فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال سوم، شماره ۱۱، پاییز ۱۳۹۳، صفحه ۱۰۹- ۱۱۶
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۶/۰۴ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۲۴

بررسی آلودگی گوشت گوساله عرضه شده در سطح شهر اصفهان به *کلستریدیوم دیفیسیل* با روش کشت و واکنش زنجیره ای پلیمراز با تکنیک چندتایی

زهرا اسفندیاری [**]: دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران، research_esfandiary@mui.ac.ir
محمد جلالی: دانشیار میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، mjalali1343@gmail.com
حمید عزت پناه [*]: دانشیار علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران، hamidezzatpanah@srbiau.ac.ir
اسکات ویز: استاد پاتوبیولوژی، دانشکده پاتوبیولوژی، دانشگاه Guelph، اونتاریو، کانادا، jsweese@uoguelph.ca
محمد چمنی: دانشیار علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران، m.chamani@srbiau.ac.ir

چکیده

مقدمه: در سال‌های اخیر احتمال انتقال *کلستریدیوم دیفیسیل* با مصرف مواد غذایی به انسان با افزایش عفونت این باکتری در جامعه مطرح شد. در این میان پژوهش‌های گسترده‌تری از وضعیت *کلستریدیوم دیفیسیل* در گوشت قرمز کشورهای مختلف دنیا نسبت به مواد غذایی دیگر انجام شد. مطالعه حاضر با هدف بررسی شیوع *کلستریدیوم دیفیسیل* در گوشت گوساله انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: ۱۰۰ نمونه از گوشت گوساله عرضه شده در دو شکل تکه‌ای و چرخ کرده از قصابی‌های مناطق مختلف شهراصفهان برای انجام آزمایش‌ها جمع آوری شد. پس از انجام مراحل کشت و تایید پرگنه‌های مثبت *کلستریدیوم دیفیسیل* با آزمون‌های بیوشیمیایی، روش مولکولی PCR با تکنیک چندتایی جهت تشخیص سه ژن ایزومراز تری فسفات، زهرابه آ و زهرابه ب انجام گرفت. بررسی ارتباط بین شیوع *کلستریدیوم دیفیسیل* در دو شکل تکه‌ای و چرخ کرده گوشت گوساله در نرم افزار آماری SPSS (ویرایش ۱۶) با آزمون مربع کای در سطح معنی داری $Pvalue<0.05$ انجام گرفت.

نتایج: *کلستریدیوم دیفیسیل* در ۱۲ نمونه (۱۲ درصد) از گوشت‌های گوساله جداسازی شد. از بین ۱۲ نمونه، دو نمونه (۴ درصد) به گوشت تکه‌ای و ۱۰ نمونه (۲۰ درصد) به گوشت چرخ کرده مربوط بود. همه پرگنه‌های جداسازی شده از هر سه ژن مورد بررسی برخوردار بودند. تفاوت معنی‌داری در شیوع *کلستریدیوم دیفیسیل* در دو نوع از گوشت‌های مورد بررسی مشاهده شد (*Pvalue*=۰/۰۱).

بحث و نتیجه‌گیری: در این مطالعه، میزان جداسازی *کلستریدیوم دیفیسیل* در گوشت‌های چرخ کرده گوساله نسبت به شکل تکه‌ای افزایش داشت که می‌تواند به علت عدم رعایت اصول بهداشتی در شست و شو و تشکیل احتمالی بیوفیلم در دستگاه‌های چرخ گوشت باشد. همچنین، نتایج این مطالعه نشان داد که مصرف گوشت گوساله به‌عنوان یک مخزن احتمالی از *کلستریدیوم دیفیسیل* در انتقال این باکتری به انسان می‌تواند عمل کند.

واژه‌های کلیدی: *کلستریدیوم دیفیسیل*، گوشت گوساله، واکنش زنجیره ای پلیمراز با تکنیک چندتایی

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات
** دانشجوی دکترای تخصصی علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

