Archive of SID

مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۵، دوره ۷۱، شماره ۴، ۴۲۹- ۴۲۳
Original Article
Journal of Veterinary Research. 71,4:423-429, 2016

مطالعه مولکولی کلستریدیوم دیفیسیل جداشده از گوشت گوساله توزیع شده در سطح عرضه شهراصفهان

زهرا اسفندیاری[۱،۲]* محمدجلالی[۳] حمیدعزت پناه[۴] اسکات ویز[۵] محمدچمنی[۶] پریسا شعاعی[۱] مجید یاران[۱] بهروز عطایی[۱]

۱) مرکزتحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲) واحد تحقیق و توسعه، معاونت غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳) مرکز تحقیقات امنیت غذایی، دانشکده تغذیه و علوم غذایی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴) گروه تخصصی علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۵) دانشکده پاتوبیولوژی و مرکز سلامت جامعه و بیماری‌های زئونوز، دانشکده دامپزشکی اونتاریو، دانشگاه Guelph، اونتاریو، کانادا
۶) گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۲۰ مرداد ماه ۱۳۹۵، پذیرش نهایی: ۵ مهر ماه ۱۳۹۵)

چکیده

زمینه مطالعه: در حال حاضر عفونت کلستریدیوم دیفیسیل در محیط‌های درمانی و جامعه یکی از بیماری‌های مورد بررسی در سطح جهانی است. دو ریبوتایپ مهم این باکتری باعناوین ۰۲۷ و ۰۷۸ از قدرت ویرولانس بالاتر به دلیل تولید زهرابه‌های بیشتر برخوردار می‌باشند و در اکثر مطالعات بیمارستانی و غذایی مرتبط با مواد خام دامی شناسایی شده اند. جهت دستیابی به ارتباط سویه کلستریدیوم دیفیسیل در نمونه‌های غذایی با ایزوله‌های محیط درمانی از تایپینگ مولکولی با روش PCR استفاده می‌شود. **هدف:** در این مطالعه ژن باینری توکسین ب (*cdtB*) و الگوی ریبوتایپ کلستریدیوم دیفیسیل توکسیژنیک جداشده در گوشت گوساله توزیع شده در سطح عرضه شهر اصفهان مورد ارزیابی قرار گرفت. **روش‌کار:** ژن *cdtB* در ۱۲ ایزوله کلستریدیوم دیفیسیل توکسیژنیک (دارای ژن‌های زهرابه A و B) شناسایی شده در نمونه‌های گوشت گوساله جمع آوری شده در سطح عرضه شهر اصفهان با روش مولکولی PCR مورد بررسی قرار گرفت. همچنین الگوی ریبوتایپ ایزوله‌های مثبت کلستریدیوم دیفیسیل با روش PCR-Ribotyping تعیین گردید و مقایسه آن با دو الگوی ریبوتایپ ۰۲۷ و ۰۷۸ کلستریدیوم دیفیسیل انجام شد. **نتایج:** ژن *cdtB* در کلیه ایزوله‌های مثبت کلستریدیوم دیفیسیل در مطالعه حاضر مشاهده نشد. ده الگوی متفاوت ریبوتایپ کلستریدیوم دیفیسیل در ۱۲ ایزوله مثبت توکسیژنیک تشخیص داده شد. تشابهی ما بین الگوهای ریبوتایپ مطالعه حاضر با دو ریبوتایپ ۰۲۷ و ۰۷۸ وجود نداشت. **نتیجه‌گیری‌نهایی:** اگرچه در مطالعه حاضر دو ریبوتایپ ۰۲۷ و ۰۷۸ کلستریدیوم دیفیسیل شناسایی نشد اما جداسازی سویه‌های توکسیژنیک این باکتری با الگوی ریبوتایپ جدید در ایران، نشان دهنده خطرات احتمالی این باکتری در سلامت جامعه می‌تواند باشد. انجام پژوهش‌های بیشتر در سطح ملی در ارتباط با بررسی وضعیت این باکتری در منابع مختلف غذایی توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: کلستریدیوم دیفیسیل توکسیژنیک، ژن *cdtB*، تایپینگ، گوشت گوساله

