

การตรวจหาพันธุกรรมของสารพิษและทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ
ของเชื้อ *Clostridium difficile* ที่แยกได้จากอุจจาระผู้ป่วยระหว่าง พ.ศ. 2555-2558

Antimicrobial susceptibility and toxin production of *Clostridium difficile* isolated
from diarrheal patients during 2012-2015

■ ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์* ธนิตชัย คำแถลง ชุตินา จิตตประสาทศีล
Piyada Wangroongsarb* Thanitchai Kamthlang Chutima Jittaprasatsin
นัฐพงษ์ ชื่นบาน บุษราวรรณ ศรีวรรณระ สมชาย แสงกิจพร
Natthapong Cheunban Busarawan Sriwanthana Somchai Sangkitporn

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดนนทบุรี 11000
Department of Medical Sciences, National Institute of Health, Nonthaburi Province, Thailand

* ผู้รับผิดชอบบทความ (Email: piyada.w@dmsc.mail.go.th)

* Corresponding author (Email: piyada.w@dmsc.mail.go.th)

Received March 2017

Accepted as revised May 2017

Abstract

Background: *Clostridium difficile* infection affects people who have been treated with antibiotics and long-term care facilities. *C. difficile* release two protein toxins, toxin A and toxin B that are the major virulence factors. *C. difficile* plays important role in hospital-associated diarrhea around the world with wide range of clinical symptoms from asymptomatic carrier, mild to severe diarrhea, colitis, pseudomembranous colitis.

Objectives: To investigate the prevalence of toxigenic *C. difficile* by multiplex PCR and to determine antimicrobial susceptibility of *C. difficile* isolated from diarrheal patients using agar dilution method.

Materials and methods: A total of 49 isolates of *C. difficile* from stool specimens of diarrheal patients with suspected antibiotic-associated diarrhea during 2012-2015 were included. Detection of toxin genes by multiplex PCR and minimum inhibitory concentration (MIC) by agar dilution were performed.

Results: *C. difficile* isolates were classified into three groups according to toxin genes found as following 1) negative detection of types A and B toxin genes (A-B-) (29 isolates, 3.36%), 2) negative detection of type A toxin gene but positive detection of type B toxin gene (A-B+) (14 isolates, 1.62%), 3) positive detection of type A and B toxin genes (A+B+) (6 isolates, 0.69%). Binary toxin genes were not found in any isolate. Results of MIC for 9 drugs were as following; all isolates were sensitive to vancomycin (MIC 0.25-1 µg/mL) and Metronidazole (MIC 0.25-2 µg/mL). All isolates were resistant to clindamycin (MIC=8 to >256 µg/mL, MIC₅₀=32 µg/mL). Approximately 65.7% of isolates were sensitive to moxifloxacin (MIC 1-4 µg/mL). Most isolates were sensitive to tetracycline (MIC<0.125-4 µg/mL) and sensitive to chloramphenicol (MIC 0.25-8 µg/mL). Antimicrobial susceptibility test of levofloxacin, gemifloxacin and erythromycin were performed without criteria of breakpoint, MIC of these drugs were obtained as followings: 2 to >128 µg/mL (MIC₅₀=4 µg/mL), 0.5-32 µg/mL (MIC₅₀=1 µg/mL) and 0.125-128 µg/mL (MIC₅₀=2 µg/mL), respectively.

Conclusion: Antimicrobial susceptibility and toxin production of *C. difficile* are useful for monitoring the severity of disease and rate of resistant to antibiotics. The study found that the majority of metronidazole and vancomycin were effective for treatment of *C. difficile* diarrheal infection in Thailand.

Journal of Associated Medical Sciences 2017; 50(2): 187-196. Doi: 10.14456/jams.2017.14

Keywords: *Clostridium difficile*, agar dilution, minimum inhibitory concentration (MIC), antimicrobial susceptibility

บทคัดย่อ

ที่มาและความสำคัญ: การติดเชื้อ *Clostridium difficile* ทำให้เกิดโรคต่อระบบการย่อยอาหาร โดยเฉพาะผู้ป่วยที่ได้รับยาปฏิชีวนะในระยะยาวและผู้ที่ต้องพักอยู่ในสถานบริการสุขภาพเป็นเวลานาน มีสารพิษ 2 ชนิด คือชนิด A และ B ที่เป็นปัจจัยหลักก่อโรค *C. difficile* เป็นสาเหตุของโรคท้องเสียในโรงพยาบาลโดยมีอาการทางคลินิกหลากหลายตั้งแต่ไม่รุนแรงจนถึงมีอาการท้องเสียอย่างรุนแรง และทำให้เกิดอาการทางลำไส้ เช่น ภาวะลำไส้ใหญ่อักเสบ

วัตถุประสงค์: เพื่อตรวจแยกชนิดของสารพิษด้วยวิธี multiplex PCR และหาความไวของเชื้อ *C. difficile* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี agar dilution

วัสดุและวิธีการ: เก็บตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงจำนวนทั้งหมด 862 ราย ระหว่าง ปี พ.ศ. 2555-2558 จำแนกเชื้อ *C. difficile* และตรวจแยกชนิดของสารพิษด้วยวิธี multiplex PCR และทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี agar dilution

ผลการศึกษา: จำแนกเชื้อ *C. difficile* ได้จำนวน 49 ไอโซเลท และสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มตามชนิดของยีนที่กำหนดการสร้างสารพิษ ได้แก่ 1) กลุ่มที่ไม่พบยีนที่กำหนดการสร้างสารพิษชนิด A และ B (A-B-) จำนวน 29 ไอโซเลท (ร้อยละ 3.36) 2) กลุ่มที่พบยีนที่กำหนดการสร้างสารพิษชนิด B (A-B+) จำนวน 14 ไอโซเลท (ร้อยละ 1.62) และ 3) กลุ่มที่พบทั้งยีนที่กำหนดการสร้างสารพิษชนิด A และ B (A+B+) จำนวน 6 ไอโซเลท (ร้อยละ 0.69) ไม่พบเชื้อที่ผลิตสารพิษแบบ binary toxin เมื่อทดสอบความไวของเชื้อ *C. difficile* ที่แยกเพาะเชื้อได้ต่อยาปฏิชีวนะ 9 ชนิด พบว่า ทุกไอโซเลทมีความไวต่อยา vancomycin (MIC 0.25-1 µg/mL) และ metronidazole (MIC <0.25-2 µg/mL) ทุกไอโซเลทให้ผลต่อยา clindamycin (MIC 8->256 µg/mL) ร้อยละ 65.3 ของไอโซเลทที่ทดสอบให้ผลไวต่อยา moxifloxacin (MIC 1-4 µg/mL) ไอโซเลทส่วนใหญ่ไวต่อยา tetracycline (MIC<0.125-4 µg/mL) และ chloramphenicol (MIC 0.25-8 µg/mL) การทดสอบความไวต่อ levofloxacin, gemifloxacin และ erythromycin ทำโดยไม่มีเกณฑ์ของค่ามาตรฐานในการแปลผล พบว่าค่า MIC ของยาเหล่านี้อยู่ในช่วง 1->128 µg/mL (MIC₅₀=4), 0.5-32 µg/mL (MIC₅₀=1) และ 0.125 - >256 µg/mL (MIC₅₀=2) ตามลำดับ