مقدمه

کلستریدیوم دیفیسیل یک باسیل گرم مثبت، بی‌هوازی اجباری و تولید کننده اسپور با قابلیت تولید زهرابه است. این باکتری به علت جداسازی سخت در محیط‌های کشت آزمایشگاهی با این عنوان نام‌گذاری شد (۱). *کلستریدیوم دیفیسیل* برای نخستین بار در سال ۱۹۳۵ از مدفوع نوزادان سالم جداسازی شد (۲) و خاصیت بیماری‌زایی آن در دهه ۱۹۷۰ در بیماران بستری تحت درمان با مصرف آنتی‌بیوتیک در بیمارستان مشخص شد و در این گروه از بیماران به بروز عفونت *کلستریدیوم دیفیسیل*[1] منجر شد (۳). عفونت *کلستریدیوم دیفیسیل* با تبدیل شکل اسپور باکتری به رویشی و تولید زهرابه در سیستم گوارشی، به‌شکل بدون علامت تا اسهال شدیدآبکی در بیماران بروز می‌نماید (۴ و ۵). *کلستریدیوم دیفیسیل* تولید کننده دو اگزوتوکسین با عناوین زهرابه آ[2] (انتروتوکسین) و زهرابه ب[3] (سیتوتوکسین) است (۶). هر دو گروه از زهرابه‌ها، بر بخش رئو[4] در پروتئین از طریق واکنش مونوگلوکوزیلاسیون تاثیر می‌گذارند (۷ و ۸). این شرایط به نابودی اتصالات اکتین F در مجموعه اپی تلیال گوارشی و تخریب اتصالات بین سلولی در بدن انسان منجر می‌شود (۹). زهرابه ب قابلیت بیشتری در تخریب مخاط ناحیه کولون نسبت به زهرابه آ دارد. به همین علت سویه‌هایی از *کلستریدیوم دیفیسیل* که قادر به تولید زهرابه آ نیستند از نظر قدرت تهاجمی مشابه سویه‌هایی با قابلیت تولید هر دو زهرابه هستند (۱۰). البته سویه‌هایی از این میکروارگانیسم نیز زهرابه تولید نکرده و می‌توانند به‌عنوان فلور طبیعی سیستم گوارشی محسوب شوند و قابلیت ایجاد بیماری را ندارند (۱۱). با افزایش شیوع عفونت *کلستریدیوم دیفیسیل* در جامعه[5] و در محیط خارج از سیستم بهداشتی درمانی، احتمالاتی مبنی بر آن‌که این باکتری یک پاتوژن غذازاد باشد به وجود آمد. با جداسازی *کلستریدیوم دیفیسیل* از گوشت، برخی مواد غذایی و تشابه ژنتیکی بین سویه‌های جداشده با عامل عفونت *کلستریدیوم دیفیسیل* در بیمارستان این فرضیه قوت گرفت (۱۲). حتی در برخی از مطالعات، *کلستریدیوم دیفیسیل* را به‌عنوان یک عامل احتمالی مشترک بیماری‌زا در انسان و دام مطرح می‌کنند (۱۳ و ۱۴). در مطالعات نه چندان زیادی وجود *کلستریدیوم دیفیسیل* در مواد غذایی گوناگون در دنیا اثبات شده است اما تا به حال بررسی از شیوع این باکتری در گوشت قرمز در کشورمان انجام نگرفته است. این در حالی است که در بررسی انجام گرفته برروی نمونه‌های اسهال بیماران مبتلا به عفونت *کلستریدیوم دیفیسیل* بستری در بیمارستان الزهرا اصفهان، مصرف گوشت به‌عنوان یکی از منابع احتمالی انتقال عفونت عنوان شد (۱۵). به همین علت ضرورت انجام تحقیقاتی در راستای بررسی آلودگی *کلستریدیوم دیفیسیل* در گوشت به‌شکل منطقه‌ای اهمیت دارد. بنابراین، در این مطالعه، به ردیابی مولکولی *کلستریدیوم دیفیسیل* در گوشت‌های گوساله عرضه شده در قصابی‌های شهر اصفهان پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه توصیفی– تحلیلی بر اساس نمونه‌برداری به شکل تصادفی از قصابی‌های مناطق مختلف شهراصفهان با تعداد کلی ۱۰۰ نمونه گوشت گوساله در دو نوع تکه‌ای و چرخ کرده (هرکدام ۵۰ نمونه) انجام شد. همه نمونه‌ها در شرایط استریل به آزمایشگاه مرکز تحقیقات امنیت غذایی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان منتقل و در روز نمونه‌برداری آزمایش شدند. آزمایش‌های کشت با انتقال ۵ گرم از نمونه‌های مورد نظر به ۲۵ میلی‌لیتر محیط مایع انتخابی *کلستریدیوم دیفیسیل* موکسالاکتام نورفلوکسازین[6] (۴۰

گرم بر لیتر پروتئوز پپتون، ۵ گرم بر لیتر دی سدیم هیدروژن فسفات، ۱ گرم بر لیتر پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۰/۱ گرم بر لیتر سولفات منیزیم، ۲ گرم بر لیتر کلریدسدیم، ۶ گرم بر لیتر فروکتوز و یک گرم بر لیتر اسید سدیم تورکولیک غنی شده با ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سیستئین هیدروکلرید، ۱۲ میلی‌گرم بر لیتر نورفلوکسازین و ۳۲ میلی‌گرم بر لیتر موکسالاکتام) انجام شد.

