مقاله تحقیقی

استفاده از تکنیک qPCR به منظور شناسایی سویه‌های کدکننده توکسین *Clostridium difficile*

لیلا نوری[1]، مهدی ابراهیمی[2,*]، مهدی علیجانیان‌زاده[3]

۱. گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، پیشوا، ایران
۲. گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، پیشوا، ایران
۳. گروه علوم زیستی و بیوتکنولوژی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

***مسئول مکاتبات:** mahd_ebrahimi@yahoo.com

محل انجام تحقیق: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا

تاریخ دریافت:۹۷/۳/۱۳ تاریخ پذیرش:۹۷/۹/۴

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۲- شماره ۱-بهار ۱۳۹۷

چکیده

کلستریدیوم دیفیسیل (*Clostridium difficile*)، باکتری گرم مثبت، بی‌هوازی و اسپوردار بوده که به عنوان فاکتور شایع اسهال بیمارستانی شناخته شده و عامل گاستروآنتریت وکولیت با غشاءکاذب است. هنگامی که میکروفلور طبیعی روده، توسط فاکتورهای خطر، مانند درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها، شیمی‌درمانی و غیره آشفته می‌شود، کلستریدیوم دیفیسیل فرصت تکثیر یافته و باعث بیماری می‌شود. عوامل اصلی بیماری‌زایی این باکتری، دو توکسین B وA هستند،که توسط ژن‌هایTcdA و TcdB کد می‌شوند. تظاهرات بالینی عفونت کلستریدیوم دیفیسیل دامنه ای از کلنی سازی بدون علامت، اسهال شدید، کولیت غشایی، مگاکولون سمی و مرگ است. هدف از این تحقیق جداسازی باکتری های کلستریدیوم دیفیسیل از نمونه های مدفوع و توسعه روش qPCR به منظور شناسایی عفونت کلستریدیوم‌دیفیسیل از طریق طراحی پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های TcdA و TcdB می‌باشد. در این مطالعه ابتدا ۱۰۰ نمونه بالینی طی ۶ ماه از بیماران تحت درمان در مرکز پزشکی و درمانی آیت الله طالقانی جمع آوری شد. همچنین یک سویه استاندارد از بانک میکروبی انستیتو پاستور تهیه شد. با بررسی دقیق نواحی حفاظت‌شده در توالی ژن‌های TcdA و TcdB، دو جفت پرایمر برای تکثیر اختصاصی نواحی مورد نظر طراحی‌شد. سپس بهینه‌سازی روش qPCR با استفاده از این پرایمرها انجام‌شد. حساسیت روش با استفاده از غلظت‌های مختلف DNA باکتری مورد ارزیابی قرارگرفت. علاوه براین، به منظور بررسی اختصاصیت روش از DNA باکتری‌های مولد اسهال (اشرشیاکلی، شیگلا دیسانتری، سالمونلا تیفی و یرسینا انتروگلیتیکا) استفاده شد. در نهایت عملکرد روش بهینه‌سازی‌شده با تعداد ۱۰۰ نمونه بالینی مورد ارزیابی قرارگرفت. حساسیت روش به میزان ۱۰۰pgاز DNA و اختصاصیت روش بهینه‌سازی شده ۱۰۰٪ تعیین شد. در نمونه‌های بالینی مورد مطالعه با روش بهینه‌سازی شده ۹ مورد مثبت شناسایی شد. با توجه به نتایج بدست آمده استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های TcdA و TcdB می‌تواند به عنوان رویکرد مناسبی برای شناسایی سریع و دقیق عفونت *C. difficile* در تکنیک qPCR مورد استفاده قرارگیرد.

واژه های کلیدی: کلستریدیوم دیفیسیل، qPCR، توکسینtcdA، توکسین tcdB

مقدمه

کلستریدیوم دیفیسیل، باسیل گرم مثبت، بی‌هوازی و اسپوردار و تولیدکننده توکسین است. این باکتری اولین باردرسال ۱۹۳۵ کشف شد اما ارتباط آن با اسهال ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک تا اواخر دهه ۱۹۷۰ مشخص نشد (۱). بیماری‌زایی کلستریدیوم دیفیسیل با کلونیزاسیون باکتری در روده شروع می‌شود. برهم خوردن تعادل فلورمیکروبی روده در اثر مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و یا بستری‌شدن در بیمارستان شرایط را برای کلونیزه شدن و تکثیر کلستریدیوم دیفیسیل درروده فراهم می‌کند (۲). درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها بخصوص آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف، شیمی‌درمانی، سن و غیره از جمله عوامل مهمی می‌باشند که روده را مستعد عفونت‌های شدید توسط این باکتری می‌کنند (۲).

