فراوانی سویه های توکسین زای کلستریدیوم دیفیسیل A^-B^+ در کودکان سرطانی

حدیث طوافی[1]، میثم سرشار[2]، پرویز اولیاء[3]، نادر شاهرخی[4*]

1. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد
2. کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)
3. استاد میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد
4. استادیار بیوتکنولوژی پزشکی، بخش بیولوژی مولکولی، انستیتو پاستور ایران

***** نشانی برای مکاتبه: انستیتو پاستور ایران، بخش بیولوژی مولکولی shahrokhi@pasteur.ac.ir، تلفن: 09123847794
دریافت مقاله: آذر نود پذیرش برای چاپ: بهمن نود

چکیده

سابقه و هدف: *کلستریدیوم دیفیسیل (Clostridium difficile) به عنوان عامل اصلی کولیت با غشای کاذب، اسهال مرتبط با مصرف آنتی بیوتیک و عفونت های بیمارستانی شناخته شده است. هدف از این پژوهش تعیین فراوانی جدایه های توکسین زای کلستریدیوم دیفیسیل A^-B^+ (سویه هایی که تنها توکسین B تولید می کنند) در کودکان سرطانی تحت شیمی درمانی می باشد.*

روش کار: *در طی دوره ای 12 ماهه، 105 نمونه مدفوع، از کودکان تحت شیمی درمانی با میانگین سنی 2 تا 13 ماه از بیمارستان های امام حسین(ع)، محک و مرکز طبی کودکان تهران جمع آوری شد. Multiplex PCR از سه ژن tpi (تریوز فسفو ایزومراز)، tcdA و tcdB (توکسین های A و B) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی هر یک از ژن ها، صورت گرفت.*

یافته ها: *کلستریدیوم دیفیسیل در 18 مورد (17/14%) از بیماران سرطانی تحت شیمی درمانی یافت شد که از این میان، در 13 مورد (72%)، کلستریدیوم دیفیسیل توکسین زا تشخیص داده شد. در موارد توکسین زا، باکتری در 30/76% A^+B^+ (تولید کننده هر دو توکسین)، 61/53% A^-B^+ (تولید کننده تنها توکسین B) و 7/7% موارد A^+B^- (تولید کننده تنها توکسین A) تشخیص داده شد.*

نتیجه گیری: *نتایج بدست آمده در این مطالعه، نشان دهنده شیوع بالای سویه های توکسین زای کلستریدیوم دیفیسیل A^-B^+ در گروه بیماران مورد مطالعه ما می باشد. با توجه با اینکه این سویه ها قادرند عفونت های مرتبط با کلستریدیوم دیفیسیل را ایجاد نمایند، لذا به منظور پیشگیری از شیوع بالای این باکتری، استفاده از روش های سریع تشخیصی و قابل اطمینانی مانند Multiplex PCR، در غربالگری ابتدایی و تشخیص کلستریدیوم دیفیسیل و توکسین های آن، بسیار حائز اهمیت می باشد.*

واژگان کلیدی: ***کلستریدیوم دیفیسیل، سویه های A^-B^+، شیمی درمانی، Multiplex PCR***

مقدمه

کلستریدیوم دیفیسیل، باکتری گرم مثبت، بی هوازی و اسپور داری است، که به عنوان عامل اصلی کولیت با غشای کاذب و عفونت های بیمارستانی شناخته شده است(1 و 2). عوامل بیماری زای این باکتری، دو توکسین A (انتروتوکسین) و توکسین B (سیتوتوکسین) می باشند که توسط دو ژن به نام های tcdA و tcdB کد می شوند(6-3). اکثر سویه های بیماری زا، هر دو توکسین را تولید می کنند، اگر چه جدایه هایی نیز تشخیص داده شده اند که تنها توکسین B را تولید می کنند و قادر به ایجاد بیماری هستند(7). به عبارتی سویه هایی وجود دارند که A^-B^+ هستند و قادر به تولید توکسین A نمی باشند، با این حال فعالیت انتروتوکسینی را از خود نشان می دهند(8 و 9). بررسی ها نشان می دهند که میزان شیوع سویه های A^-B^+ در حال افزایش است(۷،۱۰ و 11) و عفونت های شدید کلستریدیوم دیفیسیل ایجاد شده توسط ایزوله های توکسین زای A^-B^+، در درصد بالایی از بیماران جدا شده است(7، 12 و 13).

