مقاله پژوهشی

تشخیص کلستریدیوم دیفیسیل و بررسی توکسین‌های A و B از مبتلایان به اسهال مزمن با روش‌های کشت و PCR

محسن زرگر[1*]، علی جوادی[2]، عباس مروتی[1]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران
۲- گروه باکتری‌شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۱۰/۰۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۴/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: کلستریدیوم دیفیسیل باسیل گرم مثبت، بی‌هوازی اجباری است. تشخیص دقیق و سریع یکی از مسائل مهم در کنترل عفونت کلستریدیوم دیفیسیل است. مطالعه حاضر باهدف مقایسه دو روش کشت و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در تشخیص کلستریدیوم دیفیسیل از بیماران مبتلابه اسهال و بررسی توکسین‌های A و B در این نمونه‌ها است.

مواد و روش‌ها: ۶۸ نمونه از بیماران بستری در بیمارستان‌های قم جمع‌آوری گردید. همه نمونه‌ها به‌سرعت روی محیط CCFA کشت و در شرایط بی‌هوازی گرما گذاری شدند. پس‌ازاین اقدامات، باکتری‌های موردنظر جهت استخراج DNA و سپس انجام PCR بر روی ژن *cdd3* جهت تشخیص قطعی باکتری به کار گرفته شد؛ محصول PCR آن 622bp است و برای توکسین‌های A و B بایستی قطعاتی با طول ۴۷۳ و ۲۷۲ جفت باز گرفته شود.

نتایج: مورفولوژی پرگنه‌های کلستریدیوم دیفیسیل بر روی محیط‌های مختلف بسیار متفاوت است. از مجموع ۶۸ نمونه مدفوع استفاده‌شده، ۱۱ کشت مثبت به دست آمد. ۱۶ ایزوله کلستریدیوم دیفیسیل ازنظر ژن *cdd3* مثبت بودند که در ۶ مورد دارای هر دو توکسین و ۴ مورد دارای توکسین A و ۳ مورد توکسین B را برای اساس ژن‌های مورد انتظار دارا بودند.

نتیجه‌گیری: روش سیتوتوکسیتی به‌عنوان روش gold standard برای این باکتری است. به‌منظور پیشگیری از شیوع بالای این باکتری، استفاده از روش‌های شناسایی بسیار مهم است که تکنیک PCR در مقایسه با روش‌های کشت روشی مناسب برای تشخیص سریع باکتری کلستریدیوم دیفیسیل است این روش در زمان کمتری انجام‌شده و همچنین از اختصاصیت بالایی برخورداراست.

کلمات کلیدی: اسهال، PCR، ژن *cdd3*، کلستریدیوم دیفیسیل، توکسین A و B

مقدمه

کلستریدیوم دیفیسیل اولین بار ۴۳ سال قبل در طی مطالعه باکتری‌های روده‌ای یک نوزاد، شناخته شد که آن را به‌عنوان یک باسیل گرم مثبت، توکسیکوژنیک، تولیدکننده اسپور و بی‌هوازی تعریف کردند. اندازه آن نسبتاً بزرگ و با طول حدود ۷-۲ میلی‌متر است. این باکتری به علت جداسازی سخت در آزمایشگاه با این عنوان نام‌گذاری شده است (۱-۲).

آلودگی این باکتری با ایجاد حالت اسپور باکتری به رویشی و تولید توکسین در سیستم گوارشی، به ایجاد حالت بدون علامت تا اسهال شدید آبی در بیماران بروز می‌نماید. این باکتری ۲ نوع توکسین تولید می‌کند که با واکنش منوگلیکوزیلاسیون سبب تخریب اتصالات بین سلولی در بدن انسان می‌گردد. بیماری اسهال یکی از رایج‌ترین بیماری‌های عفونی بوده و هم‌چنین یکی از معضلات بهداشتی بیشتر کشورهای جهان سوم است. که دراین‌بین اسهال ایجادشده توسط کلستریدیوم دیفیسیل، علت مهم اسهال بیمارستانی است (۳).

*نویسنده مسئول: **محسن زرگر**، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران
Email: zmohsen2000@yahoo.com
https://orcid.org/0000-0002-3108-5655

امروزه بیماری ناشی از کلستریدیوم دیفیسیل بدون ارتباط با آنتی‌بیوتیک و شیمی‌درمانی در حال افزایش است، به‌خصوص در بیماران سرپایی و غیر بستری و علت را نمی‌توان دقیقاً به پیدایش سوش‌های جدیدی از باکتری با ویژگی‌هایی که به آن‌ها اجازه کلونیزه شدن در حضور باکتری‌های طبیعی را می‌دهد ربط داد و یا اینکه فاکتورهایی جدا از آنتی‌بیوتیک هستند که می‌توانند باکتری‌های طبیعی روده را تحت تأثیر قرار دهند (۴). اسهال به دنبال مصرف آنتی‌بیوتیک و ناشی از کلستریدیوم دیفیسیل از عوارض درمان با ترکیبات آنتی میکروبیال است و در بین حدود ۵-۲۵٪ از بیماران اتفاق می‌افتد. که دراین‌بین کلستریدیوم دیفیسیل مسئول ۲۵-۱۵٪ از تمام موارد اسهال مرتبط با مصرف آنتی‌بیوتیک است که اکثراً در بیماران سنین بالاتر و معمولاً ۲ هفته بعد از قطع درمان با آنتی‌بیوتیک اتفاق می‌افتد (۵).

