

EPIDEMIE OSPEDALIERE DI DIARREA DA *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*: DIMOSTRAZIONE DI INFEZIONE CROCIATA MEDIANTE TECNICHE DI TIPIZZAZIONE

M. CERQUETTI (a), A. PANTOSTI (a), G. GENTILE (b), F. D'AMBROSIO (a) e P. MASTRANTONIO (a)

(a) Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica; (b) Laboratorio di Ultrastrutture, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto. - Sono stati studiati due episodi epidemici di diarrea associata ad antibiotici (AAD) da *Clostridium difficile* avvenuti in reparti di chirurgia generale di due distinti ospedali. Inoltre, è stato effettuato uno studio sulla presenza e la circolazione del *C. difficile* in un reparto di neurochirurgia di un terzo ospedale. I ceppi di *C. difficile* isolati dai pazienti e dall'ambiente sono stati tipizzati mediante test di sensibilità agli antibiotici ed elettroforesi su gel di poliacrilamide (SDS-PAGE) di proteine EDTA-estraiibili. La maggior parte dei ceppi isolati nell'ambito di ciascun reparto ospedaliero ha evidenziato un pattern di sensibilità agli antibiotici ed un profilo proteico simile, avvalorando l'ipotesi di un'acquisizione e trasmissione ospedaliera di *C. difficile*.

Summary (Hospital outbreaks of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: demonstration of cross-infection by typing methods). - Two hospital outbreaks of *Clostridium difficile* diarrhoea in two general surgery units of different hospitals are described. Moreover, the results of a study on the circulation of *C. difficile* in a neuro-surgery unit following two cases of colitis are reported. *C. difficile* strains isolated from patients and environment have been typed using antimicrobial susceptibility testing and electrophoretic profiles of EDTA-extracted proteins. The majority of strains isolated in each hospital shared the same protein profile and the same pattern of antibiotic susceptibility. This provides strong evidence of cross-infection and hospital acquisition of *C. difficile*.

Introduzione

Il *Clostridium difficile* è stato riconosciuto negli ultimi anni quale agente eziologico della colite pseudomembranosa (CPM) nonché di molti casi di diarrea associata all'uso di antibiotici (AAD) [1, 2].

C. difficile viene isolato raramente (0-3%) dal tratto gastrointestinale della popolazione normale, con l'unica eccezione dei neonati asintomatici nelle cui feci il microrganismo è presente in alta percentuale (30-75%) [3].

Non è ancora stato definitivamente chiarito se la patologia enterica conseguente all'uso di antibiotici sia cau-

sata da una modificazione della flora intestinale normale in grado di facilitare la sovraccrescita di un germe già presente nell'intestino oppure se tale modificazione faciliti un'infezione di provenienza esogena.

Alcune segnalazioni di piccole epidemie ospedaliere sembrerebbero avvalorare quest'ultima ipotesi suggerendo una diffusione intraospedaliera di *C. difficile* [4, 5].

Lo studio epidemiologico della patologia da *C. difficile*, così come quello di tutti i patogeni intestinali presenti anche in individui sani, trae grande vantaggio dalla possibilità di riconoscere diversi tipi nell'ambito della specie.

Infatti, studi riguardanti la cross-infezione ospedaliera hanno utilizzato differenti schemi di tipizzazione al fine di dimostrare la presenza di un medesimo ceppo di *C. difficile* circolante tra pazienti ed ambiente [6, 7].

Nel presente lavoro sono stati osservati tre episodi epidemici ospedalieri di AAD da *C. difficile* avvenuti nel centro e nel nord Italia.

I ceppi di *C. difficile* isolati nel corso di tali studi sono stati tipizzati raffrontando i pattern di sensibilità agli antibiotici e i profili proteici ottenuti mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide (SDS-PAGE) di proteine di superficie EDTA-estraiibili.

Materiali e metodi

Pazienti

Sono stati effettuati studi su pazienti con AAD nel corso di due focolai epidemici verificatisi in due distinti ospedali: ospedale A e B, rispettivamente nelle regioni Veneto e Lazio.

