

การศึกษาความชุกของเชื้อ *C. difficile* โดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อและตรวจแยกชนิดของ toxin genes โดยวิธี multiplex polymerase chain reaction (mPCR)

The prevalence of *C. difficile* infection by culture method and typing toxin genes by multiplex polymerase chain reaction (mPCR)

■ ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์ Piyada Wangroongsarb [*] กรัณย์ สุทธิวราคม Karun Suthivarakom	ธนิตชัย คำแถลง Thanitchai Kamthlang นัฐพงษ์ ชื่นบาน Nattapong Cheunban	ชุติมา จิตตประสาทศีล Chutima Jittaprasatsin สมชาย แสงกิจพร Somchai Sangkitporn
---	---	---

^{*}สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

^{*}ผู้รับผิดชอบบทความ (E-mail: piyada.w@dmsc.mail.go.th)

^{*}Corresponding author (E-mail: piyada.w@dmsc.mail.go.th)

Received January 7, 2014

Accepted as revised May 8, 2014

Abstract

Introduction: *Clostridium difficile*-associated diarrhea is a global health problem. The pathogenicity of this bacterium is determined by production of two major toxins: enterotoxin A and cytotoxin B. The clinical feature typically includes diarrhea, lower abdominal pain and systemic symptoms, such as fever, anorexia, nausea and malaise, but they can range from mild diarrhea to pseudomembranous colitis. The standard methods of *C. difficile* for diagnosis and toxin detection are culture method and cytotoxicity assay (CA).

Materials and methods: A total of 433 fecal samples with diarrhea diseases from 13 provinces were collected during year 2006-2013 for identification of *C. difficile* by culture method and detection toxin genes by mPCR.

Results: The prevalence of *C. difficile* infection was 14.55% (63/433) by culture method. The detection of toxin genes by mPCR was A-B+ strain (19 samples), A+B+ strain (1 sample), A-B- strain (43 samples) and no strain of binary toxin, respectively. The prevalence of *C. difficile* infection was occurred in women more than men.

Conclusions: From this study showed that *C. difficile* infection is a major cause in patients with diarrhea. The most common toxin gene was A-B+ strain. Monitoring of *C. difficile* strains in Thailand is useful for the strains that cause antibiotic resistance.

Keywords: *Clostridium difficile*, mPCR, toxin genes

บทคัดย่อ

บทนำ: *Clostridium difficile* เป็นสาเหตุโรคอุจจาระร่วงและเป็นปัญหาสาธารณสุขระดับโลก การก่อโรคของเชื้อนี้เกิดจากการสร้างสารพิษสำคัญ 2 ชนิดคือ enterotoxin A และ cytotoxin B อาการทางคลินิกของโรคคืออาการท้องเสีย อาการปวดท้อง และอาการต่างๆ เช่น มีไข้ เบื่ออาหาร คลื่นไส้ วิงเวียน ความรุนแรงของโรคจากน้อยไปจนถึงรุนแรงมาก เช่น ปลายลำไส้ใหญ่อักเสบ วิธีมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *C. difficile* โดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อและการตรวจหาสารพิษด้วยวิธี cytotoxicity assay (CA)

วัสดุและวิธีการวิจัย: เก็บตัวอย่างอุจจาระจากผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงรวมจำนวนทั้งสิ้น 433 ตัวอย่างใน 13 จังหวัดในประเทศไทย ระยะเวลาเก็บตั้งแต่ปี พ.ศ. 2549-2556 ทำการตรวจหาเชื้อ *C. difficile* โดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อและตรวจแยกชนิดของ toxin genes โดยวิธี mPCR

ผลการศึกษา: การศึกษาความชุกของเชื้อ *C. difficile* ในตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงสามารถเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. difficile* ได้ 63 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 14.55 และเมื่อตรวจแยกชนิดของ toxin genes ของเชื้อ *C. difficile* โดยวิธี mPCR พบสายพันธุ์ A-B+ จำนวน 19 ตัวอย่าง สายพันธุ์ A+B+ จำนวน 1 ตัวอย่าง ส่วนสายพันธุ์ A-B- จำนวน 43 ตัวอย่าง และไม่พบสายพันธุ์ binary toxin พบผลบวกของการติดเชื้อ *C. difficile* ในผู้หญิงมากกว่าผู้ชาย

สรุปผลการศึกษา: จากการศึกษาความชุกของเชื้อ *C. difficile* พบว่าเป็นสาเหตุสำคัญในผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วง ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าส่วนมากเป็นสายพันธุ์ A-B+ การเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงของสายพันธุ์ *C. difficile* ของประเทศไทยมีประโยชน์เพื่อเป็นแนวโน้มความรุนแรงของโรคเนื่องจากชนิดของสายพันธุ์ทำให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะได้

คำรหัส: *Clostridium difficile*, mPCR, toxin genes

บทนำ

Clostridium difficile เป็นแบคทีเรียแบบไม่ใช้ออกซิเจน ติดสีกรัมบวก รูปแท่ง สามารถสร้างสปอร์ ซึ่งพบบ่อยในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะอย่างยิ่งในดิน¹ การติดเชื้อ *C. difficile* (CDI) จะแสดงอาการทางระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ อาการท้องร่วง (*C. difficile*-associated diarrhea: CDAD) ลำไส้อักเสบ (*C. difficile*-associated colitis) และ pseudomembranous colitis (PMC)² ยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้างเป็นปัจจัยหลักที่ก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ CDI รวมทั้งยา clindamycin, amoxicillin/clavulanic acid, 2nd และ 3rd generation cephalosporins และ fluoroquinolones³ แบคทีเรียนี้ผลิตสารพิษชนิด toxin A (enterotoxin) และ toxin B (cytotoxin) โดยถูกควบคุมด้วย tcd-A และ tcd-B ยีนตามลำดับ^{4,5} สารพิษ enterotoxin มีศักยภาพที่ทำให้เกิดการสะสมของของเหลวในลำไส้ เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และมีผลอันตรายเมื่อทำการทดสอบในสัตว์ทดลอง สารพิษ cytotoxin มีความรุนแรงเป็น 1,000 เท่าของ toxin A^{6,7} สายพันธุ์ *C. difficile* ที่ให้ A-B+ พบว่าเป็นสาเหตุก่อโรคในคนและพบว่ามีระบาดทั่วโลก^{8,9} ส่วน *C. difficile* binary toxin (CDT) ซึ่งเป็น actin-ADP-ribosylating toxin ส่งผลกระทบท่อโครงสร้างของโปรตีน กระตุ้นให้การสร้างส่วน microtubule ยื่นออกมาบนพื้นผิวของเซลล์เยื่อบุผิว นำไปสู่การเพิ่มการยึดติดของแบคทีเรียมากขึ้น^{5,10} และเป็นสารพิษที่เกี่ยวข้องกับ

