Isolation and identification of Clostridium difficile from ready-to-eat vegetable salads in restaurants of Tabriz by Real-time PCR and determination of the antibiotic resistance pattern

Kochakkhani H., BS[1], Moosavy M.H., PhD[2], Dehghan P., PhD[3]
1. MSc Department of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition and Food Science, Tabriz university of Medical Sciences, Tabriz, Iran
2. Associate Professor, Department of of Food Hygiene and Aquatic, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz (Corresponding Author), Tabriz, Iran, Tel:+98-81-32518064, mhmoosavy@gmail.com
3. Assistant Professor Department of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition and Food Science, Tabriz university of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

ABSTRACT

Backgrounds and Aim: Clostridium difficile has been identified as a pathogen in antibiotic associated diarrhea, pseudo-membranous colitis. The ready-to-eat vegetable salads (REVS) are one of the possible sources for transmission of C. difficile to human. The aim of the present study was isolation and identification of Clostridium difficile in ready-to-eat vegetable salads in the restaurants of Tabriz by Real-time PCR and determination of its antibiotic resistance pattern.

Materials and methods: This was a cross-sectional study. A total of 60 ready-to-eat vegetable salads samples were collected randomly from restaurants in different regions of Tabriz from February to June 2015. After preparation and DNA extraction, Clostridium difficile was identified by Real-time PCR method. Disc diffusion method was used to determine antimicrobial resistance of the isolates to eight different antibiotics. Using SPSS 19 software, chi-square was used for data analysis. $p \leq 0.05$ was considered significant.

Results: Among that 60 samples, 8 (13.33%) were contaminated with Clostridium difficile. There was no difference in Clostridium difficile prevalence in different regions ($p= 0.296$). Among eight antibiotics used in this study, nalidixic acid with 8 isolates (100%) and Clindamycin with 7 isolates (87.5%) had the highest resistance rate. We found no resistance to metronidazole and vancomycin.

Conclusion: The results of this study showed that the ready-to-eat salad vegetables can be a way for transmission of Clostridium difficile to humans. Therefore it is necessary to take necessary measures to prevent transmission of the infection through ready to- eat vegetable salads

Keywords: Clostridium difficile, Antibiotic resistance, Ready-to-eat vegetable salads, Real-time PCR.

Received: Oct 31, 2016 **Accepted:** Mar 14, 2017

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-06-06]

[DOI: 10.22102/22.3.102]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و دوم / مرداد و شهریور ۱۳۹۶/ ۱۱۲-۱۰۲

جداسازی و شناسایی کلستریدیوم دیفیسایل از سالاد سبزیجات آماده به مصرف از رستوران‌های تبریز به روش Real-time PCR و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آن

حجت کوچک‌خانی[۱]، میرحسن موسوی[۲]، پروین دهقان[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۲. دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران (مولف مسوول)،تلفن ثابت: ۳۶۳۷۸۷۴۳-۰۴۱
mhmoosavy@gmail.com

۳. استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

چکیده

زمینه و هدف: کلستریدیوم دیفیسایل (Clostridium difficile) به عنوان عامل اسهال ناشی از مصرف آنتی بیوتیک و کولیت کاذب است. سالادهای آماده به مصرف به عنوان یکی از منابع احتمالی انتقال کلستریدیوم دیفیسایل به انسان محسوب می-شوند. هدف از مطالعه حاضر جداسازی و شناسایی کلستریدیوم دیفیسایل از سالاد سبزیجات آماده به مصرف از رستوران‌های تبریز به روش Real-time PCR و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آن بود.

روش بررسی: این مطالعه از نوع توصیفی – تحلیلی بود. ۶۰ نمونه از سالاد عرضه شده از رستوران‌های مناطق مختلف شهر تبریز در فاصله زمانی اسفند ۹۴ تا خرداد ۹۵ جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها پس از آماده سازی و استخراج DNA، با روش Real-time PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. مقاومت آنتی بیوتیکی جدا شده‌ها به هشت آنتی بیوتیک مختلف با استفاده از روش انتشار دیسک تعیین شد. بررسی ارتباط بین شیوع کلستریدیوم دیفیسایل در مناطق پنجگانه در نرم‌افزار آماری SPSS (ویرایش ۱۹) با آزمون مربع کای در سطح معنی‌داری $P < ۰/۰۵$ انجام گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که از ۶۰ نمونه مورد بررسی، ۸ نمونه (۱۳/۳۳٪) آلوده به کلستریدیوم دیفیسایل بودند. بر اساس نتایج، اختلاف معنی‌داری در شیوع باکتری در مناطق مختلف مشاهده نشد ($P = ۰/۲۹۶$). از بین هشت آنتی‌بیوتیک مورد استفاده، نالیدیکسیک اسید با ۸ جدایه(۱۰۰٪) و کلیندامایسین با ۷ جدایه(۸۷/۵٪) به ترتیب بیشترین میزان مقاومت را داشته‌اند. هیچ جدایه‌ی مقاومی به مترونیدازول و وانکومایسین یافت نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که سالاد سبزیجات آماده به مصرف ممکن است راه انتقال کلستریدیوم دیفیسایل به انسان باشد. بنابراین لازم است تدابیر لازم برای مقابله با انتقال آلودگی از طریق سالاد سبزیجات آماده مصرف به کار گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: کلستریدیوم دیفیسایل، مقاومت آنتی بیوتیکی، سالاد سبزیجات آماده به مصرف، Real-time PCR

