

## Research Paper

## Antibiotic Susceptibility Profile of Clostridium Difficile Bacteria Isolated from Older Residents of a Nursing Home in Iran

Ahmad Ghasemi<sup>1</sup> , Ashraf Mohabati Mobarez<sup>1</sup> , Ehsan Mostafavi<sup>2,3</sup>

1. Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

2. Department of Epidemiology and Biostatistics, Research Centre for Emerging and Reemerging Infectious Diseases, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

3. Laboratory Reference Country Plague, Tolarmi and Q Fever, Research Centre for Emerging and Reemerging Infectious Diseases Pasteur Institute of Iran, Kabudar Ahang, Hamadan, Iran.



**Citation:** Ghasemi A, Mobarez Mohabati A, Mostafavi E. [Antibiotic Susceptibility Profile of Clostridium Difficile Bacteria Isolated from Older Residents of a Nursing Home in Iran (Persian)]. Iranian Journal of Ageing. 2021; 15(4):496-505. <https://doi.org/10.32598/sija.15.4.2997>

<https://doi.org/10.32598/sija.15.4.2997>



Received: 01 Jul 2020

Accepted: 31 Oct 2020

Available Online: 24 Feb 2021

**Keywords:**

Clostridium difficile, Older adults, Antibiotic susceptibility

**ABSTRACT**

**Objectives** Clostridium difficile (C. diff) is a gram-positive anaerobic bacterium known as the most common cause of nosocomial diarrhea in nursing homes. The antibiotic susceptibility profile is the basic way for successful treatment due to antimicrobial resistance. This present study aims to assess the antibiotic susceptibility profile of C. diff isolated from older residents of a nursing home in Tehran, Iran.

**Methods & Materials** Forty-two isolates of C. diff were used in this study collected from 289 residents of Kahrizak Nursing Home. Antibiotic susceptibility testing was conducted by using disk-diffusion method, agar dilution method, and Epsilonometer test (E-test).

**Results** All C. diff strains were susceptible to Metronidazole, Vancomycin, Rifampicin, Linezolid and Tigecycline. By using the disk-diffusion method, the highest rate of resistance was related to Clindamycin (100%), Levofloxacin (96.2%), Imipenem (81%), Azithromycin (61%) and Erythromycin (54.8%). All C. diff strains were susceptible to Metronidazole under E-test. Furthermore, 100% and 59.5% of strains were susceptible to Vancomycin and Erythromycin, respectively under agar dilution test.

**Conclusion** C. diff strains are sensitive to Vancomycin and Metronidazole. These two antibiotics can be used to treat C. diff infections in older adults. The disk diffusion method can be used as a screening test to determine antibiotic resistance.

**Extended Abstract****1. Introduction**

**C**lostridium difficile (C. diff) is a gram-positive, obligate anaerobic, and spore-forming bacillus that was identified in 1935 as part of the flora of healthy infants. This bacterium is an important human pathogen that has been introduced as a causative agent of antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis [1, 2]. This

bacterium is the most common cause of infectious diarrhea in nursing homes, which in recent years. About 3 million cases of diarrhea and colitis are reported annually. Mortality associated with C. diff infectious diarrhea is estimated at 17%, which is higher in the elderly [5, 6]. Colonization by C. diff isolates producing toxins has been reported in nursing home residents ten times more than in those dwelling in the community [7]. It is reported that about 57% of the residents of nursing homes can be carriers of this bacterium [7, 8]. In Iran, there is also the problem of irrational use or overuse of antibiotics [14]. The resistance to these

\* Corresponding Author:

Ashraf Mobarez Mohabati, PhD.

Address: Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Tel: +98 (21) 82883862

E-mail: mmmobarez@modares.ac.ir

drugs is increasing in the world and there are no reports of their usage among the residents of nursing homes in Iran. Antibiotic susceptibility profile is the most basic way for successful treatment due to antimicrobial resistance. This study aims to evaluate the antibiotic susceptibility profiles of *C. diff* bacteria isolated from the elderly living in a nursing home in Tehran, Iran.

## 2. Methods & Materials

In this study, 289 fecal samples from residents of Kahrizak nursing home in Tehran, Iran who were over 60 years old (ranging from 60 to 101) and hospitalized for at least one month were examined for antibiotic susceptibility (44.3% male and 55.7% female). of 289 samples, 42 (14.5%) tested positive for *C. diff*.

### Antibiotic susceptibility test by disk diffusion method

Discs of antibiotics were metronidazole, vancomycin, imipenem, clindamycin, chloramphenicol, azithromycin, linezolid, tigecycline, teicoplanin, rifampin, erythromycin and amoxicillin-clavulanic acid (Mast Group Ltd, UK). Isolates were first cultured in Cycloserine-cefoxitin fructose Agar (CCFA) medium and 1 McFarland dilution in physiological saline was prepared from each grown sample. Then, swab was used for superficial culture on Bru-

cella agar medium (Merck Co.) with 5% sheep blood and 1 µg/mL vitamin K (Sigma Co.). The tested disks were then placed on the culture medium and incubated for 48 hours at 37 ° C in an anaerobic jar containing GasPak type A (Merck Co.). Disk diffusion of each drug was interpreted according to published articles [15-21].

### Antibiotic susceptibility test by agar dilution method and E-test

Antibiotic susceptibility testing was performed with agar dilution method for vancomycin and erythromycin antibiotics (Sigma Co.) and Epsilometer test (E-test) for metronidazole antibiotic (Liofilchem Co., Italy), according to the protocol of Clinical and Laboratory Standards Institute 2018 (CLSI 2018). First, 0.5 McFarland dilution was prepared from isolates grown in CCFA culture medium. Then, 1 microliter of 0.5 McFarland dilution was cultured on Brucella agar medium with different dilutions of antibiotics, containing 5% sheep blood and vitamin K (1 µg/mL). For E-test, 1 McFarland dilution was cultured on by swap on Brucella agar medium containing 5% sheep blood and 1 µg/mL vitamin K. Next, metronidazole strip was placed on the culture. The cultured plates were then incubated for 48 hours at 37 ° C in an anaerobic jar containing GasPak type A [22]. The results were interpreted according to CLSI 2018 guidelines.

