

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دوره ۳۳ شماره ۶ بهمن و اسفند ۱۳۹۰ صفحات ۱۸-۱۳

تعیین حساسیت کلستریدیوم دیفیسیل های جدا شده از پرسنل مرکز آموزشی و درمانی امام رضا(ع) تبریز

محمد نقی اخی: مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، گروه باکتری و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
طاهره پیرزاده: گروه باکتری و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران، نویسنده رابط:
E-mail: t_pirzad@yahoo.com

محمد آقازاده: گروه باکتری و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
یوسف بافنده: گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
مرتضی قوجازاده: گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
محسن مژده بر: مرکز آموزشی و درمانی امام رضا(ع) تبریز، تبریز، ایران
بهرزپور اصغری: مرکز آموزشی و درمانی امام رضا(ع) تبریز، تبریز، ایران

دریافت: ۸۹/۸/۲۲ پذیرش: ۹۰/۱/۶

چکیده

زمینه و اهداف: تعیین حساسیت کلستریدیوم دیفیسیل در آزمایشگاه ها بطور روتین انجام نمی شود. هدف از این مطالعه تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی کلستریدیوم دیفیسیل های جدا شده از پرسنل بیمارستان و ارزیابی درصد جداسازی این باکتری از مدفوع توسط سه روش مختلف برای اولین بار در تبریز بود.

مواد و روش ها: تعداد ۱۰۰ نمونه مدفوع پرسنل درمانی بیمارستان جمع آوری و سه روش استاندارد بیهوازی: کشت مستقیم در محیط CCFA، کشت در محیط آگار خوندار پس از غنی سازی با ۱٪ املاح صفراوی و شوک الکلی بر روی آنها اجرا گردید. کلنی های مشکوک با بوی مخصوص طویله اسب از طریق تستهای بیوشیمیایی تعیین هویت شدند. تمام ایزوله ها با روش دیسک دیفیوژن نسبت به ۱۴ آنتی بیوتیک تعیین حساسیت گردیدند. حداقل غلظت ممانعتی (MIC) ایزوله ها با استفاده از E-test در مقابل وانکومایسین و مترونیدازول تعیین شد.

یافته ها: یکصد نمونه مدفوع از پرسنل شامل ۶۶٪ مونث و ۳۴٪ مذکر جمع آوری گردید. نتایج نشان دادند که تفاوت سنی و جنسی در این تحقیق از نظر آماری معنی دار نبود ($P=0/12$, $P=0/16$). تعداد ۱۸ کلستریدیوم دیفیسیل از پرسنل ۱۳ بخش بیمارستان جدا گردید. بیشترین تعداد از بخش های داخلی و ICU (هر کدام ۵ ایزوله) و کمترین از اورتوپدی و فیزیوتراپی (هر کدام ۱ ایزوله) جدا گردید. هیچ ایزوله مقاومی نسبت به وانکومایسین و مترونیدازول با روشهای دیسک دیفیوژن و E-test مشاهده نگردید.

تمام ایزوله ها نسبت به پلی میکسین B و سفتریاکسون ۱۰۰٪ مقاوم بودند. میزان جداسازی کلستریدیوم دیفیسیل با روش های غنی سازی ۰/۱٪ صفرا و الکل شوک بطور معنی داری بالاتر از کشت در محیط CCFA می باشد ($P=0/02$, $P=0/04$).

نتیجه گیری: پرسنل مرکز آموزش - درمانی امام رضا(ع) می تواند به عنوان منبع ذخیره های آلودگی کلستریدیوم دیفیسیل باشد. کلیه ایزوله ها حساس به آنتی بیوتیک های وانکومایسین و مترونیدازول بودند. میزان جدا سازی کلستریدیوم دیفیسیل توسط روش های غنی سازی بالاتر از کشت در محیط CCFA است.