وصول مقاله: ۹۵/۸/۱۰ اصلاحیه نهایی:۹۵/۱۲/۱۸ پذیرش:۹۵/۱۲/۲۴

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-06-06]

[DOI: 10.22102/22.3.102]

مقدمه

کلستریدیوم دیفیسایل (Clostridium difficile) یک باکتری گرم مثبت، بی‌هوازی اجباری، میله‌ای شکل، اسپورزا و فرصت طلب می‌باشد(۱). عفونت کلستریدیوم دیفیسایل (CDI= Clostridium difficile infection) از شایع‌ترین علل اسهال‌های عفونی ناشی از مصرف آنتی بیوتیک و مراقبت‌های بهداشتی در کشورهای توسعه یافته می باشد(۴-۲). شدت عفونت با کلستریدیوم دیفیسایل بیانگر توانایی این میکروارگانیسم در تولید توکسین‌های پیش التهابی در روده بزرگ می‌باشد(۵). این باکتری آنتروتوکسین A(۳۰۸ کیلو دالتون) و سیتوتوکسین B (۲۷۰ کیلو دالتون) را تولید می‌کند که برای اولین بار در سال ۱۹۸۱ توسط Banno و همکاران گزارش شده است(۶). اخیراً سم سومی بنام باینری توکسین برای اولین بار توسط Popoff و همکاران جداسازی شده که می‌تواند در ۱۷٪ تا ۲۳٪ از گونه‌های کلستریدیوم دیفیسایل شناسایی شود (۷). از مهمترین عوامل خطر در ایجاد بیماری‌های ناشی از این باکتری می‌توان سن بالا (بیش از ۶۵ سال)، بستری شدن در بیمارستان، استفاده از مهارکننده‌های پمپ پروتون و مسدود کننده H2 را نام برد که با کاهش اسیدیته معده امکان انتقال اسپور کلستریدیوم دیفیسایل از طریق معده به روده را فراهم می‌کند. آنتی بیوتیک‌هایی از جمله کلیندامایسین، سفالوسپورین، پنی سیلین و فلوروکینولون نقش عمده-ای را در افزایش شیوع اسهال ناشی از کلستریدیوم دیفیسایل دارند. (۸و۱). شناخت فاکتورهای مرتبط و مستعد کننده ابتلا به این عفونت از آن جهت اهمیت دارد که عفونت با کلستریدیوم دیفیسایل می‌تواند علائمی از قبیل اسهال، کولیت کاذب (التهاب روده بزرگ)، مگاکولون سمی(بزرگ شدن روده بزرگ) و مرگ ایجاد کند(۱۰و۹). مهمترین علامت این بیماری اسهال آبکی بوده که در روده بزرگ و معمولاً در اثر تجویز آنتی بیوتیک رخ می‌دهد. همچنین این باکتری ایجاد دو اگزوتوکسین نموده که با اتصال شدن به سلول‌های اپی‌تلیال منجر به التهاب و اسهال می‌گردد. علاوه بر این تشخیص بالینی مگاکولون سمی بر اساس یافته‌های بالینی دیلاتاسیون کولون (اتساع روده بزرگ) می‌باشد(۵). همچنین این ارگانیسم عامل ایجاد ۲۰-۱۵ درصد اسهال‌های ناشی از مصرف آنتی بیوتیک‌ها و بیش از ۹۵٪ اسهال‌های ناشی از کولیت کاذب در انسان می‌باشد(۷). در طی ۲۰ سال اخیر بروز و شدت عفونت کلستریدیوم دیفیسایل در سراسر جهان افزایش یافته است. بطوریکه سویه‌های نوظهور بیماری‌زایی مانند ریبوتایپ ۰۲۷ با قدرت تهاجمی بالاتر باعث افزایش شیوع عفونت حاصل از این باکتری در شمال امریکا و اروپا شده است(۲).

در طول سه دهه گذشته، با افزایش شیوع عفونت کلستریدیوم دیفیسایل و با تغییرات ایجاد شده در اپیدمیولوژی بیماری ،مواد غذایی می‌تواند به عنوان یک منبع احتمالی انتقال کلستریدیوم دیفیسایل به انسان مطرح شود(۸). گزارشات زیادی مبنی بر وجود کلستریدیوم دیفیسایل در محیط‌های مختلفی از جمله آب، خاک، گوشت، حیوانات وجود دارد. این مطالعات دلالت بر این دارد که اگر مواد غذایی بعنوان یک منبع بالقوه کلستریدیوم دیفیسایل باشند، سبزیجات می‌تواند بعنوان یکی از راه‌های انتقال کلستریدیوم دیفیسایل به انسان تلقی شود. با وجود شیوع بالای این بیماری، هنوز مکانیسم‌های انتقال کلستریدیوم دیفیسایل

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-06-06]

[DOI: 10.22102/22.3.102]

از مواد غذایی به انسان به طور کامل گزارش نشده است (۱۴-۱۱و۹).

