

بررسی ارتباط توکسین میکروب کلستریدیوم دیفی سل و عود بیماری کولیت اولسروز

وحید محمودی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم دانشگاه تهران

دکتر فریده سیاوشی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم دانشگاه تهران

دکتر قدرت‌اله منتظری، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، بیمارستان دکتر شریعتی

دکتر ناصر دریانی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، بیمارستان دکتر شریعتی

دکتر رضا ملک‌زاده، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، بیمارستان دکتر شریعتی

Relation of Clostridium Difficile Toxin and Acute Exacerbation of Ulcerative Colitis ABSTRACT

Clostridium difficile toxin was checked in fecal extract of 62 ulcerative colitis patients and 62 normal controls, by Elisa and cell culture methods.

Clostridium difficile toxin was found in 48.71 percent of ulcerative colitis patients in their acute exacerbations, and in 26.08 percent of cases in their remissions. This toxin was found in the fecal extract of only 3 percent of normal controls. Chi-2 analysis showed that the differences between normal individuals and patients with ulcerative colitis were significant ($P < 0.001$), but these differences between two groups of ulcerative colitis patients either with exacerbations or in remissions were not significant ($P > 0.05$).

Key Words: Clostridium Difficile; Toxin; Ulcerative Colitis

چکیده

وجود توکسین کلستریدیوم دیفی سل با روش‌های کشت سلولی و الیزا (ELISA) در عصاره مدفوع ۶۲ بیمار کولیت اولسروز و ۶۲ فرد طبیعی مطالعه شد. ۴۸/۷۱٪ بیماران با عود کولیت اولسروز و ۲۶/۰۸٪ بیماران کولیت اولسروز بدون عود، توکسین مثبت بودند. در صورتی که فقط ۳٪ عصاره مدفوع افراد سالم از نظر توکسین مثبت بودند. آزمون آنتی‌شان داد که اختلاف بین بیماران و افراد سالم از نظر توکسین مثبت، معنی‌دار بود ($P < 0/001$)، ولی این اختلاف بین دو گروه بیماران کولیت اولسروز با عود و بدون عود معنی‌دار نبوده است ($P > 0/05$).

واژه‌های کلیدی: کلستریدیوم دیفی سل؛ توکسین؛ کولیت اولسروز

مقدمه

میکروب کلستریدیوم دیفی سل، باسیل گرم مثبت و بی‌هوازی

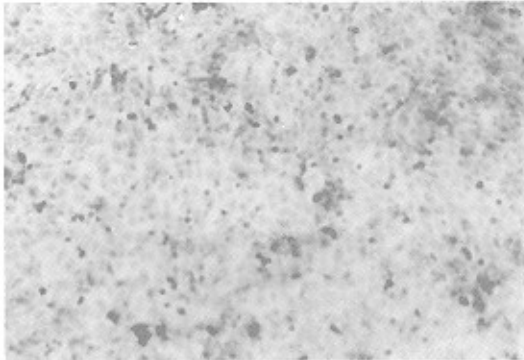
است و در شرایطی قادر به تولید اسپور نیز می‌باشد (۱). کشت و توصیف این باکتری برای اولین بار در سال ۱۹۳۵ توسط هال واتول در مدفوع نوزادان انجام شد (۲). این میکروب در مدفوع ۷۰ درصد نوزادان، سه درصد افراد نرمان و تا صد درصد بیماران اسهالی با زمینه مصرف آنتی‌بیوتیک یافت می‌شود (۳). از سال ۱۹۷۸ که رابطه بین کلستریدیوم دیفی سل و کولیت پس از مصرف آنتی‌بیوتیکها (Pseudomembranous colitis) مشخص گردید (۴، ۵)، تحقیقات دامنه‌داری در زمینه اپیدمیولوژی، قدرت بیماری‌زایی توکسینهای A و B، مکانیسم اسهال و اهمیت آنها در اسهالهای بدون سابقه مصرف آنتی‌بیوتیکها انجام پذیرفت (۶، ۷، ۸، ۹). یکی از مسائل قابل توجه محققان در مورد نقش این میکروب در ایجاد و یا عود اسهالهای مزمن نظیر کولیت اولسروز بوده است.

