View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by shahrekord university of medical scinces

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۷، شماره ۲/ خرداد و تیر ۱۳۹۴/ ۴۲-۳۵

مقاله پژوهشی

بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی ژن های توکسین A و B *کلستریدیوم دیفیسیل* جدا شده از مدفوع گوساله در استان چهارمحال و بختیاری

عباس مختاری فارسانی، عباس دوستی*

مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۳/۱/۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۵/۱٤

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 10:52 +0430 on Saturday August 26th 2017

چکیده:

زمینه و هدف: *کلستریدیوم دیفیسیل* یک باسیل گرم مثبت و اسپورزا می باشد که قادر به ایجاد بیماری در انسان و حیوانات است. هدف از مطالعه حاضر بررسی فراوانی ژن های ویرولانس و مقاومت آنتی بیوتیکی *کلستریدیوم دیفیسیل* جدا شده از مدفوع گوساله ها در استان چهارمحال و بختیاری می باشد.

روش بررسی: در این مطالعه مقطعی- توصیفی تعداد ۱۵۰ نمونه مدفوع تازه گوساله جمع آوری و *کلستریدیوم دیفیسیل* به کمک روش های کشت باکتریایی جداسازی شد. DNA ژنومی باکتری ها با استفاده از کیت استخراج DNA، تخلیص و ژن های ***tcdA*** و ***tcdB*** با استفاده از روش **Multiplex PCR** شناسایی گردید. برای بررسی مقاومت دارویی از روش انتشار دیسک به روش **Kirby-Bauer** استفاده گردید.

یافته ها: تعداد ۹۰ نمونه (٦۰٪) دارای *کلستریدیوم دیفیسیل* بوده که از این تعداد، ۸ نمونه (۸/۸ ٪) دارای ژن ***tcdA*** و ۱٦ نمونه (۱۷/۷٪) ژن ***tcdB*** داشتند. در آزمایش مقاومت آنتی بیوتیکی مشاهده شد که بیشترین میزان مقاومت، به ترتیب مربوط به آنتی بیوتیک های کلیندامایسن (۱۰۰٪) و اریترومایسین (۹۰٪) است و بیشترین حساسیت به ترتیب مربوط به سیپروفلوکساسین (۵۰٪) و وانکومایسین (۲۰٪) می باشد.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج مطالعه حاضر *کلستریدیوم دیفیسیل* دارای شیوع و مقاومت آنتی بیوتیکی بالا بوده که می بایست با اتخاذ روش های پیشگیری و درمانی مناسب و همچنین محدود کردن استفاده از داروهای ضد میکروبی در انسان و دام از توسعه ی این باکتری و به خصوص سویه های بیماریزا جلوگیری کرد.

واژه های کلیدی: *کلستریدیوم دیفیسیل*، ژن ***tcdA***، ژن ***tcdB***، مقاومت آنتی بیوتیکی.

مقدمه:

کلستریدیوم ها باسیل های گرم مثبت، اسپورزا، بی هوازی، متحرک و کاتالاز منفی هستند که تاکنون حدود صد گونه ی این جنس باکتریایی شناسایی شده اند (۱). محل طبیعی زندگی آن ها خاک می باشد و در دستگاه گوارش انسان و حیوانات (بصورت جزئی از فلور عادی) نیز وجود دارند. *کلستریدیوم دیفیسیل* (*Clostridium difficile*) یک گونه بیماریزا از این باکتری می باشد که از خاک و آب و فاضلاب و ۳-۱ درصد از روده اشخاص سا لم و نیز به عنوان عامل پاتوژن در بیش از ۲۰ درصد بیماران بستری در بیمارستان جداسازی شده است (۲)؛ همچنین در مواردی وجود این باکتری در گوشت های حیوانی (گاو، گوساله، خوک) عرضه شده در بازار گزارش شده است (۳). *کلستریدیوم دیفیسیل* عامل ایجاد ۱۵ تا ۲۰٪ اسهال های ناشی از مصرف آنتی بیوتیک ها و بیش از ۹۵٪ اسهال های ناشی از کولیت غشاءکاذب (Pseudomembranous colitis) در انسان (۴) و از عوامل مهم بیماری های روده در گاو، اسب، سگ، خوک، گربه و همچنین عامل اسهال در ۱۰٪ گوساله ها و مرگ و میر در آن ها گزارش شده است (۷-۵).

