

Clostridium difficile İnfeksiyonunun Laboratuvar Tanısında Sorunlar

Nurittin Ardic

Giriş

Clostridium difficile Gram-pozitif, zorunlu anaerop, sporlu bir mikroorganizmadır (1). Nozokomiyal bir ajan olması ve uygun olmayan antibiyotik kullanımlarının sık görülmesi nedeniyle, bu bakteri ile her yıl milyonlarca insanın enfekte olmasına yol açmaktadır. Salgınlar sırasında yüzeyden, havadan, yiyeceklerden, uzun süreli tedavi ve bakım yapılan bölümlerden ve hastane personelinin ellerinden izole edilmiştir. Hastaların *C. difficile* ile çok kolay kontamine olabileceği bir yerde antibiyotik tedavisi görmeleri nedeni ile hastane ortamında birinci sırada gastrointestinal enfeksiyon nedeni haline gelmiştir (2). Psödomembranöz kolitlerin %90-100'ünden, antibiyotikle ilişkili kolitlerin %60-75'inden, antibiyotikle ilişkili diyarelerin %11-33'ünden sorumludur (1). Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda nozokomiyal infeksiyöz gastroenterit etkenlerinin %3.2-18.4 arasında *C. difficile* olduğu saptanmıştır (3-7). Toksin A (enterotoksin) ve toksin B (sitotoksin) olmak üzere en az iki toksin üretir. Her ikisi de ayrı ayrı toksik özellikte olup, ayrıca birbiri ile sinerji gösterirler (8). Bu toksinleri üretmeyen suşlar klinik önemi olan hastalık yapmazlar (9).

C. difficile enfeksiyonunun tanısında henüz standardize edilmiş tek bir tanı yöntemi yoktur. Ayrıca sağlıklı kişilerde %0-11, hospitalize erişkinlerde %10-20, çocuklarda %4-50 gibi asemptomatik taşıyıcılık görülmesi, test sonuçlarının yorumunda dikkat edilmesini gerektirir (2, 10). The Society for Healthcare Epidemiology Association (SHEA) ve bazı otörler optimal duyarlılık ve özgüllük elde etmek için dışkı kültürü ile doku kültürü sitotoksin testinin birlikte yapılmasını önermektedir. Çoğu laboratuvarlarda ise maliyet yüksekliği ve zaman alıcı olması nedeni ile bu iki test yapılmamaktadır. Buna karşın, duyarlılığı kısmen düşük de olsa, özgüllüğünün yüksek olması, maliyet ve zaman uygunluğu gibi sebeplerle ELISA testleri yaygın kullanım alanı bulmuştur. ELISA ve doku kültürü sitotoksin testinin birlikte uygulanması ise duyarlılığı %72'den %81'e çıkarmaktadır (11).

C. difficile enfeksiyonu tanısı, klinik, biyokimyasal ve mikrobiyolojik yaklaşım gerektirir (9, 11-14).

Klinik Tanı

Klasik semptom ve bulgular olduğunda *C. difficile* enfeksiyonu tanısını koymak oldukça kolaydır. Hastalık başlıca aşağıdaki beş klinik formdan biri ile seyredebilir: [1] Asemptomatik taşıyıcılık, [2] Psödomembransız kolit, [3] Psödomembranlı kolit (PMK), [4] Toksik megakolon, [5] Fülminan kolit.

Diyare ana semptomdur. Nozokomiyal diyarelerin önde gelen sebebi olup, hastaneyle ilişkili diyarelerin %20-45'inden *C. difficile* sorumludur (13). Kanlı diyare yaygın değildir, hatta görülmesi diyareye yol açan diğer sebepleri akla getirmelidir. Diyarenin yanında kramp şeklinde karın ağrısı, anoreksi ve bazen hafif ateş de görülebilir (9).

İki yaşından küçüklerin %25-60'ının, yenidoğanların ise %64'ünün dışkısında *C. difficile* görülmektedir. Sağlıklı yenidoğanlarda asemptomatik taşıyıcılığın yüksek olması, bu popülasyonda patojenik etkisinin olmadığını düşündürmektedir. Enterosit membran reseptörlerini bu yaş grubunda henüz kullanmamış olması bu görüşü desteklemektedir. Ayrıca yaş ile azalan antitoksik mukozal bir mekanizmanın varlığı da düşünülmektedir (2).

