

75
2ei

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

NUEVAS PERSPECTIVAS DE AISLAMIENTO E
IDENTIFICACION DE Clostridium difficile EN EL
LABORATORIO CLINICO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TRABAJO ESCRITO

Que para obtener el título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a

NORMA LETICIA LOPEZ MEDINA





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 está 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.

INDICE

	Pag.
INTRODUCCION	1
I.- GENERALIDADES	3
a. TAXONOMIA Y MORFOLOGIA	3
b. IMPORTANCIA CLINICA	5
c. REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES Y MEDIOS DE CULTIVO	7
d. CONSTITUCION ANTIGENICA Y PROPIEDADES INMUNOLOGICAS	13
e. FACTORES DE VIRULENCIA	14
II.- DIAGNOSTICO DE LABORATORIO	21
a. OBTENCION DE MUESTRA	22
b. DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO	23
c. DIAGNOSTICO INMUNOLOGICO	27
III.- PRONOSTICO	49
IV.- DISCUSION	50
V.- CONCLUSIONES	53
IV.- BIBLIOGRAFIA	55

INTRODUCCION

En la actualidad, el uso desmedido de los antibióticos ha ocasionado el aumento de enfermedades que antes eran poco conocidas.

La diarrea es una complicación común del uso de antibióticos que, en la mayoría de los casos, se presenta como un cuadro benigno y autolimitado; sin embargo, en el 10 % de los afectados puede evolucionar a colitis, que puede ser inespecífica o pseudomembranosa.

Los cambios metabólicos sufridos por el desequilibrio microbiano, como el potencial redox y el pH, favorecen el sobrecrecimiento de microorganismos potencialmente patógenos que normalmente forman parte de la flora intestinal. Estos cambios se atribuyen a la pérdida de la flora habitual y a que los antibióticos tienen mayor impacto sobre la flora anaerobia, que generalmente sobrepasa a la aerobia.

La mayoría de los casos de diarreas relacionadas con antibióticos son causadas por las toxinas de Clostridium difficile, esto ha llevado a buscar el desarrollo de nuevas técnicas de laboratorio con el objeto de hacer un diagnóstico más rápido y acertado de la enfermedad.

Es importante mencionar que algunas de las técnicas ya son lo suficientemente confiables y rápidas como para detectar con seguridad a Clostridium difficile en el padecimiento.

Por lo anteriormente referido, el objetivo del presente trabajo es dar a conocer un panorama completo de las nuevas técnicas de laboratorio,

tanto de aislamiento, identificación, detección de toxinas, y pruebas epidemiológicas para Clostridium difficile.

I.- GENERALIDADES

a.- TAXONOMIA Y MORFOLOGIA.

a.1 TAXONOMIA

El género CLOSTRIDIUM del latín clostridium = huso, se encuentra clasificado en la sección trece de la novena edición del Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey, de acuerdo a su morfología y tinción de Gram.

El microorganismo al cual se hace referencia en el presente trabajo, se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera:

Familia: Bacillaceae

Género: Clostridium

Especie: difficile

Hall y O'Toole en 1935 encontraron que Clostridium difficile formaba parte de la flora intestinal en el período neonatal y lo denominaron así, debido a lo inusual y difícil que era encontrarlo para su aislamiento y estudio (24). Estos investigadores notaron que la bacteria producía una "neurotoxina", así la definieron, porque el sobrenadante libre de células de cultivos líquidos eran mortales cuando se inyectaban en cerdos de guinea o en conejos (2). En 1974 Hafiz observó que el microorganismo estaba muy difundido en la naturaleza y que la mayoría de las cepas producían la toxina anteriormente descrita, aunque había considerables variaciones entre las cepas con respecto a la cantidad de toxina producida (2).

Sin embargo, no fué sino hasta 1978 cuando George y Bartlett asociaron a esta bacteria con la colitis secundaria a antibióticos en el modelo animal experimental y en humanos (23).

a.2 MORFOLOGIA.

De la misma manera que las otras bacterias pertenecientes a este género, el microorganismo en cuestión es un bacilo Gram positivo, anaerobio obligado y formador de esporas; generalmente móvil debido a la presencia de flagelos peritricos, mide aproximadamente de 0.5 a 1.9 micras de ancho por 3.0 a 6.9 micras de largo; sus extremos son redondeados, algunas cepas forman cadenas consistentes de 2 a 6 células alineadas una tras otra.