بیماری ناشی از کلستریدیوم دیفیسیل را باید در بیماری شک کرد که در طی ۲ ماه گذشته آنتی‌بیوتیک مصرف کرده و اکنون مبتلابه اسهال شده و یا بعد از ۷۲ ساعت بستری در بیمارستان مبتلابه اسهال شود. در اکثر مواقع، بررسی توکسین و یا کشت کلستریدیوم دیفیسیل در یک نمونه مدفوع، به‌طور مؤثری تشخیص را معلوم می‌کند و گاهی اوقات نیاز به انجام آندوسکوپی و یا تکرار تست است (۶-۷).

روش سیتوتوکسیسیتی، برای تشخیص Gold Standard است ولی اکثر لابراتوارهای تشخیصی از روش آنزیم ایمونواسی که به‌خوبی با روش قبلی مطابقت دارد، استفاده می‌کنند. هرچند نتیجه منفی توکسین باعث رد تشخیص آن نمی‌شود (۷). حساسیت این روش بسته به نوع روش به‌کاررفته، کمتر از ۵۰٪ تا بالای ۹۳٪ متغیر است ولی اختصاصیت این روش بالای ۹۰٪ است. کشت مدفوع هم می‌تواند برای جداسازی کلستریدیوم دیفیسیل استفاده شود ولی وجود ارگانیسم در کشت مدفوع لزوماً به معنی وجود بیماری در آن زمان نیست زیرا بالای ۴٪ بالغین سالم می‌توانند حامل این ارگانیسم به‌عنوان میکروفلور طبیعی روده خود باشند (۸). شناخت بارنگ گرم در نمونه‌های مدفوعی در تشخیص بیماری ارزشی ندارد. کلستریدیوم دیفیسیل می‌تواند به‌وسیله کشت غیر هوازی از مدفوع جدا شود اما این روش برای تشخیص کلینیکی بسیار نادر است زیرا برای کامل شدن ۲ تا ۳ روز وقت نیاز است و همچنین سویه‌های توکسیژنیک را از سویه‌های غیر توکسیژنیک تمیز نمی‌دهد (۹-۱۰). سویه‌های غیر توکسیژنیک با بیماری کلینیکی ارتباطی ندارند با توجه به مطالعات ارزیابی‌شده، دیگر متدهای آزمایشگاهی برای تشخیص بیماری، PCR یا واکنش‌های زنجیره پلی مرازی است. این روش برای تشخیص سریع باکتری کلستریدیوم دیفیسیل به کار می‌رود (۱۱). تکنیک PCR، باکتری را ازلحاظ کمی ارزیابی می‌کند و برای تشخیص اولیه و برای تمایز باکتری‌های پاتوژن از باکتری‌های غیر پاتوژن از این روش می‌تواند استفاده شود. این تست حساسیت بالایی دارد و به کارشناسان تکنیکی نیاز دارد (۱۲). این مطالعه باهدف مقایسه دو روش کشت و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در تشخیص کلستریدیوم دیفیسیل از بیماران مبتلابه اسهال که در این بررسی از ژن *cdd3* به‌عنوان ژن و هدف در تشخیص این باکتری در بررسی‌های اپیدمیولوژی استفاده می‌شود، همچنین بررسی توکسین‌های A و B در این باکتری‌های جداشده با استفاده از تکنیک PCR به‌عنوان یک روش شناسایی حساس و دقیق باکتری در این بیماران است.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به‌عنوان یک مطالعه مقطعی (cross sectional) است؛ که در این بخش از مطالعه ۶۸ نمونه مدفوع بیماران بستری در بیمارستان‌های قم در داخل ظرف مخصوص نمونه‌گیری حداکثر ظرف مدت ۲ ساعت به مرکز منتقل شدند. نمونه‌ها یا سریعاً مورد آزمایش قرار گرفتند و یا اینکه در آزمایشگاه جهت کشت نمونه‌های مدفوع، در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. همه نمونه‌ها به‌سرعت روی محیط CCFA کشت داده شدند.

با توجه به اینکه کلستریدیوم دیفیسیل باکتری اسپوردار است، جهت کاهش میزان آلودگی فلور باکتریایی در نمونه‌های مدفوع از دو روش می‌توان استفاده نمود که شامل استفاده از حرارت (دمای ۶۰-۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه) و استفاده از متانول (شرکت مرک، آلمان) است. در این مطالعه در یک لوله‌آزمایش ۵۰۰ میکرولیتر محیط BHI Broth (شرکت مرک، آلمان) حاوی عصاره مخمر به‌عنوان یک محیط غنی کننده و در لوله دیگر ۵۰۰ میکرو لیتر متانول ریخته شد. دو سواپ از مدفوع گرفته‌شده، سپس هرکدام در لوله‌ها قرار داده‌شده و سپس ورتکس شدند. سواپ در لوله محیط BHI Broth حاوی عصاره مخمر پس از ۳۰ ثانیه و سواپ موجود در لوله حاوی الکل پس از یک دقیقه (جهت دادن شوک الکلی به سایر باکتری‌های موجود در مدفوع) روی محیط کلستریدیوم دیفیسل آگار یا

Cefoxitin cycloserine fructose agar (CCFA)(شرکت مرک- آلمان) کشت داده شدند.