سویه های کلستریدیوم دیفیسیل A^-B^+ تقریباً مشابه سویه های کلستریدیوم دیفیسیل A^+B^+ دامنه ای از علائم را از کلنیزاسیون بدون علامت تا کولیت های سمی را باعث می شوند(14). درمان با آنتی بیوتیک ها بخصوص آنتی بیوتیک های وسیع الطیف، شیمی درمانی، سن و غیره از جمله عوامل مهمی می باشند که روده را مستعد عفونت های شدید توسط این باکتری می کنند(1). به علاوه ثابت شده است که شیمی درمانی در افراد سرطانی نیز شرایط روده را برای تکثیر و کلنی سازی توسط کلستریدیوم دیفیسیل آماده می سازد(15). داروهای آنتی نئوپلاستیک در شیمی درمانی، به عنوان عوامل مستقل ایجاد کننده عفونت های کلستریدیوم دیفیسیل تشخیص داده نشده اند، اما بررسی ها نشان می دهند که مراحلی از شیمی درمانی که مستلزم درمان با آنتی بیوتیک است، می تواند بیماری های ناشی از این باکتری را تسریع کند(16).

تشخیص رایج پاتوژن های باکتریایی در آزمایشگاه های تشخیصی، براساس روش های مبتنی بر کشت، آزمون های بیوشیمیایی و ایمونولوژیکی می باشد که اغلب این روشها، وقت گیر بوده و از طرفی قادر به تشخیص هم زمان چندین فاکتور موثر در بیماری زایی باکتری ها نمی باشند. روش های مولکولی روش هایی حساس و دقیق در تشخیص پاتوژن های میکروبی می باشند. Multiplex PCR، یکی از روش های سریع مولکولی می باشد که قادر است چندین ژن را به طور همزمان در انواع پاتوژن ها تشخیص دهد(17). باتوجه به اینکه میزان شیوع سویه های توکسین زای کلستریدیوم دیفیسیل A^-B^+ در حال افزایش است و این سویه ها قادرند عفونت های مرتبط با کلستریدیوم دیفیسیل را ایجاد کنند و همچنین با توجه به اثراتی که شیمی درمانی بر روی سیستم ایمنی بیماران سرطانی اعمال می کنند و آنها را نسبت به انواع عفونت ها، به خصوص عفونت های کلستریدیومی حساس می سازند، این بیماران می توانند منبع بالقوه ای از این سویه ها باشند و به نظر می رسد که روش تشخیصی سریع به منظور شناسایی و تشخیص این باکتری در بیماران حساس، به منظور پیش گیری از ظهور علائم بیماری های ایجاد شده ضروری باشد(14 و 18). در مطالعه حاضر، با استفاده از روش Multiplex PCR، بخش هایی از ژن های توکسین A، توکسین B و ژن tpi (ژن تائید کننده کلستریدیوم دیفیسیل) را بوسیله ی پرایمر های اختصاصی آنها تکثیر کرده تا بدینوسیله سویه های کلستریدیوم دیفیسیل A^-B^+ از سویه های A^+B^+ و A^-B^- تشخیص داده و میزان شیوع این سویه ها در بین کودکان سرطانی تحت شیمی درمانی، بررسی گردد.

روش کار

در این مطالعه، 105 نمونه مدفوع کودکان سرطانی تحت شیمی درمانی با میانگین سنی 2 تا 13 ماه از بیمارستان های امام حسین(ع)، محک و مرکز طبی کودکان تهران جمع آوری شد. نمونه گیری بوسیله ی سواب استریل انجام گرفت و سواب ها درون لوله های استریل قرار داده شد و تا انتقال به آزمایشگاه، در دمای 4 درجه ی سانتی گراد نگهداری شدند.

برای آماده سازی نمونه ها، سواب ها ی آغشته به نمونه، در 2 -1 سی سی سرم فیزیولوژیک یا محلول TE 1X (10mM Tris- Hcl, 1 mM EDTA. PH 8) قرار داده شد. چند بار ورتکس انجام شد تا نمونه ها از سواب ها جدا شدند. بعد از خارج کردن سواب ها از لوله، محتوی آن به لوله های اپندرف استریل انتقال داده شد. به منظور جداسازی اجسام درشت نمونه ها، به مدت 2 الی 3 دقیقه و با سرعت 1500rpm -1000، سانتریفوژ انجام شد. مایع رویی به لوله ی اپندرف جدید انتقال داده شد و با سرعت 15000 rpm، به مدت 3 دقیقه سانتریفوژ شد. حدود 400 میکرولیتر از مایع رویی دور ریخته شد و مابقی پس از مخلوط کردن، برای مطالعه ی بیشتر در دمای 20- درجه ی سانتی گراد نگهداری شد.

