کتابخانه مرکزی
دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
شماره ثبت: ۱۵۲۹۰
تاریخ ثبت: ۱۳۹۴/۳/۱۰

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اصفهان

دانشکده ی بهداشت

گروه مهندسی بهداشت محیط

پایان نامه جهت اخذ درجه ی کارشناسی ارشد (MSc)

طرح تحقیقاتی شماره:

۳۹۱۲۱۷

عنوان:

بررسی مقایسه ای توزیع فراوانی باکتری *کلستریدیوم دیفیسیل* در نمونه های فاضلاب ورودی و خروجی تصفیه خانه ی فاضلاب جنوب اصفهان و برکه های تثبیت فاضلاب فولاد شهر

نگارش:

هاجر عقیلی دهنوی

اساتید راهنما:

دکتر مهناز نیک آئین و دکتر محمد جلالی

استاد مشاور:

مهندس اکبر حسن زاده

زمستان۹۳

چکیده

مقدمه

کلستریدیوم دیفیسیل یک باسیل گرم مثبت بیهوازی و تولید کننده ی اسپور می باشد. در طول ۲۰ سال گذشته گونه های بیماریزای *کلستریدیوم دیفیسیل* به عنوان یکی از مهمترین پاتوژن های عامل عفونت بیمارستانی مرتبط با اسهال و کولیت های کشنده پسودوممبرانی ظهور یافته اند. توکسین A و B به عنوان مهمترین عوامل ایجاد بیماری توسط این ارگانیسم، به طور مستقیم با اسهال و کولیت مرتبط می باشند. با وجود این بروز عفونت مرتبط با *کلستریدیوم دیفیسیل* در افراد بدون سابقه تماس با محیط های بیمارستانی و اغلب بدون داشتن عوامل خطر مستعد کننده ی این عفونت، به میزان زیادی در حال افزایش است.

کلستریدیوم دیفیسیل در مدفوع افراد مبتلای بدون علامت و یا باعلامت موجود می باشد بگونه ای که هر فرد مبتلا می تواند تعداد 1×10^{4}-1×10^{7} عدد باسیل *کلستریدیوم دیفیسیل* را به ازاء هر گرم از مدفوع خود به محیط دفع نماید. بنابراین تصفیه خانه های فاضلاب می توانند به عنوان یکی از راه های اصلی انتشار این پاتوژن به محیط زیست باشند. این باکتری به عنوان یک باسیل اسپور زا می تواند تحت شرایط محیطی سخت برای دوره طولانی زمانی زنده بماند. به همین دلیل نیز نگرانی ها در زمینه انتقال این پاتوژن به انسان از طریق محیط های آبی افزایش یافته است.

با این وجود مطالعات اندکی در زمینه ردیابی *کلستریدیوم دیفیسیل* در محیط های آبی مانند تصفیه خانه های فاضلاب که می توانند در انتقال عفونت *کلستریدیوم دیفیسیل* مرتبط با اجتماع (CA-CDI) نقش داشته باشد، انجام شده است.

بنابراین مطالعه ی حاضر به منظور بررسی حضور و سرنوشت نهایی *کلستریدیوم دیفیسیل* در دو سیستم تصفیه فاضلاب شهری مختلف انجام شد.

مواد و روش ها:

در این مطالعه جمعاً ۹۵ نمونه (فاضلاب و لجن) به صورت ماهانه بین مرداد ماه ۹۱ تا تیر ماه ۹۲ از واحد های مختلف دو سیستم تصفیه فاضلاب شامل برکه های تثبیت و لجن فعال برداشت شده و از نظر حضور باکتری *کلستریدیوم دیفیسیل* مورد بررسی قرار گرفت. دمای هوا، دمای فاضلاب و pH نمونه ها نیز ثبت شد. همچنین نمونه های جمع آوری شده از نظر مقدار کل جامدات، جامدات معلق و جامدات فرار، تعداد باکتری های کلیفرم کل و کلیفرم مدفوعی، طبق روش های استاندارد آنالیز شد.

