

## تعیین ریوتیپ سویه های کلستریدیوم دیفیسیل به وسیله واکنش زنجیره ای پلیمرز

دکتر احمد رحمتی<sup>۱</sup>، دکتر جان برازیر<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>نویسنده مسئول: استادیار گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز E-mail:rahmatia@tbzmed.ac.ir

<sup>۲</sup>دانشیار میکروب شناسی، آزمایشگاه رفرانس بی هواری، بیمارستان دانشگاه ولز، هیث پارک، کاردیف انگلستان

### چکیده

**زمینه و هدف:** کلستریدیوم دیفیسیل عامل کولیت با غشای کاذب و اسهال وابسته به آنتی بیوتیک کسب شده از بیمارستان، به روش های فنوتیپی و مولکولی تعیین نوع می شود. هدف از این بررسی مطالعه پراکندگی ریوتیپ های این ارگانیزم در محدوده جغرافیایی و در زمان مورد نظر بود.

**روش کار:** در این بررسی ۱۸ سویه از بیماران بخش های مختلف بیمارستانی در لهستان در سال های ۸۲-۱۳۸۱ مورد آزمایش حساسیت به وانکومایسین و مترونیدازول قرار گرفت. نمونه ها با نور فرابنفش و لاتکس آگلوتیناسیون تعیین هویت مجدد شده و وجود توکسین های A و B مشخص شد. با استخراج DNA و تکثیر آن بوسیله واکنش زنجیره ای پلیمرز و الکتروفورز، ریوتیپ آنها تعیین گردید.

**یافته ها:** همه سویه ها به وانکومایسین و مترونیدازول حساس بوده و کلنی همه آنها در مقابل نور فرابنفش فلوروسانس زرد مایل به سبز نشان دادند. همه سویه ها از نظر لاتکس آگلوتیناسیون مثبت گردیدند. هفت سویه از نظر وجود توکسین A مثبت بود. از نظر توکسین B همه موارد غیر از یک مورد مثبت شد. در تعیین ریوتیپ مولکولی کلستریدیوم دیفیسیل مشخص شد که این سویه ها متعلق به ۷ ریوتیپ ۱۲، ۱۴، ۱۷، ۱۸، ۲۹، ۷۰ و ۹۰ بوده و ریوتیپ ۱۷ (۶۱٪) از همه بیشتر بود.

**نتیجه گیری:** در هر منطقه ای ریوتیپ های خاصی از کلستریدیوم دیفیسیل از شیوع بیشتری برخوردار بوده و برای مطالعات اپیدمیولوژیک تعیین ریوتیپ های این کلستریدیوم ضروری است و بهتر است سویه های شایع این ارگانیزم در مراکز بهداشتی و درمانی ایران نیز شناسایی شده و جهت پیگیری های اپیدمیولوژیک، ریوتیپ آنها تعیین شود.

**واژه های کلیدی:** کلستریدیوم دیفیسیل، واکنش زنجیره ای پلیمرز، ریوتیپ

دریافت: ۸۳/۶/۶ درخواست اصلاحات نهایی: ۸۳/۱۱/۵ پذیرش: ۸۴/۴/۲۵

### مقدمه

کلستریدیوم دیفیسیل عامل عمده اسهال وابسته به آنتی بیوتیک کسب شده از محیط بیمارستان، کولیت و کولیت با غشای کاذب است [۱]. شیوع عفونت بیمارستانی با کلستریدیوم دیفیسیل بصورت افزایشی بخصوص از گروه های حساس مثل کهنسالان، افراد با سازش ایمنی و بیماران جراحی شده گزارش می شود [۲]. تعیین این که آیا در یک شیوع، تیپ خاصی از

ارگانیزم دخیل است یا نه نیازمند بررسی و تعیین نوع این ارگانیزم است.

برای تعیین نوع این ارگانیزم روش های مختلفی مورد استفاده قرار گرفته است. روش های فنوتیپی از اولین روش های مورد استفاده در این زمینه بود [۳].  
واست<sup>۱</sup> و همکاران آنالیز پلاسمیدی، الکتروفورز روی ژل پلی آکریلامید پروتئین های محلول،

<sup>۱</sup> Wust

های این ارگانیزم در انگلستان است به طوری که میزان شیوع این ریبوتیپ تا ۵۸٪ از تمام ریبوتیپ ها می رسد [۳]. در بررسی دیگری که با استفاده از روش های متنوع مولکولی انجام گردیده، مشخص شده است که می توان حتی هر کدام از این انواع ریبوزومی را با استفاده از پرایمرهای خاصی به زیر نوع های آن تقسیم کرد [۸].

