

İSHALLİ HASTALARIN DIŞKI ÖRNEKLERİNDE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* TOKSİN A/B SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI*

Zübeyde LALE¹, Funda DOĞRUMAN AL¹, Işıl FİDAN¹, Gülcan ADIYAMAN¹,
Emine YEŞİLYURT¹, Seçil ÖZKAN², Kayhan ÇAĞLAR¹

¹Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

²Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, ANKARA

ÖZET

Clostridium difficile, antibiyotik ile ilişkili ishallerin en önemli etkenlerindedir. Toksik C.*difficile* suşları, asemptomatik kolonizasyondan, pseudomembranöz kolite kadar değişen farklı klinik semptomlara neden olmaktadır. C.*difficile* ile ilişkili kolit tanısında dışkı örneklerinde toksin üretimini belirleyen testler yaygın olarak kullanılmaktadır.

Çalışmamızda ishaller hastalara ait dışkı örneklerinde C.*difficile* toksin A/B varlığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Toksin A/B varlığının belirlenmesi, enzim immünoassay yöntemi (ELISA) ile yapılmıştır. Bu amaçla, Serazym *Clostridium difficile* Toxin A/B (Seramun, Almanya) ticari kiti kullanılmıştır.

İncelenen 592 adet dışkı örneğinde C.*difficile* toksin A/B pozitifliği % 24 olarak tespit edilmiştir. Kan ve dışkı lökosit sayılarının Toksin A/B pozitif hastalarda toksin negatif hastalara göre anlamlı düzeyde düşük olduğu belirlenmiştir ($p < 0.01$, $p = 0.012$). C.*difficile* toksin A/B pozitiflik oranı en sık hematoloji-onkoloji, kemik iliği nakil ünitelerindeki hastalara ait dışkı örneklerinde tespit edilmiştir.

C.*difficile* enfeksiyonunun ishaller hastalardaki dışkı örneklerinde yüksek oranda bulunduğu tespit edilmiştir. Özellikle antibiyotiklerin yoğun olarak kullanıldığı ve immünsupresif hastaların bulunduğu ünitelerde C.*difficile* enfeksiyonlarının daha sık görüldüğü tespit edilmiştir. Bu nedenle, C.*difficile*'nin, ishal ayırıcı tanısında mutlaka düşünülmesi gereken bir patojen olduğu ve tanısına yönelik testlerin yapılmasının uygun olacağı düşünülmüştür. C.*difficile* ile ilişkili ishallerde antibiyotik kullanımının yüksek oranda olması nedeniyle, hastanelerin belirli zaman aralıklarında antibiyotik kullanım stratejilerini gözden geçirmeleri gerekmektedir.

Anahtar sözcükler: *Clostridium difficile*, ishal, toksin

SUMMARY

The Investigation of Frequency of *Clostridium difficile* Toxin A/B in Stool Samples of Patients with Diarrhea

Clostridium difficile is one of the most important causes of diarrhea associated with antibiotics. Toxigenic strains of C.*difficile* lead to various clinical symptoms, ranging from asymptomatic colonization to pseudomembranous colitis. The most widely used test for diagnosing C.*difficile* associated colitis is a test that detects toxins produced by C.*difficile* in stool samples.

In our study, stool samples of 592 patients with diarrhea were studied for prevalence of C.*difficile* Toxin A/B. To investigate the presence of Toxin A/B, the enzyme immunoassay method (ELISA) was carried out using ile Serazym *Clostridium difficile* Toxin A/B kit (Seramun, Germany).

In the stool samples examined, 24 % C.*difficile* toxin A/B positivity was found in total 592 stool examples. The number of leukocytes in the blood and stool samples was significantly lower in Toxin A/B positive patients than those of Toxin A/B negative patients ($p < 0.01$, $p = 0.012$). The rate of C.*difficile* Toxin A/B positivity was more frequently detected in patients stool samples the divisions of hematology-oncology and bone marrow transplantation.

C.*difficile* infection rate in patients stool samples showing symptoms of diarrhea was high. In divisions which antibiotics were widely used and patients were immunosuppressed, C.*difficile* infections were more common. C.*difficile* should be considered as a pathogen in the differential diagnosis of diarrhea and diagnostic testing might be appropriate. In addition, since the use of antibiotics is high in C.*difficile* associated diarrhea, hospitals should revise their antibiotic strategies periodically.

