

# بررسی نسبت انتروکولیت ناشی از کلوستریدیوم دیفیسیل در مراجعین به بیمارستانهای تهران

دکتر محمدحسین سالاری، استادیار دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

## Investigation of enterocolitis incidence due to clostridium difficile from the referred to Tehran hospitals

### ABSTRACT

Pseudomembrane colitis (PMC) and antibiotic associated colitis (AAC) are acute disease of the colon. In the case of inadequate treatment, the disease will often become chronic and may lead to the dysplasia of the epithelial cells of the infected areas. Previously because of poor knowledge

treatment in this case, one of the methods for treatment was surgical ablation of the large intestine while the patients could have been treated with oral vancomycin. In this study the following results were obtained: out of 2517 enterocolitis patients under study, 1384 were men and 1133 women. By anaerobic culture method, 132 cases *C. difficile* were isolated from the total samples and Hela cell culture method, toxin was determined in 36 samples (1.43 %)

Key words: enterocolitis incidence- clostridium difficile- Tehran hospitals.

### خلاصه

کولیت سودوممبران و کولیت ناشی از مصرف آنتی بیوتیک بیماریهای حاد کولون می باشند که در صورت عدم تشخیص و درمان مناسب، اغلب بصورت مزمن باقی مانده و ممکن است خطر دیسپلازی سلولهای اپی تلیال منطقه آلوده را بدنبال داشته باشد. قبلاً بدلیل عدم شناخت کافی، یکی از راههای درمان را حذف روده بزرگ می دانستند. در صورتی که امروزه بیماری را با تجویز خوراکی وانکومايسين درمان می نمایند. علی رغم تحقیقات گسترده در جهان، پیرامون این بیماریها در ایران کمتر به آن توجه شده است. یک مورد از پژوهشهای انجام یافته، تحقیقی است که در مورد 2517 نمونه بیمار مبتلا به انتروکولیت مربوط به 1184 مرد و 1133 زن صورت گرفت. در این تحقیق با استفاده از کشت بی هوازی از کل نمونهها، 132 مورد (5/24٪) کلوستریدیوم دیفیسیل

جداً نموده و با استفاده از کشت سلول هیللا در 36 مورد (1/43٪) از 132 مورد نمونه مذکور حضور توکسین این باکتری نیز مورد شناسایی قرار گرفته است.

### مقدمه

کلوستریدیوم دیفیسیل باکتری بی هوازی اسپوردار از خانواده باسیلاسه و جنس کلوستریدیوم می باشد. باکتری متحرک دارای کلنی گرد و واکنش برآمده است. (گاهی در اطراف کلنی ریزوئید موجود است). اندازه باکتری 1/9-1/5 تا 16/9x0/5-3 میکرون بوده و بصورت منفرد، دوتایی و گاهی بصورت زنجیره کوتاه تا 6 باکتری دیده می شود. بعضی از انواع آن ایجاد همولیز می کنند. کلوستریدیوم دیفیسیل فلور نرمال روده 3٪ افراد سالم و 60-20٪ نوزادان 8-1 ماهه می باشد. این باکتری قادر است دونوع توکسین ایجاد کند، یکی

درد شدید ناحیه پایین شکم، حساسیت شکمی، مدفوع خونی با تعداد زیادی لوکوسیت همراه باشد احتمال وجود اسهال معمولی رد شده و کولیت مطرح می‌گردد. (۶)

در مورد کولیت‌های شدید، تنقیه باریک ممکن است علائمی را نشان دهد ولی در صورت وجود مگا کولون توکسیک یا پرفوراسیون تشخیص مشکل می‌شود. (۱۹، ۱۸)