هدف از این مطالعه بررسی پراکندگی ریبوتیپ های این ارگانیزم در محدوده جغرافیایی و در زمان مورد نظر و نیز نشان دادن این که برای بررسی های اپیدمیولوژیک عوامل عفونت زا، می توان از روش های خاص مولکولی استفاده کرد، بود.

### روش کار

هیجده سویه از بیماران بخش های مختلف بیمارستانی در لهستان که در سال های ۸۲-۱۳۸۱ به آزمایشگاه فرانس بی هوازی ها در کاردیف انگلستان ارسال شده بود مورد بررسی قرار گرفت.

حساسیت سویه ها در مقابل دیسک مترونیدازول و وانکومایسین در شرایط هوایی و ۳۷ درجه سانتی گراد مورد بررسی قرار گرفت. مرفولوژی کلنی ها و وجود فلوئورسانس زرد مایل به سبز در مقابل نور فرابنفش ۳۶۶ نانومتر نیز بررسی شد. با استفاده از کیت (Microgen Products, UK) آزمایش لاتکس آگلوتیناسیون انجام گردید.

وجود توکسین A با استفاده از کلنی های رشد کرده در محیط ساده بلاد آگار بیس بدون خون (به مدت ۵-۳ روز)، به روش الیزا و با استفاده از کیت اختصاصی (TechLab, USA) انجام شد. وجود توکسین B با تغییراتی طبق روشی که قبلاً توصیف شده است [۳] و به صورت زیر مورد بررسی قرار گرفت.

ابتدا ارگانیزم ها در محیط Cooked Meat Broth کشت داده شدند و در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه گردید. ۲ قطره از محلول صاف شده محیط روی سلول های ورو (Vero Cell Line) ریخته شد. سپس در ۳۵ درجه سانتی گراد در حضور دی

ایمونوالکتروفورز آنتی ژن های خارج سلولی و آنتی بیوگرام ۱۶ سویه جداشده از موارد مرتبط با عفونت کلوستریدیوم دیفیسیل را مورد استفاده قرار داده و نشان دادند که ۱۲ سویه از ۱۶ سویه مورد بررسی قابل افتراق نبود بنابراین نتیجه گرفتند که عفونت متقاطع رخ داده است [۴]. ترکیبی از روش های تعیین نوع بوسیله باکتریوسین و باکتریوفاژ نیز توسط سل<sup>۱</sup> و همکاران انجام شد که موفقیت محدودی داشته است [۵]. با توجه به تحقیقات مختلفی که در این ارتباط انجام شده است به نظر می رسد که تعیین نوع بوسیله روش های فنوتیپی برای تعیین منشأ عفونت های حاصل از این ارگانیزم و اپیدمیولوژی آن کاملاً رضایت بخش نباشد [۳].

بر خلاف روش های فنوتیپی، روش های تعیین نوع مولکولی کاملاً رضایت بخش بوده و فاقد محدودیت های این روش ها است. یکی از این روش های مولکولی تعیین نوع ارگانیزم بوسیله واکنش زنجیره ای پلیمراز روی RNA ریبوزومی ارگانیزم است که در آن پرایمر های خاصی که مکمل ناحیه هایی در داخل اوپرون ژن RNA است مورد استفاده قرار می گیرد. گراتلر<sup>۲</sup> اولین کسی بود که از این روش برای تعیین نوع کلوستریدیوم دیفیسیل استفاده کرد او ناحیه فاصله انداز (spacer) بین S ۱۶ و S ۲۳ ژن RNA ریبوزومی را افزایش داد. مشخص شد که این قسمت از ژنوم برخلاف ژن های RNA ریبوزومی که شدیداً محافظت شده است هتروژن می باشد [۶]. کلوستریدیوم دیفیسیل دارای ۱۰ نسخه از ژن های ریبوزومی در ژنوم خود است که نه تنها بین سویه ها بلکه بین نسخه های مختلف در یک ژنوم نیز متفاوت است [۳]. با استفاده از این روش از ۲۰۳۰ سویه بدست آمده از منابع محیطی، بیمارستانی، افراد انسانی، حیوانات و سویه های فرانس این ارگانیزم مجموعه ای شامل ۱۱۶ ریبوتیپ شناسایی شده که هر کدام دارای پراکندگی مختلفی در نقاط مختلف جهان بوده و از شیوع بیشتری برخوردارند [۷].