عفونت *کلستریدیوم دیفیسیل* عامل اصلی مرگ و میر در عفونت های مرتبط با بیمارستان ها و

نویسنده مسئول: شهرکرد- دانشگاه آزاد اسلامی- واحد شهرکرد- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی- تلفن: ۰۹۱۳۲۸۷۹۵۷۲، E-mail: geneticsshki@yahoo.com

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 10:52 +0430 on Saturday August 26th 2017

موسسات بهداشتی و درمانی به خصوص در کشورهای در حال توسعه می باشد. شدت عفونت با *کلستریدیوم دیفیسیل* بیانگر توانایی این میکروارگانیزم در تولید توکسین های پیش التهابی در روده بزرگ می باشد (۲). این باکتری دو نوع توکسین به نام های توکسین A (*tcdA*) و B (*tcdB*) تولید می کند که عامل بیماری هستند (۸). توکسین A که خاصیت آنتروتوکسینی دارد با وزن مولکولی ۳۰۸ کیلو دالتون و توکسین B که خاصیت سایتوتوکسینی دارد با وزن مولکولی ۲۰۷ کیلو دالتون از بزرگترین توکسین های پلی پپتیدی باکتریایی هستند که تاکنون شناخته شده اند (۹). این دو توکسین از لحاظ ساختاری شبیه به یکدیگر هستند؛ اما به طور کلی توکسین B حدود ۱۰۰۰ برابر قویتر از توکسین A می باشد (۹). گونه های پاتوژن هر دو نوع توکسین را بصورت یکسان و برابر تولید می کنند (۱۰). ژن های *tcdA* و *tcdB* همچنین دارای تنظیم کننده های مثبت و منفی (*tcdR* و *tcdC*) می باشند (۱۱).

کلستریدیوم دیفیسیل در هر دو گونه ی انسان و حیوان معمولاً روده بزرگ را درگیر می کند. این باکتری از طریق مسیر مدفوعی- دهانی منتشر می شود و اسپورهای حاصل از آن به مدت طولانی در محیط زنده می مانند و می توانند از محیط اسیدی معده عبور کنند و سپس در روده کوچک اسپورها به فرم فعال باکتری تبدیل شوند. آلودگی با این باکتری در سراسر جهان در حال افزایش است و طیف وسیع تظاهرات بالینی از ناقلین بدون علامت تا کولیت برق آسا، توکسیک مگاکولون (toxic megacolon)، اسهال آبکی، سپتی سمی، سوراخ شدن روده، از کار افتادن ارگان های مختلف بدن و در نهایت مرگ را می تواند در بر گیرد. البته لازم به ذکر است عفونت های شدید و کشنده *کلستریدیوم دیفیسیل*، از اسهال آبکی تا کولیت با غشاءکاذب در ارتباط با تیپ های خاصی از این باکتری می باشند (۲). علائم بیماری های حاصل از این باکتری در انسان شامل اسهال آبکی و گاهی خونی به تعداد ۱۵-۱۰ بار در روز همراه با دردهای کرامپی قسمت پایین شکم، تب خفیف و لوکوسیتوز می باشد؛ اما از علائم این بیماری در حیوانات تاکنون به جز درد شکم، اسهال آبکی و در موارد معدودی اسهال خونی موردی گزارش نشده است. البته علل بروز طیف گسترده از این علایم، نامشخص است و براساس عوامل مختلف مربوط به فرد بیمار و سویه ی باکتری *کلستریدیوم دیفیسیل* متغیر است. تاکنون هیچ مطالعه یا پژوهشی بر روی *کلستریدیوم دیفیسیل* جدا شده از مدفوع گوساله ها در ایران صورت نگرفته است؛ بنابراین، این مطالعه با هدف تشخیص و بررسی فراوانی دو ژن *tcdA* و *tcdB* در *کلستریدیوم دیفیسیل* جدا شده از مدفوع گوساله های استان چهارمحال و بختیاری و همچنین بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی این باکتری انجام شده است.

