



การประเมินคุณภาพชุดตรวจวิเคราะห์พิษของเชื้อคลอสทริเดียมดิฟฟิไซล์ เอ/บี โดยวิธีเลตเฟลโวลูมิโนโครมาโตกราฟี

The Quality Evaluation of *Clostridium difficile* Toxin A/B Test Kit by Lateral Flow Immunochromatography Method

กฤษฎา ศิริสภารณ์*, สุภาพร พุ่มพา, พลากร พุทรักษ์

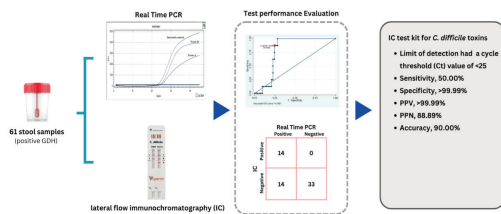
งานห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี 12120

Kridsada Sirisabhabhorn*, Supaporn Pumpa, Palakorn Puttaruk

Medical Technology Laboratory, Thammasat University Hospital, Pathum Thani 12120

Received 21 July 2024; Received in revised 10 March 2025; Accepted 17 March 2025

GRAPHICAL ABSTRACT



ABSTRACT

Clostridium (or *Clostridiodes*) *difficile* produces both toxins A (TcdA) and B (TcdB), which cause severe diarrhea in patients with *C. difficile* infection (CDI) and can lead to death. Diagnosis of glutamate dehydrogenase enzymes (GDH) and TcdA/B detection by lateral flow Immunochromatography (IC) test kits requires quality evaluation prior to clinical use. This study aimed to evaluate the performance of an IC test kit by comparing its results with those of real-time polymerase chain reaction (real-time PCR). **Methods:** A total of 61 fecal post-analysis

samples from patients who attended Thammasat University Hospital, Pathum Thani, Thailand, were tested for GDH, TcdA/B using the IC test kit, with results confirmed by real-time PCR. **Result:** Real-time PCR confirmed that all samples were positive for *C. difficile* (100.00%). The distribution of toxigenic strains was as follows: TcdA⁺/TcdB⁺ (37.70%), TcdA/TcdB⁺ (8.20%), and non-toxigenic strains (TcdA⁻/TcdB⁻) (54.10%). The IC test kit showed the following performance metrics for TcdA/B detection in CDI cases: sensitivity 50.00%, specificity >99.99%, positive predictive value (PPV) >99.99%, negative predictive value (NPV) 88.89%, and overall accuracy 90.00%. The cycle threshold (Ct) values for TcdA and TcdB were 23.59 and 24.43, respectively. **Conclusion:** The IC test kit for GDH and TcdA/B detection demonstrated acceptable quality for routine laboratory screening of *C. difficile* infection. However, confirmation using real-time PCR is recommended for accurate diagnosis.

คำสำคัญ

อิมมูโนโครมาโตกราฟี;
C. difficile;
พิษ;
อุจจาระ;
real-time PCR;
คุณภาพ

Keywords

Immunochromatography;
C. difficile;
Toxin; Feces;
Real-time PCR;
Quality

บทคัดย่อ

เชื้อ *Clostridium* หรือ *Clostridiodes difficile* ผลิตสารพิษทั้งชนิด A (TcdA) และ B (TcdB) เป็นสาเหตุของโรค CDI (*C. difficile* infection: CDI) ผู้ป่วยที่ติดเชื้อมีอาการท้องเสียอย่างรุนแรงจนถึงขั้นเสียชีวิต การตรวจ Glutamate dehydrogenase (GDH), TcdA และ TcdB ของเชื้อด้วยวิธี Lateral flow Immunochromatography (IC) ในห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องมีการประเมินคุณภาพของชุดตรวจวิเคราะห์สำหรับการนำมาใช้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินคุณภาพของชุดตรวจวิเคราะห์ IC ที่ใช้อยู่ โดยใช้อุจจาระหลังจากตรวจประจำวันจากผู้ป่วยของโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ จ.ปทุมธานี จำนวน 61 ตัวอย่าง ทำการทดสอบ GDH, TcdA และ TcdB ด้วยวิธี IC และทดสอบยืนยันการพบเชื้อ *C. difficile* และเชื้อผลิตพิษชนิด TcdA และ TcdB ด้วยวิธี Real-time Polymerase Chain Reaction (Real-time PCR) ผลการทดลองยืนยันการพบเชื้อ *C. difficile* ในอุจจาระทั้งหมด (ร้อยละ 100.00) และเชื้อผลิตพิษชนิด TcdA⁺/TcdB⁺, TcdA⁺/TcdB⁻ เท่ากับร้อยละ 37.70 และ 8.20 และเชื้อชนิดไม่ผลิตพิษ (TcdA⁻/TcdB⁻) เท่ากับร้อยละ 54.10 ตามลำดับ สำหรับคุณภาพของชุดทดสอบวิธี IC ที่ใช้สำหรับกลุ่มผู้ป่วย CDI มีความไว ความจำเพาะ PPV NPV ความถูกต้อง สำหรับการตรวจพิษชนิด TcdA/TcdB เท่ากับร้อยละ 50.00, >99.99, >99.99, 88.89, 90.00 ตามลำดับ และค่า Cycle threshold (Ct) สำหรับ TcdA และ TcdB อยู่ที่ 23.59 และ 24.43 ตามลำดับ สรุปว่าชุดตรวจวิเคราะห์ GDH, TcdA/B ของวิธี IC มีคุณภาพสามารถยอมรับได้และควรใช้วิธี Real-time PCR เพื่อตรวจวิเคราะห์ยืนยัน