مناسبت‌ترین روش تشخیص بیماری کشت نمونه روی محیط‌های اختصاصی و شناسایی باکتری و نیز با استفاده از کشت سلول هیلا، مشخص نمودن سیتوتوکسین آن در نمونه است. البته روش‌های الیزا، کانترا ایمونوالکتروفورز، لانتکس آگلو تیناسیون نیز برای تشخیص انترتوکسین باکتری مورد استفاده قرار می‌گیرد. (۱۱ و ۷) در صورت عدم درمان مناسب مخصوصاً در افراد سالمند ممکن است ۲۰-۱۰٪ موارد منجر به مرگ بیمار شود. علت مرگ را ناشی از شوک هیپوولمیک، پرفوراسیون سکوم، عفونت ثانوی و خونریزی می‌دانند. با وجود اینکه باکتری نسبت به تعدادی از آنتی بیوتیک‌ها حساس است ولی داروی مناسب و انتخابی آن را وانکوماسین خوراکی معرفی می‌کنند زیرا اعتقاد بر این است که این دارو می‌تواند ضمن اثر روی کلستریدیوم دیفیسیل فلور روده را بر علیه این باکتری حفظ نماید. داروهای جانشین، باسیتراسین و مترونیدازول است، گرچه در مواردی گزارش شده که بعضی از انواع این باکتری نسبت به مترونیدازول مقاوم هستند. لازم به ذکر است که حدود ۲۰-۱۰٪ بیمارانی که توسط وانکوماسین، مترونیدازول و باسیتراسین درمان شده‌اند عود بیماری داشته‌اند که در این صورت تجویز مجدد یک دوره درمان با وانکوماسین توصیه می‌شود (۱۲ و ۱۳ و ۱۴ و ۲۰ و ۲۱ و ۲۲).

### روش کار

در این تحقیق از ۲۵۱۷ بیمار (۱۳۸۴ مرد و ۱۱۳۳ زن) مبتلا به انترتوکسیت مراجعه کننده به بیمارستان‌های تهران نمونه‌گیری بعمل آمد که ضمن ثبت کلیه مشخصات بیمار و مطالعه میکروسکوپی هر نمونه، آن را روی محیط اختصاصی سیکلوسرین سفوکسین فروکتوز آگار (یا محیط بروسلا آگار همراه با ویتامین و همین) بمدت ۴۸ ساعت با استفاده از روش جایگزینی گاز مناسب در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۷ درجه قرار دادیم. سپس نمونه‌ها را با استفاده از تست‌های افتراقی اندول، اسکولین، نیترات، اوره، شیر تورنسل دار، آزمایش تخمیر قندهایی از جمله آرابینوز، گالاکتوز، لاکتوز، مانوز، مانوز، سالیسین، سوکروز، فروکتوز و گلوکز باکتری مورد شناسایی قرار گرفته و برای بررسی سیتوتوکسین باکتری از کشت سلول هیلا استفاده شده است. بدین صورت که هر نمونه را با استفاده از مولار فسفات بافر با  $\text{pH}=7/2$  و رقت یک دهم به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۲۵۰۰ سانتریفوژ کرده، قسمت فوقانی محلول سانتریفوژ شده را از فیلتر ۰/۴۵ میکرون عبور دادیم. سپس در هر حفره میکروتایتر پلیت، ۰/۲ میلی لیتر از محیط اختصاصی که در هر میلی لیتر آن مقدار  $2/5 \times 10^5$  سلول می‌باشد، اضافه کردیم.

انترتوکسین (توکسین آ) با ساختمان پروتئینی و وزن مولکولی ۵۰۰-۴۴۰ هزار دالتون و دیگری سیتوتوکسین (توکسین ب) با ساختمان پروتئینی و وزن مولکولی ۴۷۰-۳۶۰ هزار دالتون (۳ و ۹). بیماری‌های ناشی از کلستریدیوم دیفیسیل، کولیت حاد و شدید سودوممبران و کولیت ناشی از مصرف آنتی بیوتیک می‌باشند. گرچه آنتی بیوتیک‌ها را بعنوان زمینه ساز این بیماری‌ها معرفی می‌کنند ولی گزارش‌هایی نیز وجود دارد که نشان می‌دهد قدمت آنها در مواردی به قبل از پیدایش آنتی بیوتیک‌ها برمی‌گردد. وجود کولیت سودوممبران تا قبل از دهه ۱۹۶۰ بدون شناسایی قطعی در بعضی از بیمارانی که تحت درمان با کلیندامایسین، لینکوماسین و بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف بوده گزارش شده‌اند. اغلب این بیماران بخاطر عدم شناخت و درمان صحیح تلف می‌شدند. لازم به ذکر است که همه اسهال‌هایی را که بدنبال مصرف نوعی آنتی بیوتیک ایجاد می‌شوند نباید مربوط به کلستریدیوم دیفیسیل دانست چون عده زیادی از این بیماران برخلاف کولیت‌های فوق‌الذکر با قطع دارو و جایگزین کردن آب و الکتروولیت درمان می‌شوند. (۱۷ و ۱۵ و ۳)