برای استخراج DNA از سویه ی استاندارد کلستریدیوم دیفیسیل (ATCC 308637) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. باکتری بر روی محیط بروسلا آگار در دمای 37 درجه ی سانتی گراد به مدت 72 ساعت و در شرایط بی هوازی انکوبه گردید. کلنی های باکتری، توسط بافر TE 1X از روی محیط کشت شستشو داده شد و از مخلوط بدست آمده جهت استخراج ژنوم باکتری استفاده گردید. با استفاده از کیت استخراج DNA (Roche, Germany) و طبق دستورالعمل گفته شده در کیت، استخراج DNA از سویه ی استاندارد و نمونه های کلینیکی گرفته شده، انجام شد. به منظور تائید حضور DNA در نمونه های گرفته شده، تستInternal Control انجام گرفت که برای این منظور، از DNA های استخراج شده با استفاده از پرایمر یونیورسال 23S rDNA، واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)، صورت گرفت. نتایج حاصل از PCR نمونه ها از نظر دارا بودن DNA باکتریایی مثبت و فاقد هر نوع مهارکننده PCRبود.

به منظور تشخیص حضور ژن های tpi (تریوز فسفو ایزومراز)، tcdA و tcdB (توکسین های A و B) از روش Multiplex PCR استفاده گردید. توالی پرایمر ها به همراه غلظت های استفاده شده از هر یک، در جدول 1 آورده شده است.PCR از ژن های مذکور مطابق شرایط معمولی و با مقادیر ذکر شده صورت پذیرفت (جدول 2). در نهایت به منظور بررسی نتایج حاصل از PCR، از الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز 2% و رنگ آمیزی توسط اتیدیوم برماید استفاده گردید. برنامه دمایی دستگاه ترموسیکلر برای تکثیر ژن های مورد نظر، در (جدول 3) نمایش داده شده است. به منظور بررسی بهتر توالی محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز، از کیت استخراج ژل ساخت شرکت فرمنتاس لیتوانی و طبق دستورالعمل گفته شده در کیت، جداسازی ژن از ژل صورت گرفت و محصول بدست آمده تعیین توالی شد.

جدول 1: پرایمرهای مورد استفاده برای ژن های مورد مطالعه(19)

توالی هدف	توالی پرایمر ها (5′ به 3′)	اندازه محصول (جفت باز)
tcdA	F:AGATTCCTATATTTACATGACAATAT R:GTATCAGGCATAAAGTAATATACTTT	380
tcdB	F:GGAAAAGAGAATGGTTTTATTAA R:ATCTTTAGTTATAACTTTGACATCTTT	163
tpi	F:AAAGAAGCTACTAAGGGTACAAA R:CATAATATTGGGTCTATTCCTA	215

جدول 2: مقادیر مورد نیاز جهت انجام واکنش Multiplex PCR

ترکیبات	مقادیر
DreamTaq™ PCR Master Mix (2X)	17.5 µl
F:tcdA (20 p.mol)	1.25 µl
R: tcdA (20 p.mol)	1.25 µl
F: tcdB (20 p.mol)	1.25 µl
R: tcdB (20 p.mol)	1.25 µl
F: tpi (20 p.mol)	0.75 µl
R: tpi (20 p.mol)	0.75 µl
DNA	11 µl
Total Volum	35 µl

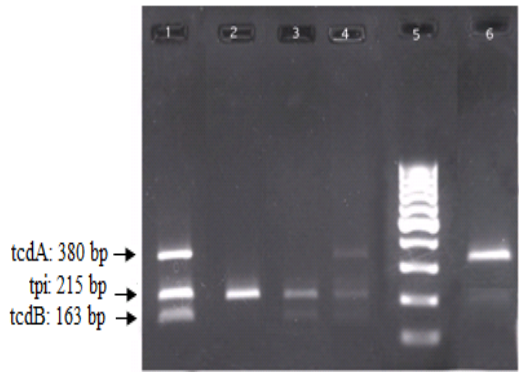
جدول 3: برنامه ی دمایی دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر ژن های tpi، tcdA و tcdB