1. บทนำ

โรค CDI (*Clostridium difficile* infection) เกิดจากการติดเชื้อ *Clostridium difficile* หรือ *Clostridiodes difficile* เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดแอนแอโรบ (Anaerobe) แกรมบวก รูปแท่ง สร้างสปอร์ (Gram positive bacilli spore forming) สามารถติดต่อทาง Oral-Fecal route เชื้อสามารถผลิต enterotoxin ทั้งชนิด A (TcdA) และ cytotoxin ชนิด B (TcdB) ก่อให้เกิดอาการท้องเสียท้องร่วง (Diarrhea) และโรค Pseudomembranous colitis ทำให้ผู้ป่วยต้องใช้เวลารักษาในโรงพยาบาลยาวนานขึ้นอาจทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ ซึ่งพิษของเชื้อผลิตโดยยีน *tcdA* และ *tcdB* ของเชือบนตำแหน่งยีน Pathogenicity locus (PaLoc) โรค CDI เกี่ยวข้องกับปัญหาอัตราการติดเชื้อซ้ำ การดื้อยาต้านของเชื้อและทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตสูง [1, 2] เคยมีการรายงานเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ที่ผลิตพิษของเชื้อที่ต่างกันกับความรุนแรงของโรคและการดื้อยาด้าน เช่น สายพันธุ์ Ribotype 017 (TcdA⁺/B⁺) พบอุบัติการณ์แพร่ระบาดรุนแรงในเอเชีย ประเทศไทยและทั่วโลก [3, 4] Sholeh และคณะในประเทศอิหร่านรายงานว่าการติดเชื้อที่ผลิตรูปแบบของพิษชนิด TcdA⁺B⁺ และ TcdA⁺B⁻ เกี่ยวข้องกับการดื้อยา Vancomycin และ Metronidazole ส่วนเชื้อที่ผลิตรูปแบบของพิษชนิด TcdA⁺B⁺ เกี่ยวข้องกับการดื้อยา Moxifloxacin, Clindamycin และ Tetracycline และเชื้อที่ให้รูปแบบพิษชนิด TcdA⁺ และ TcdB⁺ พบในผู้ป่วย ICU มากกว่าร้อยละ 90 [5] เคยปรากฏรายงานสายพันธุ์ที่มีการผลิต Toxin ชนิดเดียวของเชื้อ *C. difficile* เช่น เชื้อที่ผลิตรูปแบบพิษชนิด A⁺/B⁻ และ A⁻/B⁺ มีความเกี่ยวข้องปัญหาการติดเชื้อกลับซ้ำ (Relapse) [6, 7] ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิดพิษของเชื้ออย่างถูกต้องจึงมีความสำคัญในการบ่งชี้ความรุนแรงของโรคและเตรียมวางแผนการรักษาของแพทย์

แม้ว่าวิธี Cell cytotoxicity assays (CCTAs) เป็นวิธีมาตรฐาน (Gold standard) สำหรับการตรวจวิเคราะห์พิษของเชื้อ *C. difficile* แต่เป็นวิธีที่ยุ่งยาก ต้องใช้ห้องปฏิบัติการแบคทีเรียเฉพาะชนิด Anaerobe ต้องใช้งบประมาณราคาสูงและมีระยะเวลารอคอยผลนานประมาณ 3-4 วัน และผู้ปฏิบัติงานต้องมีทักษะและการแปลผลขั้นสูง ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์พิษ TcdA และ TcdB ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ในประเทศไทยส่วนใหญ่จึงนิยมใช้วิธี Enzyme immunoassays (EIAs) และวิธี Lateral flow immunochromatography (IC) สำหรับงานห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ (รพธ.) จ.ปทุมธานี เลือกใช้วิธี IC เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำงานง่าย สะดวก รายงานผลเร็ว และราคาไม่สูง ผู้ใช้บริการสามารถเข้าถึงการตรวจวิเคราะห์ได้ ซึ่งประกอบด้วยการตรวจเอนไซม์ GDH (Glutamate dehydrogenase) และพิษของเชื้อทั้งชนิด A (TcdA) และ B (TcdB) โดยชุดตรวจวิเคราะห์ (Kit) ที่มีคุณภาพ อย่างไรก็ตามแพทย์ด้านโรคติดเชื้อของโรงพยาบาลได้ตั้งข้อสงสัยเกี่ยวกับผลการตรวจจากวิธี IC ในกลุ่มผู้ติดเชื้อ (ผล GDH positive ด้วยวิธี IC) ส่วนใหญ่ไม่สอดคล้องกับลักษณะอาการทางคลินิกของผู้ป่วยและผลการตรวจด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) จากห้องปฏิบัติการอื่นประมาณร้อยละ 50 ทำให้นักเทคนิคการแพทย์ผู้ทำการตรวจวิเคราะห์มีประเด็นข้อสงสัยเกี่ยวกับคุณภาพของชุดตรวจวิธี IC ที่ใช้อยู่สำหรับกลุ่มผู้ป่วย CDI อีกทั้งข้อกำหนดตามมาตรฐาน ISO15190 ได้กำหนดให้มีการทวนสอบ (Verification) คุณภาพของชุดตรวจที่นำมาใช้ตรวจวินิจฉัยโรคดังกล่าว งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินคุณภาพชุดตรวจ GDH, TcdA และ TcdB ของวิธี IC โดยเทียบกับวิธี Real-time PCR ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและได้รับการยอมรับสามารถใช้เป็นวิธีอ้างอิงเทียบเท่าวิธี CCTAs ได้ [8]

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 กลุ่มตัวอย่าง

งานวิจัยนี้ใช้ตัวอย่างอุจจาระหลังการตรวจวิเคราะห์ประจำวันของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *C. difficile* (ให้ผล GDH positive ด้วยวิธี IC) และไม่พบเชื้อในกลุ่ม Gastroenteroparasitic infection ที่เข้ารับการตรวจที่โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ จ.ปทุมธานี จำนวน 61 ตัวอย่าง

2.2 การตรวจด้วยวิธี Lateral flow immunochromatography (IC) [9]

ตรวจวิเคราะห์แอนติเจน GDH, TcdA และ TcdB ด้วยวิธี IC จากชุดตรวจวิเคราะห์ (Operon, S.A, Spain Lot.BJ24-BK36) โดยตัดอุจจาระประมาณ 110 มิลลิกรัม หรือ 110 ไมโครลิตร ลงใน Sample tube ที่บรรจุ Buffer อยู่ภายใน จากนั้นเขย่าสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน (Homogenous) แล้วหยดลงในหลุม Sample ของ GDH และ TcdA/TcdB บน Strip ตามลำดับ เมื่อครบเวลา 20 นาทีจึงอ่านผลการทดสอบ หากในอุจจาระมีแอนติเจน GDH พิษชนิด TcdA และ TcdB อยู่ จะจับกันอย่างจำเพาะกับ Antibodies ของ GDH, TcdA และ TcdB ปรากฏเป็นเส้นสีแดงบริเวณ Test line (T) ใน Lanes ของ GDH และ Toxin อ่านผลเป็นผลบวกดังภาพตัวอย่างด้านล่าง (Figure 1)

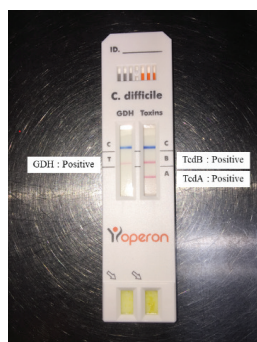


Figure 1 Illustration of positive results composed of GDH, TcdA, and TcdB (GDH+/TcdA+/TcdB+) using the Lateral Flow Immunochromatography (IC) method.