**Table 1.** Prevalence of antibiotic susceptibility by disk diffusion method in *C. diff* isolates

Antibiotic Disk	Susceptible No. (%)	Resistant, No. (%)	Range zone, mm
Clindamycin 2µg	0 (0.00)	42 (100)	0
Teicoplanin 30µg	40 (95.2)	2 (4.8)	16-32
Tigecycline 15µg	42 (100)	0 (0.00)	24-48
Levofloxacin 5µg	2 (4.8)	40 (96.2)	0-28
Metronidazole 5µg	42 (100)	0 (0.00)	32-56
Vancomycin 30µg	42 (100)	0 (0.00)	20-32
Imipenem 10µg	8 (19)	34 (81)	0-32
Rifampicin 5µg	42 (100)	0 (0.00)	16-48
Azithromycin 15µg	16 (39)	25 (61)	0-32
Erythromycin 15µg	19 (45.2)	23 (54.8)	0-40
Linezolid 30µg	42 (100)	0 (0.00)	24-48
Amoxicillin/clavulanic acid 30µg	35 (83.3)	7 (17.7)	20-36
Chloramphenicol 30µg	32 (76)	10 (24)	0-34

**Table 2.** Prevalence of antibiotic susceptibility by agar dilution method and E-test in *C. diff* isolates

Antibiotic	MIC Range (µg/ml)	Resistant, NO. (%)	Break Points (µg/ml)
Metronidazole	0.016-0.94	0 (0.00)	≥ 32
Vancomycin	0.125-0.5	0 (0.00)	≥2
Erythromycin	0.5-16	17 (40.5)	≥8

### 3. Results

*C. difficile* isolates were 100% resistant to clindamycin; 96.2% to levofloxacin; 54.8% to erythromycin; 81% to imipenem, and 61% to azithromycin by disk diffusion method. The antibiotic susceptibility of *C. diff* by disk diffusion method was 95.2% to teicoplanin; 76% to chloramphenicol, and 83.3% to amoxicillin-clavulanic acid. 100% of the isolates were sensitive to metronidazole, vancomycin, linezolid, tigecycline, and rifampin while 45.2% were sensitive to erythromycin (Table 1). All *C. diff* isolates were sensitive to metronidazole using E-test. By agar dilution method, all *C. diff* isolates were sensitive to vancomycin, while 59.5% were sensitive to erythromycin (Table 2).

### 4. Conclusion

The present study was performed to determine the susceptibility of *C. diff* to common antibiotics such as vancomycin, metronidazole and erythromycin in residents of nursing homes in Tehran, Iran. Inappropriate use of antibiotics is one of the effective factors in causing diarrhea by CDI; hence, it is necessary to stop the use of antibiotics for treatment [23]. Antibiotics are one of the most widely used drugs in the world and are extremely valuable in terms of general health. However, the effect of antibiotics in the community and the risk of resistance may also be affected by how the patient uses antibiotics [11]. Antibiotic resistance plays an important role in the emergence of new strains, and transmission of genetic elements can occur between *C. diff* strains or between *C. diff* and other bacteria, where increase resistance [23, 38].

The results were the same for metronidazole and vancomycin antibiotics by using disk diffusion method, agar dilution method and E-test. *C. diff* strains were sensitive to metronidazole, vancomycin, linezolid, tigecycline, teicoplanin, rifampin and amoxicillin-clavulanic acid. Therefore, the disk diffusion method can be a suitable method for testing the antibiotic susceptibility of *C. diff*. Study limitations included financial constraints and difficulty sampling the elderly. Due to our financial constraints, only three metro-

nidazole, vancomycin, and erythromycin antibiotics were selected for agar dilution test and E-test.

*Clostridium difficile* isolates were sensitive to vancomycin and metronidazole antibiotics using disk diffusion and agar dilution methods. These antibiotics can be used in cases of *C. diff* infection in the elderly. However, the use of vancomycin by injection is not recommended for outpatients. On the other hand, the disk diffusion method, as a simple and inexpensive screening method can be used to determine the antibiotic resistance of *C. diff*, and resistant isolates be confirmed by Minimum Inhibitory Concentration parameter.

### Ethical Considerations

#### Compliance with ethical guidelines

This study was approved by Ethical Committee of Tarbiat Modares University, Tehran.

#### Funding

This study was supported by Tarbiat Modares University, Tehran and the Research Center for Emerging and Reappearing Infectious Diseases, Pasteur Institute of Iran and also in collaboration with Kahrizak Nursing Home in Tehran.

#### Authors' contributions

All authors equally contributed in preparing this article.

#### Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

#### Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Farshad Sharif, Elderly Health Research Center, Tehran University of Medical Sciences.

## بررسی حساسیت آنتی بیوتیک مؤثر بر کلوستریدیوم دیفیسیل‌های ایزوله‌شده از سالمندان مقیم خانه سالمندان در تهران

احمد قاسمی<sup>۱</sup>، اشرف محبتی مبارز<sup>۱</sup>، احسان مصطفوی<sup>۲،۳</sup>

۱. گروه باکتری شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۲. گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی بازپدید و نوپدیده، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

۳. آزمایشگاه مرجع کشوری طاعون، تولارمی و تب کبوی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی بازپدید و نوپدیده، انستیتو پاستور ایران، کبودآهنگ، همدان، ایران.