C. difficile, PMK'ye neden olan en sık etken olmakla birlikte, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* tip C ve diğer *Clostridium* türleri de aynı tabloyu meydana getirebilmektedir (2).

Biyokimyasal Testler

Rutin Biyokimyasal Testler

Lökositozun yanında, ciddi olgularda gelişen enteropatiye bağlı olarak dehidratasyon, protein kaybı sonucunda ortaya çıkan hipoalbuminemi ve diğer bazı elektrolit anomalileri görülebilir. Yine fekal lökositlerin saptanması *C. difficile* enfeksiyonunu destekleyen nonspesifik bulgulardır (8,9).

Gaz-Likid Kromatografisi

Bu anaerop bakteriler metabolizmaları sonucu uçucu spesifik (Tablo 1) metabolitler oluştururlar. Gaz-likid kromatografisi yöntemi ile, söz konusu metabolitler saptanarak, *C. difficile*'nin kesin tanımlayıcı idantifikasyonu yapılmaktadır. Basit, hızlı ve çok güvenilir diyagnostik bir testtir (15).

Radyolojik İncelemeler

Abdominal radyografi ve bilgisayarlı tomografi *C. difficile* enfeksiyon tanısında yardımcı olursa da, bu amaçla en çok tercih edilebilecek radyolojik tetkik endoskopidir (8). Abdominal radyogramda kolon ve çekumdaki dilatasyonları, incebarsaktaki hava-su seviyesini görmek olasıdır. Bilgisayarlı tomografide ise kolondaki kalınlaşmalar ve katlanmalar görülebilir. Ancak bunlar tamamen nonspesifik bulgulardır (9). Endoskopik yöntemlerde ise kolon duvarındaki lezyonlar incelenir. Ancak tipik psödomembran formasyonu yoksa kısmen nonspesiftir. Maliyeti, hasta için risk taşıması ve diğer tanı testlerinin olması nedeni ile daha çok özel durumlarda başvurulmalıdır. The American College of Gastroenterology Guidelines, endoskopiye şu şartlarda önermektedir (11): [1] Hızlı tanı testlerine ihtiyaç

Tablo 1. *C. difficile* ve Diğer Bazı *Clostridium*'ların Biyokimyasal Özellikleri*

Tür	Yağ asidi üretimi**	İzobutirik asid üretimi	Hareket	Spor***	Toksin	İndol	Maltoz****	Ksiloz****	Sukroz****	Mannitol****	Eskülin hidrolizi	Lipaz	Aerotolerans	Laktöz****	Lesitinaz
<i>C.botulinum</i> tip A ve proteolitik tip B ve F	A p ib B iV (f ic l s)	+	+	S	+	-	+/-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>C.sporogenes</i>	A ib B iv (p v ic s)	+	+	S	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-(+)
<i>C.botulinum</i> tip E ve nonproteolitik tip B ve F	A B (f l s)	-	+	S	+	-	+/-	-	+	-	-	+	-	-	-
<i>C.botulinum</i> tip C ve D	a P B (f v l s)	-	+	S	+	-	+(-)	-	-	-	-	+	-	-	-(+)
<i>C.difficile</i>	A ib b iv v ic (p c)	+	+(-)	S/T	+	-	-	-	-	+	+(-)	-	-	-	-
<i>C.innocum</i>	A B L (f s)	-	-	T	-	-	-	-	+(-)	+	+	-	-	-	-
<i>C.clostridioforme</i>	A (F l s)	-	+	S	-	-(+)	+	+	+	-	+	-	-	+/-	-
<i>C.glycolicum</i>	A ib iV (f p l s)	+	+	S	-	-	+/-	+	-	-	-(+)	-	-	-	-
<i>C.fallax</i>	A B (L s)	-	+	S	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>C.cadaveris</i>	A B (f p s)	-	+	T	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C.putrificum</i>	A ib B iv (f p ic l s)	+	+	T	-	-	-	-	-	-	-(+)	-	-	-	-
<i>C.novyi</i> tip C	A p B (v)	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C.carnis</i>	A f B l (s)	-	+	S	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+/-	-

*6 no.'lu kaynaktan alınmıştır
**Büyük harfler >10 µmol/ml, küçük harfler 0.2-10 µmol/ml (a: asetik asid, b: butirik asid, ib: izobutirik asid, p: propiyonik asid, v: valerik asid, iv: izovalerik asid, c: kaproik asid, ic: izokaproik asid, f: formik asid, l: laktik asid, s: süksinik asid)
***T=terminal, S=subterminal
****Fermantasyon testi

duyuluyor ve test sonuçları gecikecekse; [2] hasta ileuslu ve dışkı örneği alınmıyorsa, [3] endoskopik tanıyı gerektiren başka bir hastalık düşünülüyorsa.