پس از کشت نمونه‌ها بر روی محیط CCFA و سپری شدن دوره انکوباسیون در شرایط بی‌هوازی در جار بی‌هوازی حاوی گاز پک نوع A (شرکت مرک، آلمان)، به مشاهده و بررسی پرگنه‌های مشکوک به کلستریدیوم دیفیسیل پرداخته شد. پرگنه‌های کلستریدیوم دیفیسیل بر روی محیط CCFA به رنگ سفید تا زرد، به‌صورت محدب، گرد با حاشیه کاملاً مضرس و با قطر mm ۱-۳ قابل‌رؤیت هستند. مرفولوژی پرگنه‌های کلستریدیوم دیفیسیل بر روی محیط‌های مختلف بسیار متفاوت است. در مرحله اول از پرگنه‌های مشکوک، لام تهیه‌کرده و بعد از رنگ‌آمیزی گرم، موردبررسی قرار گرفتند. لازم به توضیح است که اگر محیط کشت باکتری تازه تهیه‌شده باشد، کلستریدیوم دیفیسیل به‌صورت باسیل گرم مثبت مشاهده می‌شود؛ اما گاهی در کشت‌های کهنه باکتری به‌صورت گرم منفی به نظر می‌رسد. اگر در طول انکوباسیون اسپور تشکیل شود، اسپورها به‌صورت بیضی با هاله‌ای شفاف، نزدیک به انتهای باکتری و اندکی بزرگ‌تر از عرض باکتری دیده می‌شوند. یکی دیگر از مشخصات اولیه در تشخیص مقدماتی باکتری بوی پرگنه بوده که بویی شبیه به اسطبل اسب دارند. این مشخصه ویژه به علت تولید ماده‌ای به نام p– کرزول است. تولید فلورسانس در مقابل نور UV مشخصه دیگری است که در تشخیص پرگنه‌های کلستریدیوم دیفیسیل کمک‌کننده است. کلستریدیوم دیفیسیل در شرایط هوازی قادر به رشد نیست.

پس‌ازاین اقدامات، پرگنه‌های موردنظر جهت استخراج DNA و سپس انجام PCR بر روی ژن *cdd3* جهت تشخیص قطعی کلستریدیوم دیفیسیل به کار گرفته شد. پس از تشخیص قطعی کلستریدیوم دیفیسیل، پرگنه‌های باکتری برای استخراج DNA با استفاده از کیت DNP استخراج شرکت سیناکلون استفاده گردید. برای انجام هر واکنش PCR، ابتدا مخلوط واکنش در یک حجم ۲۵ میکرولیتر تهیه شد. به این صورت که مقادیر لازم ۱۲/۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش و ۱ میکرولیتر از پرایمر جلویی و عقبی (در جدول ۱) و ۵ میکرولیتر از DNA و ۵/۵ میکرولیتر از آب برای هر واکنش در تعداد نمونه‌ها آماده گردید؛ و ۲ نمونه که یکی برای کنترل مثبت و دومی کنترل منفی که بجای DNA، حجم معادل آن آب اضافه می‌شود تهیه گردید، کنترل منفی برای چک کردن عدم آلودگی مواد PCR است که در هر واکنش کنار تست‌ها انجام شد. شرایط انجام PCR برای ژن *cdd3* مشابه است (۱۳). ژن‌های توکسین A و B که در این آزمایش بر روی نمونه‌های مثبت انجام گردید پرایمرهای این ژن‌ها با استفاده از توالی ثبت شد، این ژن‌ها در بانک اطلاعاتی NCBI جمع‌آوری گردید و سپس در نرم‌افزار CLC sequence Viewer ویرایش ۹ این توالی‌ها زیر هم قرار گرفت برای ژن توکسین A ۳۲ سکانس و برای توکسین B ۲۵ سکانس از بانک اطلاعاتی NCBI استخراج شد سپس بر اساس نواحی ثابت هر یک از این ژن‌ها توالی‌های موردنظر انتخاب و سپس برای بررسی اختصاصیت پرایمرها در بخش Primer Blast بررسی گردید که فقط به ژن‌های موردنظر متصل می‌شود. طبق پرایمرهای طراحی‌شده برای توکسین A قطعه موردنظر ۴۷۳ جفت باز و برای توکسین B قطعه ۲۷۲ جفت باز را تکثیر می‌دهد (جدول ۱).