اطلاعات در زمینه رابطه توکسین کلستریدیوم دیفی سل با عود بیماری کولیت اولسروز ضد و نقیض است (۱۰، ۱۱، ۱۲). چون

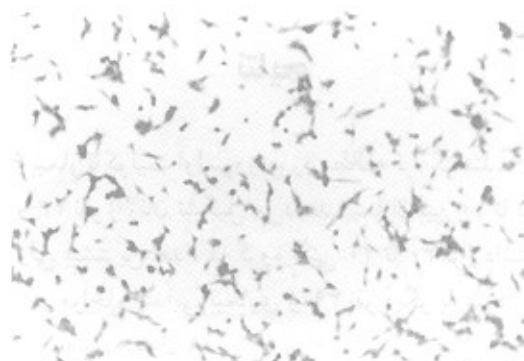
سری سوم: عصاره مدفوع بیماران و یا افراد سالم به سلولها اضافه شد. این سری نشانگر آثار مخرب توکسین بر روی سلولها است (شکل ۲).

شکل ۱- نمای سلولها (Bovine kidney cell lines) بدون

توکسین: نمای طبیعی سلولها قابل رؤیت است.



شکل ۲- نمای سلولها (Bovine kidney cell lines) با توکسین: گرد شدن سلول و حالت Actinomorphie کاملاً نمایان است.



سری چهارم: عصاره مدفوع بیماران و یا افراد سالم با آنتی توکسین به سلولها اضافه شده قاعداً در این سری نباید سلول آسیب ببیند (شکل ۳). در صورت تخریب علت آن آنتی توکسین کلستریدیوم دیفی سل نبوده بنابراین باید از مطالعه حذف شود.

۲- روش الیزا (ELISA): در این روش ابتدا سطح میکروپلیت‌ها را با توکسین استاندارد شاهد coat می‌کنیم سپس همزمان محلول آنتی توکسین استاندارد را (با دیاستاز HRP) همراه عصاره مدفوع به چاهکها اضافه می‌کنیم. پس از شستشوی کافی سوبسترای مورد نظر (2,2-Azino Diethyl - Bezothiazoline - sulphonate) را اضافه می‌کنیم. اگر در عصاره مدفوع بیمار توکسین کلستریدیوم دیفی سل وجود نداشته باشد، آنتی توکسین به توکسین

اثبات رابطه توکسین کلستریدیوم دیفی سل و عود بیماری می‌تواند مراقبت و درمان این بیماران را بهبود بخشد، بنابراین ما علاقمند شدیم رابطه بین وجود توکسین کلستریدیوم دیفی سل و عود کولیت اولسروز را در بیماران خود مطالعه کنیم.

روش و مواد

۶۲ بیمار مبتلا به کولیت اولسروز که تشخیص آنها با تاریخچه، عکسبرداری، کولونوسکوپی و بیوپسی قبلاً به اثبات رسیده بود مورد مطالعه قرار گرفتند. ۳۹ نفر آنها با عود بیماری و ۲۳ نفر با بیماری زمینه‌ای کولیت اولسروز مراجعه نموده بودند. توکسین شاهد از محلول صاف شده کشت کلستریدیوم دیفی سل بدست آمد. سوش استاندارد بصورت لئوفلیزه توسط سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی در اختیار ما قرار گرفت. پس از کشت در محیط آبگوشت، محلول صاف شده آن را بعنوان توکسین استاندارد استفاده نمودیم. آنتی توکسین کلستریدیوم دیفی سل لیوفلیزه شده از شرکت TECK LAB (آمریکا) خریداری شد. از سلولهای دودمان جنینی گاو (Bovine kidney cell line) در کشت سلولی برای ردیابی وجود توکسین استفاده شد. کشت میکروب در محیط بی‌هوایی CCFA (Cycloserine-cefoxintie-fructose-agar) انجام شد و سپس برای تولید توکسین به کشت آبگوشت منتقل گردید. مدفوع بیماران و افراد سالم جمع‌آوری شد. پس از سانتریفوژ با ۱۰۰۰۰ دور به مدت ده دقیقه بعنوان عصاره مدفوع برای مطالعه توکسین استفاده شد. وجود توکسین در مدفوع بیماران و افراد سالم به دو روش کشت سلولی و الیزا مورد استفاده قرار گرفت:

۱- روش کشت سلولی: سلولهای دودمان جنینی گاو (شکل ۱) با ۰/۱ سی سی عصاره مدفوع به مدت ۱۸ ساعت مجاورت داده شده و به مدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه نگهداری گردید. به علت تأثیر مخرب توکسین، سلولها چروکیده و گرد می‌شوند و باصطلاح حالت Actinomorphie پیدا می‌کنند که با رنگ‌آمیزی فوشین و بلودومیلن کاملاً قابل تشخیص هستند. کنترل مثبت و کنترل منفی برای هر یک از نمونه‌ها شرح زیر انجام پذیرفت:

سری اول: توکسین حاصل از کشت باکتری استاندارد به سلولها اضافه شد. این سری نماینده کنترل مثبت است.

