

1/262
2 y 2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**Clostridium difficile Y SU PARTICIPACION EN LA COLITIS
INDUCIDA POR ANTIBIOTICOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS**

P R E S E N T A

ROBERTO MANUEL CEDILLO RIVERA

CIUDAD UNIVERSITARIA, MEXICO, D. F.

1986

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E .

	<u>PAGINA</u>
ANTECEDENTES	
ETIOLOGIA, PATOGENIA, INCIDENCIA.....	3 - 7
- TABLAS I A III.....	8 - 10
MANIFESTACIONES CLINICAS.....	11
DIAGNOSTICO.....	12 - 14
- TABLAS IV A VI.....	15 - 17
TRATAMIENTO.....	18 - 20
PRONOSTICO.....	21
JUSTIFICACION DEL PRESENTE TRABAJO.....	22
MATERIAL Y METODOS.....	23 - 26
RESULTADOS.....	27 - 29
- TABLAS VII A X.....	30 - 33
DISCUSION.....	34 - 38
CONCLUSIONES.....	39
RESUMEN.....	40
BIBLIOGRAFIA.....	41 - 46

Dedicatorias y agradecimientos:

A Elizabeth, mi esposa, y a Natalia, mi hija

Con amor

A mis padres María y Manuel †

Con agradecimiento

A mis hermanos:

Lilia

José Manuel

Mario

Arturo

María Elena

Con cariño

ETIOLOGIA, PATOGENIA, INCIDENCIA.

La colitis inducida por antibióticos es una complicación frecuente en el tratamiento de las enfermedades infecciosas (1-5), puede provocar diferentes manifestaciones, desde diarrea moderada hasta la forma grave de colitis pseudomembranosa (CPM) de evolución ocasionalmente fatal (1-8).

La colitis pseudomembranosa se conoce desde la era preantibiótica. La mayoría de los casos se relacionaban con cirugía abdominal (4); sin embargo, a partir de 1950 hay pocos casos publicados secundarios a cirugía y en cambio se incrementaron los informes de casos relacionados con los antimicrobianos (1-8), los primeros de estos fueron tetraciclina y cloranfenicol (9,10).

Por muchos años permaneció la incógnita del mecanismo por el cual éstos provocaban diarrea o colitis. La primera explicación patogénica se relacionó con un sobrecrecimiento en heces de S. aureus (11,12), y aunque probablemente es otra causa de diarrea asociada a los antimicrobianos, se considera ahora como una entidad rara, la cual tiene alteraciones principalmente en ileon y yeyuno y no en colon (13). Se investigaron otros factores posiblemente relacionados con la patogenia de la colitis como la participación de virus, insuficiencia vascular en intestino, sales biliares y metabolitos de los mismos antibióticos, sin lograr demostrarse (4,14,15).

En 1977 Larson y col., descubrieron una toxina en las heces de pacientes con CPM inducida por antibióticos, que produce efecto citotóxico en células de cultivo de tejidos (16). Rifkin y col., demostraron que este efecto citotóxico es inhibido por antitoxina de Clostridium sordellii (17). -

Diversos grupos de investigadores y en especial Bartlett pudieron reproducir la enfermedad en hamsters al administrarles clindamicina, y después re producirla en otros hamsters al suministrarles un filtrado acelular de heces de los primeros; se observó que además si este filtrado se inyecta intraperitonealmente se producía peritonitis, hemorragia abdominal y muerte. De los cultivos de heces de estos animales se lograron aislar varias especies de clostridios y nuevamente se logró reproducir la enfermedad, inyectando intracecalmente el sobrenadante estéril de estos cultivos (18-21). Estudios posteriores identificaron a Clostridium difficile como productor de una toxina que directamente es la causante de la CRM. Se ha descartado que C. sordellii intervenga en la etiología de la enfermedad y el hecho de que su antitoxina neutralice el efecto citotóxico causado por la toxina de C. difficile se debe a la semejanza estructural que existe entre ambas toxinas (22-24).

Con los experimentos anteriores se cumplieron los postulados de Koch y actualmente se acepta que la colitis inducida por antibióticos es producida en la mayoría de los casos de su forma pseudomembranosa y en cuando menos un tercio de sus formas menos graves por la o las toxinas de C. difficile (25). C. difficile es un bacilo anaeróbico gram positivo que produce dos o más exotoxinas, las cuales son liberadas al medio cuando se lisa la célula.

La toxina inicialmente descubierta es termolábil, se inactiva a un pH de 4 y 9, incrementa la permeabilidad vascular, produce ileotiflitis en hamsters cuando se inyecta intracecalmente e inicialmente se calculó que tenía un peso molecular aproximado de 530,000 y se observó que estaba compuesta

de dos subunidades; produce efecto citotóxico en células de cultivos de tejidos, especialmente en las de riñón de hamster, fibroblastos humanos y de ratón y células amnióticas humanas. Su mecanismo de acción al parecer se relaciona con la estimulación de la actividad de la guanil ciclase (22,24, 26). Posteriormente Taylor y col, (27) identificaron dos tipos de toxinas de C. difficile con diferentes propiedades inmunológicas, físicas y biológicas. La toxina A tiene principalmente un efecto secretor (enterotoxina), mientras que la toxina B es más citotóxica, aunque ambas son letales en animales de experimentación. La mayoría de las cepas producen las dos toxinas y aparentemente ambas están involucradas en la patogénesis de la enfermedad (28-30), aunque se desconoce si alguna de ellas participa más que la otra. Existe un tercer factor que aún no ha sido bien caracterizado y que podría tener un efecto mioeléctrico y, por lo tanto, afectar la actividad motora intestinal (31).

En la tabla I se muestran los antimicrobianos que han sido relacionados con la colitis por antibióticos (1-5, 9, 32-38). De ellos, la clindamicina, la ampicilina y las cefalosporinas, son los que se han referido más frecuentemente (1-5,32). Al parecer los antimicrobianos por vía oral causan con más frecuencia la colitis que por vía parenteral (1). En base a lo señalado anteriormente se ha sugerido la siguiente hipótesis: los antibióticos que alcanzan concentraciones suficientes en colon para inhibir el crecimiento de las bacterias anaeróbicas en general, pero no de C. difficile en particular, son los principalmente responsables del sobrecrecimiento de este microorganismo y, por lo tanto, de la producción de grandes cantidades de toxina; sin embargo, llama la atención que in vitro este microorganismo es sensible a gran parte de los antibióticos que se han asociado con

CPM y se ha especulado que la imposibilidad para erradicarlo puede estar - condicionado por su capacidad para esporular (3). La frecuencia de diarrea en adultos, secundaria al empleo de clindamicina es de un 20% y secundaria a la ampicilina de un 15% aproximadamente. La frecuencia de CPM secundaria a clindamicina es de un 2% y después de ampicilina es menor de 1% (2). En las mujeres y después de los 60 años, estos porcentajes son aún mayores. - En niños la frecuencia de diarrea y CPM secundaria a clindamicina es mucho menor; Randolph encontró que sólo el 2.6% de un grupo de 1,484 niños a quienes se administró clindamicina, desarrollaron diarrea; ninguno de ellos tuvo CPM (39).

En general se ha observado que para que se presente la colitis producida por las toxinas de C. difficile es necesario que exista un factor desencadenante que en la mayoría de los casos es un antimicrobiano, que permita el sobrecrecimiento del germen; sin embargo, se han informado casos de CPM por C. difficile en pacientes que no han recibido antibióticos y en quienes fueron otros factores como la cirugía abdominal, los probables responsables de la misma, e incluso puede presentarse sin un factor predisponente evidente (4,40-42). Esto también explica el por qué recientemente se ha relacionado a C. difficile con exacerbaciones de otros tipos de enfermedades inflamatorias del intestino como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerativa crónica inespecífica, sin antecedente de haber recibido antimicrobiano (43,44).

