مقاله پژوهشی

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 ودرمانی امام رضا(ع) تبریز

محمد تقی 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 ودرمانی امام رضا(ع) تبریز، تبریز، ایران
بهروزپور اصغری: مرکز آموزشی ودرمانی 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 نمی‌شود. **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 روش‌ها: 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. کلنی‌های مشکوک با بوی مخصوص طویله اسب از طریق تستهای بیوشیمیائی تعیین هویت شدند. تمام ایزوله ها با روش دیسک دیفیوژن نسبت به ۱۴ آنتی بیوتیک تعیین حساسیت گردیدند. حداقل غلظت ممانعتی (MIC) ایزوله‌ها با استفاده از E.test در مقابل وانکومایسین و مترونیدازول تعیین شد.

یافته‌ها: 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**=۰/۱۶، **P**=۰/۱۲). تعداد ۱۸ کلستریدیوم دیفیسیل از پرسنل ۱۳ بخش بیمارستان جدا گردید. بیشترین تعداد از بخش‌های داخلی و ICU (هر کدام ۵ ایزوله) وکمترین از اورتوپدی و فیزیوتراپی (هر کدام ۱ ایزوله) جدا گردید. هیچ ایزوله مقاومی نسبت به وانکومیسین ومترونیدازول 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 غنی‌سازی ۰/۱٪ صفرا و الکل شوک بطور معنی‌داری بالاتر از کشت در محیط CCFA می باشد (**P**= ۰/۰۴، **P**=۰/۰۲).

نتیجه‌گیری: پرسنل مرکز آموزش- درمانی امام رضا(ع) می‌تواند به عنوان منبع ذخیره‌ای آلودگی کلستریدیوم دیفیسیل باشد. کلیه ایزوله ها حساس به آنتی بیوتیک‌های وانکومیسین و مترونیدازول بودند. میزان جدا سازی کلستریدیوم دیفیسیل توسط روش‌های غنی‌سازی بالاتر از کشت در محیط CCFA است.

کلید واژه‌ها: کلستریدیوم دیفیسیل، مقاومت آنتی بیوتیکی، وانکومیسین، مترونیدازول، کشت بیهوازی

مقدمه

کلستریدیوم دیفیسیل باکتری گرم مثبت اسپوردار بیهوازی و یکی از مهمترین عوامل عفونتهای بیمارستانی بشمار می‌آید (۲و۱). بیماری در فرم‌های مختلف مثل یک اسهال ساده خود محدود شونده (Self-limiting)، کولیت حاصل از مصرف آنتی‌بیوتیک (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 تقریبا مسئول تمام موارد PMC همراه با آنتی بیوتیک‌ها می باشد (۲و۳). 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 وملافه آلوده به انسان سالم منتقل می‌گردد (۴).

لذا تعداد حاملین بدون علائم در میان بستری شدگان در بیمارستان ها خیلی بیشتر از آنهائی است که علائم بالینی نشان می‌دهند (۱).

خطر کلونیزاسیون با طولانی شدن زمان بستری در بیمارستان افزایش می‌یابد. تقریبا ۲۰٪ از بیماران بستری شده دارای مدفوع کلونیزه شده و بدون علامت می‌باشند و خطر ظهورPMC با مصرف آنتی بیوتیک در این افراد بیش از انسان های سالم است در مقابل میزان این کلونیزاسیون در جامعه انسان‌های سالم ۳-۱٪ می‌باشد (۱و۵).

درصد آلوده شدگان به کلستریدیوم دیفیسیل در کل بیماران بستری شده در امریکا از۰/۲۷٪ در قبل از سال ۲۰۰۰ به ۰/۵۱٪ در سال ۲۰۰۳ افزایش یافته است و این در حالی است که در بیماران نسبتا 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 می‌باشد. اما این آمار در بیماران سرپائی به مراتب کمتر بوده و حدود ۰/۵٪ در میان ۱۰۰۰۰۰ نفر در یکسال می‌باشد (۶).

از نظر اقتصادی نیز این نوع آلودگی‌ها منجر به طولانی شدن زمان بستری در بیمارستان ها شده و هزینه های بالائی را به بیمار و بیمارستان تحمیل می‌نماید. 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 نهایتا در بیمارانی که به‌این درمان ها پاسخ مناسب ندهند استفاده از آنتی بیوتیک‌هایی مثل مترونیدازول و وانکومیسین می‌باشد (۸).

