● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیستم، شمارهٔ ۲، ص ۱۳۷-۱۲۹، ۱۳۹۲

مقالهٔ پژوهشی

فراوانی سویه‌های سم‌زای کلستریدیوم دیفیسیل در بیماران بستری مبتلا به اسهال در تهران به روش PCR در سال ۱۳۸۹

امید عزیزی[۱]، محمدمهدی اصلانی[*۲]، معصومه عظیمی‌راد[۳]، مسعود آل‌بویه[۴]، سیدفضل الله‌موسوی[۵]، محمدرضا زالی[۶]

خلاصه

مقدمه: کلستریدیوم دیفیسیل عامل اسهال ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک، کولیت غشای کاذب و هچنین اسهال بیمارستانی است. هدف از این بررسی تعیین فراوانی سویه‌های توکسین‌زای کلستریدیوم دیفیسیل در نمونه‌های اسهالی می‌باشد.

روش: این بررسی بر روی ۹۸ نمونه مدفوع بیماران بستری مشکوک به عفونت کلستریدیوم دیفیسیل در بیمارستان‌های تهران از مرداد تا آذر ماه ۱۳۸۹ انجام شد. پس از کشت نمونه‌ها بر روی محیط CCFA (Cefoxitincycloserine fructose agar) و جداسازی کلونی‌های مشکوک، استخراج DNA صورت گرفت. با استفاده از پرایمر عمومی سویه‌های کلستریدیوم دیفیسیل شناسایی شد و پس از آن PCR برای دو ژن توکسین A و B، انجام شد.

یافته‌ها: از میان ۹۸ نمونه بررسی شده، در مجموع ۳۹ نمونه مثبت کلستریدیوم دیفیسیل به‌دست آمد. از این تعداد ۱۵ سویه (۱۵/۳٪) کلستریدیوم دیفیسیل توکسین‌زا تشخیص داده شدند. از این بین، ۱۲ سویه (۱۲/۲٪) دارای توکسین +A+B، ۲ سویه (۲٪) دارای توکسین -A+B و ۱ سویه (۱٪) دارای توکسین $^{+}$A-B بودند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که کلستریدیوم دیفیسیل عامل تعدادی از اسهال‌های بیمارستانی می‌باشد و آزمایشگاه‌ها باید به طور روتین آزمایش تشخیص کلستریدیوم دیفیسیل را در تشخیص نمونه‌های مشکوک به‌کار گیرند.

واژه‌های کلیدی: کلستریدیوم دیفیسیل، کولیت غشای کاذب، اسهال بیمارستانی، آنتی‌بیوتیک

۱. کارشناس ارشد، بخش میکروب‌شناسی، انستیتو پاستور ایران ۲. استاد، گروه میکروب شناسی، انستیتو پاستور ایران ۳.کارشناس علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۴. استادیار میکروب‌شناسی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۵. استادیار، گروه میکروب‌شناسی، انستیتو پاستور ایران ۶. استاد، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: mmaslani@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۱۱/۱۰ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۱/۶/۱۹ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۸/۱۷