Se ha postulado que para que pueda haber colitis secundaria a C. difficile además de estar disminuida la flora aeróbica o anaeróbica normal se necesita que exista este germen en el colon del individuo, o bien que lo adquiriera del medio ambiente (45).

La frecuencia de portadores sanos de C. difficile varía de cero a cuatro - por ciento en los adultos (13,25); sin embargo, en los niños sanos menores de un año la colonización intestinal por este germen es más frecuente y en recién nacidos llega a ser de 10 hasta un 50% (tablas II y III) (46,47).

El mecanismo exacto de transmisión no se conoce, pero el germen o sus esporas se han encontrado en las manos y heces del personal sano del hospital y en pisos o muebles del mismo y se han informado de brotes epidémicos en hospitales probablemente porque hay infecciones cruzadas con el microorganismo (45,48).

TABLA I

ANTIMICROBIANOS ASOCIADOS A COLITIS PSEUDOMEMBRANOSA*

PENICILINA	CLORANFENICOL
AMPICILINA	METRONIDAZOL
AMOXICILINA	TRIMETOPRIM-SULFAMETOXAZOL
DICLOXACILINA	ERITROMICINA
LINCOMICINA	ESPIRAMICINA
CLINDAMICINA	RIFAMPICINA
CEFALOSPORINAS	AMINOGLUCOSIDOS ORALES
TETRACICLINA	IMIPENEM

* VER REFERENCIAS:

1 - 5

9

32 - 38

TABLA II

FRECUENCIA DE LA TOXINA DE Clostridium difficile EN NEONATOS

	No.	%
NORMALES	11/105	10.5
PACIENTES DE LA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS NEONATALES	28/51	54.9

Donta, ST, Myers MG. J Pediatr 1982; 100: 431-434

TABLA III
 INCIDENCIA DE Clostridium difficile EN EL COLON
 DE NIÑOS Y ADULTOS

EDAD (AÑOS)	No. DE INDIVIDUOS ESTUDIADOS	No. DE CULTIVOS POSITIVOS DE <u>C. difficile</u>
< 1	13	7
1	10	3
2	17	1
3	12	0
4	8	0
20-40	28	1

Stark PL, Lee A, Parsonage BD. Infect Immun 1982;
35:895-899.

MANIFESTACIONES CLINICAS.

El cuadro clínico de la colitis inducida por antibióticos es muy variable. Se puede manifestar como diarrea solamente, como colitis inespecífica o como CPM. La mayoría de los casos corresponden al primer grupo (1,2). La enfermedad típicamente comienza cuatro a nueve días después de iniciado el antibiótico; sin embargo, se puede presentar hasta varias semanas después de haber suspendido el antimicrobiano (5). La diarrea habitualmente es líquida y profusa y en la tercera parte de los casos se presentan evacuaciones sanguinolentas (7). De acuerdo a la gravedad de la lesión colónica puede haber fiebre, dolor cólico abdominal, hematoquesia, megacolon, perforación intestinal o choque (5-7). En algunos casos el padecimiento se presenta inicialmente con fiebre sin una causa aparente y dolor abdominal leve sin diarrea (13).

En niños el cuadro clínico es similar, aunque en los casos graves se refieren más complicaciones: hiponatremia, hipoalbuminemia, acidosis metabólica, necrosis cortical renal y septicemia (49,50).

La mayoría de los pacientes pediátricos son escolares y adolescentes (49, 50). Los informes en lactantes son escasos, el niño más pequeño es el de un recién nacido de 10 días de edad (51).

DIAGNOSTICO.

El diagnóstico de CPM debe sospecharse ante la presencia de un cuadro clínico sugestivo, con el antecedente de estar recibiendo o haber recibido en forma reciente, uno de los antibióticos referidos en la tabla I. Deben excluirse otras posibilidades etiológicas mediante coprocultivo y coproparasitoscópico. Es frecuente encontrar leucocitosis con neutrofilia en sangre venosa periférica y leucocitos abundantes en el frotis del moco fecal (1-3, 13). El diagnóstico definitivo de la entidad se establece por la rectosigmoidoscopia. En ella se aprecia la mucosa colónica edematosa, hiperémica, friable, con ulceraciones superficiales y placas blancoamarillentas adosadas a la mucosa, de uno a cinco mm de diámetro (pseudomembranas) (5,7,8). Cuando el cuadro clínico es sugestivo y la mucosa colónica sólo se aprecia hiperémica y edematosa, es conveniente efectuar biopsia rectal para aclarar el diagnóstico (1,5,13). En ésta se pueden apreciar las pseudomembranas no visibles macroscópicamente por la endoscopia, las que se componen de leucocitos polimorfonucleares, fibrina y detritus celulares (5).

Se pueden observar además focos de necrosis epitelial y en la lámina propia infiltrado leucocitario. Si la mucosa en recto y sigmoides no muestran alteraciones, pero el cuadro clínico es muy sugestivo, se debe realizar una colonoscopia, ya que un 3% de los casos puede manifestar sólo lesiones en ciego y colon ascendente (52). Price resume las características clínicas y evolución en 29 pacientes con CPM (5) tabla IV.

Los pacientes con colitis por antibióticos pueden mostrar alteraciones radiológicas en el estudio de colon por enema baritado, pero este procedimiento puede ser peligroso por la posibilidad de perforación y sólo debe ser -

realizado en casos muy seleccionados (7,8).

Los estudios de laboratorio más importantes son: el cultivo de C. difficile y la detección de su toxina en las heces de los pacientes. En el 80 a 90 por ciento de los casos de CPM se encuentra a C. difficile y su toxina en heces (3,25), por lo que su positividad apoya el diagnóstico y puede ayudar a decidir qué enfermos ameritan tratamiento. Por el contrario, en los pacientes que tienen diarrea asociada con antibióticos y la rectosigmoidoscopia sólo revela edema e hiperemia de la mucosa colónica, la toxina sólo se detecta en el 38% de los casos y es difícil decir, en un caso en particular, si realmente C. difficile es el causante de la diarrea o si sólo se está detectando a un portador del germen que además tiene diarrea (25) tabla V.

George ofrece una guía para el análisis de las probabilidades de que C. difficile sea el causante de la colitis inducida por antibióticos (3) tabla VI.

El medio selectivo que se usa para cultivar C. difficile ha dado muy buenos resultados y se puede realizar en aquellos laboratorios que cuentan con cámaras de anaerobios. Detecta desde 100 bacterias por gramo de heces y los enfermos de CPM tienen habitualmente de 10^4 a 10^5 por gramo de heces (53).

La detección de la toxina de C. difficile se realiza mediante la apreciación de un efecto citopático del sobrenadante de las heces, sobre un cultivo de fibroblastos de ratón o alguna otra línea celular (25). Es necesario siempre demostrar inhibición del efecto citopático con antitoxina de C. difficile o C. sordellii puesto que la mitad de los casos de diarrea por antibióticos, tienen este efecto, en forma inespecífica (13). Por su dificultad

técnica, este método de detección de la toxina no se realiza en la mayoría de los laboratorios. Pruebas más sencillas y prácticas, como ELISA y contrainmunolectroforesis, están en desarrollo y parecen promisorias (54-57). La contrainmunolectroforesis ya ha sido utilizada, pero ha mostrado falsas positivas (56), lo mismo que la aglutinación con latex (58). Lysterly ha lo grado identificar y cuantificar la toxina A, en heces de pacientes con CPM, por el método de ELISA, sin necesidad de separar previamente las dos toxinas (55).