روش بررسی:

در این مطالعه مقطعی- توصیفی تعداد ۱۵۰ نمونه اسهال و مدفوع گوساله (حداقل۴ گرم) در پاییز ۱۳۹۲ به صورت تصادفی از گاوداری های صنعتی و سنتی موجود در سطح استان چهارمحال و بختیاری در ظروف استریل جمع آوری گردید. نمونه ها ی جمع آوری شده در کنار یخ به مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد منتقل شدند.

جهت کشت و جداسازی *کلستریدیوم دیفیسیل* ابتدا به منظور غنی سازی ۲ گرم از نمونه مدفوع را با ۳ml اتانول ۹۶٪ جهت انتخاب اسپور باکتریایی مخلوط کرده و به مدت ۵۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده و بعد از سانتریفوژ، مخلوط حاصله را در حجم ۱۰ml محیط آبگوشت مایع (Cooked Meat Broth) ریخته و به مدت ۷ روز در دمای ۳۷°C در انکوباتور CO_2 گرمخانه گذاری شد. در مرحله ی بعد توسط یک لوپ استریل از سوسپانسیون بدست آمده بر روی محیط Blood Agar غنی شده با ۵٪ خون گوسفند به روش خطی کشت داده شد و در دمای ۳۷°C به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی هوازی انکوبه گردید. شناسایی باکتری بر اساس مورفولوژی و بوی حاصله از پلیت های تلقیح شده (بوی

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 10:52 +0430 on Saturday August 26th 2017

شبیه اصطبل اسب) انجام گرفت. علاوه بر این از آنجا که *کلستریدیوم دیفیسیل* یک باکتری کاتالاز منفی می باشد جهت شناسایی این باکتری از تست کاتالاز نیز استفاده گردید. به این صورت که توسط یک اپلیکاتور چوبی از قله یک کلونی به سطح یک لام شیشه ای منتقل و بلافاصله یک قطره پراکسید هیدروژن ۳٪ به آن اضافه شد و از نظر ایجاد حباب بر روی لام مورد بررسی قرار گرفت. ایجاد حباب های سریع و ماندگار با حالت جوش زدن نشانگر مثبت بودن تست و منفی بودن نسبت به *کلستریدیوم دیفیسیل* بود.

جهت استخراج DNA کلونی های بدست آمده را در حجم ۱۰۰ میکرولیترآب مقطر دیونیزه حل کرده و بعد از سانتریفوژ با استفاده از کیت استخراج DNA (ساخت شرکت سیناژن ایران) و طبق دستورالعمل کیت، DNA ژنومی باکتری ها تخلیص شد. کیفیت DNA تخلیص شده پس از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تشخیص قطعی *کلستریدیوم دیفیسیل* از روش PCR بهره گرفته شد. تأیید وجود *کلستریدیوم دیفیسیل* با شناسایی باند ۲۶۴ جفت بازی ژن *SrRNA ۱۶* با استفاده از پرایمرهای F: 5'-CCTCCTCAAGTACCGTCATTATC-3' و R: 5'-CAAAGGTGAGCCAGTACAGGA-3' صورت گرفت. این پرایمرها با استفاده از نرم افزار Gene Runner (Version 3.01) طراحی و جهت سنتز به شرکت سیناژن ایران فرستاده شدند. واکنش PCR، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به صورت ۲۰ نانوگرم DNA الگو، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR(10X)، ۲ میلی مولار $MgCl_2$، ۲۰۰ میکرو مولار dNTPMix، ۲۵ پیکومول از هر پرایمر و ۱ واحد آنزیم DNA پلیمراز Smar Taq (شرکت سیناژن ایران) انجام گردید. در پایان ۱ قطره روغن معدنی استریل برای جلوگیری از آلودگی و تبخیر، به مخلوط واکنش PCR اضافه شد. واکنش PCR در دستگاه مسترسایکلر (Mastercycler Gradient, Eppendorf) ساخت کشور آلمان با شرایط دمایی ۵ دقیقه دناتوره کردن ابتدایی در دمای ۹۵°C و در ادامه ۳۲ چرخه شامل دناتوره شدن در دمای ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۶۲°C به مدت ۴۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲°C به مدت ۴۰ ثانیه و در نهایت گسترش در دمای ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