Sus esporas son ovales, subterminales, (rara vez terminales), que hinchon la célula, son altamente resistentes a cambios ambientales y a desinfectantes comunes; son eliminadas sólo por glutaraldehído alcalino y dióxido de cloro, pueden permanecer en superficies y fomites por largos períodos, lo cual ha sido corroborado en mobiliario hospitalario (24).

b. IMPORTANCIA CLINICA.

Clostridium difficile es el agente etiológico usual de la colitis pseudomembranosa y aproximadamente del 20 % de los casos de diarrea asociada a antibióticos (3, 10, 27).

La colitis pseudomembranosa en humanos es causada por el crecimiento excesivo del microorganismo en el colon, generalmente después de que la flora se ha alterado con la terapia antimicrobiana (24). En general, los antimicrobianos por vía oral causan colitis con más frecuencia que los administrados por vía parenteral, debido a que los antibióticos alcanzan concentraciones suficientes en el colon para inhibir el crecimiento de las bacterias anaerobias en general, pero no de Clostridium difficile en particular, y son principalmente los que originan el desarrollo excesivo del microorganismo y, por tanto, grandes cantidades de toxina (20, 28).

Un caso muy similar puede producirse en hamsters y varios otros roedores por administración de antibióticos, pero a las ratas y a los ratones no los afecta (24).

Desde la era preantibiótica se conoce a la colitis pseudomembranosa, pero se le había relacionado con cirugía abdominal; sin embargo, a partir de 1950 hay pocos casos publicados secundarios a cirugía y en cambio cada vez hay más informes que la relacionan con los antimicrobianos.

Los primeros antibióticos a los que se les atribuyó la producción de la enfermedad fueron tetraciclina y cloramfenicol; sin embargo, a la mayor parte de los antimicrobianos se les ha relacionado con ella y en la última década la lincomicina, la clindamicina, la ampicilina y las cefalosporinas, han sido las más frecuentemente mencionadas (20).

La enfermedad se presenta más en adultos que en niños, sobre todo en mujeres mayores de 60 años. Se ha reportado la colonización por Clostridium difficile en neonatos, detectándose a partir de los cinco días de vida, el número de portadores asintomáticos a esta edad oscila entre el 2 - 52 % (2, 20, 28). En adultos el estado de portador varía entre 2 - 6 %.

El riesgo de ser portador, aumenta si existe el antecedente de haber estado hospitalizado; en este sentido se refieren porcentajes hasta del 21 % en adultos y en niños menores de un año hasta de 71 % (28).

c. REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES Y MEDIOS DE CULTIVO.

c.1 FUENTES DE AISLAMIENTO.

La investigación de varios métodos para el cultivo del microorganismo ha hecho posible la detección de las principales fuentes de aislamiento, entre - las cuales encontramos:

a).- Materia fecal de la mayor parte de los enfermos que padecen la enfermedad.

b).- Centros hospitalarios (Mulligan, 1980) (En manos y heces del personal sano del hospital y en el mobiliario del mismo como son: colchones, ropa - de cama, lavabos, sanitarios, pisos, paredes).

c).- Estiércol de caballos, camellos y burros (Hafiz y Oakley, 1976).

d).- Heces de perros, gatos y pájaros domésticos (Borriello, 1983).

e).- Tracto genital humano (Hafiz, 1975).

f).- Heces de humano sin diarrea (Viscidi, 1981; Stark y Lee, 1982; Finegold, 1983).

g).- Sedimento marino (Matches y Liston, 1974).

h).- Suelo y arena (Hafiz y Oakley, 1976).

i).- Raramente en sangre de humanos con infecciones pirogénicas (Smith - y King, 1962; Alpern y Dowell, 1971; Finegold, 1975; Gorbach y Thadepalli, - 1975 y Lewis, 1980) (2, 24).

c.2 TRANSMISION.

En cuanto a la transmisión, se ha demostrado en modelo animal la adquisi-

ción de Clostridium difficile por contacto directo o a partir del medio ambiente contaminado. En centros hospitalarios hay evidencia de transmisión - de persona a persona o por fomites.