روش‌های مختلفی از جمله روش کشت، الایزا (ELISA= Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR= Polymerase Chain Reaction) برای شناسایی کلستریدیوم دیفیسایل در مواد غذایی استفاده می‌شود. روش کشت از رایج‌ترین روش‌های تشخیص کلستریدیوم دیفیسایل می‌باشد(۱۵) ولی این روش، تا حدودی پرزحمت، گران و وقت گیر بوده و به ۱۵-۵ روز برای شناسایی میکروارگانسیسم با این روش زمان نیاز است(۱۶). الایزا به دلیل ساده بودن، حساسیت بالایی دارد و اغلب برای جستجوی سم باکتری بکار می رود و نیز حضور ۱۰۰۰-۱۰۰ پیکوگرم از توکسین جهت مثبت شدن این تست ضروری می‌باشد(۱۷). بنابراین، استفاده از روش‌های سریع و دقیق برای شناسایی خود باکتری در محصولات غذایی مهم بوده و نقش بسزایی در کنترل و پیشگیری از بیماری دارد. از جمله روش‌های سریع، می‌توان به روش‌های مولکولی نظیر Real-time PCR اشاره کرد که می‌تواند اسید نوکلئیک میکروارگانیسم را در فاصله زمانی کوتاه تکثیر کرده و نتیجه را اعلام کند(۱۸). در سال‌های اخیر، از روش Real-time PCR برای شناسایی باکتری‌های مختلفی از جمله اشریشیا کولای O157:H7، سالمونلا و لیستریا مونوسیتوژنز در انواع مواد غذایی استفاده شده است. و این روش به عنوان یک روش مولکولی کارا و ارزشمند جهت شناسایی باکتری‌های بیماریزا ارزیابی شده است (۲۰و ۱۹).

نتایج برخی محققین نشان می‌دهد که سالادهای آماده به مصرف و سبزیجات به عنوان منابع آلودگی به کلستریدیوم دیفیسایل می‌توانند در بیماری‌های منتقله از غذا نقش بسزایی داشته باشند. بطور مثال Bakri و همکاران در سال ۲۰۰۹ در اسکاتلند ۴۰ نمونه سالاد آماده به مصرف را مورد آزمایش قرار داده و در ۷/۵٪ نمونه‌ها این باکتری را مشاهده کردند(۲۱) Metcalf و همکاران در سال ۲۰۱۰ در کانادا مطالعه‌ای روی سبزیجات انجام دادند که از ۱۱۱ نمونه آزمایش شده پنج مورد از نظر وجود کلستریدیوم دیفیسایل مثبت بودند(۲۲) همچنین Eckert و همکاران در سال ۲۰۱۳ در فرانسه، ۱۰۴ سالاد آماده به مصرف و سبزیجات را مورد آزمایش قرار دادند که در سه مورد این باکتری وجود داشت(۸). از آنجایی که در ایران هیچ گونه مطالعه‌ای مبنی بر شناسایی کلستریدیوم دیفیسایل در مواد غذایی با روش Real-time PCR صورت نگرفته است، از این‌رو مطالعه حاضر به منظور جداسازی و شناسایی کلستریدیوم دیفیسایل از سالاد سبزیجات آماده به مصرف از رستوران‌های تبریز به روش Real-time PCR و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آن انجام گرفت.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی – تحلیلی، برای جداسازی و شناسایی کلستریدیوم دیفیسایل از سالاد سبزیجات آماده به مصرف از رستوران‌های تبریز به روش Real-time PCR و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آن، با استفاده از فرمول

$$n = \frac{z^2 p(1-p)}{d^2}$$

و با توجه به شیوع ۷/۵ درصد کلستریدیوم در سالاد (۲۱) و با سطح اطمینان ۹۵٪ نسبت مذکور طوری برآورد شد که خطای برآورد حداکثر ۰/۰۷ باشد، که

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-06-06]

[DOI: 10.22102/22.3.102]

بر این اساس ۵۴ نمونه ارزیابی گردید; ولی نظر به بالا بودن تعداد رستوران‌ها، بررسی ما بر روی نمونه‌هایی با تعداد بیشتر یعنی ۶۰ نمونه صورت پذیرفت.

جمع‌آوری نمونه :

در این مطالعه تعداد ۶۰ نمونه از سالاد سبزیجات آماده به مصرف در اسفند ۹۴ تا خرداد ۹۵ به طور تصادفی از رستوران‌های موجود در مناطق جنوب (n = ۱۶), شرق (n = ۱۴), شمال (n = ۱۰), غرب (n = ۱۰) و مرکز (n = ۱۰) شهر تبریز جمع‌آوری گردید. سپس نمونه-های جمع‌آوری شده در ظرف مخصوص در شرایط سرد بلافاصله به آزمایشگاه میکروب شناسی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز منتقل شدند و در همان روز آماده سازی نمونه‌ها انجام گرفت.