تشخیص ژن های *tcdA* و *tcdB* با استفاده از روش Multiplex PCR انجام گرفت. واکنش PCR Multiplex، در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر با کاربرد پرایمرهای اختصاصی تشخیص ژن های *tcdA* و *tcdB* (جدول شماره ۱) به صورت ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۶ میلی مولار $MgCl_2$، ۵۰ میلی مولار Kcl، ۱۰میلی مولار Tris-HCl (pH 8.5)، ۸۰۰ میکرومولار dNTPMix، ۵۰ پیکومول از هر پرایمر و ۵ واحد آنزیم DNA پلیمراز Smar Taq (شرکت سیناژن ایران) انجام گردید. PCR Multiplex، با استفاده از دستگاه مسترسایکلر (Mastercycler Gradient, Eppendorf) ساخت کشور آلمان با شرایط، ۱۰ دقیقه دناتوره کردن ابتدایی در دمای ۹۴°C و در ادامه ۴۰ چرخه شامل دناتوره شدن در دمای ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۸°C به مدت ۱ دقیقه، گسترش در دمای ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه و در نهایت گسترش در دمای ۷۲°C به مدت ۷ دقیقه انجام شد. در پایان، ۱۵µLاز محصول PCR بدست آمده، در ژل آگارز ۱/۵٪ حاوی ۲ میکرولیتر اتیدیوم برماید الکتروفورز و به وسیله ی دستگاه ترانس لومیناتور مورد بررسی قرار گرفت.

جدول شماره ۱: پرایمرهای مورد استفاده برای تشخیص ژن های *tcdA* و *tcdB*

ژن	نام پرایمر	توالی پرایمر (۳'→۵')	طول محصول	شماره مسلسل
tcdA	TcdA-F	AATGATGTTACCTAATGCTCCTTC	۳۱۱**bp**	**KC**۲۹۲۱۲۵
	TcdA-R	AGTAAGTTCCTCCTGCTCCATC		
tcdB	TcdB-F	CCAGCTAATACACTTGATGAAAACC	٤۳۲**bp**	**KC**۲۹۲۱۹۰
	TcdB-R	TTTCTTCACCTTCTTCATTTCCT		

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 10:52 +0430 on Saturday August 26th 2017

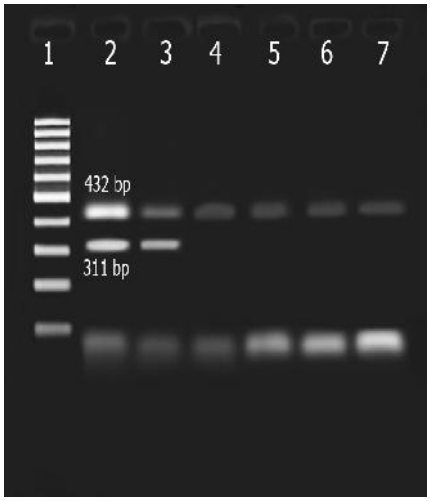
تست آنتی بیوگرام برای همه نمونه های کشت مثبت با استفاده از روش انتشار دیسک به روش Kirby-Bauer انجام شد. در مجموع از ۵ نوع دیسک آنتی بیوتیک اریترومایسین (ERY) (۱۰µg)، کلیندامایسین (CLI) (۱۰µg)، تتراسایکلین (TE) (۳۰µg)، سیپروفلوکساسین (CIP) (۳۰µg) و وانکومایسین (VAN) (۳۰µg) (پادتن طب، ایران) استفاده شد. انتخاب آنتی بیوتیک ها بر اساس اهمیت آن ها در درمان عفونت های *کلستریدیوم دیفیسیل* در انسان ها و حیوانات، انجام گرفت. در انتها قطر هاله عدم رشد بر اساس توصیه های کمیته فرعی NCCLS تفسیر شد (۱۲).