สรุปผลการศึกษา: การตรวจหายีนสร้างสารพิษและศึกษาความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพเป็นประโยชน์สำหรับเฝ้าระวังความรุนแรงในการก่อโรคและอัตราการติดเชื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *C. difficile* การศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ไม่มีความสามารถในการสร้างสารพิษทั้งชนิด A และ B และพบว่ายา metronidazole และ vancomycin เป็นยาที่ยังคงมีประสิทธิภาพสามารถใช้สำหรับรักษาโรคอุจจาระร่วงที่เกิดจากการติดเชื้อ *C. difficile* ในประเทศไทยได้

Journal of Associated Medical Sciences 2560; 50(2): 187-196. Doi: 10.14456/jams.2017.14

คำสำคัญ: *Clostridium difficile*, agar dilution, minimum inhibitory concentration (MIC) ความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ

บทนำ

Clostridium difficile (*C. difficile*) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ สามารถสร้างสปอร์ที่ทนต่อความร้อนและความเป็นกรด ทำให้อยู่ในสิ่งแวดล้อมได้นานหลายเดือนจนถึงปี¹⁻³ การติดเชื้อ *C. difficile* ส่งผลต่อระบบย่อยอาหาร พบได้ในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะเป็นเวลานาน ยาปฏิชีวนะลดจำนวนของเชื้อ normal flora ที่มีอยู่ในลำไส้ แต่ *C. difficile* ทนต่อยาได้จึงสามารถเพิ่มปริมาณและสร้างสารพิษ enterotoxin เป็นสาเหตุทำให้

อุจจาระร่วงและอาจมีอาการ pseudomembranous colitis ได้^{4,5} เนื่องจากสามารถผลิตสารพิษที่สำคัญคือ toxin A (enterotoxin), toxin B (cytotoxin) และ binary toxin ซึ่งกำหนดการสร้างโดยยีน *tcdA*, *tcdB* และ *cdt* ตามลำดับ^{6,7} ปัจจุบัน *C. difficile* จัดเป็นปัญหาหนึ่งในโรงพยาบาลต่างๆ เพราะสามารถแพร่กระจายและทำให้ผู้ป่วยจำนวนมากต้องรับประทุกันยาปฏิชีวนะหรือระบบภูมิคุ้มกันอ่อนแอลง โรงพยาบาลหลายแห่งของอังกฤษยังคงมีผู้ติดเชื้อสูงแม้มีจำนวนลดลงแล้ว เช่น ในปี ค.ศ. 2010-2011 มีผู้ติดเชื้อ *C. difficile* 10,414 ราย ลดลงจาก 33,442 ราย ใน

ปี ค.ศ. 2007-2008 เช่นเดียวกับโรงพยาบาลหลาย แห่งในสหรัฐอเมริกา มีผู้ติดเชื้อ *C. difficile* มากถึง 336,000 คน และมีผู้เสียชีวิตถึง 14,000 คนต่อปี⁸ รายงานของประเทศญี่ปุ่น ในปี พ.ศ. 2543 พบความชุกของผู้ติดเชื้อ *C. difficile* ที่เป็นไอโซเลท A-B+ ร้อยละ 39⁹ และ ในระหว่าง ปี พ.ศ. 2548-2551 อุบัติการณ์ลดลงเป็นร้อยละ 12.7%¹⁰ ในประเทศเกาหลี ปี พ.ศ. 2541 พบอุบัติการณ์ผู้ติดเชื้อ *C. difficile* ที่เป็นไอโซเลท A -B+ เป็นร้อยละ 4.9¹¹ และในปีพ.ศ. 2547-2548 เพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 50.9¹²

ในประเทศไทยมีรายงานในเรื่องนี้ น้อย ศิริพรรณและคณะ¹³ ศึกษาอุบัติการณ์ของ *C. difficile*-associated disease (CDAD) ที่แยกได้จากอุจจาระของผู้ป่วยไทย ในปี พ.ศ. 2546 พบ CDAD ร้อยละ 18.64 วิลาวรรณและคณะ¹⁴ ศึกษาความชุกในผู้สงสัยว่าติดเชื้อ *C. difficile* ที่มีอาการท้องร่วงในโรงพยาบาลศิริราช ในปี พ.ศ. 2554 พบ CDAD ร้อยละ 12.3 และ การศึกษาของจักรพันธ์และคณะ¹⁵ ที่ศึกษา CDAD ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ในปี พ.ศ. 2551 โดยการกำหนดลักษณะผู้ป่วยทางคลินิก การรักษาโดยใช้ยาสำหรับผู้ป่วย CDAD