تعیین حساسیت in vitro به این دو آنتی بیوتیک بصورت روتین در آزمایشگاه ها انجام نشده و فرض بر این است که کلستریدیوم 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 (۱۰،۹، 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 می‌شود (۵، ۱۳ و۱۴).

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 نهایتا مقایسه کارآئی سه روش استاندارد بکار برده شده در ایزوله سازی کلستریدیوم دیفیسیل می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه: در کل تعداد ۱۰۰ نمونه مدفوع در ظروف پلاستیکی از کادر درمانی ۱۳بخش مختلف مرکز آموزش-درمانی امام رضا تبریز در مدت ۴ ماه ازاول دی ماه ۱۳۸۸ تا آخر فروردین ماه ۱۳۸۹جمع 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 (می‌توان 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 قرارداده 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 مستقیما به محیط (Cycloserine-Cefoxitin-Fructose Agar, CCFA) حاوی ۵٪ خون گوسفند و Cycloserine 8mg/Lit Cefoxitin ۲۵۰mg/Lit 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 پلیت‌ها 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

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 سویه ها قابل کشت می باشند (۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱). برای تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله ها 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 هینتون خوندار و دستورالعمل شرکت سازنده E-test استفاده شد.

Metronidazole (MZ5µg), vancomycin (VA30µg) , clindamycin (CD2µg), gentamicin (GM120µg), rifampin (RP5µg) chloramphenicol (C30µg) ,erythromycin (E15µg), tetracycline (T30µg) ,imipenem (IMI10µg), Ciprofloxacin (CIP5µg), polymyxin B (PB300U), Piperacillin / Tazobactam (PTZ110µg), Amoxiclav (AC30µg), Ceftriaxone (CRO30µg)

یافته‌ها

یکصد نمونه مدفوع از پرسنل شامل ۶۶٪ مونث و ۳۴٪ مذکر جمع آوری گردید. میانگین سنی زنان ۶/۵۳±۳۵/۲۰ سال با کمترین سن ۲۴ و بیشترین سن ۵۷ سال بود. میانگین سنی مردان 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**=۰/۱۶، **P**=۰/۱۲) (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.

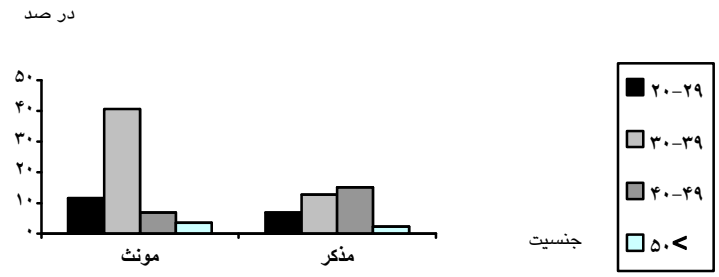
درصد جداسازی کلستریدیوم دیفیسیل ۱۱/۱٪ (۲ مورد)، ۳۸/۹٪ (۷ مورد) و ۵۰٪ (۹ مورد) به ترتیب در روش های کشت مستقیم در CCFA ، الکل شوک و غنی سازی با املاح صفراوی بود. اگر چه با روش غنی سازی ۹ مورد و با روش الکل شوک ۷ مورد کلستریدیوم دیفیسیل جدا گردید اما از نظر آماری معنی‌دار نبود(**P**= ٪۳۹).

اما مقایسه روشهای غنی‌سازی و نیز الکل شوک با کشت در CCFA برتری دو روش اول را در جداسازی نشان دادند و از نظر آماری معنی‌دار بودند (**P**=۰/۰۴، **P**=۰/۰۲).