Mikrobiyolojik İncelemeler Mikroskopik İnceleme

Toksin testleri için yeterli örnek aldıktan sonra buradan bir Gram boyaması yapılarak Gram-pozitif sporlu basiller aranır. Ayrıca buradan taze preparat hazırlanarak faz kontrast mikroskobu ile yapılan incelemelerde tipik salınım hareketi yapan sporlu basiller görülebilir. Ancak özgülüğü düşüktür (9,12).

Kültür

Normal bir gram dışkıdaki *C. difficile* sayısı 10^2 kadardır. Bu sayı 10^3 - 10^4 /gr olduğunda kültürle tanı yönünden anlamlı hale gelmektedir (2).

C. difficile izolasyonunda, George ve arkadaşlarının geliştirdiği CCFA (cefoksitin-cycloserine fructose agar) seçkin besiyeri olarak kullanılmaktadır. Dışkı örneklerinin direkt olarak inoküle edildiği ilk CCFA'nın bileşiminde sikloserin (500 mg/lt), sefoksitin (16 mg/lt), fruktoz, nötral kırmızısı indikatörü ve yumurta sarısı vardı. Sikloserin ve sefoksitin konsantras-

yonlarının çok yüksek olmasına bağlı olarak birçok *C. difficile* suşunun inhibe olduğunun anlaşılması üzerine bu antimikrobiyal ajanların konsantrasyonlarının yarı dozlarını içeren modifikasyonları yapılmıştır. CCEY (cycloserine-cefoxitine-egg yolk) agar gibi CCFA'nın modifikasyonları geliştirilerek kullanıma girmiştir (12).

Dışkı örneklerinin ısı veya alkolle işleme tabi tutulduktan sonra CCFA'ya pasajlarının yapılması *C. difficile* izolasyon oranını artırmaktadır (16). *C. difficile* kolonileri ultraviyole (UV) ışığı altında (366 nm dalga boyunda) CCFA üzerinde sarı-yeşil floresans verir. P-krezol, volatil yağ asitleri ve özellikle izokaproik asidlere bağlı olarak tipik at veya fil dışkısı kokusu vardır. *C. difficile* kolonileri tipik olarak, gri, opak, 24-48 saatte nonhemolitikdir. Fakat bazı suşları alfa-hemoliz yapar. İnkübasyondan 48-72 saat sonra sporülasyona bağlı olarak merkezi beyaz veya hafif gri olan ayırt edici koloniler gelişebilir. Kültürde üreyen koloniler lateks aglütinasyon, gaz kromatografi veya biyokimyasal yöntemlerle (Tablo 1) idantifiye edilir (12).

Kültür duyarlı bir yöntem olmasına karşın, kompleks oluşu, toksinojenik ve nontoksinojenik suşları ayırt edememesi gibi nedenlerle kısmen merkezi laboratuvarlarda uygulanır ve daha çok salgın zamanlarında epidemiyolojik açıdan önem kazanır. Bazı hastanelerde nontoksinojenik suşların oranı %20-25'i

Tablo 2. *C. difficile* İnfeksiyonlarında Kullanılan Testlerin Duyarlılık ve Özgüllükleri (5)

Test	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	Klinik Anlamı
Endoskopi	51	~100	PMK için diagnostik
Kültür	89-100	84-99	Oldukça duyarlı, toksisite yönünden doğrulanmalı
Doku kültürü sitotoksin testi	67-100	85-100	Klinikle uyumlu ise <i>C. difficile</i> diyaresi için diyagnostik
ELISA (toksin testi)	63-99	75-100	Klinikle uyumlu ise <i>C. difficile</i> diyaresi için diyagnostik
Lateks testi (<i>C. difficile</i> antijeni)	58-92	80-96	Hızlı, duyarlılık ve özgüllüğü diğer testlerden düşük
PCR	?	?	Araştırma aşamasında

bulmakta olup, bu sorun toksin testleri ile kombine edildiğinde çözülebilmektedir. Ancak bu da ilave zaman ve maliyet anlamı taşımaktadır (9,11).