کلستریدیوم دیفیسیل دو توکسین مهم به نام‌های A وB تولید می‌کند. این توکسین‌ها نقش اصلی در بیماری‌زایی باکتری دارند. توکسین A متشکل از ۲۷۱۰ آمینواسید (۳۰۸kDa) و توکسین B متشکل از ۲۳۶۶ آمینواسید (۲۷۰kDa) است. ژن توکسین A (TcdA) و ژن توکسینB (TcdB) در فاصله نزدیک به هم و در ناحیه‌ای به نام لوکوس بیماری‌زایی (PaLoc) قرار دارند. سویه های غیرتوکسین‌زا فاقد این ژن‌ها هستند (۳).

ثابت شده است که شیمی‌درمانی در افراد سرطانی نیز شرایط روده را برای تکثیر و کلنی‌سازی توسط کلستریدیوم دیفیسیل آماده می‌سازد (۴). داروهای آنتی‌نئوپلاستیک مورد استفاده در شیمی‌درمانی، به عنوان عوامل مستقل ایجاد کننده عفونت‌های کلستریدیوم دیفیسیل تشخیص داده نشده‌اند، اما بررسی‌ها نشان می‌دهند که مراحلی از شیمی‌درمانی که مستلزم درمان با آنتی‌بیوتیک است، می‌تواند بیماری‌های ناشی از این باکتری را تسریع کند (۵).

از آنجایی که نشانه‌های بالینی عفونت کلستریدیوم‌دیفیسیل می‌تواند مشابه با اسهال‌هایی باشد که توسط عوامل دیگری مانند: تغییر در رژیم‌غذایی، درمان با آنتی‌بیوتیک و یا عفونت با دیگر پاتوژن‌ها مثل: سالمونلا ایجاد می‌شود، تشخیص دقیق و سریع وجود عفونت کلستریدیوم دیفیسیل به منظور درمان به موقع بیماران و کنترل مناسب عفونت های بیمارستانی ضروری محسوب می‌شود (۶). روش‌های رایج تشخیص پاتوژن‌های باکتریایی در آزمایشگاه‌های تشخیصی، براساس روش های مبتنی بر کشت، آزمون‌های بیوشیمیایی و ایمونولوژیکی است که اغلب این روش ها وقت‌گیر بوده و از طرفی در مواردی فاقد دقت لازم در شناسایی عامل بیماریزا می‌باشند. در مقابل روش‌های مولکولی از جمله qPCR (quantitative polymerase chain reaction) دارای حساسیت و دقت بالا در تشخیص پاتوژن‌های میکروبی می‌باشند (۷). همچنین، با توجه به اثرات شیمی‌درمانی در تضعیف سیستم ایمنی بیماران مبتلا به سرطان داشته و آنها را نسبت به انواع عفونت‌ها از جمله عفونت‌های کلستریدیومی حساس می‌سازد، این بیماران می‌توانند منبع بالقوه‌ای از این سویه‌ها باشند. به این ترتیب به نظر می‌رسد وجود یک روش تشخیصی سریع به منظور شناسایی و تشخیص این باکتری در بیماران حساس، به منظور پیشگیری از ظهور علائم بیماری ضروری می‌باشد (۸).

در این مطالعه روش qPCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای شناسایی ژن توکسین A (TcdA) و ژن توکسین B (TcdB) توسعه‌یافته و همچنین میزان اختصاصیت و ویژگی روش مورد ارزیابی قرارگرفته است. علاوه براین، به منظور بررسی عملکرد روش توسعه یافته در مواجهه با نمونه‌های بالینی از تعداد ۱۰۰ نمونه بالینی که وجود عفونت به کلستریدیوم دیفیسیل توسط پزشک معالج تشخیص داده شده استفاده شد.