تعداد چرخه	زمان	دما	نام مرحله	چرخه
1 بار	5 دقیقه	95◦C	واسرشت اولیه	اول
35 بار	40 ثانیه	95◦C	واسرشت شدن	دوم
	30 ثانیه	72◦C	گسترش	
	30 ثانیه	72◦C	گسترش	
1 بار	5 دقیقه	72◦C	گسترش نهایی	سوم

یافته ها

در این تحقیق، نمونه های مدفوع از 105 کودک سرطانی تحت شیمی درمانی جمع آوری و مورد بررسی قرار گرفت. کلستریدیوم دیفیسیل، در 18 مورد (17/14%) در کودکان سرطانی که در سنین بین 2 ماهه تا 13 ساله بودند، تشخیص داده شد.

از میان بیماران کلستریدیوم دیفیسیل مثبت، در 5 مورد، باکتری به صورت غیر توکسین زا ، 13 مورد توکسین زا (4 نفر، هر دو توکسین A و B (B^+A^+)، 1 نفر تنها توکسین A (A^+B^-) و 8 نفر تنها توکسین B (B^+A^-) را تولید می کردند) تشخیص داده شد. تصویر باند های تشخیص داده شده از سه ژن مورد مطالعه در شکل 1، نشان داده شده است. از 8 مورد سویه کلستریدیوم دیفیسیل B^+A^-، 7 مورد در بیمارستان امام حسین و یک مورد در بیمارستان محک جداسازی شد. در جدول 4 تعداد نمونه های جمع آوری شده از بیمارستان ها و تعداد سویه های کلستریدیوم دیفیسیل جدا شده از بیماران آورده شده است.



شکل1: Multiplex PCR از ژن های tpi، tcdA وtcdB در نمونه های مورد بررسی

چاهک 1: سویه استاندارد (کنترل مثبت)، چاهک 2: ژن tpi (کلستریدیوم دیفیسیل غیر توکسین زا)، چاهک 3: ژن های tcdB و tpi (B^+A^-)، چاهک 4: ژن های tcdB و tpi (B^+A^+)، چاهک 5 : مارکر 100 جفت بازی (فرمنتاز)، چاهک 6: ژن های tcdA و tpi (A^+B^-).

جدول 4: تعداد نمونه های جمع آوری شده از بیمارستان ها و تعداد سویه های کلستریدیوم دیفیسیل جدا شده از بیماران

بیمارستان ها	تعداد نمونه ها	کلستریدیوم دیفیسیل مثبت	A^+B^+	A^-B^+	A^+B^-	A^-B^-
بیمارستان 1	28	5	1	0	0	4
بیمارستان 2	48	9	1	7	1	0
بیمارستان 3	29	4	2	1	0	1
جمع	105	18	4	8	1	5

بحث

کلستریدیوم دیفیسیل، باکتری بی هوازی، گرم مثبت و اسپور داری است، که اولین بار، در سال 1935 از نمونه های مدفوع اطفال جداسازی شد(20). بعد از شناسایی این باکتری به عنوان یک پاتوژن و به دلیل اهمیت تشخیص کلینیکی آن، روش های متعددی برای تشخیص این باکتری و توکسین های آن مورد استفاده قرار گرفت. George و همکارانش در سال 1979، برای جداسازی این باکتری از نمونه مدفوع، محیط کشت انتخابی به نام CCFA (Cycloserine Cefoxitin Froctose Agar) پیشنهاد دادند(21). با اینکه کشت یک روش استاندارد طلایی برای تشخیص عوامل میکروبی می باشد، اما در این روش، امکان جداسازی سویه های توکسین زا از غیرتوکسین زا وجود نداشته و روش هایی طولانی و وقت گیر تلقی می گردند(22).

Persson و همکارانش در سال 2008 با روش 5plexPCR، ژن های توکسین زای tcdA ,tcdB, cdtA, cdtB, 16S rDNA کلستریدیوم دیفیسیل را به طور هم زمان مورد مطالعه قرار دادند و توانستند با طراحی پرایمرهای اختصاصی، از 159 جدایه کلستریدیوم دیفیسیل، 135 مورد توکسین زا و 24 مورد غیر توکسین زا تشخیص دهند(23). همچنین Burgner و همکارانش در طی مطالعه ای که بر روی این باکتری و کلونیزاسیون آن بر کودکان سرطانی داشتند، گزارش دادندکه، کلستریدیوم دیفیسیل در کودکان سرطانی، به نظر نمی رسد توکسین زا باشد و ممکن است بخشی از فلور نرمال این کودکان قلمداد شود(24).