سری دوم: توکسین حاصل از کشت باکتری استاندارد همراه با رقت $\frac{1}{25}$ آنتی توکسین استاندارد به سلولها اضافه شد. این سری نماینده کنترل منفی هستند.

رسید و از ۲۳ مورد که در مرحله زمینه‌ای (بدون عود) بیماری بودند، فقط ۶ نفر توکسین مثبت شدند (۲۶/۰۸٪). آزمون آلفا نشان داد که اختلاف بین گروه الف (با عود بیماری) و گروه ب (بیماری زمینه‌ای - بدون عود) از نظر توکسین مثبت معنی‌دار نبوده است ($P > ۰/۰۵$) (جدول ۲).

جدول ۲- وجود توکسین کلسترییدیوم دیفی سل در عصاره مدفوع بیماران کولیت اولسروز بیماران به دو گروه الف (با عود بیماری) و گروه ب (بدون عود - بیماری)

زمینه‌ای) تقسیم شدند

گروه الف	توکسین مثبت	توکسین منفی	جمع
۱۹ نفر (۴۸/۷۱٪)	۲۰ نفر	۳۹ نفر	
۶ نفر (۲۶/۰۸٪)	۱۷ نفر	۲۳ نفر	
۲۵ نفر	۳۷ نفر	۶۲ نفر	جمع

چهار نفر از بیماران در محدوده زمانی درماتشان آنتی‌بیوتیک مصرف نمودند که یک نفر از آنها در عود بیماری بوده و سه نفر دیگر در مراحل زمینه‌ای (بدون عود) بیماری بودند. توکسین کلسترییدیوم دیفی سل در عصاره مدفوع هر چهار نفر وجود داشت جهت بررسی ارتباط بین وجود توکسین و بیماری کولیت اولسروز از ۶۲ نفر افراد سالم استفاده شد. سعی گردید تا افراد سالم از نظر سن، وضعیت اجتماعی و اقتصادی با بیماران هماهنگی داشته باشند. فقط در عصاره مدفوع دو نفر از آنها، با کشت سلولی وجود توکسین نشان داده شد. آزمون آلفا نشان داد که بین بیماران و افراد سالم از لحاظ توکسین مثبت اختلاف معنی‌داری وجود داشت (۰/۰۰۱) ($P <$ جدول ۳).

کشت میکروبی فقط در ۴ مورد و روش الیزا نیز فقط در ۴ مورد از بیماران مثبت گردید.

جدول ۳- وجود توکسین کلسترییدیوم دیفی سل در عصاره مدفوع بیماران کولیت اولسروز و افراد نرمال

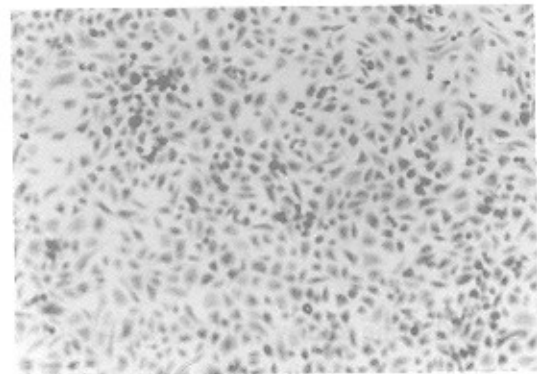
بیماران	توکسین مثبت	توکسین منفی	جمع
۲۵ نفر	۳۷ نفر	۶۲ نفر	
۲ نفر	۶۰ نفر	۶۲ نفر	
۲۷ نفر	۹۷ نفر	۱۲۴ نفر	جمع

بحث

میکروب کلسترییدیوم دیفی سل توکسین A و B تولید می‌کند (۱). قدرت کشندگی آنها حدود یکصد برابر سم Botulinium در موشهای آزمایشگاهی است. توکسین A پروتئینی است با وزن مولکولی ۳۰۸ KD که در مقابل حرارت، خاصیت خود را از دست می‌دهد. در مدل‌های حیوانی مثل موش، خرگوش و خوکچه هندی التهاب بسیار شدید مخاط روده را بوجود می‌آورد

میکروپلیت چسبیده و با سوسترا محللول رنگی بوجود می‌آورد که با روش کالری متریک قابل سنجش است. برای هر یک از نمونه‌ها با روش فوق چهار سری شاهد اعم از کنترل مثبت و کنترل منفی تهیه نمودیم. از مدفوع ۶۲ نفر نرمال، بعنوان کنترل استفاده شد و سعی گردید از نظر سن، موقعیت اجتماعی و اقتصادی با بیماران هم تراز باشند.