<sup>1</sup> Sell

<sup>2</sup> Grutler

تصاویر باند های رنگ شده با استفاده از رایانه و سیستم تصویر گیری (Bio Rad) GelDoc 2000 بدست آمد. سپس با استفاده از نرم افزار GelCompar (Applied Maths, Belgium) و مقایسه با اطلاعات کتابخانه ای درباره ریوتیپ های کلستریدیوم دیفیسیل، ریوتیپ سویه های مورد نظر مشخص گردید. برای بررسی تکرارپذیری و صحت آزمایش ها، هر آزمایش ۲ تا ۳ بار تکرار گردید و در موارد لازم کنترل منفی هم در نظر گرفته شد.

### یافته ها

همه سویه ها به وانکومایسین و مترونیدازول حساس بوده و کلنی همه آنها در مقابل نور فرابنفش فلئورسانس زرد مایل به سبز نشان دادند. همه سویه ها از نظر لاتکس آگلوتیناسیون مثبت گردیدند. الگوی توکسین زایی بصورت A+/B+ با ۷ سویه، A-/B+ با ۱۰ سویه و A-/B- فقط با ۱ سویه بود (جدول ۱).

اکسید کربن ۵٪ به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. روز بعد تاثیر توکسین روی این سلول ها و ایجاد CPE<sup>۱</sup> مورد بررسی قرار گرفت.

برای استخراج DNA و تعیین ریوتیپ سویه ها بوسیله PCR<sup>۲</sup>، روشی که قبلا توصیف شده است [۹] مورد استفاده قرار گرفت. بطور خلاصه سویه های DNA با استفاده از ماده Chelex-100 استخراج شد و سپس با استفاده از پرایمرهای p3 (5'-CTGGGGTGAAGTCGTAACAAGG-3') و p5 (5'-GCGCCCTTTGTAGCTTGACC-3') (Pharmacia Amersham) تکثیر گردید. محصول PCR بوسیله الکتروفورز در ۳٪ ژل آگاروز متافور جدا شده و بعد از رنگ آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید، باندهای حاصل مشاهده گردید. نشانگر اندازه (Ladder)، مارکر PCR Superladder-Low 100 bp (Sigma) بود. الکتروفورز در شرایط جریان ۶۰ میلی آمپر، اختلاف پتانسیل ۲۰۰ ولت و مدت ۳ ساعت انجام شد.

جدول ۱. خصوصیات و ریوتیپ ۱۸ سویه از لهستان

شماره	حساسیت به V	حساسیت به Mz	فلئورسانس UV	لاتکس	توکسین A	توکسین B	بخش	ریوتیپ	سال
۱	+	+	+	+	+	+	جراحی عمومی	۲۹	۱۳۸۲
۲	+	+	+	+	+	+	جراحی عمومی	۱۴	۱۳۸۲
۳	+	+	+	+	+	+	جراحی عمومی	۱۴	۱۳۸۲
۴	+	+	+	+	-	+	پیوند اعضا	۱۷	۱۳۸۲
۵	+	+	+	+	+	+	جراحی عمومی	۹۰	۱۳۸۲
۶	+	+	+	+	-	+	اورتوپدی	۱۷	۱۳۸۲
۷	+	+	+	+	-	+	اورتوپدی	۱۷	۱۳۸۲
۸	+	+	+	+	+	+	جراحی عمومی	۱۲	۱۳۸۲
۹	+	+	+	+	+	+	پیوند اعضا	۷۰	۱۳۸۲
۱۰	+	+	+	+	-	+	پیوند اعضا	۱۷	۱۳۸۲
۱۱	+	+	+	+	-	+	جراحی عمومی	۱۷	۱۳۸۲
۱۲	+	+	+	+	-	+	پیوند اعضا	۱۷	۱۳۸۱
۱۳	+	+	+	+	-	+	پیوند اعضا	۱۷	۱۳۸۱
۱۴	+	+	+	+	-	+	جراحی عمومی	۱۷	۱۳۸۱
۱۵	+	+	+	+	-	-	مرابتهای ویژه	۱۷	۱۳۸۱
۱۶	+	+	+	+	-	+	درماتولوژی	۱۷	۱۳۸۱
۱۷	+	+	+	+	+	+	جراحی عمومی	۱۸	۱۳۸۱
۱۸	+	+	+	+	-	+	داخلی	۱۷	۱۳۸۱