Se reconocen como factores de riesgo para presentar la enfermedad:

- 1).- Estancia hospitalaria prolongada.
- 2).- Haber permanecido en pabellones quirúrgicos.
- 3).- Internamiento en salas con hacinamiento.
- 4).- Haber recibido como tratamiento, múltiples antibióticos de amplio espectro.
- 5).- Antecedentes de infección (28).

c.3 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES.

Para el aislamiento de esta bacteria, a partir de muestras de materia fecal, se requieren en general medios de cultivo selectivos, a los cuales - se les pueden adicionar aminoácidos como: prolina, ácido aspártico, leucina, trionina, valina, fenil alanina, metionina, e isoleucina; que se utilizan - para incrementar su crecimiento.

Entre los productos de fermentación se encuentran los ácidos acético,- isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, e isocaproico, así como isobu tanol y hexanol (24, 28).

No se presenta digestión de la leche ni producción de lecitinasa ni de lipasa (12).

Condiciones de Incubación.- La temperatura óptima de crecimiento es de 30°C a 37°C, aunque también ocurre entre 25°C - 45°C.

En cuanto al tiempo más apropiado de incubación es de 48 horas.

Por ser un microorganismo anaerobio obligado requiere condiciones de anaerobiosis para su desarrollo óptico, para lograr esta atmósfera se requiere de 90 % de H_2 y un 10 % de CO_2 (3, 6, 12, 13).

En el laboratorio se pueden utilizar diferentes sistemas de anaerobiosis como son:

- a).- Jarra de anaerobiosis.
- b).- Cámara de guantes anaeróbica.
- c).- Técnica del tubo rodado.

- a).- Jarra de anaerobiosis.

Una jarra de anaerobiosis es un recipiente cilíndrico de plástico, vidrio, o metal, con tapa metálica o plástica, que cierra herméticamente, algunas tapas tienen ventanillas o válvulas por donde el aire puede evacuarse y se añade una mezcla gaseosa anaerobia. Si se usa generador Gas Pack, la válvula no es necesaria.

En el mercado existen diferentes tipos de jarras de anaerobiosis, sin embargo, la más utilizada es la de Gas Pack con generador descartable de $H_2 - CO_2$.

El fundamento químico es el mismo para todas ellas, consiste en hacer reaccionar todo el oxígeno presente con el hidrógeno que se ha adicionado al sistema para formar agua, en presencia de un catalizador (paladio).

b).- Cámara de guantes anaeróbica.

Consiste en una cámara de gas sellada, con puertas en forma de guantes y una cerradura para la transferencia de materiales dentro y fuera de la cámara. La cámara se llena con una mezcla de gases que contiene 85 % de N_2 , - 10 % de H_2 y 5 % de CO_2 , se hace recircular una atmósfera que contiene hidrógeno a través del catalizador paladio para quitar el oxígeno restante del interior de la cámara.

La humedad relativa en la cámara deberá ser de 70 a 85 %, que se podrá medir con un hidrómetro. Si ésta no fuera la requerida, podrá mantenerse con la ayuda de gel desecante de óxido de silicio, el cual puede usarse nuevamente después de calentarlo de 2 a 3 horas de 150° - 200° C, éste es de color azul si está deshidratado.

c).- Técnica del tubo rodado.

Este sistema se utiliza más para estudios de investigación, debido a - que se requiere equipo especial poco accesible para un laboratorio de rutina.

El medio de cultivo utilizado es pre-reducido, se hierve para quitarle el oxígeno disuelto y se guarda en tubos con tapa de caucho butílico bajo - gas libre de oxígeno. Antes de esterilizarse se le adiciona un agente reductor (clorhidrato de cisteína) para mantener un bajo potencial de oxidoreducción. Ya estéril, se usa un rodillo giratorio para formar una capa delgada sobre la superficie interna del tubo.

El tubo rodado se convierte en su propia cámara de cultivo anaeróbico y se puede incubar en condiciones normales (12, 13).

c.4 MEDIOS DE CULTIVO.

En la actualidad se encuentran gran variedad de medios de cultivo para Clostridium difficile y esto es gracias a las investigaciones realizadas durante varios años (8).