مقدمه

کلستریدیوم دیفیسیل اولین بار در سال ۱۹۳۵ در نمونه مدفوع نوزادان تازه متولد شده و سالم که فاقد علایم گوارشی خاصی بودند شناسایی شد (۱). این باکتری یک باسیل گرم مثبت به طول ۵- میکرومتر است که در رنگ آمیزی گرم به‌صورت میله‌ای بلند با اسپور نزدیک به انتها رنگ می‌گیرد(۲). این باکتری عامل بیشتر موارد اسهال ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک(Antibiotic associated diarrhea: AAD) و تقریباً تمام موارد کولیت با غشای کاذب(Pseudomembranous colitis: PMC) است. همچنین یکی از شایع‌ترین عوامل اسهال بیمارستانی و عفونت‌های بی‌هوازی است. عفونت این باکتری محدود به‌دستگاه گوارش نیست و موارد اندک خارج روده‌ای نیز گزارش شده است (۳). چون سد دفاعی میکروفلور مانع از کلونیزاسیون کلستریدیوم دیفیسیل می شود، مصرف آنتی‌بیوتیک‌های گوناگونی مستعدکننده شرایط ابتلا به کلستریدیوم دیفیسیل هستند. مسیر تجویز آنتی‌بیوتیک، تعداد دفعات مصرف و محتوای میکروفلور گوارشی در این استعداد ابتلا نقش دارند (۴). عوامل مساعد کننده‌ای مانند جراحی عمومی، سرطان، بیماری‌های مزمن کلیوی و یا بستری شدن در بیمارستان و مصرف آنتی‌بیوتیک در ایجاد بیماری نقش دارند. این ارگانیسم در مدفوع بیماران بستری شده وجود دارد لذا محیط بیمارستان از آلودگی بالائی برخوردار بوده و یک باکتری کسب شونده از بیمارستان محسوب می‌شود (۵). میزان بروز AAD بسته به نوع آنتی‌بیوتیک مورد استفاده از ۵ تا ۳۹ درصدمتغیر می‌باشد. کلستریدیوم دیفیسیل عامل تقریباً ۲۵ درصد اسهال‌های همراه با تجویز آنتی‌بیوتیک و تقریبا تمام موارد کولیت با غشای کاذب مرتبط با مصرف آنتی‌بیوتیک است. بیماری ناشی از کلستریدیوم دیفیسیل تقریبا همیشه و در بیشتر موارد مرتبط با مصرف آنتی‌بیوتیک بوده و در بیمارستان و بیماران مسن دیده می‌شود (۶).

از سال ۱۹۹۱ تا ۲۰۰۳ در آمریکا افزایش ده برابری شیوع بیماری در گروه‌های سنی بالای ۶۵ سال و افزایش ابتلا به مگاکولون توکسیک گزارش شده است. مرگ و میر طی دوره ۳۰ روزه از ۴/۷ به ۱۳/۸ درصد رسیده است. در سال ۲۰۰۶ شیوع عفونت کلستریدیوم دیفیسیل (CDI: C. difficile infection) در آمریکا، از رقمی کمتر از ۱۵۰هزار نفر در سال به بیش از ۳۰۰هزار نفر رسید. شیوع عفونت در آلمان از ۱/۷ به ۳/۸ مورد از هر ۱۰۰ هزار نفر در سال ۲۰۰۲ به ۱۴/۸ مورد در سال ۲۰۰۶ رسیده است (۷).

کلستریدیوم دیفیسیل دو توکسین مهم به نام A و B تولید می‌کند. این توکسین‌ها نقش اصلی درویرولانس باکتری و سهم مهمی در بیماری‌زایی باکتری دارند. توکسین A متشکل از ۲۷۱۰ آمینواسید(308kDa) و توکسین B متشکل از ۲۳۶۶ آمینو اسید (270kDa) می‌باشد. ژن توکسین A (tcdA) و ژن توکسین B (tcdB) در فاصله نزدیکی به هم روی کروموزوم و در ناحیه‌ای به نام لوکوس بیماری‌زایی (Pathogenicity locus: PaLoc) قرار دارند. سویه‌های غیرتوکسین‌زا فاقد این ژن‌ها هستند (۸).

توکسین A دارای خاصیت انتروتوکسینی و توکسین B دارای خاصیت سایتوتوکسینی است (۹). هر دو برای موش کشنده‌اند اما توکسین A از این نظر، حدود ۴۰۰-۵۰ برابر سمیت بیشتری دارد (۱۰). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که هر دو توکسین فعالیت انتروتوکسینی مشابهی دارند. توکسین B در انسان قدرت بیماری‌زایی بالاتری دارد. هر دو توکسین mono-O-glucosyltransferase بوده و پروتئین‌های خانواده Rho متصل شونده به GTP را تغییر می‌دهند. پروتئین‌های Rho تغیرات القا شده خارج سلولی در حرکت، مرفولوژی و قطبیت سلول را تنظیم می‌کنند. توکسین‌های A و B تمام Rho GTPaseها شامل RhoA، Rac و Cdc42 را گلوکوزیله می‌کنند (۱۱).