بیماران مبتلا به کولیت سودوممبران ممکن است دارای غشاء کاذب، کانون‌های عفونی گسترده، پلاک‌ها و ندول‌های مجزا، برنگ سفید متمایل به زرد و شکننده‌ای باشند که فقط اپی تلیوم و بخش سطحی لامینا پروپریا را فرا می‌گیرد ولی در موارد شدت بیماری ممکن است بافت‌های زیرین نیز درگیر شوند (شکل شماره یک). در بعضی از بیماران با چشم غیر مسلح نمی‌توان غشاء کاذب را در معاینات و دید منطقه رکتوسیگموئید رویت نمود. غشاء کاذب ممکن است در تمام نقاط کولن تشکیل شود ولی اغلب در ناحیه رکتوسکموئید و بندرت ایلئوم دیده می‌شود. پلاک‌ها از موکوس، لوکوسیت، سلول‌های مرده اپی تلیال و باکتری تشکیل شده‌اند. کولیت سودوممبران و کولیت ناشی از مصرف آنتی بیوتیک در اطفال شایع نبوده و بندرت گزارش شده است. ولی در بین سالمندان، افراد ضعیف، مبتلایان به سرطان و بیمارانی که تحت عمل جراحی و درمان با آنتی بیوتیک قرار دارند، بیشتر از سایرین دیده می‌شود. (۳، ۱۰، ۱۶)

مبتلایان به این بیماری‌ها دچار اسهال آبکی، موکوئیدی و یا خونی گردیده و در ۵۰٪ آنها لوکوسیت فراوان نیز در نمونه با چشم می‌خورد. در این بیماری تب بالای ۱۰۵-۱۰۳ درجه فارنهایت، حساسیت شکمی مشخص، شمارش گلبول‌های سفید بالای ۳۶۰۰۰ در هر میلی‌متر مکعب خون و پایین افتادن آلبومین خون شایع است. موارد یاد شده تفاوت‌های قابل توجهی برای تشخیص کولیت از اسهال‌های معمولی است، بعضی اوقات بیماران با وجود نشانه‌های شکمی حاد، مگا کولون توکسیک، پرفوراسیون کولون یا پیریتونیت بدون اسهال و یا اسهال خفیف بوده و در مواقعی هم که بیمار دچار آرتريت حاد شبیه سندرم رایتز باشد، ممکن است ناخوشی بشکل پیچیده‌تری بروز کند. بنابراین هرگاه کسی پس از مصرف نوعی آنتی بیوتیک دچار اسهال شود و بیماری با تب بالا،



(۱۳/۸۱) فاقد توکسین و ۳۶ نمونه (۱/۴۳) دارای توکسین بودند، عبارت دیگر این تعداد از افراد دارای کلستریدیوم دیفیسیل توکسی ژنیک بوده و نمونه آنها نیز دارای توکسین این باکتری بود. برحسب اطلاعات بدست آمده از ۳۶ بیمار فوق، بارزترین علایم بیماری وجود اسهال در آنها بود. بطوری که ۱۷ مورد (۲۲/۴۷) دارای اسهال ساده، ۴ مورد (۱۱/۱۱) اسهال موکوئیدی، ۳ مورد (۳۳/۸) اسهال خونی، ۶ مورد (۱۶/۱۶) اسهال همراه با درد ناحیه تحتانی شکم و ۲ مورد (۵/۵۵) به اسهال توأم با التهاب شکم مبتلا بوده‌اند. لازم به ذکر است که ۳۱ مورد (۸۶/۱۱) از بیماران مبتلا به حالت مزمن بیماری (یک ماه تا ۷ سال) و ۵ مورد (۱۳/۸۸) دوره بیماریشان کوتاه بود (چند روز). ضمناً ۱۵ مورد (۵۵/۵۵) از این بیماران قبل از بیماری انتروکولیت دارای نوعی بیماری از قبیل سل، آلودگی به آمیب و یا زیاردیاه، آپاندیسیت، گلودرد و... بوده و تحت درمان با داروهایی چون کورتون، نوعی آنتی بیوتیک، مترونیدازول و غیره قرار گرفته بودند.