Keywords: *Clostridium difficile*, diarrhea, toxin

İletişim adresi: Işıl Fidan. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

Tel: (0312) 202 46 26

e-posta: isilfidan@yahoo.com

Alındığı tarih: 04.03.2013, Yayına kabul: 17.05.2013

*XXXIV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde sunulmuştur. Poster No. 257 (7-11 Kasım 2010, Girne)

GİRİŞ

Clostridium difficile, Gram pozitif, anaerop, sporlu bir basildir. İlk olarak 1935 yılında sağlıklı bebeklerin dışkılarından izole edilmiş ve sitotoksin üreten bir bakteri olduğu belirlenmiştir⁽¹³⁾. *C.difficile*, klinik olarak asemptomatik taşıyıcılıktan ölümle sonlanabilen tabloya kadar çok geniş bir yelpazede infeksiyon yapabilmektedir. Hafif ishal, psödomembranöz kolit, toksik megakolon veya sepsis ile giden klinik tablolar oluşturabilmektedir⁽²⁾. Normal kişilerde yaklaşık % 1-2, hastanede yatanlarda % 20 oranında asemptomatik bağırsak kolonizasyonu bulunmaktadır⁽¹⁰⁾. Ürettiği toksin A (Enterotoksin) ve toksin B (Sitotoksin) aracılığıyla enterokolit oluşturmaktadır⁽¹⁸⁾. Etki mekanizmaları benzer olan bu toksinler, endositozla bağırsak epitel hücrelerine girmekte ve hücrede aktin iskeletini etkileyerek hücre ölümüne neden olmaktadır. Toksinlerin, aynı zamanda birtakım sitokinlerin salgılanmasına, böylece inflamatuvar yanıtın gelişmesine ve psödomembranların oluşmasına yol açtıkları da belirlenmiştir. Önceleri, toksin A'nın bağırsak epitelinde zedelenme oluşturduğu, ardından toksin B'nin etkisini gösterdiği, dolayısıyla toksin B'nin tek başına aktif olamayacağı düşünülmekte iken, moleküler tekniklerin gelişmesiyle, toksin B'nin, toksin A olmaksızın sitotoksik etki gösterdiği anlaşılmıştır⁽¹⁴⁾.

C.difficile, antibiyotikle ilişkili ishallerin en sık nedenlerinden olup, yaklaşık % 15-25'inden sorumludur⁽⁴⁾. Antibiyotikle ilişkili ishal tanımı; başka bir nedenle açıklanamayan ve antibiyotik kullanımından 2 saat ile 2 ay arasındaki sürelerde ortaya çıkan, günde ikiden fazla ve iki gündür devam eden şekilsiz dışkılama için kullanılmaktadır⁽¹⁾.

C.difficile infeksiyonu sıklıkla sefalosporin, florokinolon, klindamisin, penisilin gibi antibiyotik kullanımı ile birlikte görülmektedir. Geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın ve uygunuz biçimde kullanıldığı günümüzde gerek hastane dışında, gerekse hastanede yatan hastalarda antibiyotikle ilişkili ishallerde önemli bir etken olarak karşımıza çıkmaktadır. *C.difficile*, hastaneye yatırılan hastalarda ortaya çıkan ishallerde en önemli ve en sık görülen etkidir. Salgıladığı enterotoksin (toksin A) ve sitotoksin

(toksin B) hastalığın patogeneğinde sinerjistik etkiler göstermektedirler. Antibiyotik kullanımı *C.difficile* infeksiyonlarında değiştirilebilen bir risk faktörü olup, diğer risk faktörleri ileri yaş, hastanede yatış süresi, altta yatan hastalığın şiddetidir. Ayrıca, mide asit supresyonu, enteral beslenme, gastrointestinal cerrahi, kanser kemoterapisi ve hematopoetik kök hücre transplantasyonu olası ek risk faktörleridir. *C.difficile* infeksiyonu esas olarak ileri yaştaki kişileri etkilemesine rağmen, günümüzde hastanede ortamıyla karşılaşmamış sağlıklı gençlerin veya antibiyotik tedavisi almayan bireylerin de risk altında olduğu kabul edilmektedir⁽¹³⁾.

C.difficile infeksiyonun tanısı amacıyla, antijen aranması, kültür, sitotoksisite testleri ve polimeraz zincir reaksiyonu kullanılmaktadır. Ayrıca dışkıda toksin varlığının ELISA ve lateks aglütinasyon gibi yöntemlerle gösterilmesi sıklıkla kullanılan yöntemlerdir.

