

*Adam Szczęsny**, *Gayane Martirosian**#*

EPIDEMIOLOGIA ZAKAŻEŃ *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*

* II Zakład Anestezjologii i Intensywnej Terapii SP CSK
Akademii Medycznej w Warszawie

** Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Centrum Biostruktury
Akademii Medycznej w Warszawie

Katedra Mikrobiologii Śląskiej Akademii Medycznej

*Omówiono najważniejsze zagadnienia epidemiologii zakażeń
wywołanych przez Clostridium difficile.*

Słowa kluczowe: Clostridium difficile, epidemiologia zakażeń, metody badań

Key words: Clostridium difficile, epidemiology of infections, methods of investigation

WSTĘP

W piśmiennictwie coraz częściej pojawiają się doniesienia na temat *zakażeń* szpitalnych w postaci biegunek poantybiotycznych i rzekomobłoniastego zapalenia jelit, spowodowanych przez szczepy *Clostridium difficile*. Są to zakażenia wymagające specjalnej diagnostyki i leczenia, co czasem bardzo znacznie powiększa koszty hospitalizacji pacjentów. Problem ten jest coraz bardziej niepokojący również i w Polsce. Dlatego też postanowiliśmy omówić tutaj najważniejsze - z naszego punktu widzenia - zagadnienia, związane ze śledzeniem zakażeń szpitalnych, spowodowanych przez *C. difficile* i stosowanymi do tego celu metodami.

ETIOLOGIA I KLINIKA ZAKAŻEŃ *C DIFFICILE*

Clostridium difficile to Gram-dodatnia laseczka rosnąca w warunkach beztlenowych, czynnik etiologiczny AAD (antibiotic-associated diarrhea) i PMC (pseudomembranous colitis) (1, 2). Jest odpowiedzialna również za zakażenia szpitalne, szczególnie na oddziałach długoterminowej opieki medycznej (3). AAD i PMC występują najczęściej jako następstwo stosowania antybiotyków takich jak: cefalosporyny II i III generacji, penicyliny, inne antybiotyki beta-laktamowe, klindamycyna, erytromycyna, ryfampicyna, trimetoprim, a także metronidazol, aminoglikozydy, amfoterycyna B i inne (1, 2, 4). PMC i AAD mogą występować również po zastosowaniu cytostatyków (5). Laseczki *C. difficile* występują w środowisku naturalnym (gleba, woda), oraz w przewodzie pokarmowym licznych gatunków zwierząt (6). Badania wykazały, że drobnoustroj ten może bytować w organizmie dzikich kotów takich jak lwy, tygrysy, niektórych małp,

np. makaków a nawet hodowlanych zwierząt udomowionych - psów i koni (7). Bakterie te można hodować również z przewodu pokarmowego człowieka: z kału zdrowych osób dorosłych mogą być izolowane okresowo, z niską częstością (ok. 3%) (8). Natomiast z przewodu pokarmowego dzieci do dwóch lat *C. difficile* hodowano z częstością aż do 60% (9). U osób dorosłych *C. difficile* może być odpowiedzialny za schorzenia przewodu pokarmowego począwszy od łagodnych biegunek, kończących się samowyleczeniem, a skończywszy na rzekomobłoniastym zapaleniu jelita grubego, które u pacjentów nie leczonych może nawet zakończyć się zgonem (10). Według ostatnich badań, *C. difficile* wywołuje większość przypadków rzekomobłoniastego zapalenia jelita grubego oraz około 25% przypadków biegunki związanej z poprzedzającą antybiotykoterapią (11). Schorzenia związane z zakażeniem *C. difficile* są spowodowane głównie przez działanie dwóch dużych toksyn białkowych A i B (12). Obie toksyny wykazują podobne działanie cytotoksyczne oraz letalne. Cechą różniącą je jest aktywność toksyny A w przewodzie pokarmowym. Badania na modelach zwierzęcych wykazały, że pod wpływem toksyny A powstaje lepki, krwisty płyn na skutek znacznego uszkodzenia tkanek. Toksyna A jest odpowiedzialna za większość objawów jelitowych (13). Zaś toksyna B jest silną cytotoksyną, 1000 razy mocniejszą niż toksyna A. Szczepy toksynotwórcze wytwarzają na ogół obydwie toksyny równolegle i można stwierdzić obecność genów tych toksyn w badanym materiale klinicznym, czy w szczepach badanych. Szczepy nietoksynotwórcze nie wytwarzają tych toksyn i są pozbawione odpowiednich genów. Opisano również szczepy produkujące jedną toksynę przy braku drugiej: A-/B+ i A+/B- (1, 4, 14, 15). Takie szczepy *C. difficile* również są przyczyną biegunek i są udokumentowane przypadki zakażeń szpitalnych spowodowanych przez te szczepy.