یافته ها:

با بررسی مورفولوژیکی کلونی های بدست آمده بر روی هر پلیت، در ۱۰۷ (۷۱/۳۳ درصد) نمونه *کلستریدیوم دیفیسیل* شناسایی گردید. کلونی های سفید یا خاکستری، کدر، گرد و کمی برآمده مشخصه وجود *کلستریدیوم دیفیسیل* بود. علاوه بر این با استفاده از تست کاتالاز مشخص شد که ۱۰۱ (۶۷/۳۳ درصد) نمونه کاتالاز منفی وجود دارد که به عنوان نمونه های مثبت در نظر گرفته شدند. جهت تشخیص قطعی از روش PCR بهره گرفته شد که به همین جهت از همه ۱۵۰ نمونه استخراج DNA انجام گرفت و سپس PCR انجام شد. با استفاده از روش PCR مشخص شد که از ۱۵۰ نمونه مدفوع تعداد ۹۰ نمونه (۶۰٪) دارای باکتری *کلستریدیوم دیفیسیل* هستند (تصویر شماره ۱). نمونه های مثبت به منظور شناسایی و تشخیص ژن های *tcdA* و *tcdB* با استفاده از روش Multiplex PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند که در نهایت مشاهده شد که از مجموع ۹۰ نمونه تنها ۸ نمونه (۸/۸٪) دارای ژن *tcdA* و ۱۶ (۱۷/۷٪) نمونه نیز دارای ژن *tcdB* می باشند. بعلاوه بررسی نتایج بدست آمده نشان داد که فقط ۲ نمونه (۲/۲ ٪) دارای هر دو ژن *tcdA* و *tcdB* هستند (تصویر شماره ۲).

تصویر شماره ۱: نتیجه PCR تشخیصی *کلستریدیوم دیفیسیل*

۱، ٤، ٥ و ۷: باند ٢٦٤ جفت بازی مشخصه وجود کلستریدیوم دیفیسیل، ۲: مارکر ۱۰۰ جفت بازی.



تصویر شماره ۲: نتیجه PCR ژن های *tcdA* و *tcdB*

۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۲ و ۳: باندهای ۳۱۱ و ٤٣٢ مشخصه وجود دو ژن های tcdA و tcdB.

بر اساس نتایج آنتی بیوگرام بدست آمده بیشترین موارد مقاومت به ترتیب مربوط به آنتی بیوتیک های کلیندامایسین و اریترومایسین است. از سوی دیگر بیشترین حساسیت به ترتیب مربوط به آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین و وانکومایسین می باشد (جدول شماره ۲).

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 10:52 +0430 on Saturday August 26th 2017

جدول شماره ۲: الگوی آنتی بیوگرام باکتری *کلستریدیوم دیفیسیل* جدا شده از مدفوع گوساله ها

آنتی بیوتیک	حساسیت		مقاومت متوسط		مقاومت	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
سیپروفلوکساسین (۳۰µg)	٤٥	٥٠	١٥	١٦/٦	٣٠	٣٣/٣
اریترومایسین (۱۰µg)	٠	٠	٩	١٠	٨١	٩٠
کلیندامایسین (۱۰µg)	٠	٠	٠	٠	٩٠	١٠٠
تتراسایکلین (۳۰µg)	١٥	١٦/٦	٦٩	٧٦/٦	٦	٦/٦
وانکومایسین (۳۰µg)	١٨	٢٠	٠	٠	٧٢	٨٠

بحث:

کلستریدیوم دیفیسیل سبب ایجاد بیماری های گسترده ای در انسان، دام و حیوانات اهلی شده و خسارات فراوانی به سیستم های تغذیه ای و اقتصادی وارد می کند. یکی از مخازن این عفونت باکتریایی، دام و حیوانات اهلی و به خصوص گوساله می باشد که در مناطق مختلف جهان از طریق مدفوع و یا حتی گوشت آلوده ی آن ها به سایر حیوانات اهلی و همچنین انسان انتقال می یابد. مطالعات و پژوهش های انجام شده در نقاط مختلف جهان تأیید کننده ی شیوع ناگهانی و بسیار بالای این باکتری به خصوص سویه های بیماریزای آن در سال های اخیر در انسان ها و حیوانات می باشند (۱۳). از طرفی مشکل دیگری که امروزه در مقابله ی با عفونت ها و بیماری های ناشی از *کلستریدیوم دیفیسیل* به وجود آمده است مقاوم شدن این باکتری به بسیاری از آنتی بیوتیک ها و روش های درمانی است. مطالعه حاضر درصد فراوانی و همچنین مقاومت دارویی بالایی از این باکتری را در گوساله های استان چهارمحال و بختیاری نشان می دهد. Rodriguez-Palacio و همکاران در سال ۲۰۰۶ به بررسی فراوانی *کلستریدیوم دیفیسیل* در مدفوع گوساله ها در کانادا پرداختند و درصد فراوانی این باکتری را ۱۱/۲٪ گزارش نمودند؛ همچنین در آزمایش مقاومت آنتی بیوتیکی که در این مطالعه صورت گرفت مشخص شد که همه نمونه های *کلستریدیوم دیفیسیل* نسبت به آنتی بیوتیک وانکومایسین مقاوم هستند که تشابه بالایی با نتایج مطالعه حاضر دارد (۵). در سال ۲۰۰۸، Pirs و همکاران در اسلوونی، فراوانی *کلستریدیوم دیفیسیل* در گوساله ها را ۱/۸٪ گزارش نمودند (۱۴). Janvilisri و همکاران در سال ۲۰۰۹ فراوانی *کلستریدیوم دیفیسیل* در مدفوع گوساله ها را ۵۲/۹٪ گزارش نمودند که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد؛ بعلاوه در این مطالعه مشخص شد که همه ی نمونه های مثبت دارای هر دو ژن *tcdA* و *tcdB* می باشند (۷). در سال ۲۰۱۰، Hoffer و همکاران در سوئیس درصد بسیار پایینی از *کلستریدیوم دیفیسیل* را در مدفوع گوساله های مورد مطالعه گزارش نمودند که تنها یک نمونه نسبت به *کلستریدیوم دیفیسیل* مثبت بود و همین یک نمونه دارای هر دو ژن *tcdA* و *tcdB* بود (۳). در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۲ توسط Rodriguez و همکاران انجام شد، فراوانی *کلستریدیوم دیفیسیل* در گوساله ها ۲۲/۲٪ گزارش شد (۱۵). مطالعه Zidaric و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داد که فراوانی *کلستریدیوم دیفیسیل* در گوساله ها ۱۶٪ می باشد؛ همچنین در این مطالعه مشخص شد که نمونه های مثبت نسبت به اریترومایسین و تتراسایکلین مقاوم می باشند که تا حدودی با نتایج حاصل از مطالعه حاضر مطابقت دارد (۱۶). با بررسی مطالعات و پژوهش های انجام گرفته بر روی *کلستریدیوم دیفیسیل* و ژن های ویرولانس این باکتری مشخص می شود که نتایج متفاوتی از شیوع و فراوانی این باکتری در نقاط مختلف جهان در برهه های زمانی متفاوت وجود دارد که این

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 10:52 +0430 on Saturday August 26th 2017