نمونه‌ها با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گرادبه مدت ۷ روز انکوباسیون بی‌هوازی شد. انتقال دو میلی‌لیتر از مایع به دو میلی‌لیتر اتانول و نگهداری آن در دمای محیط به مدت ۶۰ دقیقه انجام گرفت. نمونه‌ها به مدت ده دقیقه تحت سانتریفوژ ۳۰۰۰ دور بر دقیقه قرار گرفتند. رسوب بخش پایینی لوله بر روی محیط CDMN آگار حاوی ۷ درصد خون گوسفند کشت و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی انکوبه شد. سپس، پرگنه‌های مشکوک به *کلستریدیوم دیفیسیل* بر روی محیط بلاد آگار کشت و انکوباسیون بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انجام گرفت. تشخیص بیوشیمیایی از طریق شکل، بوی مدفوع اسب، رنگ آمیزی گرم و اسپور و دیسک پرولین [۷] بر روی پرگنه‌های مثبت انجام شد (۱۶).

آماده‌سازی DNA برای انجام آزمایش‌های PCR با برداشتن پرگنه تازه و انتقال آن به یک میلی‌لیتر آب دیونیزه استریل و قراردهی نمونه‌ها به مدت سه دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. نمونه‌ها به مدت پانزده دقیقه در دور ۱۱۰۰۰سانتریفیوژ شد. سپس، حجم ۱۰ میکرولیتر از سوپرناتانت برای آزمایش‌های PCR به‌کارگرفته شد.

در این مطالعه، ژن ایزومراز تری فسفات[۸] برای تایید باکتری *کلستریدیوم دیفیسیل* و دو ژن زهرابه آ و زهرابه ب به علت اینکه عامل عفونت *کلستریدیوم دیفیسیل* هستند برای واکنش PCRبا تکنیک چندتایی[۹] بررسی شد.

همه مواد مورد استفاده برای واکنش PCR از شرکت سیناژن تامین شد. واکنش PCR با حجم ۲۵ میکرولیتر که شامل: ترکیبی از ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X PCR، ۳ میکرولیتر کلریدمنیزیم[۱۰] ۵۰ میلی‌مولار، ۲ میکرولیتر دی‌اکسی نوکلئوتید تری فسفات[۱۱] ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۵ واحد آنزیم تک DNA پلی مراز[۱۲]، ۱ میکرولیتر از هریک از آغازگرهای[۱۳] زهرابه آ و زهرابه ب، ۰/۵ میکرولیتر از آغازگر ایزومراز تری فسفات و ۵ میکرولیتر DNA الگو انجام شد. چرخه حرارتی مورد استفاده به ترتیب واسرشتگی[۱۴] در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه، اتصال[۱۵] در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۵ درجه سانتی‌گراد تا ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای ۱۱ سیکل و۲۴ سیکل باقیمانده در ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش[۱۶] در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در پایان، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر (T-cY، هلند) انجام شد. تشخیص ژن‌های ایزومراز تری فسفات، زهرابه آ و زهرابه ب با روش واکنش PCR با تکنیک چندتایی در آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان براساس روش لمی و همکاران[۱۷] انجام گرفت (۱۷).