2.3 การทดสอบทางอณูชีววิทยาด้วยวิธี Real-time PCR

2.3.1 การสกัดพันธุกรรม (Deoxyribonucleic acid: DNA) ของเชื้อ *C. difficile*

ตัดอุจจาระประมาณ 50 มิลลิกรัม ใส่ใน Eppendorf tube ที่มี Lysis buffer 500 ไมโครลิตร และ Protease K 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ Sterile stick แล้วนำไป Mixed ด้วย Vortex 10 วินาที นำไป Incubated ที่ 60 องศาเซลเซียส (°C) นาน 10 นาที นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 10000 นาน 1 นาที จากนั้นดูดส่วนใส (Supernatant) 500 ไมโครลิตร ถ่ายไปยัง Well แรกของ Extracted kit นำ Extracted kit ไปเข้าเครื่อง DNA extraction ด้วยเครื่อง TANBead® Nucleic Acid Extraction kit Stool cell DNA auto tube (Taiwan advanced nanotech Inc. Lot M312011B) Magnetic beads ที่เคลือบด้วย Silicon dioxide จะไปจับกับโมเลกุลอื่นที่มีประจุเป็นลบออกจาก DNA ของเชื้อ *C. difficile* ซึ่งมีประจุเป็นบวก และทำการล้างสารตกค้างและ Inhibitors ต่าง ๆ ด้วย Washing buffer และแยก DNA ออกจาก Magnetic bead ด้วย Elution buffer เทคโนโลยีนี้ทำให้ DNA มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ดูดสารสกัด DNA ของเชื้อ *C. difficile* มา Incubated ที่อุณหภูมิห้อง 25 °C นาน 10 นาที

2.3.2 การเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อ *C. difficile* และการวิเคราะห์ยีนชนิดของยีน *tcdA* และ *tcdB* [10, 11]

เตรียม PCR reaction โดยใส่ Rehydration buffer 15 ไมโครลิตร ลงใน Master mix tube ที่มี Lyophilized ของ PCR components (Mixed of enzymes, Specific primers/probe (ของเชื้อ *C. difficile* สำหรับการทดสอบยืนยันเชื้อ *C. difficile* (CerTest Biotech S.L., lot. CDS112L-017, Ref.VS-CDS112L) หรือ ของยีน *tcdA* และ *tcdB* สำหรับการวิเคราะห์ยีนชนิดของยีน *tcdA* และ *tcdB* (CerTest Biotech S.L., lot. CDA112L-023, Ref.VS-CDA1SL),

dNTPs, Stabilizers) บรรจุอยู่ (VIASURE real-time PCR detection kit for *C. difficile* by CerTest Biotec S.L., San Mateo de Gállego, Zaragoza, Spain) ใส่สารสกัด DNA ของเชื้อจากข้อ 2.3.1 หลังจาก Centrifuge ที่ 10000 g นาน 1 นาที ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ลงใน PCR reaction tube แล้วนำไป Centrifuge แบบ Spin down 10 วินาที นำ PCR reaction tube เข้าเครื่อง Thermocycle (BioRad laboratories Inc.) โดยกำหนด Condition ดังนี้ Polymerase activation 95 °C 2 นาที 1 cycles, Denature 95 °C 10 วินาที 45 cycles, Annealing 60 °C 50 วินาที 45 cycles, Extension 60 °C 50 วินาที 45 cycles ใช้จำนวนรอบ 45 รอบ (Cycles) หรือใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง 27 นาที (ทำการทดสอบวิเคราะห์ควบคู่ทั้ง Positive (Non-infectious synthetic lyophilized DNA ละลายใน RNAs/DNA free water), Negative และ Internal controls (Non template) controls ทุกรอบของการทดลอง) (positive, negative และ internal controls ผลิตและ verified โดย CerTest Biotec S.L., Spain Lot. CDS112L-017 ตามเอกสารอ้างอิงรหัส COA code VS-CDS112L สำหรับการตรวจหาเชื้อ *C. difficile* และ Lot. CDA112L-023 ตามเอกสารอ้างอิงรหัส COA code VS-CDA112L สำหรับการตรวจวิเคราะห์ยีน *tcdA* และ *tcdB*)

การแปลผลการตรวจวิเคราะห์โดยใช้ Signal cut-off ที่ Cycle threshold (C_t) 40, $C_t < 40$ แปลผลเป็นผลบวก (Positive), No signal แปลผลเป็นผลลบ (Negative), หาก Internal control signal $C_t \geq 40$ ไม่สามารถแปลผลได้ (Invalid) และ Signal ของ Positive, Negative และ Internal controls ต้องปรากฏเสมอจึงแปลผลได้ (Figure 2)

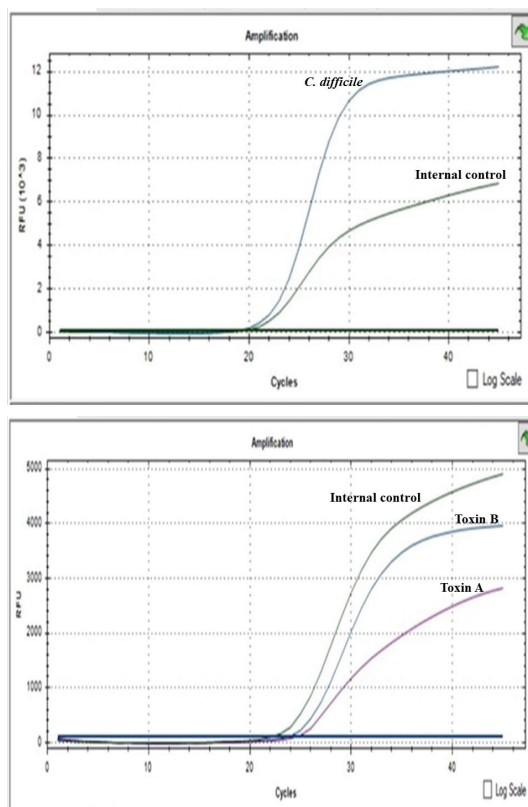


Figure 2 Illustration of the amplification curves resulting positive genes for *C. difficile* (Upper panel) and *tcdA* and *tcdB* (Lower panel) identified by real-time PCR method.