ปัญหาทางคลินิกที่ยากที่สุดในการรักษาผู้ป่วย *C. difficile* คือการกลับเป็นซ้ำของโรคก่อนข้างสูง และยังไม่มีการรักษาใดที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการป้องกันการเป็นซ้ำได้ การกลับเป็นซ้ำของโรคเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ จึงมีผู้สนใจศึกษาวิธีการช่วยพยากรณ์การติดเชื้อซ้ำ Hu และคณะ¹⁶ จำแนกลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยจำนวน 63 ราย พบว่าผู้ป่วยที่อายุมากกว่า 65 ปี มีอาการแสดงของโรคที่รุนแรงและยังมีความจำเป็นต้องใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคติดเชื้อชนิดต่างๆ ภายหลังหยุดการรักษาจำเพาะต่อเชื้อ *C. difficile* แล้วมีความเสี่ยงสูงต่อการติดเชื้อดังกล่าวซ้ำอีก เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาใช้ประเมินผู้ป่วยอีกกลุ่มหนึ่งจำนวน 89 ราย พบว่าผู้ป่วยที่มีปัจจัยทุกรายมีโอกาสเกิดการติดเชื้อ *C. difficile* ซ้ำได้อีก โดยมีความแม่นยำสูงถึงร้อยละ 72 ผลของการศึกษาช่วยให้แพทย์ผู้ดูแลมีการเฝ้าระวังเพื่อให้การรักษาอย่างทันที่ ข้อมูลที่พบยังช่วยในการค้นหาระบบการรักษาใหม่ๆ เช่น การใช้ probiotics ยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆ วัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อซ้ำ และ ยังพบว่าสิ่งแวดล้อมในโรงพยาบาล เป็นอีกหนึ่งสาเหตุของการติดเชื้อ *C. difficile* ที่อยู่ในอุจจาระผ่านการสัมผัสมือของบุคลากรทางการแพทย์ ทำให้เชื้อแพร่กระจายไปได้ ผู้ป่วยบางรายไม่มีการแต่เป็นพาหะแพร่กระจายเชื้อได้อย่างดีในโรงพยาบาล ดังนั้น ผู้ป่วยในโรงพยาบาลที่มี CDAD ควรแยกห้องเพื่อลดการกระจายของเชื้อไปสู่ผู้ป่วยด้วยกัน อุบัติการณ์ของ *C. difficile* จะลดลงอย่างชัดเจนเมื่อลดการใช้ยาปฏิชีวนะโดยไม่จำเป็น ผู้ป่วยอายุมากมีความเสี่ยงเพิ่มขึ้นเนื่องจากได้รับยาปฏิชีวนะบ่อย เข้าโรงพยาบาลบ่อยขึ้น การทำงานของ

เม็ดเลือดขาวในการกำจัดเชื้อลดลง เหล่านี้เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อ *C. difficile* ปัจจัยอื่นที่อาจเพิ่มความเสี่ยงในการติดเชื้อ คือการใส่สายสวนหรือท่อ เช่น nasogastric tube, gastrointestinal procedure, acidantisecretory medication และระยะเวลาในการนอนโรงพยาบาล ยาเคมีบำบัดเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อเช่นกันโดยเฉพาะ methotrexate เพราะยาเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ ทำให้เกิด *C. difficile* colonization นอกจากนี้ สามารถพบ CDAD ในผู้ป่วยปลูกถ่ายอวัยวะที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันด้วย ผู้ป่วยติดเชื้อเอดส์มีความเสี่ยงเพิ่มขึ้นต่อการเกิด CDAD เนื่องจากมีปัจจัยเสี่ยงมากมาย เช่น ได้รับยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการติดเชื้อฉวยโอกาสบางชนิดหลายครั้ง ได้รับการรักษาในโรงพยาบาลบ่อยๆ และภูมิคุ้มกันบกพร่อง ดังนั้น ควรตรวจ *C. difficile* ในผู้ป่วย HIV และผู้ป่วยอุจจาระร่วงที่มีประวัติได้รับยาปฏิชีวนะ ผู้ป่วย inflammatory bowel disease มีความเสี่ยงสูงต่อการติดเชื้อ *C. difficile* แม้ไม่ได้รับยาปฏิชีวนะ เพราะพยาธิสภาพเป็นปัจจัยหลักทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งชนิดและปริมาณของแบคทีเรียในลำไส้ กระบวนการ colonization resistance สูญเสียและ *C. difficile* อาจทำให้การทำงานของอวัยวะแย่งได้เช่นกัน^{17,18}

สรุปปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ CDAD ได้แก่ การได้รับยาปฏิชีวนะชั้นสูง ผู้ป่วยสูงอายุ ผู้ได้รับเคมีบำบัด ผู้มีโรคประจำตัวร้ายแรง และผู้พักอาศัยในสถานอภิบาลระยะยาว¹⁹ รวมถึงการใช้ยาปฏิชีวนะผิดวิธีของประชากรไทย ซึ่งสามารถหาซื้อยาได้ง่าย²⁰ ดังนั้น เพื่อให้ทราบข้อมูลความชุกของการติดเชื้อ *C. difficile* และเพื่อใช้ในการเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงความรุนแรงของตัวเชื้อและการใช้ยาปฏิชีวนะ คณะผู้วิจัยจึงตรวจแยกชนิดของยีนก่อสารพิษ (toxin genes) ของเชื้อ *C. difficile* โดยวิธี multiplex PCR และการทดสอบความไวของเชื้อ *C. difficile* ที่แยกได้จากตัวอย่างของผู้ป่วยต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ

การเก็บและจัดการสิ่งส่งตรวจ

เก็บตัวอย่างอุจจาระจากโรงพยาบาลแมสซอด จังหวัดตาก จำนวน 381 ราย และโรงพยาบาลพระปกเกล้าจังหวัดจันทบุรี จำนวน 481 ราย รวมทั้งสิ้น 862 ราย (ทั้งสองแห่งเป็นโรงพยาบาลติดพื้นที่เขตชายแดนของประเทศไทย) ระยะเวลาเก็บตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555-2558 ทุกอย่างเป็นตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงนำส่งห้องปฏิบัติการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ งานวิจัยผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน กระทรวงสาธารณสุข (เลขที่ 70/2557) เพื่อตรวจหาสาเหตุของโรค ตัวอย่างอุจจาระที่ส่งตรวจต้องอยู่ในสภาพที่เหมาะสม

คือบรรจุอยู่ในภาชนะปากกว้างมีฝาปิดสะอาดปราศจากเชื้อ มีปริมาณอุจจาระสดประมาณ 1-2 กรัม ส่งถึงห้องปฏิบัติการ ภายใน 24 ชม. ที่อุณหภูมิ 4 °C เมื่อส่งถึงห้องปฏิบัติการแล้ว ดำเนินการเพาะเลี้ยงเชื้อทันที

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. difficile* จากตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วย

เพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้ alcohol shock technique²¹ โดยผสมตัวอย่างกับ absolute ethanol ในอัตราส่วน 1:1 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายตัวอย่างลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Wilkins-Chalgren blood agar : WCBL (CM 619B; Oxoid England) streak plate และบ่มเพาะเชื้อในสภาวะไร้อากาศ (anaerobic jar ที่มี gas generating kit และ anaerobic indicator) ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง โคโลนีของ *C. difficile* ที่เจริญบน plate WCBL มีลักษณะแบน สีเทาเข้ม แผ่ ขอบหยักคล้ายรากไม้ มีกลิ่นของสาร para-cresol ไม่มี hemolysis zone