کلید واژه ها: کلستریدیوم دیفیسیل، مقاومت آنتی بیوتیکی، وانکومایسین، مترونیدازول، کشت بیهوازی

مقدمه

کلوستریدیوم دیفیسیل باکتری گرم مثبت اسپوردار بیهوازی و یکی از مهمترین عوامل عفونتهای بیمارستانی بشمار می آید (۱و۲). بیماری در فرمهای مختلف مثل یک اسهال ساده خود محدود شونده (Self-limiting)، کولیت حاصل از مصرف آنتی بیوتیک (Antibiotic associated colitis= AAC)، *C. difficile*- associated (diarrhea= (CDAD) Pseudomembranous colitis (PMC شناخته شده است. این باکتری عامل ۲۵-۱۰٪ موارد اسهال حاصل از آنتی بیوتیکها بوده و تقریباً مسئول تمام موارد PMC همراه با آنتی بیوتیکها می باشد (۳و۲). از آنجائیکه اسپور این باکتری مقاوم به اسید می باشد لذا به آسانی از طریق محیط بیمارستانی، وسایل مشترک، دست های ناقلینی چون پرسنل بیمارستانی و هم اتاقی ها، ظروف و ملافه آلوده به انسان سالم منتقل می گردد (۴).

لذا تعداد حاملین بدون علائم در میان بستری شدگان در بیمارستان ها خیلی بیشتر از آنهاست که علائم بالینی نشان می دهند (۱).

خطر کلونیزاسیون با طولانی شدن زمان بستری در بیمارستان افزایش می یابد. تقریباً ۲۰٪ از بیماران بستری شده دارای مدفوع کلونیزه شده و بدون علامت می باشند و خطر ظهور PMC با مصرف آنتی بیوتیک در این افراد بیش از انسان های سالم است در مقابل میزان این کلونیزاسیون در جامعه انسان های سالم ۱-۳٪ می باشد (۵و۱).

درصد آلوده شدگان به کلوستریدیوم دیفیسیل در کل بیماران بستری شده در امریکا از ۲۷٪ در قبل از سال ۲۰۰۰ به ۵۱٪ در سال ۲۰۰۳ افزایش یافته است و این در حالی است که در بیماران نسبتاً مسن این افزایش قابل توجه تر است بطوریکه آمار تهیه شده در سالهای اخیر نشان دهنده ابتلای ۲۲۸ نفر در میان ۱۰۰۰۰۰ نفر از افراد بالای ۶۵ سال در مدت یکسال می باشد. اما این آمار در بیماران سرپائی به مراتب کمتر بوده و حدود ۵٪ در میان ۱۰۰۰۰۰ نفر در یکسال می باشد (۶).

از نظر اقتصادی نیز این نوع آلودگی ها منجر به طولانی شدن زمان بستری در بیمارستان ها شده و هزینه های بالائی را به بیمار و بیمارستان تحمیل می نماید. البته میزان مرگ و میر در افرادی که درمان خوبی دریافت نکرده و یا با تاخیر زیاد نسبت به درمان اقدام می نمایند تا ۳۰٪ افزایش می یابد (۷).

درمان اولیه اسهال های همراه با مصرف آنتی بیوتیک قطع آنتی بیوتیک عامل و جبران مایعات و الکترولیت ها و نهایتاً در بیمارانی که به این درمان ها پاسخ مناسب ندهند استفاده از آنتی بیوتیکهایی مثل مترونیدازول و وانکومیسین می باشد (۸).

تعیین حساسیت *in vitro* به این دو آنتی بیوتیک بصورت روتین در آزمایشگاه ها انجام نشده و فرض بر این است که کلوستریدیوم دیفیسیل به این آنتی بیوتیک ها حساس هستند اما کاهش حساسیت و مقاومت به وانکومیسین و نیز مقاومت به مترونیدازول در نقاط مختلف دنیا گزارش گردیده است (۹و۱۰،

۱۱و۱۲) و این در حالی است که حساسیت این ارگانیسم به این دو آنتی بیوتیک هنوز در بسیاری از نواحی دنیا از طریق تحقیقات مختلف ثابت می شود (۵، ۱۳ و ۱۴).