سپس مقدار ۱/۰ میلی لیتر توکسین با رقت یک چهلم افزوده آنرا در شرایط آتمسفر هوا و ۵٪ دی اکسید کربن بمدت حداکثر ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دادیم. مواردی که حداقل ۵۰٪ سلولها گرد شوند مثبت تلقی می‌شود، ضمناً برای کنترل کشت سلول از آنتی توکسین و توکسین کلستریدیوم سوردلی استفاده شده است (۲ و ۱۱ و ۱۳ و ۱۸).

## نتایج

نتایج حاصله از کشت ۲۵۱۷ نمونه بیماران مورد مطالعه را می‌توان برحسب موضوع در جداول و نمودار ارائه شده مشاهده نمود. همانطور که ملاحظه می‌شود جدول شماره ۱ براساس توزیع سنی کل بیماران مراجعه کننده و جدول شماره ۲ و نمودار شماره ۱ براساس کل موارد مبتلا و مواردی که کلستریدیوم دیفیسیل جدا گردیده توکسی ژنیک تنظیم شده است. از کل نمونه‌ها، ۱۳۲ مورد (۵/۲۴) کلستریدیوم دیفیسیل جدا شده که از این تعداد ۹۶ نمونه

جدول شماره ۱: توزیع فراوانی ۲۵۱۷ بیمار مبتلا به انتروکولیت برحسب سن و جنس

جنس سن	مرد	زن	جمع	درصد
۱-۰ ماهه	۳	۳	۶	۲۰/۲۳
۸-۱ ماهه	۵۵	۵۱	۱۰۶	۴/۲۱
۱۱-۹ ماهه	۳۷	۲۵	۶۲	۲/۴۶
۶-۱ ساله	۱۹۹	۱۸۵	۳۸۴	۱۵/۲۵
۱۱-۷ ساله	۱۲۲	۱۱۳	۲۳۵	۹/۳۳
۱۶-۱۲ ساله	۱۱۰	۹۹	۲۰۹	۰/۳۰
۱۹-۱۷ ساله	۸۹	۸۹	۱۷۸	۷/۰۷
۵۰-۲۰ ساله	۶۳۱	۴۳۱	۱۰۶۲	۴۲/۱۹
بیشتر از ۵۰ سال	۱۳۸	۱۳۷	۲۷۵	۱۰/۹۱
جمع	۱۳۸۴	۱۱۳۳	۲۵۱۷	۱۰۰

بیماری‌زایی کلستریدیوم دیفیسیل گزارش شده که ۱۹ مورد از بیماران مذکور مبتلا به انتروکولیت مربوط به مصرف آنتی بیوتیک و ۴ مورد مبتلا به کولیت سودوممبران و بقیه دچار اسهال با علت نامشخص بوده‌اند (۳). آقای W.Lance George و همکاران در سال ۱۹۸۲، ۲۳۳ نمونه بیماران مبتلا به انتروکولیت دارای کلستریدیوم دیفیسیل را مورد بررسی قرار داده و گزارش نمودند که ۸۹ نمونه دارای توکسین این باکتری بوده که از این تعداد ۳۷ مورد آنها متعلق به مبتلایان به کولیت سودوممبران بود. بنابراین با توجه به تحقیقات

## بحث

نقش باکتریهای بی هوازی مخصوصاً کلستریدیوم دیفیسیل در ایجاد کولیت سودوممبران و یا کولیت مربوط به مصرف آنتی بیوتیک از سالها قبل مطرح بوده ولی اخیراً بعلت افزایش بیماری در دنیا تحقیقات زیادی در مورد اختصاصات این باکتری و بیماری ناشی از آن صورت گرفته است. از جمله تحقیق آقای Bartlett که در سال ۱۹۷۶ در مورد ۲۴۲ بیمار مبتلا به انتروکولیت ناشی از مصرف آنتی بیوتیک انجام پذیرفته و در این تحقیق ضمن مشخص نمودن نقش

۴- جهت درمان و جلوگیری از مزمن شدن بیماری باید اولاً داروهای انتخابی بیماری از جمله وانکومایسین خوراکی را در سیستم دارویی مملکت وارد نمود ثانیاً امکانات کار با باکتریهای بی‌هوازی و عفونتهای ناشی از آنها را برای مراکز تشخیص و تحقیق فراهم کرد.