شکل ۳- نمای سلولها (Bovine kidney cell lines) با استفاده از توکسین و آنتی توکسین: آنتی توکسین اثر مخرب توکسین را خنثی می‌کند بنابراین توکسین نمی‌تواند حالت Actinomorphie را بوجود آورد.



نتایج

۶۲ بیمار با کولیت اولسروز مورد مطالعه قرار گرفتند. ۳۹ نفر را مردان و ۲۳ نفر را زنان تشکیل می‌دادند. بیماران بین ۱۰ تا ۶۵ سال بودند ولی بیشترین تعداد در گروه سنی ۲۰ تا ۳۰ قرار داشتند. ۲۳ نفر آنها در مراحل ابتدایی بیماری و ۳۹ نفر دیگر با عود بیماری مراجعه نمودند (جدول ۱).

جدول ۱- گروههای سنی

گروههای سنی	تعداد	مرد	زن
زیرده سال	—	—	—
۲۰ تا ۲۰ سال	۴ نفر	۴ نفر	—
۲۱ تا ۳۰ سال	۳۱ نفر	۱۸ نفر	۱۳ نفر
۳۱ تا ۴۰ سال	۱۵ نفر	۱۰ نفر	۵ نفر
۴۱ تا ۵۰ سال	۸ نفر	۵ نفر	۳ نفر
۵۱ تا ۶۰ سال	۳ نفر	۱ نفر	۲ نفر
< ۶۱ سال	۱ نفر	۱ نفر	—

طی بررسی کشت سلولی و بکارگیری توکسین و آنتی توکسین شاهد مشخص شد که ۱۹ نفر از ۳۹ بیمار با عود بیماری، توکسین مثبت بودند (۴۸/۷۱٪) و وجود توکسین در مدفوع آنها باآلیات

میکروب کلستریدیوم دیفی سل یکی از آنها است و اطلاعات حاصله در این مورد کاملاً ضد و نقیض است (۱۰، ۱۱، ۱۲، ۳۲). ارتباط توکسین کلستریدیوم دیفی سل با عود بیماری کولیت اولسروز توسط Trnka Lamont پیشنهاد شد (۱۰). آنها توکسین کلستریدیوم دیفی سل را در مدفوع ۶ بیمار مبتلا به کولیت اولسروز با عود بیماری یافتند و در هر ۶ مورد با حذف توکسین، بیماران بهبود یافتند، ولی گزارشات بعدی دیگر محققان باین صراحت موضوع را تأیید نمودند (۱۱). در گزارشات بعدی با تعداد بیشتر بیماران و گرفتن تاریخچه دقیق تا حدی مشخص شد که اغلب قریب به اتفاق بیماران یک ماه قبل از عود بیماری نوعی آنتی بیوتیک مصرف نموده بودند. ضمناً با وجود کشت مثبت مدفوع و توکسین، وقتی بیماران بدون درمان کلستریدیوم دیفی سل پی گیری شدند، مشاهده گردید که میکروب بخودی خود در مدفوع بیماران ناپدید گردید، گرچه درصد بالایی از بیماران در زمان عود این میکروب را در مدفوع خود داشتند، ولی بنظر می رسد علت آن مصرف آنتی بیوتیک بوده و بدون تردید بدون هیچ درمانی این میکروب در مدفوع آنها از بین رفت. بنابراین ارتباط عود بیماری و وجود توکسین تأیید نگردید (۱۲). بنظر می رسد علت ابتلا به این میکروب بستری شدن آنان در بیمارستان و انتقال میکروب در محیط بیمارستان به بیماران باشد، چون این میکروب بخصوص در بین بیماران بستری شده در بیمارستان، بصورت ناقلان بدون علامت شایع است و می توانند آنرا براحثی به بیماران کولیت اولسروز منتقل نمایند و بدین ترتیب روده آسیب دیده آنها، مورد تهاجم این میکروب قرار می گیرد.