هدف از این مطالعه جستجوی حاملین این باکتری در میان کارکنان بخش درمانی و تعیین الگوی مقاومت ایزوله ها نسبت به آنتی بیوتیکهای مختلف، تعیین MIC آنها نسبت به مترونیدازول و وانکومیسین در جهت بررسی پیدایش احتمالی مقاومت نسبت به این دو آنتی بیوتیک مهم درمانی و نهایتاً مقایسه کارائی سه روش استاندارد بکار برده شده در ایزوله سازی کلوستریدیوم دیفیسیل می باشد.

مواد و روشها

جمع آوری نمونه: در کل تعداد ۱۰۰ نمونه مدفوع در ظروف پلاستیکی از کادر درمانی ۱۳ بخش مختلف مرکز آموزش- درمانی امام رضا تبریز در مدت ۴ ماه از اول دی ماه ۱۳۸۸ تا آخر فروردین ماه ۱۳۸۹ جمع آوری گردید. نمونه ها از میان کارکنانی انتخاب شدند که حداقل سه سال در یکی از بخش های بیمارستان شاغل بوده اند. در صورت عدم وجود امکانات لازم برای تحویل سریع نمونه ها به آزمایشگاه میکروب شناسی، آنها حداکثر تا ۴۸ ساعت در یخچال نگهداری شدند (۵، ۱۵).

روش کار: یک گرم (می توان مقداری از مدفوع را اول در BHI حل کرد و سپس با یک میلی لیتر الکل اتیلیک مخلوط کرد) و یا یک میلی لیتر از مدفوع را با حجم برابر از الکل اتیلیک ۹۶ درجه مخلوط کرده و خوب بهم زده و بمدت ۶۰ دقیقه در حرارت آزمایشگاه قرارداد شدند. مایع بالایی بدور ریخته شد و رسوب آن به محیط کشت کلمبیا آگار حاوی ۵٪ خون گوسفند کشت داده شدند. یک لوپ از مدفوع نیز مستقیماً به محیط (Cycloserine-Cefoxitin-Fructose Agar, CCFA) حاوی ۵٪ خون گوسفند و ۲۵۰mg/Lit Cefoxitin 8mg/Lit Cycloserine کشت داده شد. همزمان با اجرای روشهای فوق مقداری از مدفوع را در ۹ میلی لیتر تیوگلیکولات بعلاوه ۰/۱٪ Taurocholate sodium حل کرده و آنرا بمدت ۷ روز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه نمودیم. سپس ۲ میلی لیتر از آبگوشت فوق را با ۲ میلی لیتر الکل مطلق مخلوط نموده و بمدت ۶۰ دقیقه در حرارت اتاق قرار دادیم. پس از سانتریفیوژ بمدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۸۰۰، مایع بالایی را دور ریخته واز رسوب به محیط کشت کلمبیا آگار حاوی خون گوسفند تلقیح نمودیم. کلیه پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در شرایط بیهوازی بمدت ۴۸ ساعت و یا تا ۵ روز انکوبه و سپس کلنی های مشکوک بررسی گردیدند. برای ایجاد شرایط بیهوازی مطلق از دستگاه Anoxomat استفاده شد و اتمسفری برابر با CO₂=10% H₂=10%, N₂=80% تولید گردید.

از کلنی های مشکوک و زرد بر روی CCFA و کلمبیا آگار با بوی مخصوص طویله اسب که نور فلورسنت زرد سبز در مقابل

۷/۵۵ ± ۳۷/۶۳ سال با کمترین سن ۲۵ و بیشترین سن ۵۱ بود. نتایج آزمون t-test و آزمون مجذور کای نشان دادند که تفاوت سنی و جنسی در این تحقیق از نظر آماری معنی دار نبود ($P=0/12$, $P=0/16$) (نمودار ۱). تعداد ۱۸ کلستریدیوم دیفیسیل از پرسنل ۱۳ بخش بیمارستان جدا گردید (نمودار ۲). بیشترین تعداد از بخش‌های داخلی و ICU (هر کدام ۵ ایزوله) و کمترین از اورتوپدی و فیزیوتراپی (هر کدام ۱ ایزوله) جدا گردید در بقیه بخش‌ها کلستریدیوم دیفیسیل جدا نگردید.