การพิสูจน์ชนิดของเชื้อทางจุลชีววิทยา

เชื้อ *C. difficile* ย้อมติดสีแกรมบวก เซลล์รูปท่อนสร้างสปอร์รูปไข่อยู่ใต้ส่วนปลายเซลล์ (oval sub-terminal spore) เคลื่อนที่ได้ หมักย่อยน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตส มีเอนไซม์ เจลาติเนสย่อยสลายเจลาติน ไฮโดรไลซ์เอสคูลิน ควบคุมคุณภาพโดยการตรวจสอบลักษณะโคโลนีและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *C. difficile* ที่เพาะเลี้ยงได้จากตัวอย่างเปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐาน *C. difficile* ATCC 43255

การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพด้วยวิธี agar dilution method

ทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ 9 ชนิด ประกอบด้วย vancomycin, metronidazole, clindamycin, chloramphenicol, moxifloxacin, tetracycline, levofloxacin, gemifloxacin และ erythromycin โดยใช้ *Clostridium difficile* GAI10029 และ *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 เป็นเชื้อควบคุม ดังนี้ Subculture เชื้อ *C. difficile* ให้ได้ pure colony บน WCBL อายุ 48 ชั่วโมง ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อป้ายเชื้อจุ่มลงใน Brucella broth วัดให้ได้ความขุ่น 1 McFarland โดยใช้ colorimeter หรือเทียบกับ McFarland standard ใช้ปิเปตต์ปราศจากเชื้อดูดเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้ว 2 มิลลิลิตร ใส่ลงใน inoculator และบันทึกตำแหน่งของเชื้อใน inoculator นั้น เมื่อใส่เชื้อและเชื้อมาตรฐานจนครบแล้ว นำเข้าเครื่อง replicator ทำการ inoculate เชื้อลงบน Brucella sheep blood agar ที่ใส่ยาความเข้มข้นต่างๆ ไว้แล้ว จากนั้นบ่ม plate ที่ 37°C ในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อ่านผลโดยดูว่าเชื้อหยุดการเจริญที่ความเข้มข้นใดและบันทึกผล²² หาค่า MIC₅₀ และ MIC₉₀

การตรวจหา toxin genes ของเชื้อ *C. difficile* โดยวิธี multiplex PCR

การสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างเชื้อ *C. difficile*

นำไอโซเลทที่แยกได้จากตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วย และพิสูจน์แล้วว่าเป็นเชื้อ *C. difficile* มาเพาะเลี้ยงใน Wilkins-Chalgren broth บ่มในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง นำเชื้อที่เจริญเติบโตจนขึ้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 rpm (Spectrafuge Labnet international Inc., USA) นาน 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วย normal saline ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง สกัด DNA จากตะกอนด้วยน้ำยา lysozyme และ proteinase K²³ จากนั้นเก็บ DNA ไว้ที่ -20 °C

การเพิ่มขยายปริมาณสารพันธุกรรม

ใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ที่ออกแบบโดย Lemee และคณะ²⁴ (ไพรเมอร์ *tpi* ให้ PCR product ขนาด 230 bp ไพรเมอร์ *tcd-A* (สามารถตรวจสอบการเกิด deletion ของยีน *tcd-A*) เชื้อสายพันธุ์ A- ให้ PCR product ขนาด 110 bp เชื้อสายพันธุ์ A+ ให้ PCR product ขนาด 369 bp ไพรเมอร์ *tcd-B* ให้ PCR product ขนาด 160 bp) เตรียมส่วนผสมปริมาตร 25 µL ประกอบด้วย 0.5 µM ไพรเมอร์, 0.2 mM dNTPs, 2.5 mM MgCl₂, 1X PCR buffer, 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Promega, USA), DNA template 1 µL เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง PCR thermal cycler (Multigene Labnet International Inc., USA) ประกอบด้วยขั้นตอน pre-denaturation 95 °C 3 นาที 40 รอบของ denaturation 95 °C 30 วินาที annealing 55 °C 30 วินาที extension 72 °C 30 วินาที และ final-extension 72 °C 7 นาที ควบคุมคุณภาพโดยใช้ *C. difficile* DMST 16180 (A+B+) มี PCR product ขนาด 230, 369 และ 160 bp และ *C. difficile* DMST 47766 (A-B+) มี PCR product ขนาด 230, 110 และ 160 bp

การตรวจหา binary toxin ของเชื้อ *C. difficile* ใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ ที่ออกแบบโดย Samie และคณะ²⁵ ประกอบด้วย การตรวจหาส่วน enzymatic (*cdt-A*) ใช้ไพรเมอร์ *cdt-A* ให้ PCR product ขนาด 376 bp และส่วน binding component (*cdt-B*) ใช้ไพรเมอร์ *cdt-B* ให้ PCR product ขนาด 475 bp เตรียมส่วนผสม ปริมาตร 25 µL ประกอบด้วย 0.15 µM ไพรเมอร์, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 1X PCR buffer, 1 U *Taq* DNA polymerase (Promega, USA), DNA template 5 µL เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง PCR thermal cycler (Multigene Labnet International Inc., USA) ประกอบด้วยขั้นตอน

pre-denaturation 94 °C 5 นาที 30 รอบของ denaturation 94 °C 45 วินาที annealing 52 °C 1 นาที extension 72 °C 1.2 นาที และ final-extension 72 °C 10 นาที ควบคุมคุณภาพโดยใช้ *C. difficile* ATCC BAA-1805 (*cdt-A* + *cdt-B*+) มี PCR product ขนาด 376 bp และ 475 bp

ผลการศึกษา

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. difficile* จากตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยและการตรวจหา toxin gene ของ *C. difficile* โดยวิธี multiplex polymerase chain reaction (mPCR)

การศึกษครั้งนี้เป็นการเก็บตัวอย่างอุจจาระจากโรงพยาบาลแม่สอด จังหวัดตาก และโรงพยาบาลพระปกเกล้า จังหวัดจันทบุรีระหว่างปี พ.ศ. 2555-2558 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. difficile* จากตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยและการตรวจหา toxin gene ของ *C. difficile* จากโรงพยาบาลทั้งสองแห่ง จำแนกตามเพศ พบเชื้อ *C. difficile* ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อใน 49 ราย จากทั้งหมด 862 ราย (ร้อยละ 5.68) เป็น toxin gene แบบ A-B- จำนวน 29 ราย (ร้อยละ 3.36) แบบ A-B+ จำนวน 14 (ร้อยละ 1.62) และแบบ A+B+ จำนวน 6 ราย (ร้อยละ 0.69) เป็นตัวอย่างจากผู้ป่วยชาย จำนวน 26 ราย จากตัวอย่างชายทั้งหมด 421 (ร้อยละ 6.17) ผู้ป่วยหญิงจำนวน 23 ราย จากตัวอย่างผู้ป่วยหญิงทั้งหมด 441 ราย (ร้อยละ 5.21) (Table 1) วิเคราะห์แยกแหล่งตัวอย่างดังนี้