در این پژوهش، با استفاده از روش 3plexPCR، ژن tpi و ژن های توکسینی A و B، از کلستریدیوم دیفیسیل، مورد بررسی قرار گرفت و نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان داد که از 18 موردی که در آنها کلستریدیوم دیفیسیل تشخیص داده شد، 13 مورد توکسین زا و 5 مورد غیر توکسین زا بودند. همچنین نتایج نشان داد که اکثر سویه هایی که توانایی ایجاد عفونت را دارند، هر دو توکسین را تولید می کنند. با این وجود در دهه اخیر، سویه هایی شناسایی شده اند که توانایی ایجاد کلنی و عفونت را دارند و تنها توکسین B را تولید می کنند (A^-B^+)(7). میزان جداسازی و شناسایی جدایه هایی که $TcdA^-$ هستند در جهان متغیر است(25). دامنه ی شیوع سویه های B^+A^- از 0/2% تا 56% در مطالعات مختلف در آمریکا، اروپا و آسیا گزارش شده است(26 و 27). Alfa و همکارانش در سال 1998 اولین گروهی بودند که توانستند با استفاده از PCR به عنوان یک روش مولکولی، سویه های A^-B^+ را تشخیص دهند(12). در ادامه Kuijper و همکارانش در مطالعه ای که در سال 1998 انجام دادند، توانستند در بین نمونه های مورد مطالعه، 13% سویه های کلستریدیوم دیفیسیل A^-B^+ را جدا سازی نمایند(28).

در مطالعه ای که در سال 1998 در کشور ژاپن انجام گرفت، شیوع این نوع سویه ها در بزرگسالان بدون علامت، 12% گزارش شد(2). همچنین Brazierو همکارانش در سال 1999(29) و Kato و همکارانش در سال 2001(30) میزان شیوع کلستریدیوم دیفیسیل را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج بدست آمده توسط این دو گروه نشان داد که در میان بیماران تحت بررسی، به ترتیب، 3 و 6 درصد سویه ها به صورت B^+A^- می باشند. از جمله بررسی هایی که بالاترین میزان شیوع سویه های B^+A^- را نشان می دهد، مطالعه ای است که توسط Samra و همکارانش در سال 2002(31) و Komatsu و گروهش در سال 2003(32) انجام دادند. این دو گروه میزان شیوع سویه های B^+A^- در میان بیماران تحت بررسی را، به ترتیب حدود 56 و 39 درصد گزارش کردند. همچنین در مطالعه ای که توسط Van den Berg و همکارانش در سال 2004، به مدت 4 سال بر روی بیماران بستری شده در بیمارستان های آرژانتین انجام گرفت، نتایج این گروه نشان داد که در سال 2000 میزان شیوع سویه های B^+A^-، 12/5% و در سال 2003 این میزان به 97/9% رسیده است(33). در مطالعه حاضر، 61/53% از نمونه هایی که کلستریدیوم دیفیسیل در آنها تشخیص داده شد، A^-B^+ بودند که حاکی از شیوع بالای این سویه ها در میان بیماران تحت بررسی در این مطالعه دارد. با توجه به نقش این سویه ها در ایجاد عفونت های مرتبط با کلستریدیوم دیفیسیل و همچنین با توجه به اثرات جانبی شیمی درمانی که باعث نقص و ضعیف شدن سیستم ایمنی بیماران سرطانی می شوند و این افراد نسبت به انواع عفونت ها، به خصوص عفونت های کلستریدیومی حساس می باشند، بنابراین بیماران مذکور می توانند منبع بالقوه ای از سویه های کلستریدیوم دیفیسیل باشند.