clostridial binary toxin ซึ่งรวมทั้ง iota toxin ที่ผลิตโดยเชื้อ *C. perfringens* type E สารพิษที่ผลิตจากเชื้อ *C. spiroforme* และสารพิษจากเชื้อ *C. botulinum* type C2 และ D11 บทบาทพยาธิวิทยาของสารพิษนี้ยังไม่สามารถอธิบายได้ชัดเจน^{4,10,12-13}

การตรวจวินิจฉัยเชื้อและการตรวจหาสารพิษของ *C. difficile* โดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธี cytotoxicity assay (CA) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน¹⁴⁻¹⁶ บางครั้งการตรวจหาสารพิษโดยวิธี CA ให้ผลลบจากตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วย¹⁴ ทั้งที่ผู้ป่วยมีอาการทางคลินิกของโรค CDAD¹⁷ การตรวจหาสารพิษวิธีนี้เป็นงานที่ยากเนื่องจากต้องใช้การเพาะเลี้ยง cell line เช่น Vero cells HT29-MTX, human CaCo-2 cells และต้องมี antitoxin สำหรับการทดสอบ neutralization มีการตรวจหาสารพิษโดยวิธี enzyme immunoassays (EIAs) ซึ่งเป็นทางเลือกอีกวิธีหนึ่ง¹⁸ จากการศึกษาของ Barbut และคณะ¹⁸ พบว่าสายพันธุ์ A-B+ variants (โดยที่ส่วนของปลาย 3' ของ toxin A มีการ deletion) ทำให้ไม่สามารถตรวจหา toxin A ได้ด้วยวิธี EIAs ปัจจุบันการตรวจหาเชื้อจากตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วยและทดสอบหาสารพิษโดยวิธีทางชีวโมเลกุลเพื่อศึกษาทางระบาดวิทยาในกรณีระบาดหรือการติดเชื้อในโรงพยาบาลซึ่งเป็นวิธีที่ให้ความจำเพาะสูงและสามารถแยกชนิดของสารพิษได้¹⁷

วัตถุประสงค์การศึกษา

การศึกษาหาความชุกของเชื้อ *C. difficile* ในตัวอย่างอุจจาระจากผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงและการตรวจแยกชนิดของ toxin genes ของเชื้อ *C. difficile* โดยวิธี mPCR

วัสดุและวิธีการศึกษา

การเก็บและจัดการกับตัวอย่างตรวจ

เก็บตัวอย่างอุจจาระจากโรงพยาบาลจังหวัดต่างๆ ดังนี้ กรุงเทพมหานคร สมุทรสงคราม จันทบุรี สุพรรณบุรี ตาก หนองคาย นครสวรรค์ ปทุมธานี พะเยา นนทบุรี อโยธยา ชลบุรี ลพบุรี เก็บตัวอย่างจำนวนรวมทั้งสิ้น 433 ตัวอย่าง ระยะเวลาเก็บตั้งแต่ปี พ.ศ. 2549-2556 ซึ่งเป็นตัวอย่างผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงนำมาส่งสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขเพื่อตรวจหาสาเหตุของโรค

ตัวอย่างอุจจาระที่ส่งตรวจต้องอยู่ในสภาพที่เหมาะสมคือ บรรจุในภาชนะปากกว้างมีฝาปิดที่สะอาดปราศจากเชื้อ มีปริมาณอุจจาระสดประมาณ 1-2 กรัม ส่งถึงห้องปฏิบัติการภายใน 2 ชั่วโมงหลังการเก็บตัวอย่างหรือเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C หากส่งตรวจภายใน 24 ชั่วโมง และเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C หากจำเป็นต้องส่งตรวจหลังการเก็บตัวอย่างนานกว่า 24 ชั่วโมงเมื่อส่งถึงห้องปฏิบัติการแล้วดำเนินการเพาะเลี้ยงเชื้อทันที

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. difficile* จากตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วย

การเพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้ alcohol shock technique¹⁹ คือ ผสมตัวอย่างกับ absolute ethanol ในอัตราส่วน 1 : 1 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ก่อนถ่ายตัวอย่างลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Wilkins-Chalgren blood agar : WCBL (CM 619B; Oxoid, England) ใส่ plate ลงใน anaerobic jar ที่มี gas generating kit และ anaerobic indicator บ่มที่อุณหภูมิ 37±2 °C นาน 48 ชั่วโมง *C. difficile* ที่เจริญบน plate WCBL มีลักษณะโคโลนีแบน สีเทาดำน แฉก ขอบหยักคล้ายรากไม้ มีกลิ่นของสาร para-cresol ไม่มี hemolysis zone และเร่งทำการทดสอบต่างๆ โดยเร็วเพราะเชื้อ anaerobe ไม่สามารถทนต่อสภาวะอากาศปกติได้นาน

