Original Article

Drug Resistance Pattern of Toxigenic Clostridium difficileIsolated from Patients with Diarrhea to Conventional Therapeutic Drugs with Chronic

Mohsen Zargar[1*], Mohammad Reza Ghadir[2], Ali Javadi[3], Abbas Morovvati[4], Fariba Dastjani Farahani[5]

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

[2]*Department of Gastroenterology, Qom University of Medical Science, Qom, Iran.*

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

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

[5]*Department 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

International License Creative Commons Attribution License 4.0

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره سیزدهم، شماره یازدهم، بهمن ۹۸
صفحه ۱۳ الی ۲۳

مقاله پژوهشی
(Original Article)

الگوی مقاومت دارویی کلستریدیوم دیفیسیل توکسیژنیک جداشده 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]

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

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

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

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

[۵]کارشناس 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

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 CCFA (Cefoxitin Cycloserine Fructose Agar) 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، ونکومایسین 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 ونکومایسین حساس بودند.

نتیجه‌گیری: الگوی مقاومت دارویی در ایزوله‌های به‌دست‌آمده همچنان داروی ونکومایسین را به‌عنوان انتخاب درمانی معرفی می‌کند.

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

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 difficileIsolated from Patients with Diarrhea to Conventional Therapeutic Drugs with Chronic. Qom Univ Med Sci J 2020;13(11):12-23. [Full Text in Persian]

International License Creative Commons Attribution License 4.0

مقدمه

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 (۲-۱). آلودگی این باکتری با تبدیل اسپور باکتری به شکل رویشی و تولید توکسین در سیستم گوارشی بروز می نماید که می تواند 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 ایجادشده 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 درحال افزایش می‌باشد. علت این امر را نمی توان دقیقاً به پیدایش سوش‌های جدید از باکتری با ویژگی‌هایی که به آن‌ها اجازه کلونیزه‌شدن در حضور باکتری‌های طبیعی را می‌دهد، ربط داد. ممکن است فاکتورهای دیگری به غیر از مصرف آنتی‌بیوتیک ها 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 آنتی بیوتیک 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 سیتوتوکسیسیتی به‌عنوان روش رفرانس و روش آنزیم ایمونواسی که در اکثر آزمایشگاه‌ها به خوبی با روش رفرانس مطابقت دارد، استفاده می شود (۷). کشت مدفوع نیز می‌تواند برای جداسازی کلستریدیوم دیفیسیل مورد استفاده قرار بگیرد؛ اما وجود ارگانیسم در کشت مدفوع لزوماً به معنای وجود بیماری در آن زمان نیست؛ زیرا بیشتر از ۴ درصد از بالغین سالم می‌توانند حامل این ارگانیسم 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 نمی دهد (۱۰-۹). 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 (۱۲-۱۱). 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 انتروتوکسینی 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 ونکومایسین خوراکی هستند که طول درمان ۱۰ تا ۱۴ روز دارند. با وجود مشاهده مقاومت بالا در سویه‌های جداشده 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 روشPCR به‌عنوان روش شناسایی حساس و دقیق باکتری در این بیماران و همچنین بررسی و مشاهده میزان مقاومت جدایه‌های بالینی کلستریدیوم دیفیسیل علیه آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین، مترونیدازول و کلیندامایسین انجام شد. رژیم درمانی مرسوم برای درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری، استفاده از مترونیدازول و ونکومایسین به مدت ۱۰ تا ۱۴ روز می‌باشد (۱۳). از آنجایی که مترونیدازول و ونکومایسین خط اول درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری هستند، شناخت مقاومت به این دو دارو از اهمیت بالایی برخوردار است.

International License Creative Commons Attribution License 4.0

در این راستا، هدف از انجام مطالعه حاضر علاوه بر شناسایی حضور ایزوله‌های توکسیژنیک کلستریدیوم دیفیسیل در بین افراد مبتلا به اسهال مزمن، بررسی مقاومت ایزوله‌ها نسبت به داروهای رایج درمانی می‌باشد.