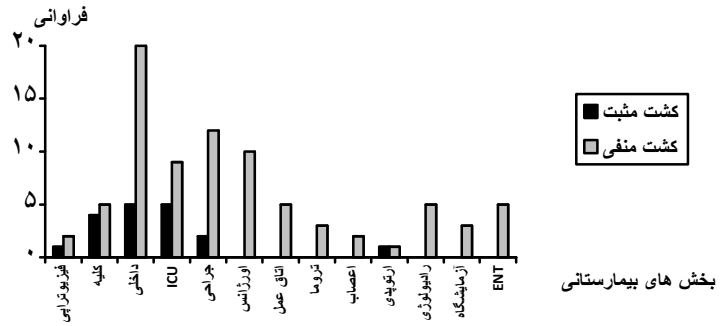
نتایج تست تعیین حساسیت ایزوله‌ها نسبت به آنتی بیوتیک ها در جدول شماره ۱ آورده شده است. کلیه ایزوله ها نسبت به وانکومیسین با حداقل غلظت ممانعتی MIC = ۰/۱۹–۲ µg/ml و مترونیدازل با حداقل غلظت ممانعتی MIC =۰/۳۸–۲ µg/ml نیز در تست دیسک دیفیوژن حساس بودند.

جدول۱: الگوی حساسیت ۱۸ کلستریدیوم دیفیسیل جدا شده از پرسنل بیمارستان امام رضا(ع)

آنتی بیوتیک‌ها	حساس٪	مقاوم٪	حد واسط٪
وانکومیسین	۱۰۰	–	–
مترونیدازول	۱۰۰	–	–
ایمی پنم	۸۳/۳۲	۱۶/۶۸	–
کلرامفنیکل	۸۳/۳۲	۱۶/۶۸	–
پلی میکسین ب	۰	۱۰۰	–
ریفام پین	۷۷/۷۷	۱۱/۱۱	۱۱/۱۱
اریترومایسین	۶۱/۱۱	۳۸/۸۹	–
آموکسی کلاو	۶۶/۶۶	۳۳/۳۴	–
کلیندامایسین	۳۳/۳۳	۶۱/۱۲	۵/۵۵
پیپراسیلین/ تازوباکتام	۳۳/۳۴	۶۶/۶۶	–
تتراسیکلین	۲۲/۲۳	۷۷/۷۷	–
جنتامایسین	۱۱/۱۱	۸۸/۸۹	–
سیپروفلوکساسین	۱۱,۱۱	۸۸/۸۹	–
سفتریاکسون	۰	۱۰۰	–



نمودار ۱: توزیع فراوانی افراد مورد مطالعه بر حسب جنس



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

بحث

ایـن اولـین مطالعـه کـشت و تعیـین حـساسیت کلـستریدیوم دیفیسیل نسبت به آنتی بیوتیـک هـای رایـج و نیـز وانکومیـسین و مترونیدازول در تبریز می باشد. نبود اطلاعـات کـافی در بـاره ایـن باکتری در کشورمان و انتشار مقـالات علمـی گونـاگون در مجـامع علمی دنیا در بـاره کـسب مقاومـت ایـن بـاکتری مهـم عفونتهـای بیمارستانی به وانکومایسین و مترونیدازول اهمیت اجرای این طـرح را مطرح می‌سازد. از ۱۸٪ نمونه هـا کلـستریدیوم دیفیـسیل ایزولـه گردید.

اطلاعات بسیار کمی در این مورد در دسترس می باشـد امـا در بعضی مطالعات از دست هـا و مـدفوع پرسـنل ایـن بـاکتری قابـل کشت بوده است (۲۳). علت این امر می‌تواند عدم ارتبـاط نزدیـک پرسنل تحت آزمایش با بیماران مبتلا در یک بخـش متمرکـز شـده باشد.

معمول‌ترین آنتی بیوتیکی که بـرای درمـان عفونـت حاصـل از کلـستریدیوم دیفیـسیل اسـتفاده مـی‌شـود شـامل وانکومیـسین و مترونیدازول می‌شود اغلب آزمایشگاه هـا کلـستریدیوم دیفیـسیل را حساس نسبت به این دو دارو فرض می‌کنند علیرغم اینکه در سـال ۱۹۹۴ در اسـپانیا ۶/۳٪ مقاومـت بـه مترونیـدازول (۱۶µg/ ml) در میان ۷۸ ایزوله (۲۴) گزارش گردید.

Wong et al مقاومت بـسیار بـالائی را در میـان ایزولـه هـای بالینی (MIC> 64µg/ml) گـزارش نمـود (۲۵). محققـین اسـپانیائی ۱۳ کلستریدیوم دیفیسیل با حساسیت کاهش یافته بـه وانکومیـسین مـشاهده کردنـد. در ایـن تحقیـق مثـل بـسیاری از مطالعـات دیگرکلستریدیوم دیفیسیل های جدا شده صد درصـد حـساس بـه مترونیدازول و وانکومایسین بود (۶، ۱۳و ۱۴).