การพิสูจน์ทางจุลชีววิทยา

หลังจากแยกเชื้อบริสุทธิ์ นำมาเพาะเลี้ยงใน Wilkins-Chalgren broth บ่มในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37±2 °C นาน 48 ชั่วโมง นำโคโลนีที่สงสัยไปย้อมสีแกรม หากพบเป็นเชลล์รูปทรงท่อน ติดสีแกรมบวก สร้างสปอร์ สงสัยว่าเป็น *Clostridium sp.* นำไปทำ catalase test โดยหยด 15% H₂O บน glass slide เขี่ยเชื้อลงบน slide หากมีฟองอากาศเกิดขึ้นแสดงว่าให้ผลบวก หากไม่เกิดฟองอากาศแสดงว่าให้ผลลบ เชื้อ *C. difficile* ให้ผลการทดสอบ catalase test เป็นลบ และนำมาทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ได้แก่ starch, arabinose, dextrose, fructose, lactose, maltose, mannose, mannitol, salicin, sucrose, xylose, esculin, SIM, nitrate, litmus milk,

gelatin และ egg yolk agar (EY) อ่านผลการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีตามวิธีมาตรฐานควบคุมคุณภาพโดยการตรวจสอบลักษณะโคโลนีและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *C. difficile* ที่เพาะเลี้ยงได้จากตัวอย่างเปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐาน *C. difficile* ATCC 43255

การตรวจหา toxin genes ของเชื้อ *C. difficile* โดยวิธี multiplex polymerase chain reaction (mPCR)

การสกัดสารพันธุกรรมจากตัวเชื้อ *C. difficile*

นำเชื้อ *C. difficile* ที่แยกได้จากตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยมาเพาะเลี้ยงใน Wilkins-Chalgren broth บ่มในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37±2 °C นาน 48 ชั่วโมง หลังจากเชื้อเจริญเติบโตเต็มที่แล้วนำมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 rpm (Spectrafuge Labnet international Inc., USA) นาน 10 นาที และดูดส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วย normal saline 1 mL ในหลอดขนาด 1.5 mL ผสมให้ตะกอนละลายดีแล้วจึงนำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm เวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง นำตะกอนที่ได้มาสกัด DNA ด้วยน้ำยา lysozyme และ proteinase k ตามวิธีของ Sambrook และคณะ²¹ จากนั้นเก็บ DNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

การเพิ่มขยายปริมาณสารพันธุกรรม

การเพิ่มขยายปริมาณสารพันธุกรรมในส่วนของ tpi gene tcd-A และ tcd-B เตรียมส่วนผสมปริมาตร 30 µL ที่ประกอบด้วย DNA template 5 ng, 0.5 mM dNTPs (Promega USA), 2.5 mM MgCl₂ (Promega USA), 1X buffer (Promega USA), 1U Taq polymerase (Promega USA) และ 0.5 µM ของไพรเมอร์ 3 คู่ ดังแสดงในตารางที่ 1 (tpi สำหรับจีโนมที่จำเพาะกับ *C. difficile* tcd-A สำหรับยีนที่สร้างสารพิษชนิด A และ tcd-B สำหรับยีนที่สร้างสารพิษชนิด B) ที่ออกแบบโดย Lemee และคณะ¹⁷ ส่วนการเพิ่มขยายปริมาณสารพันธุกรรมของ binary toxin (cdt-A และ cdt-B) เตรียมส่วนผสมปริมาตร 25 µL ที่ประกอบด้วย DNA template 5 ng, 0.2 µM dNTPs (Promega USA), 1.5 mM MgCl₂ (Promega USA), 1X buffer (Promega USA), 1U Taq polymerase (Promega USA) และ 0.2 µM ของไพรเมอร์ 2 คู่ สำหรับ binary toxin (cdt-A และ cdt-B ออกแบบโดย Samie และคณะ¹¹)

ไพรเมอร์ tcd-B ถูกออกแบบมาจากตำแหน่ง converse 5' region ของยีน tcd-B ซึ่งให้ขนาด PCR product ที่ 160 bp ไพรเมอร์ tcd-A ออกแบบมาให้จับได้กับการเกิด three deletion ในตำแหน่ง region ของยีน tcd-A ของสายพันธุ์ที่เป็น A-B+ จะให้ขนาดของ PCR product ที่ 110 bp สำหรับสายพันธุ์ที่เป็น A+B+ ให้ขนาด PCR product ที่ 396 bp ส่วนไพรเมอร์ของ binary toxin เกี่ยวข้องกับสองปฏิกิริยาที่แตกต่างกันคือ ส่วน enzymatic สำหรับ cdt-A และ binding component สำหรับ cdt-B ให้ขนาด PCR product ที่ 376 bp และ 475 bp ตามลำดับ

นำส่วนผสมทั้งหมดไปเข้าเครื่อง DNA thermal cycler (Multigene Labnet International Inc., USA) สำหรับ *tpi*, *tcd-A* และ *tcd-B* มีขั้นตอนประกอบด้วย pre-denaturation 94 °C 5 นาที denaturation 94 °C 30 วินาที annealing 50 °C 30 วินาที extension 72 °C 1 นาที จำนวน 30 รอบ สำหรับ binary toxin มีขั้นตอนประกอบด้วย pre-denaturation 94 °C 5 นาที denaturation 94 °C 45 วินาที annealing 52 °C 1 นาที

extension 72 °C 1.20 นาที จำนวน 30 รอบ ตรวจสอบ PCR product ที่ได้ด้วย agarose gel electrophoresis (2% agarose gel/TBE) กระแสไฟฟ้า 100 V เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นย้อมแผ่นเจลด้วย ethidium bromide วิเคราะห์ PCR product ด้วยเครื่อง UV transilluminator เปรียบเทียบขนาด DNA ที่ได้กับ DNA marker