Il primo focolaio epidemico osservato nell'ospedale A ha interessato dieci pazienti uomini degenti in un reparto di chirurgia generale; sono stati esaminati cinque campioni fecali appartenenti a cinque pazienti coinvolti nell'episodio.

Il secondo focolaio epidemico avvenuto nell'ospedale B ha coinvolto dieci pazienti donne degenti in un reparto di chirurgia generale. Tale episodio è stato preceduto da un caso accertato di CPM e da un caso di AAD verificatisi nella sezione uomini dello stesso reparto.

Il personale infermieristico era comune nelle due sezioni del reparto. Per ciascun paziente, compresi i due della sezione uomini, è stato esaminato un singolo campione fecale.

Inoltre, è stato condotto uno studio sulla circolazione di *C. difficile* in un reparto di neurochirurgia di un ospedale del Lazio, ospedale C, in seguito al verificarsi di un caso di CPM (diagnosticato solo al momento dell'autopsia) e di un caso di AAD.

Tale studio, effettuato per un periodo di 2 mesi, ha interessato complessivamente quarantatre pazienti, compreso il paziente affetto da AAD. Da questi sono stati prelevati, a scadenze fisse, sessantatre campioni di feci.

Infine sono stati studiati tre casi di AAD verificatisi nel medesimo reparto in un periodo successivo, a distanza di circa sei mesi.

Ambiente

Contemporaneamente, sono stati effettuati studi ambientali negli ospedali B e C. La ricerca di *C. difficile* nell'ambiente, effettuata mediante tamponi imbibiti con soluzione fisiologica, ha interessato le zone attigue al letto dei malati (pavimento, pareti, comodini, sedie), le medicherie, la stanza rifiuti smaltitoio, nonché gli oggetti d'uso (padelle, vasi da notte, sonde rettali). In una unica occasione sono state inoltre esaminate le mani degli infermieri mediante impronta diretta su terreno selettivo.

Ricerca ed identificazione di *C. difficile*

I ceppi di *C. difficile* sono stati isolati mediante semina dei campioni fecali e dei tamponi ambientali su terreno selettivo cicloserina-cefoxitina-fruttosio-agar (CCFA) [8], contenente acido p-idrossi-fenil-acetico (0,1%) ed incubazione in camera anaerobia a 37 °C per 5 gg.

Il *C. difficile* è stato identificato mediante osservazione della tipica morfologia di colonia e analisi gas-cromatografica dei suoi prodotti di fermentazione. La presenza nella piastra d'isolamento del particolare odore del p-creosolo, sintetizzato dal precursore acido p-idrossi-fenilacetico, costituisce un valido ausilio per un'identificazione preliminare del germe [9]. La gas-cromatografia evidenzia picchi di acidi grassi volatili tra i quali è caratteristico l'acido isocaproico [10].

Test di citotossicità

La ricerca della citotossina di *C. difficile* nelle feci dei pazienti è stata effettuata saggiando gli estratti fecali su cellule Hep-2. I campioni fecali sono stati sospesi in tampone fosfato salino 0,01 M e quindi centrifugati a 15.000 g x 15 min. I supernatanti, filtrati attraverso filtri 0,45 µm, sono stati testati su cellule cresciute in

piastre per microtitolo (5.000 cellule/pozzetto) ed incubate per 24 h a 37 °C in 5% CO₂. L'arrotondamento di almeno il 90% delle cellule, neutralizzato dal siero immune anti-*C. difficile* (VPI), è stato considerato positivo per la presenza della citotossina.

Analogamente è stata saggiata la produzione *in vitro* di citotossina dopo crescita del ceppo in esame in Robertson Cook Meat addizionato del 5% di glucosio [11].

Test di sensibilità agli antibiotici

I test di sensibilità agli antibiotici sono stati effettuati secondo il metodo della diffusione in agar modificato da Sutter *et al.* [12].

Sono stati saggiati antibiotici verso i quali, in studi precedenti, ceppi diversi di *C. difficile* hanno dimostrato avere differente sensibilità [13]; sono stati utilizzati dischetti di: clindamicina (8 µg), tetraciclina (30 µg), eritromicina (30 µg), cloramfenicolo (30 µg), rifampicina (30 µg).