2.4 จริยธรรมการวิจัยและความปลอดภัยทางชีวภาพ

งานวิจัยนี้ได้ขออนุญาตดำเนินการวิจัยและได้รับอนุญาตจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคนของโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ หมายเลข 014/2565 และคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ หมายเลข 078/2565

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

คำนวณร้อยละของการเกิดผลบวกหรือลบจากการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี IC และวิธี Real time PCR ดังนี้

$$\frac{\text{จำนวนตัวอย่างของการเกิดผลบวก (Positive) หรือผลลบ (Negative)}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด (N=61)}} \times 100$$

คำนวณค่าความไว ความจำเพาะ PPV (Positive predictive value) NPV (Negative predictive value) และ ค่าความถูกต้อง (Accuracy) จากสูตรคำนวณจาก MedCalc (version 23.1.6) calculator online (MedCalc Software Ltd, Belgium) ดังนี้ Sensitivity = $TP / (TP + FN)$, Specificity = $TN / (FP + TN)$, PPV = $(\text{Sensitivity} \times \text{Prevalence}) / [(\text{Sensitivity} \times \text{Prevalence}) + ((1 - \text{Specificity}) \times (1 - \text{Prevalence}))]$, NPV = $(\text{Specificity} \times (1 - \text{Prevalence})) / [(1 - \text{Sensitivity}) \times \text{Prevalence} + (\text{Specificity} \times (1 - \text{Prevalence}))]$, Accuracy = $(TP + TN) / (TP + TN + FP + FN)$ [12] จากนั้นหาค่า Cut-off point ที่เหมาะสมของค่า Ct จากวิธี Real-time PCR โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Stata® และแปลผลความถูกต้องของการจำแนกโดยพิจารณาจากพื้นที่ใต้กราฟ Receiver operating characteristic curve (ROC) หรือ Area under the curve (AUC) (Table 1)

Table 1 The correct classification interpreted from the area under the curve (AUC). [13]

Area under the curve (AUC)	Interpretation
$0.9 \leq \text{AUC}$	Excellent
$0.8 \leq \text{AUC} < 0.9$	Good
$0.7 \leq \text{AUC} < 0.8$	Fair
$0.6 \leq \text{AUC} < 0.7$	Poor
$0.5 \leq \text{AUC} < 0.6$	Fail

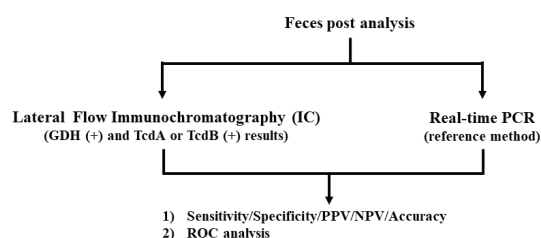


Figure 3 Flowchart of research methodology.

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 ความชุกของ TcdA และ TcdB ในกลุ่ม CDI จากวิธี IC และ Real-time PCR (วิธีอ้างอิง)

จากตัวอย่างอุจจาระทั้งหมดจำนวน 61 ราย แสดงผลตรวจวิเคราะห์ GDH positive ด้วยวิธี IC และทำการยืนยันการพบเชื้อ *C. difficile* ด้วยวิธี Real-time PCR แสดงผลบวก (Positive) ทุกรายเท่ากับร้อยละ 100 จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิด TcdA และ TcdB ด้วยวิธี Real-time PCR (วิธีอ้างอิง) และวิธี IC แสดงผลดังนี้ (Table 2)

Table 2 Detection results of toxigenic types using IC and real-time PCR methods.

Method Toxin genotype	Real-time PCR (N=61) n (%)	IC (N=61) n (%)
TcdA ⁺ /TcdB ⁺	23(37.70)	4(6.56)
TcdA ⁺ /TcdB ⁻	0(0.00)	4(6.56)
TcdA ⁻ /TcdB ⁺	5(8.20)	6(9.84)
TcdA ⁻ /TcdB ⁻	33(54.10)	47(77.05)

จากผลการทดลอง (Table 2) ในกลุ่มผู้ติดเชื้อ CDI จำนวน 61 ราย (N=61) จากผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี IC พบผู้ป่วยติดเชื้อสายพันธุ์ผลิตพิษ (Toxigenic types ($TcdA^+/TcdB^+$, $TcdA^+/TcdB^-$, $TcdA^-/TcdB^+$)) จำนวน 14 ราย คิดเป็นร้อยละ 22.95 แต่พบจำนวนเพิ่มขึ้นเป็น 28 ราย คิดเป็นร้อยละ 45.90 จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Real-time PCR ซึ่งการศึกษารังนี้สอดคล้องกับการรายงานของ Pologe และคณะเคยรายงานการพบ Toxigenic types ในกลุ่มผู้ป่วย CDI ในโรงพยาบาลแสดงผลบวกด้วยวิธี PCR ร้อยละ 44.70 [14] แต่มากกว่าการรายงานของ Putsathit et al. (2016) และ Wongwanich et al. (2001) ซึ่งรายงานการพบ Toxigenic strain เท่ากับร้อยละ 9.20 และร้อยละ 13.60 ด้วยวิธี Toxigenic culture และวิธี Specific PCR ตามลำดับ [15, 16] การศึกษานี้พบรูปแบบผลชนิดของพิษ (Toxigenic types) เป็น $TcdA^+/TcdB^+$ มากที่สุดจำนวน 23 ราย คิดเป็นร้อยละ 37.70 และรูปแบบชนิด $TcdA^-/TcdB^+$ จำนวน 5 ราย คิดเป็นร้อยละ 8.20 ตามลำดับ ซึ่งแสดงผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Putsathit et al. (2016) [17] แต่แตกต่างกับการศึกษาของ Imwattana et al. เคยรายงานการพบ $TcdA^-/B^+$ มากกว่า $TcdA^+/B^+$ ประมาณร้อยละ 13.00 [3] และจากผลการตรวจวิเคราะห์ทั้งวิธี Real-time PCR และวิธี IC ตรวจพบผู้ป่วย CDI ที่มีเชื้อไม่ผลิตพิษ (Non-toxigenic strain($TcdA^-/TcdB^-$)) จำนวน 33 และ 47 ราย คิดเป็นร้อยละ 54.10 และร้อยละ 77.05 ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับการรายงานของ Wongkuna ได้รายงานการพบ $TcdA^-/TcdB^-$ ด้วยวิธี PCR เท่ากับร้อยละ 46.00 [18] สำหรับจำแนกชนิดของพิษด้วยวิธี Real-time PCR พบการติดเชื้อพิษชนิด A ($TcdA$) และชนิด B ($TcdB$) จำนวน 23 และ 28 ราย จากผู้ป่วย CDI ทั้งหมด 61 ราย คิดเป็นร้อยละ 37.70 และร้อยละ 45.90 ตามลำดับ (Figure 4) สำหรับในกลุ่มผู้ป่วย CDI พบการติดเชื้อชนิด B ($TcdB$) มากกว่าชนิด A ($TcdA$) จำนวนร้อยละ 8.20 ซึ่งสอดคล้อง

กับการรายงานการพบ $TcdB$ สูงถึงร้อยละ 52.50 ในกลุ่มผู้ป่วย Diarrhea [19]

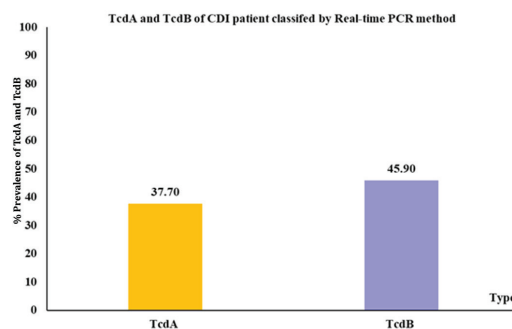


Figure 4 Percent incidence of $TcdA$ and $TcdB$ classification in CDI patient group 61 (N=61).