جدول ۱- پرایمرهای مورداستفاده در این مطالعه

Primer name	sequence	TM	length	PCR product	reference
cdd3F	TCCAATATAATAAATTAGCATTCCA	55	25 bp	622 bp	14
cdd3R	GGCTATTACACGTAATCCAGATA	55	23bp		
tcdAF	GGACTAGACCGTTGGGAAATG	52	21bp	473bp	This study
tcdAR	GTGGAGCGAGCTTCTGGC	52	18bp		
tcdBF	GAAACTAAAAAAGCATGCAAAGG	52	23bp	272bp	This study
tcdBR	CCCTCAAAATTCTCATCCAAAG	52	22bp		

انجام PCR جهت ژن *cdd3*

PCR برای ژن *cdd3* در ۲۵ میکرولیتر محلول واکنش انجام شد. این ژن جهت تعیین هویت کلستریدیوم دیفیسیل به‌عنوان یک ژن حفظ‌شده در تمام سویه‌ها شناسایی می‌شود و دارای وزن 622bp است. 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 برای مشاهده بر روی چاهک ژل آگارز ۱ درصد برده شد.

انجام PCR جهت ژن *tcdA*

این ژن جهت تعیین توکسین A کلستریدیوم دیفیسیل در تمام سویه‌ها شناسایی می‌شود و دارای اندازه ۴۷۳ جفت باز است. 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 بر روی چاهک ژل آگارز ۱/۵ درصد برده شد.

انجام PCR جهت ژن *tcdB*

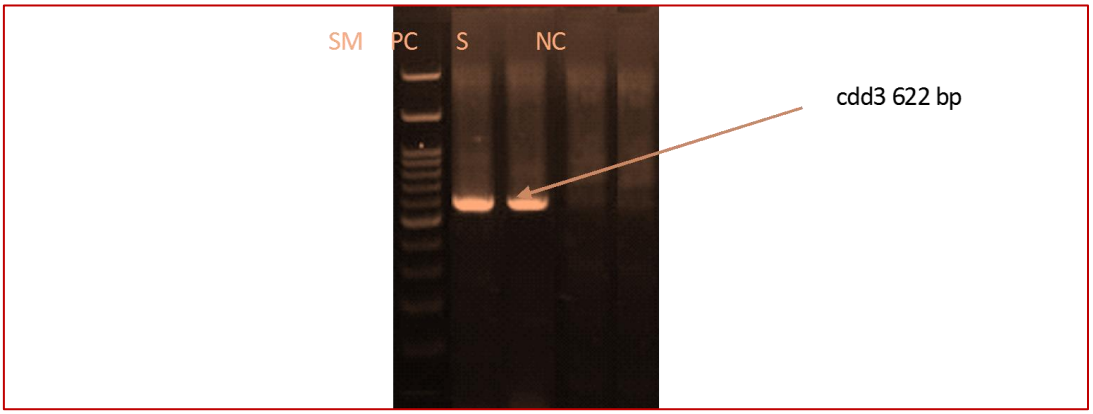
از ژن tcdB جهت تعیین ژن توکسین B کلستریدیوم دیفیسیل در سویه‌های این باکتری استفاده می‌شود و دارای اندازه ۲۷۲ جفت باز است. واکنش PCR ژن توکسین *B* در شرایط ۹۵ درجه ۴ دقیقه، ۹۵ درجه ۴۰ ثانیه، ۵۲ درجه ۴۰ ثانیه،۷۲ درجه ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه پایانی ۵ دقیقه انجام شد. نمونه‌ها پس از انجام واکنش برای مشاهده بر روی چاهک ژل آگارز ۲ درصد برده شد.

نتایج

پس از کشت نمونه‌ها بر روی محیط CCFA و سپری شدن دوره انکوباسیون به مشاهده و بررسی پرگنه‌های مشکوک به کلستریدیوم دیفیسیل پرداخته شد. نمونه‌های استفاده‌شده از افراد بستری در بیمارستان و یا افرادی بودند که جهت تشخیص کلستریدیوم دیفیسیل به مرکز ارجاع داده‌شده بودند. این افراد شواهد و زمینه ابتلا به این باکتری را داشتند. پرگنه‌های باکتری بر روی محیط CCFA به رنگ سفید تا زرد، به‌صورت محدب، گرد با حاشیه کاملاً مضرس و با قطر ۱-۳ mm قابل‌رؤیت هستند. مورفولوژی پرگنه‌های کلستریدیوم دیفیسیل بر روی محیط‌های مختلف بسیار متفاوت است. در مرحله اول از پرگنه‌های مشکوک، لام تهیه‌کرده و بعد از رنگ‌آمیزی گرم، موردبررسی قرار گرفتند. یکی دیگر از مشخصات اولیه در تشخیص مقدماتی باکتری بوی پرگنه بوده که بویی شبیه به اسطبل اسب دارند. این مشخصه ویژه به علت تولید ماده‌ای به نام p– کرزول است. از مجموع ۶۸ نمونه مدفوع استفاده‌شده، ۱۱ کشت مثبت به دست آمد.