Analisi elettroforetica delle proteine mediante SDS-PAGE

La preparazione degli estratti proteici da sottoporre ad elettroforesi è stata effettuata secondo il metodo di Poxton *et al.* [14].

I ceppi di *C. difficile* isolati sono stati coltivati in camera anaerobia (microflow anaerobic system-M.D.H.) a 37 °C per 24 h in 100 ml di brodo con peptone-estratto di lievito. La coltura è stata centrifugata a 20.000 g x 8 min; le cellule del pellet, lavate due volte con tampone fosfato salino pH 7,4, sono state trattate a 45 °C con una soluzione tampone fosfato salino-EDTA 10 mM per 30 min.

Il contenuto proteico degli estratti ottenuti è stato misurato mediante Bio-Rad Protein Assay. I medesimi estratti proteici (100 µg/campione) sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di poliacrilamide al 10% (SDS-PAGE) [14] utilizzando il sistema tampone di Laemmli [15]. I gel di poliacrilamide sono stati colorati con Coomassie bleu.

Risultati

In tutti i pazienti con AAD esaminati negli ospedali A e B è stato isolato dalle feci *C. difficile*.

Nel caso dell'ospedale A sono stati analizzati campioni provenienti da cinque pazienti le cui caratteristiche, unitamente ai risultati dello studio, sono riportate in Tab. 1.

I diversi ceppi di *C. difficile* hanno mostrato uguale resistenza agli antibiotici testati ed un identico profilo proteico denominato elettroferotipo II in base a studi precedenti [16].

In Tab. 2 sono riassunte le caratteristiche dei pazienti ed i risultati relativi allo studio effettuato nell'ospedale B.

Tabella 1. - Ospedale A: caratteristiche dei pazienti e tipizzazione dei ceppi isolati

Pazienti	Sesso	Età	Malattia di base	Antibiotici somministrati	Citotossina feci	<i>C. difficile</i>		
						Tossina	Sensibilità	Elettroferotipo
1	M	56	Pancreatite acuta	Ampicillina + Dicloxacillina	-	+	R	II
2	M	68	Pancreopatia	Cefazolina + Gentamicina	+	+	R	II
3	M	72	Ascesso subfrenico	N.C.	+	+	R	II
4	M	48	Ulcera duodenale	Ampicillina + Dicloxacillina + Cefoxitina	+	+	R	II
5	M	74	Carcinoma gastrico	Cefoxitina	+	+	R	II

N.C.: Non conosciuti

R: Resistenti agli antibiotici testati

Tabella 2. - Ospedale B: caratteristiche dei pazienti e tipizzazione dei ceppi isolati

Pazienti	Sesso	Età	Malattia di base	Antibiotici somministrati	Citotossina feci	<i>C. difficile</i>		
						Tossina	Sensibilità	Elettroferotipo
1 (*)	M	79	Carcinoma colon	Cefoxitina	N.E.	+	R	II
2 (*)	M	60	Calcolosi colecisti	Cefoxitina	N.E.	-	R/S	VI
3	F	52	Calcolosi colecisti	Clindamicina	N.E.	+	R	II
4	F	40	Calcolosi colecisti	Clindamicina	N.E.	+	R	II
5	F	23	Annessite	Cefotaxime	+	+	R	II
6	F	85	Carcinoma colon	Ampicillina	-	+	R	II
7	F	53	Occlusione intestinale	Cefotaxime	+	+	R	II
8	F	66	Metastasi epatiche	Cefoxitina	+	+	R	II
9	F	54	Calcolosi colecisti	Ceftriaxone	+	+	R	II
10	F	32	Calcolosi colecisti	Clindamicina	+	+	R	II
11	F	86	Idatidosi epatica	Ceftriaxone	N.E.	+	R	I
12	F	32	Calcolosi colecisti	Ampicillina	N.E.	+	S	VII
Mano sinistra infermiere 1						+	R	II
Mano destra infermiere 1						+	R	II
Smaltitoio						+	R	II
Pavimento stanza smaltitoio						+	R	II
Padelle						+	S	VII
Vasi notte						+	R	II
Sonde rettali						+	R	II
Acqua lavaggio padelle						+	R	I