TABLA IV

EVOLUCION CLINICA DE 29 PACIENTES CON COLITIS
PSEUDOMEMBRANOSA, SEGUN PRICE

EDAD: 12 A 77 AÑOS
 PROMEDIO: 51 AÑOS
 11 HOMBRES Y 18 MUJERES

HISTORIA

SIN ANTECEDENTES DE ANTIBIOTICOTERAPIA	2
ANTIBIOTICOTERAPIA RECIENTE (HASTA 21 DIAS ANTES)	27

DIARREA

COMENZO DURANTE LA ANTIBIOTICOTERAPIA	19
DESPUES DE TERMINADA	10

DIARREA	25
ABDOMEN AGUDO	3
CAMBIOS EN EL HABITO INTESTINAL	1

HALLAZGOS SIGMOIDOSCOPIICOS (EN 21)

PLACAS BLANCO-AMARILLENTAS	14
ALTERACIONES INESPECIFICAS	6
NORMAL	1

ENFERMEDAD ASOCIADA

ENFERMEDAD GRAVE	6
POST-OPERATORIO DE CIRUGIA MAYOR	14
INFECCION BANAL	8
CASOS ORTOPEDICOS	6
SIN ENFERMEDAD ASOCIADA	1

EVOLUCION

FALLECIDOS (TODOS MAYORES DE 55 AÑOS)	8
SE RECUPERARON	21
COLECTOMIA EN 8 PACIENTES DE LOS CUALES 4 FALLECIERON	

TABLA V

CORRELACION ENTRE EL DIAGNOSTICO FINAL Y LOS RESULTADOS DE LA
 DETECCION DE LA TOXINA DE Clostridium difficile EMPLEANDO LA
 TECNICA DE CULTIVO DE TEJIDOS, SEGUN CHANG

D I A G N O S T I C O S	NUMERO DE PACIENTES	PORCENTAJE DE POSITIVOS
COLITIS PSEUDOMEMBRANOSA INDUCIDA POR ANTIBIOTICOS	53	96
DIARREA INDUCIDA POR ANTIBIOTICOS:		
COLITIS INESPECIFICA	16	38
SIGMOIDOSCOPIA NORMAL	15	20
SIN SIGMOIDOSCOPIA	34	15
ENFERMEDAD GASTROINTESTINAL NO ASOCIADA CON ANTIBIOTICOS	137	2
INDIVIDUOS SANOS:		
NEONATOS	82	2
ADULTOS	29	0

Chang TW, Laverman M, Bartlett JG.
 J Infect Dis 1979; 140: 765-770

TABLA VI

PROBABILIDADES DE QUE Clostridium difficile SEA EL CAUSANTE DE
LA DIARREA, SEGUN GEORGE WL.

	VISUALIZACION DE LA PSEUDOMEMBRANA LIMITADA A COLON	COLITIS INESPECIFICA O DIARREA SIN COLITIS
PRUEBA DE LA TOXINA Y CULTIVO DE <u>C. difficile</u> NEGATIVOS	PROBABLE	POSIBLE
CULTIVO POSITIVO DE <u>C. difficile</u>	MY PROBABLE	POSIBLE
PRUEBA DE LA TOXINA Y CULTIVO DE <u>C. difficile</u> POSITIVOS	DIAGNOSTICO	PROBABLE

George WL. West J Med 1980; 133: 115-123

TRATAMIENTO.

La mayoría de los pacientes con colitis por antibióticos que presentan un cuadro leve a moderado no necesitan de una terapia específica, ya que la diarrea cede en menos de una semana después de suspender el antibiótico y sólo es necesario reemplazar los líquidos y electrolitos perdidos (3). - En los casos graves causados por C. difficile el tratamiento de elección es la vancomicina por vía oral a una dosis de 125 a 250 mg cuatro veces - al día por 7 a 10 días, independientemente de la edad (59,60). La vancomicina se absorbe muy poco en tubo digestivo y, por lo tanto, administrada por esta vía no es tóxica y alcanza concentraciones muy elevadas en las evacuaciones (más de 500 ug/ml); el microorganismo es sensible generalmente a concentraciones menores de 5 ug/ml y nunca es resistente a 20 ug/ml (13).

En los enfermos graves, con complicación abdominal, debe administrarse por sonda nasogástrica o en casos de colostomía o ileostotomía, por las mismas, ya que por vía intravenosa no es de utilidad.

Los pacientes muestran mejoría clínica en 24 a 48 horas de tratamiento y la cantidad de toxina en heces disminuye y desaparece rápidamente. Si la toxina persiste en heces a pesar del tratamiento, es conveniente prolongar su administración, pues estos pacientes recaen frecuentemente (13, 59-63).

Otras opciones de tratamiento específico son la bacitracina (60,64), el metronidazol (60,65), el ácido fusídico (66) y la colestiramina (67,68). La primera puede ser una buena alternativa de la vancomicina, pero aún se necesitan estudios futuros para evaluar su utilidad y efectos tóxicos en este tipo de pacientes.

El metronidazol in vitro es un muy buen antimicrobiano contra C. difficile ya que la mayoría de las cepas son sensibles a concentraciones muy bajas - del mismo; sin embargo, tiene la desventaja para esta entidad, de que su - absorción en tubo digestivo es excelente y por ello alcanza muy bajas con- centraciones en la luz del colon. A pesar de ello, se ha referido como - efectiva a dosis de 500 mg tres veces al día (65). Sólo se ha estudiado - un número limitado de pacientes y es necesario ampliar su investigación en este campo y lo mismo se puede decir del ácido fusídico (66).

La colestiramina es una resina de intercambio iónico que aparentemente fija la toxina y evita su acción. También fija a la vancomicina, por lo que no es recomendable su asociación (69). Los primeros estudios con esta resina fueron alentadores, pero posteriormente se ha observado que sólo se presen- ta mejoría en aproximadamente la mitad de los casos. No inhibe el creci- miento de C. difficile. Su aplicación actual es sólo para los casos mode- rados (60). Otra opción terapéutica que se ha empleado es el uso de ene- mas de heces frescas de sujetos sanos con la idea de restaurar la flora - normal (70,71).

A pesar de un tratamiento específico adecuado se presentan recaídas al - suspenderlo en un 10 a 20% de los casos (60). Estas responden en forma - satisfactoria a la misma vancomicina por otros 10 días. Algunos pacientes presentan recurrencias a largo plazo en relación con la administración de algún nuevo antibiótico.

Los agentes antiperistálticos como el difenoxilato con atropina y la loper- ramida están contraindicados. Los esteroides no han mostrado ninguna uti- lidad (13,72).

El tratamiento en casos graves debe incluir el manejo de cada una de las complicaciones que se pueden presentar. Si se desarrolla megacolon tóxico o perforación, es necesario realizar ileostomía o colostomía y aplicar a través de ellas la vancomicina (59). La colectomía es cada vez menos frecuente con la suspensión oportuna del antibiótico que causó la colitis y el tratamiento específico. En aquellos pacientes en los que por su padecimiento de fondo o por una infección extraintestinal grave, sea necesario continuar o iniciar un antimicrobiano potencialmente inductor de colitis, éste se debe administrar junto con el tratamiento específico. En caso contrario deben suspenderse todos los demás antibióticos (13).

PRONOSTICO.

La colitis pseudomembranosa puede ser fatal si el padecimiento no es reconocido y tratado. La enfermedad tiene una letalidad cercana al 20% en pacientes mayores de 50 años y en enfermos crónicos (5,13). La muerte generalmente es causada por alguna de las complicaciones.

En los casos benignos de diarrea o colitis inespecífica inducida por antibióticos y en los pacientes jóvenes con tratamiento adecuado es bueno. En los niños la letalidad era elevada (30 a 40%), antes de que se empleara la vancomicina. A pesar de que el episodio haya sido grave, si el paciente se recupera, no quedan secuelas en el colon (7,8).

La mejor prevención es evitar el uso inadecuado de antibióticos, empleando aquéllos que se asocian con menor frecuencia a colitis.