### چکیده

تاریخ دریافت: ۱۱ تیر ۱۳۹۹

تاریخ پذیرش: ۱۰ آبان ۱۳۹۹

تاریخ انتشار: ۱۲ دی ۱۳۹۹

**اهداف:** کلوستریدیوم دیفیسیل یک باکتری گرم مثبت بی‌هوازی است که در حال حاضر به عنوان شایع‌ترین علت اسهال عفونی در خانه سالمندان شناخته شده است. پروفایل حساسیت آنتی‌بیوتیکی، اساسی‌ترین گام برای درمان موفقیت‌آمیز به دلیل مقاومت ضد میکروبی است. در این مطالعه، پروفایل حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های کلوستریدیوم دیفیسیل که از سالمندان مقیم در یکی از خانه‌های سالمندان در تهران جدا شده بود، ارزیابی شدند.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه، ۴۲ سویه کلوستریدیوم دیفیسیل که از ۲۸۹ نفر از سالمندان ساکن در خانه سالمندان کهریزک تهران جدا شده بود، آزمایش شدند. تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های کلوستریدیوم دیفیسیل با استفاده از روش‌های دیسک دیفیوژن، رقت‌سازی در آگار و E-test بررسی شد.

**یافته‌ها:** با روش دیسک دیفیوژن ۱۰۰ درصد سویه‌های کلوستریدیوم دیفیسیل نسبت به مترونیدازول، ونکومايسين، ریفامپيسين، لاینزولید و تایچی سایکلین حساس بودند و همچنین بالاترین میزان مقاومت در کلیندامایسین (۱۰۰ درصد)، لووفلوکسازین (۹۶/۲ درصد)، ایمی پنم (۸۱ درصد)، آزیترومایسین (۶۱ درصد) و اریترومايسين (۵۴/۸ درصد) مشاهده شد. با روش آگار دایلوژن ۱۰۰ درصد سویه‌های کلوستریدیوم دیفیسیل نسبت به ونکومايسين و ۵۹/۵ درصد ایزوله‌ها نسبت به اریترومايسين حساس بودند. با روش E-test ۱۰۰ درصد سویه‌های کلوستریدیوم دیفیسیل نسبت به مترونیدازول حساس بودند.

**نتیجه‌گیری:** سویه‌های کلوستریدیوم دیفیسیل نسبت به ونکومايسين و مترونیدازول حساس بودند و می‌توانند به عنوان دو آنتی‌بیوتیک انتخابی در درمان عفونت‌های کلوستریدیوم دیفیسیل در سالمندان استفاده شوند. همچنین، روش انتشار دیسک می‌تواند به عنوان یک تست غربالگری برای تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی استفاده شود.

### کلیدواژه‌ها:

کلوستریدیوم دیفیسیل، سالمندان، حساسیت آنتی بیوتیکی

می‌گذارد. این تغییرات اغلب فلور روده را مختل، در نتیجه موجب گسترش کلوستریدیوم دیفیسیل در روده می‌شود [۳].

آمارها نشان می‌دهد که این عارضه بسته به جمعیت و نوع آنتی‌بیوتیک در ۵ تا ۳۹ درصد بیماران رخ می‌دهد و در بیماران مسن به دنبال مصرف آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف مانند فلوروکینولون‌ها، کلیندامایسین، پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها شایع‌تر است.

افزایش مقاومت به تعداد زیادی از ترکیبات آنتی‌بیوتیکی، به‌ویژه فلوروکینولون‌ها یک موضوع نگران‌کننده جهانی در سازمان‌های ناظر بر بهداشت و سلامت است و بین اسهال‌های ناشی از مصرف ترکیبات ضد میکروبی، عفونت بیمارستانی کلوستریدیوم دیفیسیل

باکتری کلوستریدیوم دیفیسیل<sup>۱</sup> باسیل گرم مثبت، بی‌هوازی اجباری، اسپوردار و متحرک که در سال ۱۹۳۵ به عنوان بخشی از فلور افراد سالم شناسایی شد. این باکتری یک پاتوژن مهم انسانی که به عنوان عامل ایجادکننده اسهال مرتبط با آنتی‌بیوتیک و کولیت باغشای کاذب معرفی شده است [۱، ۲].

اسهال ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک، یکی از شایع‌ترین مشکلات گوارشی به دنبال مصرف آنتی‌بیوتیک است. مصرف طیف گسترده ضد میکروبی که اثرات مخرب شدیدی بر فلور میکروبی روده

1. Clostridium difficile

\* نویسنده مسئول:

دکتر اشرف محبتی مبارز

نشانی: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه باکتری شناسی

تلفن: ۸۲۸۸۳۸۶۲ (۲۱) ۹۸+

پست الکترونیکی: mmmobarez@modares.ac.ir

ساکنان خانه سالمندان ایران وجود ندارد. در این مطالعه، ناقلین کلستریدیوم دیفیسیل در ساکنان خانه‌های سالمندان از نظر مقاومت آنتی‌بیوتیکی ارزیابی شدند.

### روش مطالعه

نمونه‌ها: در این مطالعه با فرض ۱۰ درصد آلودگی به کلستریدیوم دیفیسیل در خانه سالمندان [۷] و با فرض دقت ۳/۵ درصد و با توجه به فرمول حجم نمونه مطالعات مقطعی (کوکران)، ۲۸۹ نمونه مدفوع از ساکنان خانه سالمندان کهریزک تهران که بالای ۶۰ سال سن داشتند و حداقل به مدت یک ماه در خانه سالمندان بستری بودند، از نظر حساسیت آنتی‌بیوتیکی بررسی شدند.

۴۲ (۱۴/۵ درصد) نمونه‌ها از ۲۸۹ نمونه مورد بررسی از نظر کلستریدیوم دیفیسیل دارای نتیجه مثبت بودند که ۴۴/۳ درصد بیماران مورد مطالعه را آقایان و ۵۵/۷ درصد بقیه را خانم‌ها تشکیل می‌دادند. دامنه سنی بیماران از ۶۰ تا ۱۰۱ سال متغیر بود و ۴۲ ایزوله کلستریدیوم دیفیسیل مورد بررسی شامل ۱۶ مورد آقا و ۲۶ مورد از خانم بودند.

### تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش انتشار دیسک

دیسک آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی مترونیدازول، ونکومايسين، ایمی پنم، کلیندامایسین، کلرامفنیکل، آزیترومایسین، لینزولید، تایجی سایکلین، تیکوپلانتین، ریفامپین، اریترومايسين و آموکسی کلونیک اسید ساخت شرکت مست انگلستان بودند. در این مطالعه، ابتدا ایزوله‌های جدا شده را در محیط CCFA<sup>۲</sup> کشت داده شدند و از هر نمونه رشد کرده، رقت یک مک فارلند در سرم فیزیولوژی تهیه شد.