อย่างไรก็ตามการศึกษารังนี้ไม่พบ Toxigenic type ชนิด $TcdA^+/TcdB^-$ ซึ่งคล้ายกับการศึกษาของ Issarachaikul et al. [20] อาจเป็นเพราะงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วย CDI ซึ่งสายพันธุ์ที่ผลิต $TcdA$ เพียงชนิดเดียวพบรายงานน้อยและไม่เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดอาการ Diarrhea รุนแรงในผู้ป่วย CDI และเมื่อทดสอบด้วยวิธี IC สามารถพบ Toxigenic types ทุกชนิดได้แก่ $TcdA^+/TcdB^+$, $TcdA^+/TcdB^-$ และ $TcdA^-/TcdB^+$ แต่เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี Real-time PCR สามารถช่วยเปลี่ยนการพบ Toxigenic types ชนิด $TcdA^+/TcdB^-$ จากวิธี IC เป็นชนิด $TcdA^+/TcdB^+$ จึงทำให้การศึกษารังนี้ไม่พบ Toxigenic type ชนิด $TcdA^+/TcdB^-$ อีกทั้งวิธี Real-time PCR ช่วยยืนยันการพบ Toxigenic strain จาก Non-toxigenic type บางรายจากวิธี IC จึงทำให้การพบ Non-toxigenic strain ของวิธี IC ลดลงและพบ Toxigenic strain จากวิธี Real-time PCR เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าวิธี IC สามารถเกิดผลลบลวง (False negative) ได้มาก สำหรับการศึกษาี้แสดงให้เห็นว่าผลตรวจวิเคราะห์วิธี IC มีความแตกต่างกันกับวิธี Real-time PCR ถึงร้อยละ 32.79 ซึ่งใกล้เคียง

กับการรายงานของ Chapin และคณะที่เคยรายงานว่าวิธีทาง Molecular สามารถตรวจพบผลบวกเพิ่มขึ้นร้อยละ 37.40 [21] และ Jaqueti et al. เคยรายงานในประเทศสเปนว่าวิธี PCR สามารถตรวจพบ Toxin เพิ่มขึ้นจากวิธี Rapid test ถึงร้อยละ 73.10 [22] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่ใช้วิธีทางอนุชีววิทยาที่ใช้เป็น Reference method รายงานพบการเพิ่มขึ้นของ Toxin เช่น การศึกษาของ Humphries และคณะรายงานว่า การตรวจด้วยวิธี Nucleic acid amplification test (NAAT) ทำให้ตรวจพบผล Positive เพิ่มขึ้นจากประมาณร้อยละ 60 เป็นร้อยละ 98 ในกลุ่มผู้ป่วย Mild และ Severe CDI ตามลำดับ [8]

3.2 วิเคราะห์ประเมินคุณภาพของชุดตรวจวิเคราะห์วิธี IC (Operon, S.A, Spain) ที่ใช้อยู่สำหรับกลุ่ม CDI โดยเปรียบเทียบกับวิธี Real-time PCR (CerTest Biotech S.L.Spain)

เนื่องจากการอ่านและแปลผลด้วยสายตาของชุดตรวจวิเคราะห์วิธี IC อาจทำให้เกิดความผิดพลาดหรือคลาดเคลื่อนได้และเป็นการตรวจในระดับคัดกรอง (Screening test) จึงทำให้มีผลลบสูง ดังนั้นการ

ทราบถึงคุณภาพของชุดทดสอบวิธี IC จึงเป็นสิ่งสำคัญที่ช่วยสนับสนุนความน่าเชื่อถือของการวินิจฉัยของแพทย์ ผู้วิจัยมีความประสงค์ศึกษาคุณภาพ (Qualitative) ของชุดทดสอบวิธี IC ที่ใช้อยู่โดยเปรียบเทียบกับวิธี Real-time PCR ซึ่งใช้เป็นวิธีอ้างอิงในการศึกษาครั้งนี้ โดยแปลงผลตรวจวิเคราะห์จากทั้งวิธี IC และ Real-time PCR ซึ่งหากผล TcdA⁺ หรือ TcdB⁺ (TcdA/B) อย่างใดอย่างหนึ่งเป็นผลบวก (Positive) ให้ค่าผลการทดสอบนั้นเป็นบวก (Positive) และหากผลการทดสอบทั้ง TcdA และ TcdB ที่เป็นลบทั้งคู่ให้ค่าผลการทดสอบนั้นเป็นลบ (Negative) เมื่อนำผลการทดสอบของวิธี IC ไปเทียบกับวิธี Real-time PCR แล้วให้ผลไม่ตรงกับวิธี Real-time PCR สรุปผลการทดสอบนั้นเป็นผลบวกปลอม (False positive) หรือผลลบปลอม (False negative) และหากผลจากวิธี IC และวิธี Real-time PCR แสดงผลตรงกันสรุปผลการทดสอบเป็นผลบวกจริง (True positive) หรือผลลบจริง (True negative) ซึ่งได้แสดงผลแปลงค่าการทดสอบ (Table 3) และได้แสดงผลประเมินคุณภาพของชุดทดสอบของวิธี IC (Table 4) ดังนี้

Table 3 The interpretation results of IC method compared with Real-time PCR method.