نتیجه گیری

بر اساس اطلاعات به دست آمده، میزان شیوع سویه های توکسین زای کلستریدیوم دیفیسیل A^-B^+ در حال افزایش است. در این بررسی بیشتر سویه هایی که توکسین B تولید می کردند، از میان نمونه های بیمارستانی بودند که اپیدمی اسهال در بخش انکولوژی آن بیمارستان رخ داده بود. بنابراین می توان نتیجه گرفت که این میزان شیوع، تحت تاثیر این اپیدمی باشد. در ضمن به نظر می رسد که روش تشخیصی سریع به منظور شناسایی و تشخیص این باکتری در بیماران حساس، به منظور پیشگیری از ظهور علائم آن ضروری باشد و روش Multiplex PCR، روشی سریع و مفید برای غربالگری ابتدایی و تشخیص کلستریدیوم دیفیسیل و توکسین های آن است. در نهایت پیشنهاد می شود که بررسی های بیشتری به منظور تشخیص حضور و میزان شیوع ژن های توکسین زای این باکتری، در کودکان سرطانی که وارد فاز کولیت با غشای کاذب شده اند، مخصوصاً آنهایی که تحت درمان آنتی بیوتیک هستند صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسئولین بخش بیولوژی مولکولی انستیتو پاستور ایران به خاطر تامین کلیه امکانات این تحقیق، تشکر و قدردانی به عمل می آید. از مسئولین بخش های انکولوژی بیمارستان های محک، امام حسین، مرکز طبی کودکان که در تهیه ی نمونه های کلینیکی در این تحقیق همکاری داشتند، نیز تشکر می گردد. همچنین از جناب دکتر صادقی فر (دانشگاه علوم پزشکی ایلام) که در تهیه سویه استاندارد کلستریدیوم دیفیسیل با این گروه همکاری داشتند نیز تشکر و قدر دانی می گردد.

REFERENCES

1. Castagnola E, Battaglia T, Bandettini R, Caviglia I, Baldelli I, Nantron M, et al. Clostridium difficile Associated Diseases in Children with Solid Tumors. Support Care Cancer J. 2008; 17: 321-324.

2. Kato H, Kato N, Watanabe K, Iwai N, Nakamura H, Yamamoto T, et al. Identification of toxin A-negative, toxin B-positive Clostridium difficile by PCR. J Clin Microbiol. 1998. 36: 2178-82.

3. Deneve C, Janoir C, Poilane I, Fantinato C, Collignon A. New trend in Clostridium difficile Virulance and Pathogenesis. Int J Antimicrob Agents. 2009. 10: 24-28.

4. Bauer MP, van Dissel JT. Alternative Strategies for Clostridium difficile Infection. Int J Antimicrob Agents. 2009. 11: 51-56.

5. Mani N, Dupuy B. Regulation of Toxin Synthesis in Clostridium difficile by an Alternative RNA polymerase Sigma Factor. 2001. 98: 5844-49.

6. Cohen SH, Tang YJ, Silva J Jr. Analysis of the pathogenicity locus in Clostridium difficile strains. J. Infect. Dis. 2000. 181: 959-963.

7. Alfa MJ , Kabani A, Lyerly D, Moncriet S, Neville L.M, AL- Barrak A, et al. Charecterization of Toin A negative, Toxin B positive Strain of Clostridium difficile Responcible for a Nosocomial Outbreak of Clostridium difficile Associated Diarrhea. J Clin Microbial. 2000. 38:2706-2714.

8. Lyerly DM, Barroso LA, Wilkins TD, Depitre C, Corthier G. Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of Clostridium difficile. Infect Immun. 1992. 60 :4633-4639.

9. Borriello SP, Wren BW, Hyde S, Seddon SV, Sibbons P, Krishna MM, et al. Molecular, immunological, and biological characterization of a toxin A-negative, toxin Bpositive strain of Clostridium difficile. Infect Immun. 1992. 60: 4192-4199.

10. Sambol SP, Merrigan MM, Lyerly D, Gerding DN, Johnson S. Toxin Gene Analysis of a Variant Strahn of Clostridium difficile that Causes Human Clinical Disease. Infect Immun. 2000. 68: 5480-87.

11. Rupnik M, Kato N, Grabnar M, Kato H. New types of toxin A-negative, toxin B-positive strains among Clostridium difficile isolates from Asia. J Clin Microbiol. 2003. 41: 1118-25.

12. al-Barrak A, Embil J, Dyck B, Olekson K, Nicoll D, Alfa M, et al. An outbreak of toxin A negative, toxin B positive Clostridium difficile-associated diarrhea in a Canadian tertiary-care hospital. Can Commun Dis Rep. 1999. 25: 65-69.