درصد جداسازی کلستریدیوم دیفیسیل ۱۱/۱٪ (۲ مورد)، ۳۸/۹٪ (۷ مورد) و ۵۰٪ (۹ مورد) به ترتیب در روش‌های کشت مستقیم در CCFA، الکل شوک و غنی سازی با املاح صفاوی بود. اگر چه با روش غنی سازی ۹ مورد و با روش الکل شوک ۷ مورد کلستریدیوم دیفیسیل جدا گردید اما از نظر آماری معنی دار نبود ($P=0/39$).

اما مقایسه روش‌های غنی سازی و نیز الکل شوک با کشت در CCFA برتری دو روش اول را در جداسازی نشان دادند و از نظر آماری معنی دار بودند ($P=0/02$, $P=0/04$).

نتایج تست تعیین حساسیت ایزوله‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌ها در جدول شماره ۱ آورده شده است. کلیه ایزوله‌ها نسبت به وانکومیسین با حداقل غلظت ممانعتی $0/19-2 \mu\text{g/ml}$ MIC و مترونیدازول با حداقل غلظت ممانعتی $0/38-2 \mu\text{g/ml}$ MIC نیز در تست دیسک دیفیوژن حساس بودند.

UV=365nm از خود متصاعد نمودند کشت دوباره تهیه کرده و سپس از طریق مورفولوژی کلنی، رنگ آمیزی گرم، و سایر تست‌های استاندارد تعیین هویت گردیدند.

طبق این روش غنی سازی ۹۴٪ از سویه‌ها قابل کشت می‌باشند (۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱). برای تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله‌ها از محیط کشت بروسلا آگار غنی شده با ویتامین K و همین و ۱۶ دیسک آنتی بیوتیکی ساخت شرکت Mast بشرح زیر استفاده گردید.

روش کیربای بائر (Kirby- Bauer) اصلاح شده برای انجام آزمایش دیسک دیفیوژن بیهوازی‌ها انتخاب گردید (۲۲). برای تعیین MIC نسبت به وانکومیسین و مترونیدازول از محیط کشت مولر هیتون خوندار و دستورالعمل شرکت سازنده E-test استفاده شد.

Metronidazole (MZ5 μg), vancomycin (VA30 μg), clindamycin (CD2 μg), gentamicin (GM120 μg), rifampin (RP5 μg) chloramphenicol (C30 μg), erythromycin (E15 μg), tetracycline (T30 μg), imipenem (IMI10 μg), Ciprofloxacin (CIP5 μg), polymyxin B (PB300U), Piperacillin / Tazobactam (PTZ110 μg), Amoxiclav (AC30 μg), Ceftriaxone (CRO30 μg)

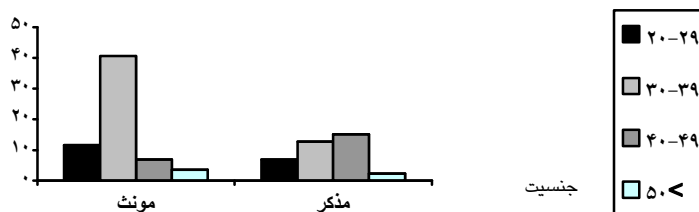
یافته‌ها

یکصد نمونه مدفوع از پرسنل شامل ۶۶٪ مونث و ۳۴٪ مذکر جمع آوری گردید. میانگین سنی زنان $25/20 \pm 6/53$ سال با کمترین سن ۲۴ و بیشترین سن ۵۷ سال بود. میانگین سنی مردان

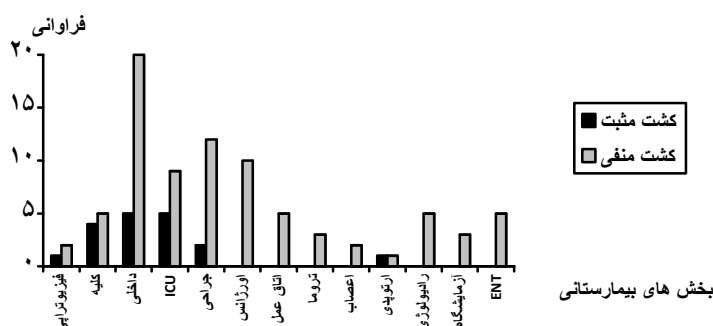
جدول ۱: الگوی حساسیت ۱۸ کلستریدیوم دیفیسیل جدا شده از پرسنل بیمارستان امام رضا (ع)