### تشکر

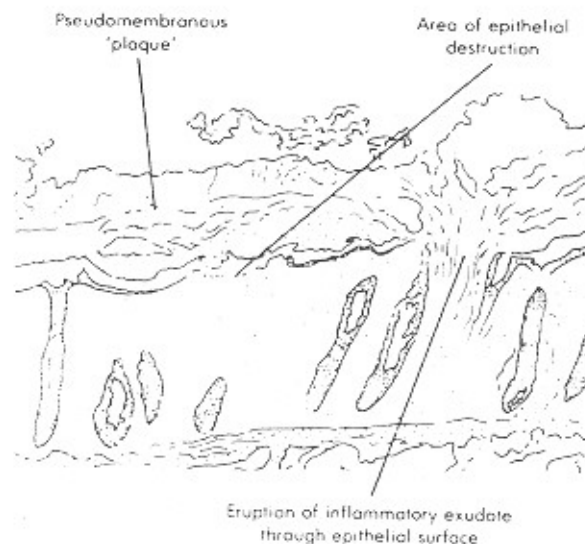
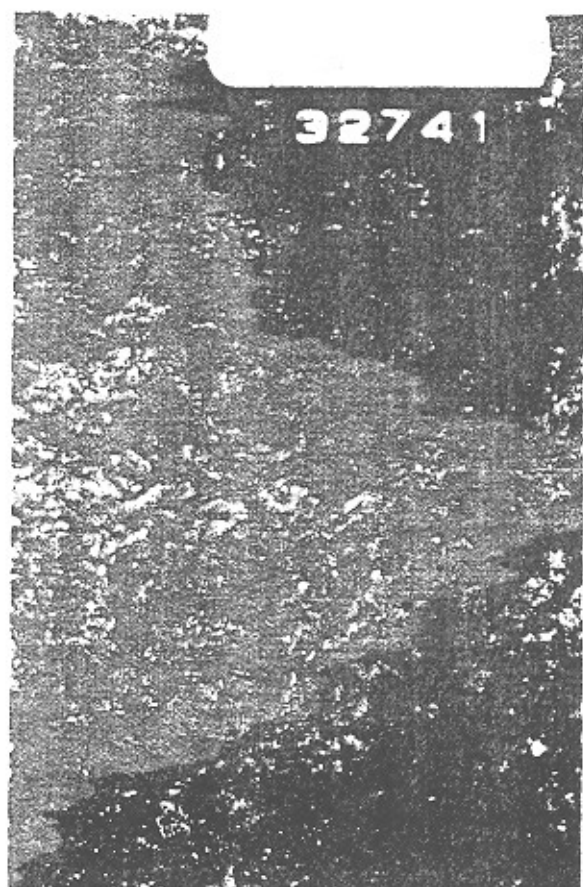
از دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران و سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران و خصوصاً استاد گرامی سرکار خانم دکتر معظمی و نیز از کلیه همکاران محترم دانشکده بهداشت و بیمارستانهایی که در پیشبرد این تحقیق همکاری صمیمانه داشته‌اند تشکر می‌نمایم.

و بررسی به عمل آمده که در این مقاله به آن اشاره شد، می‌توان موارد ذیل را مورد توجه قرار داد:

۱- مواردی که کلستریدیوم دیفیسیل توکسین زا، توکسین این باکتری از نمونه بیماران مبتلا به انتروکولیت گزارش شود، می‌توان بیماری را ناشی از این باکتری دانست (۱ و ۲ و ۳ و ۱۸ و ۲۳).