روش‌های لاتکس آگلوتیناسیون جهت شناسایی آنتی‌ژن‌های کلستریدیوم دیفیسیل، تشخیص توکسین B (سیتوتوکسین) از طریق کشت سلولی، کانترایمونوالکتروفروز جهت تشخیص توکسین‌ها یا آنتی‌ژن‌های اختصاصی کلستریدیوم دیفیسیل در فیلتره مدفوع، آنزیم ایمنواسی (EIA) در تشخیص توکسین‌های کلستریدیوم دیفیسیل در نمونه‌های مدفوع،

ایمنوکروماتوگرافی (روش جدید تشخیص توکسین A در نمونه‌های مدفوع بر پایه اصول به‌کار رفته در کیت) و روش‌های مولکولی مثل PCR در تشخیص کلستریدیوم دیفیسیل به‌کار می‌روند (۱۲).

عفونت کلستریدیوم دیفیسیل به‌عنوان یک مشکل عمده در بعضی از بیمارستان‌ها به‌ویژه در مراکزی که دارای بخش‌های شیمی درمانی و یا بیمارانی که نیاز به بستری طولانی دارند، مطرح می‌باشد (۱۳). در حال حاضر کلستریدیوم دیفیسیل به‌عنوان عمومی‌ترین عامل اسهال بیمارستانی (۳۲٪) در نوزادان ۳-۱ ساله گزارش شده است (۱۴). هدف از این مطالعه تعیین میزان جداسازی کلستریدیوم دیفیسیل از نمونه‌های اسهالی با استفاده از روش PCR و بررسی اپیدمیولوژیک اسهال‌های ناشی از آن در محیط بیمارستان می‌باشد.

روش بررسی

از ۹۸ نمونه مدفوع بیماران بستری در بیمارستان‌های تهران (بیمارستان‌های امام خمینی،آیت الله طالقانی، امام حسین، بوعلی، خاتم الانبیاء، دکترشریعتی، مسیح دانشوری، علی اصغر، لقمان، مرکزطبی کودکان)که طی مرداد تا آذر ماه ۱۳۸۹ به دپارتمان بیماری‌های اسهالی منتقله از طریق آب و غذای مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به‌عنوان مرکز تشخیص کلستریدیوم دیفیسیل ارجاع داده شده بودند، استفاده شد. به فرد مراجعه کننده، پرسشنامه‌ای برای تکمیل مشخصات بیمار به واسطه پرستار و یا پزشک معالج داده می‌شد. در این پرسش‌نامه اطلاعاتی مانند نام، سن، بیمارستان محل بستری، بخش و مدت زمان بستری شدن در بیمارستان، مدت زمان شروع اسهال، مصرف آنتی‌بیوتیک، وجود بیماری زمینه‌ای و سایر اطلاعات جانبی مربوط به بیمار اخذ می‌گردید، تا در تجزیه و تحلیل نتایج مورد استفاده قرار گیرند. نمونه‌های گرفته شده در داخل ظرف مخصوص نمونه‌گیری حداکثر ظرف مدت ۴ ساعت به مرکز منتقل می‌شدند. نمونه‌ها به‌سرعت مورد آزمایش قرار می‌گرفتند. در غیر این‌صورت جهت پایداری فعالیت توکسین‌ها، نمونه‌های مدفوع، در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند. همچنین اگر کشت و یا تعیین توکسین‌های باکتری تأخیری چند روزه و یا بیشتر وجود داشت، نمونه‌های مدفوع در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند.