یافته ها:

درمطالعه حاضر *کلستریدیوم دیفیسیل* تنها در ٪۱۳/۶ از نمونه های لجن هضم شده سیستم لجن فعال و ٪۵(۲/۴۰) از نمونه های سیستم برکه های تثبیت (تنها از خروجی برکه بیهوازی و تکمیلی (پساب نهایی)) یافت شد. همه ی گونه های جدا شده نیز تولید کننده توکسین بودند ($tcdB^+$). نتایج آزمون های آماری نیز نشان دهنده عدم وجود ارتباط بین تعداد باکتریهای کلیفرم کل و کلیفرم های مدفوعی، و حضور *کلستریدیوم دیفیسیل* بود.

بحث و نتیجه گیری:

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تصفیه خانه های فاضلاب می توانند به عنوان منابع بالقوه انتشار عفونت *کلستریدیوم دیفیسیل* مرتبط با اجتماع عمل نمایند. با این وجود مطالعات بیشتری برای شناسایی ارتباط بین گونه های جدا شده از محیط و بیماران مبتلا به عفونت مرتبط با اجتماع لازم است.

واژه های کلیدی: *کلستریدیوم دیفیسیل*، برکه های تثبیت فاضلاب، لجن فعال متداول، عفونت مرتبط با اجتماع، PCR، *tcdB*

فهرست مطالب

واژه نامه ..... آ

فهرست مطالب ..... ث

فهرست جداول ..... ج

فهرست اشکال و نمودار ها..... ح

واژه نامه

CDI: *Clostridium Difficile* Infection

WSP: Waste Stabilization Pounds

AS: Activated Sludge

CDC: Control Disease Center

AAD: Antibiotic Associated Diarrhea

PMC: Pseudomembranous Colitis

TS: Total Solids

TSS: Total Suspended Solids

VSS: Volatile Suspended Solids

PFRP: Processes for Significant Removal of Pathogens

PCR: Polymerase Chain Reaction

CA-CDI: Community Associated- *Clostridium Difficile* Infection

فصل اول: کلیات

۱-۱ مقدمه ۲

۱-۲ تاریخچه و اهمیت موضوع ۲

۱-۳ کلیاتی در مورد باکتری *کلستریدیوم دیفیسیل* ۳

۱-۳-۱ خصوصیات میکروبشناختی ۳

۱-۳-۲ فاکتورهای بیماریزایی ۴

۱-۳-۳ پاتوفیزیولوژی ۶

۱-۳-۴ میزان بروز و شدت بیماری و تغییرات آن ۶

۱-۳-۵ عوامل خطر ابتلا به عونت *کلستریدیوم دیفیسیل* ..... ۷.

۱-۳-۶ تولید اسپور ..... ۸.

۱-۴ تظاهرات بالینی در انسان ۹

۱-۵ انتقال از طریق غذا، حیوانات و محیط ۹

۱-۶ اپیدمیولوژی عفونت *کلستریدیوم دیفیسیل* و تغییرات آن در طول زمان ۱۰

۱-۷ بررسی متون ..... ۱۰.

فصل دوم: اهداف، فرضیات سوالات پژوهشی

۲-۱ اهداف و فرضیات ۱۴

۲-۱-۱ هدف کلی ۱۴

۲-۱-۲ اهداف جزئی ۱۴

۲-۱-۳ اهدف کاربردی ۱۵

۲-۲ سوالات پژوهشی ۱۵

۲-۳ فرضیات ۱۶

فصل سوم: مواد و روشها

۳-۱ طرح کلی مطالعه ۱۸

۳-۲ محل های نمونه برداری و تعداد نمونه ها ۱۸

۳-۲-۱ سیستم لجن فعال ۱۸

۳-۲-۲ سیستم برکه های تثبیت فاضلاب ۱۸

۳-۳ روش انجام کار ..... ۱۹.

۳-۳-۱ روش نمونه برداری ..... ۱۹.

۳-۳-۲ آزمایشات میکروبی جهت کشت و جداسازی باسیل *کلستریدیوم دیفیسیل* ..... ۱۹.

۳-۳-۲-۱ کشت نمونه و جداسازی باسیل *کلستریدیوم دیفیسیل* ۱۹

۳-۳-۲-۲ طرز تهیه ی محیط کشت Cycloserine-Fructose Broth ۱۹

۳-۳-۲-۳ طرز تهیه ی محیط کشت . Cycloserine-Fructose Blood-Agar ۲۰

۳-۳-۲-۴ طرز تهیه ی ساپلیمنت ..... ۲۱.