ตารางที่ 1 Primers for multiplex PCR

Gene	Primers	Sequence (5'-3')	PCR product size (bp)	Amplification	References
<i>tpi</i>	<i>tpi-F</i>	AAAGAAGCTACTAAGGGTACAAA	230	<i>C. difficile</i> house-keeping gene	Lemee <i>et al.</i> , 2004 ¹⁷
	<i>tpi-R</i>	CATAATATTGGGTCTATTCCTAC			
<i>tcd-A</i>	<i>tcd-A F</i>	AGATTCCTATATTTACATGACAATAT	369	Toxin A enterotoxin	Lemee <i>et al.</i> , 2004 ¹⁷
	<i>tcd-A R</i>	GTATCAGGCATAAAGTAATATACTTT	110	Toxin A deleted enterotoxin	Lemee <i>et al.</i> , 2004 ¹⁷
<i>tcd-B</i>	<i>tcd-B F</i>	GGAAAAGAGAATGGTTTTATTAA	160	Toxin B cytotoxin	Lemee <i>et al.</i> , 2004 ¹⁷
	<i>tcd-B R</i>	ATCTTTAGTTATACTTTGACATCTTT			
<i>cdt-A</i>	<i>cdt-A F</i>	TGAACCTGGAAAAGGTGATG	376	Enzymatic component of binary toxin	Samie <i>et al.</i> , 2008 ¹¹
	<i>cdt-A R</i>	AGGATTATTTACTGGACCATTTG			
<i>cdt-B</i>	<i>cdt-B F</i>	GATTACAGCTAATGTAACATA	475	Binding component of binary toxin	Samie <i>et al.</i> , 2008 ¹¹
	<i>cdt-B R</i>	TATAGTCTGACCAACTATTTTC			

ตารางที่ 2 List of bacteria for testing cross reaction

No.	Microorganisms	No.	Microorganisms
1	<i>Clostridium difficile</i> ATCC 43255 (A-B-)	14	<i>Streptococcus pneumoniae</i> DMST 25929
2	<i>Clostridium difficile</i> A 4897 (A-B-)	15	<i>Bordetella bronchiseptica</i> DMST 6811
3	<i>Clostridium difficile</i> GAI 10029 (A+B+)	16	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> DMST 19079
4	<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	17	<i>Burkholderia plantarii</i> LMG 9035
5	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 19404	18	<i>Bacillus cereus</i> DMST 11098
6	<i>Clostridium ramosum</i> ATCC 25582	19	<i>Bacillus mycoides</i> DMST 3747
7	<i>Clostridium bifermentans</i> LMG 3027	20	<i>Bacillus thuringiensis</i> DMST 18583
8	<i>Clostridium sordellii</i> ATCC 9714	21	<i>Bacillus licheniformis</i> DMST 16838
9	<i>Vibrio parahaemolytica</i> DMST 15285	22	<i>Bacillus subtilis</i> DMST 7988
10	<i>Moraxella urethralis</i> DMST 17525	23	<i>Vibrio cholerae non O1, non O139</i> DMST 2873
11	<i>Burkholderia pyrocinia</i> DMST 15513	24	<i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303
12	<i>Klebsiella pneumoniae</i> DMST 7592	25	<i>Salmonella Enteritidis</i> DMST 15676
13	<i>Haemophilus influenza</i> DMST 18936	26	<i>Campylobacter coli</i> NCTC 11353
27	<i>Campylobacter lari</i> ATCC 43675	30	<i>Helicobacter pylori</i> TK 1029
28	<i>Campylobacter fetus</i> DMST 17955	31	<i>Achromobacter xylosoxidans subsp. xylosoxidans</i> DMST 8572
29	<i>Helicobacter pylori</i> NCTC 11638	32	<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285