El medio ambiente de los pacientes con colitis, tiene un alto grado de contaminación con C. difficile (45). En algunos hospitales se han observado brotes de la enfermedad en varias salas (48). Por todo ello se recomienda un aseo estricto de las manos en la atención de estos pacientes y un manejo adecuado de sus excretas.

JUSTIFICACION DEL PRESENTE ESTUDIO.

La mayor parte de estudios clínicos han sido efectuados en adultos. En la población infantil, la relación de C. difficile con la colitis asociada a la administración de antibióticos aún no ha sido aclarada, ya que como se comentó, los estudios de población pediátrica son escasos y no se han encontrado diferencias en relación al aislamiento de este microorganismo en pacientes con y sin diarrea. Dado el amplio uso de antibióticos en nuestro medio y en ocasiones inclusive el abuso de ellos, es importante identificar esta complicación y conocer su frecuencia en los niños.

Este estudio fué diseñado para tratar de definir el papel patógeno de C. difficile en niños, comparando la frecuencia de aislamiento de dicho germen y la presencia de su citotoxina en heces de diferentes grupos de pacientes, para establecer la posible asociación de este microorganismo en procesos diarreicos inducidos por antibióticos.

MATERIAL Y METODOS.

Se estudiaron 154 niños, divididos en cuatro grupos, durante el período de mayo de 1981 a enero de 1982.

- 1) Cincuenta y ocho niños que presentaron diarrea durante la administración de antibióticos o hasta tres semanas después de haberse suspendido éste. El promedio de la edad fué de 7.3 meses (límites de cinco - días a cinco años).
- 2) Veintidos pacientes con diarrea sin antecedentes de haber recibido an antibióticos, con promedio de edad de 3.2 meses (límites de tres días a tres meses).
- 3) Treinta y ocho niños que recibieron antibióticos por diferente patología infecciosa y no presentaron diarrea, hasta tres semanas después de haber terminado el tratamiento. El promedio de edad fué de 14.1 meses (límites de trece días a siete años).
- 4) Treinta y seis niños sanos (grupo testigo) con promedio de edad de - 11.9 meses (límites de diecinueve días a veinticuatro meses) procedentes de una guardería del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Los tres primeros grupos fueron pacientes atendidos en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional, Instituto Mexicano del Seguro Social.

Se obtuvieron muestras de heces de cada uno de los pacientes y se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento, que en general se efectuó en los siguientes 15 días. Se registró información sobre cuadro clínico, tipo de - antibiótico empleado y en tres casos se efectuó rectosigmoidoscopia. En - los pacientes en que se consideró necesario, se efectuó estudio radiográfico de abdomen.

Aislamiento.

Para el aislamiento primario de Clostridium difficile se usó el medio selectivo y diferencial desarrollado por George y col., en 1979 (53) utilizando cefalexin en lugar de cefoxitin pero a la misma concentración. Se inocularon 0.1 ml de una dilución 1:10 de las heces en regulador de fosfatos pH - 7.0. La búsqueda de colonias sospechosas se hizo a las 24 y 48 horas de incubación; éstas se subcultivaron en placas de gelosa sangre para lograr el aislamiento. Las colonias aisladas después de practicarles tinción de gram se inocularon en medio líquido de tioglicolato y con un cultivo de 48 horas en este caldo, se ensayaron las pruebas bioquímicas necesarias para su identificación (73), que fueron: producción de ácido a partir de glucosa, lactosa, maltosa, manitol, manosa, melibiosa y fructosa, hidrólisis de esculina y almidón, producción de ácido a partir de sacarosa y xilosa, producción de indol, reducción de nitratos, comportamiento en leche tornasolada y producción de lipasa y lecitinasa. La atmósfera anaeróbica se logró utilizando el sistema GasPack (Becton Dickinson and Co. Cockeysville, MD - 21030).

Ensayo de citotoxicidad. Para la búsqueda de efecto citotóxico, se utilizó cultivo primario de fibroblastos de ratón. El cultivo se preparó por tripsinización de homogeneizados de fetos de ratón Balb/c obtenidos por cesárea y crecidos en medio 199 más suero bovino fetal al 10 por ciento. Se distribuyeron en volúmenes de 10 ml en tubos de tapón de rosca y se incubaron a 37°C. Después de formada la monocapa el cultivo se mantuvo en suero bovino fetal al 2 por ciento en medio 199.

Las muestras de heces se centrifugaron a 2000 rpm y el sobrenadante se -

esterilizó por filtración en membranas Millipore de 0.45 micras. Se inocu-
laron 0.1 ml de diluciones decimales desde 1:10 hasta 1:1000 y los resulta-
dos se leyeron a las 24 y 48 horas (25).

Se consideró que había efecto citotóxico cuando se observaron cambios mor-
fológicos en el 50 por ciento de las células o más. El título se expresó
como el inverso de la máxima dilución en la que todavía hubo efecto cito-
tóxico. Para demostrar efecto citotóxico específico, los especímenes que
mostraron cambios citopáticos fueron probados de nuevo adicionando un vo-
lumen igual de antitoxina de C. sordellii diluida 1:10 (25). En aquéllos
en los que hubo neutralización, se consideró que el efecto fué por citoto-
xina de C. difficile.

Susceptibilidad de antimicrobianos in vitro. Se determinó la susceptibi-
lidad de antimicrobianos en 20 cepas aisladas durante el estudio, usando
diluciones seriadas dobles (de 1,024 a 0.25 mcg/ml) de los siguientes an-
timicrobianos: penicilina, eritromicina, cloranfenicol, vancomicina, tri-
metoprim-sulfametoxazol, cefalexina, metronidazol, rifampicina, clindami-
cina y tetraciclina. Se usó el método de dilución en placa utilizando el
replicador de Steers (74). Los resultados se expresaron como concentra-
ción mínima inhibitoria (CMI) en mcg/ml.

Producción de citotoxina in vitro. Se inoculó caldo cerebro corazón pre-
reducido con cada una de las cepas aisladas y se incubaron a 37°C por 48
horas en anaerobiosis. Después de centrifugar el cultivo a 2000 rpm, el
sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0.45 micras. Se ino-
cularon 0.1 ml del filtrado en tubos con células de cultivo de fibroblas-
tos de ratón. Como controles positivos se emplearon tubos inoculados con

extracto de cultivo y toxina semipurificada en nuestro laboratorio de la -
cepa toxigénica 8484 del VPI. Como controles negativos se emplearon tubos
inoculados con solución reguladora de fosfatos y antisuero de C. sordellii.

Análisis Estadístico. Para comparar las diferencias en el porcentaje de -
aislamiento de C. difficile y la detección de su toxina entre los cuatro -
grupos de pacientes estudiados se efectuó estudio de chi cuadrada y en ca-
so necesario el de probabilidades exactas de Fisher.

RESULTADOS.

En los pacientes con diarrea por antibióticos (grupo 1) se aisló C. difficile en 12 de 58 casos (20.6%). La toxina fué detectada en cuatro pacientes (6.9%) en tres de los cuales el aislamiento del microorganismo también fué positivo y negativo en uno de ellos (tabla VII). De estos 58 pacientes, 29 presentaron un cuadro de diarrea aguda y 28 presentaron diarrea de evolución prolongada (más de 15 días de evolución) y en un paciente se documentó CPM; este último caso confirmado por rectosigmoidoscopia y biopsia rectal, en el que el aislamiento fué positivo, pero no se detectó citotoxina en tres de las muestras procesadas (tabla VIII).

De los 45 pacientes de este grupo en que no se aisló ni Clostridium difficile ni su citotoxina, a 12 se les practicó radiografía de abdomen, encontrándose dos normales, seis con dilatación de asas y niveles aire-líquido, tres con neumatosis intestinal y uno con suboclusión intestinal. A uno se le practicó rectosigmoidoscopia y fué normal. En los 12 pacientes con aislamiento positivo, a tres se les practicó estudio radiográfico, resultando dos con dilatación de asas y niveles aire-líquido y uno con colon dilatado. Sólo a uno se le practicó rectosigmoidoscopia, demostrando la presencia de pseudomembranas.