۳-۳-۳ شناسایی و تأیید باکتری *کلستریدیم دیفیسیل* ۲۳

۳-۳-۳-۱ شناسایی باکتری *کلستریدیم دیفیسیل* با استفاده از روش های فنوتیپی و بیوشیمیایی ۲۳

۳-۳-۳-۲ آزمایش تخمیر قند های فروکتوز، و لاکتوز و ساکاروز ۲۳

۳-۳-۳-۳ آزمایش اندول ۲۶

۳-۳-۳-۴ آزمایش حرکت و احیاء نیترات ۲۷

۳-۳-۳-۵ آزمایش گرم ۲۹

۳-۳-۴ آزمایش PCR و تعیین توالی ژن 16srRNA جهت تأیید نهایی ۳۰

۳-۳-۴-۱ شست و شو و استخراج DNA ۳۰

۳-۳-۴-۲ انجام آزمون PCR ۳۰

۳-۴ آزمایش شمارش باکتری های کلیفرم کل و کلیفرم مدفوعی ۳۲

۳-۵ آزمایشات فیزیکوشیمیایی ۳۲

۳-۵-۱ اندازه گیری pH و دمای نمونه و دمای هوا ۳۲

۳-۵-۲ اندازه گیری TS، TSS و VSS ۳۲

۳-۶ نحوه ی تحلیل نتایج ۳۲

فصل چهارم: یافته ها و نتایج

۴-۱ مقدمه ۳۴

۴-۲ سیستم لجن فعال ۳۴

۴-۲-۱ شناسایی و جداسازی باکتری *کلستریدیوم دیفیسیل* ۳۴

۴-۲-۲ شمارش باکتری های کلیفرم کل و کلیفرم مدفوعی ۳۵

۴-۲-۳ خصوصیات فیزیکوشیمیایی نمونه ها ی سیستم لجن فعال و دمای هوا ۳۶

۴-۳ سیستم برکه های تثبیت فاضلاب ۳۷

۴-۳-۱ جداسازی باکتری *کلستریدیوم دیفیسیل* ..... ۳۷.

۴-۳-۲ شمارش باکتری های کلیفرم کل و کلیفرم مدفوعی ۳۸

۴-۳-۳ خصوصیات فیزیکوشیمیایی نمونه های سیستم برکه های تثبیت فاضلاب و دمای هوا ۳۹

۴-۴ تأیید باسیل *کلستریدیوم دیفیسیل* و تعیین گونه های تولید کننده ی توکسین با استفاده از آزمون PCR ۴۰

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

۵-۱ مقدمه ۴۲

۵-۲ شناسایی و جداسازی باکتری *کلستریدیوم دیفیسیل* از دو سیستم لجن فعال و برکه های تثبیت فاضلاب ۴۵

۵-۳ ارتباط حضور باکتری *کلستریدیوم دیفیسیل* با شاخص کلیفرم های کل و کلیفرم های مدفوعی ۴۶

۵-۴ ارتباط حضور باکتری *کلستریدیوم دیفیسیل* با خصوصیات فیزیکوشیمایی نمونه ها (مانند دمای هوا ،دمای نمونه، pH، TS،TSS و VSS) ..... ۴۶.

۵-۵ نتیجه گیری ۴۷

۵-۶ پیشنهادات ۴۷

منابع و مآخذ

چکیده انگلیسی

مقالات چاپ شده

فهرست جداول

جدول ۳-۱: ترکیبات لازم برای تهیه ی محیط کشت Cycloserine-Fructose Broth ۲۰

جدول۳-۲: ترکیبات لازم برای تهیه ی محیط کشت Cycloserine-Fructose Blood-Agar ۲۰

جدول ۳-۳: ترکیبات لازم برای تهیه ی ساپلیمنت ۲۱

جدول ۳-۴: ترکیبات لازم جهت تهیه محیط کشت احیاء نیترات ۲۸

جدول ۳-۵ : نتایج تست های بیوشیمیایی گونه های مختلف ۳۰

جدول ۳-۶: ارتباط بین پارامترهای اندازه گیری شده در سیستم برکه های تثبیت ۳۱

جدول ۳-۷: برنامه دستگاه Thermal cycler جهت تکثیر DNA الگو ..... ۲۹.