مقدمه

کلستریدیوم دیفیسیل در ابتدا بعنوان عامل "عفونت بیمارستانی کلستریدیوم دیفیسیل" "*nosocomial Clostridium difficile* Infection (CDI) در افراد بستری در بیمارستان که جهت درمان از آنتی بیوتیک استفاده می‌کردند معرفی گردید. ایجاد عفونت در این باکتری از طریق ژن‌های مختلف که منجر به تولید زهرابه می‌شود مهیا می‌گردد. ژن‌های زهرابه A "toxin *clostridium difficile* A: tcdA" و B "toxin *clostridium difficile* B: tcdB" از مهمترین عوامل ایجاد عفونت کلستریدیوم دیفیسیل شناخته شده اند. سه ژن دیگر شامل ژن R "sigma factor: tcdR"، ژن C "anti-sigma factor: tcdC" و ژن E "tcdE" مسئول کنترل ترشح زهرابه‌های اصلی یعنی A و B می‌باشند. ژن R به عنوان تنظیم کننده مثبت "positive regulator" تولید زهرابه‌های A و B است. فعالیت ژن C یا تنظیم کننده منفی "negative regulator" منجر به توقف تولید زهرابه‌های اصلی کلستریدیوم دیفیسیل می‌شود. ژن E نیز ممکن است در ترشح زهرابه‌های A و B نقش داشته باشد. ژن‌های A و B با غیرفعال کردن و تغییر دادن اتصالات گوانوزین‌تری فسفات "triphosphate:GTP-'۵-guanosine" در بخش پروتئینی خانواده "رئو" منجر به بهم خوردن آرایش ساختمانی در سلول ناحیه گوارشی، مرگ و دفع آن می‌شوند (۱۱،۱۵). علاوه بر دو زهرابه اصلی این باکتری (زهرابه‌های A و B)، پروتئین دیگری با عنوان "باینری توکسین B "binary toxin *clostridium difficile*: *cdtB*" شناخته شد (۸). این زهرابه در سویه‌های با قدرت ویرولانس بالاتر مانند ریبوتایپ‌های ۰۲۷ و ۰۷۸ کلستریدیوم دیفیسیل جداسازی و منجر به دپلیمریزه کردن اکتین در بخش ساختاری سلول می‌شود و قابلیت چسبندگی باکتری و تجمع آن را افزایش می‌دهد (۲۶).

در سال‌های اخیر تغییراتی در اپیدمیولوژی "عفونت بیمارستانی کلستریدیوم دیفیسیل" گزارش گردید. به طوری که شیوع عفونت در محیط‌های خارج از سیستم درمانی رو به افزایش گذاشت (۲۹). موضوعی

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۳۱-۳۷۹۲۳۴۱۱ نمابر: ۰۳۱-۳۶۶۹۹۶۱۳ Email: research_esfandiary@mui.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

که در این بررسی‌ها به ویژه در مطالعات مولکولی اپیدمیولوژی اهمیت می‌یابد تعیین تیپ کلستریدیوم دیفیسیل می‌باشد که با روش PCR-Ribotyping قابل انجام است. این روش دارای مزایایی مانند تکرارپذیری، سرعت، قابلیت انجام آسان و ارایه نتایج دقیق در مدت زمان کوتاه است (۱).

با جداسازی دو ریبوتایپ جهش یافته و با قدرت ویرولانس بیشتر از کلستریدیوم دیفیسیل با عناوین ۰۲۷ و ۰۷۸ در گوشت نگرانی‌های جهانی در ارتباط با این محصول به عنوان عامل احتمالی انتقال باکتری به مصرف کنندگان افزایش یافت. در ریبوتایپ ۰۲۷ حذف به میزان ۱۸ جفت باز "base pair" منجر به جهش در ژن زهرابه C می‌گردد و افزایش تولید زهرابه‌های A و B در محیط آزمایشگاه یا خارج از محیط طبیعی "in vitro" اتفاق می‌افتد (۲۷). گزارشاتی از شیوع بیماری‌ها در سطح جهانی از کلستریدیوم دیفیسیل ریبوتایپ ۰۲۷ منتشر شده است (۱۹، ۱۷). در ریبوتایپ ۰۷۸ حذف ۳۹ جفت باز و جهش در زهرابه C وجود دارد. البته این ریبوتایپ در مقایسه با ۰۲۷، زهرابه A و B را در مقادیر کمتری تولید می‌کند (۱۲).