سپس توسط سوآپ روی محیط بروسلا آگار (ساخت شرکت مرک) دارای ۵ درصد خون گوسفندی و ویتامین K (۱ میکروگرم در میلی لیتر) (ساخت شرکت سیگما) کشت سطحی داده شد. بعد دیسک‌های مورد آزمایش در سطح محیط کشت قرار گرفتند. به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در جار بی‌هوای حاوی گاز پک نوع A (ساخت شرکت مرک) انکوبه شدند. هاله عدم رشد هر دارو طبق مقالات منتشر شده تفسیر شد [۲۱-۱۵].

### تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش آگار دایلوشن و E-test<sup>۳</sup>

تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش آگار دایلوشن برای آنتی‌بیوتیک‌های ونکومايسين و اریترومايسين ساخت شرکت سیگما و روش E-test برای مترونیدازول ساخت شرکت Lio-filchem ایتالیا، طبق پروتکل CLSI2018<sup>۴</sup> انجام گرفت.

حدود ۲۵ تا ۳۰ درصد موارد را پوشش می‌دهد [۴، ۳].

کلستریدیوم دیفیسیل به عنوان شایع‌ترین عامل اسهال عفونی در خانه سالمندان است که در سال‌های اخیر، سالانه حدود سه میلیون مورد از اسهال و کولیت اعلام می‌شود. مرگ‌ومیر مرتبط با اسهال عفونی کلستریدیوم دیفیسیل ۱۷ درصد تخمین زده می‌شود، که این میزان در سالمندان بیشتر است [۶، ۵].

اسهال مکرر مرتبط با کلستریدیوم دیفیسیل بیشتر در ساکنان خانه سالمندان برای افراد مسن اتفاق می‌افتد. کلونیزاسیون توسط ایزوله‌های کلستریدیوم دیفیسیل مولد توکسین در ساکنان خانه سالمندان ده برابر بیشتر از جمعیت عادی که در خارج از این مراکز زندگی می‌کنند، گزارش شده است [۷].

مطالعات نشان می‌دهد که وضعیت جسمی ساکنان خانه سالمندان و به طور معمول تماس نزدیک بین آن‌ها باعث گسترش عفونت و اسپور باکتری می‌شود. علاوه بر این‌ها، خطر انتقال کلستریدیوم دیفیسیل توسط افرادی که در بیمارستان بستری بوده و سپس به مراکز سالمندان مراجعه کرده‌اند، به عنوان یک منبع و ناقل بالقوه آلودگی است.

گزارش شده که حدود ۵۷ درصد از ساکنان خانه سالمندان می‌توانند ناقل این باکتری باشند [۸، ۷]. ساکنان خانه سالمندان با توجه به سن، بستری مکرر، بیماری‌های زمینه‌ای شایع، باقی ماندن طولانی‌مدت و قرار گرفتن در معرض مکرر آنتی‌بیوتیک، بیشتر مستعد ابتلا به CDI<sup>۲</sup> هستند میزان CDI از سال ۲۰۰۰، به خصوص در افراد مسن با ساکن شدن در خانه سالمندان افزایش یافته است [۱۰-۸].

درمان آنتی‌بیوتیکی نقش اصلی را در پیشرفت CDI دارد. اگر کلستریدیوم دیفیسیل به آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی مقاوم باشد، ریسک ابتلا به CDI افزایش می‌یابد. آنتی‌بیوتیک‌ها، هموستاز و تعادل رقابتی میکروبیوتای گوارشی را به هم می‌زنند و رشد کلستریدیوم دیفیسیل را موجب می‌شوند که مهم‌ترین عامل در ایجاد و پیشروی عفونت کلستریدیوم دیفیسیل است

مصرف هم‌زمان چندین آنتی‌بیوتیک و افزایش طول مدت درمان آنتی‌بیوتیکی با افزایش ریسک عفونت کلستریدیوم دیفیسیل مرتبط است. آنتی‌بیوتیک‌ها جهت درمان انواع بیماری‌های عفونی استفاده می‌شوند، اما کاربرد نادرست و نابجای آنتی‌بیوتیک، عامل پیدایش مقاومت میکروبی، ایجاد عوارض و بیماری‌های ثانویه از مشکلات بالینی آن در کل دنیا است. مترونیدازول و ونکومايسين جزو داروهای انتخابی برای CDI هستند [۱۳-۱۱].

در کشور ما نیز معضل مصرف غیرمنطقی و بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌ها وجود دارد [۱۴]. با توجه به اینکه مقاومت به این داروها در دنیا رو به افزایش است و هیچ گزارشی در این مورد در

3. Cycloserine-Cefoxitin Fructose Agar

4. Epsilometer test

5. Clinical and Laboratory Standards Institute 2018

2. Clostridium Difficile Infection

### یافته‌ها

نتایج نشان داد که ایزوله‌های کلستریدیوم دیفیسیل با روش دیسک دیفیوژن نسبت به کلیندامایسین ۱۰۰ درصد، لووفلوکسازین ۹۶/۲ درصد، اریترومایسین ۵۴/۸ درصد، ۸۱ درصد، آزیترومایسین ۶۱ درصد مقاوم بودند. حساسیت آنتی‌بیوتیکی کلستریدیوم دیفیسیل با روش دیسک دیفیوژن نسبت به تیکوپلانتین ۹۵/۲ درصد، کلرامفنیکل ۷۶ درصد و آموکسی سیلین کلونیک اسید ۸۳/۳ درصد حساس بودند. ۱۰۰ درصد ایزوله‌ها نسبت به مترونیدازول، ونکومایسین، لینزولید، تایجی سایکلین، ریفامپین و ۴۵/۲ درصد ایزوله‌ها نسبت به اریترومایسین حساس بودند (جدول شماره ۱).