جدول ۴-۱: درصد جداسازی کلستریدیوم دیفیسیل از سیستم لجن فعال با استفاده از روش های بیوشیمیایی و مولکولی (PCR) ۳۵

جدول ۴-۲ : نتایج شمارش باکتری های کلیفرم کل و کلیفرم مدفوعی نمونه های سیستم لجن فعال ..... ۳۵.

جدول ۴-۳ : میانگین درصد حذف باکتری های کلیفرم کل و کلیفرم مدفوعی نمونه های سیستم لجن فعال ۳۶

جدول ۴-۴ : نتایج خصوصیات فیزیکوشیمیایی نمونه های سیستم لجن فعال و دمای هوا ۳۶

جدول ۴-۵ : ارتباط بین پارامتر های اندازه گیری شده در سیستم لجن فعال ..... ۳۷.

جدول ۴-۶: درصد جداسازی *کلستریدیوم دیفیسیل* از سیستم برکه های تثبیت با استفاده از روش های بیوشیمیایی و مولکولی (PCR) ..... ۳۸.

جدول ۴-۷ : نتایج شمارش باکتری های کلیفرم کل و کلیفرم مدفوعی نمونه های سیستم برکه های تثبیت فاضلاب ..... ۳۸.

جدول ۴-۸ : میانگین درصد حذف باکتری های کلیفرم کل و کلیفرم مدفوعی نمونه های سیستم برکه های تثبیت فاضلاب ۳۹

جدول ۴-۹: نتایج خصوصیات فیزیکوشیمیایی نمونه های سیستم برکه های تثبیت فاضلاب و دمای هوا ۳۹

جدول ۴-۱۰: ارتباط بین پارامترهای اندازه گیری شده در سیستم برکه های تثبیت ۴۰

فهرست اشکال

شکل ۱-۱: محل بیماریزایی(*PaLoc*) *باکتری کلستریدیوم دیفیسیل*، تولید و ساختار توکسین A و B، و اتصال، خنثی سازی و نحوه عملکرد توکسین در محیط زنده ۵

شکل ۱-۲: بیماریزایی اسهال ناشی از *کلستریدیوم دیفیسیل* ۶

شکل ۳-۱: کشت نمونه ها در محیط Cycloserine-Fructose Broth ۲۳

شکل ۳-۲: ظرف جار به همراه گاز پک جهت ایجاد شرایط بیهوازی ۲۳

شکل ۳-۳: کلنی های *کلستریدیوم دیفیسیل* بر روی محیط کشت Cycloserine-Fructose Blood-Agar ۲۴

شکل ۳-۴: محیط کشت تخمیر قند فروکتوز (تغییر رنگ زرد در اثر تولید اسید به دنبال تخمیر قند). ۲۵

شکل ۳-۵ : محیط کشت قندی آهن دار (TSI). (a): لاکتوز منفی، ساکاروز مثبت، گلوکزمثبت. (b): لاکتوز مثبت، ساکاروز مثبت، گلوکزمثبت. (c): لاکتوز منفی، ساکاروز منفی، گلوکز منفی. ۲۷

شکل ۳-۶: محیط کشت تخمیر اندول. (a):نمونه اندول منفی(عدم ایجاد حلقه اندول به دنبال افزودن معرف کواکس). (b):نمونه ی اندول مثبت (ایجاد حلقه قرمز رنگ اندول به دنبال افزودن معرف کواکس) ۲۸

شکل۳-۷: محیط کشت احیاء نیترات. (a): نمونه مثبت (عدم ایجاد رنگ صورتی به دنبال افزودن معرف A و B و پودر روی).(b): نمونه مثبت (ایجاد تغییر رنگ به دنبال افزودن معرف A و B) ۳۰

شکل ۴-۱ : تصویر ژل الکتروفورز ۱/۵٪ از محصول PCR باکتریهای *کلستریدیوم دیفیسیل* جهت تشخیص ژن *tcdB*.(۱و۲):گونه ی $tcdB^+$، (۳): نمونه کنترل منفی، (۴): نمونه کنترل مثبت، (۵):مارکر ۴۵