13. Limaye AP, Turgeon DK, Cookson BT, Fritsche TR. Pseudomembranous colitis caused by a toxin A(-) B(+) strain of Clostridium difficile. J Clin Microbiol. 2000. 38: 1696-1697.

14. Drudy D, Fanning S, Kyne L. Toxin A negative, toxin B positive Clostridium difficile. Int J Infect Dis. 2007.11: 5-10.

15. Brunetto AL, Pearson AD, Craft AW, Pedler SJ. Clostridium difficile in an Oncology Unit. Arch Dis Child. 1988. 8: 979-981.

16. Anand A. Glatt AE. Clostridium difficile Infection Induced by Cancer Chemotherapy: a review. Clin Infect Dis. 1993. 142: 333-5.

17. Antikainen J, Pasanen T, Mero S, Tarkka E, Kirveskari J, Kotila S, et al. Detection of Virulence genes of Clostridium difficile by Multiplex PCR. AMIS; 2009. 117: 607-13.

18. Hadir A. El- Mahalla WY, Nelly Hassan Aly El- Din, Iman A- Attia , Alau El – Haddad. Clostridium difficile Associated Diarrhea in Pediatric Oncology Patients Receiving Chemothrapy. J Egypt Natl Canc Inst. 2001. 13: 285-290.

19. Lemee L, Dhalluin A, Testelin S, Mattrat 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. Clin Microbial. 2004. 42: 5710-14.

20. Barbut F, Petit JC. Epidemiology of Clostridium difficile Associated Infections. Clin Microbial Infect. 2001. 7: 405-410.

21.George WL, Sutter VL, Citron D, Finegold SM. Selective and differential medium for isolation of Clostridium difficile. J Clin Microbial. 1979: 9: 214-219.

22. Delmee M. Laboratory diagnosis of Clostridium difficile disease. J Clin Microbial Infect. 2001. 7: 411-416.

23. Persson S, Torpdahl M, Olsen KE. New multiplex PCR method for the detection of Clostridium difficile toxin A (tcdA) and toxin B (tcdB) and the binary toxin (cdtA/cdtB) genes applied to a Danish strain collection. Clin Microbiol Infect. 2008.14: 1057-64.

24. Burgner D, Siarakas S, Eagles G, McCarthy A, Bradbury R, Stevens M. A prospective study of Clostridium difficile Infection and colonization in pediatric oncology patients. Pediatr Infect Dis J. 1997. 16: 1131-1134.

25. Barbut F, Lalande V, Burghoffer B, Thien HV, Grimprel E, Petit JC. Prevalence and Genetic Characterization of Toxin A Variant Strains of Clostridium difficile among Adults and Children with Diarrhea in France. J Clin Microbiol, 2002. 40: 2079–83.

26. 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.

27. Geric B, Rupnik M, Gerding DN, Grabnar M, Johnson S. Distribution of Clostridium difficile Variant Toxinotypes and Strains with Binary Toxin Genes among Clinical Isolates in an American Hospital. J Med Microbial. 2004. 53: 887- 894.

28. Kuijper EJ, de Weerdt J, Kato H, Kato N, van Dam AP, van der Vorm ER, et al. Nosocomial outbreak of Clostridium difficile-associated diarrhoea due to a clindamycin-resistant enterotoxin A-negative strain. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2001. 20:528-534.

29. Brazier JS, Stubbs SL, Duerden BI. Prevalence of toxin A negative/B positive Clostridium difficile strains. J HospInfect. 1999. 42: 248-249.

30. Kato H, Kato N, Watanabe K, Yamamoto T, Suzuki K, Ishiguro S, et al. Analysis of Clostridium difficile isolates from nosocomial outbreaks at three hospitals in diverse areas of Japan. J Clin Microbiol. 2001. 39: 1391-1395.

31. Samra Z, Talmor S, Bahar J. High Prevalence of Toxin A- negative, Toxin B- positive Clostridium difficile in Hospitalized Patients with Gastrointestinal Disease. Diagn Microbial Infect Dis. 2002. 43: 189-192.

32. 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. 22:525-29.

33. Van den Berg RJ, Legaria MC, de Breij ER, van der Vorm ER, Brazier JS, Kuijper EJ. Introduction of TcdA negative, TcdB positive Clostridium difficile in a general hospital in Argentina. 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Copenhagen, Denmark, April 2005.