Çalışmamızda, ishalleri ve klinik özellikleri *C.difficile* infeksiyonu ile uyumlu hastaların dışkı örneklerinde *C.difficile* toksin A ve toksin B sıklığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Ocak-Ağustos 2010 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen, ishalleri hastalara ait yumuşak kıvamlı veya sulu mukuslu dışkı örnekleri çalışma kapsamına alınmıştır. Dışkı örneklerinin 131'i (% 22) pediatri, 123'ü (% 21) gastroenteroloji, 78'i (% 13) onkoloji-hematoloji, 49'u (% 8) yoğun bakım, 47'si (% 8) pediatrik enfeksiyon, 44'ü (% 7) enfeksiyon hastalıkları, 35'i (% 6) dahiliye, 34'ü (% 6) pediatrik gastroenteroloji, 28'i (% 5) pediatrik onkoloji-hematoloji ve 23'ü (% 4) diğer birimlerden gönderilmiştir.

Dışkı örneklerinde *C.difficile* toksin A/B sıklığı Enzim immünoassay yöntemi ile, *C.difficile* toksin A'nın ve toksin B'nin aynı anda kalitatif olarak belirlenmesini sağlayan ticari kit (Serazym *Clostridium difficile* Toxin A/B, Seramun, Almanya) kullanılarak üretici firmasının önerileri doğrultusunda çalışılmıştır. Dışkı örnekleri toplandıktan sonra makroskopik ve mikroskopik incelemeleri yapılmıştır. Dışkı

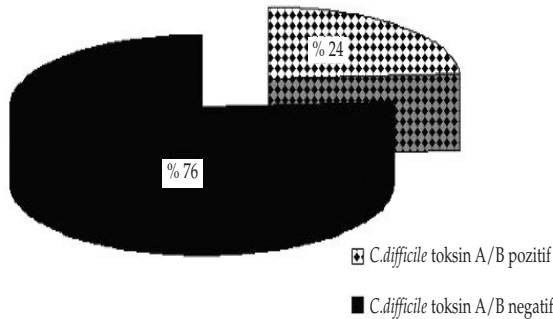
örnekleri; lökosit, eritrosit ve parazit varlığı açısından nativ-lugol inceleme, trikrom ve asit-fast boyama yöntemleri ile ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir. Daha sonra, dışkı örneklerinin kültürleri yapılarak patojen bakteri varlığı araştırılmıştır. Dışkı örnekleri *C.difficile* toksin A/B ELISA çalışılınca kadar -20°C'de saklanmıştır. Örnekler, *C.difficile* toksin A/B yönünden en geç bir hafta içinde çalışmaya alınmıştır. Çalışma yapıldıktan sonra, örneğin absorbansı eşik değerinden yüksek ise pozitif, eşik değerinin % 10 altındaysa negatif, eşik değerinin % 10 sınırları arasında tespit edildiyse sınırda kabul edilmiştir. Absorbans değerleri sınır değerde çıkan örnekler üretici firmanın önerileri doğrultusunda tekrar çalışılmıştır.

C.difficile toksin A/B pozitif ve negatif hastalar arasındaki istatistiksel karşılaştırmada Fisher ki-kare testi uygulanmıştır. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

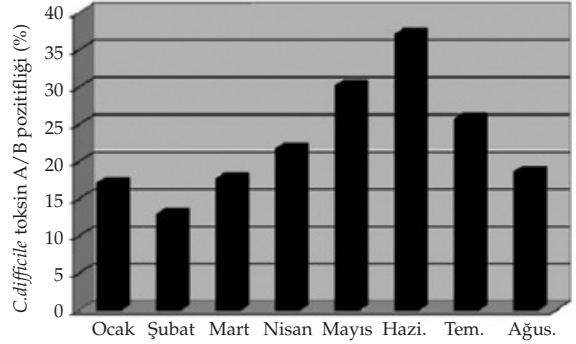
Çalışmamızda incelenen 592 dışkı örneğinin alındığı hasta grubunda yaş aralığı 1-81 (29.3 ± 24.68) ve kadın/erkek oranı 268/324 olarak tespit edilmiştir. Dışkı örneklerinin mikroskopik incelemesinde, 4 örnekte *Giardia intestinalis*, bir örnekte *Entamoeba coli* tespit edilmiştir. Dışkı örneklerinin kültüründe 581 örnekte normal bağırsak florası, iki örnekte dışkıda patojen bakteri üremesi (*Shigella sonnei* ve *Shigella flexneri*), dokuz örnekte *Candida* spp. tespit edilmiştir.