کلستریدیوم دیفیسیل دارای نسخه‌های گوناگون ژن RNA است. ژن‌ها در بین سویه‌های مختلف باکتری و حتی ما بین نسخه‌های مختلف یک ژنوم تفاوت دارند. در روش معرفی شده توسط Bidet و همکاران در سال ۲۰۰۰، از آغازگر اختصاصی نواحی ۱۶S و ۲۳S ژن rRNA جهت تعیین ریبوتایپ کلستریدیوم دیفیسیل استفاده می‌شود و تیپ باکتری بر اساس تفاوت در الگوهای حاصل از تکثیر منطقه "intergenic spacer: ITS" بین آغازگرهای اختصاصی فوق الذکر مشخص می‌گردد. تفاوت در یک باند از این الگوها، بیانگر ریبوتایپ جدید می‌باشد. با استفاده از این روش، بیش از ۲۰۰ ریبوتایپ متنوع از مناطق مختلف جغرافیایی شناسایی گردید (۸، ۱). اطلاعات اندکی در ارتباط با اپیدمیولوژی "عفونت کلستریدیوم دیفیسیل در جامعه" Clostridium difficile associated community infection: CA-CDI" مانند عوامل خطر و مسیرهای انتقال آلودگی باکتری وجود دارد (۱۶). در مطالعه انجام گرفته برروی بیماران مبتلا به اسهال بستری در بیمارستان الزهرا در شهر اصفهان میزان "عفونت کلستریدیوم دیفیسیل در جامعه" حدود ۲۴٪ گزارش گردید و فرضیه وجود کلستریدیوم دیفیسیل در گوشت و فراورده‌های گوشتی مطرح شد (۱۰). بدین ترتیب بررسی هایی در ارتباط با فراوانی این ارگانیزم در گوشت خام و فراورده گوشتی همبرگر در اصفهان آغاز گردید. برای مثال، کلستریدیوم دیفیسیل در ۷/۱ و ۲/۴٪ از همبرگر و گوشت گوساله نمونه برداری شده در کارخانجات فراورده گوشتی همبرگر و بسته بندی گوشت این استان شناسایی شد (۵،۶). در دیگر تحقیقات انجام شده نیز آلودگی گوشت، شیر خام و دیگر فراورده‌های غذایی به کلستریدیوم دیفیسیل گزارش گردید (۲۹، ۲۲، ۲۰، ۹). نظر به اینکه مصرف گوشت گوساله می‌تواند یکی از مسیرهای انتقال اسپور کلستریدیوم دیفیسیل به انسان محسوب گردد در این مطالعه در ابتدا وجود ژن *cdtB* در سویه‌های توکسیژنیک کلستریدیوم دیفیسیل در گوشت گوساله که در مطالعه قبلی انجام گرفته توسط این گروه تحقیقاتی جداسازی گردید بررسی شد (۴). سپس در این پژوهش، الگوی تایپینگ مولکولی سویه‌های شناسایی شده با روش RCR-Ribotyping تعیین و با دو الگوی ریبوتایپ ۰۲۷ و ۰۷۸ مقایسه گردید.

مواد و روش کار

این بررسی با هدف ارزیابی وجود ژن *cdtB* و الگوی ریبوتایپ ۱۲ ایزوله توکسیژنیک کلستریدیوم دیفیسیل (حاوی زهرابه‌های A و B) که در مطالعه قبلی ما در ۱۰۰ نمونه گوشت گوساله توزیع شده در فروشگاه‌های قصابی شهر اصفهان شناسایی شد صورت گرفت (۴). نمونه‌های گوشت خام گوساله در بازه زمانی فروردین تا شهریور ۱۳۹۲ از ۲۰ قصابی و از هر کدام پنج نمونه در چهار منطقه مختلف شهر اصفهان به صورت تصادفی جمع آوری گردید.

در ابتدا آزمایش مولکولی شناسایی ژن *cdtB* ایزوله‌های توکسیژنیک کلستریدیوم دیفیسیل با روش PCR انجام شد. به صورت خلاصه این مرحله با حجم نهایی ۵۰ µl و با ترکیبی از ۲/۵ µl از بافر PCR، ۲ µl از دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات ۱۰mM، یک واحد آنزیم تک DNA پلی مراز، ۵ µl DNA الگو و ۰/۱ µl پرایمرهای *cdtB* با توالی [۵'-CTTAATGCAAGTAAATACTGAG-۳'] و R [۵'-AACGGATCTCTTGCTTCAGTC-۳'] و آب دیونیزه استریل صورت پذیرفت. چرخه حرارتی به ترتیب واسرشتگی اولیه "initial denaturation" در دمای ۹۴°C به مدت یک دقیقه، واسرشتگی در ۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال "annealing" در ۵۲°C به مدت ۶۰ ثانیه و بسط "extension" در ۷۲°C به مدت ۸۰ ثانیه براساس روش Stubbs و همکاران در سال ۲۰۰۰ بود. محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵٪ با ولتاژ ۸۰ به مدت ۱ ساعت الکتروفورز شد. ژل با محلول اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و با استفاده از دستگاه UV-doc باندهای جداشده مشاهده گردید (۲۶).