مواد و روش‌ها

سویه های استاندارد و نمونه های بالینی

تمامی سویه‌های استاندارد مورد مطالعه در این تحقیق از بانک میکروب انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. *Difficil*; ATCC 9689, *Escherichia coli;* ATCC:25922 *Yersinia Entrocolitica*; *A*TCC 23715, *Shigella dysenteriae*; ATCC 11835, *Salmonella typhi*; ATCC 19430). علاوه براین، تعداد ۱۰۰ نمونه‌ی بالینی طی مدت ۶ ماه از بیماران بستری‌شده دارای علائم گوارشی (اسهال) در مرکز پزشکی آموزشی و درمانی آیت الله طالقانی که وجود عفونت کلستریدیوم دیفیسیل توسط پزشک معالج قطعی تشخیص داده شده جمع‌آوری گردید. نمونه‌های بالینی توسط پزشک به وسیله سواپ استریل از ناحیه رکتوم بیماران جمع‌آوری گردید و به فالکن محتوی محیط کشت انتقالی منتقل شد. پس از انتقال نمونه به آزمایشگاه، یک میلی‌لیتر از نمونه‌ها با رعایت شرایط

استریل به میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شده و مراحل استخراج DNA از آن صورت گرفت.

استخراج DNA و تکثیر قطعات مربوط به ژن‌های TcdA و TcdB

DNA تام از تمامی نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی (Bioneer، کره جنوبی) استخراج‌شده و کیفیت آن با استفاده از الکتروفورز مورد بررسی قرارگرفت. پس از تائید کیفیت DNA خالص‌سازی شده، از آنها برای تکثیر قطعات مورد نظر با استفاده از تکنیک PCR استفاده شد. پرایمر مورد نیاز برای انج PCR با بررسی توالی ژن‌های TcdA و TcdB با استفاده نرم‌افزار primer3 طراحی‌شد. توالی ژن‌های TcdA TcdB از سایت NCBI دریافت‌شد. به این ترتیب مجمو دو جفت پرایمر برای تکثیر قطعات مورد نظر از ژن‌ها TcdA و TcdB طراحی شد (**rror! Unknown switch argument.**). مراحل PCR با تغییر در پارامترهای مو بهینه‌سازی‌شده و شرایط بهینه‌شده مطابق با **rror! Unknown switch argument.** و جدول ۳ در مراح بعد مورد استفاده قرارگرفت.

جدول ۱ - توالی پرایمرهای طراحی شده جهت تکثیر قطعات مورد نظر از ژن‌های TcdA و TcdB.

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول پرایمر	طول آمپلیکون
TcdA F	GGCTATAGTTGAATCTTCTACC	۲۲	۱۶۸
TcdA R	ATTATCAAATTGAGGATTTTG	۲۱	
TcdB F	CTTTGAAGAATTTAAAGGTGGAG	۲۳	۱۶۸
TcdB R	AATAGGTCTGGTTGTATTCCTG	۲۲	

جدول ۲ - ترکیبات و مقادیر مورد نیاز جهت انجام PCR.

	کنترل مثبت (میکرولیتر)	کنترل منفی (میکرولیتر)
DNA (50ng/µl)	۱	-
Primer Mix* (۱۰ pmol/µl)	۴	۴
PCR Master Mix (2X)	۱۲/۵	۱۲/۵
H_2O (ddW)	۷/۵	۸/۵
Total	۲۵	۲۵

* حاوی: آنزیم Taq DNA Polymerase (۰/۲ واحد بین‌المللی بر میکرولیتر)، $MgCl_2$ (۳ میلی‌مولار)، Tris – HCl pH= 8.5، $(NH_4)_2SO_4$ (۰/۲ درصد توئین ۲۰ و dNTP ها (۰/۴ میلی‌مولار).

جدول ۳ - برنامه دمایی و زمانی مورد استفاده در دستگاه PCR.

مراحل	دما (°C)	زمان	تعداد سیکل
۱-واسرشت اولیه(Initial Denaturation)	۹۵	۵ دقیقه	۱
۲-واسرشت (Denaturation)	۹۵	۱ دقیقه	
۳- اتصال پرایمرها(Annealing)	۵۷	۳۰ ثانیه	۳۵
۴-سنتز(Extension)	۷۲	۴۰ ثانیه	
۵- سنتز نهایی (Final Extension)	۷۲	۵ دقیقه	۱