بیماران کولیت اولسروز از داروهای Sulfasalazine به عنوان درمان نگهدارنده استفاده می کنند. این دارو در روده تبدیل به Sulfaryridine و S-Aminosalicylic می شود، ترکیب اول یک داروی ضد التهاب است و ترکیب دوم نوعی آنتی بیوتیک است که می تواند فلور نرمال روده را از حالت طبیعی خارج کرده و زمینه را برای رشد میکروب کلستریدیوم دیفی سل آماده نماید (۳۳، ۳۴، ۳۵). شاید به همین دلیل است که استفاده از وانکومايسين نتیجه مطلوب در معالجه عود این بیماری دارد (۱۰، ۳۶، ۳۷).

با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق مشخص گردید که تعدادی از بیماران کولیت اولسروز در مدفوع، توکسین کلستریدیوم دیفی سل داشتند. وجود توکسین با عود بیماری مرتبط نبود ($P > 0.05$)، ولی وجود آن با بیماری کولیت اولسروز مرتبط است و این ارتباط از لحاظ آماری حائز اهمیت می باشد ($P < 0.001$). مطالعات بیشتری نیاز است تا رابطه علت و معلولی آن روشن گردد. بخصوص بیماران بصورت Randomized Trial در دو گروه مورد مطالعه قرار گیرند که یک گروه برای میکروب کلستریدیوم دیفی سل درمان شوند و گروه دیگر بدون درمان پی گیری شوند تا نتیجه آن مورد ارزیابی قرار گیرد.

(۱۳، ۱۴، ۱۵) و میانجی شیمیایی زیادی نظیر پروستاگلاندین E2 و لکوتراینها (Leurotriens) توسط سلولهای التهابی در محیط ترشح می شود (۱۶). حاصل آن یک اسهال آبکی همراه با خون خواهد بود. توکسین B پروتئینی است با وزن مولکولی ۲۷۹KD-۲۷۰ که با خاصیت خود را از دست می دهد. در حد ۰/۲ پیکوگرم قادر است اکتین ساختمان سلولها را در هم بشکند و حالت کلاسیک و قابل رؤیت Actinomorphie را بوجود می آورد (۱۷، ۱۸، ۱۹).

فقط توکسین A در مدلهای حیوانی تخریب سلولهای روده را سبب می شود و توکسین B حداقل با این روش هیچ نوع تخریب سلولی را به همراه ندارد. در عوض قدرت تخریب توکسین B در کشت سلولی تا ده هزار برابر توکسین A گزارش شده است. به همین دلیل توکسین B را به عنوان یک سایتوتوکسین و توکسین A را به عنوان یک انتروتوکسین (Enterotoxin) می شناختند. بنابراین تصور بر این بوده است که توکسین A موجب بیماری در انسان می شود و توکسین B فقط در تشخیص بیماری کمک می کند. ولی اطلاعات جدید با استفاده از سلولهای روده انسان (T84) نشان داده است که توکسین B حدود ده برابر توکسین A موجب تغییرات ظاهری سلول و نفوذ پذیری آن می شود (۲۰). بدین ترتیب به نظر می رسد که هر دو توکسین A و B در تخریب سلولهای روده و ایجاد اسهال در انسان دخالت داشته باشند.

ردیابی توکسین با روش کشت سلولی از حساسیت بالایی برخوردار است و قادر است تا ۰/۲ پیکوگرم توکسین B را تشخیص دهد (۲۱). حساسیت الیزا (ELISA) نسبت به کشت سلولی حدود ۸۰ درصد است (۲۲، ۲۳). فقط ۴ مورد توکسین مثبت با روش الیزا در بیماران خود داشتیم که نسبت به گزارشات، رقم کمی است. این موضوع می تواند به علت ایده آل نبودن شرایط اندازه گیری در الیزا باشد. ولی به هر حال در تفسیر کشت سلولی ما نمی تواند خللی وارد آورد. در هر صورت اغلب قریب به اتفاق آزمایشگاههای تحقیقاتی به علت حساسیت بالای روش کشت سلولی از الیزا اصلاً استفاده نمی کنند. ما نیز روش کشت سلولی را ملاک قرار داده ایم. آنتی بادی استفاده شده معمولاً بر علیه هر دو توکسین است (۲۴). چون درجه سیتوتوکسی سیتی (تخریب سلولی) با شدت علائم بیماری رابطه دارد، بنابراین اندازه گیری توکسین A و B به تفکیک کمکی نمی کند. ما نیز از آنتی بادی پلی کلونال استفاده کرده و توکسین A و B را بصورت جدا اندازه گیری نکردیم.