N.E.: Non eseguita

R: Resistente agli antibiotici testati

S: Sensibile agli antibiotici testati

R/S: Sensibile solo a tetraciclina e rifampicina

(*) Paziente ricoverato in una diversa sezione dello stesso reparto

La maggior parte dei ceppi isolati dai pazienti ha mostrato uniforme resistenza agli antibiotici; solo i ceppi isolati dai pazienti n. 2 e n. 12 hanno evidenziato un diverso pattern di sensibilità.

L'elettroforesi ha evidenziato un elettroferotipo identico in nove dei pazienti interessati, analogo a quello già osservato nell'ospedale A (elettroferotipo II).

I ceppi di *C. difficile* isolati dai pazienti n. 2, 11 e 12, invece, erano caratterizzati da elettroferotipi diversi, denominati rispettivamente VI, I e VII.

Nella medesima tabella sono riportati i risultati relativi allo studio ambientale contemporaneamente condotto.

Le colture effettuate nelle zone attigue al letto dei malati e nella medicheria sono risultate negative. Si sono ottenute, invece, colture positive dalle mani di un infermiere, dallo smaltitoio, dal pavimento della stanza smaltitoio e da alcuni oggetti d'uso. Contaminata da *C. difficile* si è rivelata anche l'acqua utilizzata per il lavaggio di tali oggetti.

L'elettroferotipo maggiormente presente è risultato quello stesso elettroferotipo II già evidenziato ripetutamente tra i ceppi isolati dai pazienti e perciò definibile come "epidemico".

Due ceppi isolati da una padella e dall'acqua di lavaggio hanno mostrato un profilo elettroferotico diverso, ma simile a quello dei ceppi isolati rispettivamente dai pazienti n. 12 e n. 11.

In Tab. 3 sono riportate le caratteristiche dei pazienti positivi per il *C. difficile* (sei su quarantatre) ed i risul-

tati relativi allo studio di sorveglianza effettuato presso l'ospedale C; nella medesima tabella i dati riguardanti i pazienti n. 7, 8 e 9 si riferiscono ad un limitato focolaio di casi di AAD verificatosi successivamente.

Il paziente n. 1 costituiva il "caso indice", ovvero il caso di AAD da cui ha avuto inizio lo studio di sorveglianza.

In tempi diversi dai restanti cinque pazienti (n. 2-6) sono stati isolati uno o più ceppi di *C. difficile*; nella tabella vengono riportati i dati relativi ad un solo ceppo per paziente, essendo i diversi ceppi isolati da uno stesso paziente risultati uguali rispetto ai test di tipizzazione effettuati.

Solo un ceppo, isolato da un bambino, (paziente n. 3) si è mostrato diverso in quanto sensibile agli antibiotici saggiati e caratterizzato dall'elettroferotipo V; tutti gli altri ceppi appartenevano invece all'elettroferotipo I (Fig. 1).

Lo studio ambientale ha evidenziato cinque campioni positivi, reperiti in giorni diversi, relativi al pavimento della stanza smaltitoio e alle padelle (Tab. 3); i ceppi isolati appartenevano tutti al medesimo tipo elettroferotico predominante tra i ceppi dei pazienti (tipo I).

Lo studio dei ceppi isolati dai pazienti n. 7, 8 e 9, coinvolti nella piccola epidemia occorsa successivamente, ha evidenziato una uniforme resistenza agli antibiotici e l'appartenenza ad un profilo proteico, elettroferotipo II, diverso da quello predominante nel medesimo ospedale nei mesi precedenti.