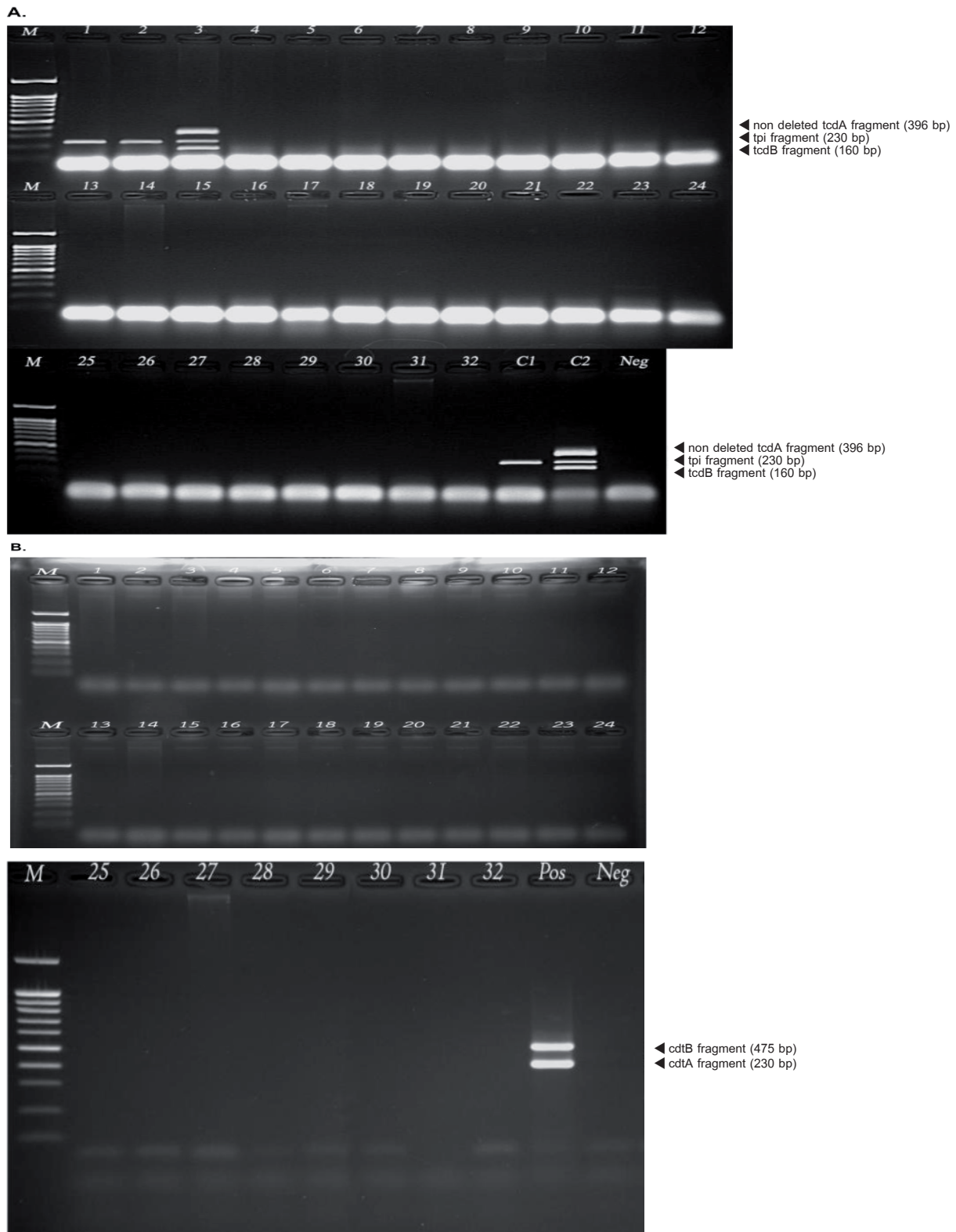


Figure 1 A. The specificity of the references strains (Table 2) with *tpi*, *tcd-A*, *tcd-B*, *cdt-A* and *cdt-B* primers of *C. difficile* by multiplex PCR method. B. The specificity of the references strains with *cdt-A* and *cdt-B* primers of *C. difficile* by multiplex PCR method. (Marker = 100 bp, lane 1 = *C. difficile* ATCC 43255, lane 2 = *C. difficile* A 4897 lane 3 = *C. difficile* GAI 10025, lane 4 = *C. perfringens* ATCC 13124, lane 5 = *C. sporogenes* ATCC 19404, lane 6 = *C. ramosum* ATCC 25582, lane 7 = *C. bifementans* LMG 3027, lane 8 = *C. sordellii* ATCC 9714, lane 9 = *V. parahaemolytica* DMST 15285, lane 10 = *M. urethralis* DMST 17525, lane 11 = *B. pyrocinia* DMST 15513, lane 12 = *K. pneumoniae* DMST 7592, lane 13 = *H. influenza* DMST 18936, lane 14 = *S. pneumoniae* DMST 25929, lane 15 = *B. bronchiseptica* DMST 6811, lane 16 = *S. maltophilia* DMST 19079, lane 17 = *B. plantarii* LMG 9035, lane 18 = *B. cereus* DMST 11098, lane 19 = *B. mycoides* DMST 3747, lane 20 = *B. thuringiensis* DMST 18583, lane 21 = *B. licheniformis* DMST 16838, lane 22 = *B. subtilis* DMST 7988, lane 23 = *V. cholerae* non O1, non O139 DMST 2873, lane 24 = *L. monocytogenes* DMST 17303, lane 25 = *Sal. Enteritidis* DMST 15676, lane 26 = *C. coli* NCTC 11353, lane 27 = *C. lari* ATCC 43675, lane 28 = *C. fetus* DMST 17955, lane 29 = *H. pylori* NCTC 11638, lane 30 = *H. pylori* TK 1029, lane 31 = *A. xylosoxidans subsp. xylosoxidans* DMST 8572, lane 32 = *B. fragilis* ATCC 25285, C1 = *C. difficile* ATCC 43255, C2 = *C. difficile* GAI 10029, lane Neg = negative)

ตารางที่ 3 Identification of *C. difficile* by culture method and detection toxin genes by mPCR which classified by years and age groups

Age	Total samples	Total positive samples (%)	Year 2549						Year 2550						Year 2551						Year 2552					
			Samples			Male			Female			Samples			Male			Samples			Male			Female		
			tpi	A	B	tpi	A	B	tpi	A	B	tpi	A	B	tpi	A	B	tpi	A	B	tpi	A	B	tpi	A	B
≤10	177	16 (9.03)	4			2			2	-	-	2			1	-	-	1			1			1		
11-20	16	2(12.5)	0			2									0	1	-	1								
21-30	7	1(14.2)	1			0						0						1			1			-		
31-40	10	2(20)	1			2						2			1	-	-	0								
41-50	21	1(4.76)	1			2			1	-	-	2						2								
51-60	31	2(6.45)	3			2						4						2						1	-	1
>60	114	26(22.80)	29	4	-	15	4	-	3	-	-	10	2	-	2	1	-	13	3	-	3	-	3	2	-	1
No data	57	13(22.80)	19	2	-	6	2	-	1	-	-	4	1	-	2	-	-	8	1	-	1	-	1			
Total	433	63(14.55)	58	6	-	31	6	-	7	-	-	22	5	-	3	3	-	26	6	-	5	3	-	2		

A = *tcd-A*, B = *tcd-B*

Age	Samples	Year 2553						Year 2554						Year 2555						Year 2550					
		Male			Female			Samples			Samples			Samples			Male			Female			Samples		
		tpi	A	B	tpi	A	B	tpi	A	B	tpi	A	B	tpi	A	B	tpi	A	B	tpi	A	B	tpi	A	B
≤10	4							2			34			2			2			2					
11-20	0							0			2														
21-30	1							0			1			0											
31-40	1							0			0			2						1					
41-50	1				1	-	-	0			0			2											
51-60	3							0			0			2											
>60	29	4	-	-	6	-	-	5			3			15						3					
No data	19	2	-	-	4	-	-	0			2			6			2	-	-	1					
Total	58	6	-	-	11	-	-	7			42			31			2	-	-	7					

A = *tcd-A*, B = *tcd-B*

ตารางที่ 4 Identification of *C. difficile* by culture method and detection toxin genes by mPCR which classified by provinces and age groups