โรงพยาบาลแม่สอด : ตรวจพบเชื้อ *C. difficile* ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อในผู้ป่วย จำนวน 23 ราย จากผู้ป่วยทั้งหมด 381 ราย (ร้อยละ 6.04) เป็น toxin gene แบบ A-B- จำนวน 11 ราย (ร้อยละ 2.89) แบบ A-B+ จำนวน 7 ราย (ร้อยละ 1.84) และแบบ A+B+ จำนวน 5 ราย (ร้อยละ 1.31) เป็นผู้ป่วยชาย 11 ราย จากตัวอย่างชายทั้งหมด 185 ราย (ร้อยละ 5.94) ผู้ป่วยหญิง 12 ราย จากตัวอย่างผู้ป่วยหญิงทั้งหมด 196 ราย (ร้อยละ 6.12) (Table 1)

การตรวจหา toxin genes ด้วยวิธี mPCR โดยจำแนกตาม ปี พ.ศ. เพศ และแหล่งตัวอย่าง เป็นดังนี้ ปี พ.ศ. 2555 ตรวจพบเชื้อ *C. difficile* จากผู้ป่วยหญิง 1 ราย (ร้อยละ 3.70) เป็น toxin gene แบบ A-B+ ปี พ.ศ. 2556 ตรวจพบเชื้อ *C. difficile* จำนวน 6 ราย จากผู้ป่วยทั้งหมด 93 ราย (ร้อยละ 6.45) เป็นผู้ป่วยชายจำนวน 3 ราย เป็น toxin gene แบบ A-B- เป็นผู้ป่วยหญิงจำนวน 3 ราย เป็น toxin gene แบบ A-B- จำนวน 1 ราย แบบ A-B+ จำนวน 1 ราย และแบบ A+B+ จำนวน 1 ราย ปี พ.ศ. 2557 ตรวจพบเชื้อ *C. difficile* จำนวน 11 ราย จากผู้ป่วยทั้งหมด 176 ราย (ร้อยละ 6.25) เป็นผู้ป่วย

ชายจำนวน 6 ราย เป็น toxin gene แบบ A-B- จำนวน 2 ราย แบบ A-B+ จำนวน 2 ราย และแบบ A+B+ จำนวน 2 ราย เป็นผู้ป่วยหญิงจำนวน 5 ราย เป็น toxin gene แบบ A-B- จำนวน 2 ราย แบบ A-B+ จำนวน 1 ราย และแบบ A+B+ จำนวน 2 ราย ปี 2558 ตรวจพบเชื้อ *C. difficile* จำนวน 5 ราย จากผู้ป่วยทั้งหมด 85 ราย (ร้อยละ 5.88) เป็นผู้ป่วยชายจำนวน 2 ราย เป็น toxin gene แบบ A-B- จำนวน 1 ราย แบบ A-B+ จำนวน 1 ราย เป็นผู้ป่วยหญิงจำนวน 3 ราย เป็น toxin gene แบบ A-B- จำนวน 2 ราย แบบ A-B+ จำนวน 1 ราย (Table 2)

โรงพยาบาลพระปกเกล้า : มีการตรวจพบเชื้อ *C. difficile* ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อในผู้ป่วยจำนวน 26 จากผู้ป่วยทั้งหมด 481 ราย (ร้อยละ 5.41) พบเป็น toxin gene แบบ A-B- จำนวน 18 ราย (ร้อยละ 3.74) แบบ A-B+ จำนวน 7 ราย (ร้อยละ 1.46) และแบบ A+B+ จำนวน 1 ราย (ร้อยละ 0.21) เป็นผู้ป่วยชาย 15 ราย จากตัวอย่างชายทั้งหมด 236 ราย (ร้อยละ 6.35) ผู้ป่วยหญิง 11 ราย จากตัวอย่างผู้ป่วยหญิงทั้งหมด 245 ราย (ร้อยละ 4.48) (Table 1)

การตรวจหา toxin genes ด้วยวิธี mPCR จำแนกตามปี เพศ และแหล่งตัวอย่าง เป็นดังนี้ ปี พ.ศ. 2555 ตรวจพบเชื้อ *C. difficile* จากจำนวนทั้งหมด 15 ราย ปี พ.ศ. 2556 ตรวจพบเชื้อ *C. difficile* จำนวน 5 ราย จากผู้ป่วยทั้งหมด 125 ราย (ร้อยละ 4.0) เป็นผู้ป่วยชายจำนวน 3 ราย เป็น toxin gene แบบ A-B- ผู้ป่วยหญิงจำนวน 2 ราย เป็น toxin gene แบบ A-B- จำนวน 1 ราย แบบ A-B+ จำนวน 1 ราย ปี พ.ศ. 2557 ตรวจพบเชื้อ *C. difficile* จำนวน 12 รายจากผู้ป่วยทั้งหมด 235 ราย (ร้อยละ 5.10) เป็นผู้ป่วยชายจำนวน 8 ราย เป็น toxin gene แบบ A-B- จำนวน 5 ราย แบบ A-B+ จำนวน 2 รายแบบ A+B+ จำนวน 1 ราย เป็นผู้ป่วยหญิงจำนวน 4 ราย เป็น toxin gene แบบ A-B- จำนวน 3 ราย แบบ A-B+ จำนวน 1 ราย ปี 2558 ตรวจพบเชื้อ *C. difficile* จำนวน 9 ราย จากผู้ป่วยทั้งหมด 106 ราย (ร้อยละ 8.49) เป็นผู้ป่วยชายจำนวน 4 ราย เป็น toxin gene แบบ A-B- จำนวน 2 ราย แบบ A-B+ จำนวน 2 ราย เป็นผู้ป่วยหญิงจำนวน 5 ราย เป็น toxin gene แบบ A-B- จำนวน 4 ราย และแบบ A-B+ จำนวน 1 ราย (Table 2)

Table 1 Identification of *C. difficile* by culture method and detection toxin genes by mPCR which classified by sex and hospitals.