Chorobę związaną z zakażeniem *C. difficile* rozpoznaje się gdy: pacjent oddał 6 nieufornych lub biegunkowych stolców w ciągu 36 godzin, otrzymywał antybiotyki w ciągu ostatnich 8 tygodni, nie stwierdza się innych przyczyn biegunki i kiedy podawanie wankomycyny lub metronidazolu przynosi dobry efekt (16, 17). Badanie endoskopowe umożliwia wykrycie błon rzekomych charakterystycznych dla rzekomobłoniastego zapalenia okrężnicy (PMC) (14, 18). Pierwszymi objawami są biegunka i bóle brzucha, po czym występuje gorączka, dreszcze, a w stolcu może pojawić się krew. Białawe błony rzekome obecne są na ścianach jelita grubego. Składają się one z martwiczej tkanki, włókniaka i wysięku zapalnego (14, 18, 19). Materiałem badanym w kierunku *C. difficile* jest głównie kał. Zdarzają się jednak przypadki wyhodowania szczepów tego drobnoustroju z innych materiałów klinicznych: krwi i innych płynów ustrojowych, ropa. Ciekawe przypadki "reactive arthritis" spowodowane przez *C. difficile* są opisane przez Riley'a i współautorów u pacjenta z zespołem Reitera (14, 20).

PACJENCI HOSPITALIZOWANI JAKO ŹRÓDŁO ZAKAŻEŃ *C. DIFFICILE*

W latach dziewięćdziesiątych opisano *C. difficile* jako jeden z głównych czynników szpitalnych biegunek w USA (19) i w wielu krajach uprzemysłowionych (21). Epidemiczne zachorowania na biegunki wywołane przez te bakterie stwierdzono na oddziałach onkologicznych, oddziałach dla przewlekle chorych i oddziałach dla pacjentów po zabiegach operacyjnych, głównie po operacjach jamy brzusznej (22). U około 13-30% dorosłych hospitalizowanych pacjentów stwierdza się obecność *C. difficile* w przewodzie pokarmowym (23). *C. difficile* może być odpowiedzialny również za biegunki nabywane

przez hospitalizowane dzieci (w tym niemowlęta i noworodki) (24, 25). Opisano przypadki schorzeń wywołanych przez *C. difficile* u niemowląt, które były leczone antybiotykami z powodu posocznicy i innych infekcji (26, 27).