نتایج PCR

در هر دو بخش بررسی اپیدمیولوژی و ژنوتیپی، PCR ژن *cdd3* گذاشته شد. دراین‌بین از ۶۸ نمونه جمع‌آوری‌شده کلستریدیوم دیفیسیل ازنظر ژن *cdd3* ۱۶ نمونه (۲۴ درصد) مثبت بودند. این ژن جهت تعیین هویت کلستریدیوم دیفیسیل به‌عنوان یک ژن حفظ‌شده در تمام سویه‌ها، شناسایی می‌شود و محصول PCR آن دارای قطعه ۶۲۲ جفت باز نوکلئوتید است

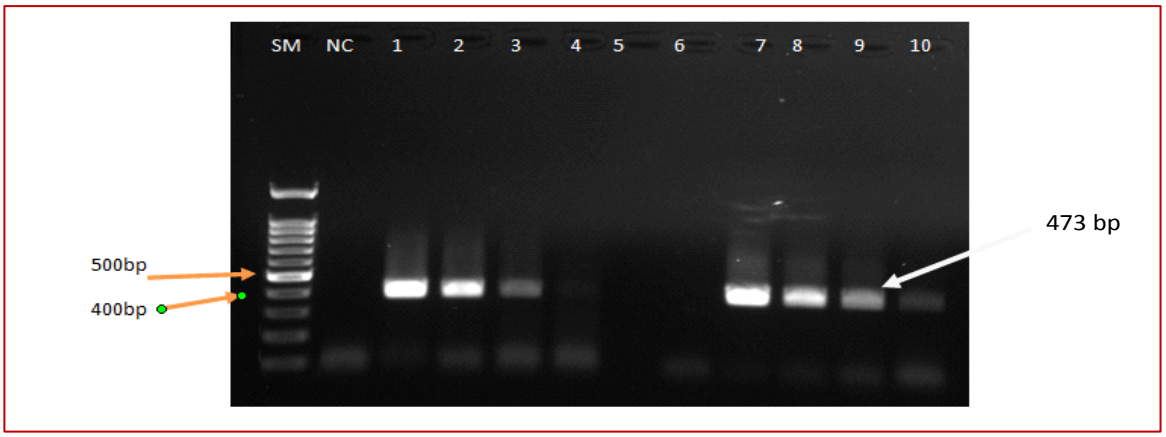


شکل ۱– نتایج تکثیر توالی توسط PCR برای ژن cdd3 از چپ سایز مارکر ۱۰۰ باز کنترل مثبت و S: نمونه NC: کنترل منفی

(شکل ۱) برای توکسین A در نمونه‌های جداشده ۴ نمونه (۵ درصد)(شکل ۲) و برای توکسین B ۳ نمونه (۴ درصد) (شکل ۳) و ۶ نمونه برای هر دو توکسین (۸ درصد) مثبت بودند.

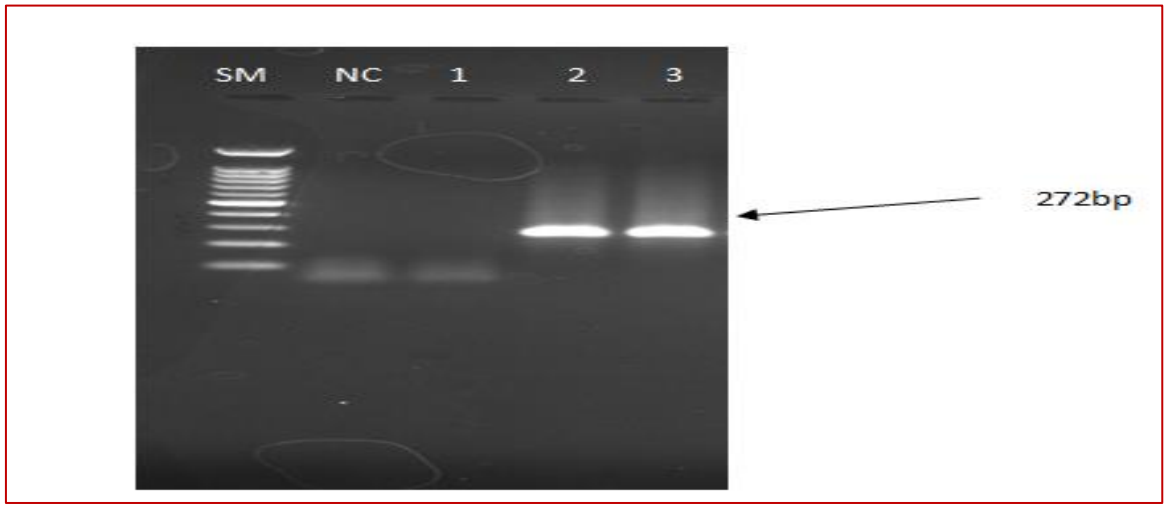
سرولوژی و محیط کشت‌ها و تست‌های روتین آزمایشگاهی قابل جداسازی هستند (۱۳). تظاهرات بالینی آن متفاوت است از بیماری بدون علائم تا مگاکولون سمی است. این ارگانیسم در

نتایج PCR جهت توکسین A بر اساس ژن *tcdA*



شکل۲- نتایج تکثیر توالی توسط PCR برای ژن *tcdA* از چپ سایز مارکر ۱۰۰ باز NC: کنترل منفی، نمونه‌های شماره ۱، ۲، ۳، ۴ و ۷، ۸، ۹ و ۱۰ مثبت برای این ژن و نمونه‌های ۵ و ۶ منفی می‌باشند.