گرچه تحقیقات هنوز عامل کولیت اولسروز را شناسایی نکرده است ولی هم اکنون اکثریت قریب به اتفاق دانشمندان بر این باورند که در پاتوژنز بیماری کولیت اولسروز، علاوه بر عوامل زمینه ای ژنتیکی و پاسخ ایمنی، ویژگی عامل بیرون و به احتمال زیاد از فلور میکروبی روده در شروع بیماری و یا عود آن نقش دارد. در این رابطه تحقیقات زیادی بعمل آمده است (۲۵، ۲۶، ۲۷، ۲۸، ۲۹، ۳۰، ۳۱).

منابع

- 1- Haliz S. Clostridium difficile and its toxin. PHD dissertation Leads, U.K. university of Leads 1974.
- 2- Hall, I.C. and Ottole, E. "Intestinal flora in newborn infants with description of a new pathogenic anaerobe, bacillus difficillis". Am. J. Dis. Child 49: 390, 1935.
- 3- Snyder M.L. "Normal fecal flora of infants between two weeks and one year of age". Serial studies J. infect. Dis 66: 1, 1940.
- 4- Bartlett, T.G. sang, T.W., Gurwith, M. et al. "Antibiotic associated pseudomembranous colitis due to toxin producing clostridia" new England journal of medicine. 198: 531-534, 1978.
- 5- Bartlett, T.G., Onder donk, A.B., Gibneros A.B. and kasper, D.L. "Clidamycin associated colitis due to toxin producing species of clostridium in hamsters", journal of infectious disease 136: 701-705, 1977.
- 6- Noki Kato, Chin-Yih Ov, Haru Rato, Su zette L, Bartley Vicki K, Brown, Vilus R, Bowell JR, and Kazuo veno. Identification of Toxigenic Clostridium difficile by the polymerase Chain Reaction. Journal of clinical microbiology 29: 33-37, 1991.
- 7- C.H. Dove, S.Z. Wang, S.B. Price, C.J. Phelps, D.M. Lyerly T.D. Wilkins, and J.L. Johnson. "Molecular characterization of clostridium difficile toxin A gene". Infection and immunity 58: 480-488, 1990.
- 8- Hannah Rosly devlin Mar Av, Luba Tox and wayne claude Bradbury. "Restriction endonuclease analysis of nosocomial isolates of clostridium difficile". Journal of clinical Microbiology 25: 2168-7172, 1987.
- 9- Maurice J. H. M. Wolflagen, rund torensma, AD C. Fluit, and Jan Verhoef. "Toxin A and B of clostridium difficile" FEMS microbiology reviews. 13: 59-64, 1994.
- 10- J. Thomas Lamont, Yvonda Trnka. "Therapeutic implications of clostridium difficile Toxins during relapse of chronic inflammatory bowel disease". The lancet 1: 381-3, 1980.
- 11- John G. Bartlett. "Clostridium difficile and inflammatory bowel disease" gastroenterology 80: 863-865, 1981.
- 12- M.R.B. Kieghley, Denise Younge, Margaret Johnson R.N. Allan, And D.W. Burdon. "Clostridium difficile toxin in acute diarrhoea complicating inflammatory bowel disease". Gut 23: 410-414, 1982.
- 13- Kenneth D. Tucker, Paulne E. Carrig and Tracyd. Wilkins. "Toxin A of Clostridium difficile is A potent cytotoxin". Journal of clinical microbiology 28: 869-871, 1990.
- 14- Sullivan, N.M., Petteil, S., and Wilkins, T.D. Purification and Characterization of Toxin A and B of Clostridium difficile. Infect immun. 35: 1032, 1982.
- 15- Lima, A.A.M. Lyerly D.M., Wilkins, T.D. Effect of Toxin A and B in rabbit small and large intestine in vivo and cultures cells in vitro Infect Immun. 56: 582, 1988.
- 16- Burakoff, R, Zhao, J, Cehlarov, A.J. et al. Effect of purified clostridium difficile Toxin A on rabbit distal colon. Gastroenterology 190(2): 348, 1995.
- 17- Fiorentini, C., Malorni, W., Paradisi, S. et al. Interaction of clostridium difficile Toxin A with culture cells: cytoskeletal changes and nuclear polarization Infect Immun. 58: 2329, 1990.