روش بررسی

در پژوهش مقطعی حاضر (Cross Sectional) ۶۸ نمونه مدفوعی از بیماران مبتلا به اسهال مزمن و آبکی ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک بستری‌شده در بخش‌های عفونی و جراحی مردان و زنان بیمارستان‌های "کامکار"، "بهشتی" و "گلپایگانی" شهر قم که بیش از یک هفته اسهال آبکی همراه با درد شکمی داشتند، جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها در ظروف مخصوص نمونه‌گیری جمع‌آوری شدند و طی حداکثر دو ساعت به آزمایشگاه منتقل گردیدند. تمامی نمونه‌ها به سرعت در محیط CCFA (شرکت Merck، آلمان) کشت داده شدند. با توجه به اینکه کلستریدیوم دیفیسیل یک باکتری اسپوردار می‌باشد، به‌منظور کاهش میزان آلودگی فلور باکتریایی در نمونه‌های مدفوع از دو روش استفاده شد: استفاده از حرارت (دمای ۶۰-۵۵ درجه سانتی‌گراد 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 به‌عنوان یک محیط غنی‌کننده و در لوله دیگر ۵۰۰ میکرولیتر متانول ریخته شد. در ادامه، دو سوآپ از مدفوع گرفته شد که هریک در لوله‌ها 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 (به‌منظور شوک‌دادن الکلی به سایر باکتری‌های موجود در مدفوع) روی محیط کلستریدیوم دیفیسیل آگار (CCFA) (شرکت Merck، آلمان)کشت داده شدند. پس از کشت نمونه‌ها در محیط CCFA و سپری‌شدن دوره انکوباسیون، در شرایط بی‌هوازی در جار بی‌هوازی حاوی گاز پک نوع A (شرکت Merck، آلمان) به مشاهده و بررسی پرگنه‌های مشکوک به کلستریدیوم دیفیسیل پرداخته شد. این پرگنه‌ها در محیط CCFA به رنگ سفید تا زرد به‌صورت محدب و گرد با حاشیه کاملاً مضرس و با قطر ۳-۱ میلی‌متر قابل‌مشاهده می‌باشند. مورفولوژی پرگنه‌های کلستریدیوم دیفیسیل در ارتباط با محیط‌های مختلف، بسیار متفاوت می‌باشد. در این مطالعه در مرحله اول از کلونی‌های مشکوک، لام تهیه گردید و پس از رنگ‌آمیزی گرم مورد بررسی قرار گرفت. اگر در طول انکوباسیون اسپور تشکیل شود، اسپورها به‌صورت بیضی با هاله‌ای شفاف نزدیک به انتهای باکتری و اندکی بزرگتر از عرض باکتری مشاهده می‌شوند. در پژوهش حاضر از آزمون بیوشیمیایی پرولین آمینوپپتیداز برای شناسایی استفاده گردید (۱۴). یکی دیگر از ویژگی‌های اولیه در تشخیص مقدماتی باکتری، بوی کلونی است که شبیه به بوی اسطبل اسب می‌باشد (۱۴). پس از تشخیص اولیه کلستریدیوم دیفیسیل به روش کشت، کلونی‌های 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 می‌شود، کنترل منفی برای چک‌کردن عدم آلودگی مواد PCR است در هر واکنش کنار آزمون‌ها انجام شد. باید خاطرنشان ساخت که ژن *cdd3* جهت تعیین هویت کلستریدیوم دیفیسیل به‌عنوان یک ژن حفظ‌شده در تمام سویه‌ها شناسایی می‌شود و دارای اندازه ۶۲۲ جفت باز می‌باشد. 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. نمونه‌ها پس از انجام واکنش به‌منظور مشاهده روی چاهک ژل آگارز ۱ درصد برده شدند (۱۵).

انجام PCR جهت تشخیص حضور ژن‌های *tcdA* و *tcdB*

در این مطالعه تشخیص حضور ژن‌های توکسین A و B در ارتباط با نمونه‌های کشت مثبت صورت گرفت. پرایمرهای این ژن‌ها با استفاده از توالی ثبت‌شده آن‌ها در بانک اطلاعاتی NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) جمع‌آوری گردید و

International License Creative Commons Attribution License 4.0

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 طراحی‌شده، 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 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 خاطرنشان 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.

جدول شماره ۱: پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

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

تعیین MIC (Minimum Inhibitory Concentration) به روش آگار دایلوشن

پس از جداسازی نمونه‌ها طبق استانداردهای CLSI (Laboratory Standards Institute & Clinical) از روش آگار دایلوشن برای انجام آزمون MIC استفاده شد. جهت بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها از آنتی‌بیوتیک های مترونیدازول، ونکومایسین و کلیندامایسین استفاده گردید. برای انجام این آزمایش، ابتدا ایزوله‌های ذخیره‌شده 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. پس از حل‌کردن کلنی با ورتکس، سوسپانسیون معادل لوله مک‌فارلند از باکتری ساخته شد. سپس کشت در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک ونکومایسین با غلظت ۲-۰/۰۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر، محیط حاوی مترونیدازول با غلظت ۰/۵-۰/۰۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و محیط حاوی ۳۲-۰/۰۱۵ 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 ونکومایسین و مترونیدازول مقاوم بوده و غلظت بیش از ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای کلیندامایسین مقاوم محسوب می‌گردد (۱۶).