بررسی عملکرد مارکر مولکولی در روش qPCR

پس از اطمینان از عملکرد پرایمرهای طراحی شده در تکثیر قطعات مورد نظر با استفاده از تکنیک PCR، روش qPCR با استفاده از ترکیبات اختصاصی برای تمامی نمونه‌های استاندارد و بالینی انجام‌شد (جدول ۴). علا براین، جهت تعیین حساسیت روش qPCR، DNA ژنوم بدست آمده از نمونه استاندارد کلستریدیوم دیفیسیل رقیق‌سازی شده و مورد ارزیابی قرارگرفت. برای تعیی

اختصاصیت روش qPCR، ازDNAژنومی باکتری‌های اشریشیا کلی، شیگلا دیسانتری، سالمونلا تیفی و یرسینیا انتروکلی‌تیکا استفاده شد.لازم به ذکراست نتایج بدست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS مورد آنالیز قرارگرفته شد.

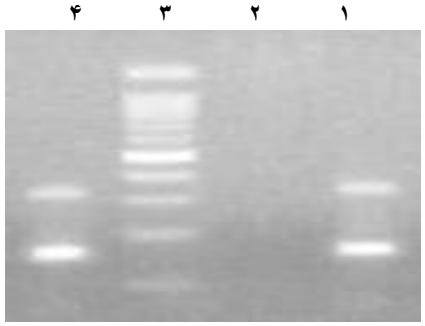
جدول ۴ - ترکیبات مورد استفاده در Real time PCR.

	نمونه بیمار (میکرولیتر)	کنترل منفی (میکرولیتر)
DNA (50ng/µl)	۱	-
Primer Mix (10 pmoles/µl)	۴	۴
DDW	۵	۶
Master Mix (2X)*	۱۰	۱۰
Total	۲۰	۲۰

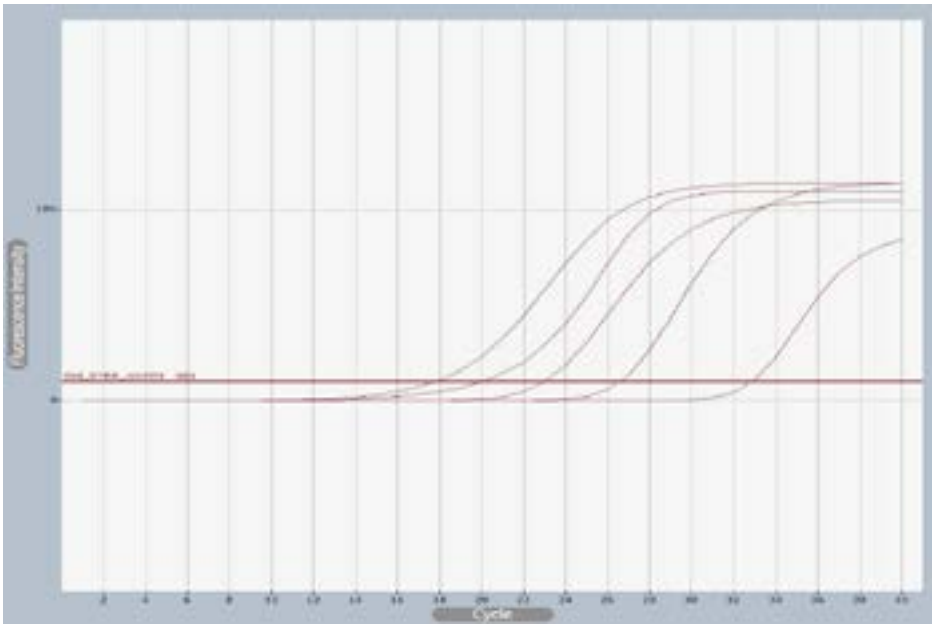
*حاوی: qPCR Polymerase، تثبیت‌کننده‌ها،dATP،dCTP،dGTP،dUTP،Reaction buffer دارای KCl، $(NH_4)_2SO_4$ و$MgCl_2$، رنگ فلورسنت SYBR Green.