Tabella 3. - Ospedale C: caratteristiche dei pazienti e tipizzazione dei ceppi isolati

Pazienti	Sesso	Età	Malattia di base	Antibiotici somministrati	Citotossina feci	<i>C. difficile</i>		
						Tossina	Sensibilità	Elettroferotipo
1	F	49	Meningioma	Ceftazidime	N.E.	+	R	I
2	F	73	Meningioma	Ceftazidime + Cloramfenicolo	N.E.	+	R	I
3	M	7	Craniostenosi	Entromicina	N.E.	-	S	V
4	F	47	Aneurisma carotideo	Ampicillina	N.E.	+	R	I
5	F	19	Shunt infetto	Teicoplanina + Gentamicina	N.E.	+	R	I
6	F	43	Adenoma ipofisario	Cefotaxime + Cotrimoxazolo	N.E.	+	R	I
7 (*)	F	62	Meningioma	Cloramfenicolo	+	+	R	II
8 (*)	F	58	Glioblastoma	Ceftazidime + Tobramicina	+	+	R	II
9 (*)	F	69	Glioblastoma	Ceftazidime + Tobramicina	+	+	R	II
Pavimento stanza smaltitoio (3 ceppi)						+	R	I
Padelle (2 ceppi)						+	R	I

N.E.: Non eseguita

R: Resistente a tutti gli antibiotici testati

S: Sensibile a tutti gli antibiotici testati

(*) Epidemia successiva alla prima indagine (vedi testo)

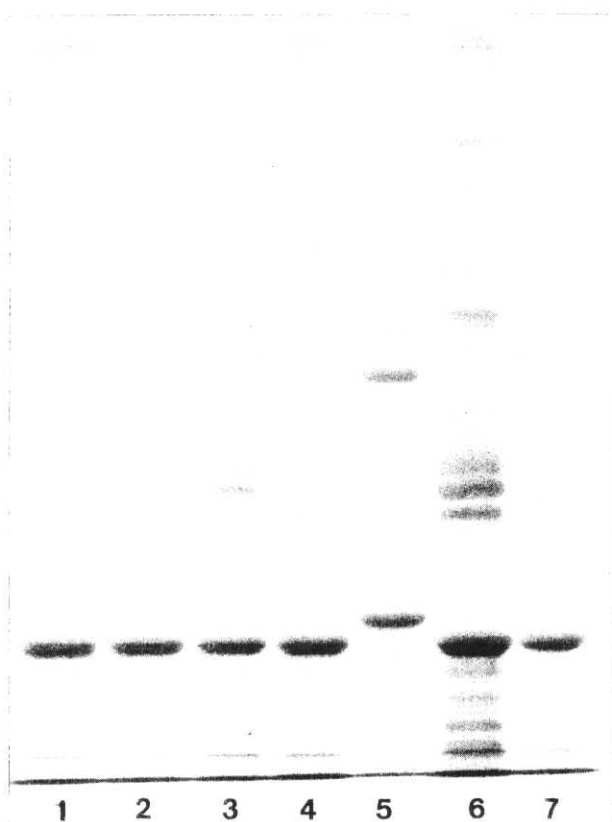


Fig. 1. - Pattern elettroforetici di ceppi di *C. difficile* isolati dall'ospedale C. I ceppi in posizione n. 1-2-3-4-6-7 mostrano lo stesso profilo proteico (gruppo I). Il ceppo in posizione n. 5 ha un diverso profilo (gruppo V).

Discussione e conclusioni

In letteratura sono stati riportati numerosi studi riguardanti piccoli episodi epidemici ospedalieri di AAD o CPM sostenuti da *C. difficile*. Tali studi hanno interessato pazienti degenti in reparti diversi (chirurgia, oncologia, ortopedia, ostetricia, dialisi, lungo-degenti, neonatologia) suggerendo, tra l'altro, misure d'intervento appropriate per limitare l'eventuale diffusione intraospedaliera di *C. difficile* [4, 17-22].

Recentemente sono stati condotti diversi studi in cui, accanto alla ricerca microbiologica ed epidemiologica, si è tentata la caratterizzazione dei ceppi di *C. difficile* isolati mediante varie tecniche di tipizzazione [6, 7, 19, 21].

I metodi di tipizzazione usati comprendono i test di sensibilità agli antibiotici, l'analisi del DNA plasmidico, l'elettroforesi di proteine cellulari solubili ed EDTA-

estraibili oppure marcate con metionina radioattiva, la tipizzazione sierologica mediante agglutinazione [6, 7, 14, 23].