V: وانکومایسین Mz: مترونیدازول UV: نور فرابنفش

<sup>1</sup> Cytopathic Effect

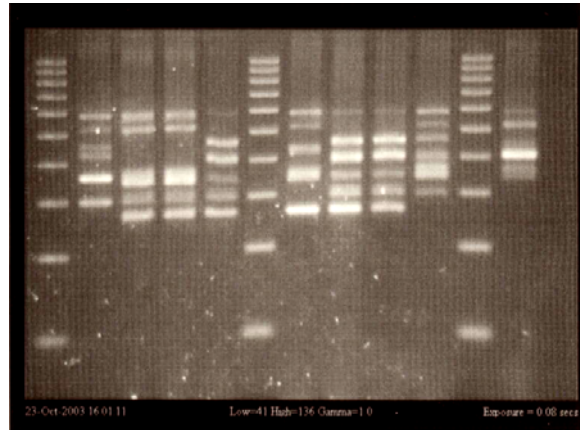
<sup>2</sup> Polymerase Chain Reaction

### بحث

شناسایی کلوستریدیوم دیفیسیل به عنوان یک پاتوژن عمده کسب شده از بیمارستان و پراکندگی سویه های آن محققین را برآن داشت تا چندین روش برای تعیین نوع این میکروارگانیسم بوجود آورند. تعیین تیپ ارگانیسم ها و تقسیم آنها به زیر گروه ها یکی از اهداف اپیدمیولوژی بیماری های عفونی است تا بتوان به وسیله آن به منشا عفونت پی برد. برای تعیین نوع این میکروارگانیسم از روش های مختلف فنوتیپی و مولکولی استفاده شده است [۱۶-۱۰] ولی تعیین نوع آن با استفاده از روش های مولکولی از اهمیت خاصی برخوردار است. با استفاده از این روش ها می توان یک گونه از این میکرو ارگانیسم را به زیر گونه های مختلف با خصوصیات ویژه تقسیم کرد که می تواند در مطالعات اپیدمیولوژیک مورد استفاده قرار گیرد. استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز با بکارگیری پرایمرهای خاصی که ناحیه فاصله انداز داخل ژنی<sup>۱</sup> در ژن S-۲۳ S-۱۶ RNA ریوزومی را افزایش می دهد از روش هایی است که برای تعیین نوع این میکروارگانیسم مورد استفاده قرار گرفته است. از این روش در باکتری های دیگر نیز استفاده شده است [۱۷]. در این بررسی برای تعیین نوع و تقسیم بندی کلوستریدیوم دیفیسیل به انواع مختلف، از این روش استفاده گردید. میزان شیوع ریپوتیپ ۱۷ از همه ریپوتیپ ها بیشتر بود و سویه های بدست آمده در سال ۱۳۸۱ همه به غیر از یک مورد از ریپوتیپ ۱۷ تشکیل شده بودند که نشان دهنده بومی بودن این سویه در آن منطقه است. به نظر می رسد پراکندگی ریپوتیپ ها از منطقه ای به منطقه دیگر متفاوت باشد همان طور که در لهستان ریپوتیپ ۱۷ شایع است ریپوتیپ ۱ در انگلستان [۳] و ریپوتیپ ۸۷ در مجارستان [۱۸] و ریپوتیپ های ۷۶، ۷۸ و ۹۷ در کویت [۱۹] از شیوع بیشتری برخوردار هستند. پراکندگی ریپوتیپ های مختلف در نواحی مختلف جهان بیانگر تنوع سویه ها و عدم ارتباط متقابل موارد عفونت در جاهای مختلف دنیا است.

تصویر ۱. باند های الکتروفورزی حاصل از ازدیاد ژنوم RNA ریوزومی بوسیله PCR. از شماره ۱ تا ۹ الگوی باندی مربوط به سویه ها و M مارکر مورد استفاده در این بررسی است. باند های مارکر از بالا به پایین ۱۰۰، ۹۰۰، ۸۰۰، ۷۰۰، ۶۰۰، ۵۰۰، ۴۰۰، ۳۰۰ و ۲۰۰ جفت باز است.