در این مطالعه برای تیمار نمونه‌ها در یک لوله آزمایش ۵۰۰ میکرو لیتر محیط عصاره مخمر extract 5%Yeast به‌عنوان یک محیط غنی‌کننده و در لوله دیگر ۵۰۰ میکرولیتر متانول (به‌منظور کاهش میزان آلودگی فلور باکتریایی در نمونه‌های مدفوع) ریخته می‌شد. دو سواپ از مدفوع گرفته شده، سپس هر کدام در لوله‌ها قرار داده می‌شد و سپس با دستگاه ورتکس مخلوط می‌شدند. سواپ عصاره مخمر پس از ۳۰ ثانیه و سواپ موجود در لوله حاوی الکل پس از یک دقیقه (برای ازبین بردن سایر باکتری‌های موجود در مدفوع) روی محیط کلستریدیوم دیفیسل آگار یا CCFA (Cefoxitincycloserine fructose agar) کشت داده می‌شدند. سپس محیط‌ها داخل جار بیهوازی قرار داده شده و با استفاده از گاز پک نوع A (Merck) و یا به کمک دستگاه Anoxomate (Mart,Netherland) شرایط بیهوازی در داخل جار فراهم می‌شد. پس از این مرحله جارها در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه می‌شدند. پس از پایان دوره انکوباسیون کلونی‌های مشکوک به کلستریدیوم دیفیسیل مورد آزمایش قرار می‌گرفتند. کلونی‌های کلستریدیوم دیفیسیل بر روی محیط CCFA به رنگ سفید تا زرد، به‌صورت محدب، گرد با حاشیه کاملاً مضرس و با قطر mm ۳-۱ قابل رؤیت هستند. از کلونی‌های مشکوک، لام تهیه شده و بعد از رنگ‌آمیزی گرم، مورد بررسی قرار می‌گرفتند. DNA کلونی‌های مورد نظر با استفاده از کیت QIA gene استخراج شد و سپس آزمایش PCR برای ژنcdd3 یا ژن Universal برای تشخیص قطعی کلستریدیوم دیفیسیل استفاده گردید.

برای انجام PCR برای ژن‌های tcdA،cdd3 و tcdB از پرایمرها(جدول ۱)، برنامه حرارتی (جدول۲) و Master Mix (جدول۳) در دستگاه ترموسایکلر(Eppendorf) استفاده شد (۱۵).

پس از انجام PCR، محصولات PCR در ژل آگارز با غلظت ۱٪ یا ۰/۵٪ در بافر TBE (Tris base boricacid EDTA) و در ولتاژ ۹۰ به مدت ۴۰ دقیقه الکتروفورز شده و پس از رنگ‌آمیزی در اتیدیوم بروماید 10µg/ml با دستگاه Gel documentation(Bio-Rad) مورد بررسی قرار گرفتند.

برای مشخص کردن اندازه تقریبی قطعات DNA الکتروفورز شده از مارکر bp ۱۰۰ استفاده شد.

در این مطالعه از سویه رفرانس VPI 10463 به‌عنوان کنترل مثبت برای ژن‌های Cdd3، tcdA، tcdB و از نرم افزار SPSS جهت انجام آنالیزهای آماری استفاده گردید.

جدول ۱. *مشخصات پرایمرهای استفاده شده در PCR برای سه ژن cdd3، tcdA و tcdB*

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی	وزن مولکولی (bp)	نام ژن
Tim6	۳´TCCAATATAATAAATTAGCATTCC ۵	۶۲۲	cdd3
TA1	۳´ ATGATAAGGCAACTTCAGTGG۵ ´	۶۲۴	tcdA
TB1	۳´ GAGCTGCTTCAATTGGAGAGA ۵	۴۱۲	tcdB

جدول۲. *زمان و شرایط مورد استفاده برای انجام PCR بر حسب نوع ژن*

step	Temp. (0C)			Time (Min)		
	Cdd3	tcdA	tcdB	Cdd3	tcdA	tcdB
Initial denaturation	۹۵	۹۵	۹۵	۵	۵	۵
Denaturation	۹۵	۹۵	۹۵	۱	۱	۱
Annealing	۵۸	۵۸	۵۸	۱	۱	۱
Extension	۷۲	۷۲	۷۲	۱/۵	۱/۲	۱/۲
Final Extension	۷۲	۷۲	۷۲	۱۰	۵	۵
Cycle number	۴۲	۳۲	۳۲			