Age	Bangkok						Samut Songkhram						Chanthaburi					
	Male			Female			Male			Female			Male			Female		
	Positive/ total samples	<i>tpi</i>	A B	Positive/ total samples	<i>tpi</i>	A B	Positive/ total samples	<i>tpi</i>	A B	Positive/ total samples	<i>tpi</i>	A B	Positive/ total samples	<i>tpi</i>	A B	Positive/ total samples	<i>tpi</i>	A B
≤10	0/2			3/4	3	- -				6/63	6	- 2	2/43	2	- 1			
11-20	1/2	1	- 1	0/1						0/4			0/3					
21-30	1/2	1	- -							0/1								
31-40	0/2			1/1	1	- -							1/1	1	- 1			
41-50	0/1			1/3	1	- -				0/1			0/4					
51-60	0/1			0/2			0/1			0/4			0/1					
>60	2/13	2	- 1	7/28	7	- 1	3/8	3	- -	5/8	5	- 1	0/4					
No data	5/23	5	- 1	5/20	5	- 1				1/2	1	- -	0/1					
Total	9/46	9	- 3	17/59	17	- 2	3/9	3	- -	6/12	6	- 1	6/77	6	- 2	3/57	3	- 2

A = *tot-A*, B = *tot-B*

Age	Suphanburi						Nongkhai						Tak					
	Male			Female			Male			Female			Male			Female		
	Positive/ total samples	<i>tpi</i>	A B	Positive/ total samples	<i>tpi</i>	A B	Positive/ total samples	<i>tpi</i>	A B	Positive/ total samples	<i>tpi</i>	A B	Positive/ total samples	<i>tpi</i>	A B	Positive/ total samples	<i>tpi</i>	A B
≤10	3/6	3	- 2	0/4						2/23	2	- -	0/25					
11-20										0/2			1/4	1	- -			
21-30										0/2			0/2					
31-40				0/1						0/2			0/2					
41-50										0/4			0/6					
51-60	0/1			0/1						0/2			1/12	1	1 1			
>60	1/3	1	- 1	1/4	1	- -				0/6			2/11	2	- -			
No data	1/4	1	- -	1/1	1	- -	2/3	2	- 2	1/5			0/1					
Total	5/14	5	- 3	2/11	2	- -	0/2	2	- 2	0/3	1	- 1	2/43	2	- 4	4/63	4	1 1

A = *tot-A*, B = *tot-B*

ตารางที่ 4 Identification of *C. difficile* by culture method and detection toxin genes by mPCR which classified by provinces and age groups (ต่อ)

Age	Nakomsawan		Pratumthani			Prayao			Nonthaburi		Ayutthaya		Chonburi	Lopburi
	Male		Female			Male			Male	Female	Male	Female	Male	Female
	Positive/ total samples	<i>tqi</i> A B	Positive/ total samples	<i>tqi</i> A B	Positive/ total samples	Positive/ total samples	<i>tqi</i> A B	Positive/ total samples	Positive/ total samples	Positive/ total samples	Positive/ total samples	Positive/ total samples	Positive/ total samples	Positive/ total samples
≤10												0/1		
11-20														
21-30														
31-40												0/1		
41-50									0/1		0/1			
51-60			1/1	1	-	1		0/2			0/3	0/1		
>60	1/1	1	-	1			1	-	1	0/2	0/1	0/6	0/1	0/2
No data									0/1	0/2	0/4	0/1		
Total	1/1	1	-	1	1	1	-	1	0/3	0/4	0/10	0/10	0/1	0/2

A = *tcd-A*, B = *tcd-B*

ผลการศึกษา

การทดสอบหาความจำเพาะของไพรเมอร์

นำไพรเมอร์ 5 คู่ทำการทดสอบหาความจำเพาะกับเชื้อต่างๆ ตามตารางที่ 2 พบว่าการทดสอบดังกล่าวให้ผลลบและมีความจำเพาะต่อสารพิษที่ต้องการทดสอบ และไม่เกิดปฏิกิริยาการข้ามเกี่ยวกับเชื้ออื่นๆ (รูปที่ 1)

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. difficile* จากตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วย

จากตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วยจากโรงพยาบาลจังหวัดต่างๆ จำนวนรวมทั้งสิ้น 433 ตัวอย่าง สามารถเพาะแยกเชื้อ *C. difficile* ได้ 63 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 14.55 จำแนกตามปีที่เกิดตัวอย่าง ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2549-2556 พบผลบวกเป็นร้อยละ 29.31 (17/58), 29.03 (9/31), 36.36 (8/22), 34.61 (9/26), 13.79 (4/29), 0 (0/7), 0 (0/42) และ 7.33 (16/218) ตามลำดับ (ตารางที่ 3) จำแนกตามกลุ่มอายุตั้งแต่ ≤10 ถึง >60 พบผลบวกเป็นร้อยละ 3.69, 0.46, 0.23, 0.46, 0.23, 0.46, และ 6.0 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) จำแนกตามจังหวัดต่างๆ ดังนี้ กรุงเทพมหานคร สมุทรสงคราม จันทบุรี สุพรรณบุรี หนองคาย ตาก นครสวรรค์ ปทุมธานี และพะเยา พบผลบวกของการเพาะเชื้อที่ร้อยละ 6.0, 2.07, 2.07, 1.61, 0.69, 1.38, 0.23, 0.23 และ 0.23 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) และพบการก่อโรคอุจจาระร่วงในผู้ป่วยหญิงร้อยละ 53.9 และในผู้ชายร้อยละ 46.1 ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% โดยค่า odd ratio เท่ากับ 1.3746

การตรวจหา toxin genes ของเชื้อ *C. difficile*

โดยวิธี multiplex Polymerase chain reaction (mPCR)