آماده سازی نمونه:

جهت آماده سازی نمونه‌ها، ۵۰ گرم از کل نمونه را وزن کرده و در داخل کیسه‌های پلاستیکی استریل ریخته شد و بر روی هر کدام از آنها ۴۵۰ میلی لیتر پپتون واتر ۰/۱ درصد استریل اضافه گردید. سپس محتویات کیسه‌ها به مدت ۶۰ ثانیه در داخل دستگاه پالسی فایر ساخت کشور انگلستان همگن شده و مایع حاصله به داخل فالکن‌های استریل منتقل شده و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژگردیدند، رسوب بدست آمده سه بار بوسیله پپتون واتر ۰/۱ درصد استریل شستشو داده شد و عمل سانتریفوژ تکرار گردید. یک میلی لیتر پپتون واتر ۰/۱درصد استریل به رسوب بدست آمده از مرحله آخر اضافه گردید و تا زمان استخراج (Deoxyribo Nucleic Acid) DNA در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها از نظر باکتری کلستریدیوم دیفیسایل با استفاده از روش Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه، ژن ایزومراز تری فسفات (tpi= triose phosphate isomerase) بعنوان ژن Housekeeping یا کنترل برای تایید باکتری کلستریدیوم دیفیسایل مورد استفاده قرار گرفته است.

استخراج DNA:

کیت مورد نیاز برای استخراج DNA باکتری و پرایمرهای مورد استفاده برای بررسی کلستریدیوم دیفیسایل از شرکت بیونر کره جنوبی تهیه شده که در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش qPCR

ژن هدف	توالی پرایمر(′۳- ′۵)	اندازه باند(pb)
tpi	AAAGAAGCTACTAAGGGTACAAA CATAATATTGGGTCTATTCCTAC	۲۳۰
16SrDNA	TTGAGCGATTTACTTCGGTAAAGA CCATCCTGTACTGGCTCACTT	۱۵۷

مخلوط واکنش Real-time PCR:

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-06-06]

[DOI: 10.22102/22.3.102]

مخلوط واکنش در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر مستر میکس ۲x سایبر گرین یک، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمرهای فوروارد و ریورس، یک میکرولیتر DNA الگو و ۳ میکرولیتر آب مقطر بود. تمام آزمایشات مربوط به باکتری کلستریدیوم دیفیسایل در دستگاه Real time PCR با مدل روتور ژن Q- 5 PLEX ، (QIAGEN، آلمان) با شرایط دمایی ۲ دقیقه دناتوره کردن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و در ادامه ۴۰ چرخه شامل دناتوره شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۹ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. برای به دست آوردن غلظت بهینه از پرایمرها، آزمایش‌های اولیه با استفاده از ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ پیکومول در میلی‌لیتر از غلظت پرایمرهای فوروارد و ریورس صورت گرفت.

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی:

تست حساسیت آنتی بیوتیکی برای همه نمونه‌های مثبت بوسیله روش انتشار دیسک با استفاده از مولر هینتون آگار با پروتکل موسسه استاندارد آزمایشگاه بالینی (CLSI, 2007) انجام گردید(۲۳). در مجموع از ۸ نوع دیسک آنتی بیوتیکی، کلیندامایسین (۲ میکروگرم)، وانکومایسین (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، مترونیدازول (۵ میکروگرم) و نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکروگرم)،(پادتن طب، ایران) استفاده شد. در انتها نتایج مطابق با معیارهای تفسیری ارائه شده توسط موسسه استاندارد آزمایشگاه بالینی (Clinical and Laboratory Standards Institute=CLSI) تفسیر گردید.

آنالیز آماری:

نتایج آماری برای بررسی ارتباط بین شیوع کلستریدیوم دیفیسایل در مناطق پنج‌گانه در نرم‌افزار آماری SPSS (ویرایش ۱۹) با استفاده از آزمون مربع کای در سطح معنی‌داری ۰/۰۵> P انجام گرفت.

یافته‌ها

منحنی استاندارد با استفاده از (Threshold Cycle) CT از غلظت‌های مختلف کلستریدیوم دیفیسایل (حدود 10^{6}- 10^{1} CFU/ml) تهیه شده که یک رابطه خطی را بین غلظت DNA و CT با R^2 ۰/۹۹۹ نشان می‌دهد (شکل ۱). حساسیت آزمون کمتر از (Colony Forming Unit / Milliliter) 10^{2} CFU/ml می‌باشد.