Toksin Aramaya Yönelik Testler

Doku kültürü: Dışkı örneklerinde 10 pg'lık sitotoksin saptayabilen doku kültürleri, toksinlerin varlığını araştırmada altın standard olarak kabul edilmektedir (2). Bu yöntemde, Hep2 (human epithelial) hücreleri, CHO (Chinese hamster ovary) hücreleri, insan embriyonik akciğer fibroblast (MRC 5, WI-38) hücreleri, insan amniyon (FL) hücreleri ve Afrika yeşil maymun böbreği (Vero) hücreleri gibi hücreler kullanılmaktadır (17,18).

Bu amaçla, sıvı dışkı örnekleri santrifüje edildikten sonra elde edilen süpernatant, filtrelerden geçirilerek bakteriden arındırılır. Elde edilen filtrattan bir miktar saydam hücre kültürü kaplarına eklenir. 37°C'de 24-48 saat anaerob inkübasyondan sonra, ışık mikroskopunda sitopatik etki (yuvarlaklaşma) aranır. Normal dışkı örnekleri çalışmaya uygun olmadığından rutin işlemlerde en az on, hatta yüz kez dilüe edilmiş dışkılarından toksisite titreleri araştırılır (18). Nötralizan antikor (anti-*C. sordellii* antiserum) eklendiğinde bu sitopatik etki ortadan kalkar (8,11). Doku kültürünün dezavantajı uzun sürede (2-3 gün) sonuç alınması, pahalı olması, standardizasyonun sağlanamamış olması, her laboratuvarında uygulanamaması ve doğrulama için referans laboratuvarlarına gereksinimi olmasıdır. Bu yüzden pratik bir yöntem değildir (8,19). Her ne kadar altın standard kabul edilse de, toksin B'nin proteazlarla parçalanması sonucunda yalancı negatiflikler de görülebilmektedir (1).

İmmünoyagnostik Testler

ELISA: Sitotoksinlerin saptanmasında doku kültürlerinin yukarıda bahsedilen dezavantajları nedeni ile daha başka testlere gereksinim duyulmaktadır. Bu amaçla çoğunlukla daha hızlı, kısmen ucuz ve özgüllüğü yüksek olan ELISA testleri tercih edilmektedir. ELISA ile ancak 100-1000 pg toksin A veya B saptanabilmektedir. Bu nedenle %10-20 oranında bir yalancı negatiflik söz konusudur (8). Ticari kitlerin bir kısmı sadece toksin A antijenini saptamaya yöneliktir. *C. difficile* suşlarının %1-2'si toksin A üretmediğinden dolayı toksin A ve B'yi birlikte saptayan kitler tercih edilir (8, 9). Bunun yanı sıra *C. difficile*'nin 10 farklı toksinotipi saptanmış olup (I-X), tip VIII ve X toksin A'ya spesifik testlerle saptanamaz (20). ELISA yöntemi ile üç dışkı örneği incelenmesi tanı şansını sadece %5-10 arttırırken, maliyeti oldukça yükseltir. Bu nedenle hastalığın tablosunu açıklayıcı başka sebep bulunamamasına rağmen, di-

yarenin devam etmesi gibi durumlar dışında genelde tercih edilmez (8,9). Şekilli dışkılarda %10 dolayında yalancı pozitiflik gözlenebileceğinden, sadece diyareli hasta dışkılarında çalışılması önerilmektedir (9).

Lateks aglütinasyon testi: Hızlı, basit ve ucuz bir testtir. Bu testlerin esası toksin A'nın saptanması ise de, tüm *C. difficile* suşlarında bulunan glutamat dehidrogenaz da saptanabilmektedir (9). Lateks aglütinasyon yöntemi uygulanacak dışkı örneğinin dondurulmaması gerekmektedir (2). Diğer testlere göre duyarlılık ve özgüllüğünün düşük olması nedeni ile yaygın kullanım alanı bulmamıştır (9).