International License Creative Commons Attribution License 4.0

آنالیز آماری

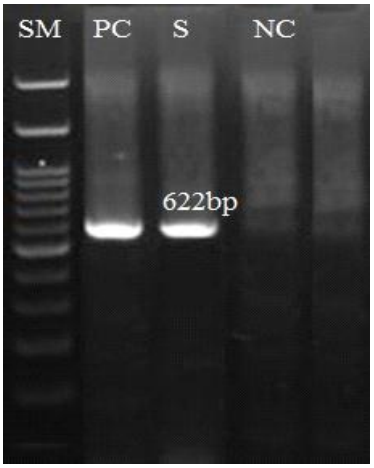
بررسی ارتباط بین حضور ژن، بخش بیماران بستری و وجود مقاومت با استفاده از نرم‌افزار SPSS 21 و آزمون کای دو صورت گرفت. سطح معناداری نیز معادل (P<۰/۰۵) در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

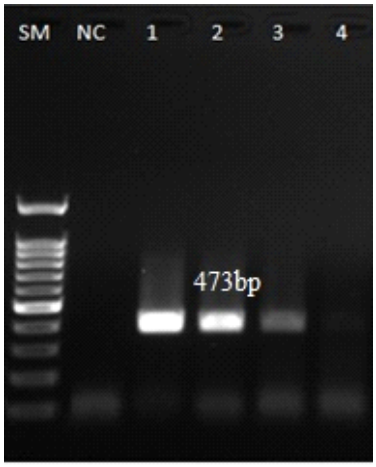
در این مطالعه ۱۱ ایزوله به روش فنوتیپی جدا شد. ایزوله‌هایی که در محیط کشت CCFA دارای رنگ سفید تا زرد به‌صورت محدب و گرد با حاشیه کاملاً مضرس و قطر ۳-۱ میلی‌متر با بوی کلونی مشابه با بوی اسطبل اسب بودند به‌عنوان کاندید کشت مثبت انتخاب شدند. آزمون پرولین آمینوپپتیداز هر ۱۱ ایزوله مثبت بود. این ۱۱ نمونه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

نتایج PCR

براساس نتایج PCR برای بررسی حضور ژن *cdd3* از مجموع ۶۸ نمونه مدفوع، ۱۱ کشت مثبت به‌دست آمد. ۱۱ ایزوله کلستریدیوم دیفیسیل از نظر حضور ژن cdd3مثبت بودند. این ژن به‌منظور تعیین هویت کلستریدیوم دیفیسیل به‌عنوان یک ژن حفظ‌شده 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).

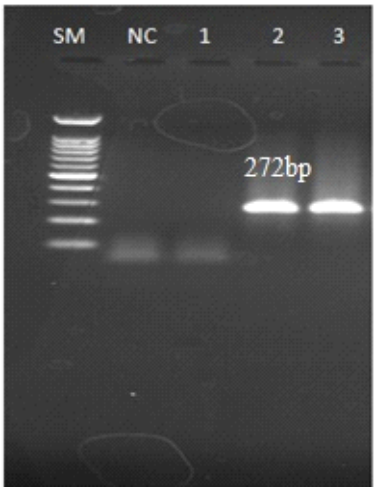


شکل شماره ۱: نتایج الکتروفورز حضور ژن *cdd3* در ایزوله‌های کشت مثبت (از چپ به راست: سایز مارکر ۱۰۰ جفت باز؛ PC: کنترل مثبت؛ S: ایزوله؛ NC: کنترل منفی)



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)

International License Creative Commons Attribution License 4.0



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 جداشده، 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 جداسازی شدند (P<۰/۰۵). از نظر حضور ژن و ارتباط آن با مقاومت، تمامی ایزوله‌ها دارای ژن توکسین B بودند (P<۰/۰۵). 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 توکسینA و مقاومت وجود نداشت.