İncelenen 592 hastaya ait dışkı örneğinin 135'inde (% 23) ELISA yöntemi ile *C.difficile* toksin A/B pozitif, 50'sinde (% 8) sınır değer olarak bulunmuştur. Sınır değer veren 50 dışkı örneği



Şekil 1. Dışkı örneklerinde *C.difficile* toksin A/B pozitiflik oranı (%).

aynı yöntemle tekrar çalışıldığında örneklerin yedisinde *C.difficile* toksin A/B pozitif olarak saptanırken, 43'ünde negatif bulunmuştur. Böylece çalışılan 592 dışkı örneğinin toplam 142'sinde (% 24) *C.difficile* toksin A/B pozitif olarak saptanmıştır (Şekil 1). Çalışmamızda, dışkı örneklerinde pozitiflik oranının en sık Haziran ayında olduğu belirlenmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. Aylara göre *C.difficile* toksin A/B pozitiflik oranı (%).

İncelenen dışkı örneklerinde 18 yaş üstü yetişkin hasta grubunda en yüksek *C.difficile* toksin A/B pozitiflik oranı, % 38 ile hematoloji-onkoloji ve kemik iliği nakil ünitelerinde tespit edilmiştir.

C.difficile toksin A/B pozitif olarak bulunan hastalarda % 22 oranında kan lökosit düzeylerinde düşüklük (lökopeni) tespit edilirken, *C.difficile* toksin A/B negatif bulunan hastalarda bu oran % 9 olarak bulunmuştur. *C.difficile* toksin A/B pozitif ve negatif hastalar arasında lökopeni açısından istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmiştir ($p < 0.001$).

C.difficile toksin A/B pozitif hastalarda dışkı mikroskopisinde lökosit, % 17 hastada yüksek olarak bulunurken; toksin negatif hasta grubunda bu oran % 9 olarak tespit edilmiş ve *C.difficile* toksin A/B pozitif ve negatif hastalar arasında dışkı mikroskopisinde lökosit varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p = 0.012$) (Tablo).

Tablo. *C.difficile* toksin A/B pozitif ve negatif örneklerde lökopeni ve dışkıda lökosit oranları.

	<i>C.difficile</i> toksin A/B pozitif (n=142)	<i>C.difficile</i> toksin A/B negatif (n=450)	p değeri
Lökopeni n (%)	31 (22)	40 (9)	<0.001
Dışkıda lökosit n (%)	24 (17)	42 (9)	0.012

TARTIŞMA

Sağlıklı kişilerde *C.difficile* taşıyıcılık oranı % 3 iken hastanede yatan, antibiyotik kullanan kişilerde taşıyıcılık oranı % 40'lara çıkmaktadır⁽¹²⁾. Toksin belirlemede altın standart olarak kabul edilen sitotoksik testlerle karşılaştırıldığında, *C.difficile* toksin A/B saptanmasında ELISA yönteminin duyarlılığı % 95.3, özgüllüğü ise % 100 olarak belirlenmiştir. Sitotoksik testlere göre toksin belirlenmesinde ELISA yöntemi daha pratik bir yöntemdir^(15,16). Hızlı sonuç alınması ve uygulama kolaylığı nedeniyle pek çok laboratuvarında toksin A ve B varlığını belirleyen ELISA yöntemi kullanılmaktadır⁽¹⁷⁾. Toksin A negatif, toksin B pozitif suşların da ishal ve kolit nedeni olarak izole edilmesi ve toksin A/B belirlenen olgularda toksin A'nın sadece % 30.7 oranında pozitif olarak tespiti, *C.difficile* kaynaklı ishal olgularının saptanmasında toksin A ve B tespitinin bir arada yapılmasının önemini ortaya koymakta ve aynı zamanda patogeneizde toksin B'nin önemine dikkat çekmektedir^(3,8,16). Bu nedenle, tanı amacıyla toksin varlığının araştırıldığı testlerin hem toksin A, hem de toksin B'yi içermesi gerekmektedir. Bu nedenle çalışmamızda her iki toksini bir arada tespit eden ELISA kiti kullanılmıştır.