ایزوله‌های کلستریدیوم دیفیسیل با استفاده از روش E-test نسبت به مترونیدازول حساس بودند. همچنین با روش آگار

ابتدا از ایزوله‌های رشد کرده در محیط کشت CCFA رقت ۰/۵ مک فارلند تهیه شد، بعد یک میکرولیتر از رقت ۰/۵ مک فارلند روی محیط کشت بروسلا آگار با رقت‌های متفاوت آنتی‌بیوتیک، دارای ۵ درصد خون گوسفندی و ویتامین K (یک میکروگرم در میلی لیتر) به صورت نقطه‌ای کشت داده شد.

روش E-test برای مترونیدازول استفاده شد که از رقت یک مک فارلند توسط سوآپ روی محیط بروسلا آگار دارای ۵ درصد خون گوسفندی و ویتامین K (یک میکروگرم در میلی لیتر) کشت داده شد. بعد استریپ مترونیدازول در سطح کشت قرار گرفت، سپس پلیت‌های کشت داده شده به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در جار بی‌هوای حاوی گاز پیک نوع A انکوبه شدند [۲۲]. نتایج طبق دستورالعمل CLSI 2018 تفسیر شد.

جدول ۱. فراوانی حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن در ایزوله‌های کلستریدیوم دیفیسیل جدا شده از سالمندان

زون گسترشی (mm)	No. (%)		آنتی‌بیوتیک (میلی گرم)
	مقاومت	حساسیت	
۰	۴۲ (۱۰۰)	۰ (۰/۰۰)	کلیندامایسین ۲
۱۶-۳۲	۲ (۴/۸)	۴۰ (۹۵/۲)	تیکوپلانتین ۳۰
۲۴-۴۸	۰ (۰/۰۰)	۴۲ (۱۰۰)	تایجی سایکلین ۱۵
۰-۲۸	۴۰ (۹۶/۲)	۲ (۴/۸)	لووفلوکسازین ۵
۳۲-۵۶	۰ (۰/۰۰)	۴۲ (۱۰۰)	مترونیدازول ۵
۲۰-۳۲	۰ (۰/۰۰)	۴۲ (۱۰۰)	ونکومایسین ۳۰
۰-۳۲	۳۴ (۸۱)	۸ (۱۹)	ایمی پنم ۱۰
۱۶-۴۸	۰ (۰/۰۰)	۴۲ (۱۰۰)	ریفامپین ۵
۰-۳۲	۲۵ (۶۱)	۱۶ (۳۹)	آزیترومایسین ۱۵
۰-۴۰	۲۳ (۵۴/۸)	۱۹ (۴۵/۲)	اریترومایسین ۱۵
۲۴-۴۸	۰ (۰/۰۰)	۴۲ (۱۰۰)	لینزولید ۳۰
۲۰-۳۶	۷ (۱۷/۷)	۵ (۱۲/۳)	آموکسی سیلین/کلونیک اسید ۳۰
۰-۳۴	۱۰ (۲۴)	۳۲ (۷۶)	کلرامفنیکل ۳۰

سالمند

جدول ۲. فراوانی حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش آگار دایلوژن و E-test در کلستریدیوم دیفیسیل

آنتی‌بیوتیک	دامنه CIM ( $\mu\text{g/ml}$ )	حسایت تعداد (درصد)	فواصل مصرف دارو ( $\mu\text{g/ml}$ )
مترونیدازول	۰/۰۱۶-۰/۹۴	۰ (۰/۰۰)	$\geq 32$
ونکومایسین	۰/۱۲۵-۰/۵	۰ (۰/۰۰)	$\geq 2$
اریترومایسین	۰/۵-۰/۱۶	۱۷ (۴۰/۵)	$\geq 8$

سالمند

حساس به ونکوماپسین، مترونیدازول، تیکوپلانتین و ۶۶/۶ درصد ایزوله‌ها حساس به اریتروماپسین، ۹۷/۲ درصد ایزوله‌ها حساس به لینزولید، کلرامفنیکل و ۷۷/۸ درصد ایزوله‌ها حساس به آموکسی‌سیلین کلانونیک اسید و ۹۷/۳ درصد ایزوله‌ها مقاوم به لوفلوکساسین گزارش کردند [۲۴].

در عراق با روش دیسک دیفیوژن نسبت به کلیندامایسین ۹۵ درصد و اریتروماپسین ۶۵ درصد مقاوم و نسبت به ونکوماپسین ۱۰۰ درصد و مترونیدازول ۹۵ درصد، کلرامفنیکل ۸۰ درصد حساس بودند [۱۶]. در آمریکا در سال ۲۰۱۰، ایزوله‌های کلستریدیوم دیفیسیل جدا شده از نمونه‌های بیمارستانی نسبت به ونکوماپسین ۱۰۰ درصد حساس و نسبت به مترونیدازول ۱۳ درصد مقاوم بودند [۳۰].

الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های کلستریدیوم دیفیسیل در چندین مطالعه از ایران، فرانسه، زیمبابوه، چین، ژاپن، اسپانیا، لهستان و جمهوری چک مشابه مطالعه ما بوده‌اند [۲۱، ۲۴، ۳۱-۳۶]. گزارش‌ها از سراسر جهان تنوع الگوی مقاومت را برای ایزوله‌های کلستریدیوم دیفیسیل پیشنهاد نمی‌کنند.

در مطالعه حاضر، همه سویه‌ها حساس به ونکوماپسین و مترونیدازول بودند. مطالعات مشابه دیگر نشان دادند که سویه‌های توکسین‌زا حساسیت بالایی نسبت به این داروهای انتخابی متداول برای درمان CDI دارند [۲۱، ۳۷].

اخیراً اپیدمیولوژی کلستریدیوم دیفیسیل تغییر کرده و ظهور سویه‌هایی با بیماری‌زایی بالا با عفونت‌های شدید ارتباط دارند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی نقش مهمی در ظهور سویه‌های جدید ایفا می‌کند. تشخیص سریع مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌تواند از ظهور فنوتیپی جدید جلوگیری کرده و به شناسایی سویه‌های جدید کمک کند.