جهت آزمون PCR-ribotyping پرایمرهای اختصاصی ۱۶S با توالی ۵'-GTGCGGCTGGATCACCTCCT-۳' و ۲۳S با توالی ۵'-CCCTGCACCCTTAATAACTTGACC-۳' جهت تکثیر ژن‌های ریبوزومی استفاده گردید. برای انجام ریبوتایپینگ ابتدا بافر واکنش ۵X حاوی ۵۰۰µl از بافر ۱۰X PCR، ۲۰۰µl از dNTPs و ۳۰۰µl از آب دیونیزه تهیه شد. پس ازتهیه بافر آزمون PCR در هر واکنش با ۸۰µl از بافر ۵X، ۲ µl از کلرید منیزیم ۲۵mM، ۲/۵ واحد آنزیم تک DNA پلی مراز، ۴µl از هر پرایمر و ۵µl از DNA الگو انجام گرفت و بقیه آن تا حجم ۱۰۰µl با آب مقطر دیونیزه تکمیل گردید. برنامه PCR در ۳۰ سیکل شامل واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵ °C به مدت ۲ دقیقه، واسرشته سازی در دمای ۹۲ °C به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ °C به مدت ۱ دقیقه و گسترش در ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه و در پایان دمای ۷۲ °C به مدت ۵

www.SID.ir

Archive of SID

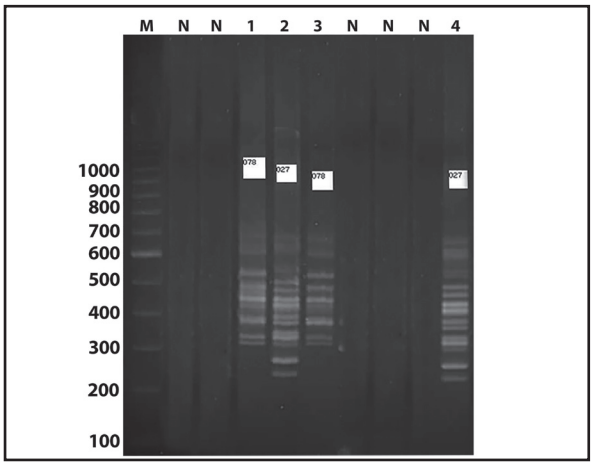
دقیقه صورت گرفت. جهت افزایش غلظت نهایی محصولات PCR بدست آمده به مدت یک و نیم ساعت در انکوباتور با دمای ۷۵ °C قرار می‌گرفتند. الگوی ریبوتایپ بوسیله الکتروفورز در ژل آگارز ۳٪ در ولتاژ ۸۰ به مدت ۶ ساعت و رنگ آمیزی بامحلولاتیدیوم بروماید بدست آمد (۱) و سپس با الگوهای ریبوتایپ ۰۲۷ و ۰۷۸ ثبت شده در آزمایشگاه مرجع دکتر ویز در دانشگاه Guelph کانادا مقایسه گردید (تصویر۱). جهت انجام آزمایشات مولکولی از سویه کلستریدیوم دیفیسیل ریبوتایپ ۰۲۷ و ۰۷۸ دریافتی از دانشگاه Guelph کانادا به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

نتایج

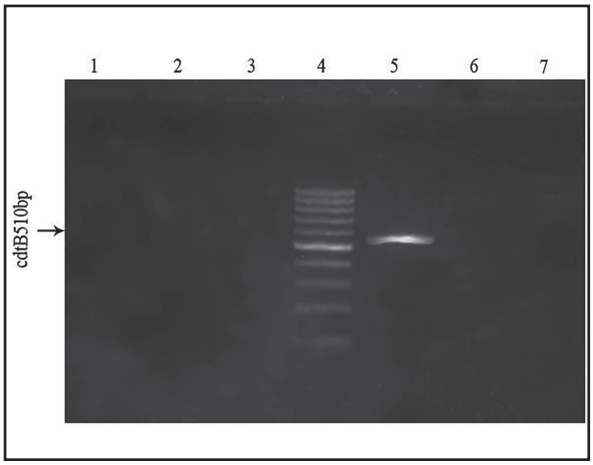
ژن *cdtB* در ۱۲ ایزوله مثبت کلستریدیوم دیفیسیل توکسیژنیک جداسازی نشد (تصویر ۲). تنوع ریبوتایپ در مطالعه حاضر مشاهده گردید و ده الگوی متفاوت ریبوتایپ در ایزوله‌های فوق الذکر شناسایی شد. تشابهی مابین الگوهای مذکور با دو الگوی ریبوتایپ ۰۲۷ و ۰۷۸ بدست نیامد. یک الگوی ریبوتایپ مشابه در ۳ ایزوله مثبت کلستریدیوم دیفیسیل حاصل شد. این الگو از سه نمونه گوشت چرخ کرده گوساله نمونه برداری شده ازسه فروشگاه مختلف قصابی در یک روز جداسازی گردید.