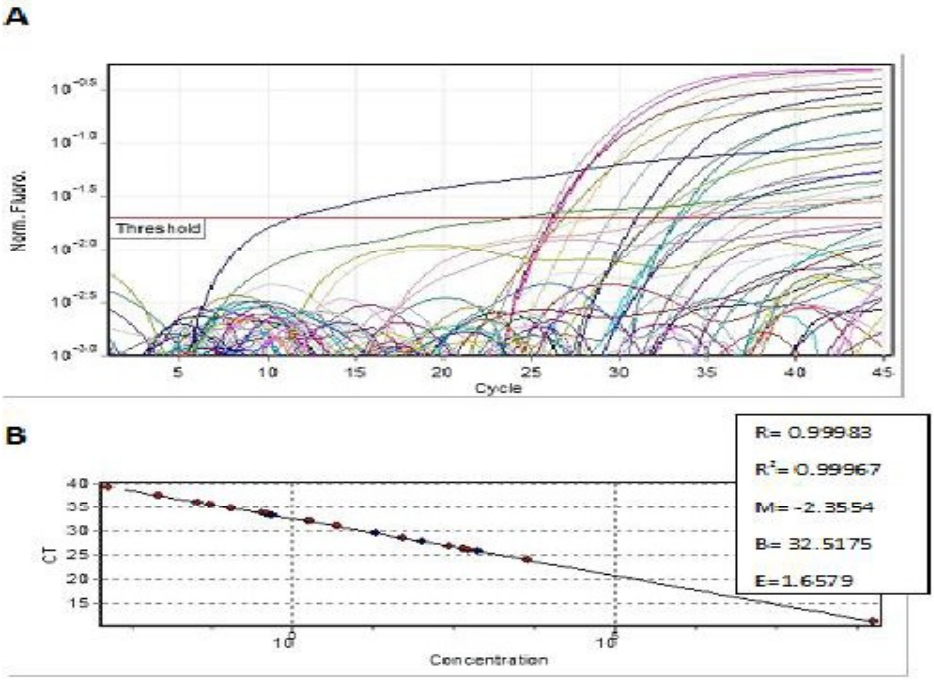
در مطالعه حاضر از مجموع ۶۰ نمونه از سالاد سبزیجات آماده به مصرف، به طور کل ۸ جدایه (۱۳/۳۳٪) کلستریدیوم دیفیسایل با آزمایشات مولکولی شناسایی شد. در بین مناطق، بالاترین آلودگی به کلستریدیوم دیفیسایل، مربوط به مرکز بوده و شمال و شرق در رده دوم قرار داشتند(جدول ۲). بر اساس نتایج به دست آمده اختلاف آماری معنی‌داری بین شیوع کلستریدیوم دیفیسایل در پنج منطقه (شمال، جنوب، شرق، غرب و مرکز) مشاهده نشد(P=۰/۲۹۶).

براساس نتایج آنتی بیوگرام به دست آمده بیشترین موارد مقاومت به ترتیب مربوط به آنتی بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید(n=۸) و کلیندامایسین(n=۷) بود. از

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-06-06]

[DOI: 10.22102/22.3.102]

سوی دیگر بیشترین حساسیت مربوط به آنتی بیوتیک- های مترونیدازول(n=۸) وانکومایسین(n=۸) تشخیص داده شد (جدول ۳).



شکل ۱.(A) تعیین حساسیت qPCR برای ارزیابی کلستریدیوم دیفیسایل در نمونه‌های سالاد سبزیجات آماده به مصرف. (B) منحنی استاندارد بصورت یک رابطه خطی بین غلظت DNA استاندارد و ارزش CT است. منحنی رگرسیون خطی که به وسیله CT ایجاد شده را نشان می‌دهد.

جدول ۲: شیوع کلستریدیوم دیفیسایل جدا شده از سالاد سبزیجات آماده به مصرف

مناطق	تعداد نمونه	نمونه‌های آلوده	تعداد نمونه آلوده (درصد)	P-value
شمال	۱۰	N2 N6	۲(۲۰)	
غرب	۱۰	-	۰(۰/۰۰)	
مرکز	۱۰	C5 C7 C8	۳(۳۰)	۰/۲۹۶
شرق	۱۴	E5 E6	۲(۱۴/۲۸)	
جنوب	۱۶	S12	۱(۶/۲۵)	
کل	۶۰	-	۸(۱۳/۳۳)	

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-06-06]

[DOI: 10.22102/22.3.102]

جدول ۳: مقاومت آنتی بیوتیکی کلستریدیوم دیفیسایل جدا شده از سالاد سبزیجات آماده به مصرف

طبقه و آنتی بیوتیک عامل	مقاومت		متوسط		حساس	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
لینکومایسین						
کلیندامایسین	۷	۸۷/۵	۱	۱۲/۵	۰	۰
گلیکوپپتید						
وانکومایسین	۰	۰	۰	۰	۸	۱۰۰
ماکرولید						
اریترومایسین	۴	۵۰	۳	۳۷/۵	۱	۱۲/۵
فنولیک						
کلرامفنیکل	۱	۱۲/۵	۲	۲۵	۵	۶۲/۵
تتراسایکلین						
تتراسایکلین	۳	۳۷/۵	۲	۲۵	۳	۳۷/۵
کوینولون						
سیپروفلوکساسین	۵	۶۲/۵	۲	۲۵	۱	۱۲/۵
نالیدیکسیک اسید	۸	۱۰۰	۰	۰	۰	۰
نیتروایمیدازول						
مترونیدازول	۰	۰	۰	۰	۸	۱۰۰