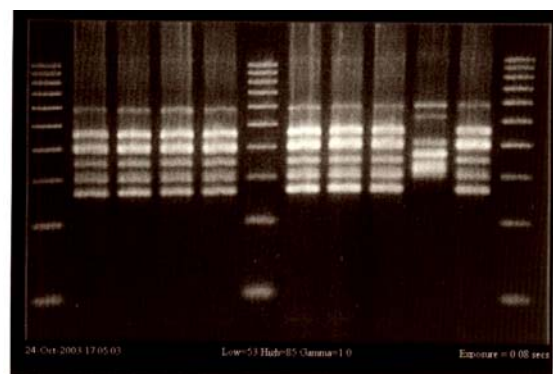
M 1 2 3 4 M 5 6 7 8 M 9



ریپوتیپ مولکولی کلوستریدیوم دیفیسیل با استفاده از پرایمرهای p3 و p5 تولید ۵ تا ۶ محصول ازدیادی با اندازه bp ۲۶۰ تا ۶۰۰ کرد. از مقایسه الگوهای باندی با استفاده از نرم افزار GelCompar و داده های کتابخانه ای، ۷ ریپوتیپ ۱۲، ۱۴، ۱۷، ۱۸، ۲۹، ۷۰ و ۹۰ از ۱۸ سویه مورد آزمایش به دست آمد که ریپوتیپ ۱۷ (۶۱٪) بیشترین موارد را تشکیل می داد. تصویرهای ۱ و ۲، باند های حاصل از الکتروفورز محصول PCR در ۱۸ سویه را نشان می دهند.

تصویر ۲. باند های الکتروفورزی حاصل از ازدیاد ژنوم RNA ریوزومی بوسیله PCR. از شماره ۱۰ تا ۱۸ الگوی باندی مربوط به سویه ها و M مارکر مورد استفاده در این بررسی است. باند های مارکر از بالا به پایین ۱۰۰، ۹۰۰، ۸۰۰، ۷۰۰، ۶۰۰، ۵۰۰، ۴۰۰، ۳۰۰ و ۲۰۰ جفت باز است.

M 10 11 12 13 M 14 15 16 17 18 M



<sup>1</sup> Intergenic Spacer Region

editors. Current Topics in Microbiology and Immunology. Clostridium difficile. Berlin Heidelberg: Spriger-Verlag, 2000: 1-33.

4- Wust J, Sullivan NM, Hardegger U, Wilkins TD. Investigation of an outbreak of antibiotic associated colitis by various typing methods. J Clin Microbiol. 1982 Dec; 16(6):1096-101.

5- Sell TL, Schaberg DR, Fekety FR. Bacteriophage and bacteriocin typing scheme for Clostridium difficile. J Clin Microbiol. 1983 Jun; 17(6): 1148-52.

6- Grutler V. Typing of Clostridium difficile strains by PCR-amplification of variable length 16S-23S rRNA spacer regions. J Gen Microbiol. 1993 Dec; 139(12): 3089-97.

7- Stubbs SL, Brazier JS, O'Neill GL, Duerden BI. PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of Clostridium difficile and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. J Clin Microbiol. 1999 Feb; 37(2): 461-63.

8- Rahmati A, Gal M, Northey G, Brazier JS. Subtyping of Clostridium difficile polymerase chain reaction (PCR) ribotype 001 by repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting. J Hosp Infect. 2005 May; 60 (1): 56-60.

9- O'Neill GL, Ogunsola FT, Brazier JS, Duerden BI. Modification of a PCR ribotyping method for application as a routine typing scheme for Clostridium difficile. Anaerobe. 1996; 2: 205-9.

10- Barbut F, Mario N, Meyohas MC, Binet D, Frottier J, Petit JC. Investigation of a nosocomial outbreak of Clostridium difficile-associated diarrhoea among AIDS patients by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. J Hosp Infect. 1994 Mar; 26(3): 181-9.

11- Martirosian G, Kuipers S, Verbrugh H, Van Belkum A, Meisel-Mikolajczyk F. PCR ribotyping and arbitrarily primed PCR for typing strains of Clostridium difficile from a Polish maternity hospital. J Clin Microbiol. 1995 Aug; 33(8): 2016-21.

12- Bidet P, Lalande V, Salauze B, Burghoffer B, Avesani V, Delmee M, et al. Comparison of PCR-ribotyping, arbitrary primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for typing Clostridium difficile. J Clin Microbiol. 2000; 38 (7): 2484-7.