حد واسط٪	مقاوم٪	حساس٪	آنتی بیوتیک‌ها
-	-	۱۰۰	وانکومیسین
-	-	۱۰۰	مترونیدازول
-	۱۶/۶۸	۸۳/۳۲	ایمی پنم
-	۱۶/۶۸	۸۳/۳۲	کلرامفنیکل
-	۱۰۰	۰	پلی میکسین ب
۱۱/۱۱	۱۱/۱۱	۷۷/۸۷	ریفام پین
-	۳۸/۸۹	۶۱/۱۱	اریترومایسین
-	۳۳/۳۴	۶۶/۶۶	آموکسی کلاو
۵/۵۵	۶۱/۱۲	۳۳/۳۳	کلیندامایسین
-	۶۶/۶۶	۳۳/۳۴	پیراسیلین / تازوباکتام
-	۷۷/۸۷	۲۲/۲۳	تراسیکلین
-	۸۸/۸۹	۱۱/۱۱	جتتامایسین
-	۸۸/۸۹	۱۱،۱۱	سیروفلوکساسین
-	۱۰۰	۰	سفترایکسون

در صد



نمودار ۱: توزیع فراوانی افراد مورد مطالعه بر حسب جنس



نمودار ۲: توزیع فراوانی کشت های مثبت و منفی نسبت به بخش ها

بحث

در ۱۹۹۴ در اسپانیا ۶/۳٪ مقاومت به مترونیدازول ($16 \mu\text{g/ml}$) در میان ۷۸ ایزوله (۲۴) گزارش گردید.

Wong et al مقاومت بسیار بالائی را در میان ایزوله های بالینی ($\text{MIC} > 64 \mu\text{g/ml}$) گزارش نمود (۲۵). محققین اسپانیائی ۱۳ کلاستریدیوم دیفیسیل با حساسیت کاهش یافته به وانکومیسین مشاهده کردند. در این تحقیق مثل بسیاری از مطالعات دیگر کلاستریدیوم دیفیسیل های جدا شده صد درصد حساس به مترونیدازول و وانکومیسین بود (۶، ۱۳ و ۱۴).

اگر چه در بعضی مناطق دنیا ایزوله هائی با کاهش حساسیت و یا مقاوم نسبت به این دو آنتی بیوتیک مشاهده شده است (۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲)، بنظر میرسد علت اینکه در این تحقیق بر عکس بسیاری از منابع جنسیت و سن در حمل باکتری معنی دار نبوده ($P=0/12$) انتخاب نمونه از میان افرادی با سنین پائین تر از ۶۰ سال بوده است.

روش غنی سازی بکار برده شده در این تحقیق یک روش حساس بود و طولانی شدن زمان قبل از کشت و کم و زیاد بودن مقدار نمونه تاثیر قابل توجهی روی نتایج نداشت.

این اولین مطالعه کشت و تعیین حساسیت کلاستریدیوم دیفیسیل نسبت به آنتی بیوتیک های رایج و نیز وانکومیسین و مترونیدازول در تبریز می باشد. نبود اطلاعات کافی در باره این باکتری در کشورمان و انتشار مقالات علمی گوناگون در مجامع علمی دنیا در باره کسب مقاومت این باکتری مهم عفونتهای بیمارستانی به وانکومیسین و مترونیدازول اهمیت اجرای این طرح را مطرح می سازد. از ۱۸٪ نمونه ها کلاستریدیوم دیفیسیل ایزوله گردید.

اطلاعات بسیار کمی در این مورد در دسترس می باشد اما در بعضی مطالعات از دست ها و مدفوع پرسنل این باکتری قابل کشت بوده است (۲۳). علت این امر می تواند عدم ارتباط نزدیک پرسنل تحت آزمایش با بیماران مبتلا در یک بخش متمرکز شده باشد.