بحث

بررسی‌های اپیدمیولوژیک جهت تعیین وضعیت میکروبی پدیده‌های مختلف و بویژه نقش آن‌ها در انتقال عوامل بیماریزا به انسان اهمیت دارند. این مطالعات، منبع اطلاعاتی ارزشمندی را در ارتباط با مبارزه با بیماری‌های انسانی، یافتن منبع آلودگی، کنترل و پیشگیری آن مهیا می‌کنند. دو ریبوتایپ ۰۲۷ و ۰۷۸ از مهمترین تایپ‌های کلستریدیوم دیفیسیل به دلیل جداسازی در افراد مبتلا به عفونت در محیط‌های درمانی و خارج از آن در کشورهای پیشرفته دنیا می‌باشد. این دو ریبوتایپ قابلیت تولید زهرابه *cdtB* با قدرت ویرولانس بالاتر و تولید زهرابه‌های A و B بیشتر به دلیل توقف فعالیت ژن C هستند. به جهت اهمیت ریبوتایپ‌های فوق الذکر در مطالعات اپیدمیولوژیک، بررسی الگوی ریبوتایپ ایزوله‌های توکسیژنیک کلستریدیوم دیفیسیل شناسایی شده درگوشت گوساله عرضه شده در شهر اصفهان به دلیل نقش مهم این محصول در تغذیه انسان و مقایسه الگوی آن با ریبوتایپ‌های ۰۲۷ و ۰۷۸ صورت گرفت (۱۲،۱۴،۲۷). نتایج مشابهی در ارتباط با ژن *cdtB*، تنوع ریبوتایپ و عدم مشاهده الگوهای ریبوتایپ ۰۲۷ و ۰۷۸ در گوشت گوساله گزارش گردیده است. Rodriguez-Palacios و همکاران در سال ۲۰۰۷، دوازده ایزوله مثبت توکسیژنیک کلستریدیوم دیفیسیل را در ۶۰ نمونه گوشت چرخ کرده گاو و گوساله در کشور کانادا جداسازی و ۴ ریبوتایپ مختلف با عناوین M۳۱، ۰۱۴، ۰۷۷ و M۲۶ مشاهده نمودند. ریبوتایپ M۳۱ دارای ژن‌های زهرابه A، B و باینری توکسین بود. دو ریبوتایپ ۰۱۴ و ۰۷۷ نیز حاوی ژن زهرابه‌های



تصویر ۱. چاهک M مارکر ۱۰۰ جفت باز، چاهک‌های N کنترل منفی، چاهک ۱ و ۳ ریبوتایپ ۰۷۸ کلستریدیوم دیفیسیل، چاهک ۲ و ۴ ریبوتایپ ۰۲۷ کلستریدیوم دیفیسیل.



تصویر۲. چاهک شماره یک تا سه و شش محصول PCR نمونه‌های منفی، چاهک شماره چهار مارکر ۱۰۰ جفت باز، چاهک شماره ۵ نمونه شاهد ریبوتایپ ۰۲۷ کلستریدیوم دیفیسیل، چاهک شماره ۷ نمونه کنترل منفی.

A، B و فاقد *cdtB* و الگوی M۲۶ فاقد ژن‌های زهرابه A، B و باینری توکسین بود (۲۳). در مطالعه دیگری برروی ۲۱۴ نمونه چرخ کرده و تکه ای گوساله تنوع ژنتیکی در الگوی ریبوتایپ ۱۳ ایزوله توکسیژنیک کلستریدیوم دیفیسیل در کشور کانادا مشاهده شد. ریبوتایپ M۲۶ فاقد ژن‌های زهرابه A، B و باینری توکسین، ریبوتایپ‌های ۰۷۷، ۰۱۴، C و H دارای دو زهرابه A و B و فاقد باینری توکسین، ریبوتایپ F دارای زهرابه B و فاقد زهرابه‌های A و باینری توکسین و ریبوتایپ‌های J و K دارای هر سه زهرابه A، B و باینری توکسین بود (۲۴). در اتریش ۷۰ نمونه مخلوط گوشت گاو و خوک بررسی شد و دو الگوی ریبوتایپ AI-۵۷ و ۰۵۳ در سه ایزوله مثبت کلستریدیوم دیفیسیل گزارش شد (۱۳). پژوهشی که در فرانسه برروی ۱۰۵ نمونه گوشت چرخ کرده گاو به عمل آمد یک ریبوتایپ با عنوان ۰۱۲ از دو ایزوله مثبت توکسیژنیک دارای ژن‌های زهرابه آ و ب جداسازی گردید (۲). مشابه با مطالعات پیشین، الگوی ریبوتایپ ۰۲۹ در یک ایزوله مثبت کلستریدیوم دیفیسیل شناسایی شده در ۶۷ نمونه گوشت گاو در کاستاریکا

www.SID.ir

Archive of SID

گزارش گردید. ایزوله فوق الذکر حاوی ژن‌های زهرابه A، B و فاقد باینری توکسین بود (۱۸).