جدول ۳. *Master Mix استفاده شده برای PCR بر حسب نوع ژن*

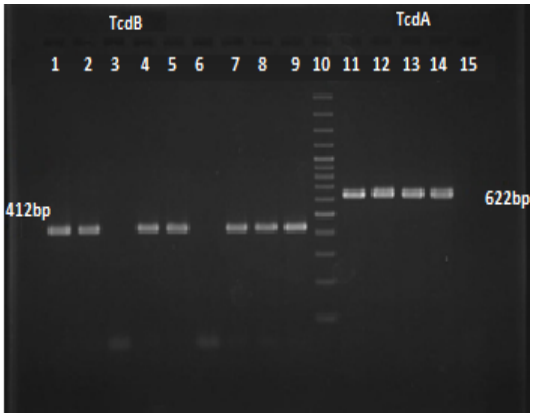
	Cdd3	tcdA	tcdB
D.D.W	µl۱۶/۳	۱۶/۱µl	۱۷/۱ µl
10X PCR buffer	۲/۵µl	۲/۵µl	۲/۵ µl
MgCl2(50mM)	۱/۵µl	۱µl	۱ µl
dNTP mix(25mM)	./۵µl	۱µl	۱ µl
Primer-F(20pM)	./۵µl	۱µl	./۵µl
Primer-R(20pM)	./۲µl	۱µl	./۵µl
Taq Polymerase(5unit/ µl)	./۵µl	./۴ µl	./۴ µl
DNA template	۲µl	۲ µl	۲ µl
Total volume	µl۲۵	۲۵ µl	۲۵ µl

نتایج

از مجموع ۹۸ نمونه استفاده شده، ۴۷ نمونه (۴۸٪) مربوط به زنان و ۵۱ نمونه (۵۲٪) مربوط به مردان بود. از این تعداد، ۳۹ کشت (۳۹/۸) برای کلستریدیوم دیفیسیل مثبت به‌دست آمد. تمام ایزوله‌های کلستریدیوم دیفیسیل از نظر ژن cdd3 مثبت بودند. در مجموع شیوع ایزوله‌های توکسین‌زا در بین بیماران۱۵/۳٪گزارش شد. از این تعداد ۱۲ ایزوله (۱۲/۲٪) به‌صورت A+B+، یک ایزوله (۱٪) A-B+ و دو ایزوله (۲٪) A+B- مثبت بودند (تصویر۱،جدول۴).

جدول ٤. *فراوانی توکسین A و B در بین نمونه‌های بررسی شده*

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	A pos	۲	۲	۲	۲
	B pos	۱	۱	۱	۳/۱
	AB pos	۱۲	۱۲/۳	۱۲/۳	۱۵/۳
	neg	۸۳	۸۴/۷	۸۴/۷	۱۰۰
	Total	۹۸	۱۰۰	۱۰۰	



تصویر ۱. *:محصول PCR ژن tcdA و tcdB*
چاهک۱ و ۱۴: کنترل مثبت VPI 10463
چاهک۶ و ۱۵: کنترل منفی
چاهک ۱۰: Ladder 100bp
سایر چاهک‌ها مربوط به نمونه بیماران است.

بدون توجه به بیمارستان، ۶ ایزوله (۴۰٪) از بخش عفونی، ۴ ایزوله (۲۶/۷٪) از بخش داخلی، ۲ ایزوله از آی‌سی‌یو (۱۳/۳٪) و بقیه ایزوله‌ها از سایر بخش‌ها جدا شده است. فراوانی ایزوله‌های مثبت در بخش عفونی نشان از گسترش بیشتر ایزوله‌های توکسین‌زا در این بخش دارد.

بیشترین آنتی‌بیوتیک‌های مصرف شده بین ۱۵ بیمار دارای سویه‌های توکسین مثبت، سفالوسپورین‌های نسل سوم، مترونیدازول و کلیندامایسن بودند. همچنین از ۱۵ بیمار مثبت شده از مجموع ۹۸ بیمار، ۱۰ نفر دارای لوکوسیتوز بودند که بین وجود لوکوسیتوز و عفونت با کلستریدیوم دیفیسیل رابطه معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۵).

بر اساس مدت زمان بستری در بیمارستان و عفونت با کلستریدیوم رابطه معنی‌دار و مستقیمی مشاهده شد (P<۰/۰۵)؛ به این ترتیب که طول دوره بستری شدن در بیمارستان به چهار دوره کمتر از ۵ روز، ۵ تا ۱۰ روز، ۱۰ تا ۱۵ روز و بیشتر از ۱۵ روز تقسیم شد و مشاهده شد که بیشترین موارد عفونت با کلستریدیوم دیفیسیل (۷ ایزوله توکسین مثبت) در افرادی می‌باشد که بیشتر از ۱۰ روز در بیمارستان بستری باشند.