En los 22 pacientes con diarrea sin antecedentes de haber recibido antibiótico (grupo 2) se encontró sólo en uno el microorganismo (4.4%) y en ninguno la citotoxina. De los 38 pacientes que habiendo recibido antibióticos por algún proceso infeccioso y que no desarrollaron diarrea (grupo 3) en siete se aisló el microorganismo (18.4%) mientras que en tres se demostró la citotoxina (7.9%) y sólo en uno de ellos se aisló también el microorga-

nismo. Sólo a uno de estos pacientes se le practicó estudio radiográfico de abdomen encontrándose dilatación de asas y edema interasa.

De los 36 niños sanos (grupo 4) se aisló el bacilo en siete casos (19.4%) y se encontró la citotoxina en uno (2.8%). El grupo de niños sanos y el que presentó diarrea asociada a antibióticos se dividieron en mayores y menores de un año para ver la diferencia en la frecuencia de aislamiento de C. difficile de acuerdo a la edad, apreciando que el mayor porcentaje fué en los niños menores de un año (tabla IX).

El análisis estadístico no reveló diferencias significativas ($p > 0.05$) en los porcentajes de aislamiento de C. difficile y la detección de su toxina entre los cuatro grupos de pacientes estudiados.

Antibióticos empleados. No se pudo establecer alguna relación entre los antibióticos empleados y la presencia del microorganismo, ya que en la mayoría de los pacientes se emplearon dos o más antibióticos; y aunque predominaron los betalactámicos, no se pudo acusar de algún antibiótico en particular.

Susceptibilidad a los antibióticos. Los resultados de susceptibilidad a los antimicrobianos de Clostridium difficile se muestran en la tabla X. Cabe señalar la alta resistencia a ciclocerina y a ácido nalidixico, así como a cefalexin. La totalidad de las cepas fueron sensibles a vancomicina, que es el antibiótico de elección para el tratamiento de colitis pseudomembranosa. Se aprecia además que la mayor parte de las cepas fueron sensibles a los betalactámicos, al cloranfenicol, a la clindamicina, a la rifampicina y al metronidazol.

Producción de citotoxina in vitro. Se procesaron 20 de las 27 cepas aisladas. El resultado fué positivo en 14 de ellas (70%). Dos de estas últimas cepas correspondían a pacientes en quienes fué positivo también el estudio de citotoxicidad en heces. La cepa aislada del paciente con colitis pseudo membranosa confirmada, no demostró actividad citotóxica in vitro. (Tampoco se demostró actividad citotóxica en heces).

TABLA VII

FRECUENCIA DE Clostridium difficile Y SU TOXINA
EN NIÑOS CON Y SIN DIARREA

	No. DE CASOS	<u>C. difficile</u> No. (%)	CITOTOXINA No. (%)
GRUPO 1			
DIARREA POR ANTIBIOTICO	58	12 (20.7)	4 (6.9)
GRUPO 2			
DIARREA SIN ANTIBIOTICO	22	1 (4.5)	0 (0.0)
GRUPO 3			
PACIENTES CON ANTIBIO - TICO SIN DIARREA	38	7 (18.4)	3 (7.9)
GRUPO 4			
TESTIGO	36	7 (19.4)	1 (2.8)
TOTAL	154	27 (17.5)	8 (5.2)

$p > 0.05$

TABLA VIII

AISLAMIENTO DE Clostridium difficile Y SU CITOTOXINA EN PACIENTES
 CON DIARREA POR ANTIBIOTICOS, SEGUN FORMA CLINICA

	No. DE CASOS	<u>C. difficile</u> No. (%)	TOXINA No. (%)
DIARREA AGUDA	29	6 (20.7)	2 (6.9)
DIARREA DE EVOLUCION PROLONGADA	28	5 (17.9)	2 (7.1)
COLITIS PSEUDOMEMBRANOSA	1	1	0

$p > 0.05$

TABLA IX

AISLAMIENTO DE C. difficile EN DOS GRUPOS DE NIÑOS

	MENORES DE UN AÑO		MAYORES DE UN AÑO	
	No.	%	No.	%
NIÑOS SANOS	6/22	27.3	1/14	7.1
CON DIARREA ASOCIADA A ANTIBIOTICOS	12/52	23.1	0/6	-

p > 0.05

TABLA X

SUSCEPTIBILIDAD IN VITRO DE 25 CEPAS DE Clostridium difficile

ANTIMICROBIANOS	PORCENTAJE ACUMULADO CON CMI (ug/ml) DE:												
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
CICLOSERINA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	100
PENICILINA	0	0	17	80	100								
AMPICILINA	8	8	17	25	87	100							
ERITROMICINA	29	29	29	29	29	29	29	29	75	87	100		
ACIDO NALIDIXICO	8	12	12	12	12	12	12	12	12	21	29	100	
CLORANFENICOL	0	0	75	83	91	100							
CLINDAMICINA	25	50	66	71	71	71	71	71	75	87	91	91	100
VANCOMICINA	36	92	100										
TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL	52	52	52	60	72	72	72	72	72	72	72	88	100
CEFALEXINA	0	4	8	8	8	8	8	96	100				
RIFAMPICINA	92	92	92	92	100								
TETRACICLINA	17	17	29	54	79	83	87	100					
METRONIDAZOL	79	87	87	87	87	87	87	87	87	87	96	100	

TABLA X

SUSCEPTIBILIDAD IN VITRO DE 25 CEPAS DE Clostridium difficile

ANTIMICROBIANOS	PORCENTAJE ACUMULADO CON CMI (ug/ml) DE:												
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
CICLOSERINA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	100
PENICILINA	0	0	17	80	100								
AMPICILINA	8	8	17	25	87	100							
ERITROMICINA	29	29	29	29	29	29	29	29	75	87	100		
ACIDO NALIDIXICO	8	12	12	12	12	12	12	12	12	21	29	100	
CLORANFENICOL	0	0	75	83	91	100							
CLINDAMICINA	25	50	66	71	71	71	71	71	75	87	91	91	100
VANCOMICINA	36	92	100										
TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL	52	52	52	60	72	72	72	72	72	72	72	88	100
CEFALEXINA	0	4	8	8	8	8	8	96	100				
RIFAMPICINA	92	92	92	92	100								
TETRACICLINA	17	17	29	54	79	83	87	100					
METRONIDAZOL	79	87	87	87	87	87	87	87	87	87	96	100	

DISCUSION.

La participación de C. difficile en la colitis inducida por antibióticos parece estar bien establecida en los adultos, tanto por estudios clínicos como experimentales (18, 21-24). Generalmente existe buena correlación - entre el diagnóstico clínico de CPM y el aislamiento de C. difficile, así como la presencia de su citotoxina en las heces (25). Habitualmente esta bacteria no forma parte de la flora normal del colon y en la población - adulta sana sólo se le encuentra en porcentajes pequeños que van del cero al cuatro por ciento (13,25).