Interpreted result (N=61)	TcdA/B n (%)	TcdA n (%)	TcdB n (%)
FN	14(22.95)	15(24.59)	18(29.51)
FP	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
TN	33(54.10)	38(62.30)	33(54.10)
TP	14(22.95)	8(13.11)	10(16.39)

หมายเหตุ TP = True positive (ผลบวกจริง), TN = True negative (ผลลบจริง), FN = False negative (ผลลบปลอม), FP = False positive (ผลบวกปลอม)

Table 4 Quality evaluation of IC method compared with Real-time PCR in the CDI group of GDH positive samples. The table showed percent values of sensitivity, specificity, PPV, and NPV with 95% CI of TcdA and B, TcdA, TcdB, respectively which were calculated by MedCalc (version 23.1.6) calculator online. [12]

Result (N=61)	TcdA/B %(95%CI)	TcdA %(95%CI)	TcdB %(95%CI)
Sensitivity	50.00 (30.65- 69.35)	34.78 (16.38-57.27)	35.71(18.64-55.93)
Specificity	>99.99 (89.42-100.00)	>99.99 (90.75-100.00)	>99.99 (89.42-100.00)
PPV	>99.99 (76.84-100.00)	>99.99 (63.06-100.00)	>99.99 (69.15-100.00)
NPV	88.89 (84.67-92.06)	85.98 (81.98-89.21)	86.15(82.52-89.13)
Accuracy	90.00 (79.60-96.20)	86.96 (75.87-94.21)	87.14(76.09-94.34)

จากผลการวิเคราะห์ประเมินคุณภาพของชุดตรวจวิเคราะห์วิธี IC (Table 4) พบว่าวิธี IC ที่ใช้อยู่ยังคงแสดงความไว (Sensitivity) น้อยประมาณร้อยละ 35 กับ TcdA, TcdB และเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 50.00 กับ TcdA/B ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Fedorko และคณะรายงานความไวของการตรวจวิธี Rapid test อยู่ที่ประมาณร้อยละ 30-50 [23] และสอดคล้องกับบางการศึกษาที่เคยรายงานความไวของวิธี Enzyme immunoassay (EIA) มีความไวของการตรวจจับ TcdA และ TcdB อยู่ในช่วงร้อยละ 31.70 ถึงร้อยละ 55.20 [24, 25] และร้อยละ 43.00 ถึงร้อยละ 98.00 ตามลำดับ [26] วิธี IC ที่ใช้อยู่นี้แสดงค่าความจำเพาะ (Specificity) และค่าการทำนายผลบวก (PPV) สูงเท่ากับมากกว่าร้อยละ 99.99 กับทั้ง TcdA และ TcdB ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Hernández et al. (2017) รายงานว่าการตรวจวิเคราะห์ TcdA และ TcdB ด้วยวิธี IC แสดงค่าความไวประมาณร้อยละ 50 ต่อ TcdA และ TcdB แต่ให้ค่าความจำเพาะสูงประมาณร้อยละ 95 ถึงร้อยละ 98 [27] จากการศึกษาที่แสดงค่าความไวของชุดตรวจน้อยกว่าที่ระบุไว้ในผลิตภัณฑ์ที่ทดสอบเปรียบเทียบกับชุดตรวจของ C.DIFF QUIK CHEK COMPLETE® (TechLab, Blacksburg, VA) Cytotoxicity (Operon, S.A, Spain)

ประมาณร้อยละ 30 และ 40 ตามลำดับ [9] อาจเป็นเพราะผู้ผลิตนำจำนวนตัวอย่างอุจจาระที่ไม่มี Toxin จำนวนมากกว่าประมาณ 0.5 เท่ามาคำนวณวิเคราะห์และวิธี Cytotoxicity ไม่สามารถจำแนกพิษชนิด A และ B ของเชื้อได้ สำหรับค่าความจำเพาะของชุดตรวจวิธี IC ในการศึกษาครั้งนี้มีค่าสูงซึ่งสอดคล้องตามที่ระบุไว้ในผลิตภัณฑ์ที่ได้ทำการทดลองเทียบกับวิธี Cytotoxicity นอกจากนี้วิธี IC ก็ยังให้ค่าการทำนายผลลบ (NPV) และค่าความถูกต้อง (Accuracy) มากกว่าร้อยละ 85 ทั้ง TcdA และ TcdB อีกด้วย อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ทำให้ทราบว่าชุดตรวจวิธี IC ที่ใช้อยู่มีคุณภาพในระดับที่สามารถยอมรับได้แม้ว่าจะใช้สำหรับการตรวจในกลุ่มผู้ป่วย CDI และควรใช้วิธี Real-time PCR สำหรับห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อมตรวจวิเคราะห์ขั้นสูงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยโรค CDI ให้ถูกต้องมากขึ้น

แม้ว่าการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Real-time PCR กำหนดสัญญาณ Ct < 40 แปลผลเป็นผลบวกหรือ Positive และค่า Ct ≥ 40 หรือ No signal แปลผลเป็นผลลบหรือ Negative แต่ผู้เชี่ยวชาญด้านผลิตภัณฑ์ของบริษัท (Product specialist) ให้ข้อมูลว่าโดยเฉลี่ยแล้ววิธี IC แสดงผลบวกหรือปรากฏเส้นบนแถบทดสอบ (Test line) จากการอ่านด้วยสายตาเมื่อค่า Ct ของวิธี

Real-time PCR < 25 (C_t cut-off = 25) ซึ่งหากค่า C_t > 25 อาจไม่ปรากฏแถบเส้นการทดสอบ TcdA และ TcdB เนื่องจากวิธี IC มีความไวที่น้อยกว่าวิธี Real-time PCR มาก ดังนั้นผู้วิจัยต้องการทราบว่าผลการอ่านผลบวกและลบของวิธี IC ที่ใช้อยู่ตรงกับค่า C_t cut-off ที่เหมาะสมของวิธี Real-time PCR ที่ประมาณเท่าไรซึ่งหากชุดตรวจวิเคราะห์ของวิธี IC ได้ค่า C_t ที่สูงกว่า 25 มากซึ่งสามารถประเมินว่าชุดตรวจวิธี IC อาจไม่มีคุณภาพ ไม่เหมาะสมนำมาใช้งาน ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการทวนสอบ (Verification) คุณภาพของชุดตรวจวิธี IC โดยทดสอบหาค่า C_t cut-off สำหรับ TcdA และ TcdB เพื่อศึกษาความใช้ได้ของชุดตรวจวิธี IC ที่ใช้อยู่โดยผู้วิจัยนำผลการทดสอบวิเคราะห์ด้วยวิธี IC เทียบกับผลการตรวจวิเคราะห์กับวิธี Real-time PCR ซึ่งใช้เป็นวิธีอ้างอิงในการศึกษาครั้งนี้ โดยพิจารณาหาค่า C_t cut-off ที่เหมาะสมจาก ROC curve และแปลผลอำนาจของการจำแนกความถูกต้องจากพื้นที่ใต้ ROC curve [13] โดยวิเคราะห์จากโปรแกรมสำเร็จรูป Stata® ซึ่งแสดงผลการวิเคราะห์จุด C_t cut-off ที่เลือก (Selected C_t cut-off point) ในวงกลมสีแดงสำหรับ TcdA (Figure 5) และ TcdB สำหรับ TcdB (Figure 6) ตามลำดับดังนี้