نتایج

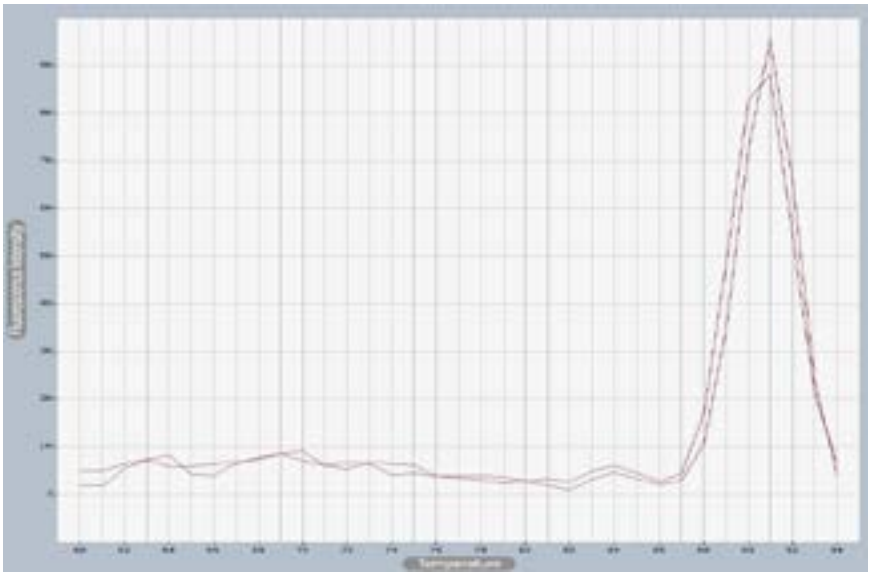
با توجه به نتایج بدست آمده از الکتروفورز محصولات PCR در ژل آگارز، مشخص است که پرایمرهای طراحی شده بخوبی می‌توانند با تکثیر همزمان نواحی مربوط به ژن‌های TcdA و TcdB بدون ایجاد باند اضافی بصورت اختصاصی عمل کنند (شکل ۱) بنابراین می‌توان از این پرایمرها به منظور شناسایی ژن‌های TcdA و TcdB در روش qPCR استفاده نمود. در روش qPCR مورد استفاده در این مطالعه از رنگ فلورسنت SYBR Green برای اندازه گیری مقدار محصول PCR تولید شده استفاده می-شود. این ترکیب قادر است تا با قرارگیری در بین دو رشته DNA نشر فلورسنس ایجاد نماید. بنابراین شدت فلورسنت ایجادشده با میزان DNA دو رشته‌ای موجود در محیط ارتباط مستقیم دارد. روش PCR به تنهایی حساسیت بسیار بالایی دارد و به همین دلیل به عنوان یکی از روش‌های شناسایی وجود پاتوژن‌ها مورد استفاده قرارمی‌گیرد. استفاده از این روش در کنار حساسیت ذاتی سیستم‌های تشخیصی مبتنی بر فلورسنت (روش qPCR) می‌تواند به میزان قابل توجهی حساسیت این تکنیک‌ها را افزایش دهد. بررسی حساسیت روش qPCR مورد استفاده برای تشخیص همزمان ژن‌های TcdA و TcdB نشان می-دهد، این سیستم می‌تواند تا ۱۰۰ پیکوگرم از DNA باکتری کلستریدیوم دیفیسیل دارای ژن‌های TcdA و TcdB را شناسایی کند. به این ترتیب امکان شناسایی سریع عفونت به کلستریدیوم دیفیسیل توسط این سیستم وجود خواهد داشت.



شکل ۱ - نتیجه واکنش PCR انجام شده بر روی DNA استخراج شده سویه استاندارد (چاهک‌های ۱ و ۴ نمونه کنترل مثبت، چاهک ۳ نمونه مارکر ۵۰ جفت بازی با فواصل ۵۰ جفت بازی،.چاهک ۲ کنترل منفی).