Nel presente studio due di tali metodi di tipizzazione, quali la sensibilità agli antibiotici e la separazione elettroforetica di proteine EDTA-estraibili, sono stati utilizzati per verificare l'ipotesi di una circolazione, in ciascun ospedale, di un unico ceppo tra la maggior parte dei pazienti studiati. I risultati ottenuti, confrontando i pattern elettroforetici dei ceppi isolati, sembrano confermare questa ipotesi.

Negli ospedali B e C, la circolazione di *C. difficile* sembra anche dimostrata dal ritrovamento nell'ambiente di ceppi caratterizzati da un profilo elettroforetico simile a quello dei pazienti. I ceppi ambientali sono stati isolati dalla stanza rifiuti smaltitoio e dal materiale d'uso in essa presente; inoltre, nell'ospedale C le mani di un infermiere sono risultate contaminate da *C. difficile*.

Il *C. difficile* sembra essere, quindi, presente nell'ambiente, là dove sia possibile una contaminazione fecale diretta. La ricerca di *C. difficile* nell'ambiente non è stata effettuata utilizzando terreni di arricchimento come da alcuni suggerito [21]; permane, quindi, il dubbio che la presenza del microrganismo possa essere stata sottovalutata.

Rispetto a un possibile ruolo dell'ambiente nella trasmissione di *C. difficile* va notato che alcuni degli oggetti risultati contaminati (padelle, sonde rettali) erano puliti e pronti per l'uso.

Nel caso degli ospedali B e C norme adeguate d'igiene e opportune disinfezioni con sostanze sporicide (glutaraldeide attivata) sono state sufficienti ad interrompere la cross-infezione.

Relativamente ai metodi di tipizzazione utilizzati, i risultati ottenuti confermano l'utilità del metodo elettroforetico, in grado di rilevare differenze tra ceppi anche laddove la sensibilità agli antibiotici risulti uguale.

Concludendo, i dati in nostro possesso sembrano avvalorare l'ipotesi di un'acquisizione e di una trasmissione ospedaliera del *C. difficile*.

Il verificarsi di casi di diarrea in pazienti ospedalizzati, soprattutto se degenti in reparti di chirurgia e sottoposti a terapia antibiotica, dovrebbe sempre far avanzare il sospetto di una infezione da *C. difficile*, patologia enterica rivelatasi tra le più frequenti in ambito ospedaliero. Essendo la presenza ambientale del microrganismo limitata prevalentemente a zone con contaminazione fecale diretta, sarebbe auspicabile, per la prevenzione di eventuali epidemie ospedaliere, operare un isolamento enterico dei pazienti con diarrea da *C. difficile*.

Ricevuto il 15 luglio 1988.

Accettato il 20 dicembre 1988.

BIBLIOGRAFIA

- BARTLETT, J. 1979. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Rev. Infect. Dis.* 1: 530-539.
- BORRIELLO, S.P. 1984. *Antibiotic associated diarrhoea and colitis*. Martinus Nijhoff Publishers, Boston.
- GEORGE, R.H. 1986. The carrier state: *Clostridium difficile*. *J. Antimicrob. Chemother.* 18(Suppl. A): 47-58.
- ABEYESUNDERE, R.L. 1982. A ward outbreak of *Clostridium difficile* enterocolitis. *J. Infect.* 5: 211-282.