Cuando iniciamos el estudio había poca información de este problema en - los niños y nos interesó investigar el fenómeno en la edad pediátrica, - por lo que diseñamos cuatro grupos de pacientes en diferentes situaciones clínicas para comparar la frecuencia de aislamiento de C. difficile y la presencia de su citotoxina en las heces. Observamos que el porcentaje de aislamiento en los niños sanos fué de 19.4% y este porcentaje se elevó a 27.3% cuando se tomaron en cuenta únicamente los niños menores de un año. Resalta la diferencia en relación con la población adulta en donde como - ya mencionamos, la frecuencia de portadores sanos es muy baja. Al analizar los otros grupos observamos que los pacientes que habían recibido antibióticos, desarrollaran o no diarrea, tuvieron porcentajes de aislamiento similares al grupo de niños sanos, lo que parece indicar que el empleo de antimicrobianos por sí mismo no incrementa la colonización por C. difficile en los niños menores de un año. Por otro lado, en el grupo de pacientes que tuvieron diarrea sin haber recibido antibióticos el porcentaje de aislamiento fué menor que en los demás grupos, si bien la diferencia no - fué estadísticamente significativa. Además en este grupo el estudio de -

citotoxicidad fué negativo en todos ellos. Una posible explicación a este fenómeno es que los cambios en la microflora intestinal puede interferir con el desarrollo de C. difficile, como también ha sido postulado por Wilson (71).

Nuestros resultados concuerdan parcialmente con los de Holst (75) quien aisló el germen en el 23% de niños sanos, similar al de nosotros; sin embargo, encontró lo contrario en pacientes con diarrea sin antibióticos, en quienes obtuvo un porcentaje de aislamiento de 20%, mientras que nosotros sólo encontramos un 4.5%; diferencias similares se apreciaron en los pacientes con diarrea asociada a antibióticos.

Stark (47), apreció que en el transcurso del primer año de vida el 90% de los niños son colonizados por esta bacteria por un tiempo que va de una semana a varios meses, sin presentar diarrea o algún otro signo de alteración intraabdominal; sin embargo, al estudiarlos en forma transversal encontró que el 54% de los niños menores de un año estaban colonizados en un momento dado por este germen. Estos porcentajes son mayores que los que encontramos nosotros; sin embargo, el tipo de pacientes estudiados son diferentes.

Del total de los cuatro grupos se aisló el microorganismo en 27 pacientes (17.5%) y sólo en ocho fué positivo el estudio de citotoxicidad (5.2%). En el grupo de pacientes con diarrea sin haber recibido antibióticos no hubo ningún paciente con evidencia de la citotoxina; en los otros grupos hubo uno o más pacientes con estudio de citotoxicidad positivo, incluyendo al grupo de niños sanos. Otros investigadores también han encontrado la toxina de C. difficile en las heces de niños sanos en concentraciones -

incluso más altas que en pacientes adultos con CPM (76,77).

Donta investigó la presencia de citotoxina de C. difficile en heces de recién nacidos y encontró que era detectable en el 10.5% de los niños sanos y en el 55% de los niños que ameritaban estar en una unidad de cuidados intensivos sin tener signos de enfermedad gastrointestinal. Estos porcentajes también son más altos que los que encontramos en nuestros pacientes; sin embargo, hay que tener en cuenta que estos eran lactantes en su mayoría y como ya se ha observado, la frecuencia de colonización de C. difficile cambia con la edad; además otro factor importante que se debe tomar en cuenta, y que nosotros no analizamos, es el sitio donde permanecen los pacientes, ya que de acuerdo con los resultados de Donta, en las unidades de cuidados intensivos, existe un mayor riesgo de adquirir el germen del medio ambiente, que en otros sitios.

Se desconocen actualmente los factores que condicionan esta tolerancia de los recién nacidos y lactantes a la toxina de C. difficile aunque se ha especulado que puede ser por inactivación de la toxina por productos del huésped o de la misma flora microbiana, inhibición de su crecimiento por la misma microflora o bien ausencia de receptores específicos para la toxina en el colon de los lactantes y que en edades posteriores se harían evidentes (78).

De las cepas aisladas, el estudio de citotoxicidad in vitro fué positivo en el 70% de las que fueron probadas. Lo anterior sugeriría que no todas las cepas de C. difficile son toxigénicas, aunque otros autores han encontrado que más del 90% de las cepas lo son (79). En nuestro estudio únicamente empleamos el método de citotoxicidad para detectar la toxina de C.

difficile, no se empleó la metodología necesaria para detectar por separado la toxina A y B; sin embargo, otros investigadores han encontrado que la ma yoría de las cepas producen ambas toxinas (28,29).

En base a algunos informes sobre la participación de C. difficile en enfermedades crónicas de colon (43,44), se analizó el porcentaje de aislamiento en los pacientes con diarrea aguda comparada con los de diarrea prolongada en el grupo que habían recibido antibióticos, apreciando que la frecuencia de aislamiento fué similar, por lo que podemos suponer que C. difficile no interviene en la génesis de la diarrea prolongada en niños.

En un paciente se hizo el diagnóstico de CPM mediante rectosigmoidoscopia y aunque el cultivo fué positivo para C. difficile el estudio de citotoxicidad fué negativo; aunque este fenómeno no es frecuente, ya ha sido observado por otros autores (79).

Las radiografías simples de abdomen no mostraron una imagen característica de lesión colónica, lo que ya ha sido referido en pacientes adultos, en quienes incluso los estudios con material de contraste, al efectuar colon por enema, no presentan alteraciones específicas de esta enfermedad (7,8).

El estudio de susceptibilidad a los antimicrobianos mostró que C. difficile fué sensible a penicilina, ampicilina y vancomicina, éste último de elección en los casos de CPM; los dos primeros, a pesar de ser eficaces contra esta bacteria in vitro se les ha relacionado frecuentemente como inductores de CPM. Este hecho paradójico aún no tiene explicación, aunque se ha elucubrado que se debe a la capacidad de C. difficile para formar esporas, lo que pudiera explicar las recaídas que se han observado después de suspender

la vancomicina a los pacientes tratados con este antibiótico.

En conclusión, los resultados de nuestro estudio sugieren que C. difficile coloniza frecuentemente el intestino de los niños menores de un año sin - provocar patología y, por lo tanto, existe gran dificultad en analizar adecuadamente la relación causa-efecto de este germen y sus toxinas en la mayoría de los casos de diarrea asociada a antibióticos o en gastroenteritis por otra causa, en niños menores de un año. La dificultad de diagnóstico impide establecer en la mayoría de los casos una relación causa-efecto de este microorganismo con la enfermedad.

Quedan todavía muchas incógnitas alrededor de esta bacteria y aún está por aclarar el papel patógeno que puede tener en los niños, el motivo por el - que aparentemente son resistentes a la acción de sus toxinas, el papel individual de éstas en la génesis de la CPM, los mecanismos de transmisión, la interacción con la flora normal del intestino, los fenómenos inmunológicos, el perfeccionamiento de técnicas serológicas para la detección de antígenos o anticuerpos, etc.

Finalmente hay que tener en cuenta que pueden haber otros microorganismos toxigénicos, involucrados en la etiología de la colitis inducida por antibióticos como Clostridium perfringens tipo C, como se ha informado (80).

Los conocimientos aportados por nuestro estudio y por los de otros grupos de investigadores ponen en duda la capacidad de producir enfermedad de C. difficile en los pacientes pediátricos especialmente en los lactantes. - Probablemente dentro de algunos años se le considere como un germen habitual de la flora intestinal.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES.

- Costridium difficile se aísla en porcentajes similares en heces de niños sanos, en pacientes con diarrea asociada a antibióticos y en aquellos que los reciben sin desarrollar diarrea.
- La mayor parte de las cepas de C. difficile son toxigénicas.
- Existe una tolerancia de los lactantes para la acción de las toxinas - de C. difficile, sin conocerse en la actualidad las razones de este fenómeno.
- C. difficile es un colonizador habitual de los niños menores de un año.
- Hasta el momento no se puede determinar con exactitud el papel patógeno de C. difficile en niños.

RESUMEN.