Çalışmamızda ELISA yöntemi ile çalışılan 592 dışkı örneğinin 142'sinde (% 24) *C.difficile* toksin A/B pozitifliği saptanmıştır. Garcia ve ark.⁽⁹⁾, yaptıkları çalışmada nozokomiyal ishaller hastaların % 35.2'sinde *C.difficile* ile ilişkili ishal tespit etmişler ve *C.difficile* infeksiyonlarında hastane ortamında geçişin sık olarak görüldüğünü bildirmişlerdir. Deniz ve ark.⁽⁷⁾, Marmara Üniversitesi Hastanesi'nde yatan, ishali olan 633 hastanın dışkı örneklerinde enzim immünoasay testi ile toksin pozitiflik oranını % 4.7 olarak bildirmişlerdir. Aygün ve ark.⁽⁵⁾, antibiyotik ile ilişkili ishal olgularında *C.difficile* toksin A/B pozitifliğini % 4.3 olarak belirlemişler ve bu düşük oranı kullanılan kitlerin farklılığından veya *C.difficile* tanısının daha erken yapılıp, ampirik tedaviye başlanmasından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Büyükbaba Boral⁽⁶⁾, *C.difficile* ön tanısı ile laboratuvara gönderilen 360 dışkı örneğinde sadece toksin A'yı belirleyen kit ile toksin A varlığını % 4.7 olarak belir-

lerken, laboratuvara daha sonraki yıllarda gönderilen 400 dışkı örneğinde toksin A/B varlığını % 12 olarak belirlemiştir. Bu durum, *C.difficile* tanısında toksin varlığının araştırılırken her iki toksini de içeren kitlerin kullanımının önemini bir kez daha göstermektedir.

Güzel-Tunçcan ve ark.⁽¹¹⁾, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 74'i nötropenik ve 75'i non-nötropenik toplam 149 olguda toksin A/B sıklığını sırasıyla % 24.3 ve % 21.3 olarak belirlemişlerdir. Çalışmamıza dahil edilen 592 olguda toksin A/B sıklığı, hastanemizde yapılan bu çalışma ile uyumlu düzeylerde belirlenmiştir. Çalışmamızda, hematoloji-onkoloji, kemik iliği nakil ünitelerinden gelen hasta dışkı örneklerinde toksin A/B pozitiflik oranı % 38 gibi yüksek değerlerde bulunmuştur. *C.difficile*'nin bu derece yüksek oranlarda çıkması, antibiyotiklerin bu birimlerde yoğun olarak kullanılması ve hastaların büyük oranda immünosupresif olması ile açıklanabilmektedir.

Çalışmamızda, *C.difficile* toksin A/B pozitif ve negatif hastalar arasında lökopeni ve dışkı mikroskopisinde lökosit varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmiştir. Güzel-Tunçcan ve ark.'nın⁽⁶⁾ yaptıkları çalışmada ise, nötropenik ve nötropenik olmayan hasta örnekleri arasında toksin A/B varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Belirlediğimiz istatistiksel farkın anlamlılığının, çalışmamızdaki hasta örneği sayısının, Güzel-Tunçcan ve ark.'nın⁽¹¹⁾ yaptıkları çalışmadaki sayının yaklaşık dört katı olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızın, hasta sayısının fazla olması açısından elde edilen verilerin hastanemizde *C.difficile* epidemiyolojisi konusuna dikkat çekeceği ve literatüre katkı sağlaması açısından önemli olduğu kanaatine varılmıştır.

Sonuç olarak, *C.difficile* infeksiyonlarının ishaller hastalara ait dışkı örneklerinde yüksek oranlarda olduğu tespit edilmiştir. *C.difficile* toksin A/B sıklığının ishaller hastalarda yüksek oranda bulunması, antibiyotik kullanım politikalarının tekrar gözden geçirilmesi gerektiğini düşündürmektedir. Ayrıca, ishaller olan hastalarda *C.difficile* toksin A/B saptama oranlarının yüksek düzeylerde olması, antibiyotikle ilişkili ishal ve nozokomiyal ishallerde önemli bir etken

olan *C.difficile*'nin ayırıcı tanıda gözardı edilme-
mesi gereken önemli bir patojen olduğunu gös-
termektedir.