ژنوم کلستریدیوم دیفیسیل حاوی عناصر ژنتیکی است که بسیاری از آن‌ها در مقاومت آنتی‌بیوتیک نقش دارند. انتقال عناصر ژنتیکی می‌تواند در بین سویه‌های کلستریدیوم دیفیسیل یا بین کلستریدیوم دیفیسیل و سایر گونه‌های باکتریایی رخ دهد که مقاومت گسترش می‌یابد [۲۳، ۳۸].

نتایج با روش دیسک دیفیوژن، آگار دایلوژن و E-test برای مترونیدازول و ونکوماپسین یکسان بود. سویه‌های کلستریدیوم دیفیسیل نسبت به مترونیدازول، ونکوماپسین، لینزولید، تایجی سایکلین، تیکوپلانتین، ریفامپین و آموکسی‌سیلین کلانونیک اسید حساس بودند؛ بنابراین توصیه می‌شود که روش دیسک دیفیوژن می‌تواند یک گزینه مناسب برای تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی کلستریدیوم دیفیسیل باشد.

محدودیت‌های مطالعه شامل کمبود منبع مالی و مشکل نمونه‌گیری از سالمندان بود. با توجه به محدودیت مالی که

دایلوژن، همه ایزوله‌های کلستریدیوم دیفیسیل نسبت به ونکوماپسین حساس بودند، ولی ۵۹/۵ درصد به اریتروماپسین حساس بودند (جدول شماره ۲).

## بحث

مطالعه حاضر برای تعیین حساسیت کلستریدیوم دیفیسیل نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج مانند ونکوماپسین، مترونیدازول و اریتروماپسین در ساکنان خانه سالمندان تهران انجام گرفت.

مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از عوامل مؤثر در ایجاد اسهال توسط CDI است که قطع کردن مصرف آنتی‌بیوتیک جهت درمان ضروری است [۲۳]. آنتی‌بیوتیک‌ها از رایج‌ترین داروهای مصرفی در سراسر جهان و از نظر سلامت عمومی دارای ارزش فوق‌العاده‌ای هستند.

هرچند، ادامه کارایی درمان‌های آنتی‌بیوتیکی با ظهور مقاومت در معرض خطر است. بخش اعظم این مقاومت به استفاده بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌ها نسبت داده شده است، اما اثر آنتی‌بیوتیک‌ها در جامعه و خطر مقاومت نیز ممکن است تحت تأثیر نحوه استفاده آنتی‌بیوتیک‌ها توسط بیمار باشد [۱۱]. مطالعات توصیه می‌کنند که روش دیسک دیفیوژن برای غربالگری اولیه کلستریدیوم دیفیسیل استفاده شود [۲۵، ۲۴، ۲۰، ۱۷].

در این مطالعه نتایج نشان داد که ایزوله‌های کلستریدیوم دیفیسیل با روش دیسک دیفیوژن نسبت به اریتروماپسین ۵۴/۸ درصد مقاوم، مترونیدازول و ونکوماپسین ۱۰۰ درصد حساس بودند. با روش E-test ۱۰۰ درصد ایزوله‌ها به مترونیدازول حساس بودند. با روش آگار دایلوژن ۱۰۰ درصد به ونکوماپسین و ۵۹/۵ درصد به اریتروماپسین حساس بودند. نتایج دیسک دیفیوژن مطابق با نتایج آگار دایلوژن و E-test بود.

مطالعه‌ای در تبریز با روش دیسک دیفیوژن ۱۰۰ درصد ایزوله‌ها حساس به ونکوماپسین، مترونیدازول، کلرامفنیکل و آموکسی‌سیلین کلانونیک اسید و ۸۷ درصد ایزوله‌ها حساس به اریتروماپسین بودند [۱۵].

مطالعه دیگر در تهران، میزان حساسیت آنتی‌بیوتیکی به مترونیدازول، ونکوماپسین، کلرامفنیکل به ترتیب ۹۴/۷ درصد، ۹۲ درصد و ۴۲/۷ درصد بودند [۲۶]. همچنین در یک مطالعه مشابه، حساسیت آنتی‌بیوتیکی نسبت به مترونیدازول ۹۵ درصد در نمونه‌های بالینی جدا شده از تهران گزارش کرده‌اند [۲۷].

علاوه بر این، دو مطالعه دیگر از ایران حساسیت قابل توجهی به مترونیدازول و ونکوماپسین گزارش دادند [۲۸، ۲۹]. به طور کلی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های کلستریدیوم دیفیسیل در گزارش‌های فوق از ایران مشابه بوده‌اند.

در فرانسه با روش دیسک دیفیوژن ۱۰۰ درصد ایزوله‌ها

داشتیم برای انجام تست آگار دایلوشن و E-test سه آنتی‌بیوتیک مترونیدازول، ونکومايسين و اريترومايسين انتخاب شد.

### نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه با دو روش دیسک دیفیوژن و آگار دایلوشن، ایزوله‌های کلستریدیوم دیفیسیل به آنتی‌بیوتیک‌های ونکومايسين و مترونیدازول حساس بودند که این آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توانند در موارد ابتلا به عفونت کلستریدیوم دیفیسیل در سالمندان استفاده شوند.

با وجود این استفاده از ونکومايسين تزریقی (به علت تزریقی بودن) برای موارد غیر بستری در بیمارستان‌ها توصیه نمی‌شود. از طرف دیگر، روش دیسک دیفیوژن با توجه به اینکه یک روش راحت و در دسترس برای انجام و همچنین ارزان قیمت است، می‌تواند به عنوان یک روش غربالگری برای تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی کلستریدیوم دیفیسیل استفاده شود و ایزوله‌های مقاوم با روش Minimum Inhibitory Concentration تأیید شود.

### ملاحظات اخلاقی

#### پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه توسط کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تأیید شده است.