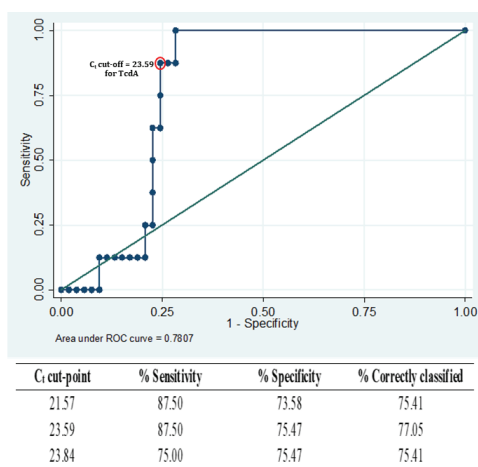


Figure 5 Illustration of three selected C_t cut-off points on ROC curve for evaluating positive band detection in IC kit for TcdA.

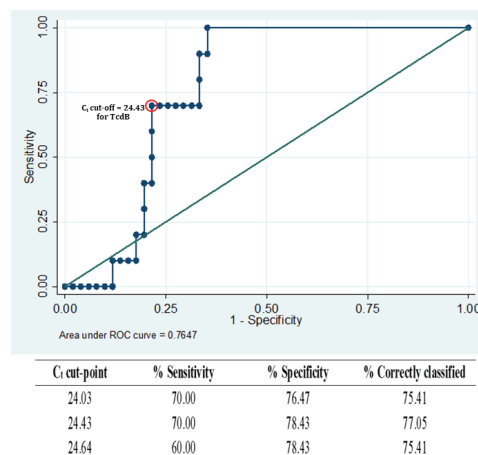


Figure 6 Illustration of three selected C_t cut-off points on ROC curve for evaluating positive band detection in IC kit for TcdB.

จากการคำนวณเบื้องต้นพบว่าค่าเฉลี่ย C_t ของวิธี IC สำหรับ TcdA และ TcdB ((Mean(95% CI)) เท่ากับ 26.59 (24.96-28.22) และ 25.39 (24.04-26.75) ตามลำดับ แต่เมื่อนำค่า C_t มาวิเคราะห์ ROC curve พบว่าได้คัดเลือกจุดที่เหมาะสมสำหรับ TcdA (Figure 5) และ TcdB (Figure 6) คือ C_t cut-off point ที่ 23.59 และ 24.43 ตามลำดับ โดยแสดงค่าความไวและความจำเพาะสำหรับ TcdA และ TcdB เท่ากับร้อยละ 87.50, 75.47 และร้อยละ 70.00, 78.43 ตามลำดับ และมีค่าความจำแนกความถูกต้อง (Correctly classified) ในระดับปานกลางเท่ากับร้อยละ 77.05 [23] ดังนั้นชุดตรวจวิธี IC ที่ใช้อยู่นี้สามารถผลบวกจากการอ่านด้วยสายตาพบว่าค่า C_t ที่เหมาะสมเมื่อเทียบกับวิธี Real-time PCR สำหรับ TcdA และ TcdB (C_t < 25) ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Lee และคณะแสดงค่า C_t cut-off point ของ TcdB จากวิธี EIA เท่ากับ 26.20 และแสดงค่า AUC เท่ากับ 0.795 [28] อย่างไรก็ตามการศึกษาค่า C_t กับวิธี IC ยังมีรายงานน้อย

งานวิจัยนี้มีข้อจำกัดที่ไม่สามารถใช้วิธี Toxigenic culture เป็นวิธีอ้างอิงได้เนื่องจาก ต้องใช้ห้องปฏิบัติการเฉพาะแบคทีเรียชนิด Anaerobe ต้องมีความ

รู้ทักษะและการแปลผลขึ้นสูง ต้องใช้งบประมาณราคาสูง และใช้ระยะเวลานานประมาณ 3-4 วัน ไม่เหมาะแก่การ รอคอยผลเพื่อการรักษาของแพทย์ อีกทั้งวิธี Toxigenic culture ไม่สามารถจำแนกชนิดพิษของเชื้อได้ ผู้วิจัยจึง เลือกใช้วิธี Real-time PCR เป็นวิธีอ้างอิงซึ่งมีหลายการ ศึกษาได้รายงานถึงประสิทธิภาพของวิธี Real-time PCR ที่สามารถใช้เป็นวิธีอ้างอิงได้

4. สรุป

ชุดตรวจวิเคราะห์ Rapid test วิธี IC ที่นำมาใช้ มีความเหมาะสมสำหรับการตรวจพิษของเชื้อ *C. difficile* ชนิด A และ B เบื้องต้นในกลุ่มผู้ป่วย CDI เนื่องจากมี คุณภาพ แสดงค่าความไว ค่าความจำเพาะและผลการ ทวนสอบอยู่ในระดับที่สามารถยอมรับได้ สำหรับห้อง ปฏิบัติการที่มีความพร้อมและศักยภาพการตรวจ วิเคราะห์ทางอณูชีววิทยาควรมีการตรวจด้วยวิธี Real-time PCR เพื่อตรวจยืนยันผลการตรวจวิเคราะห์

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ดร.ทนพ.อนุรักษ์ เชื้อมั่ง นัก วิทยาศาสตร์ชำนาญการ ที่ช่วยให้คำแนะนำด้านวิชาการ และโครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยโรงพยาบาล ธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ปีงบประมาณ 2565

ขอยืนยันว่าการศึกษานี้ไม่มีผลประโยชน์หรือ ส่วนได้ส่วนเสียใด ๆ

6. References

[1] Bacci, S., Mølbak, K., Kjeldsen, M. K. and Olsen, K. E., 2011, Binary toxin and death after *Clostridium difficile* infection, *Emerg. Infect. Dis.* 17(6): 976–982.

[2] Berry, C. E., Davies, K. A., Owens, D. W. and Wilcox, M. H., 2017, Is there a relationship between the presence of the binary toxin genes in *Clostridium difficile* strains and the severity of *C. difficile* infection (CDI)?, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 36(12): 2405–2415.

[3] Imwattana, K., Wangroongsarb, P. and Riley, T. V., 2019, High prevalence and diversity of tcdA-negative and tcdB-positive, and non-toxigenic, *Clostridium difficile* in Thailand, *Anaerobe.* 57: 4–10.