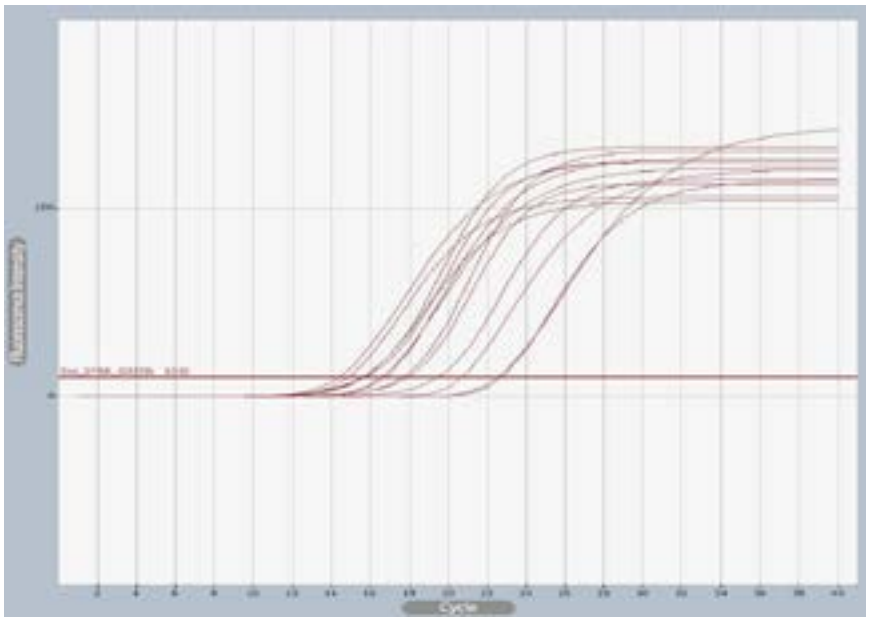
شکل ۲ - بررسی حساسیت روش qPCR در شناسایی DNA باکتری کلستریدیوم دیفیسیل. به ترتیب از چپ به راست مقادیر DNA رقیق شده و ct بدست آمده عبارت است از: ۱۰۰ نانوگرم (۲۲)، ۱۰ نانوگرم (۲۴)، ۱ نانوگرم (۲۹) و ۱۰۰ پیکوگرم (۳۱). برای انجام تست اختصاصیت، همراه با DNA ژنومی کلستریدیوم دیفیسیل از ژنوم ۴ سویه باکتری مولد اسهال استفاده شد که فقط نتیجه تست مربوط به کلستریدیوم دیفیسیل مثبت بدست آمد.



شکل ۳ - بررسی اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده برای شناسایی کلستریدیوم دیفیسیل.

در نهایت به منظور بررسی عملکرد روش مورد ارزیابی در مواجهه با نمونه‌های بالینی از تعداد ۱۰۰ نمونه بدست آمده از بیماران مبتلا به عفونت کلستریدیوم دیفیسیل استفاده شد. دربین این نمونه‌ها تنها تعداد ۹ نمونه از

لحاظ وجود ژن‌های TcdA و TcdB مثبت شناسایی شدند.



شکل ۴ - نمودار تکثیر نمونه های بالینی و کنترل مثبت (نمونه ها با سه بار تکرار انجام شده است).

بحث

عفونت ناشی از کلستریدیوم دیفیسیل می‌تواند به عنوان یک مشکل عمده در بعضی بیمارستان‌ها به ویژه در مراکزی که دارای بخش‌های شیمی‌درمانی بوده و بیمارانی که نیاز به بستری طولانی دارند، مطرح می باشد. فاکتورهای مستعد کننده در ابتلا به CDAD (*C. difficile*–associated disease) شامل سن بالا، بیماری-های زمینه‌ای، استفاده از آنتی بیوتیک‌ها و مدت طولانی بستری در بیمارستان می‌باشد (۹). هر چند در گذشته اعتقاد بر این بود که منشأ این ارگانیسم داخلی می‌باشد، اما شیوع اپیدمی‌های متعددی از CDAD در بیمارستان-های مختلف نشان می‌دهد که منشأ ارگانیسم، سایر بیماران، پرسنل بیمارستان و یا محیط بیمارستان می‌باشد و بنابراین عفونت باکتری کلستریدیوم دیفیسیل یک عفونت بیمارستانی است (۸).

بر اساس مطالعه‌ای که روی میزان شیوع اسهال‌های بیمارستانی در بیمارستانی در ترکیه انجام‌شد، عفونت به کلستریدیوم دیفیسیل به عنوان پنجمین عفونت بیمارستانی و منشاء ۷ درصد عفونت‌های بیمارستانی گزارش‌شد (۹). در همین بیمارستان کلستریدیوم دیفیسیل به عنوان عامل ۲۲/۲ درصد اسهال‌های بیمارستانی شناخته‌شد. در طی ۲۰ سال گذشته نقش کلستریدیوم دیفیسیل در ایجاد کولیت غشاءکاذب و کولیت وابسته به مصرف آنتی‌بیوتیک به وضوح ثابت شده است. این باکتری از نمونه اکثر مبتلایان به اسهال بیمارستانی جدا شده است، به طوریکه میزان جداسازی آن در بیماران مبتلا به کولیت غشاءکاذب ۹۵ تا ۱۰۰ درصد و در بیماران مبتلا به اسهال مرتبط با مصرف آنتی‌بیوتیک ۱۵ تا ۲۵ گزارش گردیده است (۱۰).