Total					Maesot Hospital					Prapokklao Hospital				
Sex	Positive (%)	Toxin genes			Sex	Positive (%)	Toxin genes			Sex	Positive (%)	Toxin genes		
		A-B-	A-B+	A+B+			A-B-	A-B+	A+B+			A-B-	A-B+	A+B+
Male	26/421 (6.17)	16/421 (3.80)	7/421 (1.66)	3/421 (0.71)	Male	11/185 (5.94)	6/185 (3.24)	3/185 (1.62)	2/185 (1.08)	Male	15/236 (6.35)	10/236 (4.23)	4/236 (1.69)	1/236 (0.42)
Female	23/441 (5.21)	13/441 (2.94)	7/441 (1.58)	3/441 (0.68)	Female	12/196 (6.12)	5/196 (2.55)	4/196 (2.04)	3/196 (1.53)	Female	11/245 (4.48)	8/245 (3.26)	3/245 (1.22)	-
Total	49/862 (5.68)	29/862 (3.36)	14/862 (1.62)	6/862 (0.69)	Total	23/381 (6.04)	11/381 (2.89)	7/381 (1.84)	5/381 (1.31)	Total	26/481 (5.41)	18/481 (3.74)	7/481 (1.46)	1/481 (0.21)

Positive = *C. difficile* was found.

Table 2 Identification of *C. difficile* detected toxin genes by mPCR which classified by sex, years and hospitals.

Sex	Maesot Hospital											
	2012 (%)	2013 (%)				2014 (%)				2015 (%)		
	A-B+	Total	A-B-	A-B+	A+B+	Total	A-B-	A-B+	A+B+	Total	A-B-	A-B+
Male	0/11(-)	3/42(7.14)	3/42(7.14)	-	-	6/96(6.25)	2/96(2.08)	2/96(2.08)	2/96(2.08)	2/36(5.56)	1/36(2.78)	1/36(2.78)
Female	1/16(6.25)	3/51(5.88)	1/51(1.96)	1/51(1.96)	1/51(1.96)	5/80(6.25)	2/80 (2.5)	1/80(1.25)	2/80(2.5)	3/49(6.12)	2/49(4.08)	1/49(2.04)
Total	1/27(3.70)	6/93(6.45)				11/176 (6.25)				5/85(5.88)		

Sex	Prapokklao Hospital											
	2012 (%)	2013 (%)				2014 (%)				2015 (%)		
	A-B+	Total	A-B-	A-B+	A+B+	Total	A-B-	A-B+	A+B+	Total	A-B-	A-B+
Male	0/9(-)	3/72(4.16)	3/72(4.16)	-	-	8/103(7.76)	5/103(4.85)	2/103(1.94)	1/103(0.97)	4/52(7.69)	2/52(3.85)	2/52(3.85)
Female	0/6(-)	2/53(3.77)	1/53(1.88)	1/53(1.88)	-	4/132(3.03)	3/132(2.27)	1/132(0.76)	-	5/54(9.25)	4/54(7.40)	1/54(1.85)
Total	0/15(-)	5/125(4.0)				12/235 (5.10)				9/106 (8.49)		

Table 3 Minimal inhibitory concentration (MIC) of *C. difficile* against 9 antimicrobial agents.

Drugs	MIC (µg/ml)			No. of <i>C.difficile</i> isolate (%)	
	Range	50%	90%	Susceptible (%)	Resistance (%)
Tetracycline	<0.125->128	2	>128	40 (81.6)	9 (18.4)
Chloramphenicol	0.25-32	4	8	47 (95.8)	2 (4.2)
Metronidazole	<0.25-2	1	2	49 (100)	0
Clindamycin	8->256	32	>256	0	49 (100)
Moxifloxacin	1-32	2	32	32 (65.3)	17 (34.7)
Vancomycin	0.25-1	0.5	0.5	49 (100)	0
Erythromycin	0.125->256	2	>256		NA
Gemifloxacin	0.5-32	1	16		NA
Levomecillin	1->128	4	>128		NA

NA= No standard values for interpretation

ผลการทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะโดยวิธี agar dilution method

การทดสอบความไวของเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะของ *C. difficile* จำนวน 49 ไอโซเลท ที่แยกได้จากผู้ป่วย กับยาต้านจุลชีพ 9 ชนิด พบว่า เชื้อ *C. difficile* ทั้งหมดไวต่อยา metronidazole ($MIC_{50}=1 \mu\text{g/mL}$, $MIC_{90}=2 \mu\text{g/mL}$) และ vancomycin ($MIC_{50}=0.5 \mu\text{g/mL}$, $MIC_{90}=0.5 \mu\text{g/mL}$) ไอโซเลทที่ไวต่อยา tetracycline 40 ตัวอย่าง ดื้อต่อยา 9 ตัวอย่าง ($MIC_{50}=2 \mu\text{g/mL}$, $MIC_{90}>128 \mu\text{g/mL}$) ไอโซเลทที่ไวต่อยา chloramphenicol 47 ตัวอย่าง ดื้อต่อยา 2 ตัวอย่าง ($MIC_{50}=4 \mu\text{g/mL}$, $MIC_{90}=8 \mu\text{g/mL}$) ไอโซเลทที่ไวต่อยา moxifloxacin 32 ตัวอย่าง ดื้อต่อยา 17 ตัวอย่าง ($MIC_{50}=2 \mu\text{g/mL}$, $MIC_{90}=32 \mu\text{g/mL}$) ไอโซเลทที่ให้ผลดื้อต่อยาทั้งหมดคือ clindamycin ($MIC_{50}=32 \mu\text{g/mL}$, $MIC_{90}>256 \mu\text{g/mL}$) ส่วนยา erythromycin, gemifloxacin และ levomycin ไม่มีค่ามาตรฐานในการแปลผล แต่การศึกษาครั้งนี้พบว่าค่า MIC ในช่วง 2-128 $\mu\text{g/mL}$ ($MIC_{50}=4 \mu\text{g/mL}$), 0.5-32 $\mu\text{g/mL}$ ($MIC_{50}=1 \mu\text{g/mL}$) และ 0.125-128 $\mu\text{g/mL}$ ($MIC_{50}=2 \mu\text{g/mL}$) ตามลำดับ