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

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

International License Creative Commons Attribution License 4.0

بحث

با توجه به رژیم‌های تجویز دارو علیه اسهال‌های ایجادشده 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 به‌منظور جلوگیری از گسترش جدایه‌های مقاوم و ایجاد عفونت‌های باکتریایی، نظارت مستمر بر چگونگی وضعیت مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها امری ضروری به نظر می‌رسد. با بررسی‌های انجام‌شده مشخص شده است که مصرف آنتی‌بیوتیک ها می‌تواند یکی از مهم‌ترین عوامل اثرگذار بر ایجاد اسهال باشد. بهترین درمان در راستای توقف این نوع اسهال، مصرف مترونیدازول و ونکومایسین است که در حال حاضر سویه‌های مقاوم به این آنتی بیوتیک ها را در سراسر دنیا دچار چالش ساخته است. مترونیدازول یک نوع آنتی‌بیوتیک از خانواده نیترو‌ایمیدازول می‌باشد که به‌طور معمول برای درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های بی‌هوازی و پروتوزوآ به کار رفته و به‌عنوان 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، وانکومایسین و مترونیدازول می‌باشند. باید خاطرنشان 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 جداشده 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 کلیندامایسین، دو مورد مقاوم به مترونیدازول و سه مورد مقاوم به ونکومایسین بودند. در این مطالعه میزان مقاومت در مقابل کلیندامایسین معادل ۵۱/۴۲ درصد گزارش شد که تقریباً مشابه با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد (۲۳). در پژوهش حاضر تمامی ایزوله‌ها (۱۰۰ درصد) نسبت به ونکومایسین حساس بودند. علاوه‌براین، چهار ایزوله (۳۶/۳۶ درصد) در مقابل مترونیدازول و پنج ایزوله (۴۵/۴۵ درصد) در مقابل کلیندامایسین مقاومت داشتند. در بررسی‌های انجام‌شده در اسپانیا در ارتباط با ۴۱۵ باکتری کلستریدیوم جداشده در دوره‌ای هشت ساله، ایزوله‌هایی با حساسیت کاهش‌یافته نسبت به ونکومایسین 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 شناسایی‌شده 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 مگاکولون سمی را شامل می‌شود. این ارگانیسم 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 آنتی‌بیوتیک های با طیف گسترده همچون لینکومایسین و کلیندامایسین 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 به‌صورت 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.

International License Creative Commons Attribution License 4.0

آلودگی با کلستریدیوم دیفیسیل در بیمارستان بسیار شایع است. این ارگانیسم 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 انگشتر 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 طولانی‌مدت دارند، مطرح باشند. فاکتورهای مستعدکننده ابتلا به CDAD عبارت هستند از: سن بالا، بیماری‌های زمینه‌ای، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و بستری‌بودن در بیمارستان به مدت طولانی (۱۶). هرچند در گذشته اعتقاد بر این بود که منشأ این ارگانیسم داخلی (اندوژن) می‌باشد؛ اما شیوع اپیدمی‌های متعدد از CDAD در بیمارستان‌های مختلف نشان می‌دهد که منشأ این ارگانیسم 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 بستری‌شدن 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، به‌عنوان استانداردی 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 توکسسین‌های 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 (۲۲،۲۱). در این مطالعه جهت تشخیص کلستریدیوم دیفیسیل از کشت ارگانیسم 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 هریک 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. PCRیک آزمون قوی در روش‌های آزمایشگاهی است که برای تشخیص ارگانیسم‌های پاتوژنیک متنوع به کار می رود؛ به‌طوری که برای تأیید اولیه و تشخیص سریع سویه‌های تولیدکننده توکسین و مدیریت بهینه بیمارانی که دچار عفونت های وابسته به کلستریدیوم دیفیسیل هستند و همچنین برای جداسازی سویه‌های پاتوژن از سویه‌های غیر پاتوژن مورد استفاده قرار می‌گیرد.

International License Creative Commons Attribution License 4.0

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).

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه نشان‌دهنده مقاومت دارویی نسبت به مترونیدازول و کلیندامایسین بودند. بر مبنای نتایج، جدایه‌ها نسبت به ونکومایسین حساس بودند. فراوانی بالای مقاومت در مقابل آنتی‌بیوتیک‌های معمول و رایج در ایران در جدایه‌های بالینی کلستریدیوم دیفیسیل می‌تواند خبر نگران‌کننده‌ای در این زمینه باشد.

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 منافعی را گزارش نکرده‌اند.

References:

1. 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

2. Wilcox M, Minton J. Role of antibody response in outcome of antibiotic-associated diarrhoea. Lancet 2001;357(9251):158-9. PMID: 11213086

3. 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

4. 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

5. 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

6. 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

7. 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

8. 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

9. 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

10. 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

International License Creative Commons Attribution License 4.0

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 Bacillis 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, Alcala L, Alonso R, RodriguezCreixems M, Garcia-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

International License Creative Commons Attribution License 4.0