در این بررسی سویه های با الگوی توکسین زایی A-/B+ بیش از الگوهای A+/B+ و A-B- بود این الگو در گزارش های محققین دیگر نیز به صورت الگوی شایع این ارگانیزم معرفی شده است [۲۲-۲۰]. تمام سویه های مربوط به ریوتیپ ۱۷، بجز یک مورد دارای این الگو بودند و این مورد از بخش مراقبت های ویژه جدا شده بود. از نظر تولید توکسین B همه موارد غیر از این مورد مثبت بودند که دور از انتظار نیست. چنین موردی توسط محققین دیگری نیز گزارش گردیده است [۱۲].

### نتیجه گیری

در پایان می توان نتیجه گرفت که در هر منطقه ای ریوتیپ های خاصی از کلوستریدیوم دیفیسیل از شیوع بیشتری برخوردار است و برای مطالعات اپیدمیولوژیک و تعیین ارتباط بین موارد عفونت های حاصل از این میکروارگانیزم و تعیین ریوتیپ های آن ضرورت دارد. توصیه می شود ضمن شناسایی کلوستریدیوم دیفیسیل در عفونت های بیمارستانی در مراکز بهداشتی و درمانی ایران، ریوتیپ های مربوطه نیز شناسایی شود تا بتوان ضمن پیدا کردن منبع عفونت، ارتباط بین این عفونت ها را پیدا کرد.

### تشکر و قدردانی

از وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی و نیز دانشگاه علوم پزشکی تبریز به خاطر حمایت مالی در دوره فرصت مطالعاتی تقدیر و تشکر می گردد.

### منابع

- 1- Bartlett JG. Clostridium difficile: history of its role as an enteric pathogen and the current state of knowledge about the microorganism. Clin Infect Dis. 1994; 18 (Suppl 4): S265-72.
- 2- Wilks M, Tabaqchali S. Typing of Clostridium difficile by polymerase chain reaction with an arbitrary primer. J Hosp Infect. 1994; 28: 231-4.
- 3- Brazier JS, Borriello SP. Microbiology, epidemiology and diagnosis of Clostridium difficile infection. In: Aktories K, Wilkins TD,

fragment length polymorphism and PCR ribotyping. *J Clin Microbiol.* 2004; 42 (3): 1035-41.

13- Brazier JS. Typing of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect.* 2001 Aug; 7(8): 428-31.

14- Klassen CHW, VanHaren HA, Horrevorts AM. Molecular fingerprinting of *Clostridium difficile* isolates: pulsed-field gel electrophoresis versus amplified fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol.* 2002; 40 (1): 101-4.

15- Johnson S, Sambol SP, Brazier JS, Delmee M, Avesani V, Merrigan MM, et al. International typing study of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* variants. *J Clin Microbiol.* 2003; 41 (4): 1543-7.

16- Spigaglia P, Mastrantonio P. Evaluation of repetitive element sequence-based PCR as a molecular typing method for *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol.* 2003; 41 (6): 2454-7.

17- Seurinck S, Verstraete W, Sisiliano SD. Use of 16S-23S rRNA intergenic spacer region PCR and repetitive extragenic palindromic PCR analyses of *Escherichia coli* isolates to identify nonpoint fecal sources. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69 (8): 4942-50.

18- Urban E, Brazier JS, Soki J, Nagy E, Duerden BI. PCR ribotyping of clinically important *Clostridium difficile* strains from Hungary. *J Med Microbiol.* 2001; 50 (12): 1082-6.

19- Rotimi VO, Gamal WY, Mokaddas EM, Brazier JS, Johnny M, Duerden BI. Prevalent PCR ribotypes of clinical and environmental strains of *Clostridium difficile* isolated from intensive-therapy unit patients in Kuwait. *J Clin Microbiol.* 2003 Aug; 52(pt8): 705-9.

20- 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. *J Clin Microbiol.* 2000 Jul; 38(7): 2706-14.

21- Brazier JS, Stubbs SL, Duerden BI. Prevalence of toxin A negative/B positive *Clostridium difficile* strains. *J Hosp Infect.* 1999 Feb; 37(2): 461-3.

22- Berg RJ, Claas EC, Oyib DH, Klassen CH, Dijkshoorn L, Brazier JS, et al. Characterization of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* isolates from outbreaks in different countries by amplified