تشابه الگوی ریبوتایپ در سه نمونه گوشت چرخ کرده گوساله شناسایی شده در سه فروشگاه مختلف قصابی مطالعه حاضر، همخوانی با بررسی deBoer و همکاران در سال ۲۰۱۱ در کشور هلند دارد. این محققین جداسازی الگوی ریبوتایپ ۰۰۳ را در دو نمونه گوشت در یک روز در دو فروشگاه مورد بررسی در کشور هلند گزارش نمودند (۳). این وضعیت می‌تواند به دلیل مشترک بودن منبع آلودگی از کشتارگاه، هوا، وسایل نقلیه یا افراد شاغل در زنجیره انتقال از کشتارگاه به فروشگاه قصابی باشد.

در برخی از مطالعات انجام شده در دنیا جداسازی دو الگوی ریبوتایپ ۰۲۷ و ۰۷۸ گزارش شده است. Weese و همکاران در سال ۲۰۰۹ ریبوتایپ‌های ۰۲۷ و ۰۷۸ را به ترتیب در یک و دوازده ایزوله توکسیژنیک کلستریدیوم دیفیسیل شناسایی شده در گوشت چرخ کرده گاو گزارش نمودند. البته در این مطالعه ایزوله ای با الگوی ریبوتایپ C نیز جداسازی گردید (۲۸). همچنین Songer و همکاران در سال ۲۰۰۹ گزارشی از ۳ و ۱۰ الگوی ریبوتایپ ۰۲۷ و ۰۷۸ را در ۱۳ ایزوله مثبت توکسیژنیک کلستریدیوم دیفیسیل در ۲۶ نمونه گوشت چرخ کرده گوساله منتشر نمودند (۲۵). جداسازی ریبوتایپ ۰۷۸ در دو نمونه از ۱۲۱ نمونه گوشت گوساله در ایران گزارش گردید (۱۹).

با توجه به مطالعات مختلف صورت گرفته تنها در دو استان اصفهان و خوزستان در ارتباط با تعیین ریبوتایپ‌های کلستریدیوم دیفیسیل در مدفوع دام، گوشت خام و فراورده گوشتی همبرگر (۵،۷،۱۹)، از محدودیت‌های پژوهش حاضر، فقدان اطلاعات کافی از وضعیت مولکولی اپیدمیولوژی کلستریدیوم دیفیسیل در گوشت و مواد مختلف غذایی در مناطق دیگر ایران می‌باشد تا امکان مقایسه الگوهای ریبوتایپ تحقیق حاضر با الگوی ریبوتایپ دیگر استان‌های ایران جهت دستیابی به اطلاعات جامع اپیدمیولوژی فراهم گردد.

نتیجه گیری: بررسی حاضر در شهر اصفهان نشان دهنده عدم تشابه الگوی ریبوتایپ ایزوله‌های توکسیژنیک کلستریدیوم دیفیسیل در گوشت گوساله با ریبوتایپ‌های ۰۲۷ و ۰۷۸ می‌باشد اما با توجه به نقش احتمالی سویه‌های توکسیژنیک کلستریدیوم دیفیسیل برسلامت مصرف کنندگان پیشنهاد می‌شود مطالعات گسترده ای در خصوص تعیین الگوی ریبوتایپ این باکتری به صورت بومی در کشورمان ایران در منابع مختلف مانند مواد غذایی علاوه بر محیط‌های درمانی صورت گیرد تا بتوان ارتباط سویه‌های جدا شده در مواد غذایی و "عفونت کلستریدیوم دیفیسیل در جامعه" را تفسیر نمود.

تشکر و قدردانی

نگارندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از مدیریت و کارکنان مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان که در اجرای پژوهش حاضر، همکاری صمیمانه ای داشتند تقدیر و تشکر نمایند.