Existe evidencia clínica y experimental de que la o las toxinas de C. difficile causan colitis pseudomembranosa (CPM) inducida por antibióticos en los adultos. En este estudio tratamos de establecer la posible relación de este microorganismo con la diarrea inducida por antibióticos en los niños, estudiando cuatro grupos de pacientes. De cada uno de ellos se procesaron muestras de heces para aislamiento primario de C. difficile y se efectuó búsqueda de efecto citopático en cultivo de fibroblastos de ratón y neutralización con antitoxina de C. sordellii; cuando resultó positivo este estudio se consideró que estaba presente la citotoxina de C. difficile. El grupo (1) incluyó 58 niños con diarrea y antecedentes de haber recibido antibióticos; en el 20.7% de los casos se logró aislar C. difficile y en el 6.9% se logró detectar su toxina. El grupo (2) con 22 niños con diarrea sin historia previa de administración de antibióticos, resultó con el 4.5% de aislamiento del germen y cero por ciento para su toxina. El grupo (3) se compuso de 38 niños que recibieron antibióticos por diferente patología infecciosa y no desarrollaron diarrea; en ellos el aislamiento del germen fue del 18.4% y el de su toxina del 7.9%. El grupo (4) se compuso de 36 niños sanos (grupo testigo) y tuvo el 19.4% de aislamiento y el 2.8% de positividad para la toxina. Estos resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de aislamiento del microorganismo y la presencia de su citotoxina en heces; entre los diversos grupos estudiados, lo que nos indica la dificultad que existe para analizar adecuadamente la presencia de C. difficile y su toxina en el colon de los niños. En la mayoría de nuestros casos de diarrea por antibióticos o gastroenteritis por otras causas, no fue posible establecer una relación causa-efecto de este microorganismo con la enfermedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Tedesco FJ, Barton RW, Alpers DH. Clindamycin-associated colitis. A prospective study. *Ann Intern Med* 1974; 81:429-433.
2. Gurwith MJ, Rabin HR, Love K. Diarrhea associated with clindamycin - and ampicillin therapy. *J Infect Dis* 1977; 135(S):S104-110.
3. George WL. Antimicrobial agent-associated colitis and diarrhea. *West J Med* 1980; 133:115-123.
4. Gorbach SL, Bartlett JG. Colitis associated with clindamycin therapy. Pseudomembranous enterocolitis: A review of its diverse forms. *J - Infect Dis* 1977; 135(S): S89-94.
5. Price AB, Davies DR. Pseudomembranous colitis. *J Clin Pathol* 1977; 30:1-12.
6. Ledger WJ, Facog O, Puttler OL. Death from pseudomembranous enterocolitis. *Obstet Gynecol* 1975; 46:609-613.
7. Viteri AL, Howard PH, Dyck WP. The spectrum of lincomycin-clindamycin colitis. *Gastroenterology* 1974; 66:1137-1144.
8. Le Frock JL, Klainer AS, Chen S, Gainer RB, Omar M, Anderson W. The spectrum of colitis associated with lincomycin and clindamycin therapy. *J Infect Dis* 1975; 131(S): S108-115.
9. Reiner L, Schlesinger MJ, Miller GM. Pseudomembranous colitis following aureomycin and chloramphenicol. *Arch Pathol* 1952; 54:39-67.
10. Klotz AP, Palmer WL, Kirsner JB. Aureomycin proctitis and colitis: a report of five cases. *Gastroenterology* 1953; 25:44-47.
11. Altmeier WA, Hummel RP, Hill EO. Staphylococcal enterocolitis following antibiotic therapy. *Ann Surg* 1963; 157:847-858.
12. Hummel RP, Altmeier WA, Hill EO. Iatrogenic staphylococcal enterocolitis. *Ann Surg* 1964; 160:551-560.
13. Fekety R. Antibiotic-associated (pseudomembranous) colitis: diagnosis and treatment. En: Peterson PK, Sabath LD, Calderon EJ, Ronald AR. *The management of Infectious Diseases in Clinical Practice*. Academic Press. New York 1982 p. 103-112.
14. McKay DG, Hardaway RM, Wable GH, Hall RM. Experimental pseudomembranous enterocolitis. *Arch Intern Med* 1975; 95:779-787.
15. Hofmann AF. Bile acids, diarrhea and antibiotics: Data, speculation and a unifying hypothesis. *J Infect Dis* 1977; 135(S): S126-132.

16. Larson HE, Parry JV, Price AB, Dolby J, Tyrell DA. Undescribed toxin in pseudomembranous colitis. *Br Med J* 1977; 1:1246-1248.
17. Rifkin GD, Fekety FR, Silva J. Antibiotic induced colitis. Implications of a toxin neutralized by Clostridium sordellii antitoxin. *Lancet* 1977; 2:1103-1106.
18. Bartlett JG, Onderdonk AB, Cisneros RL, Kasper DL. Clindamycin associated colitis due to a toxin producing species of Clostridium in hams ters. *J Infect Dis* 1977; 136:701-705.
19. Rifkin GD, Silva J, Fekety R. Gastrointestinal and systemic toxicity of fecal extracts from hamsters with clindamycin-induced colitis. *Gastroenterology* 1978; 74:52-57.
20. Larson HE, Price AB. Pseudomembranous colitis, presence of clostridial toxin. *Lancet* 1977; 2:1312-1314.
21. Bartlett JG, Chang TW, Gorbach SL, Onderdonk AB. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. *N Engl J Med* 1978; 298:531-534.
22. George RH, Symonds JM, Dimock F. Identification of Clostridium difficile as a cause of pseudomembranous colitis. *Br Med J* 1978; 1:695.
23. George WL, Sutter VL, Goldstein JC, Ludwig SL, Finegold SM. Aetiology of antimicrobial-agent-associated colitis. *Lancet* 1978; 1:802-803.
24. Larson HE, Price AB, Honour P, Borriello SP. Clostridium difficile - and the aetiology of pseudomembranous colitis. *Lancet* 1978; 1:1063-1066.
25. Chang TW, Lauer mann M, Bartlett JG. Cytotoxicity assay in antibiotic-associated colitis. *J Infect Dis* 1979; 140:765-770.
26. Rolfe RD, Finegold SM. Purification and characterization of Clostridium difficile toxin. *Infect Immun* 1979; 25:191-201.
27. Taylor NS, Thorne GM, Bartlett JG. Comparison of two toxins produced by Clostridium difficile. *Infect Immun* 1981; 34:1036-1043.
28. Libby JM, Jortner BS, Wilkins TD. Effects of the two toxins of Clostridium difficile in antibiotic-associated cecitis in hamsters. *Infect Immun* 1982; 36:822-829.
29. Sullivan NM, Pellet S, Wilkins TD. Purification and characterization of toxins A and B of Clostridium difficile. *Infect Immun* 1982; 35: -1032-1040.
30. Lyerly DM, Lockwood DE, Richardson SH, Wilkins TD. Biological activities of toxins A and B of Clostridium difficile. *Infect Immun* 1982; 35:1147-1150.