نتایج PCR برای توکسین B بر اساس ژن *tcdB*



شکل ۳- نتایج تکثیر توالی توسط PCR برای ژن *tcdB* از چپ سایز مارکر ۱۰۰ باز NC: کنترل منفی، شماره یک نمونه منفی نمونه‌های ۲، ۳ برای این ژن مثبت می‌باشند.

بحث

کلستریدیوم دیفیسیل مهم‌ترین عامل شناسایی‌شده اسهال و کولیت غشای کاذب وابسته به مصرف آنتی‌بیوتیک و عامل بیماری نازوکومیال است که این باکتری توسط تست‌های

کشت مغزی توکسین‌های بالقوه‌ای ایجاد می‌کند. این باکتری در مدفوع نوزادان سالم هم مشاهده‌شده است. در دهه ۱۹۶۰ و ۱۹۷۰ کولیت غشای کاذب به مشکل مهم بالینی تبدیل گردید، تقریباً همه آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توانند عفونت کلستریدیوم دیفیسیل را به وجود آورند ولی آنتی‌بیوتیک‌های با طیف و

گسترده‌ای مثل لینکومایسین، کلیندامایسین تقریباً در ۱۰ درصد بیماران اسهال به وجود آورده و ۱ درصد کولیت غشای کاذب ایجاد نموده است. بیماری در ۱ تا ۵ درصد شدید است و به کولکتومی یا مرگ منجر می‌شود. رویدادهای زیر در کولیت غشای کاذب رخ می‌دهد، تخریب فلورای نرمال باکتری کلون، کلونی سازی با باکتری کلستریدیوم دیفیسیل و ترشح توکسین‌هایی که به مخاط و التهاب آسیب می‌زنند. کلون انسان حاوی ۵۰۰ نوع باکتری است و مدفوع نرمال حاوی 10^{12} باکتری در هر گرم است در مطالعه‌ای توسط فولادی و همکاران در سال ۲۰۱۴ از نمونه‌های بیماران ۲/۲ درصد از ۱۳۶ نمونه از مراکز ICU جمع‌آوری‌شده بود این باکتری از نمونه‌های مدفوع با روش PCR جدا شد (۱۴). راه‌های انتقال بیماری از طریق دهان – مدفوع رخ می‌دهد. کلستریدیوم دیفیسیل اسپورهای مقاوم‌به‌گرما تولید می‌کند که در محیط تا چند ماه تا چند سال دوام می‌آورد. اسپورها در محیط اسیدی معده زنده می‌ماند و در روده به شکل زایشی تبدیل می‌شود. آلودگی با کلستریدیوم در بیمارستان خیلی شایع است. این ارگانیسم را می‌توان از زمین بیمارستان، تخت خواب و اثاثیه بیمارستان جدا کرد مخصوصاً در اتاق‌های بیمارستان یا بخش‌هایی که بیماران مبتلابه عفونت کلستریدیوم دیفیسیل در آن بستری هستند. کارکنان پزشکی با دستان، زیر انگشتر و یا در استئوسکوپ‌ها این باکتری را در مکان‌های مختلف حمل می‌کنند ولی حاملین مدفوعی در کارکنان نادر است. کلنی سازی در نوزادان شایع است ولی در نوزادان بیماری بدون علائم است علی‌رغم اینکه میزان سیتوتوکسین مدفوع نوزادان مشابه بزرگ‌سالانی است که به کولیت شدید دچار هستند (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 است. عفونت ناشی از کلستریدیوم دیفیسیل می‌تواند به‌عنوان یک مشکل عمده در بعضی از بیمارستان‌ها به‌ویژه در مراکزی که دارای بخش‌های شیمی‌درمانی بوده و یا بیماران نیاز به بستری طولانی دارند، مطرح است. فاکتورهای مستعد کننده در ابتلا به CDAD شامل سن بالا، بیماری‌های زمینه‌ای، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و مدت طولانی بستری در بیمارستان است (۱۶). هرچند درگذشته اعتقاد بر این بود که منشأ این ارگانیسم داخلی (اندوژن) است، اما شیوع اپیدمی‌های متعددی از CDAD در بیمارستان‌های مختلف نشان می‌دهد که منشأ ارگانیسم سایر بیماران، کارکنان بیمارستان و یا محیط بیمارستان است و به‌خوبی اثبات‌شده که این عفونت یک عفونت بیمارستانی است (۱۷). برخی مطالعات نشان می‌دهد که پس از هفته چهارم بستری در بیمارستان از مدفوع بیش از نیمی از بیماران، کلستریدیوم دیفیسیل قابل جداسازی است. در برخی مطالعات گزارش گردیده است که بیش از ۲۰٪ اسهال‌های بیمارستانی ناشی از کلستریدیوم دیفیسیل است (۱۸).

