیمارستانی می‌باشد (۱۷). نتایج برخی از مطالعات نشان می‌دهند که پس از گذشت چهار هفته از بستری شدن در بیمارستان، کلستریدیوم دیفیسیل از مدفوع بیش از نیمی از بیماران قابل جداسازی می‌باشد. در برخی از مطالعات گزارش گردیده است که بیش از ۲۰ درصد از اسهال‌های بیمارستانی ناشی از کلستریدیوم دیفیسیل می‌باشد (۱۸). پس از جداسازی باکتری به‌عنوان یک پاتوژن و به دلیل اهمیت بیماری‌زایی آن، روش‌های زیادی برای شناسایی آن به کار گرفته شده است. روش کشت بر روی محیط جامد که برای اولین بار در سال ۱۹۷۹ با استفاده از محیط کشت CCFA به کار گرفته شد،

فراوانی بالای مقاومت در مقابل آنتی‌بیوتیک‌های معمول و رایج در ایران در جدایه‌های بالینی کلستریدیوم دیفیسیل می‌تواند خبر نگران‌کننده‌ای در این زمینه باشد.

با وجود اینکه اطلاعات کافی در مورد میزان عفونت‌های ناشی از این باکتری در کشورهای جهان سوم وجود ندارد؛ اما گزارشات در سایر مناطق از افزایش روزافزون عفونت با این باکتری و نیز پیدایش مقاومت خبر می‌دهند (۲۶).

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر برگرفته از یک طرح تحقیقاتی به شماره ۱۵۴۹۵۰۸۲۴۰۰۲۴ می‌باشد که با حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم انجام شده است.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی را گزارش نکرده‌اند.

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان‌دهنده مقاومت دارویی نسبت به مترونیدازول و کلیندامایسین بودند. بر مبنای نتایج، جدایه‌ها نسبت به ونکومایسین حساس بودند.

References:

- Rupnik M, Brazier JS, Duerden BI, Grabnar M, Stubbs SL. Comparison of toxinotyping and PCR ribotyping of *Clostridium difficile* strains and description of novel toxinotypes. *Microbiology* 2001;147(Pt 2):439-47. PMID: 11158361
- Wilcox M, Minton J. Role of antibody response in outcome of antibiotic-associated diarrhoea. *Lancet* 2001;357(9251):158-9. PMID: 11213086
- Avbersek J, Janezic S, Pate M, Rupnik M, Zidaric V, Logar K, et al. Diversity of *Clostridium difficile* in pigs and other animals in Slovenia. *Anaerobe* 2009;15(6):252-5. PMID: 19632350
- Doosti A, Mokhtari-Farsani A. Study of the frequency of *Clostridium difficile* tcdA, tcdB, cdtA and cdtB genes in feces of calves in south west of Iran. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2014;13:21. PMID: 24903619
- Novogrudsky A, Plaut AG. The bacterial flora of the healthy gastrointestinal tract: colonization of the human colon. *Gastroenterology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003. P. 584-5. Link
- Kato H, Yokoyama T, Kato H, Arakawa Y. Rapid and simple method for detecting the toxin B gene of *clostridium difficile* in stool specimens by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol* 2005;43(12):6108-12. PMID: 16333105
- Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, Pepin J, et al. Clinical practice guidelines for *clostridium difficile* infection in adults update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010;31(5):431-55. Link
- Fooladi AA, Rahmati S, Abadi JF, Halabian R, Sedighian H, Soltanpour MJ, et al. Isolation of *Clostridium difficile* and detection of A and B toxins encoding genes. *Int J Entric Pathog* 2014;2:e15238. Link
- Silva RO, Santos RL, Pires PS, Pereira LC, Pereira ST, Duarte MC, et al. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from dogs in Minas Gerais, Brazil. *Braz J Microbiol* 2013;44(1):133-7. PMID: 24159295
- Alcalá L, Marín M, Madrid M, Domínguez-García E, Catalán P, Peláez MT, et al. Comparison of ImmunoCard Toxins A&B and the new semiautomated Vidas *Clostridium difficile* Toxin A&B tests for diagnosis of *C. difficile* infection. *J Clin Microbiol* 2010;48(3):1014-5. Link