معمول ترین آنتی بیوتیکی که برای درمان عفونت حاصل از کلاستریدیوم دیفیسیل استفاده می شود شامل وانکومیسین و مترونیدازول می شود اغلب آزمایشگاه ها کلاستریدیوم دیفیسیل را حساس نسبت به این دو دارو فرض می کنند علیرغم اینکه در سال

سویه‌های مقاوم کلستریدیوم دیفیسیل نسبت به وانکومایسین و مترونیدازول در نقاط مختلف دنیا، در تبریز هیچ گونه ایزوله مقاوم به این دو آنتی بیوتیک مهم از پرسنل جدا نگردید اما تغییرات نسبتاً زیادی در الگوی مقاومت آنها قابل مشاهده می‌باشد. استفاده از روش غنی سازی و الکل شوک تاثیر معنی داری در جدا سازی کلستریدیوم دیفیسیل ها از مدفوع دارد.

تقدیر و تشکر

محققین وظیفه خود می‌دانند که از تامین و حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه و از همکاری و مساعی نظر مسئولین و کارکنان مرکز درمانی و آموزشی امام رضا(ع) نهایت سپاسگزاری و تشکر را داشته باشند.

استفاده از املاح صفراوی در بسیاری از تحقیقات در تبدیل فرم اسپور باکتری به حالت رویشی ثابت شده است (۱۹) و احتمالاً مفید در حمل نمونه مدفوع در شرایط غیر دلخواه می باشد. این نتایج با نتایج بسیاری از محققین هماهنگ می باشد (۲۱،۱۵). اگرچه با روش غنی سازی صفر ۹ مورد و با روش الکل شوک ۷ مورد کلستریدیوم دیفیسیل جدا گردید اما از نظر آماری معنی دار نبود ($P=0/39$).

مقایسه روشهای غنی سازی و الکل شوک با کشت در CCFA برتری دوروش اول را در جداسازی این باکتری نشان دادند و از نظر آماری معنی دار بودند ($P=0/04$, $P=0/02$). این نتیجه نیز با مشاهدات بعضی از محققین دیگر مطابقت دارد (۲۱).

نتیجه گیری

پرسنل مرکز آموزشی و درمانی امام رضا به عنوان حاملین سالم کلستریدیوم دیفیسیل قابل مطرح می‌باشد. علیرغم گزارش