بحث

آلودگی مواد غذایی با سویه‌های مولد سم کلستریدیوم دیفیسایل به دلیل شیوع بالا، شدت بیماری و مرگ و میر باعث افزایش نگرانی در انتقال این میکروارگانیسم از مواد غذایی به انسان شده است(۲۵و ۲۴). با این وجود شناسایی میکروارگانیسم با استفاده از روش‌های مولکولی به دلیل سریع، دقیق بودن و تکرار پذیری بالا از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد(۲۶). در مطالعات مختلف شیوع کلستریدیوم دیفیسایل با درصد متفاوت در نمونه‌های غذایی بویژه سبزیجات و سالاد سبزیجات گزارش شده است. در مطالعه حاضر میزان شیوع کلستریدیوم دیفیسایل در سالاد سبزیجات آماده به مصرف ۱۳/۳۳٪ یافت شد. در مطالعه انجام شده در فرانسه توسط Eckert و همکاران، میزان آلودگی سالادهای آماده به مصرف و سبزیجات به این میکروارگانیسم به ترتیب ۳/۳۳٪ و ۲/۲۷٪ گزارش شده است که نتایج با تحقیق حاضر اختلاف دارد(۸). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۰ در کانادا توسط Metcalf و همکاران انجام شد، میزان آلودگی کلستریدیوم دیفیسایل در سبزیجات ۴/۵٪ گزارش گردید که نسبت به مطالعه ما آلودگی کمتری دارد (۲۲). مطالعه Bakri و همکاران در سال ۲۰۰۹ در اسکاتلند، فراوانی کلستریدیوم دیفیسایل در سالاد آماده به مصرف را ۷/۵٪ گزارش نمودند(۲۱). طی مطالعه‌ای بر روی نمونه‌های سالاد آماده به مصرف و جوانه در اسلوونی در سال ۲۰۱۲ گزارش کردند تمام نمونه‌ها عاری از

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-06-06]

[DOI: 10.22102/22.3.102]

باکتری کلستریدیوم دیفیسایل بودند(۲۷). نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر با نتایج سایر مطالعات انجام شده در داخل کشور نیز مطابقت دارد. در مطالعه‌ای که اخیراً توسط Yamoudy و همکاران در اصفهان انجام شده است، فراوانی کلستریدیوم دیفیسایل در سالاد آماده به مصرف را ۵/۶۶٪ گزارش کردند(۲۸). تفاوت در نتایج ممکن است به دلیل تفاوت در تعداد و نوع نمونه، روش نمونه برداری، روش انجام آزمایشگاهی و شرایط منطقه مورد مطالعه باشد (۲۳).

آلودگی سبزیجات سالاد با این میکروارگانیسم ممکن است به دلیل استفاده از خاک، کود، آب آلوده و یا در طول آماده سازی و بهداشت شخصی باشد. همچنین، زنده ماندن اسپور کلستریدیوم دیفیسایل در محیط احتمال آلودگی مواد غذایی و عفونت در حیوانات را افزایش می دهد(۲۶و۲۳).

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، نمونه‌های مثبت (نمونه-های آلوده به کلستریدیوم دیفیسایل) بیشترین حساسیت را به آنتی بیوتیک‌های مترونیدازول و وانکومایسین داشتند که با نتایج حاصل از مطالعه Eckert و همکاران (۸)، Rahimi و همکاران(۲۳)، Bakri و همکاران(۲۱) و Metcalf و همکاران مطابقت دارد(۲۲). مترونیدازول و وانکومایسین اکثراً برای درمان اسهال مرتبط با کلستریدیوم دیفیسایل استفاده می‌شوند. همچنین مطالعه حاضر مقاوم بودن نمونه‌های مثبت به نالیدیکسیک اسید و کلیندامایسین را نشان داد که همخوانی بالایی با نتایج مطالعه Rahimi و همکاران دارد(۲۳). نتایج حاصل از مقاومت آنتی بیوتیکی در این مطالعه با آنتی بیوتیک‌هایی که برای درمان عفونت آنتی بیوتیکی در غذاهای حیوانی در ایران استفاده می‌شوند در ارتباط است. مطالعات مختلف انجام شده در دنیا، نتایج متفاوتی از مقاومت آنتی بیوتیکی به کلستریدیوم دیفیسایل در مواد غذایی مختلفی را نشان می‌دهند(۲۳-۲۱). متفاوت بودن نتایج ممکن است به دلیل تفاوت در ریبوتایپ کلستریدیوم، روش انجام آزمایش، نوع غذا باشد. اخیراً گزارش شده است که مرگ و میر ناشی از عفونت کلستریدیوم دیفیسایل که احتمالاً به دلیل تغییرات در حدت سویه و همراه با تغییرات در الگوهای مصرف آنتی بیوتیک می‌باشد به طور قابل توجهی افزایش یافته است(۴).