İmmünokromatografik testler: Yine toksin A'yı saptama temeline dayalı ve kısa sürede sonuç alınan tarama testleridir. Bazıları glutamat dehidrogenaz enzimini de saptar. Diğer sitotoksin testlerine göre bunların da duyarlılığı daha düşüktür (%70-90,6). Tanı amaçlı olarak tek başına kullanılması önerilmez (21,22).

Kromatografik ve lateks aglütinasyon testlerinin hücre kültürü sitotoksin testlerine tek üstünlüğü ise, daha hızlı ve ucuz olması, uygulama kolaylığı ve tek veya birden fazla hasta örneğini çalışmak için uygunluğudur (8).

Moleküler Yöntemler

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), toksin A veya B genlerini saptamada oldukça umut vaat etmektedir. Toksin A ve B genlerinin "nonrepeating" ve toksin B geninin "repeating" bölgelerine uygun çift primer seti kullanıldığında toksin A+/B+, toksin A/B+ ve toksin A/B suşlar birbirinden ayrılabilir (1,23). Maliyeti ve kompleks oluşu gibi nedenlerden dolayı rutin kullanım için henüz erkendir (3).

Diğer Testler

İnflamatuvar yanıt için belirleyici rolü olan laktoferrin, TNF-, IL-1β, IL-6 ve IL-8 gibi sitokinlerin salınımını *C. difficile*'nin uyardığı ve bunların bakılmasının *C. difficile* infeksiyonu tanısında ek bilgi sağlayacağı belirtilmektedir (10,24,25).

Bunların yanı sıra karşıt immün elektroforez, fluoresan antikor testleri gibi testler de kullanılmıştır (26).

Taşıyıcılardan ayırt edebilmek için sadece sulu ve son 36 saat içinde en az altı kez sulu dışkılaması olan hastaların dışkıları kabul edilmelidir. Rutin dışkı kapları uygundur. Laboratuvar incelemesi ilk 24 saatte +4°C'de, daha uzun süre bekleyecekse -20°C'de bekletilmelidir (7,14).

Sonuçta, bu yöntemlerin hepsinde birtakım avantaj ve dezavantajlar vardır. Tüm hastalar için aynı tanı yöntemini kul-

lanmak uygun olmayabilir. Sonuçların yorumunda klinikle uyumu esas alınmalıdır. Bu amaçla the Infectious Diseases Society of America ve the Society for Hospital Epidemiology of America önerisine göre *C. difficile* toksin tespitinde izlenecek yol şu şekildedir (8): [1] İleus olguları dışında, sadece diyareli dışkıları test edilmelidir. [2] Epidemiyolojik araştırmaların dışında tedavi sonrası takip yapılmamalıdır. [3] Sadece bir yaşın üzerindeki kişilerden örnek alınmalıdır. [4] Duyarlılığı daha düşük olmakla birlikte ELISA testleri sitotoksin testlerine alternatif olarak kabul edilebilir özelliktedir. [5] Nötropeni, HIV ile enfekte ve 65 yaşın üzerindeki kişiler dışında, sadece hospitalizasyondan üç gün sonra diyare gelişen hastalar toksin yönünden test edilmelidir (üç gün kuralı).