Infekcje *C. difficile* zaobserwowano u pacjentów z cukrzycą, przewlekłą niewydolnością oddechową, udarem mózgu. Szczególnie podatni na to zakażenie są pacjenci pozostający na długoterminowym leczeniu immunosupresyjnym (28), z chorobą wrzodową (a zwłaszcza stosujący w leczeniu preparaty z grupy inhibitorów pompy protonowej) (29), przyjmujący środki przeczyszczające (szczególnie w formie czopków), wreszcie osoby z pierwotnymi lub wtórnymi zespołami upośledzenia odporności i alkoholicy (30). Opisano również przypadki występowania PMC, u pacjentów uprzednio zakażonych metacyclino-opornymi szczepami gronkowca złocistego (MRSA) i leczonych z tego powodu wankomycyną (31). Wankomycyna jest lekiem z wyboru w przypadku schorzeń, wywołanych przez *C. difficile*, ale nawet ona może być przyczyną niszczenia normalnej flory jelitowej, tzw. "colonisation resistance factor". A więc nadmierne namnażanie się *C. difficile* w przewodzie pokarmowym może nastąpić nawet po leczeniu pacjentów antybiotykami z wyboru (wankomycyna, metronidazol). Dowiedziono również, że osoby z chorobą reumatyczną pozostające na długotrwałym leczeniu metotreksatem stanowią grupę podwyższonego ryzyka związanego z zakażeniem *C. difficile* (32). Badania wykazały, że pacjenci leczeni przewlekle z powodu mukowiscydozy również stanowią grupę ryzyka zakażenia *C. difficile* (33). Szereg autorów uważa także, że osoby w przedziale wieku 65 - 79 lat są szczególnie narażone na zakażenie *C. difficile*, co najprawdopodobniej związane jest z uogólnionym upośledzeniem funkcji organizmu i spadkiem odporności immunologicznej. U tych pacjentów stwierdzono też tendencję do hipoalbuminemii (3). Odrębną grupę stanowią chorzy hospitalizowani na oddziałach chirurgicznych. Szczególnie narażeni są na zakażenia *C. difficile* pacjenci poddani zabiegom endoskopowym, na przykład kolonoskopiom czy gastrokopiom oraz pacjenci otrzymujący żywienie pozajelitowe przez klasyczne cewniki gastrostomijne lub przez tzw. PEG-i (34).

SZERZENIE SIĘ ZAKAŻEŃ *C. DIFFICILE* W WARUNKACH SZPITALNYCH

Ogromne znaczenie przy powstawaniu choroby ma też zdolność *C. difficile* do wytwarzania spor - przetrwalników (4, 14). Na spory nie działają antybiotyki, wykazują one także oporność na szereg środków dezynfekcyjnych. Mogą być one odpowiedzialne za nawroty choroby (35), których częstość w niektórych ośrodkach oceniana jest nawet na 20%. Szczepy szpitalne *C. difficile* z dużą łatwością wytwarzają spory, które mogą utrzymywać się w środowisku szpitalnym przez długi czas. Zatem obok rzeczywistych nawrotów mogą być obserwowane przypadki zakażeń egzogennych, szczepami ze środowiska szpitalnego (odmienne fenotypy i genotypy) (36). Opisane są następujące możliwe mechanizmy szerzenia się *C. difficile* w szpitalach: przez kontakt z pacjentem skolonizowanym, przez środowisko szpitalne (zanieczyszczone przedmioty i stosowany sprzęt) i przez personel medyczny. Często są przypadki wyhodowania *C. difficile* z wymazów pobranych z podłogi, z powierzchni krzeseł, łóżek, dzwonków, parapetów, ścierek, koszy na śmiecie, łazienek, ubikacji itd. (3, 14, 37, 38). Szczepy *C. difficile* wyhodowano również z wymazów pobranych ze sprzętu szpitalnego: aparatów do dializ, termometrów doodbytniczych, basenów itp. (1, 9, 14, 26).