در این بخش از مطالعه، ۲۴ ایزوله (۲۴/۴٪) کلستریدیوم دیفیسیل غیرتوکسیژنیک نیز از بیماران جدا گردید و این نشان می‌دهد که میزان حاملین به سویه‌های غیرتوکسیژنیک کلستریدیوم دیفیسیل نسبتاً بالا می‌باشد.

بحث

در میان ۹۸ نمونه بررسی شده از نظر شیوع CDI در این مطالعه، ۱۵ ایزوله توکسین‌زا (۱۵/۳٪) و ۲۴ ایزوله غیرتوکسین‌زا به‌دست آمد.

در یک مطالعه در مورد میزان شیوع اسهال‌های بیمارستانی در یک بیمارستان در ترکیه گزارش شده که این عفونت‌ها پنجمین عفونت بیمارستانی به‌حساب می‌آیند و ۷ درصد عفونت‌های بیمارستانی را تشکیل می‌دهند. در همین بیمارستان کلستریدیوم دیفیسیل عامل ۲۲/۲٪ اسهال‌های بیمارستانی بوده است (۱۶). در مطالعه‌ای در سال ۱۹۸۸ در برزیل، فراوانی کلستریدیوم دیفیسیل توکسیژنیک در موارد اسهال‌های بیمارستانی ۱۳/۸ درصد گزارش شده است (۱۷). در مطالعه‌ای که توسط صادقی‌فر و همکاران در سال ۱۳۸۳ بر روی نمونه‌های جدا شده از بیمارستان‌های سطح تهران انجام گرفت، شیوع سویه‌های توکسین‌زای کلستریدیوم دیفیسیل ۶/۱٪ گزارش گردید. لازم به‌ذکر است که در مطالعه مذکور فقط توکسین B و با تست سایتوتوکسیسیتی بررسی شده بود (۱۸).

علت بالا بودن نتیجه به‌دست آمده از شیوع CDI در مطالعه حاضر نسبت به مطالعه صادقی‌فر و همکاران این است که بیماران بررسی شده در بررسی حاضر افرادی بودند که شواهد و زمینه ابتلای به کلستریدیوم دیفیسیل را داشتند. از جمله این موارد، مصرف آنتی‌بیوتیک و یا بستری بودن در بیمارستان بود. اما در بررسی صادقی‌فر و همکاران، از تمام بیمارانی که دارای اسهال بودند به‌عنوان جمعیت هدف استفاده شده است. همچنین در مطالعه حاضر، هر دو توکسین A و B مورد بررسی قرار گرفتند.

از بین ۱۵ نمونه (۱۵/۳) مثبت شده از نظر توکسین‌زائی، ۱۲ نمونه (۱۲/۲٪) دارای توکسین +A+B، ۲ نمونه (۲٪) دارای توکسین -A+B و ۱ نمونه (۱٪) دارای توکسین +A-B بودند.

در مطالعه‌ای که در اسپانیا در سال ۲۰۰۵ انجام شد، شیوع سویه‌های +A+B را ۴/۵٪ و سویه‌های +A-Bرا ۵٪ گزارش کردند (۱۹). در مطالعه مشابهی که در کره انجام شده، شیوع ایزوله‌های +A-B به میزان ۲۵/۷٪ و ایزوله‌های +A+B به‌میزان ۵۶/۹ گزارش شده است. در اروپا شیوع ایزوله‌های +A-B حدود ۶/۲٪ و در چین ۳۳/۳٪ گزارش شده است (۲۰). مطالعه‌ای در ژاپن در سال ۲۰۰۷ شیوع سویه‌های+A-B را ۶/۳٪ گزارش کرده است (۲۱). این مطالعات نشان می‌دهند که فراوانی سویه‌های توکسین‌زای کلستریدیوم دیفیسیل در نقاط مختلف جغرافیایی متفاوت بوده و نیاز به بررسی مستمر دارد. با توجه به اینکه در این مطالعه نیز نمونه‌ها از کل بیمارستان‌های تهران نبوده، ممکن است نتایج مطالعه نشان دهنده وضعیت موجود در کل شهر تهران نباشد و بنابراین مطالعات بیشتر در این زمینه لازم می‌باشد.