31. Justus PG, Martin JL, Goldberg DA, Taylor NS, Bartlett JG, Alexander RW, Mathias JR. Myoelectric effects of Clostridium difficile: Motility-altering factors distinct from its cytotoxin and enterotoxin in rabbits. Gastroenterology 1982; 83:836-843.
32. Bartlett JG, Willey SH, Chang TW, Lowe B. Cephalosporin-associated pseudomembranous colitis due to Clostridium difficile. JAMA 1979; 242:2683-2685.
33. Brook I. Isolation of toxin producing Clostridium difficile from two children with oxacillin and dicloxacillin-associated diarrhea. - Pediatrics 1980; 65:1154-1156.
34. Cameron A, Thomas M. Pseudomembranous colitis and co-trimoxazole. Br Med J 1977; 1:1321.
35. Rogers TR, Petrou M, Lucas C et al. Spread of Clostridium difficile among patients receiving non-absorbable antibiotics for gut decontamination. Br Med J 1981; 2:408-409.
36. Saginur R, Hawley CH, Bartlett JG. Colitis associated with metronidazole therapy. J Infect Dis 1980; 141:772-774.
37. Colardyn F, Verschraegen G, Claeys G, Vogelaers D. Clostridium difficile-associated diarrhoea during treatment with imipenem. Eur - J Clin Microbiol 1985; 3:565-566.
38. George RH. Pseudomembranous colitis probably due to Rifampicin. - Lancet 1980; 1:1304.
39. Randolph MF, Morris KE. Clindamycin-associated colitis in children. A prospective study and negative report. Clin Pediatr 1977; 16:722-725.
40. Howard JM, Sullivan SN, Troster M. Spontaneous pseudomembranous colitis. Br Med J 1980; 2:356.
41. Wald A, Mendelow H, Bartlett JG. Non-antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin producing clostridia. Ann Intern - Med 1980; 92:798-799.
42. Hyams JS, Berman MM, Helgason H. Non-antibiotic-associated enterocolitis caused by Clostridium difficile in an infant. J Pediatr 1981; 99:750-752.
43. Bolton RP, Sheriff RJ, Read AE. Clostridium difficile associated - diarrhea: a role on inflammatory bowel disease. Lancet 1980; 1:383-384.
44. La Mont JT, Trnka YM. Therapeutic implications of Clostridium difficile toxin during relapse of chronic inflammatory bowel disease. Lancet 1980; 1:381-382.

45. Kim KH, Fekety RB, Batt DH, Brown D, Audomere M, Silva J, Waters D. Isolation of Clostridium difficile from the environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis. J Infect Dis 1981; 143:42-50.
46. Donta ST, Myers MG. Clostridium difficile toxin in asymptomatic neonates. J Pediatr 1982; 100:431-434.
47. Stark PL, Lee A, Parsonage BD. Colonization of the large bowel by Clostridium difficile in healthy infants: quantitative study. Infect Immun 1982; 35:895-899.
48. Wust J, Sullivan NM, Hardegger U, Wilkins TD. Investigation of an outbreak of antibiotic-associated colitis by various typing methods. J Clin Microb 1982; 16:1096-1101.
49. Buts JB, Weber AM, Roy CC, Morin CL. Pseudomembranous enterocolitis in childhood. Gastroenterology 1977; 73:823-827.
50. Viscidi RP, Bartlett JG. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis in children. Pediatrics 1981; 67:381-386.
51. Donta ST, Stuppy MS, Myers MG. Neonatal antibiotic-associated colitis. Am J Dis Child 1981; 135:181-182.
52. Tedesco FJ, Stanley RJ, Alpers DH. Diagnosis features of clindamycin-associated pseudomembranous colitis. N Engl Med 1974; 290:841-843.
53. George WL, Sutter VL, Citron O, Finegold SM. Selective and differential medium for isolation of Clostridium difficile. J Clin Microbiol 1979; 9:214-219.
54. Yolken RH, Withcomb LS, Marien G, Bartlett JG. Enzyme immunoassay - for the detection of Clostridium difficile antigen. J Infect Dis - 1981; 144:378.
55. Lysterly DM, Sullivan NM, Wilkins TD. Enzyme-linked immunosorbent - assay for Clostridium difficile toxin A. J Clin Microbiol 1983; 17: 72-78.
56. Foxton IA, Byrne MD. Detection of Clostridium difficile toxin by - counterimmunoelectrophoresis: a note of caution. J Clin Microbiol 1981; 14:349.
57. Welch DF, Menge SK, Matsen JM. Identification of toxigenic Clostridium difficile by counterimmunoelectrophoresis. J Clin Microbiol - 1980; 11:470-473.
58. Shahrabadi MS, Bryan LE, Gaffney D, Gordon R, Pai C. Latex agglutination test for detection of Clostridium difficile toxin in stool - samples. J Clin Microbiol 1984; 20:339-341.

59. George WL, Rolfe RD, Finegold SM. Treatment and prevention of antimicrobial agent-induced colitis and diarrhea. *Gastroenterology* 1980; 79:366-372.
60. Bartlett JG. Treatment of antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Rev Infect Dis* 1984; 6(S1):S235-241.
61. Tedesco F, Markham R, Gurwith M, Christie D, Bartlett JG. Oral vancomycin for antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Lancet* - 1978; 2:226-228.
62. George WL, Volpicelli NA, Stiner DB, Richman DD, et al. Relapse of - pseudomembranous colitis after vancomycin therapy. *N Eng J Med* 1979; 301:414-415.
63. Bartlett JG, Tedesco F, Shull S, Lowe B, Chang T. Symptomatic relapse after oral vancomycin therapy of antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Gastroenterology* 1980; 78:431-434.
64. Chang TW, Gorbach SL, Bartlett JG, Saginur R. Bacitracin treatment - of antibiotic-associated colitis and diarrhea caused by Clostridium difficile toxin. *Gastroenterology* 1980; 78:1584-1586.
65. Pashby NL, Bolton RP, Sherrif NJ. Oral metronidazole in Clostridium difficile colitis. *Br Med J* 1979; 2:1479.
66. Cronberg S, Castor B, Thoren A. Fusidic acid for the treatment of - antibiotic-associated colitis induced by Clostridium difficile. *Infection* 1984; 12:276-279.
67. Sinatra F, Buntain WL, Mitchel CH. Cholestyramine treatment of pseudomembranous colitis. *J Pediatr* 1976; 88:304-306.
68. Kreutzer EW, Milligan FD. Treatment of antibiotic-associated pseudomembranous colitis with cholestyramine resin. *Johns Hopkins Med J* - 1978; 143:67-72.
69. Taylor NS, Bartlett JG. Binding of Clostridium difficile cytotoxin and vancomycin by anion-exchange resins. *J Infect Dis* 1980; 141: - 92-97.
70. Schwan A, Sjolin S, Trottestam U, Aronsson B. Relapsing Clostridium difficile enterocolitis cured by rectal infusion of normal feces. - *Scand J Infect Dis* 1984; 16:211-215.
71. Wilson KH, Silva J, Fekety FR. Suppression of Clostridium difficile by normal hamster cecal flora and prevention of antibiotic-associated cecitis. *Infect Immun* 1981; 34:626-628.
72. Novak E, Lee JG, Seckman CE, Philips JP, Di Santo AR. Unfavorable - effect of atropine-diphenoxylate (Lomotil) therapy in lincomycin-caused diarrhea. *JAMA* 1976; 235:1451-1454.

73. Holdeman LV, Moore WE. Anaerobe laboratory manual 1975. Virginia - Polytechnic Institute and State University Blacksburg.
74. George WL, Sutter VL, Finegold SM. Toxicogenicity and antimicrobial - susceptibility of Clostridium difficile, a cause of antimicrobial - agent-associated colitis. Current Microbiol 1978; 1:55-58.
75. Holst E, Helin I, Mardh P. Recovery of Clostridium difficile from - children. Scand J Infect Dis 1981; 13:41-45.
76. Burdon DW, Thompson H, Candy DC, Kearns M, Lees D, Stephen J. Enterotoxin (s) of Clostridium difficile. Lancet 1981; 2:258.
77. Mardh P, Helin I, Colleen I, Oberg M, Holst E. Clostridium difficile toxin in faecal specimens of healthy children and children with diarrhoea. Acta Paediatr Scand 1982; 71:275-278.
78. Welch DF, Marks MI. Is Clostridium difficile pathogenic in infants? J Paediatr 1982; 100:393-395.
79. Viscidi R, Willey S, Bartlett JG. Isolation rates and toxigenic potential of Clostridium difficile isolates from various patient population. Gastroenterology 1981; 81:5-9.
80. Schwartz JN, Hamilton JP, Fekety R, Green EG, Stamper L, Batts DH. Ampicillin-induced enterocolitis: implication of toxigenic Clostridium perfringens type C. J Paediatr 1980; 97:661-663.