5. FEKETY, R., KIM, K.-H., BROWN, D., BATTS, D.H., CUDMORE, M. & SILVA, J. Jr. 1981. Epidemiology of antibiotic-associated colitis: isolation of *Clostridium difficile* from the hospital environment. *Am. J. Med.* **70**: 906-908.
6. DELMEE, M., HOMEL, M. & WAUTERS, G. 1985. Serogrouping of *Clostridium difficile* strains by slide agglutination. *J. Clin. Microbiol.* **21**: 323-327.
7. TABAQCHALI, S., O' FARREL, S., HOLLAND, D. & SILMAN, R. 1984. Typing scheme for *Clostridium difficile*: its application in clinical and epidemiological studies. *Lancet* **1**: 935-938.
8. GEORGE, W.L., SUTTER, V.L., CITRON, D. & FINEGOLD, S.M. 1979. Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* **9**: 214-219.
9. PHILLIPS, K.D. & ROGERS, P.A. 1981. Rapid detection and presumptive identification of *Clostridium difficile* by p-cresol production and selective medium. *J. Clin. Pathol.* **34**: 642-644.
10. HOLDEMAN, L.V., CATO, E.P. & MOORE, W.E.C. 1977. *Anaerobe laboratory manual*, 4th ed. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia.
11. GIANFRILLI, P., LUZZI, I., PANTOSTI, A., OCCHIONERO, M., GENTILE, G. & PANICHI, G. 1984. Citotoxin and enterotoxin production by *Clostridium difficile*. *Microbiologica* **7**: 375-379.
12. SUTTER, V.L., CITRON, D.M. & FINEGOLD, S.M. 1980. *Wadsworth anaerobic bacteriology manual*, 3th ed. The C.V. Mosby company, St. Louis.
13. GIANFRILLI, P., LUZZI, I., PANTOSTI, A. & OCCHIONERO, M. 1984. *In vitro* susceptibility of *Clostridium difficile* isolates to 12 antimicrobial agents. *Chemioterapia* **3**: 41-44.
14. POXTON, I.R., ARONSSON, B., MOLLBY, R., NORD, C.E. & COLLEE, J.G. 1984. Immunochemical fingerprinting of *Clostridium difficile* strains isolated from an outbreak of antibiotic-associated colitis and diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* **17**: 317-342.
15. LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
16. CERQUETTI, M., PANTOSTI, A., CARDINES, R. & MASTRANTONIO, P. 1987. Tipizzazione di ceppi di *Clostridium difficile* isolati in Italia mediante l'uso di SDS-PAGE. In: *Nuove tecniche e strumentazioni applicate alla ricerca e alla diagnostica in microbiologia*. A. Visconti & C. Morini (Eds). Associazione Microbiologi Clinici Italiani. pp. 107-110.
17. ARSURA, E.L., FAZIO, R.A. & WICKREMESINGHE, P.C. 1985. Pseudomembranous colitis following prophylactic antibiotic use in primary cesarean section. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **151**: 87-89.
18. BENDER, B.S., BENNETT, R., LAUGHON, B.E., GREENOUGH III, W.B., GAYDOS, C., SEARS, S.D., FORMAN, M.S. & BARTLETT, J.G. 1986. Is *Clostridium difficile* endemic in chronic-care facilities? *Lancet* **2**: 11-13.
19. CUMMING, A.D., THOMSON, B.J., SHARP, J., POXTON, I.R. & FRASER, A.G. 1986. Diarrhoea due to *Clostridium difficile* associated with antibiotic treatment in patients receiving dialysis: the role of cross infection. *Br. Med. J.* **292**: 238-239.
20. GERDING, D.N., OLSON, M.M., PETERSON, L.R., TEASLEY, D.G., GEBHARD, R.L., SCHWARTZ, M.L. & LEE, J.T. 1986. *Clostridium difficile*-associated diarrhoea and colitis in adults. A prospective case-controlled epidemiologic study. *Arch. Intern. Med.* **146**: 95-100.
21. HEARD, S.R., O' FARRELL, S., HOLLAND, D., CROOK, S., BARNETT, M.J. & TABAQCHALI, S. 1986. The epidemiology of *Clostridium difficile* with use of a typing scheme: nosocomial acquisition and cross-infection among immunocompromised patients. *J. Infect. Dis.* **153**: 159-162.
22. MANSO, E., STRUSI, P., STACCHIOTTI, M.A., VINCENZI, R., TIRIDUZZI, M. & DEL PRETE, U. 1986. Incidenza e origine di *Clostridium difficile* in neonatologia. *Boll. Ist. Sieroter. Milan.* **65**: 118-124.
23. WUST, J., SULLIVAN, N.M., HARDEGGER, U. & WILKINS, T.D. 1982. Investigation of an outbreak of antibiotic-associated colitis by various typing methods. *J. Clin. Microbiol.* **16**: 1096-1101.