ŚLEDZENIE ZAKAŻEŃ SZPITALNYCH SPOWODOWANYCH PRZEZ *C. DIFFICILE*: METODY TYPOWANIA

Aby zdiagnozować choroby związane z *C. difficile* - poza stosowaniem szybkich metod oznaczania obecności toksyn w kale - należy wyhodować, wyizolować i zidentyfikować szczepy. W tym celu stosowane są podłoża selektywne i hodowla szczepów prowadzona w warunkach beztlenowych. Identyfikacji *C. difficile* dokonuje się na podstawie morfologii bakterii (preparaty mikroskopowe) oraz analizy produktów metabolizmu (39). Po identyfikacji szczepów *C. difficile* powinna być przebadana ich zdolność do wytwarzania toksyn (37, 40). Bardzo często w celach diagnostycznych przeprowadza się badanie obecności toksyn *C. difficile* bezpośrednio w kale za pomocą testów immunoenzymatycznych. Wychodowanie *C. difficile* nie zawsze jest możliwe ze względu na brak niezbędnego wyposażenia laboratoriów. W śledzeniu zakażeń szpitalnych bardzo ważne jest porównanie szczepów wyhodowanych z różnych źródeł. Można je przeprowadzić stosując metody fenotypowania i genotypowania (37). Ponieważ dość łatwo dochodzi do zakażeń bakteriami występującymi w środowisku szpitalnym, zasadnicze znaczenie ma posiadanie odpowiedniego wyposażenia do przeprowadzenia hodowli drobnoustroju. Wychodowanie umożliwia ponadto ustalenie, czy te same szczepy wywołują zakażenia u różnych pacjentów i są przenoszone przez pracowników szpitala (ręce, przewód pokarmowy) (41). Jest to niezmiernie ważne również podczas badania nawrotów choroby, obserwowanych u około 20% pacjentów (42). Typowanie szczepów ułatwia również wykrywanie rezerwuarów bakterii w środowisku szpitalnym. Typowanie szczepów *C. difficile* nie jest stosowane rutynowo, muszą jednak istnieć możliwości wykorzystania go w przypadku epidemii. Metody fenotypowania przechodzą już do historii, natomiast metody genotypowania coraz bardziej się rozwijają i znajdują coraz szersze zastosowanie. Analiza chromosomowego DNA - REA (restriction endonucleas analyses) z zastosowaniem enzymów *Hind III*, *CfoI*, *EcoI*, *BamHI* i innych jest szeroko stosowana w przypadku badania zakażeń szpitalnych, spowodowanych przez *C. difficile* (37, 43). Problem tylko w tym, że po cięciu enzymami powstają kompleksy produktów - około 50 prążków, co uniemożliwia analizę wizualną i wymaga przeprowadzenia analizy komputerowej. Metoda polimorfizmu długości restrykcyjnych fragmentów - RFLP polega na: trawieniu materiału endonukleazami, przeprowadzeniu elektroforezy w żelu, Southern blottingu i hybrydyzacji z wybranymi, znakowanymi próbkami kwasów nukleinowych (14, 43). Metoda AP PCR z zastosowaniem dowolnie wybranych primerów daje możliwości badania polimorfizmu bez wiedzy o sekwencji nukleotydów w badanym materiale. W tym przypadku wybrane primery są pojedyncze i mają wielkość od 50 par zasad. Bardzo podobną do tej metody jest metoda RAPD (random amplified polymorphic DNA), w której używa się parzystych krótkich primerów, zwykle do 10 par zasad o dowolnej sekwencji. Metody te z powodzeniem są stosowane powszechnie (14, 36, 37, 44). Rybotypowanie polega na zastosowaniu specyficznych primerów komplementarnych do różnych części operonu RNA i w reakcji PCR uzyskuje się amplifikację regionu pomiędzy odcinkami 16S i 23S rRNA. Ten region charakteryzuje się wysoką heterogennością. Metoda znalazła szerokie zastosowanie dzięki temu, że region ten (między odcinkami 16S a 23S) zmienia się nie tylko w obrębie różnych szczepów badanych, ale różnice obserwuje się nawet między różnymi kopiami tego samego genomu (38, 44, 45). Metoda PFGE - elektroforeza w zmiennym

polu elektrycznym, znalazła szerokie zastosowanie w badaniach zakażeń szpitalnych. Zaletą metody jest to, że pozwala ona odseparować bardzo duże fragmenty DNA umożliwiające przeanalizowanie całego chromosomu, przy zastosowaniu szeregu enzymów: *SmaI*, *KspI*, *SacII*, albo *NurI* (46, 47). Ostatnio jednak pojawiły się doniesienia o przypadkach niepowodzenia w zastosowaniu metody PFGE do typowania szczepów *C. difficile*. Wydaje się, że jest to wynikiem degradacji DNA, ale jeszcze nie ustalono przyczyny tego zjawiska (37, 47, 48). Na podstawie badań epidemiologicznych udowodniono, że określone genotypy szczepów *C. difficile* częściej powodują zakażenia szpitalne (49, 50, 51, 52, 53).