بعد از جداسازی باکتری به‌عنوان یک پاتوژن و به دلیل اهمیت بیماری‌زایی این باکتری تکنیک‌های زیادی برای شناسایی آن بکار گرفته شد. روش‌های کشت برای اولین بار در سال ۱۹۷۹ با استفاده از محیط کشت CCFA بکار گرفته شد و به‌عنوان استاندارد برای این باکتری به‌حساب می‌آید اما در این تکنیک امکان جداسازی سویه‌های توکسین زا از غیر توکسین زا وجود ندارد و روش‌های سنتی بسیار وقت‌گیر و زمان‌بر می‌باشند (۲۰-۱۹). در مطالعه‌ای توسط اصلانی و همکاران بر روی ۹۸ نمونه مدفوع بیماران مشکوک به عفونت کلستریدیوم دیفیسیل در بیمارستان‌های تهران نمونه‌ها پس از جداسازی بر روی محیط CCFA کشت داده و باکتری‌ها جداسازی شد و با پرایمرهای عمومی و اختصاصی برای توکسین‌های A و B استفاده شد که از ۳۹ نمونه مثبت ۱۵ سویه توکسین زا تشخیص داده شد که ازاین‌بین ۱۲/۲ درصد نمونه‌ها هر دو توکسین و ۲ سویه دارای توکسین A و ۱ سویه دارای توکسین B بود (۲۱-۲۲). در این مطالعه جهت تشخیص کلستریدیوم دیفیسیل از کشت ارگانیسم روی محیط CCFA و سپس انجام PCR ژن *cdd3* یا ژن Universal جهت تشخیص کلستریدیوم دیفیسیل استفاده شد و با این شرایط، نتیجه قطعی در تشخیص باکتری محرز گردید. سپس جهت تعیین سویه‌های توکسیژنیک، PCR برای ژن‌های توکسین گذاشته شد. PCR روشی برای تشخیص سریع باکتری کلستردیوم دیفیسیل است این روش در زمان کمتری انجام‌شده و همچنین از اختصاصیت بالایی برخوردار است. با استفاده از روش‌های کشت از ۶۸ نمونه مدفوع ۱۱ نمونه جداسازی شد این در حالی است که با استفاده از تکنیک PCR، ۱۶ نمونه دارای ژن مربوط به این باکتری بودند در این بررسی بر اساس حضور ژن‌های توکسین A و B نیز باکتری موردمطالعه قرار گرفتند و برای هر یک از ژن‌ها پرایمرهای اختصاصی طراحی گردید و در جدایه‌ها ۴ باکتری توکسین A و ۳ باکتری توکسین B و ازاین‌بین ۶ باکتری ژن هر دو توکسین A و B را دارا بودند.

PCRبه‌عنوان یک تست قوی در تکنیک‌های آزمایشگاهی است که برای تشخیص ارگانیسم‌های پاتوژنیک متنوع به کار می‌رود، به‌طوری‌که برای تائید اولیه و تشخیص سریع سویه‌های تولیدکننده توکسین و مدیریت بهینه بیماران دچار عفونت‌های وابسته به کلستریدیوم دیفیسیل و همچنین برای جداسازی سویه‌های پاتوژن از سویه‌های غیر پاتوژن از این تکنیک استفاده می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل‌شده در مقایسه با مطالعات قبلی اختصاصیت بالای واکنش PCR را نشان داد و از سویی نتایج این مطالعه نشان داد که می‌توان از روش‌های حاضر به‌عنوان یک روش استاندارد با حساسیت و اختصاصیت بـالا جهت تشخیص اسـهال مزمن ناشی از کلستردیوم دیفیسیل و حضور توکسین‌های این باکتری استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل از طرح پژوهشی به کد ۱۵۴۹۵۰۸۲۴۰۰۲۴ بوده که با حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم به انجام رسیده است. بدین‌وسیله از مسئولین دانشگاه که شرایط اجرای فعالیت‌های پژوهشی را فراهم می‌آورند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. pnik, M, Brazier S, Duerden M,et al.Comparison of toxinotyping and PCR ribotyping of *Clostridium difficile* strains and description of novel toxinotypes. Microbiology,2001. 147:439–447.
2. Wilcox M,Minton J. Role of antibody response in outcome of antibiotic-associated diarrhoea. *Lancet*.2001;357: 158–159.
3. Avbersek J, Janezic S, Pate M, Rupnik M, Zidaric V, Logar K, Vengust M, Zemljijc M, Pirs T, Ocepek M. Diversity of *Clostridium difficile* in pigs and other animals in Slovenia. Anaerobe.2009. 15(6):252-5.
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: 1-6. [in Persian]
5. Novogrudsky A, Plaut AG. The bacterial flora of the healthy gastrointestinal tract: colonization of the human colon. In: Yamada T, ed. *Gastroenterology, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia*, 2003;584–585.
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): 6108-6112.
7. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, Pepin J, et al. Clinlnical practicae 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). J Infect Control Am 2010; 31(5): 431-455.
8. Fooladi, AAI; Rahmati, S; Abadi, JFM; Halabian, R; Sedighian, H; Soltanpour, MJ and Rahimi, M. Isolation of *Clostridium difficile* and detection of A and B toxins encoding genes. Int. J. Entric. Pathog. 2014; 2: e15238. [in Persian]
9. Silva, ROS; Santos, RLR; Pires, PS; Pereira, LC; Duarte, MC; de Assis, RA and Lobato, FC. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from dogs in Minas Gerais, Brazil. Braz. J. Microbiol. 2013;44: 133-137.
10. Alcala´, L, Marı´n, M, Madrid, M, Domı´nguez-Garcı´a, E, Catala´ n, P,Pela´ ez, M. T, Sa´nchez-Somolinos, M. & Bouza, E.Comparison of ImmunoCard Toxins A&B and the new semiautomatedVidas Clostridium difficile Toxin A&B tests for diagnosis of C.difficile infection. J Clin Microbiol,2010;48, 1014–1015.
11. Cheng, A. C, Ferguson, J. K, Richards, M. J, Robson, J. M, Gilbert,G. L, McGregor, A, Roberts, S, Korman, T. M., Riley, T. V. & Australasian Society for Infectious Diseases. Australasian Society for Infectious Diseases guidelines for the diagnosis and treatment of Clostridium difficile infection. Med J Aust,2011;194, 353–358.
12. Cohen, S. H., Gerding, D. N., Johnson, S., Kelly, C. P., Loo, V. G.,McDonald, L. C., Pepin, J., Wilcox, M. H., Society for Healthcare Epidemiology of America & Infectious Diseases Society of America.Clinical practice guidelines for Clostridium difficile infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). Infect Control Hosp Epidemiol.2010;31, 431–455.