از مجموع ۱۵ بیمار دارای سویه توکسین‌زا، ۵ بیمار (۳۳/۳٪) در طول ۴ هفته قبل از مراجعه به مرکز، کلیندامایسین مصرف کرده بودند که از نظر آماری کاملا معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). یکی از عوامل خطر در ابتلا به کلستریدیوم دیفیسیل مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد و کاهش استفاده از برخی آنتی‌بیوتیک‌ها همانند سفالوسپورین‌ها، آمپی‌سیلین‌ها، آموکسی‌سیلین و کلیندامایسین باعث کاهش ابتلا به CDI می‌گردند (۲۲).

پیشنهادات

به‌دلیل بالا بودن میزان شیوع سویه‌های توکسین‌زای کلستریدیوم دیفیسیل در بیمارستان‌هایی که مورد مطالعه قرار گرفتند، انجام آزمایش‌های تشخیص این باکتری به‌طور روتین در بیماران مشکوک به‌عفونت با این باکتری پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از کلیه همکاران دپارتمان بیماری‌های اسهالی ناشی از آب و غذای مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی جهت همکاری در این مطالعه سپاسگزاری می‌شود. همچنین از زحمات آقایان مهدی گودرزی و هیمن سلیمی‌زند تشکر می‌شود.

References

1. Hall I C, O'toole E. Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe. *Am J Dis Child* 1935; 49(2): 390-402.
2. Brazier J.S. The diagnosis of Clostridium difficile-associated disease. *J Antimicrob Chemot* 1998; 41 Suppl C: 29-40.
3. Feldman RJ, Kallich M, Weinstein MP. Bacteremia due to Clostridium difficile: case report and review of extraintestinal C. difficile infections. *Clin Infect Dis* 1995; 20(6): 560-2.
4. Borriello S.P, Larson HE. Antibiotic and pseudomembranous colitis. *J Antimicrob Chemother* 1981; 7(suppl A) 53-62.
5. Larson HE, Barclay FE, Honour P, Hill ID. Epidemiology of Clostridium difficile in infaats. *J Infect Dis*1982; 146(6): 727-33.
6. McFarland LV. Epidemiology، risk factors and treatment for antibiotic-associated diarrhea. *Dig Dis* 1998; 16(5): 292-307.
7. Riley TV, O'Neill GL, Bowman RA, Golledge CL. Clostridium difficile associated diarrhea: epidemiological data from western Australia. *Epidemiol infect* 1994; 113(1): 13-20.
8. Lyerly D.M, Krivan H.C, Wilkins T.D. Clostridium difficile: its diseases and toxins. *Clin Microbiol Rev* 1998; 1(1): 1-18.
9. Rothman S.W, Brown J E, Diecidue A, Foret D.A. Differential cytotoxic effects of toxins A and B isolated from Clostritlium difficile. *Infect Immun* 1984; 46(2): 324-31.
10. Taylor NS, Thorne GM, Bartlett JG. Comparison of two toxins produced by Clostidium difficile. *Infect Immun* 1981; 34(3): 1036-43.
11. Just I, Gerhard R. Large clostridial cytotoxins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2004; 152: 23-47.
12. Doern GV, Coughlin RT, Wu L. (1992) Laboratory diagnosis of Clostridium difficile associated gastrointestinal disease: comparison of a monoclonal antibody enzyme immunoassay for toxins A and B with a monoclonal antibody immunoassay for toxin A only and two cytotoxicity assay. *J Clin Microbiol* 30: 2042-6.
13. Fekety R. Antibiotic associated colitis. In: principle and practices of infectious disease, 3rd ed., Mandel, G., Douglas RG, Bennet JE, (editors), New York, Churchill Livungston, PP 863-9.
14. Langley JM, LeBlanc JC, Hanakowski M, Goloubeva O. The role of Clostridium difficile and viruses as causes of nosocomial diarrhea in children. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002; 23(11): 660–4.
15. Spigaglia P, Mastrantonio P. Molecular Analysis of the Pathogenicity Locus and Polymorphism in the Putative Negative Regulator of Toxin Production (TcdC) among Clostridium difficile Clinical Isolates. *J Clin Microbiol* 2002; 40(9): 3470-5.
16. Gorenek L, Dizer U, Besirbellioglu B, Eyigun CP, Hacibektasoglu A, Van Thiel DH. The diagnosis and treatment of Clostridium difficile in antibiotic-associated diarrhea. *Hepatogastroenterology* 1999; 46(25): 343-8.