#### حامی مالی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس، تهران و مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی نوپدید و بازپدید، انستیتو پاستور ایران و همچنین با همکاری خانه سالمندان کهریزک تهران انجام شد.

#### مشارکت‌نویسندگان

تمام نویسندگان در طراحی، اجرا و نگارش همه بخش‌های پژوهش حاضر مشارکت داشته‌اند.

#### تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ‌گونه تعارض منافع در این مطالعه ندارند.

#### تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان از دکتر فرشاد شریف، مرکز تحقیقات سلامت سالمندان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تقدیر و تشکر می‌کنند.



## References

- [1] Smits WK, Lyras D, Lacy DB, Wilcox MH, Kuijper EJ. Clostridium difficile infection. *Nature Reviews Disease Primers*. 2016; 2:16020. [DOI:10.1038/nrdp.2016.20] [PMID] [PMCID]
- [2] Rodriguez C, Taminiou B, Korsak N, Avesani V, Van Broeck J, Brach P, et al. Longitudinal survey of Clostridium difficile presence and gut microbiota composition in a Belgian nursing home. *BMC Microbiology*. 2016; 16:229. [DOI:10.1186/s12866-016-0848-7] [PMID] [PMCID]
- [3] Vincent C, Manges AR. Antimicrobial use, human gut microbiota and Clostridium difficile colonization and infection. *Antibiotics*. 2015; 4(3):230-53. [DOI:10.3390/antibiotics4030230] [PMID] [PMCID]
- [4] Esfandiari Z, Jalali M, Safaeian L, Weese JS. [A review on epidemiology of Clostridium difficile infection (Persian)]. *Tehran University Medical Journal TUMS Publications*. 2016; 74(5):305-13. <http://tunj.tums.ac.ir/article-1-7573-en.html>
- [5] Hunter JC, Mu Y, Dumyati GK, Farley MM, Winston LG, Johnston HL, et al. Burden of nursing home-onset Clostridium difficile infection in the United States: Estimates of incidence and patient outcomes. *Open Forum Infectious Diseases*. 2016; 3(1). [DOI:10.1093/ofid/ofv196] [PMID] [PMCID]
- [6] Crogan NL, Evans BC. Clostridium difficile: An emerging epidemic in nursing homes. *Geriatric Nursing*. 2007; 28(3):161-4. [DOI:10.1016/j.gerinurse.2007.04.005] [PMID]
- [7] Rodriguez C, Korsak N, Taminiou B, Avesani V, Van Broeck J, Delmée M, et al. Clostridium difficile infection in elderly nursing home residents. *Anaerobe*. 2014; 30:184-7. [DOI:10.1016/j.anaerobe.2014.08.007] [PMID]
- [8] Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, Ananthakrishnan AN, Curry SR, Gilligan PH, et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of clostridium difficile infections. *American Journal of Gastroenterology*. 2013; 108(4):478-98. [DOI:10.1038/ajg.2013.4] [PMID]
- [9] Fuchs BB, Tharmalingam N, Mylonakis E. Vulnerability of long-term care facility residents to Clostridium difficile infection due to microbiome disruptions. *Future Microbiology*. 2018; 13(13):1537-47. [DOI:10.2217/fmb-2018-0157] [PMID]
- [10] Yu H, Baser O, Wang L. Burden of Clostridium difficile-associated disease among patients residing in nursing homes: A population-based cohort study. *BMC Geriatrics*. 2016; 16(1):193. [DOI:10.1186/s12877-016-0367-2] [PMID] [PMCID]
- [11] Kardas P, Devine S, Golembesky A, Roberts C. A systematic review and meta-analysis of misuse of antibiotic therapies in the community. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2005; 26(2):106-13. [DOI:10.1016/j.ijantimicag.2005.04.017] [PMID]
- [12] Peng Z, Jin D, Kim HB, Stratton CW, Wu B, Tang YW, et al. Update on antimicrobial resistance in Clostridium difficile: resistance mechanisms and antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Clinical Microbiology*. 2017; 55(7):1998-2008. [DOI:10.1128/JCM.02250-16] [PMID] [PMCID]
- [13] Monaghan T, Boswell T, Mahida YR. Recent advances in Clostridium difficile-associated disease. *Postgraduate Medical Journal*. 2009; 85(1001):152-62. [DOI:10.1136/gut.2007.128157]
- [14] Hadi A, Mohammad H, Alireza Y, Saman Z. Antibiotic utilization in Iran 2000-2016: Pattern analysis and benchmarking with organization for economic co-operation and development countries. *Journal of Research in Pharmacy Practice*. 2019; 8(3):162-7. [DOI:10.4103/jrpp.JRPP\_19\_42] [PMID] [PMCID]
- [15] Akhi MT, Pirzade T, Naghili B, Gojzade M. Antimicrobial susceptibility of Clostridium difficile isolated from different sources of Imam Reza Hospital, Tabriz. *African Journal of Microbiology Research*. 2011; 5(19):2946-9. [DOI:10.5897/AJMR11.423]
- [16] Mehdi LY, AL-Mossawei MT. Antibiotic susceptibility testing for Clostridium difficile Iraqi isolation by using disk diffusion method. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. 2015; 5(13):156-62. <https://www.iiste.org/Journals/index.php/JBAH/article/view/23964>
- [17] Fraga EG, Nicodemo AC, Sampaio JLM. Antimicrobial susceptibility of Brazilian Clostridium difficile strains determined by agar dilution and disk diffusion. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2016; 20(5):476-81. [DOI:10.1016/j.bjid.2016.07.004] [PMID]
- [18] Levett P. Antimicrobial susceptibility of Clostridium difficile determined by disc diffusion and breakpoint methods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1988; 22(2):167-73. [DOI:10.1093/jac/22.2.167] [PMID]
- [19] Nagy E, Justesen US, Eitel Z, Urbán E. Development of EUCAST disk diffusion method for susceptibility testing of the Bacteroides fragilis group isolates. *Anaerobe*. 2015; 31:65-71. [DOI:10.1016/j.anaerobe.2014.10.008] [PMID]
- [20] Erikstrup LT, Danielsen T, Hall V, Olsen K, Kristensen B, Kahlmeter G, et al. Antimicrobial susceptibility testing of Clostridium difficile using EUCAST epidemiological cut-off values and disk diffusion correlates. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012; 18(8):E266-72. [DOI:10.1111/j.1469-0691.2012.03907.x] [PMID]
- [21] Shoaee P, Shojaei H, Jalali M, Khorvash F, Hosseini SM, Ateei B, et al. Clostridium difficile isolated from faecal samples in patients with ulcerative colitis. *BMC Infectious Diseases*. 2019; 19:361. [DOI:10.1186/s12879-019-3965-8] [PMID] [PMCID]
- [22] Weinstein MP, Patel JB, Campeau S, Eliopoulos GM, Galas MF, Humphries RM, et al. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. 2018; 38.
- [23] Spigaglia P. Recent advances in the understanding of antibiotic resistance in Clostridium difficile infection. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*. 2016; 3(1):23-42. [DOI:10.1177/2049936115622891] [PMID] [PMCID]
- [24] Poilane I, Bert F, Cruaud P, Nicolas-Chanoine M, Collignon A. Interest of the disk diffusion method for screening Clostridium difficile isolates with decreased susceptibility to antibiotics. *Pathologie-Biologie*. 2007; 55(8-9):429-33. [DOI:10.1016/j.pat-bio.2007.07.010] [PMID]
- [25] Huang H, Weintraub A, Fang H, Nord CE. Antimicrobial resistance in Clostridium difficile. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2009; 34(6):516-22. [DOI:10.1016/j.ijantimicag.2009.09.012] [PMID]
- [26] Goudarzi M, Goudarzi H, Alebouyeh M, Rad MA, Mehr FSS, Zali MR, et al. Antimicrobial susceptibility of Clostridium difficile clinical isolates in Iran. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 2013; 15(8):704-11. [DOI:10.5812/ircmj.5189] [PMID] [PMCID]