References

1. Bidet, P., Lalande, V., Salauze, B., Burghoffer, B., Avesani, V., Delmée, M., Rossier, A., Barbut, F., Petit, J.D. (2000) Comparison of PCR-ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol. 38: 2484-2487.
2. Bouttier, S., Barc, M.C., Felix, B., Lambert, S., Collignon, A., Barbut, F. (2010) *Clostridium difficile* in ground meat, France. Emerg Infect Dis.16:733-735.
3. de Boer, E., Zwartkruis-Nahuis, A., Heuvelink, A.E., Harmanus, C., Kuijper, E.J. (2011) Prevalence of *Clostridium difficile* in retailed meat in the Netherlands. Int J Food Microbiol. 144:561-564.
4. Esfandiari, Z., Jalali, M., Ezzatpanah, H., Weese, J.S., Chamani, M. (2014) Examination of *Clostridium difficile* contamination in beef meat distributed in Isfahan using culture and multiplex-PCR method. Biol J Microrganism. 11: 109-116.
5. Esfandiari, Z., Weese, J.S., Ezzatpanah, H., Jalali, M., Chamani, M. (2014) Occurrence of *Clostridium difficile* in seasoned hamburgers and seven processing plants in Iran. BMC Microbiol. 14: 283.
6. Esfandiari, Z., Jalali, M., Ezzatpanah, H., Weese, J.S., Chamani, M. (2014) Prevalence and Characterization of *Clostridium difficile* in beef and mutton meats of Isfahan region, Iran. Jundishapur J Microbiol. 7: e16771. DOI: 10.5812/jjm.16771.
7. Esfandiari, Z., Weese, J.S., Ezzatpanah, H., Chamani, M., Shoaei, P., Yaran, M., Ataei, B., Maracy, M.R., Ansariyan, A., Ebrahimi, F., Jalali, M. (2015) Isolation and characterization of *Clostridium difficile* in farm animals from slaughterhouse to retail stage in Isfahan, Iran. Foodborne Pathog Dis. 12: 10.
8. Esfandiari, Z., Jalali, M., Safaeian, L., Weese, J.S. A review on epidemiology of *Clostridium difficile* infection. Tehran Univ Med J. 74: 305-

www.SID.ir

Archive of SID

313.

9. Hasanzade, H., Rahimi, E. (2013) Isolation of *Clostridium difficile* from turkey and ostrich meat sold in meat stores of Isfahan city. Int J Advanced Biolog Biomed Res. 1: 963-967.
10. Jalali, M., Khorvash, F., Warriner, K., Weese, J.S. (2012) *Clostridium difficile* infection in an Iranian hospital. BMC Res Notes. 5: 1-5.
11. Jank, T., AktoriesK, K. (2008) Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model. Trends Microbiol. 16:222-229.
12. Jhung, M.A., Thompson, A.D., Killgore, G.E., Zukowski, W.E., Songer, G., Warny, M., Johnson, S., Gerding, D.N., McDonald, L.C., Limbago, B.M. (2008) Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. Emerg Infect Dis.14:1039-1045.
13. Jobstl, M., Heuberger, S., Indra, A., Nepf, R., Kofer, J., Wagner, M. (2010) Clostridium difficile in raw products of animal origin. Int J Food Microbiol. 138:172-175.
14. Keel, K., Brazier, J.S., Post, K.W., Weese, S., Songer, J.G. (2007) Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves and other species. J Clin Microbiol. 45. 1963-1964.
15. Kuehne, S.A., Cartman, S.T. (2011) Both, toxin A and toxin B are important in *Clostridium difficile* infection. Gut Microbes. 2: 252-255.
16. Kutty, P.K., Woods, C.W., Sena, A.C., Benoit, S.R., Naggie, S., Frederick, J., Evans, S., Engel, J., McDonald, L.C. (2010) Risk factors for and estimated incidence of community-associated *Clostridium difficile* infection, North Carolina, USA. Emerg Infect Dis.16:197-204.
17. Popoff, M.R., Rubin, E.J., Gill, D.M., Boquet, P. (1988) Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. Infect Immun. 56, 2299-2306.
18. Quesada-Gomez, C., Mulvey, M.R., Vargas, P., Gamboa-Coronado Mdel, M., Rodriguez, C., Rodriguez-Cavillini, E. (2013) Isolation of a toxigenic and clinical genotype of *clostridium difficile* in retail meats in Costa Rica. J Food Prot. 76:348-351.
19. Rahimi, E., Jalali, M., Weese, J.S. (2014) Prevalence of *Clostridium difficile* in raw beef, cow, sheep, goat, camel and buffalo meat in Iran. BMC Public Health. 14:119. 10.1186/1471-2458-14-119.
20. Rahimi, E., Momtaz, H., Hemmati, M. (2014) Occurrence of *Clostridium difficile* in raw bovine, ovine, caprine, camel and buffalo milk in Iran. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 20: 371-374.
21. Rahimi, E., Khaksar, F. (2015) Detection of toxigenic Clostidium difficile strains isolated from meat and meat products in Iran. Bulgarian J Vet Med. 18:277-281.
22. Rahimi, E., Sadat Afzali, Z., Torki Baghbadorani, Z. (2015) Clostridium diffiicle in ready-to-eat foods in Isfahan and Shahrekord, Iran. Asian Pac J Trop Biomed. 5: 128-131.
23. Rodriguez-Palacios, A., Staempfli, H.R., Duffield, T., Weese, J.S. (2007) *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. Emerg Infect Dis. 13:485-487.
24. Rodriguez-Palacios, A., Reid-Smith, R.J., Staempfli, H.R., Daignault, D., Janecko, N., Avery, B.P., Martin, H., Thomspon, A.D., McDonald, L.C., Limbago, B., Weese, J.S. (2009) Possible seasonality of *Clostridium difficile* in retail meat, Canada. Emerg Infect Dis. 15: 802-805.
25. Songer, J.G., Trinh, H.T., Killgore, G.E., Thompson, A.D., McDonald, L.C., Limbago, B.M. (2009) *Clostridium difficile* in retail meat products, USA, 2007. Emerg Infect Dis. 15:819-21.
26. Stubbs, S., Rupnik, M., Gibert, M., Brazier, J., Duerden, B., Popoff, M. (2000) Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. FEMS Microbiol Lett. 186:307 312.
27. Warny, M., Pepin, J., Fang, A., Killgore, G., Thompson, A., Brazier, J., Frost, E., McDonald, L.C. (2005) Toxin Production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. Lancet. 366:1079-1084.
28. Weese, J.S., Avery, B.P., Rousseau, J., Reid-Smith, R.J. (2009) Detection and enumeration