۲- انتروکولیت ناشی از کلستریدیوم دیفیسیل دارای علائم بیماری متفاوتی می‌باشد ممکن است بیماری بصورت اسهال معمولی یا اسهال خفیف همراه با ناراحتی حاد شکم، مگاکولن توکسیک، پرفوراسیون کولن و یا پریتونیت باشد، در صورتی که کولیت سودوممبران مطرح باشد، بیماری همراه است با غشاء کاذب و پلاکهایی در منطقه رکتوم و سیگموئید (کمتر ناحیه کولن) که در این حالت ممکن است بیمار دچار تب و درد شکم شده گلبولهای سفید و آلبومین خون او نیز افزایش یابد. (۶)

۳- باتوجه به اینکه اکثر آنتی بیوتیکها بعنوان زمینه ساز بیماری مطرح می‌باشند می‌بایست در تجویز بی‌رویه آنها تجدید نظر نمود.

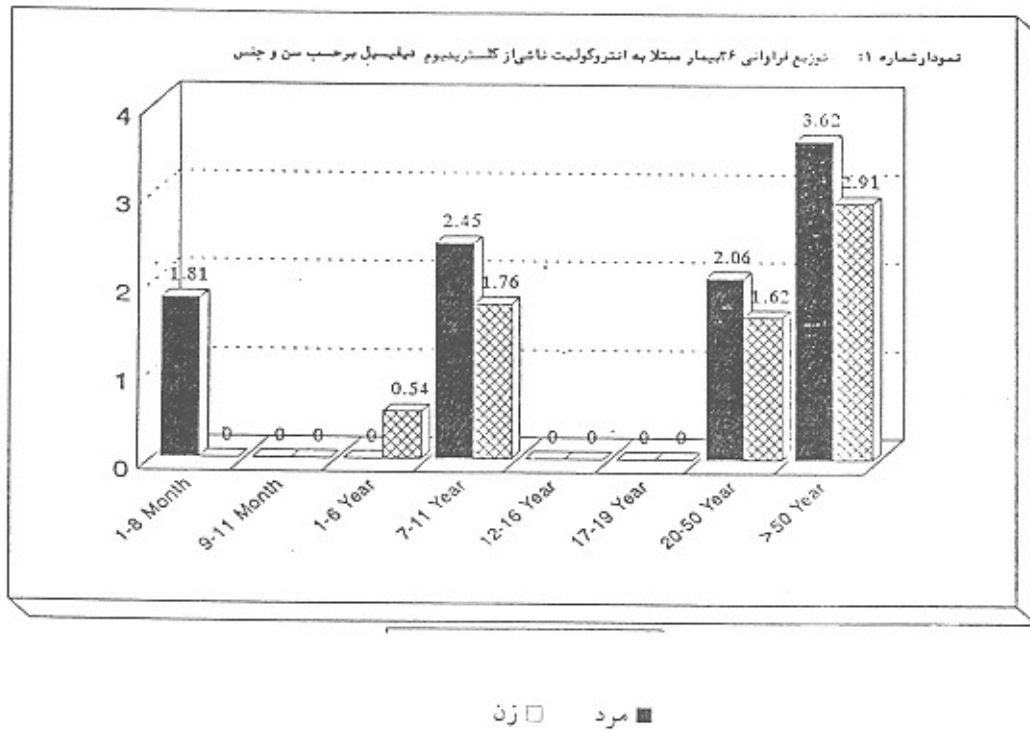


شکل ۱ - پلاکهای سودوممبران ناشی از کلستریدیوم دیفیسیل

جدول شماره ۲: توزیع فراوانی ۱۳۲ بیمار مبتلا به اتروکولیت که از آنها کلتریدیوم دیفسیل توکسی ژنک و یا غیر توکسی ژنک جدا شده است (بر حسب سن و جنس)

سن	جنس	توکسی ژنک		غیر توکسی		جمع		جمع	درصد
		مرد	زن	مرد	زن	مرد	زن		
۱-۵ ساله	۵	۱	۱	۰	۰	۱	۱	۱/۲۲	۰.۴۵
۶-۱۱ ساله	۴	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۱۲-۱۶ ساله	۳	۱	۱	۰	۰	۱	۱	۱/۲۲	۰.۴۵
۱۷-۱۹ ساله	۴	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۲۰-۲۹ ساله	۴	۱	۱	۰	۰	۱	۱	۱/۲۲	۰.۴۵
۳۰-۳۹ ساله	۴	۱	۱	۰	۰	۱	۱	۱/۲۲	۰.۴۵
۴۰-۴۹ ساله	۱۹	۱۱	۸	۰	۰	۱۱	۸	۱۱/۲۲	۴.۹۵
۵۰+	۹	۶	۳	۰	۰	۶	۳	۶/۲۲	۲.۷۳
جمع	۵۱	۲۷	۲۴	۰	۰	۲۷	۲۴	۲۷/۲۲	۱۲.۲۷

۱ = یک ماهه کلتریدیوم دیفسیل جدا شده - ۲ از افراد ۱ - ۳ = سه ماهه کلتریدیوم دیفسیل جدا شده - ۴ = درجه سنجی کلی افراد در هر گروه سنی گرفته شده است.