Kaynaklar

1. Vanpoucke H, De Baere T, Claeys G, Vanechoutte M, Verschraegen G. Evaluation of six commercial assays for the rapid detection of *Clostridium difficile* toxin and/or antigen in stool specimens. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7: 55
2. Baylan O, Doğançlı L, Gün H. Klinik ve mikrobiyolojik açıdan *Clostridium difficile*. *Sendrom* 1998; 10: 71-6.
3. Büyükbaba Ö, Özkan E, Büğet E. Uzun süreli antibiyotik tedavisi gören ishallerli çocukların dışkılarında *Clostridium difficile*'nin araştırılması. *Klimik Derg* 1994; 7: 105-7
4. Altuğlu İ, Aydemir Ş, Zeytinoğlu A, Erensoy S, Bilgiç A. Antibiyotikle ilişkili nozokomiyal diyarelerde *Clostridium difficile* toksin araştırılması. *İnfeksiyon Derg* 2001; 15: 495-7
5. Kocazeybek B. Özel bir hastanede akut gastrointestinal enfeksiyon etkeni mikroorganizmaların prevalansının araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cemiyet Derg* 2001; 31: 69-72
6. Boral ÖB. *Clostridium difficile* enfeksiyonu ön tanımlı hastaların dışkı örneklerinde toksin A ve B'nin belirlenme sıklığı. *Türk Mikrobiyol Cemiyet Derg* 2002; 32: 220-4
7. Aygün G, Aslan M, Yaşar H, Altaş K. Hastanede yatarken gelişen ishal olgularında *Clostridium difficile* toksin A+B araştırılması. *Ankem Derg* 2002; 16:82-4
8. Bartlett JG. Antibiotic-associated diarrhea. *N Eng J Med* 2002; 346: 334-9
9. Fry DE. *Clostridium difficile* infection. In: Moellering RC, ed. *Emerging Pathogens: Implications for the Future*. Montreal: PharmaLibri Publishers, 2000: 51-75
10. Schlepner MA, Garner DC, Sosnowski KM, et al. Concurrence of *Clostridium difficile* toxin A enzyme-linked immunosorbent assay, fecal lactoferrin assay, and clinical criteria with *C. difficile* cytotoxin titer in two patient cohorts. *J Clin Microbiol* 1995; 33:1755-9
11. Thielman N. Antibiotic-associated colitis. In: Mandell GL, Douglas RC, Bennett JE, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000: 1111-26
12. Collee JG, Brown R, Poxton IR. Clostridia of wound infection. In: Collee JG, Fraser AG, Marmion BP, Simmons A, eds. *Practical Medical Microbiology*. 14th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 1996; 511-47
13. Alfa MJ, Du T, Beda G. Survey of incidence of *Clostridium difficile* infection in Canadian hospitals and diagnostic approaches. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2076-80
14. Mülazimoğlu L. Antibiyotik bağımlı ishal. *Klimik Derg* 1996; 9: 13-4
15. Nonhoff C, Struelens MJ, Serruys E. Evaluation of gas-liquid chromatography (GLC) for rapid detection of *Clostridium difficile* in fecal specimens. *Acta Clin* 1995; 50: 76-80
16. Buogo C, Burnens AP, Perrin J, Nicolet J. Presence of *Campylobacter* spp. *Clostridium difficile*, *C. perfringens* and *Salmonella* in some litters of puppies and adult population of dogs. *Schweizer Arch Tierheilkunde* 1995; 137: 165-71
17. Sullivan NM, Pellet S, Wilkins TD. Purification and characterization of toxins A and B of *Clostridium difficile*. *Infect Immun* 1982; 35: 1032-40
18. Lysterly DM, Howard CK, Wilkins TD. *Clostridium difficile*: it's disease and toxins. *Clin Microbiol Rev* 1988; 1: 1-18
19. Manabe YC, Vinetz JM, Moore RD, Merz C, Charache P, Bartlett JG. *Clostridium difficile* colitis: an efficient clinical approach to diagnosis. *Ann Intern Med* 1995; 123: 835-40
20. Johnson S, Sambol SP, Brazier JS, Delmée M, Avesani V, Merriegan MM, Gerding DN. International typing study of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* variants. *J Clin Microbiol* 2003; 41:1543-7
21. Fedorko DP, Engler HD, O'Shaughnessy EM, Williams EC, Reichelderfer CJ, Smith WI. Evaluation of two rapid assays for detection of *Clostridium difficile* Toxin A in stool specimens. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3044-7
22. Alfa MJ, Swan B, VanDekerkhove B, Pang P, Harding GK. The diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea: comparison of Triage *C. difficile* panel, EIA for Tox A/B and cytotoxin assays. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 43: 257-63
23. Kato H, Kato N, Watanabe K, Iwai N, Nakamura H, Yamamoto T, Suzuki K, Kim SM, Chong Y, Wasito EB. Identification of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* by PCR. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2178-82
24. Warny M, Keates AC, Keates S, et al. p38 MAP kinase activation by *Clostridium difficile* toxin A mediates monocyte necrosis, IL-8 production, and enteritis. *J Clin Invest* 2000; 105: 1147-56
25. Steiner TS, Flores CA, Pizarro TT, Guarrant RL. Fecal lactoferrin, interleukin-1beta, and interleukin-8 are elevated in patients with severe *Clostridium difficile* colitis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; 4: 719-22.
26. Knoop FC, Owens M, Crocker IC. *Clostridium difficile*: clinical disease and diagnosis. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6: 251-65.