Ogólnie rzecz biorąc do dyspozycji badaczy jest szereg bardzo dobrych metod genotypowania, które można stosować w przypadku lokalnej epidemii. Gorzej, kiedy przeprowadza się badania wielośrodkowe, w których trzeba ujednoclić stosowane do genotypowania metody i używany sprzęt. Rozwiązaniem tych problemów zajmują się ośrodki referencyjne w różnych krajach. Naczelnym problemem wydaje się być kwestia właściwego postępowania z chorymi, u których rozpoznano biegunkę i jest konieczność izolowania ich od pozostałych chorych oraz prowadzenia dalszej diagnostyki i leczenia. Wykrywanie zakażeń szpitalnych jest niezbędnym warunkiem umożliwiającym skuteczną kontrolę zakażeń na terenie szpitala. Nadzór obejmuje rutynowe zbieranie danych na temat zakażeń, ich analizę i - na tej podstawie - wydawanie odpowiednich zaleceń personelowi szpitala. Wydaje się że najlepszym rozwiązaniem w przypadku *C. difficile* jest skoncentrowanie nadzoru na oddziałach szpitala (np. intensywnej terapii, intensywnej opieki nad noworodkiem), gdzie istnieje największe ryzyko zakażeń *C. difficile* ze względu na stan pacjentów a także oddziałach, na których przeprowadza się zabiegi inwazyjne. W prowadzeniu nadzoru nad zakażeniami szpitalnymi w ogóle, a zwłaszcza w przypadku *C. difficile*, pomocna jest systematyczna analiza czynników etiologicznych i ich wrażliwości na antybiotyki. Wskazane jest także nadzorowanie stosowania antybiotyków na oddziałach. Ponadto można przeprowadzić szczegółowe badania przypadków zakażenia zwłaszcza na obszarach szczególnego ryzyka. Takie badanie wymaga wykrywania zakażeń w określonym czasie: np. obliczenia liczby zakażonych na 100 pacjentów wypisanych ze szpitala lub na 1000 dni pobytu w szpitalu. Metoda ta jest bardziej pracochłonna niż oznaczanie odsetka osób aktualnie zakażonych.

A. Szczęsny, G. Martirosian

EPIDEMIOLOGY OF *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* INFECTION

SUMMARY

Pseudomembranous colitis (PMC), antibiotic-associated diarrhoea (AAD), and colitis (AAC) caused by *Clostridium difficile* are recognized as complications of antibiotic treatment (cephalosporins, penicillins, clindamycin and others). Two groups are particularly at risk: older and immunocompromised patients. In recent years *C. difficile* has been recognized as a common nosocomial pathogen. To understand the epidemiology of the *C. difficile* infection, many outbreaks have been investigated by various methods. In the paper we reviewed different methods of *C. difficile* typing and discussed the epidemiology of *C. difficile*-associated infections in light of recent publications.