اگر چه در بعضی مناطق دنیا ایزوله هائی با کاهش حـساسیت و یا مقـاوم نـسبت بـه ایـن دو آنتـی بیوتیـک مـشاهده شـده اسـت (۱۲،۱۱،۱۰و۹)، بنظر میرسدعلت اینکه در ایـن تحقیـق بـر عکـس بسیاری از منابع جنسیت و سن در حمـل بـاکتری معنـی دار نبـوده (P=۰/۱۲) انتخاب نمونه از میان افرادی با سنین پائین‌تر از ۶۰ سـال بوده است.

روش غنی سازی بکار بـرده شـده در ایـن تحقیـق یـک روش حساس بود و طولانی شدن زمان قبل از کشت و کم و زیـاد بـودن مقدار نمونه تاثیر قابل توجهی روی نتایج نداشت.

استفاده از املاح صفراوی در بسیاری از تحقیقات در تبدیل فرم اسپور باکتری به حالت رویشی ثابت شده است (۱۹) و احتمالا 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 صفرا ۹ مورد و با روش الکل شوک ۷ مورد کلستریدیوم دیفیسیل جدا گردید اما از نظر آماری معنی‌دار نبود (**P**=/۳۹).

مقایسه روشهای غنی سازی و الکل شوک با کشت در CCFA برتری دوروش اول را در جداسازی این باکتری نشان دادند واز نظر آماری معنی دار بودند(**P**=۰/۰۴ , **P**=۰/۰۲). 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 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 نسبتا زیادی در الگوی مقاومت آنها قابل مشاهده می‌باشد.

استفاده از روش غنی سازی و الکل شوک تاثیر معنی‌داری در جدا سازی کلستریدیوم دیفیسیل ها از مدفوع دارد.

تقدیر وتشکر

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.

References

1. Barbut F, Corthier G, Charpak Y, Cerf M, Monteil H, Fosse T. Prevalence and pathogenicity of *C. difficult* in hospitalized patients. *Arch Intern Med* 1996; **156**(13): 1449-1454.
2. Poxton IR, McCoubray J, Blair G. The pathogenicity of *Clostridium difficile*. *Clin Microbial Infect* 2001; **7**: 421–427.
3. 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.
4. McDonald LC, Owings M, Jernigan DB. *Clostridum difficile* infection in patients discharged from US short – stay hospital. *Emerg Infect Dis* 2006; **12**(3): 409-415.
5. Riley TV. *Clostridium difficile*: A pathogen of the nineties. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; **17**: 137-141.
6. 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.
7. Johnson S, Gerding N. *Clostridum difficile* – Associated diarrhea. *Clin Infect Dis* 1998; **26**: 1027-1036.
8. Pelaez T, Alcala L, Alonso R, Rodriguez- Creixems M, Garcia- Lechuz JM. Reassessment of *Clostridum difficile* susceptibility to metronidazole and vancomycin. *Antimicrobs Agents Chemother* 2002; **46**(6): 1647-1650.
9. Johnson S, Sanchez JL, Gerding DN. Metronidazole resistance in *Clostridum difficile*. *Clin Infect Dis* 2000; **31**: 625-626.
10. Pelaez T, Cercenado E, Alcala L, Marin M, Martin-Lopez A, Martinez- Alarcon J. Metronidazole resistance in *C. difficile* is heterogeneous. *J Clin Microbiol* 2008; **46**(9): 3028-3032.
11. Pelaez T, Perez C, Alcala L, Cuevas O, Munoz P, Rodriguez- Creixems M. Antimicrobial susceptibility of *C. difficile*: comparison of toxigenic and non-toxigenic strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **41**: 2270.
12. Wultanska D, Obuch-Woszczatynski P, Pituch H, Luczak M. Survey of susceptibility of clinical *clostridium difficile* strains isolated from patients hospitalized in different deparments of pediatric hospital to antimicrobial agents. *Med Dosw Microbial* 2007; **59**(2): 161-168.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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 JJr. Epidemiology of antibiotic- associated colitis; isolation of *C. difficile* from the hospital environment. *Am J Med* 1981; **70**(4): 906-908.
24. Pelaez T, Alcala 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.