17. Gracia LB, Uzeda M. Occurrence of clostridium difficile in fecal samples of children in Rio de Janerio, RJ. *Rev Inst Med Trop So Paulo* 1998; 30(16): 419-23 [Portuguese].
18. Sadeghifard N, Salari M.H, Ghassemi MR, Shirazi MH, Feizabadi MM, Kazemi B, et al. Prevalence of Clostridium difficile- Associated Diarrhea in Hospitalized Patients with Nosocomial Diarrhea. *Iranian J Publ Health* 2005; 34(4): 67-72.
19. Alonso R, Martin A, Pelaez T, Marin M, Rodriguez-Creixems M, Bouza E. Toxigenic status of Clostridium difficile in a large Spanish teaching hospital. *J Med Microbiol* 2005; 54(pt 2): 159-62.
20. Heejung K, Seok HJ, Kyoung HR, Seong GH, Jong WK, Myung-Geun Sh, 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: 491-7.
21. Kikkawa H, Hitomi S, Watanabe M. Prevalence of toxin A-nonproducing/toxin-B-producing Clostridium difficile in the Tsukuba-Tsuchiura district, Japan. *J Infect Chemother* 2007; 13(1): 35-8.
22. Ludlam H, brwown N, Sule O, Redpath C, Coni N, Owen G. An antibiotic policy associated reduced risk of Closridium difficile_associated diarrhea. *Age Ageing* 1998; 28(6): 278-80.

The Frequency of Toxigenic Strains of *Clostridium difficile* in Hospitalized Patients with Diarrhea in Tehran/Iran by PCR Method, 2010

Azizi O., M.Sc.[1], Aslani M.**M.,** Ph.D.[2*], Azimi rad M., B.Sc.[3], Alebouyeh M., Ph.D.[4], Mousavi S.F., Ph.D.[5], Zali M.R., M.D.[6]

1. Master of medical microbiology, Pasteur institute of Iran, Tehran, Iran
2. Professor, Department of Microbiology, Pasteur institute of Iran, Tehran, Iran
3. Bachelor of laboratory science, Research Center of Gastroenterology and Liver Disease, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Assistant Professor of Microbiology, Research Center of Gastroenterology and Liver Disease, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5. Assistant Professor, Department of Microbiology, Pasteur institute of Iran, Tehran, Iran
6. Professor, Research Center of Gastroenterology and Liver Disease, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Corresponding author; e-mail: mmaslani@yahoo.com

(Received: 29 Jan. 2012 Accepted: 7 Nov. 2012)

Abstract

Background & Aims: *Clostridium difficile* has been identified as a pathogen in antibiotic associated diarrhea (AAD), pseudomembranous colitis and also nosocomial diarrhea. The present study was performed to find the prevalence of toxigenic strains of *C .difficile* isolated from diarrhea patients hospitalized in Tehran hospitals.

Method: A total of 98 fecal samples obtained during July to December 2010 were studied. Samples were rapidly cultured on the CCFA medium and incubated at the anaerobic conditions. Then ELISA was done to detect toxin A and B in the stool. Molecular identification of *C.difficile* was done by cdd3 universal primer and toxin A gene (tcdA), toxin B gene (tcdB) and binary toxin profiles were determined by PCR method.

Results: from a total of 98 fecal samples, 15 samples (15.3%) were positive of which, 12 strains (21.2%) were A+B+, 2 strains (2%) were A+B-, and 1 strain (1%) was A-B+.

Conclusion: This study showed that *Clostridium difficile* is an important pathogen in the development of nosocomial diarrhea. Therefore, routine detection of *C.difficile* in suspected cases is recommended.

Keywords: *Clostridium difficile*, *C. difficile* enterotoxin A, *C. difficile* enterotoxin B, Diarrhea

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2013; 20(2): 129-137