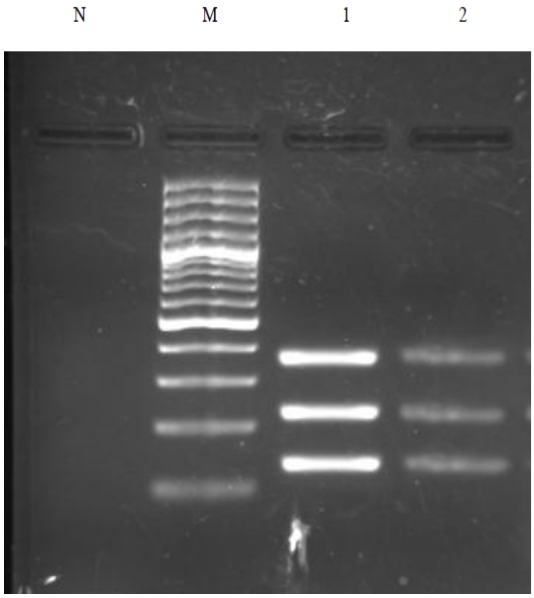
کیفیت DNA با استفاده از ژل آگاروز ۱/۵ درصد در تانک الکتروفورز افقی ارزیابی شد. شدت و وضوح باندها، تحت تاثیر اشعه فرابنفش و بااستفاده از دستگاه ترانسلومیناتور بررسی شد (۱۸). آغازگرهای مورد استفاده برای بررسی *کلستریدیوم دیفیسیل* از شرکت متابیون[۱۸] تهیه و در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- توالی آغازگرهای ژن‌های *tpi*، *tcdA* و *tcdB* برای تشخیص *کلستریدیوم دیفیسیل*

ژن هدف	سکانس آغازگر	اندازه محصول برحسب جفت بازی	منبع
tpi	F[5'- AAAGAAGCTACTAAGGGTACAAA-3'] R [5'-CATAATATTGGGTCTATTCCTAC-3']	۲۳۰	۳۸
tcdA	F [5'- AGATTCCTATATTTACATGACAATAT-3'] R [5'-GTATCAGGCATAAAGTAATATACTTT-3']	۳۶۹	۱۷
tcdB	F [5'-GGAAAAGAGAATGGTTTTATTAA-3'] R [5'-TCTTTAGTTATAACTTTGACATCTTT-3']	۱۶۰	۱۷

برای انجام آزمایش‌های مولکولی از سویه *کلستریدیوم دیفیسیل* ریبوتایپ ۰۲۷ دریافتی از دانشگاه گوالف [19] کانادا استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری برای بررسی ارتباط بین شیوع *کلستریدیوم دیفیسیل* در دو نوع تکه‌ای و چرخ کرده گوشت گوساله در نرم افزار آماری SPSS (ویرایش ۱۶) با استفاده از آزمون مربع کای در سطح معنی داری $Pvalue < 0.05$ انجام گرفت.



شکل ۱- نتایج M-PCR برای تشخیص *کلستریدیوم دیفیسیل* درنمونه‌های گوشت گوساله در ژل آگاروز ۱/۵ درصد. **N:** کنترل منفی، **M:** نشانگر ۱۰۰۰- ۱۰۰ جفت بازی، **۱:** کنترل مثبت *کلستریدیوم دیفیسیل* ریبوتایپ ۰۲۷ **۲:** نمونه مثبت *کلستریدیوم دیفیسیل*

نتایج

در مطالعه حاضر، ۱۲ نمونه (۱۲ درصد) گوشت گوساله آلوده به *کلستریدیوم دیفیسیل* شناسایی شد. دو (۴ درصد) و ده (۲۰ درصد) نمونه از گوشت‌های آلوده به ترتیب به گوشت تکه‌ای و گوشت چرخ کرده مربوط بود. پرگنه‌های مورد بررسی از ژن‌های ایزومراز تری فسفات، زهرابه آ و ب برخوردار بودند (شکل ۱).

براساس نتایج به دست آمده اختلاف آماری معنی‌داری بین شیوع آلودگی *کلستریدیوم دیفیسیل* در نمونه‌های چرخ کرده و تکه‌ای مشاهده شد ($Pvalue =$ ۰/۰۱).

بحث و نتیجه‌گیری

کلستریدیوم دیفیسیل باکتری‌ای است که به‌عنوان عامل عفونت در محیط بیمارستان شناخته شده است. علت افزایش بروز عفونت *کلستریدیوم دیفیسیل* با عوارضی حادتر و شدیدتر نسبت به قبل مبهم است. سویه‌های نو ظهوری از *کلستریدیوم دیفیسیل* مانند ریبوتایپ ۰۲۷ با قدرت تهاجمی بالاتر به‌علت تولید بیشتر زهرابه آ و ب نسبت به سویه‌های قبلی در عفونت‌های شدید بین المللی پدیدار شده اند. مطالعات مختلف حکایت از پراکندگی گسترده اسپور *کلستریدیوم دیفیسیل* در محیط دارد. یکی از نگرانی‌های اصلی در این ارتباط، مصرف مواد غذایی آلوده به اسپور است که ممکن است تهدیدی جدی