## مراجع

1. Allen , S.D. Identification of anaerobic bacteria how for to go. Clin Microbiol . New s 1979 11:3-50.
2. Atishe, Maniar et al. Detection of clostridium difficile toxin in various culture monolayers. Journal of clinical microbiology Oct. 1987 P:1999-2000
3. Bartlett, I.G. associated pseudomembranous colitis Rev.infect Dis. 1979 1:530
4. Batts ,D.H, Martin, D, Holmes, R, et al. Treatment of antibiotic- associated clostridium difficile diarrhea with oral vancomycin. J Pediatr. 1980 97 .151.
5. Borriello, S.P, Aomour, P, Turner, T, et al. Household pets as a potential reservoir for clostridium difficile infection. J clin pathol. 1983 36:84.
6. Buchanan , R.F., Gibbons , NE. Bergey's manual of systematic bacteriology 1986.
7. Chang , T.W, Lauer mann , M, Bartlett, J.G. Cytotoxicity assay in antibiotic associated colitis. J infect dis 1979 140:765.
8. Fainstein, v, Bodey , G.P. , Fekety , R. Clostridium difficile colonization in cancer patients admitted to lominar air- flow units. clin Res. 1982 30:365 A.
9. Fekety, R, Silva, J, Armstrong, J, et al. Treatment of antibiotic associated enterocolitis with vancomycin, Rev infect Dis. 1981 3(suppl.):S 273.
10. Fekety, R, Kim, k.H, Brown , D, et al . Epidemiology of antibiotic associated colitis isolation of clostridium difficile from the hospital environment. Am J Med 1989. 70:906.
11. George, V.L, Sutter, V.L, citron, D, et al. Selective and differential medium for isolation of clostridium difficile J clin Microbiol. 1979 .9:214.
12. Idialuzz , A, Caprioli , et al. Detection of clostridial toxins in stools from children with diarrhea J. Med microbiol 1986. vol:22-29-31.
13. Inlambe, D. WJR, Eneo. R.J, et al. Anaerobic bacteria selected topics. New York, Plenum Publishing co. 1980 p295.
14. Keighley, M.R.B , Burden, D.W, Arobi, Y, et al Randomized controlled trial of vancomycin for pseudomembranous colitis and postoperative diarrhea. Br Med J. 1978 2:1667.
15. Larson , H.E, price, A.B, Honour, P, et al . Clostridium difficile and the etiology of pseudomembranous colitis. lancet 1978 1:1063.
16. Lusk , R.H, Fekety , F.R, Silva , J, et al. Gastrointestinal side effects of clindomycin and ampicillin therapy. J infect Dis 1977 135 (suppl). S III.
17. Mondell , douglas , bennett. Principles and practice of infectious diseases 1990.
18. P.N, levet. anaerobic microbiology , a practical approach, 1991.
19. Ieren, P.N. I . B. Reiter's syndrome following antibiotic - associated colitis. Aust NZ j Med .1982, 12:292.
20. Silva , J, batts, D.H, Fekety , R. Treatment of clostridium difficile colitis and diarrhea with vancomycin. Am J Med. 1981, 71:815.
21. Trnka, Ym , Lamant , J.T. Association of clostridium difficile toxin with symptomatic relapse of chronic inflammatory bowel disease . Gastroenterology. 1981, 80:693.
22. Walters , B.A.J, Roberts, R., stafford, R, et al. Relapse of antibiotic associated colitis endogenous persistence of clostridium difficile during vancomycin therapy 1983, 24:206.
23. W.Lance George et al Clostridium difficile and its cytotoxin in feces of patients with antimicrobial agent-associated diarrhea and miscellaneous conditions. Journal of clinical microbiology 1982 P: 1049-1053.