วิจารณ์ผลการศึกษา

การศึกษาที่ประเทศสหรัฐอเมริกา แคนาดา และในทวีปยุโรป พบว่า ประมาณร้อยละ 20-27 ของโรค *Clostridium difficile* infection (CDI) มีอุบัติการณ์เฉลี่ย 20-30 คนต่อประชากร 100,000 คน^{25,26} และร้อยละ 11-28 ของการติดเชื้อ CDI เกิดจาก community acquired ข้อมูลเรื่องความชุกของการติดเชื้อ *C. difficile* ในประเทศไทยที่มีการศึกษาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 ถึงปัจจุบัน¹³⁻¹⁵ พบความชุกของการติดเชื้อ *C. difficile* ร้อยละ 4.8-52.2 การศึกษาความชุกของการติดเชื้อ *C. difficile* ครั้งนี้เท่ากับร้อยละ 5.68 แตกต่างกันเนื่องจากรูปแบบการศึกษา และกลุ่มประชากรที่ทำการศึกษา²⁷

นอกจากนี้ปัจจัยเสี่ยงของโรค CDI อยู่ภายใต้การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ ระยะเวลาของการเข้าพักรักษาที่โรงพยาบาล พื้นฐานการเจ็บป่วย²⁸ ในประเทศญี่ปุ่นและอินโดนีเซียพบไอโซเลท A-B+ ส่วนในประเทศไต้หวันพบไอโซเลท A+B+ เพิ่มขึ้น²⁹ ในประเทศสิงคโปร์มีรายงานการพบไอโซเลท binary toxin เป็นสาเหตุก่อโรคในโรงพยาบาล sporadic hospital acquired disease^{30,31} การศึกษาของ Lyras และคณะ³² พบว่าสารพิษชนิด B เป็นปัจจัยที่สำคัญเป็นพิเศษในด้านความรุนแรงของการก่อโรค ส่วนการศึกษาจากหลายหน่วยงาน^{31,33,34} พบว่าอาการทางคลินิกของไอโซเลท A-B+ มีความหลากหลายคือไม่มีอาการจนถึงเป็นอันตรายถึงชีวิต และ Komatsu และคณะ⁹ พบว่าอาการทางคลินิกระหว่างไอโซเลท A-B+ และ A+B+

ไม่มีความแตกต่างกัน Samie และคณะ²⁵ พบว่าไอโซเลทที่เป็น binary toxin มีความรุนแรงมากกว่าไอโซเลทอื่น และดื้อต่อยาในกลุ่ม fluoroquinolone การเปิดประเทศเนื่องจากนโยบาย AEC อาจทำให้เกิดการเข้าและออกของประชาชนซึ่งมีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงของไอโซเลทได้ ดังนั้น จึงควรเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงไอโซเลทของเชื้อ *C. difficile* เพื่อเป็นข้อมูลทางระบาดวิทยาและการรักษา

การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่โดยยาปฏิชีวนะเป็นจุดเริ่มต้นของการติดเชื้อ *C. difficile* ปกติร่างกายมีกลไกป้องกันของเนื้อเยื่อบุลำไส้ (colonization resistance) การใช้ยาปฏิชีวนะทำให้กลไกนี้เสียไป เกิดการติดเชื้อ *C. difficile* ตามมาในที่สุด ผลการทดสอบครั้งนี้พบว่าทุกไอโซเลทให้ผลดื้อต่อยา clindamycin ($MIC 8->256 \mu\text{g/mL}$) เนื่องจากเชื้อ *C. difficile* มียีน erm B ทำให้ดื้อต่อยา clindamycin และยังสามารถเกิดจากกลไกการผลักยาออกนอกเซลล์ (efflux mechanism) หรือ การเปลี่ยนแปลงการทดแทนของนิวคลีโอไทด์ การศึกษาของ Collins และคณะ³⁵ พบว่า การดื้อต่อยา clindamycin และ moxifloxacin มีแนวโน้มสูงขึ้นทั้งในประเทศเกาหลี (60%, 42%) ไต้หวัน (73.3%, 30%) และสาธารณรัฐประชาชนจีน (66.7%, 45.3%) ในประเทศเบลเยียม มีการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *C. difficile* ที่แยกได้จากผู้ป่วยต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ พบว่า metronidazole ยังเป็นยาที่ใช้ในการรักษา (drug of choice for treatment) เหมือนกับประเทศไทย^{7,21} นอกจากนี้ การศึกษาของ Kim และคณะ³⁶ และการศึกษาของ Huang และคณะ³⁷ พบว่าร้อยละ 2.5-66 ของ *C. difficile* ไอโซเลทดื้อยาแตกต่างกันตามภูมิภาค Spigaglia และคณะ³⁸ ซึ่งอยู่ในกลุ่ม Europe an Study Group on Clostridium difficile (ESGCD) ศึกษาพบว่าร้อยละ 55 ดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 1 ยาและร้อยละ 48 ดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 3 ชนิด เช่น erythromycin, clindamycin และ moxifloxacin³⁸⁻⁴⁰ การรักษา CDI จึงควรได้รับการทดสอบความไวของเชื้อเพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อที่ดื้อยาและที่ต้องใช้ยาปฏิชีวนะเป็นเวลานาน^{37,41} สำหรับยาที่ไม่มีค่ามาตรฐานในการแปลผลสามารถนำข้อมูลไปใช้เป็นแนวทางในการดูแลการดื้อยานั้นๆ หากพบว่าเชื้อไม่มีอัตราการดื้อต่อยาเพิ่มขึ้นอาจแนะนำให้ใช้นั้นกับผู้ป่วยทดแทนยาที่เชื่อนั้นดื้อยาไปแล้ว หรือทดแทนยาที่มีผลข้างเคียงสูงได้

โดยสรุป การศึกษาครั้งนี้พบว่ายา metronidazole และ vancomycin เป็นยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษา CDI และต้องมีการเฝ้าระวังอย่างต่อเนื่องของเชื้อ *C. difficile* เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อยาในอนาคต

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนจาก Centre for Disease Control and Prevention (CDC), Thailand MOPH-US CDC Collaboration (TUC)