[4] Imwattana, K., Knight, D. R., Kullin, B., Collins, D. A. and Putsathit, P., 2019, *Clostridium difficile* ribotype 017 - characterization, evolution and epidemiology of the dominant strain in Asia, *Emerg. Microbes. infect.* 8(1): 796–807.

[5] Sholeh, M., Kouhsari, E., Talebi, M., Hallajzadeh, M. and Godarzi, F., 2021, Toxin gene profiles and antimicrobial resistance of *Clostridioides difficile* infection: a single tertiary care center study in Iran, *Iran. J. Microbiol.* 13(6): 793–800.

[6] Cohen, S. H., Tang, Y. J., Hansen, B. and Silva, J., Jr., 1998, Isolation of a toxin B-deficient mutant strain of *Clostridium difficile* in a case of recurrent *C. difficile*-associated diarrhea, *Clin. Infect. Dis.* 26(2): 410–412.

- [7] Drudy, D., Harnedy, N., Fanning, S., O'Mahony, R. and Kyne, L., 2007, Isolation and characterization of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* in Dublin, Ireland, Clin. Microbiol. Infect. 13(3): 298–304.
- [8] Humphries, R. M., Uslan, D. Z. and Rubin, Z., 2013, Performance of *Clostridium difficile* toxin enzyme immunoassay and nucleic acid amplification tests stratified by patient disease severity, J. Clin. Microbiol. 51(3): 869–873.
- [9] Operon Immuno and Molecular Diagnostics, 2025, Simple GDH-Toxins, Available Source: https://www.operondx.com/wp-content/uploads/pdf/instructions/0905144_GDH-Toxins_web.pdf, February 21, 2025.
- [10] Certest Biotec SL, Viasure *Clostridium Difficile* Real-Time PCR Detection Kit, Available Source: <https://www.certest.es/wp-content/uploads/2015/12/VIASURE-Clostridium-difficile-EN.pdf>, February 21, 2024.
- [11] Certest Biotec SL, Viasure *Clostridium Difficile* Toxin A+B Real-Time PCR Detection Kit, Available Source: https://www.certest.es/wp-content/uploads/2015/12/VIASURE_Clostridium-difficile-toxAB_EN.pdf, February 21, 2024.
- [12] Medcalc Software Ltd, Diagnostic Test Evaluation Calculator, Available Source: https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php (version 22.021), May 9, 2024.
- [13] Nahm, F. S., 2022, Receiver operating characteristic curve: overview and practical use for clinicians, Korean J. Anesthesiol. 75(1): 25–36.
- [14] Polage, C. R., Gyorke, C. E., Kennedy, M. A., Leslie, J. L. and Chin, D. L., 2015, Overdiagnosis of *Clostridium difficile* infection in the molecular test era, JAMA. Intern. Med. 175(11): 1792–1801.
- [15] Putsathit, P., Kiratisin, P., Ngamwongsatit, P. and Riley, T. V., 2015, *Clostridium difficile* infection in Thailand, Intern. J. Antimicrob. Agents. 45(1): 1–7.
- [16] Wongwanich, S., Pongpech, P., Dhiraputra, C., Huttayananont, S. and Sawanpanyalert, P., 2001, Characteristics of *Clostridium difficile* strains isolated from asymptomatic individuals and from diarrheal patients, Clin. Microbiol. Infect. 7(8): 438–441.
- [17] Putsathit, P., Maneerattanaporn, M., Piewngam, P., Kiratisin, P. and Riley, T. V., 2016, Prevalence and molecular epidemiology of *Clostridium difficile* infection in Thailand, New. Microbes. New. Infect. 15: 27–32.
- [18] Wongkuna, S., Janvilisri, T., Phanchana, M., Harnvoravongchai, P. and Aroonnual, A., 2021, Temporal variations in patterns of *Clostridioides difficile* strain diversity and antibiotic resistance in Thailand, Antibiotics. 10(6): 1-15.

- [19] Wongwanich, S., Ramsiri, S., Vanasin, B., Khowsaphit, P. and Tantipatayangkul, P., 1990, *Clostridium difficile* associated disease in Thailand, Southeast. Asian. J. Trop. Med. Pub. Health. 21(3): 367–372.
- [20] Issarachaikul, R., Khantipong, M., Sawatpanich, A. and Suankratay, C., 2015, Prospective evaluation of a novel two-step protocol for screening of *Clostridium difficile* infection in hospitalized adult patients, Southeast. Asian. J. Trop. Med. Pub. Health. 46(6): 1037–1048.
- [21] Chapin, K. C., Dickenson, R. A., Wu, F. and Andrea, S. B., 2011, Comparison of five assays for detection of *Clostridium difficile* toxin, J. Mol. Diagn. 13(4): 395–400.
- [22] Jaqueti, A. J., Molina, E. L. M., García-Arata, I., García-Martínez, J. and Cano De Torres, I., 2021, Significance of a polymerase chain reaction method in the detection of *Clostridioides difficile*, Rev. Esp. Quimioter. 34(2): 141–144.
- [23] Fedorko, D. P., Engler, H. D., O'Shaughnessy, E. M., Williams, E. C. and Reichelderfer, C. J., 1999, Evaluation of two rapid assays for detection of *Clostridium difficile* toxin A in stool specimens, J. Clin. Microbiol. 37(9): 3044–3047.
- [24] René, P., Frenette, C. P., Schiller, I., Dendukuri, N. and Brassard, P., 2012, Comparison of eight commercial enzyme immunoassays for the detection of *Clostridium difficile* from stool samples and effect of strain type, Diagn. Microb. Infect. Dis. 73: 94–96.
- [25] Eastwood, K., Else, P., Charlett, A. and Wilcox, M., 2009, Comparison of nine commercially available *Clostridium difficile* toxin detection assays, a real-time PCR assay for *C. difficile* tcdB, and a glutamate dehydrogenase detection assay to cytotoxin testing and cytotoxigenic culture methods, J. Clin. Microb. 47(10): 3211–3217.
- [26] Burnham, C. A. and Carroll, K. C., 2013, Diagnosis of *Clostridium difficile* infection: an ongoing conundrum for clinicians and for clinical laboratories, Clin. Microbiol. Rev. 26(3): 604–630.
- [27] Alcalá, H. L., Reigadas, R. E. and Bouza, S. E., 2017, *Clostridium difficile* infection, Med. Clin. 148(10): 456–463.
- [28] Lee, S., Nanda, N., Yamaguchi, K., Lee, Y. and She, R. C., 2022, *Clostridioides difficile* Toxin B pcr cycle threshold as a predictor of toxin testing in stool specimens from hospitalized adults, Antibiotics. 11(5): 1–9.