برای سلامت انسان باشد (۱۹-۲۱). در بررسی‌های نقاط مختلف دنیا شیوع *کلستریدیوم دیفیسیل* با مقادیر متفاوت گزارش شده است. در بررسی حاضر میزان شیوع *کلستریدیوم دیفیسیل* در گوشت تکه‌ای گوساله ۴ درصد است. در دو مطالعه در کشورهای اتریش و هلند عدم وجود *کلستریدیوم دیفیسیل* در ۲۶ و ۱۴۵ نمونه گوشت تکه ای گوساله گزارش شد (۱۴ و ۲۲). در مطالعه ایندرا و همکاران[۲۰] به عدم آلودگی با *کلستریدیوم دیفیسیل* در نمونه‌های گوشت خوک و مرغ اشاره شد (۱۴). در پژوهش انجام شده در کشور هلند، میزان آلودگی در گوشت بره و مرغ به ترتیب ۶/۳ و ۲/۷ درصد گزارش شد اما در همین مطالعه، دبوار و همکاران[۲۱] به عدم جداسازی *کلستریدیوم دیفیسیل* در گوشت خوک اشاره کردند (۲۲). در بررسی که به‌تازگی به‌عنوان نخستین گزارش از شیوع *کلستریدیوم دیفیسل* در آمریکای لاتین در کشور کاستاریکا ثبت شده است ۱/۴ درصد از گوشت گاو مورد آزمایش به *کلستریدیوم دیفیسیل* تولید کننده زهرابه آ و ب آلوده بودند. در مطالعه یاد شده میزان شیوع در گوشت خوک و مرغ، ۳ و ۱/۴ درصد گزارش شد (۲۳).شیوع در مطالعه حاضر به مراتب کمتر ازمطالعات بحث شده است.

مطالعات شیوع *کلستریدیوم دیفیسیل* در گوشت گوساله تکه‌ای در سطح عرضه به شکل جهانی کم است و بیشتر مطالعات، اختصاص به شیوع این میکروارگانیسم در گوشت‌های چرخ کرده دارد. برای مثال در بررسی‌های انجام شده در کشور کانادا میزان شیوع *کلستریدیوم دیفیسیل* در گوشت گوساله چرخ کرده ۶/۷ و ۱۲ درصد گزارش شد (۲۴ و ۲۵). در مطالعه‌ای دیگر در سوئیس، تنها ۲/۰۴ درصد از نمونه‌های گوشت چرخ کرده گوساله آلوده به *کلستریدیوم دیفیسیل* بودند (۲۶). همچنین، میزان شیوع باکتری در کشور فرانسه ۱/۹ درصد گزارش شد (۲۷). دو مطالعه در آمریکا و دو مطالعه در اتریش و یک مطالعه در کشور سوئیس به نبود *کلستریدیوم دیفیسیل* در گوشت چرخ کرده گوساله اشاره کردند که به مراتب از نتایج بررسی حاضر کمتر است (۱۴ و ۲۸- ۳۱). همچنین، در مطالعه‌ای در کشور آمریکا میزان شیوع تا ۵۰ درصد گزارش شده است (۳۲). مطالعه حاضر همسو با نتایج بررسی رودریگواز و همکاران[۲۲] در کانادا با میزان شیوع ۲۰/۸ درصد در گوشت گوساله چرخ کرده است (۳۳). یکی از نتایج مطالعه حاضر براساس مقایسه شیوع در دو نوع از گوشت، میزان جداسازی بالاتر *کلستریدیوم دیفیسیل* در گوشت چرخ کرده نسبت به تکه‌ای است که ممکن است مربوط به انتقال آلودگی باکتری از طریق دستگاه چرخ گوشت به محصول باشد که در مطالعه کاری و همکاران[۲۳]و همچنین، هوسر و همکاران[۲۴] به آن اشاره شده است (۱۳ و ۳۴). با رعایت اصول بهداشتی در شست و شو دستگاه‌ها و استفاده از ترکیبات ضدعفونی‌کننده مناسب در راستای حذف بیوفیلم‌های احتمالی تشکیل شده (در دستگاه چرخ گوشت) می‌توان شیوع باکتری را کاهش داد (۳۵). در مطالعات مختلف انجام شده در دنیا، مقادیر مختلفی از شیوع *کلستریدیوم دیفیسیل* در گوشت قرمز یاد شده است که باید دقت لازم در ارتباط با تفسیر نتایج آن مبذول شود. از جمله دلایل آن، تفاوت در تعداد نمونه ها، شرایط جغرافیایی، منطقه ای و روش های مختلف تشخیص باکتری *کلستریدیوم دیفیسیل* است