การจำแนกตามกลุ่มอายุตั้งแต่ ≤10 ถึง >60 ปี และไม่มีข้อมูลพบผลบวกของ *tqi* ยีนคิดเป็นร้อยละ 9.03, 12.5, 14.2, 20.0, 4.76, 6.45, 22.8 และ 22.8 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) การตรวจแยกชนิดของ toxin genes ของเชื้อ *C. difficile* โดยวิธี mPCR พบสายพันธุ์ A-B+ จำนวน 19 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยอายุ ≤10 ปี จำนวน 5 ตัวอย่าง อายุ 11-20 ปี จำนวน 1 ตัวอย่าง อายุ 31-40 ปี จำนวน 1 ตัวอย่าง อายุ 51-60 ปี จำนวน 2 ตัวอย่าง อายุ >60 ปี จำนวน 9 ตัวอย่าง และไม่มีข้อมูลพบผลบวก จำนวน 1 ตัวอย่าง สายพันธุ์ A-B+ พบในผู้ชายจำนวน 12 ตัวอย่าง และในผู้หญิงจำนวน 7 ตัวอย่าง ไม่พบผลบวกที่ให้ binary toxin (ตารางที่ 3) การจำแนกตามจังหวัดต่างๆ พบผลบวกสายพันธุ์ A-B+ จำนวน 5, 1, 5, 3, 3, 1, 1, 1 และ 1 ตัวอย่าง ตามลำดับ (ตารางที่ 4) พบผลบวกสายพันธุ์ A+B จำนวน 1 ตัวอย่างในจังหวัดตาก พบสายพันธุ์ A-B- จำนวน 43 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วย จังหวัดกรุงเทพมหานคร จำนวน 21 ตัวอย่าง สมุทรสงคราม จำนวน 8 ตัวอย่าง จันทบุรี จำนวน 5 ตัวอย่าง สุพรรณบุรี จำนวน 4 ตัวอย่าง และตาก จำนวน 5 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4)

วิจารณ์ผลการศึกษา

C. difficile เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบในธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ ลำไ้มนุษย์ มีการศึกษาหาความชุกของเชื้อ *C. difficile* ในอุจจาระคนปกติพบร้อยละ 3²² Wongwanich และคณะ²³ ได้ศึกษาความชุกของเชื้อ *C. difficile* ในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2544 พบผลบวกร้อยละ 25 แต่การศึกษารุ่นนี้พบผลบวกร้อยละ 14.55 การตรวจวินิจฉัยเชื้อและการตรวจหาสารพิษของ *C. difficile* พบผลบวกมากที่สุดที่กรุงเทพมหานคร และจากตารางที่ 3 ข้อมูลปี พ.ศ. 2554-2555 ไม่พบผลบวกเนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่นำส่งมาตรวจที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขลดลง ประเทศไทยยังต้องการศึกษาเชื้อ *C. difficile* เพิ่มขึ้นเนื่องจากห้องปฏิบัติการที่รองรับการตรวจหาเชื้อนี้มีค่อนข้างน้อยและต้องมีการลงทุนทางห้องปฏิบัติการเชื้อแบคทีเรียไร้อากาศค่อนข้างสูง จากการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่า การติดเชื้อ CDI ในผู้หญิงมากกว่าผู้ชายซึ่งคล้ายกับการศึกษาในประเทศมาเลเซียพบผลบวกของการติดเชื้อ CDI เป็นร้อยละ 13.7 พบการติดเชื้อในผู้หญิงร้อยละ 54.2 และในผู้ชายพบร้อยละ 45.8²⁴ การศึกษารุ่นนี้เมื่อจำแนกตามกลุ่มอายุพบผลบวกที่มี tpi ยืนมากที่สุดคือกลุ่มอายุ >60 ปี คิดเป็นร้อยละ 22.80 (ตารางที่ 3) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Samie และคณะ¹¹ พบการติดเชื้อในผู้ป่วยที่มี tpi ยืนมากที่สุดช่วงอายุ 20-39 ปี คิดเป็นร้อยละ 28.6 นอกจากนี้ปัจจัยเสี่ยงของโรค CDI อยู่ภายใต้การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ ระยะเวลาของการเข้าพักรักษาที่โรงพยาบาล พื้นฐานการเจ็บป่วย¹² การใช้ยาปฏิชีวนะเป็นเวลานานทำให้เชื้อที่เป็น normal flora ในลำไส้ลดลงหรือหมดไป ทำให้เชื้อ *C. difficile* เจริญเติบโตมากขึ้นและสร้าง toxin ทำให้เกิดอาการท้องเสียจนถึงขั้นรุนแรงถึงชีวิต เช่นเกิด pseudomembranous colitis ยาปฏิชีวนะที่มีความเสี่ยงต่อการเกิด CDI เช่น fluoroquinolone

(gatifloxacin, moxifloxacin) และ cephalosporins²⁵ จึงควรศึกษาเรื่องต่างๆ เหล่านี้เพิ่มเพื่อดูแนวโน้มของการติดเชื้อในผู้ป่วยโรค CDI

การศึกษารุ่นนี้ส่วนมากตรวจพบสายพันธุ์ A-B+ โดยพบว่า toxin A ให้ผลลบเนื่องจากยีนที่สร้าง toxin A คือ tcd-A มีการกลายพันธุ์ที่ส่วนของปลาย 5' ของยีน tcd-A ทำให้ไม่สามารถแปลรหัส toxin A ได้²⁵ การศึกษาของ Lemee และคณะ¹⁷ ได้ศึกษาหาความชุกของเชื้อ *C. difficile* พบว่าเป็นสายพันธุ์ A+B+ ร้อยละ 60.4 และการศึกษาของ Chia และคณะ⁵ ในปี ค.ศ. 2004 พบสายพันธุ์ A-B+ ร้อยละ 73.3 และ ปี ค.ศ. 2007 พบสายพันธุ์ A-B+ ลดลงเป็นร้อยละ 23.9 และมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสายพันธุ์ A+B+ การศึกษาของ Loo และคณะ²⁶ และ Samie และคณะ¹¹ พบว่าสายพันธุ์ Binary toxin ของ *C. difficile* คือตัวยาปฏิชีวนะ fluoroquinolone และมีความรุนแรงมากกว่าสายพันธุ์อื่น ดังนั้นในประเทศไทยควรเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์ของ *C. difficile* เพื่อเป็นข้อมูลทางระบาดวิทยาและการรักษา