www.SID.ir

Archive of SID

of *Clostridium difficile* spores in retail beef and pork. Appl Environ Microbiol. 75:5009 5011.

29. Yamoudi, M., Mirlohi, M., Isfahani, B.N., Jalali, M., Esfandiari, Z., Hosseini, N.S. (2015) Isolation of toxigenic *Clostridium difficile* from ready-to-eat salads by multiplex polymerase chain reaction in Isfahan, Iran. Advanced Biomed Res. 4:87.

www.SID.ir

Archive of SID

Molecular study of *Clostridium difficile* isolated from beef in Isfahan, Iran

Esfandiari, Z.[1,2*], Jalali, M.[3], Ezzatpanah, H.[4], Scott Weese J.[5], Chamani, M.[6], Shoaei, P.[1], Yaran, M.[1], Ataei, B.[1]

[1]*Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran*

[2]*Department of Research and Development, Department of Food and Drug, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran*

[3]*Food Security Research Centre, School of Nutrition and Food Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran*

[4]Department of Food Science and Technology, College of Food Science and Technology, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

[5]Department of Pathobiology and Centre for Public Health and Zoonses, Ontario Veterinary College, University of Guelph, Guelph, Ontarion, Canada

[6]Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

(Received 10 August 2016, Accepted 26 September 2016)

Abstract:

BACKGROUND: *Clostridium difficile* (*C. difficile*) infection is one of the most important diseases in healthcare facilities and community. Ribotypes 027 and 078 are known as hyper-virulent strain of *C. difficile* in molecular study. PCR-ribotyping is a suitable method to interpret the relation of *C. difficile* isolated from food and hospital. **OBJECTIVES:** In the present study, the clostridim difficile binary toxin (cdtB) and ribotype pattern evaluated in toxigenic *C. difficle* isolated from beef. **METHODS:** Detection of cdtB in 12 toxigenic *C. difficile* (encoding tcdA and tcdB gene) isolated from 100 beef samples was determined through PCR. Afterwards, PCR-ribotyping was performed to examine the ribotype patterns of *C. difficile*. **RESULTS:** cdtB gene was not detected in any positive isolate. Ten different patterns were observed in 12 toxigenic isolates. No similarity existed in the ribotypes of our study with ribotypes 027 and 078. **CONCLUSIONS:** Albeit ribotyp 027 and 078 were not found in our study, the isolation of toxigenic *C. difficile* with new ribotypes in Iran may indicate the probable hazard of this bacterium in public health. Comprehensive research about *C. difficile* in different food sources is recommended on a national level.

Keyword: toxigenic *Clostridium difficile*, cdtB gene, ribotyping, beef

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. M: marker 100bp, N: negative control, 1 and 3: 078 ribotype of *Clostridium difficile*, 2 and 4: 027 ribotype of Clostridium difficile.

Figure 2. 1-3 and 6: negative samples, 4: marker 100bp, 5: 027 ribotype of *Clostridium difficile*, 7: negative control.

***Corresponding author's email: research_esfandiary@mui.ac.ir, Tel: 031-37923411, Fax: 031-36699613**

www.SID.ir

Surf and download all data from SID.ir: www.SID.ir

Translate via STRS.ir: www.STRS.ir

Follow our scientific posts via our Blog: www.sid.ir/blog

Use our educational service (Courses, Workshops, Videos and etc.) via Workshop: www.sid.ir/workshop