PIŚMIENICTWO

1. Borriello SP. Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. JAC 1998; 41 (Suppl. C):13-9.
2. Wilcox MH. Treatment of *Clostridium difficile* infection. JAC 1998; 41 (Suppl. C):41-6.
3. Malamou-Ladas H, O'Farrel S, Nash JQ, Tabaqchali S. Isolation of *C. difficile* from patients and the environment of hospital wards. J Clin Pathol 1983;36:88-2.
4. Cohen SH, Tang YJ, Muenzer J, Gumerlock PH, Silva JJr. Isolation of various genotypes of *C. difficile* from patients and the environment in an oncology ward. Clin Inf Dis 1997;24:889-93.
5. Nair S, Yadar D, Corpus ML, Pitchumoni CS. *C. difficile* colitis: factor influencing treatment failure and relapse - a prospective evaluation. Am J Gastroenterol 1998;93:1873-6.
6. Struble AL, Tang YJ, Kass PM, Gumerlock PH, i in. Fecal shedding of *C difficile* in dogs: a period of prevalence survey in a veterinary medical teaching hospital. J Vet Diagn Invest 1994;6:342-7.
7. Meisel-Mikołajczyk F, Łazińska B, Kot K, Obuch-Woszczatyński P, i in. Clostridia and clostridial enteric disease. Rev Med Microbiol 1998;9(Suppl. 1):560-7.
8. Bartlett J. G. *Clostridium difficile*: clinical consideration. Rev Infect Dis 1990;12(Suppl.2): 243-51.
9. Meisel-Mikołajczyk F, Martirosian G, Marianowski L, i inn. *Clostridium difficile* in a maternity hospital. Internat J Feto-Mat Med 1992;5:173-7.
10. Kyne L, Merry C, O'Connel B, i in. Factors associated with prolonged symptoms and severe disease due to *Clostridium difficile*. Age&Ageing 1999;28:107-13.
11. Tabaqchali S, Jumaa P. Diagnosis and management of *Clostridium difficile* infection. Br Med J 1995;310:1375-80.
12. Hatheway CL. Toxigenic Clostridia. Clin Microbiol Rev 1990;1:66-98.
13. Silva JJr, Iezzi C. *Clostridium difficile* as a nosocomial pathogen J Hosp Infect 1988;11(Suppl. A):378-85.
14. Martirosian G. Rzekomoblioniaste zapalenie jelit : epidemiologia, etiologia, diagnostyka. Praca habilitacyjna. Akademia Medyczna, Warszawa, 1996.
15. Martirosian G, van Belkum A, Pituch H, i in. Are rapid immunoassays for in vivo detection of toxin A sufficient for diagnostic purposes of *C. difficile*-associated diarrhoea? Anaerobe 2000;6:15-9.
16. Gerding DM., Brazier JS. Optimal method for identifying *C. difficile* infections. Clin Infect Dis 1993;16:439-42.
17. Fekety R, Shah A. Diagnosis and treatment of *C. difficile* colitis JAMA 1993; 269:71-5.
18. Kelly CP, Pothoulakis C, LaMont JT. *Clostridium difficile* colitis. N Engl J Med 1994;330:257-62.
19. Rubin M, Bodenstein L, Kent K. Severe *Clostridium difficile* colitis. Dis Colon Rectum 1995;38:350-4.
20. McCluskey J, Riley TV, Owen ET, Langlands DR. Reactive arthritis associated with *C difficile*. Aust N Z J Med 1982;12:535-7.
21. Fekety R. Antibiotic - associated diarrhoea and colitis. Current Opin Infect Dis 1995;8:391-7.
22. Predergast TM, Marini CP, D'Angelo AJ, i in. Surgical patients with pseudomembranous colitis: factors affecting prognosis. Surgery 1994;116:768-75.
23. Talbot RW, Walker RC, Beart RW. Changing epidemiology diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* toxin - associated colitis. Br J Surg 1986;73:457-60.
24. Stark PL, Lee A, Parsonage BD. Colonization of the large bowel by *C. difficile* in healthy infants: Quantitative study. Infect Immun 1982;35:895-9.