13. Cooke, D.L, Borriello S.P. Non-specific binding of Clostridium dfficile toxtn A to murine immunoglobulins is via the Fab component,Infect Immun.1998; 66: 1981-4.
14. Imani Fooladi A; Rahmati S; Falah Mehr Abadi J; Halabian R; Sedighian H; Soltanpour MJ; Rahimi M, Isolation of Clostridium difficile and Detection of A and B Toxins Encoding Gene, Int J Enteric Pathog.feb.2014;2(1):e15238[in Persian]
15. Etienne-Manneville S, Hall A: Rho GTPases in cell biology. Nature 2002,420*:* 629–*635*,
16. 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.
17. 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.
18. Hall. I C, O'Toole. E Intestinal flora in new-born infants with a description of a new pathogenic anaerobe Bacillis difficilis. Am J Dis child.1935; 49:39-402.
19. Berrington, A., Borriello, S. P., Brazier, J. S. & 9 other authors,National Clostridium difficile Standards Group: report to the Department of Health. J Hosp Infect 56 Suppl,2004, 1(56), 1–38.
20. 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: 1057-64.
21. Lemee L, Dhalluin A, Testelin S, Mattrat MA, Maillard K, LemelandJF, 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.
22. Azizi O,Aslani M.M,Azimi rad M, Alebouyeh M,Mousavi S F,Zali M R,The frequency of toxigenic strains of clostridium difficile in hospitalized patients with diarrhea in theran/iran by PCR method,2010,journal of kerman university of medical sciences,2013;20(2):129-137[in Persian]

Original Article

Detection of Clostridium Difficile Associated Diarrhea in Disease Based on Polymerase Chain Reaction and Bacterial Culture and Toxin A, B Frequency

Zargar M[1*], Javadi A[2], Morovvati A[1]

1. Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran
2. Department of Bacteriology, Faculty of Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 25 Dec 2018 Accepted: 09 Jul 2019

Abstract

Background & Objective: Clostridium difficile is an obligate anaerobic, gram positive bacillus. The purpose of this study was to compare PCR technique and bacterial culture to assess the prevalence of Clostridium difficile infection in the samples of watery diarrhea.

Materials & Methods: This cross-sectional qualitative study was performed on 68 samples of watery diarrhea in Qom province hospitals. All samples were cultured in the specialized CCFA Agar medium. Specific primers were applied for the PCR assay based on *cdd3* gene. Based on this primer, PCR product for this gene must be 622bp.toxin A & B diagnosis based on specific primers and product must be 473 and 272 bp

Results: In this study, the optimized PCR technique was determined to be bacterium in 16 samples. But bacteria diagnosis in 11 samples by culture method. 6 samples had toxin A and B, 4samples had toxin A and 3 samples had toxin B.

Conclusion: Cytotoxicity method is gold standard for clostridium difficile. Diagnosis of these bacteria is very important and PCR was found as an applicable, sensitive, and quick technique for the detection of Clostridium difficile in compromise culture medium method.

Keywords: diarrhea, PCR, *ccd3* gene, Clostridium difficile, toxin A, B

***Corresponding Author: Zargar Mohsen,** Department of microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran
Email: zmohsen2000@yahoo.com
https://orcid.org/0000-0002-3108-5655

Journal of Fasa University of Medical Sciences 9 (2019): 1596-1604