- 18- Ott Linger, M.D. and Lin, S. Clostridium difficile Toxin B induces reorganization of actin vinculin and john in cultured cells Exp cell Res. 174: 215, 1988.
- 19- Just, L, Selzer, J., Wilm, M. et al. "Glycosylation of R110 protein by clostridium Toxin B" nature 375: 500, 1995.
- 20- Rie Gler M, Sedivy, R., Pothoulakins, C. et al. Clostridium difficile Toxin B is more potent than Toxin A in damaging human colonic epithelium. In vitro. J. Clin Invest. 95: 2004, 1995.
- 21- Te-wen chang, Michael Laver Mann, and John G. Bartlett. "Cytotoxicity assay in antibiotic associated colitis" The Journal of infectious diseases 140: 765-770, 1979.
- 22- Barbara E. Lauchon, Raphael P, Viscidi, Sosan L, Grovin Robert H, Yolken, and John G. Bartlett. "Enzyme immunoassay for detection of clostridium difficile toxin A and B in fecal specimen". The journal of Infections disease 149: 781-788, 1984.
- 23- David M. Lyerly, Nadine M. Sullivan and T. Wilkins. "enzyme linked immunosorbant assay for clostridium difficile Toxin A. Journal of clinical microbiology 17: 72-78, 1983.
- 24- Marioli EH Rich, Roger L, Van tassell, Jerey M, Libby and Tracyd, Wilkins "Production of clostridium difficile antitoxine" Infection and Immunology 28: 104-1043, 1980.
- 25- Cooke, F.M, Ewins, S.P., and Shooter, RA. Changing fecal population of E-coli and hospital Medical patients. BMJ 4: 5593, 1964.
- 26- Cooke, F.M., Ewins, S.P., Hywell-Jones, J, and Leonard-Jones J.E. "Properties of strains of E-coli carried in different patient of ulcerative colitis". Gut 15: 143, 1974.
- 27- Burke, D.A and Axon, A.T.R. "Ulcerative colitis and escherichia coli with adhesive properties". J. Clin. Path. 40: 782, 1987.
- 28- Burke, D.A., Axon, A.T.R., Clayden, S.A., et al. "The efficacy of Tobramycin in Treatment of Ulcerative colitis". Aliment. Pharm. Ther. 4: 1234, 1990.
- 29- Swarbrick, E.T, Kingham, J.G.C., price, H.L., Black shaw, A.J Griffiths, P.D, Darougar, S, Buchell, N.A. "Chlamydia, Cytomegalovirus and yersinia in inflammatory bowel disease". Lancet 2: 11, 1979.
- 30- Cave, D., Michell, D., and Brooke, B. Evidence of an agent transmissible from ulcerative colitis. Lancet 1: 311, 1976.
- 31- Gitnick, G.L., Rosen, U.L, Arthur, M.H., and herweck, S.A. Evidence for the isolation of A new virus from ulcerative colitis patients. DIG, DIS, SG, 24: 609, 1979.
- 32- Mayers, S., Mayer, L, Botton, E, Desmond, E, and Janowitz, H.D. The "Occurance of clostridium toxin during the course of inflammatory bowel disease" Gastroenterology 80, 697, 1981.
- 33- John G. Bartlett. "The Pseudomembranous colitis". Scersenger,

- Gastrointestinal disease. 1998 Saunders Chapter 96 pp: 1633-1647, 1998.
- 34- "Bacterial toxin in internal fluid and electrolyte transport. Sleisinger gastrointestinal and liver disease" 1998. Saunders. Chapter 96 pp: 1464-1465. 1998.
- 35- Bolton RP, Sherriff TJ, Read AC. "Clostridium difficile associated diarrhoea, A role in inflammatory Bowel disease". The lancet I: 383-4.
- 36- Taylor. N.S. and Bartlett. J.G. Binding of clostridium difficile cytotoxin and vancomycin by anion exchang resins J. Infect dis. 141: 92, 1980.
- 37- Dickinson. R.J. O., Cooner, H.J, Pinder, L, Hamilton, I, Johnson, D. Double blind control trial of oral vancomycin vs. fluvent treatment in acute exacerbation of ideopathic colitis. JAMA. 253: 1380, 1985.