- [27] Shayganmehr FS, Alebouyeh M, Azimirad M, Aslani MM, Zali MR. Association of tcdA+/tcdB+ Clostridium difficile genotype with emergence of multidrug-resistant strains conferring metronidazole resistant phenotype. Iranian Biomedical Journal. 2015; 19(3):143-8. [DOI: 10.7508/ibj.2015.03.003]
- [28] Sadeghifard N, Salari MH, Ghassemi MR, Eshraghi S, Harati FA. The incidence of nosocomial toxigenic Clostridium difficile associated diarrhea in Tehran tertiary medical centers. Acta Medica Iranica. 2010; 48(5):320-5. <https://acta.tums.ac.ir/index.php/acta/article/view/4057>
- [29] Shoaee P, Shojaei H, Khorvash F, Hosseini SM, Ataei B, Tavakoli H, et al. Molecular epidemiology of Clostridium difficile infection in Iranian hospitals. Antimicrobial Resistance & Infection Control. 2019; 8:12. [DOI:10.1186/s13756-018-0454-6] [PMID] [PMCID]
- [30] Norman KN, Scott HM, Harvey RB, Norby B, Hume ME. Comparison of antimicrobial susceptibility among Clostridium difficile isolated from an integrated human and swine population in Texas. Foodborne Pathogens and Disease. 2014; 11(4):257-64. [DOI:10.1089/fpd.2013.1648] [PMID]
- [31] Simango C, Uladi S. Detection of clostridium difficile diarrhoea in Harare, Zimbabwe. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2014; 108(6):354-7. [DOI:10.1093/trstmh/tru042] [PMID]
- [32] Oka K, Osaki T, Hanawa T, Kurata S, Okazaki M, Manzoku T, et al. Molecular and microbiological characterization of Clostridium difficile isolates from single, relapse, and reinfection cases. Journal of Clinical Microbiology. 2012; 50(3):915-21. [DOI:10.1128/JCM.05588-11] [PMID] [PMCID]
- [33] Rodríguez-Pardo D, Almirante B, Bartolomé RM, Pomar V, Mirelis B, Navarro F, et al. Epidemiology of Clostridium difficile infection and risk factors for unfavorable clinical outcomes: Results of a hospital-based study in Barcelona, Spain. Journal of Clinical Microbiology. 2013; 51(5):1465-73. [DOI:10.1128/JCM.03352-12] [PMID] [PMCID]
- [34] Obuch-Woszczatyński P, Lachowicz D, Schneider A, Mól A, Pawłowska J, Oźdżeńska-Milke E, et al. Occurrence of Clostridium difficile PCR-ribotype 027 and its closely related PCR-ribotype 176 in hospitals in Poland in 2008-2010. Anaerobe. 2014; 28:13-7. [DOI:10.1016/j.anaerobe.2014.04.007] [PMID]
- [35] Krutova M, Matejkova J, Tkadlec J, Nyc O. Antibiotic profiling of Clostridium difficile ribotype 176-a multidrug resistant relative to C. difficile ribotype 027. Anaerobe. 2015; 36:88-90. [DOI:10.1016/j.anaerobe.2015.07.009] [PMID]
- [36] Tian T-t, Zhao J-h, Yang J, Qiang C-x, Li Z-r, Chen J, et al. Molecular characterization of Clostridium difficile isolates from human subjects and the environment. PloS One. 2016; 11(3):e0151964. [DOI: 10.1371/journal.pone.0151964]
- [37] Ngamskulrungrroj P, Sanmee S, Pusathit P, Piewngam P, Elliott B, Riley TV, et al. Molecular epidemiology of Clostridium difficile infection in a large teaching hospital in Thailand. PloS One. 2015; 10(5):e0127026. [DOI:10.1371/journal.pone.0127026] [PMID] [PMCID]
- [38] Johanesen PA, Mackin KE, Hutton ML, Awad MM, Larcombe S, Amy JM, et al. Disruption of the gut microbiome: Clostridium difficile infection and the threat of antibiotic resistance. Genes. 2015; 6(4):1347-60. [DOI:10.3390/genes6041347] [PMID] [PMCID]