منابع

1. NRC, Committee on Toxicants Pathogens in Biosolids Applied to Land. Biosolids applied to land: Advancing standards and practices: Natl Academy Pr; 2002.
2. Paillard D, Dubois V, Thiebaut R, Nathier F, Hoogland E, Caumette P, et al. Occurrence of Listeria spp. in effluents of French urban wastewater treatment plants. Applied and environmental microbiology. 2005;71(11):7562-6.
3. Hall I, O'Toole E. Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine. 1935;49(2):390.
4. Bartlett J, Moon N, Chang T, Taylor N, Onderdonk A. Role of Clostridium difficile in antibiotic-associated pseudomembranous colitis. Gastroenterology. 1978;75(5):778.
5. Zilberberg MD, Shorr AF, Kollef MH. Increase in adult Clostridium difficile–related hospitalizations and case-fatality rate, United States, 2000–2005. Emerging infectious diseases. 2008;14(6):929.
6. Dubberke ER, Haslam DB, Lanzas C, Bobo L, Burnham CA, Gröhn Y, et al. The ecology and pathobiology of Clostridium difficile infections: an interdisciplinary challenge. Zoonoses and public health. 2011;58(1):4-20.
7. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens Jr RC, Kazakova SV, Sambol SP, et al. An epidemic, toxin gene–variant strain of Clostridium difficile. New England Journal of Medicine. 2005;353(23):2433-41.
8. Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J, et al. Toxin production by an emerging strain of Clostridium difficile associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. The Lancet. 2005;366(9491):1079-84.
9. Zidaric V, Zemljic M, Janezic S, Kocuvan A, Rupnik M. High diversity of Clostridium difficile genotypes isolated from a single poultry farm producing replacement laying hens. Anaerobe. 2008;14(6):325-7.
10. 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.
11. Al Saif N, Brazier J. The distribution of Clostridium difficile in the environment of South Wales. Journal of Medical Microbiology. 1996;45(2):133-7.
12. Romano V, Pasquale V, Krovacek K, Mauri F, Demarta A, Dumontet S. Toxigenic Clostridium difficile PCR ribotypes from wastewater treatment plants in Southern Switzerland. Applied and environmental microbiology. 2012;78(18):6643-6.
13. Arroyo LG, Kruth SA, Willey BM, Staempfli HR, Low DE, Weese JS. PCR ribotyping of Clostridium difficile isolates originating from human and animal sources. Journal of Medical Microbiology. 2005;54(2): 6-163.
14. Laine J, Huovinen E, Virtanen M, Snellman M, Lumio J, Ruutu P, et al. An extensive gastroenteritis outbreak after drinking-water contamination by sewage effluent, Finland. Epidemiology and infection. 2011;139(7):1105-13.
15. Riggs MM, Sethi AK, Zabarsky TF, Eckstein EC, Jump RL, 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(8):992-8.
16. Kelly CnP, LaMont JT. Clostridium difficile—more difficult than ever. New England Journal of Medicine. 2008;359(18):1932-40.

17. Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. Clostridium difficile infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. Nature Reviews Microbiology. 2009;7(7):526-36.
18. McDonald LC, Owings M, Jernigan DB. Clostridium difficile infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996–2003. Emerging infectious diseases. 2006;12(3):409.
19. 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.
20. Loo VG ,Poirier L, Miller MA, Oughton M, Libman MD, Michaud S, et al. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of Clostridium difficile–associated diarrhea with high morbidity and mortality. New England Journal of Medicine. 2005;353(23):2442-9.
21. Muto CA, Pokrywka M, Shutt K, Mendelsohn AB, Nouri K, Posey K, et al. A large outbreak of Clostridium difficile-associated disease with an unexpected proportion of deaths and colectomies at a teaching hospital following increased fluoroquinolone use. Infection Control and Hospital Epidemiology. 2005;26(3):273-80.
22. Ananthakrishnan AN. Clostridium difficile infection: epidemiology, risk factors and management. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology. 2010;8(1):17-26.
23. Fellmeth G, Yarlagadda S, Iyer S. Epidemiology of community-onset Clostridium difficile infection in a community in the South of England. Journal of Infection and Public Health. 2010;3(3):118-23.
24. Wilcox MH, Fawley WN. Hospital disinfectants and spore formation by Clostridium difficile. The Lancet. 2000;356(9238):1324.
25. Bartlett JG, Chang TW, Gurwith M, Gorbach SL, Onderdonk AB. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. New England Journal of Medicine. 1978;298(10):531-4.
26. Louie TJ ,Emery J, Krulicki W, Byrne B, Mah M. OPT-80 eliminates Clostridium difficile and is sparing of bacteroides species during treatment of C. difficile infection. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2009;53(1):261-3.
27. Janvilisri T, Scaria J, Thompson AD ,Nicholson A, Limbago BM, Arroyo LG, et al. Microarray identification of Clostridium difficile core components and divergent regions associated with host origin. Journal of bacteriology. 2009;191(12):3881-91.
28. Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP. Asymptomatic carriage of Clostridium difficile and serum levels of IgG antibody against toxin A. New England Journal of Medicine. 2000;342(6):390-7.
29. Keel M, Songer J. The comparative pathology of Clostridium difficile-associated disease. Veterinary Pathology Online. 2006;43(3):225-40.
30. Baverud V. Clostridum difficile diarrhea: infection control in horses. Veterinary Clinics of North America-Equine Practice. 2004 Dec;20(3):615.+-
31. Broda DM, Delacy KM, Bell RG, Braggins TJ, Cook RL. Psychrotrophic Clostridium spp. associated with 'blown pack'spoilage of chilled vacuum-packed red meats and dog rolls in gas-impermeable plastic casings. International Journal of Food Microbiology. 1996;29(2):335-52.
32. Weese JS, Rousseau J, Arroyo L. Bacteriological evaluation of commercial canine and feline raw diets. The Canadian Veterinary Journal. 2005;46(6):513.
33. Rodriguez-Palacios A, Staempfli HR, Duffield T, Weese JS. Clostridium difficile in retail ground meat, Canada. Emerging infectious diseases. 2007;13(3):485.

34. Limbago BM, Long CM, Thompson AD, Killgore GE, Hannett GE, Havill NL, et al. Clostridium difficile strains from community-associated infections. Journal of Clinical Microbiology. 2009;47(9):3004-7.
35. 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.
36. Control CfD, Prevention. Severe Clostridium difficile-associated disease in populations previously at low risk--four states, 2005. MMWR Morbidity and mortality weekly report. 2005;54(47):1201.
37. Nolan N, Kelly C, Humphreys J, Cooney C, O'Connor R, Walsh T, et al. An epidemic of pseudomembranous colitis: importance of person to person spread. Gut. 1987;28(11):1467-73.
38. Simango C. Prevalence of Clostridium difficile in the environment in a rural community in Zimbabwe. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2006;100(12):1146-50.
39. Zidaric V, Beigot S, Lapajne S, Rupnik M. The occurrence and high diversity of Clostridium difficile genotypes in rivers. Anaerobe. 2010;16(4):371-5.
40. Viau E, Peccia J. Survey of wastewater indicators and human pathogen genomes in biosolids produced by class A and class B stabilization treatments. Applied and environmental microbiology. 2009;75(1):164-74.
41. Pasquale V, Romano VJ, Rupnik M, Dumontet S, ižnár I, Aliberti F, et al. Isolation and characterization of Clostridium difficile from shellfish and marine environments. Folia microbiologica. 2011;6(5):431-7.
42. Pasquale V, Romano V, Rupnik M, Capuano F, Bove D, Aliberti F, et al. Occurrence of toxigenic Clostridium difficile in edible bivalve molluscs. Food Microbiology. 2012;31(2):309-12.
43. Bazaid F. Distribution and Sources of Clostridium difficile Present in Water Sources. A Thesis Presented to The University of Guelph, In partial fulfilment of requirements For the degree of Master of Science In Food Science, Guelph, Ontario, Canada 2013.
44. Rahimi E, Afzali ZSa, Torki Baghbadorani Z. Clostridium difficile in ready-to-eat foods in Isfahan and Shahrekord, Iran. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. The Asian Pac J Trop Biomed 2015;5(2):128-131.
45. Esfandiari Z, Jalali M, Ezzatpanah H, Weese JS, Chamani M. Prevalence and Characterization of Clostridium difficile in Beef and Mutton Meats of Isfahan Region, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2014;7(8).
46. Rahimi E, Momtaz H, Hemmati M.Occurrence of Clostridium difficile in Raw Bovine, Ovine, Caprine, Camel and Buffalo Milk in Iran. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 2014;20(3): 371-374.
47. Wilson KH, Kennedy MJ, Fekety FR. Use of sodium taurocholate to enhance spore recovery on a medium selective for Clostridium difficile. Journal of clinical microbiology. 1982;15(3):443-6.
48. Balows, A., et al. Manual of clinical microbiology. American Microbiology Society, 5 edition. 1991: 1149-1155.
49. Association APH, Association AWW, Federation WPC, Federation WE. Standard methods for the examination of water and wastewater :American Public Health Association,20th edition.1915;2:1833-34
50. Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. 1991 1991:125-75.