KAYNAKLAR

1. Alam S, Mushtaq M. Antibiotic associated diarr-
hea in children, *Indian Pediatrics* 2009;46(6):491-6.
PMid:19556659
2. Alfa MJ, Du T, Beda G. Survey of incidence of
Clostridium difficile infection in Canadian hospi-
tals and diagnostics approaches, *J Clin Microbiol*
1998;36(7):2076-80.
PMid:9650966 PMCid:104982
3. Altındış M, Usluer S, Çiftçi İ, Tunç N, Çetinkaya
Z, Aktepe O. Antibiyotiğe bağlı ishal olgularında
Clostridium difficile varlığının kültür ve toksin
saptama yöntemleriyle araştırılması, *Mikrobiyol
Bul* 2007;41(1):29-37.
PMid:17427550
4. Asha NJ, Tompkins D, Wilcox MH. Comparative
analysis of prevalence, risk factors, and molecular
epidemiology of antibiotic-associated diarrhea
due to Clostridium difficile, Clostridium perfrin-
gens, and Staphylococcus aureus, *J Clin Microbiol*
2006;44(8):2785-91.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00165-06>
PMid:16891493 PMCid:1594656
5. Aygün G, Aslan M, Yaşar H, Altaş K. Antibiyotikle
ilişkili ishal olgularında Clostridium difficile tok-
sin A+B araştırılması, *Türk Mikrobiyol Cem Derg*
2003;33(1):39-41.
6. Büyükbaba Boral Ö. Clostridium difficile infeksi-
yonu ön tanılı hastaların dışkı örneklerinde toksin
A ve B'nin belirlenme sıklığı, *Türk Mikrobiyol Cem
Derg* 2003;32(3-4):220-4.
7. Deniz U, Ülger N, Aksu B, Karavuş M, Söyletir G.
Marmara Üniversitesi Hastanesinde yatan ishalleri
hastalardan izole edilen Clostridium difficile
kökenlerinde toksin genlerinin araştırılması,
Mikrobiyol Bul 2011;45(1):1-10.
PMid:21341153
8. Drudy D, Harnedy N, Fanning S, Mahony RO, Kne
L. Isolation and characterisation of toxin A-negative,
toxin B-positive Clostridium difficile in Dublin,
Ireland, *Clin Microbiol Infect* 2007;13(3): 298-304.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01634.x>
PMid:17391385
9. Garcia C, Samalvides F, Vidal M, Gotuzzo E,
Dupont HL. Epidemiology of Clostridium difficile
associated diarrhea in a Peruvian tertiary care
hospital, *Am J Trop Med Hyg* 2007;77 (5):802-5.
PMid:17984329
10. Gasperino J, Garala M, Hillel W Cohen, Kvetan V,
Currie B. Investigation of critical care unit utiliza-
tion and mortality in patients infected with
Clostridium difficile, *J Crit Care* 2010;25(2):282-6.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrc.2009.04.002>
PMid:19592210
11. Güzel-Tunçcan Ö, Ulutan F, Karakuş R.
Antibiyotiğe bağlı ishal gelişen nötropenik ve
nötropenik olmayan hastalarda Clostridium diffi-
cile toksin sıklığı ve risk faktörlerinin analizi,
Mikrobiyol Bul 2008;42(4):573-83.
12. Hookman P, Barkin JS. Clostridium difficile asso-
ciated infection, diarrhea and colitis, *World J
Gastroenterol* 2009;15(13):1554-80.
<http://dx.doi.org/10.3748/wjg.15.1554>
PMid:19340897 PMCid:2669939
13. Kelly CP, LeMont T. Clostridium difficile-more diffi-
cult than ever, *N Engl J Med* 2008;359(18):1932-40.
<http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra0707500>
PMid:18971494
14. Poxton IR, McCoubrey J, Blair G. The pathogeni-
city of Clostridium difficile, *Clin Microbiol Infect*
2001;7(8):421-7.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1198-743x.2001.00287.x>
PMid:11591205
15. Poutanen SM, Simor AE. Clostridium difficile-
associated diarrhea in adults, *CMAJ* 2004;171(1): 51-8.
<http://dx.doi.org/10.1503/cmaj.1031189>
PMid:15238498 PMCid:437686
16. Samra Z, Talmor S, Bahar J. High prevalence of
toxin-A negative, toxin-B positive Clostridium
difficile in hospitalized patients with gastrointes-
tinal disease, *Diag Microbiol Infect Dis* 2002;
43(3):189-92.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893\(02\)00400-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893(02)00400-5)
17. Shin BM, Kuak EY, Lee EJ, Songer JG. Algorithm
combining toxin immunoassay and stool culture for
diagnosis of Clostridium difficile infection, *J
Clin Microbiol* 2009;47(9): 2952-6.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00609-09>
PMid:19625481 PMCid:2738110
18. Warny M, Pepin J, Fang A et al. Toxin production
by an emerging strain of Clostridium difficile
associated with outbreaks of severe disease in
North America and Europe, *Lancet* 2005; 366(9491):
1079-84.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67420-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67420-X)