25. Cooperstock MS, Steffen E, Yolken R, Onderdonk A. *Clostridium difficile* in normal infants and sudden death syndrome: An association with infant formula feeding. *Pediatrics* 1982;70:91-5.
26. Larson HE, Barclay FE, Honour P, Hill I. Epidemiology of *Clostridium difficile* in infants. *J Infect Dis* 1982;146:727-33.
27. Rietra PJ, Slaterus KW, Zanen HC, Meuwissen SGM. Clostridial toxin in faeces of healthy infants. *Lancet* 1978;2:319.
28. Worsley MA Infection control and prevention of *C. difficile* infection. *J Antimicrob Chemother.* 1998;1(Suppl.C):59 - 66.
29. Johnson S, Clabots CR, Linn F, i in. Nosocomial *C difficile* colonization and disease. *Lancet* 1990;336:97-100.
30. Samore MH, Bettin KM, DeGirolami PC, i in. Wide diversity of *Clostridium difficile* types at a tertiary referral hospital. *J Infect Dis* 1994;170:615-21.
31. Brazier JS. The diagnosis of *Clostridium difficile* - associated disease. *J Antimicrob Chemother* 1998;41(Suppl. C):29-40.
32. Cobeta-Garcia JC, Domingo-Morera JA, Gracia P. *C. difficile* - associated diarrhea in a patient with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 1998;41 (11): 2083-5.
33. Binkovitz LA, Allen E, Bloom D, i in. Atypical presentation of *C. difficile* colitis in patients with cystic fibrosis. *Am J Roentgenol* 1999;172:517-21.
34. Byl B, Jacobs F, Struelens MJ, Thys JP. Extraintestinal *Clostridium difficile* infections. *Clin Inf Dis* 1996;22:712-3.
35. O'Neil GL, Beaman MH, Riley TV. Relapse versus reinfection with *C difficile*. *Epidemiol Infect* 1991;107:627-35.
36. Meisel-Mikołajczyk F, Martirosian G, Tang Y J, Silva JJr. Genotyping of *C. difficile* isolates from a hospital in Warsaw: a preliminary study. *Int J Infect Dis* 1997;2:88-90.
37. Brazier J. S. The epidemiology and typing of *Clostridium difficile*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41(Suppl. C):47-57.
38. Martirosian G. *C. difficile*: epidemiologia zakażeń, diagnostyka. *Post.Microbiol.* 1997;XXXVI,4:407-18.
39. Gumerlock PH, Tang YJ, Weiss JB, Silva J.Jr. Specific detection of toxigenic strains of *C. difficile* in stool specimens. *J Clin Microbiol* 1993;3:507-11.
40. Byl B, Jacobs F, Struelens MJ, Thys JP. Extraintestinal *C. difficile* infections. *Clin Infect Dis* 1996;22:712.
41. Riley TV. Wetherall F, Bowman RA, i in. Diarrheal disease due to *C. difficile* in general practice. *Pathology* 1991;23:346-9.
42. Bartlett JG, Tedesco FJ, Shull S, i in. Symptomatic relapse after oral vancomycin therapy of antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Gastroenterol* 1980;78:431-4.
43. O'Neil G, Adams JE, Bowman EA, Riley TV. A molecular characterization of *C difficile* isolates from humans, animals and their environments. *Epidemiol Infect* 1993;111:257-64.
44. Martirosian G, Kuipers S, Verbrugh H, i in. PCR ribotyping and arbitrary primed PCR for typing strains of *C. difficile* from a polish maternity hospital. *J Clin Microbiol* 1995;33:2016-21.
45. Gurtler V. Typing of *C. difficile* strains by PCR-amplification of variable length 16S-23S rDNA spacer regions. *J Clin Microbiol* 1993;139:3089-97.
46. Talor D, Bailly P, Delmee M, i in. Use of pulse-field gel electrophoresis for investigation of an outbreak of *C. difficile* infection among geriatric patients. *Eur J Microbiol Inf Dis* 1995;14:987-93.
47. Kato H, Kato N, Watanabe K, i in. Relapses or infections: analysis of a case of *C. difficile* - associated colitis by two typing systems. *Current Microbiol* 1996;33:220-3.

48. Bidet P, Lalande V, Salauze B, i in. Comparison of PCR-ribotyping, arbitrary primed PCR and pulse-field gel electrophoresis for typing *C. difficile*. J Clin Microbiol 2000;38:2484-7.
49. Sheretz RJ, Sarubbi MD. The prevalence of *C. difficile* and foxin in a nursery population. J Pediatr 1982;100:435-8.
50. Al Saif N, Brazier JS. The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. J Med Microb 1996;45:133-7.
51. Buggy BP. *Clostridium difficile* colitis: causes, cures. JAMA 1993;269:2088.
52. Lemann F, Chambon C, Barbut F i in. Arbitrary primed PCR rules out *C. difficile*-cross infection among patients in a haematology unit. J Hosp Infect 1997;35:107-15.
53. van Dijck P, Avesani V, Delmee M. Genotyping of outbreak-related and sporadic isolates of *C difficile* belonging to serogroup C. J Clin Microbiol 1996; 34: 3049-55.

Adres autorów:

Gayane Martirosian

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Centrum Biostruktury AM

ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa

tel./fax: (0-prefiks-22) 629-52-82, e-mail: gmartir@ib.amwaw.edu.pl

Katedra i Zakład Mikrobiologii Śląskiej Akademii Medycznej

ul. Medyków 18, 40-752 Katowice

tel./fax: (0-prefiks-32) 252-60-75, e-mail: gmartir@slam.katowice.pl

Adam Szczęsny

II Zakład Anestezjologii i Intensywnej Terapii SP CSK AM

ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa

tel. (0-prefiks-22) 658-2378, fax: (0-prefiks-22) 668-84-70