References

- Barbut F, Corthier G, Charpak Y, Cerf M, Monteil H, Fosse T. Prevalence and pathogenicity of *C. difficile* in hospitalized patients. *Arch Intern Med* 1996; **156**(13): 1449-1454.
- Poxton IR, McCoubrey J, Blair G. The pathogenicity of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect* 2001; **7**: 421-427.
- Bartlett JG. *Clostridium difficile*: History of its role as an enteric pathogen and the current state of knowledge about the organism. *Clin Infect Dis* 1994; **18** Suppl 4: 265-272.
- McDonald LC, Owings M, Jernigan DB. *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospital. *Emerg Infect Dis* 2006; **12**(3): 409-415.
- Riley TV. *Clostridium difficile*: A pathogen of the nineties. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; **17**: 137-141.
- Zar FA, Bakkanagari SR, Moorthi KM, Davis MB. A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of *C. difficile* -associated diarrhea, stratified by disease severity. *Clin Infect Dis* 2007; **45**(3): 302-307.
- Johnson S, Gerding N. *Clostridium difficile* - Associated diarrhea. *Clin Infect Dis* 1998; **26**: 1027-1036.
- Pelaez T, Alcalá L, Alonso R, Rodríguez- Creixems M, García- Lechuz JM. Reassessment of *Clostridium difficile* susceptibility to metronidazole and vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**(6): 1647-1650.
- Johnson S, Sanchez JL, Gerding DN. Metronidazole resistance in *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis* 2000; **31**: 625-626.
- Pelaez T, Cercenado E, Alcalá L, Marin M, Martín-Lopez A, Martínez- Alarcón J. Metronidazole resistance in *C. difficile* is heterogeneous. *J Clin Microbiol* 2008; **46**(9): 3028-3032.
- Pelaez T, Perez C, Alcalá L, Cuevas O, Muñoz P, Rodríguez- Creixems M. Antimicrobial susceptibility of *C. difficile*: comparison of toxigenic and non-toxigenic strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **41**: 2270.
- Wultanska D, Obuch-Woszczatynski P, Pituch H, Luczak M. Survey of susceptibility of clinical *clostridium difficile* strains isolated from patients hospitalized in different departments of pediatric hospital to antimicrobial agents. *Med Dosw Microbiol* 2007; **59**(2): 161-168.
- Poilane I, Fantinato C, Cruaud P, Collingnon A. Epidemiological study of *C. difficile* strains isolated in Jean-Verdier- Rene-Muret hospitals from 2001 to 2008. *Pathol Biol* 2008; **56**(7-8): 412-416.
- Pituch H, Obuch-Woszczatynski P, Wultanska D, Meisel-Mikotajczyk F, Luczak M. A survey of metronidazole and vancomycin resistance in strains of *C. difficile* isolated in Warsaw, Poland. *Anaerobe* 2005; **11**: 197-199.
- Arroyo LG, Rousseau J, Willey BM, Low DE, Staempli H, McGeer A. Use of a selective enrichment broth to recover *Clostridium difficile* from stool swabs stored under different conditions. *J Clin Microbiol* 2005; **43**(10): 5341- 5343.
- Sadeghifard N, Salari MH, Ghasemi MR, Amin Harati F. Evaluation of methods for detection of *C. difficile* and its toxins in patients with nosocomial diarrhea. *Pak J Biol Sci* 2005; **8**(9): 1256-1260.

17. Connor D, Hynes P, Cormican M, Colins E, Corbett-Feeney G, Cassidy M. Evaluation of methods for detection of toxins specimens of feces submitted for diagnosis of *C. difficile* – associated diarrhea. *J Clin Microbiol* 2001; **39**(8): 2846-2840.
18. Engelkirk PG, Engelkirk JD. Anaerobes of clinical importance. In: Mahon CR, Manuselis G. *Textbook of diagnostic microbiology*. 2nd ed. Philadelphia; W.B. Saunders Company, 2000; PP: 566-622.
19. Brian P, Buggy T, Catherine C, Hawkins T, Fekety R. Effect of adding sodium taurocholate to selective media on the recovery of *Clostridium difficile* from environmental surfaces. *J Clin Microbiol* 1985; **21**(4): 636-637.
20. Riley TV, Brazier JS, Hassan H, Williams K, Phillips KD. Comparison of alcohol shock enrichment and selective enrichment for the isolation of *Clostridium difficile*. *Epidemiol Infect* 1987; **99**: 355-359.
21. Marler LM, Siders JA, Wolters LC, Pettigrew Y, Skitt BL, Allen SD. Comparison of five cultural procedures for isolation of *Clostridium difficile* from stools. *J Clin Microbiol* 1992; **30**: 514-516.
22. Poilane I, Bert F, Cruaud P, Nicolas- Chanoine MH, Collignon A. Interest of the disk diffusion method for screening *Clostridium difficile* isolates with decreased susceptibility to antibiotics. *Pathol Biol* 2007; **55**(8-9): 429- 433.
23. Fekety R, Kim KH, Brown D, Batts DH, Cudmore M, Silva J Jr. Epidemiology of antibiotic- associated colitis; isolation of *C. difficile* from the hospital environment. *Am J Med* 1981; **70**(4): 906-908.
24. Pelaez T, Alcalá L, Alonso R, et al. Reassessment of *Clostridium difficile* susceptibility to metronidazole and vancomycin. *Antimicrobs Agents Chemother* 2002; **46**(6): 1647-1650.
25. Wong SS, Woo PC, Luk WK, Yuen KY. Susceptibility testing of *Clostridium difficile* against metronidazol and vancomycin by disc diffusion and E-test. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; **34**: 1–6.