اسهال یکی از شایع ترین عوارض مصرف آنتی بیوتیک‌ها و کلستریدیوم دیفیسایل شایع ترین عامل ایجاد اسهال ناشی از آنتی بیوتیک (AAD= antibiotic-associated diarrhea) می باشد. نشان داده شده است که بیماری‌های اسهالی یکی از علل اصلی مرگ و میر در سراسر جهان می‌باشد که مصرف بسیاری از آنتی بیوتیک‌ها و بی تاثیر بودن آنها روی این باکتری از مهم‌ترین عوامل موثر در ایجاد اسهال می-باشند(۲۹). طبق گزارشات صورت گرفته بیش از ۹۰٪ از موارد عفونت کلستریدیوم دیفیسایل در رابطه با درمان آنتی بیوتیکی رخ می‌دهد و این درمان آنتی بیوتیکی عامل خطر مهمی برای عفونت کلستریدیوم دیفیسایل در انسان می‌باشد(۱) که کاهش مصرف آنتی بیوتیک‌ها می‌تواند منجر به کاهش عفونت کلستریدیوم دیفیسایل در ارتباط با آنتی بیوتیک‌ها شود(۳۰). مقاوم بودن کلستریدیوم دیفیسایل به آنتی بیوتیک‌ها برای تشخیص، درمان و پیشگیری از بیماری متفاوت می‌باشد با این وجود در حال حاضر درمان عفونت کلستریدیوم دیفیسایل به طور عمده بر اساس مترونیدازول و وانکومایسین می‌باشد(۳۱).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-06-06]

[DOI: 10.22102/22.3.102]

مطالعه حاضر اولین گزارش از وضعیت آلودگی مواد غذایی بویژه سالاد سبزیجات آماده به مصرف به کلستریدیوم دیفیسایل در شهر تبریز می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که سالاد سبزیجات آماده به مصرف در رستوران‌ها دارای آلودگی به کلستریدیوم دیفیسایل می‌باشند. از آنجایی که این محصولات بصورت خام مصرف می‌شوند، می‌توانند به عنوان منبع احتمالی انتقال کلستریدیوم دیفیسایل به انسان باشند(۲۱). بنابراین، روش Real-time PCR به دلیل سریع و دقیق بودن می‌تواند به عنوان یک روش تشخیصی در آزمایشگاه‌های مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد(۱۹). بعلاوه این باکتری به برخی از آنتی بیوتیک‌ها مقاومت نشان داده است که می‌تواند بسیار نگران کننده باشد، بنابراین تشخیص دقیق بیماری و شناسایی عامل ایجاد کننده آن، انجام تست آنتی بیوگرام و تعیین هر گونه تغییر در الگوی مقاومتی قبل از تجویز آنتی بیوتیک می‌تواند در کنترل و پیشگیری از شیوع این باکتری مفید واقع شود. همچنین بررسی الگوی سروتایپینگ سویه‌های کلستریدیوم دیفیسایل در مطالعات آینده می‌تواند پاسخگوی سوالات در ارتباط با اپیدمیولوژیکی آن باشد. از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به عدم امکان شناسایی ریبوتایپ سویه‌های کلستریدیوم دیفیسایل همچنین پایین بودن دقت در نظر گرفته شده در فرمول حجم نمونه اشاره کرد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می دهد که کلستریدیوم دیفیسایل دارای درصد شیوع بالایی (۱۳/۳۳٪) در سالاد سبزیجات آماده به مصرف عرضه شده در رستوران‌های شهر تبریز می باشد. بعلاوه این باکتری مقاومت نسبتاً بالایی نسبت به انواع آنتی بیوتیک ها نشان داد که بسیار نگران کننده می باشد؛ بنابراین 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

پژوهش حاضر، حاصل از نتایج پایان نامه کارشناسی ارشد مصوب در دانشکده تغذیه و علوم غذایی دانشگاه علوم پزشکی تبریز می‌باشد. کلیه نویسندگان این مقاله، مراتب تقدیر و تشکر خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تبریز بابت حمایت مالی اعلام می‌دارند.

References

1. Rodriguez C, Taminiau B, Van Broeck J, Delmée M, & Daube G. Clostridium difficile infection and intestinal microbiota interactions. Microbial Pathogenesis 2015; 89: 201-9.
2. Collins DA, Riley TV. Routine detection of Clostridium difficile in Western Australia. Anaerobe 2016; 37: 34-7.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-06-06]

[DOI: 10.22102/22.3.102]