11. Cheng AC, Ferguson JK, Richards MJ, Robson JM, Gilbert GL, McGregor A, et al. Australasian Society for Infectious Diseases guidelines for the diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* infection. *Med J Aust* 2011;194(7):353-8. PMID: 21470086
12. Sunenshine RH, McDonald LC. *Clostridium difficile*-associated disease: new challenges from an established pathogen. *Cleve Clin J Med* 2006;73(2):187-97. PMID: 16478043
13. Shayganmehr FS, Darbouyi M, Aslani MM, Alebouyeh M, Azimirad M, Zali MR. Frequency of resistance to common antibiotics in Iranian *clostridium difficile* clinical isolates. *J Isfahan Med Sch* 2013;30(217):2160-8. Link
14. Peng Z, Jin D, Kim HB, Stratton CW, Wu B, Tang YW, et al. Update on antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*: resistance mechanisms and antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 2017;55(7):1998-2008. PMID: 28404671
15. Aliramezani A, Talebi M, Baghani A, Hajabdolbaghi M, Salehi M, Abdollahi A, Afhami S, Marjani M, Golbabaei F, Boroumand MA, Sarrafnejad A. Pathogenicity locus determinants and toxinotyping of *Clostridioides difficile* isolates recovered from Iranian patients. *New microbes new infect.* 2018; Sep 1;25:52-7. PMID: 30094031
16. 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;6(1):58. PMID: 28603609
17. Zidaric V, Beigot S, Lapajne S, Rupnik M. The occurrence and high diversity of *Clostridium difficile* genotypes in rivers. *Anaerobe* 2010;16(4):371-5. PMID: 20541023
18. Janezic S, Ocepek M, Zidaric V, Rupnik M. *Clostridium difficile* genotypes other than ribotype 078 that are prevalent among human, animal and environmental isolates. *BMC Microbiol* 2012;12:48. PMID: 22452857
19. Hall IC, O'Toole EL. Intestinal flora in new-born infants with a description of a new pathogenic anaerobe *Bacillus difficilis*. *Am J Dis Child* 1935;49(2):390-402. Link
20. National *Clostridium difficile* Standards Group. National *Clostridium difficile* Standards Group: report to the Department of Health. *J Hosp Infect* 2004;56(Suppl 1):1-38. PMID: 15129935
21. Persson S, Torpdahl M, Olsen KE. New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (tcdA) and toxin B (tcdB) and the binary toxin (cdtA/cdtB) genes applied to a Danish strain collection. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(11):1057-64. PMID: 19040478
22. Lemee L, Dhalluin A, Testelin S, Mattrat MA, Maillard K, Lemeland JF, et al. Multiplex PCR Targeting tpi (Triose Phosphate Isomerase), tcdA (Toxin A), and tcdB (Toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 2004;42(12):5710-4. PMID: 15583303
23. Kouhsari E, Douraghi M, Krutova M, Yaseri HF, Talebi M, Baseri Z, et al. The emergence of metronidazole and vancomycin reduced-susceptibility in *Clostridium difficile* isolates in Iran. *J Global Antimicrob Resist* 2019;18:28-33. PMID: 30703583
24. Pelaez T, Alcalá L, Alonso R, RodríguezCreixems M, García-Lechuz JM, Bouza E. Reassessment of *Clostridium difficile* susceptibility to metronidazole and vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(6):1647-50. PMID: 12019070
25. 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):1-6. PMID: 10342100
26. Poilane I, Fantinato C, Cruaud P, Collignon A. Epidemiological study of *Clostridium difficile* strains isolated in Jean-Verdier-Rene-Muret hospitals from 2001 to 2007. *Pathol Biol* 2008;56(7-8):412-6. PMID: 18842360