نتایج حاکی از شیوع روزافزون سویه های بیماریزا و ناقل ژن های ویرولانس و همچنین سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک در سراسر جهان است. با توجه به اینکه تاکنون مطالعه ای بر روی ژن های ویرولانس و مقاومت آنتی بیوتیکی *کلستریدیوم دیفیسیل* در دام در ایران انجام نگرفته است؛ بنابراین نمی توان فراوانی و شیوع این باکتری و همچنین مقاومت آنتی بیوتیکی آن را به خوبی مورد بررسی قرار داد؛ ولی از مقایسه نتایج این مطالعه با مطالعات دیگر در سراسر جهان مشخص می شود که *کلستریدیوم دیفیسیل* جدا شده از مدفوع گوساله در استان چهارمحال و بختیاری دارای فراوانی و همچنین مقاومت بالایی نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف می باشد و در صورت ادامه همین روند ممکن است خسارات اقتصادی و جانی سنگینی را به جامعه تحمیل کند.

نتیجه گیری:

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می دهد که *کلستریدیوم دیفیسیل* دارای درصد شیوع بالایی در گوساله های استان چهارمحال و بختیاری می باشد که خوشبختانه میزان کمی از سویه های بیماریزا (سویه های دارای ژن های *tcdA* و *tcdB*) در این بین وجود دارند. بعلاوه این باکتری مقاومت نسبتاً بالایی نسبت به انواعآنتی بیوتیک ها نشان داد که بسیار نگران کننده می باشد؛ بنابراین محدود کردن استفاده از آنتی بیوتیک ها و انجام تست های حساسیت ضد میکروبی و همچنین انجام مطالعات منظم و دوره ای به منظور بررسی شیوع این باکتری و بخصوص سویه های بیماریزای آن و شناسایی هرگونه تغییر در الگوی مقاومت می تواند برای جلوگیری از شیوع این باکتری و توسعه گونه های مقاوم و بیماریزا مفید واقع شود.

تشکر و قدردانی:

نویسندگان این مقاله از همکاران مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

منابع:

1. Arroyo LG, Kruth SA, Willey BM, Staempfli HR, Low DE, Weese JS. PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources. J Med Microbiol. 2005; 54(2): 163-6.
2. Goodarzi H, Albouyeh M, Azimi Rad M, Zali M, Aslan M. Molecular typing of *Clostridium difficile* isolated from hospitalized patients by PCR ribotyping. Pejouhesh. 2012; 36(2): 68-75
3. Hoffer E, Haechler H, Frei R, Stephan R. Low occurrence of *Clostridium difficile* in fecal samples of healthy calves and pigs at slaughter and in minced meat in Switzerland. J Food Prot. 2010; 73(5): 973-5.
4. Bouvet PJ, Popoff MR. Genetic relatedness of *Clostridium difficile* isolates from various origins determined by triple-locus sequence analysis based on toxin regulatory genes tcdC, tcdR, and cdtR. J Clin Microbiol. 2008; 46(11): 3703-13.
5. Rodriguez-Palacios A, Stampfli HR, Duffield T, Peregrine AS, Trotz-Williams LA, Arroyo LG, et al. *Clostridium difficile* PCR ribotypes in calves, Canada. Emerg Infect Dis. 2006; 12(11): 1730-6.
6. Schneeberg A, Rupnik M, Neubauer H, Seyboldt C. Prevalence and distribution of Clostridium difficile PCR ribotypes in cats and dogs from animal shelters in Thuringia, Germany. Anaerobe. 2012; 18(5): 484-8.
7. Janvilisri T, Scaria J, Thompson AD, Nicholson A, Limbago BM, Arroyo LG, et al. Microarray identification of *Clostridium difficile* core components and divergent regions associated with host origin. J Bacteriol. 2009; 191(12): 3881-91.