3. Mackin KE, Elliott B, Kotsanas D, Howden B P, Carter G P, Korman T M, et al. Molecular characterization and antimicrobial susceptibilities of Clostridium difficile clinical isolates from Victoria, Australia. Anaerobe 2015; 34: 80-3.
4. Carter GP, Rood JI, Lyras D. The role of toxin A and toxin B in the virulence of Clostridium difficile. Trends in Microbiol 2012; 20: 21-9.
5. Voth DE, Ballard JD. Clostridium difficile toxins: mechanism of action and role in disease. Clin Microbiol Reviews 2005; 18: 247-63.
6. Sun X, Savidge T, Feng H. The enterotoxicity of Clostridium difficile toxins. Toxins 2010; 2:1848-80.
7. Eckert C, Emirian A, Le Monnier A, Cathala L, De Montclos H, Goret J, et al. Prevalence and pathogenicity of binary toxin–positive Clostridium difficile strains that do not produce toxins A and B. New Microbes and New Infections 2015; 3: 12-7.
8. Eckert C, Burghoffer B, & Barbut F. Contamination of ready-to-eat raw vegetables with Clostridium difficile in France. J Medical Microbiol 2013; 62: 1435-8.
9. Pasquale V, Romano VJ, Rupnik M, Dumontet S, Čižnár I, Aliberti F, et al. Isolation and characterization of Clostridium difficile from shellfish and marine environments. Folia Microbiol 2011; 56: 431-7.
10. Freeman J, Bauer M, Baines SD, Corver J, Fawley W, Goorhuis B, et al. The changing epidemiology of Clostridium difficile infections. Clin Microbiol Reviews 2010; 23: 529-549.
11. Harvey RB, Norman KN, Andrews K, Hume ME, Scanlan CM, Callaway TR, et al. Clostridium difficile in poultry and poultry meat. Foodborne Pathogens Dis 2011; 8: 1321-3.
12. De Boer E, Zwartkruis-Nahuis A, Heuvelink AE, Harmanus C, Kuijper EJ. Prevalence of Clostridium difficile in retailed meat in the Netherlands. Int J Food Microbiol 2011; 144: 561-4.
13. Gould LH, Limbago B. Clostridium difficile in food and domestic animals: a new foodborne pathogen? Clin Infect Dis 2010;51:577-82.
14. Jhung MA, Thompson AD, Killgore GE, Zukowski WE, Songer G, Warny M, et al. Toxinotype V Clostridium difficile in humans and food animals. Emer Infect Dis 2008; 14: 1039-45.
15. Esfandiari Z, Jalali M, Ezzatpanah H, Weese Scott, Chamani M. The frequency of clostridium difficile in processing steps of hamburger. J Health System Res 2013; Nutrition supplement: 1460-8.
16. Lyon SA. Clostridium difficile in healthy food animals and development of a PCR assay for detection in enriched food and fecal samples [dissertation]. Uga: Georgia in Partial Univer; 2009.
17. Hosseini SF, Almasi MA, Kardi MT, Moghim S, & Karbasizade V. Molecular detection of clostridium difficile in patients with diarrhea via LAMP technique. J Mazandaran Univer Med Sci 2014; 24: 36-42 .
18. Kim J, Kang J, Kim H, Seo MR, Chol TY, Pal H, et al. Epidemiology of Clostridium difficile infections in a tertiary-care hospital in Korea. Clin Microbiol Infect 2013; 19: 521-7.
19. Elizaquível P, Gabaldón J, Aznar R. Quantification of Salmonella spp., Listeria monocytogenes and Escherichia coli O157: H7 in non-spiked food products and evaluation of real-time PCR as a diagnostic tool in routine food analysis. Food Control 2011; 22: 158-64.
20. Kotzekidou P. Survey of Listeria monocytogenes, Salmonella spp. and Escherichia coli O157: H7 in raw ingredients and ready-to-eat products by commercial real-time PCR kits. Food Microbiol 2013; 35: 86-91.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-06-06]

[DOI: 10.22102/22.3.102]

21. Bakri MM, Brown DJ, Butcher JP, Sutherland AD. Clostridium difficile in ready-to-eat salads, Scotland. Eme Infect Dis 2009; 15: 817-8.
22. Metcalf D, Costa M, Dew W, Weese J. Clostridium difficile in vegetables, Canada. Lett Appl Microbiol 2010; 51: 600-2.
23. Rahimi E, Afzali ZS, Baghbadorani ZT. Clostridium difficile in ready-to-eat foods in Isfahan and Shahrekord, Iran. Asian Pacific J Tropical Biomedicine 2015; 5: 128-31.
24. Dumyati G, Stevens V, Hannett GE, Thompson AD, Long C, MacCannell D, et al. Community-associated Clostridium difficile infections, Monroe County, New York, USA. Emer Infect Dis 2012; 18: 392-400.
25. Metcalf D, Avery BP, Janecko N, Matic N, Reid-Smith R, Weese JS. Clostridium difficile in seafood and fish. Anaerobe 2011; 17: 85-6.
26. Kochakkhani H, Dehghan P, Moosavy M-H, Sarmadi B. Occurrence, molecular detection and antibiotic resistance profile of Escherichia coli O157:H7 isolated from ready-to-eat vegetable salads in Iran. Pharm Sci 2016; 22: 195-202.
27. Zidaric V, Rupnik M, editors. Clostridium difficile in meat products, eggs and vegetables in Slovenia. Proceedings of the 4th International Clostridium difficile Symposium. 2012 Sept. 20–22, Bled, Slovenia.
28. Yamoudy M, Mirlohi M, Isfahani BN, Jalali M, Esfandiari Z, Hosseini NS. Isolation of toxigenic Clostridium difficile from ready-to-eat salads by multiplex polymerase chain reaction in Isfahan, Iran. Adv Biomed Res 2015; 4: 87.
29. 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 School 2013; 30: 2160-2168.
30. Schoster A, Staempfli H. Epidemiology and antimicrobial resistance in clostridium difficile with special reference to the horse. Current Clin Microbiol Rep 2016; 3: 32-41.
31. Pereira JB, Farragher TM, Tully MP, Cooke J. Association between Clostridium difficile infection and antimicrobial usage in a large group of English hospitals. Br J Clin Pharma 2014; 77: 896-903.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-06-06]

[DOI: 10.22102/22.3.102]