51. Lemee L, Dhalluin A, Testelin S, Mattrat M-A, Maillard K, Lemeland J-F, 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):5710-4.
52. Pillai SD, Widmer KW, Dowd SE, Ricke SC. Occurrence of airborne bacteria and pathogen indicators during land application of sewage sludge. Applied and environmental microbiology. 1996;62(1):296-9.
53. Marcheggiani S, Iaconelli M, D'angelo A, Pierdominici E, La Rosa G, Muscillo M, et al. Microbiological and 16S rRNA analysis of sulphite-reducing clostridia from river sediments in central Italy. BMC microbiology. 2008;8(1):171.

Abstract

Introduction

Clostridium difficile is an anaerobic Gram-positive spore forming bacillus which found in the small intestine of newborn infants as a component of the normal microbiota. In the past 20 years, toxigenic *C. difficile* has emerged as one of the most important pathogens of nosocomial infections which associated with many cases of diarrhea (AAD) and potentially fatal pseudomembranous colitis. Toxin A and toxinB are the main virulence factors of *C. difficile* which directly mediates diarrhea and colitis. However, incidence of community associated *C. difficile* infection (CA-CDI) is increasingly recognized in persons with no apparent health care setting contacts and often without known *C. difficile* infection risk factors .

C. difficile is present in feces of symptomatic and asymptomatic infected patients with CDI. A patient can excrete about 1×10^4- 1×0^7 *C. difficile* per gram of feces which, therefore enter in hospital and domestic wastewaters. Therefore, Wastewater treatment plants (WWTPs) could act as a major pathway for dissemination of *C. difficile* into natural environment. As a spore former *C. difficile* can survive in the environment for a long period of time. These facts support concerns about transmission of this pathogen to human through aquatics environments.

Only a few studies, however, have investigated presence of *C.difficile* in aquatic environments such as wastewaters that could potentially contribute to community-associated CDI.

Gaining a better understanding of *C. difficile* environmental sources could provide information about dissemination routs of this pathogen in the environment. To address this need, the present study was carried out to investigate the prevalence and fate of *C. difficle* in two types of WWTPs.

Material and methods

A total of 95 samples were taken from two types of WWTPs, between September 2012 and April 2013. Wastewater and sludge were analyzed for total coliforms, fecal coliforms and *C. difficile* immediately after arrival at the laboratory. Temperature of air and wastewater samples, pH, total solid, total suspended solids,volatile suspended solids of samples were also measured.

Total and fecal coliforms were analyzed by multiple-tube fermentation technique (MFT) according to the *Standard methods.*

Results and and Discussion

In the present study *C. difficile* was found in 13.6% (3/22) of digested sludge samples in activated sludge system, and 5% (2/40) samples of waste stabilization pound system. The results of PCR assay showed that all detected *C. difficile* were tcdB positive.

Also, Statistical analysis showed no relationship between the number of total and fecal coliforms with the presence of *C. difficile* in positive samples.

Conclusion

In conclusion the results of present study revealed that WWTPs are potential sources for the dissemination of *C.difficil* in the environment and may act as a source of community-associated CDI. However, further researches are needed to establish the relationship between environmental strains and those from community-acquired patients.

Key words: *Clostridium difficile*, waste stabilization pounds, Activated Sludge *Clostridium difficile* infection, PCR, *tcdB*