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 10:52 +0430 on Saturday August 26th 2017

8. Sadeghifard N, Salari M, Ranjbar R, Ghafouryan S, Raftari M, Abdulamir A, et al. The clinical and environmental spread and diversity of toxigenic *Clostridium difficile* diarrhea in the region of the Middle East. Rev Infec. 2010; 1(4): 180-7.
9. Sun X, Savidge T, Feng H. The enterotoxicity of *Clostridium difficile* toxins. Toxins (Basel). 2010; 2(7): 1848-80.
10. Nasri MR, Khorvash F, Zolfaghari MR, Mobasherizadeh S. The relative frequency of *Clostridium Difficile* in fecal samples of hospitalized patients with diarrhea by ELISA Method. J Isfahan Med School. 2012; 29(167): 2376-82.
11. Persson S, Jensen JN, Olsen KE. Multiplex PCR method for detection of *Clostridium difficile* tcdA, tcdB, cdtA, and cdtB and internal in-frame deletion of tcdC. J Clin Microbiol. 2011; 49(12): 4299-300.
12. CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard—Eleventh ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute Pub; 2012.
13. Lin YC, Huang YT, Tsai PJ, Lee TF, Lee NY, Liao CH, et al. Antimicrobial susceptibilities and molecular epidemiology of clinical isolates of *Clostridium difficile* in Taiwan. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(4): 1701-5.
14. Pirs T, Ocepek M, Rupnik M. Isolation of *Clostridium difficile* from food animals in Slovenia. J Med Microbiol. 2008; 57(6): 790-2.
15. Rodriguez C, Taminiau B, Van Broeck J, Avesani V, Delmee M, Daube G. *Clostridium difficile* in young farm animals and slaughter animals in Belgium. Anaerobe. 2012; 18(6): 621-5.
16. Zidaric V, Pardon B, Dos Vultos T, Deprez P, Brouwer MS, Roberts AP, et al. Different antibiotic resistance and sporulation properties within multiclonal *Clostridium difficile* PCR ribotypes 078, 126, and 033 in a single calf farm. Appl Environ Microbiol. 2012; 78(24): 8515-22.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2015 Jun, Jul; 17(2): 35-42.

Original article

Investigation of antibiotic resistance and frequency of *Clostridium difficile tcdA* and *tcdB* genes in feces of calves in Chaharmahal and Bakhtiari province

Mokhtari-Farsani A, Doosti A*
Biotechnology Research Center, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, I.R. Iran.
Received: 25/Mar/2014 Accepted: 5/Aug/2014

Background and aims: *Clostridium difficile* (*C. difficile*) is a gram-positive, toxin-producing bacillus that can infect both human and animals. The aim of this study was to investigate the frequency of virulence genes and evaluation of antibiotic resistance among *C. difficile* isolated from feces of calves in Chaharmahal and Bakhtiari province.
Methods: In this cross-sectional study, 150 fresh feces of calves were collected and *C. difficile* was isolated from feces of calves using bacterial culture methods. Bacteria genomic DNA was extracted by a DNA extraction kit, and *tcdA* and *tcdB* genes were identified by Multiplex PCR method. In the final stage, antimicrobial resistance was carried out by standard Bauer-Kirby disk diffusion method.
Results: 90 samples (60%) were included *C. difficile*, 8 samples (8.8%) *tcdA* and 16 samples (17.7%) *tcdB*. The highest rate of antibiotic resistance was against Clindamycin (100%) and Erythromycin (90%), respectivly. In addition, the highest rate of antibiotic sensitivity was against Ciprofloxacin (50%) and Vancomycin (20%).
Conclusion: According to the results of present study, the prevalence and antibiotic-resistant of *C. difficile* was high. It should be adapted to appropriate methods of prevention and treatment, as well as restricting the use of antimicrobial drugs in the development of human and animal bacteria, especially, pathogenic strains.

***Keywords: Clostridium difficile, tcdA* gene, *tcdB* gene, Antibiotic resistance.**

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 10:52 +0430 on Saturday August 26th 2017

Cite this article as: Mokhtari-Farsani A, Doosti A. Investigation of antibiotic resistance and frequency of Clostridium difficile tcdA and tcdB genes in feces of calves in Chaharmahal and Bakhtiari province. J Shahrekord Univ Med Sci. 2015; 17(2): 35-42.

*Corresponding author:
Biotechnology Research Center, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, I.R. Iran, Tel: 00989132879572, E-mail: geneticsshki@yahoo.com