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาความชุกของเชื้อ *C. difficile* พบว่าเป็นสาเหตุสำคัญในผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วง การติดเชื้อ CDI พบในผู้หญิงมากกว่าผู้ชาย และเมื่อจำแนกตามกลุ่มอายุพบการติดเชื้อมากที่สุดในกลุ่มอายุ >60 ปี โดยส่วนมากพบเป็นสายพันธุ์ A-B+ ปัจจัยเสี่ยงอื่นของโรค CDI เช่น การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ ระยะเวลาของการเข้าพักรักษาที่โรงพยาบาล พื้นฐานการเจ็บป่วยซึ่งควรทำการศึกษาข้อมูลเพิ่มเติม การเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงของสายพันธุ์ *C. difficile* ของประเทศไทยมีประโยชน์เพื่อเป็นแนวโน้มดูความรุนแรงของโรคเนื่องจากชนิดของสายพันธุ์ทำให้เกิดการติดต่อยาปฏิชีวนะได้

เอกสารอ้างอิง

1. Kazanowski M, Smolarek S, Kinnarney F, Grzebieniak Z. *Clostridium difficile*: epidemiology, diagnostic and therapeutic possibilities-a systematic review. Tech Coloproctol 2014; 18: 223-32.
2. Wells CL, Wilkins TD. Antibiotic-associated diarrhea, Pseudomembranous colitis, and *Clostridium difficile* In: Baron S et al, editors. Baron's Medical Microbiology. 4thed., Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
3. Ryan KJ, Ray CG. (editors). Sherris Medical Microbiology 4thed., New York: McGraw Hill 2004; 322-4.
4. Lyerly DM, Lockwood DE, Richardson SH, Wilkins TD. Biological activities of toxins A and B of *Clostridium difficile*. Infect Immun 1982; 35: 1147-50.
5. Chia JH, Lai HC, Su LH, Kuo AJ, Wu TL. 2013. Molecular Epidemiology of *Clostridium difficile* at a Medical Center in Taiwan: Persistence of Genetically Clustering of A-B+ Isolates and Increase of A+B+ Isolates. PLoS One 2013; 8: e75471.
6. Riegler M, Sedivy R, Pothoulakis C, Hamilton G, Zacherl J, Bischof G, et al. *Clostridium difficile* toxin B is more potent than toxin A in damaging human colonic epithelium *in vitro*. J Clin Invest 1995; 95: 2004-11.
7. Barbut F, Decre D, Lalande V, Burghoffer B, Noussair L, Gigandon A, et al. Clinical features of *Clostridium difficile*-associated diarrhea due to binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase)-producing strains. J Med Microbiol 2005; 54: 181-5.

8. Johnson S, Kent SA, O'Leary KJ, Merrigan MM, Sambol SP, Peterson LR, et al. Fatal pseudomembranous colitis associated with a variant *Clostridium difficile* strain not detected by toxin A immunoassay. *Ann Intern Med* 2001; 135: 434–8.
9. Moncrief JS, Zheng L, Neville LM, Lyerly DM. Genetic characterization of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* isolates by PCR. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3072–5.
10. Bacci S, Molbak K, Kjeldsen MK, Olsen KE. Binary toxin and death after *Clostridium difficile* infection. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 976–82.
11. Samie A, Obi CL, Franasiak J, Archbald-Pannone L, Bessong PO, Alcantara-Warren C, et al. PCR detection of *Clostridium difficile* triose phosphate isomerase (tpi), toxin A (tcdA), toxin B (tcdB), binary toxin (cdtA, cdtB), and tcdC genes in Vhembe District, South Africa. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78: 577–85.
12. Schwan C, Stecher B, Tzivelekidis T, van Ham M, Rohde M, Hardt WD, et al. *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLoS Pathog* 2009; 5: e1000626.
13. Papatheodorou P, Hornuss D, Nolke T, Hemmasi S, Castonguay J, Picchianti M, et al. *Clostridium difficile* binary toxin CDT induces clustering of the lipolysis-stimulated lipoprotein receptor into lipid rafts. *MBio* 2013; 4: e00244–13.
14. Delmee M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7: 411–6.
15. Barbut F, Kajzer C, Planas N, Petit JC. Comparison of three enzyme immunoassays, a cytotoxicity assay, and toxigenic culture for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 963–7.
16. Lozniewski A, Rabaud C, Dotto E, Weber M, Mory F. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis: usefulness of Premier Cytoclon A+B enzyme immunoassay for combined detection of stool toxins and toxigenic *C. difficile* strains. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1996–8.
17. Lemee L, Dhalluin A, Testelin S, Matrat MA, Maillard K, Lemeland JF, 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: 5710–14.
18. Barbut F, Lalande V, Burghoffer B, Thien HV, Grimprel E, Petit JC. Prevalence and genetic characterization of toxin A variant strains of *Clostridium difficile* among adults and children with diarrhea in France. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2079–83.
19. Wongwanich S, Ramsiri S, Vanasin B, Khowsaphit P, Tantipatayangkul P, Phan-urai R. *Clostridium difficile* associated disease in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1990; 21: 367–72.
20. Summanen P, Baron EJ, Citron DM, Strong C, Wexler HM, Finegold SM. *Wadsworth anaerobic bacteriology manual*. 5th ed, Los Angeles California: Star Publishing Company 1997; p.95–102.
21. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
22. Riggs MM, Sethi AK, Zabarsky TF, Eckstein EC, Jump RL, Donskey CJ. Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and nonepidemic *Clostridium difficile* strains among long-term care facility residents. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 992–8.
23. Wongwanich S, Pongpech P, Dhiraputra C, Huttayananont S, Sawanpanyalert P. Characteristics of *Clostridium difficile* strains isolated from asymptomatic individuals and from diarrheal patients. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7: 438–41.
24. Hassan SA, Othman N, Idris FM, Abdul Rahman Z, Maning N, Abdul Rahman R, et al. Prevalence of *Clostridium difficile* toxin in diarrhoeal stool samples of patients from a tertiary hospital in North Eastern Peninsular Malaysia. *Med J Malaysia* 2012; 67: 402–5.
25. Sambol SP, Merrigan MM, Lyerly D, Gerding DN, Johnson S. Toxin gene analysis of a variant strain of *Clostridium difficile* that causes human clinical disease. *Infect Immun* 2000; 68: 5480–7.
26. Loo VG, Poirier L, Miller MA, Oughton M, Libman MD, Michaud S, et al. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med* 2005; 353: 2442–9.