در سال ۱۹۹۶ در فرانسه ۳۹۲۱ نمونه مدفوع که جهت کشت روتین به ۱۱ آزمایشگاه بالینی این کشور فرستاده شده بودند جهت بررسی میزان شیوع کلستریدیوم دیفیسیل مورد بررسی قرار گرفتند که از این میان ۳/۳ درصد موارد واجد کلستریدیوم دیفیسیل توکسیژنیک بودند (۱۱).

در سال ۱۹۸۱، هالست و همکاران طی مطالعه‌ای که بر روی مدفوع ۲۱۸ بچه با سنین بین ۲ هفته تا ۱۵ سال انجام دادند موفق به جداسازی کلستریدیوم دیفیسیل از

۲۰ درصد این نمونه‌ها شدند (۱۲). همچنین اناد و همکاران در سال ۱۹۹۷ تعداد ۸۷ نمونه مدفوع نوزادان را مورد آزمایش قرار دادند و توانستند حضور کلستریدیوم دیفیسیل را در ۵۲ درصد نمونه های مدفوع تست شده اثبات نمایند (۱۳). از آنجایی که میزان کلونیزاسیون بدون علامت در بچه‌ها بالاست (۵۰ درصد) (۹)، لذا در دو مطالعه بالا که تمامی نمونه‌های مدفوع مورد آزمایش از بین بچه‌ها انتخاب شده اند، نتایج به دست آمده بالاتر از یافته‌های بدست آمده در مطالعه حاظر است.

نورخداصادقی فرد و همکاران طی سال‌های ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۶ مطالعه‌ای را بر روی ۹۲۴ بیمار مبتلا به اسهال بیمارستانی ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک انجام دادند و در نهایت موفق به جداسازی ۵۷ سویه توکسیژنیک که معادل ۶/۱ درصد کل نمونه‌ها بود شدند (۱۴). در مطالعه مشابهی که در سال ۲۰۱۱ توسط احسان ناظم‌الحسینی مجرد و همکاران انجام شد ایشان ۳۵۶ نمونه مدفوع را مورد آزمایش قرار دادند که از این میان موفق به جداسازی ۱۹ سویه توکسیژنیک که معادل ۵/۳ درصد کل نمونه‌ها بود شدند (۱۵).

کلایتون و همکارانش در سال ۲۰۰۹ در انگلیس مطالعه‌ای با روش‌های کشت میکروبی و الایزا جهت شناسایی توکسین کلستریدیوم‌دیفیسیل بر روی ۱۲۲ بیمار سرپایی دارای فرم غیر فعال التهاب روده داشتند. آنها ۱۳ بیمار (۱۰/۷ درصد) را شناسایی نمودند که با روش کشت میکروبی نتیجه مثبت داشتند و از بین این ایزوله ها ۱۰ ایزوله (۸/۲ درصد) توانایی تولید توکسین را داشتند. از بین این ۱۰ ایزوله، ۶ ایزوله (۹/۴ درصد) در بیماران کولیت زخمی (۶۴ نفر) و ۴ ایزوله (۶/۹ درصد) در بیماران کرون شناسایی شده بود (۱۶). در مطالعه ای که در سال ۱۹۹۸ در کشور ژاپن انجام گرفت، شیوع سویه-های A-B+ کلستریدیوم دیفیسیل در بزرگسالان بدون علامت، ۱۲ درصد گزارش شد (۱۷).

در زمینه روش به کار رفته در این مطالعه و مقایسه آن با سایر مطالعات باید اظهار داشت که روش جداسازی و تشخیص ژن کد کننده توکسین‌های کلستریدیوم دیفیسیل دهها سال است که در دنیا مورد مطالعه قرار گرفته است و بیشتر مطالعات با این محوریت در زمینه جدا سازی و تایپینگ سویه‌های جدا شده بوده است. مطالعات گسترده ای در گذشته در خصوص ابداع محیط-های اختصاصی جداکننده کلستریدیوم دیفیسیل انجام شده است که در حال حاضر در تمام دنیا شناخته شده بوده و به طور گسترده در مطالعات اپیدمیولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرد. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه بر اساس مطالعات بیوانفورماتیک برای ژن‌های مولد توکسین‌های A وB طراحی شد. اختصاصیت و همچنین حساسیت و دقت روش Real Time PCR در مقایسه با دیگر روش‌ها نشان داد که این روش می‌تواند به عنوان یک روش سریع و دقیق و همچنین به صورت روتین در آزمایشگاه‌های تشخیصی مورد استفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد مصوب و دفاع شده در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا استخراج شده است. لذا نویسندگان بر خود لازم می دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از مسئولین و اساتید دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین، هیئت داوران پایان نامه و تمامی دوستان، همکاران و عزیزانی که ما را در انجام و ارتقاء کیفی این پژوهش یاری دادند، اعلام نمایند.