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. Anand A, Glatt AE. *Clostridium difficile* infection associated with antineoplastic chemotherapy: a review. Clin Infect Dis 1993; 17(1): 109-13.
3. Bartlett JG. *Clostridium difficile*: history of its role as an enteric pathogen and the current state of knowledge about the organism. Clin Infect Dis 1994; 18 Suppl 4: S265-72.
4. McAdam AJ, Sharpe AH. Infectious diseases. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC, editors. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 8th ed. Philadelphia: Elsevier; 2010. p. 367-444.
5. Wells CL, Wilkins TD. Clostridia: Spore forming Anaerobic Bacilli. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 18.
6. Lysterly DM, Lockwood DE, Richardson SH, Wilkins TD. Biological activities of toxins A and B of *Clostridium difficile*. Infect Immun 1982; 35: 1147-50.
7. Chia JH, Lai HC, Su LH, Kuo AJ, Wu TL. 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(10): e75471.
8. Pennisi E. [Online]. 2012. Available from: URL:<http://www.sciencemag.org/news/2012/10/using-gut-bacteria-fight-diarrhea>
9. Komatsu M, Kato H, Aihara M, Shimakawa K, Iwasaki M, Nagasaka Y, et al. High frequency of antibiotic-associated diarrhea due to toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* in a hospital in Japan and risk factors for infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003; 22: 525-9.
10. Iwashima Y, Nakamura A, Kato H, Wakimoto Y, Wakiyama N, Kaji C, et al. A retrospective study of the epidemiology of *Clostridium difficile* infection at a University Hospital in Japan: genotypic features of the isolates and clinical characteristics of the patients. J Infect Chemother 2010; 16: 329-33.
11. Chung Y, Chung GT, Seong WK, Oh HB: Molecular Analysis of *Clostridium difficile* Isolates by Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction and Polymerase Chain Reaction-Ribotyping. Korean J Infect Dis 2002; 34: 167-75.
12. Kim H, Riley TV, Kim M, Kim CK, Yong D, Lee K, et al. Increasing prevalence of toxin A-negative, toxin B-positive isolates of *Clostridium difficile* in Korea: impact on laboratory diagnosis. J Clin Microbiol 2008; 46: 1116-7.
13. Wongwanich S, Rugdeekha S, Pongpech P, Dhiraputra C. Detection of *Clostridium difficile* toxin A and B genes from stool samples of Thai diarrheal patients by polymerase chain reaction technique. J Med Assoc Thai 2003; 86(10): 970-5.

14. Thipmontree W, Kiratisin P, Manatsathi S, Tham-likitkul V. Epidemiology of suspected *Clostridium difficile*-associated hospital acquired diarrhea in hospitalized patients at Siriraj Hospital. J Med Assoc Thai 2011; 94 (1): 207-16.
15. Pupaibool J, Khantipong M, Suankrata C. A study of *Clostridium difficile*-associated disease at King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thailand. J Med Assoc Thai 2008; 91(1): 37-43.
16. Hu MY1, Katchar K, Kyne L, Maroo S, Tummala S, Dreisbach V, et al. Prospective derivation and validation of a clinical prediction rule for recurrent *Clostridium difficile* infection. Gastroenterology 2009; 136: 1206-14.
17. Kyne L1, Merry C, O'Connell B, Kelly A, Keane C, O'Neill D. Factors associated with prolonged symptoms and severe disease due to *Clostridium difficile*. Age Ageing 1999; 28: 107.
18. Laksamana N, Jearjesdakul J. Antibiotic associated diarrhea. The gastroenterological Association of Thailand. 2009; 17(83): 25-39. (in Thai)
19. Cecil JA. *Clostridium difficile*: Changing Epidemiology, Treatment and Infection Prevention Measures. Curr Infect Dis Rep 2012; 14: 612-9.
20. Supcharassaeng S, Suankratay C. Antibiotic prescription for adults with acute diarrhea at King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thailand. J Med Assoc Thai 2011; 94: 545-50.
21. Wongwanich S, Ramsiri S, Vanasin B, Khowsaphit P, Tantipatayangkul P, Phan-urai R. *Clostridium difficile* associated disease in Thailand. SE Asian J Trop Med 1990; 21(3): 367-72.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; approved standard. 8th ed. CLSI document M11-A8. Wayne, PA: CLSI, 2012.
23. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
24. 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: 5710-4.
25. 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.
26. Delmee M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. Clin Microbiol Infect 2001; 7: 411-6.
27. Putsathit P, Kiratisin P, Ngamwongsatit P, Riley TV. *Clostridium difficile* infection in Thailand. Int J Antimicrob Agents 2015; 45: 1-7.
28. 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
29. 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.
30. Lim PL, Ling ML, Lee HY, Koh TH, Tan AL, Kuijper EJ, et al. Isolation of the first three cases of *Clostridium difficile* polymerase chain reaction ribotype027 in Singapore. Singapore Med J 2011; 52(5): 361-4.

31. Iwashima Y, Nakamura A, Kato H, Wakimoto Y, Wakiyama N, Kaji C, et al. A retrospective study of the epidemiology of *Clostridium difficile* infection at a University Hospital in Japan: genotypic features of the isolates and clinical characteristics of the patients. J Infect Chemother 2010; 16: 329-33.
32. Lyras D, O'Connor JR, Howarth PM, Sambol SP, Carter GP, Phumoonna T, Poon R, Adams V, Vedantam G, Johnson S, et al: Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. Nature 2009, 458: 1176–9.
33. Alfa MJ, Kabani A, Lysterly D, Moncrief S, Neville LM, Al-Barrak A, et al. Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile* responsible for a nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. J Clin Microbiol 2000; 38: 2706-14.
34. Drudy D, Fanning S, Kyne L: Toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*. Int J Infect Dis 2007; 11: 5-10.
35. Collins DA, Hawkey PM, Riley TV Epidemiology of *Clostridium difficile* infection in Asia. Antimicrob Resist Infect Control. 2013; 2(1): 21.
36. Kim H, Jeong SH, Roh KH, Hong SG, Kim JW, Shin MG, et al. Investigation of toxin gene diversity, molecular epidemiology, and antimicrobial resistance of *Clostridium difficile* isolated from 12 hospitals in South Korea. Korean J Lab Med 2010; 30(5): 491-7.
37. Huang H, Fang H, Weintraub A, Nord CE. Distinct ribotypes and rates of antimicrobial drug resistance in *Clostridium difficile* from Shanghai and Stockholm. Clin Microbiol Infect 2009; 15(12): 1170-3.
38. Spigaglia P, Barbanti F, Mastrantonio P. Multidrug resistance in European *Clostridium difficile* clinical isolates. J Antimicrob Chemother 2011; 66(10): 2227-34.
39. 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.
40. Taori SK, Hall V, Poxton IR. Changes in antibiotic susceptibility and ribotypes in *Clostridium difficile* isolates from southern Scotland, 1979-2004. J Med Microbiol 2010; 59 (3): 338-44.
41. Lakhi N, Ahmad F, Woothipoom W. *Clostridium difficile* associated diarrhea and the relationship to antibiotic prescription practices and proton pump inhibitor use in elderly wards. Iran Red Crescent Me 2010; 12(1): 12-6.