بررسی حاضر نخستین گزارش از وضعیت آلودگی گوشت گوساله به *کلستریدیوم دیفیسیل* در سطح عرضه

در شهر اصفهان است و گویای آن است که این محصول می‌تواند به‌عنوان حامل احتمالی انتقال *کلستریدیوم دیفیسیل* به انسان باشد البته پخت مناسب محصول می‌تواند نقش موثری در کاهش این میکروارگانیسم داشته باشد اما باید توجه داشت که پخت قادر به حذف کامل اسپور نیست (۳۶ و ۳۷). بنابراین، رعایت اصول بهداشتی، کنترل و نظارت دقیق و مستمر به‌عنوان راه حل مناسب برای کاهش باکتری را باید مد نظر قرار داد. با توجه به مخاطرات احتمالی ناشی آلودگی محصولات غذایی به اسپور باکتری نیاز به انجام مطالعات جامع‌تر در نقاط مختلف کشور روی محصولات مختلف غذایی برای تعیین وضعیت این باکتری در کشورمان است. بررسی الگوی ریبوتایپینگ سویه‌های *کلستریدیوم دیفیسیل* مطالعه حاضر در پژوهش‌های آینده می‌تواند پاسخگوی سوال های مرتبط با مطالعات اپیدمیولوژیک باشد.

تشکر و قدردانی

از همکاری همه کارکنان محترم مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به‌ویژه سرکار خانم پریسا شعاعی تشکر و قدردانی می‌شود. نتایج مطالعه حاضر حاصل از پایان نامه دکتری تخصصی علوم و صنایع غذایی مصوب در دانشکده علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی است.

References

(1) Borriello SP, Aktories K. *Clostridium pertringens, Clostridium difficile*, and other *Clostridium* species. In: Borriell SP, Murray PR, Funke G, editor. *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections*. 10th ed. London: ASM press; 2005. P 1098-1136.

(2) Hall I, O'Toole E. Intestinal microflora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *The AmericanJournal of Diseases of Children* 1935; 49 (2): 390-402.

(3) Bartlett JG, Chang TW, Onderdonk AB. Antibiotic- associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing *clostridia*. *New England Journal of Medicine* 1978; 298 (10): 531–4.

(4) Gould LH, Limbago B. *Clostridium difficile* in food and domestic animals: a new foodborne pathogen? *Clinical InfectiousDiseases* 2010; 51 (5): 577-82.

(5) Poutanen S, Simor A. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. *Candadian Medical Associatin Journal* 2004; 171 (1): 51-8.

(6) Hookman P, Barkin JS. Reviwe: *Clostridium difficile*-associated disorders/diarrhea and *Clostridium difficile* colitis: the emergence of a more virulent era. *Digestive Diseases and Sciences* 2007; 52: 1071-5.

(7) Just I, Selzer J, Wilm M, von Eichel-Streiber C, Mann M, Aktories K. Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* 1995a; 375: 500-503.

(8) Just I, Wilm M, Selzer J, Rex G, von Eichel-Streiber C, Mann M, et al. The enterotoxin from *Clostridium difficile* (toxA) monoglucosylates the Rho proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 1995b; 270 (23): 13932–6.

(9) Keel MK, Songer JG. The comparative pathology of *Clostridium difficile*-associated disease. *Veterinary Pathology* 2006; 43: 225–40.

(10) Kuehne SA, Cartman ST. Both, toxin A and toxin B are important in *Clostridium difficile* infection. *Gut Microbes* 2011; 2 (4): 252-5.

(11) Riggs MM, Sethi AK, Zabarsky TF, Eckstein EC, Jump RLP, Donskey CJ. Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and nonepidemic*Clostridium difficile* strains among long-term care facility residents. *Clinical Infectious Diseases* 2007; 45: 992-8.

(12) Weese JS. *Clostridium difficile* in food-innocent bystander or serious threat? *Clinical Microbiology and Infection* 2009; 16: 3-10.

(13) Houser BA, Soehnlen MK, Wolfgang DR, Lysczek HR, Burns CM, Jayarao BM. Prevalence of *Clostridium difficile* toxin genes in the feces of beef calves and incidence of ground beef contamination. *Foodborne pathogenand disease* 2012; 9 (1): 32- 6.