منابع مورد استفاده :

1. Moreno MA, Furtner F, Rivara FP. Clostridium difficile: a cause of diarrhea in children. JAMA Pediatr. 2013;167(6):592.
2. Hookman P, Barkin JS. Clostridium difficile associated infection, diarrhea and colitis. World J Gastroenterol. 2009;15(13):1554-80.
3. Lyerly DM, Krivan HC, Wilkins TD. Clostridium difficile: its disease and toxins. Clinical microbiology reviews. 1988;1(1):1-18.
4. Brunetto A, Pearson A, Craft A, Pedler S. Clostridium difficile in an oncology unit. Archives of disease in childhood. 1988;63(8):979-81.
5. Tavafi H, Sarshar M, Owlia P, Shahrokhi N. A-B+ Toxigenic Clostridium difficile Strains in Children with Cancer. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2012;12(57):7-12.

6. Whang DH, Joo SY. Evaluation of the Diagnostic Performance of the Xpert Clostridium difficile Assay and Its Comparison With the Toxin A/B Enzyme-Linked Fluorescent Assay and In-House Real-Time PCR Assay Used for the Detection of Toxigenic C. difficile. Journal of clinical laboratory analysis. 2014;28(2):124-9.
7. Antikainen J, Pasanen T, Mero S, Tarkka E, Kirveskari J, Kotila S, et al. Detection of virulence genes of Clostridium difficile by multiplex PCR. Apmis. 2009;117(8):607-13.
8. Pépin J, Valiquette L, Alary M-E, Villemure P, Pelletier A, Forget K, et al. Clostridium difficile-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. Canadian Medical Association Journal. 2004;171(5):466-72.
9. Alfa MJ, Kabani A, Lyerly 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. Journal of clinical microbiology. 2000;38(7):2706-14.
10. McFarland LV, Surawicz CM, Stamm WE. Risk factors for Clostridium difficile carriage and C. difficile-associated diarrhea in a cohort of hospitalized patients. Journal of infectious diseases. 1990;162(3):678-84.
11. Barbut F, Corthier G, Charpak Y, Cerf M, Monteil H, Fosse T, et al. Prevalence and pathogenicity of Clostridium difficile in hospitalized patients: a French multicenter study. Archives of internal medicine. 1996;156(13):1449-54.
12. Holst E, Helin I, Mårdh P-A. Recovery of Clostridium difficile from children. Scandinavian journal of infectious diseases. 1981;13(1):41-5.
13. Enad D, Meislich D, Brodsky NL, Hurt H. Is Clostridium difficile a pathogen in the newborn intensive care unit? a prospective evaluation. Journal of perinatology: official journal of the California Perinatal Association. 1997;17(5):355-9.
14. Sadeghifard N, Salari MH, Ghassemi MR, Eshraghi S, Amin Harati F. The incidence of nosocomial toxigenic clostridium difficile associated diarrhea in Tehran tertiary medical centers. Acta Med Iran. 2010;48(5):320-5.
15. Nazemalhosseini-Mojarad E, Azimirad M, Razaghi M, Torabi P, Moosavi A, Alebouyeh M, et al. Frequency of Clostridium difficile among patients with gastrointestinal complaints. Gastroenterol Hepatol Bed Bench. 2011;4(4):210-3.
16. Clayton EM, Rea MC, Shanahan F, Quigley EM, Kiely B, Hill C, et al. The vexed relationship between Clostridium difficile and inflammatory bowel disease: an assessment of carriage in an outpatient setting among patients in remission. The American journal of gastroenterology. 2009;104(5):1162-9.
17. Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J-y, Doguchi H, et al. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. Science. 1998;282(5396):2095-8.