(14) Indra A, Lassing H, Baliko N, Much P, Fiedler A, Huhulescu S, et al. *Clostridium difficile*: a new zoonotic agent? *Wien Klin Wochenschr* 2009; 121: 91-5.

(15) Jalali M, Khorvash F, Warriner K, Weese JS. Clostridium difficile infection in an Iranian hospital. *BMC Research Notes* 2012; 5: 1-5.

(16) Esfandiari Z, Jalali M, Ezzatpanah H, Weese JS, Chamani M. The Frequency of *Clostridium difficile* in Processing steps of hamburger. *Journal of Health System Research* 2013; Special Issue on Nutrition: 1460-7

(17) Lemee L, Dhalluin A, Testelin S, Mattrat M. A, 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*. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42 (12): 5710-14.

(18) Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: A laboratory manual.* 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; 2001.

(19) Rupnik M. Is *Clostridium difficle*-associated infection a potentially zoonotic and foodborne disease? *Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2007; 13: 457-9.

(20) Rupnik M, Wilcox MH, Gerding N. *Clostridium difficile* infection: new developments in empidemiology and pathogenesis. *Nature* 2009; 7: 526- 37.

(21) Rupnik M, Songer JG. *Clostridium difficile*: Its potential as a source of foodborne disease. *Advances in Food and Nutrition Research* 2010; 60: 53- 66.

(22) De Boer E, Zwartkruis-Nahuis A, Heuvelink AE, Harmanus C, Kuijper EJ. Prevalence of *Clostridium difficile* in retailed meat in the Netherlands. *Interantional Journal of Food Microbiology* 2011; 144: 561-4.

(23) Quesada-Gomez C, Mulvey MR, Vargas P, Gamboa-Coronado MDM, Rodrigeuz C, Rodriguez-Cavillini E. Isolation of a toxigenic and clinical genotype of *Clostridium difficile* in retail meats in Costa Rica. *Journal of Food Protection* 2013; 76 (2): 348-51.

(24) Rodriguez-Palacios A, Reid-Smith RJ, Staempfli HR, Daignault D, Janecko N, Avery BP, et al. Possible seasonality of *Clostridium difficile* in retail meat, Canada. *Emerging Infectious Diseases* 2009; 15 (5):802- 05.

(25) Weese JS, Avery BP, Rousseau J, Reid-Smith RJ. Detection and Enumeration of *Clostridium difficile* spores in retail beef and pork. *Applied and Environmental Microbiology* 2009; 75 (15): 5009- 11.

(26) Von Abercron SMM, Karlsson F, TrowaldWigh G, Wierup M, Krovacek K. Low occurrence of *Clostridium difficile* in

retail ground meat in Sweden. *Journal of Food Protection* 2009; 72 (8):1732-4.

(27) Bouttier S, Barc MC, Felix B, Lambert S, Collignon A, Barbut F. *Clostridium difficile* in ground meat, France. *Emerging Infectious Diseases* 2010; 16 (4) :733- 734.

(28) Harvey RB, Norman KN, Andrews K, Norby B, Hume ME, Scanlan CM, et al. *Clostridium difficile* in retail meat and processing plants in Texas. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2011; 23: 807-11.

(29) Limbago B, Thompson AD, Greene SA, MacCannell D, MacGowan CE, Jolbitado B, et al. Development of a Consensus Method for Culture of *Clostridium difficile* from Meat and Its Use in a Survey of US Retail Meats. *Food Microbiology* 2012; 32: 448-51.

(30) Jobstl M, Heuberger S, Indra A, Nept R, Kofer J, Wagner M. *Clostridium difficile* in raw products of animal origin. *International Journal of Food Microbiology* 2010; 138: 172-5.

(31) Hoffer E, Haechler H, Frei R, Stephan R. Low occurrence of *Clostridium difficile* in fecal samples of healthy calves and pigs at slaughter and in minced meat in Switzerland. *Journal of Food Protection* 2010; 73 (5): 973-5.

(32) Songer JG, Trinh HT, Killgore GE, Thompson AD, McDonald LC, Limbago BM. *Clostridium difficile* in retail meat products, USA, 2007. *Emerging Infectious Diseases* 2009; 15 (5): 819- 21.

(33) Rodriguez-Palacios A, Staempfli HR, Duffield T, Weese JS. *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. *Emerging Infectious Diseases* 2007; 13 (3): 485-7.

(34) Curry SR, Marsh JW, Schlackman JL, Harrison LH. Prevalence of Clostridium difficile in uncooked ground meat products from Pittsburgh, Pennsylvania. *Applied and Environmental Microbiology* 2012; 78 (12): 4183-6.

(35) Mahdavi M, KasraKermanshahi R, Jalali M. The assessment of disinfectants on various bacterial biofilms. *Research Journal of the University of Isfahan* 2008; 31 (2): 35-46.

(36) Rodriguez-Palacios A, Reid-Smith R, Staempfli HR, Weese J. S. *Colstridium difficile* survives minimal termperature recommended for cooking ground meats. *Anaerobe* 2010; 16: 540-2.

(37) Rodriguez-Palacios A, LeJeune JT. Moist-Heat resistance, spore aging, and superdormance in *Clostridium difficile*. *Applied and Environmental Microbiology* 2011; 77 (9): 3085-91.

(38) Dhallun A, LemmeL, Pestel-Caron M, MoryF, LeluanG, Lemeland J. F, et al. Genotypic differentiation of twelve Clostridium species by polymorphism analysis of triosephosphateisomerase (tpi) gene. *Systematic and Applied Microbiology* 2003; 26: 90-6.

---

[1]- *Clostridium difficile* infection: CDI
[2]- tcdA
[3]- tcdB
[4]- Rho
[5]- Community associated *clostridium difficile* infection: CACDI
[6]- *Clostridium difficle*moxalactamnorfloxacin: CDMN
[7]- Hardy Diagnostics, USA
[8]- triose phosphate isomerase: tpi
[9]- multiplex Polymerase chain reaction: M-PCR
[10]- MgCl2
[11]- dNTPs
[12]-Taq DNA polymerase
[13]- primer
[14]- denaturation
[15]- annealing
[16]- extension
[17]- Lemee et al
[18]- Martinsried, Germany
[19]- Guelph
[20]- Indra et al
[21]- de Boer et al
[22]- Rodriguez-Palacios et al
[23]- Curry et al
[24]- Houser et al

Examination of *Clostridium difficile* Contamination in beef meat distributed in Isfahan using culture and Multiplex-PCR method

Zahra Esfandiari
Ph.D. student, Department of Food Science and Technology, College of Food Science and Technology, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, research_esfandiary@mui.ac.ir
Mohammad Jalali
Associate Professor of Microbiology, Food Security Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran, mjalali1343@gmail.com
Hamid Ezzatpanah *
Associate Professor of Food Science and Technology, Department of Food Science and Technology, College of Food Science and Technology, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, hamidezzatpanah@srbiau.ac.ir
Scott.Weese
Professor of Pathobiology, Department of Pathobiology, University of Guelph, Ontario, N1G 2W1, Canada, jsweese@uoguelph.ca
Mohammad Chamani
Associate Professor of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, m.chamani@srbiau.ac.ir

Abstract

Introduction: With regard to increasing of community associated *Clostridium difficile* infection in recent years, the probable transmission of *Clostridium difficile* from food to human was supposed. Most of reports on this issue were allocated to examine the prevalence of *Clostridium difficile* in red meat. The current study aimed at examination of the prevalence of *Clostridium difficile* in beef meat.

Materials and methods: A total of 100 beef meat samples including 50 chopped and ground for each ones were collected from butcheries in different regions of Isfahan for cultural analysis and biochemical tests. Molecular evaluation of *Clostridium difficle* was confirmed by multiplex polymerase chain reaction directed on existence of *tpi, tcdA* and *tcdB* genes. Chi-square test was performed for descriptive statistics with *Pvalue*≤ 0.05 in SPSS software.

Results: *Clostridium difficile* was isolated form 12 (12%) of beef meat samples. Among isolated colonies, 2 (4%) and 10 (20%) were belonged to chopped and ground beef meat, respectively. All colonies contained all genes. The significant difference was observed within the type of meat and *Clostridium difficile* prevalence (*Pvalue*=0.01).

Discussion and conclusion: The results of the present study showed the higher incidence of *Clostridium difficile* in ground meat than chopped ones. It seems that the formation of biofilm in meat grinder was the reason of higher rate of contamination. Furthermore, the consumption of beef meat as a source for *Clostridium difficile* might transmit the organism to human.

Key words: *Clostridium difficile*, Beef meat, Multiplex polymerase chain reaction

* Corresponding author
Received: August 26, 2013 / **Accepted:** January 14, 2014