Los que se han utilizado hasta la fecha satisfactoriamente son:

- 1).- Agar Sangre.
- 2).- Medio CFA (Cicloserina-Fructosa-Agar).
- 3).- Medio CCFA (Cicloserina-Cefoxitina-Fructosa-Agar).
- 4).- Medio TCCFA (Taurocolato de sodio-Cicloserina-Cefoxitina-Fructosa Agar).

Estos se han utilizado debido a la selectividad de sus componentes y a que su índice de recuperación es alto (3).

CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS.

Agar Sangre.

Colonias circulares, de 2 - 5 mm de diámetro, ocasionalmente rizadas, planas o ligeramente convexas, opacas, grisáceas, tienen una superficie sin brillo, no hemolíticas, complementando el medio con hemina y vitamina K, presentan fluorescencia amarillo verdosa bajo luz ultravioleta después de 48 - horas de incubación (24).

Medios CFA, CCFA, TCCFA.

Colonias de 2 - 3 mm de diámetro, circulares de color amarillo, planas,

de bordes ligeramente filamentosos, translúcidas, presentan cierta fluorescencia de color amarillo bajo luz ultravioleta.

Debido a la presencia de algunos productos metabólicos, el pH del medio se incrementa y el indicador (rojo neutro) vira, el cambio observado es de anaranjado a amarillo.

El taurocolato de sodio aumenta la esperulación, en el caso del medio-TCCFA (3, 28).

d. CONSTITUCION ANTIGENICA Y PROPIEDADES INMUNOLOGICAS.

Después de varios estudios hechos sobre la estructura antigénica de Clostridium difficile, se ha demostrado que posee dos carbohidratos que le dan especificidad inmunológica.

Uno de ellos se encuentra en la pared celular y su análisis químico - demuestra que está formado de glucosa, manosa, galactosamina y fósforo, estando en mayor proporción la glucosa.

El otro se ha extraído de la membrana celular y está constituido por glucosa, glucosamina, fosfatos y ácidos grasos, encontrándose también la glucosa en mayor proporción.

Al parecer, el fósforo y los ácidos grasos no forman parte de las determinantes antigénicas de dichas estructuras, debido a que se han separado del resto sin que éstas cambien su poder antigénico (2).

Rifkin y colaboradores demostraron que al poner en contacto los carbohidratos antes mencionados con suero anti- Clostridium sordellii reaccionan, pensándose que Clostridium difficile y Clostridium sordellii comparten determinantes antigénicas (2, 19, 23).

Como se menciona a continuación, el microorganismo produce dos tipos de toxinas, la A y la B. Se ha demostrado la presencia de anticuerpos contra - ambas toxinas, pero en casos agudos el paciente posee mayor cantidad contra la toxina B que contra la A (2, 19).

e.- FACTORES DE VIRULENCIA.

Sumándose a estas importantes toxinas de Clostridium difficile, A y B, las cuales representan el mayor factor de virulencia, se han descrito otros posibles factores. Estos incluyen fimbrias con la capacidad de asociarse con células del intestino y/o mucosas, la producción de una cápsula, la secreción de enzimas hidrolíticas, la producción de otras toxinas (tales como una actín-ADP-ribosiltransferasa específica de algunas cepas) y la controversial posibilidad de la producción de una segunda enterotoxina (4).

e.1 TOXINAS A y B.

Se ha revisado exhaustivamente la actividad fisicoquímica y biológica de estas toxinas.

Ambas toxinas son extremadamente grandes (20). La toxina A tiene un peso molecular en el rango de 400,000 a 600,000, y la toxina B entre 360,000 y 500,000. En condiciones de desnaturalización, ambas tienen un peso molecular mayor de 250,000, recientemente se encontró que la toxina B contiene una subunidad con un peso molecular aproximado de 50,000 (4).

En publicaciones recientes, Torres y Lonroth, proponen la existencia de dos formas de toxina B, la forma 1, la cual tiene características de la toxina B descrita en la mayoría de los trabajos (28) y la forma 2, que es de mucho más bajo peso molecular (4).

Aunque la toxina A, que es la enterotoxina y la toxina B con la actividad de citotoxina tienen pesos moleculares muy similares (20), difieren en cuanto a sus propiedades físicas y actividad biológica.

La toxina A es estable en un intervalo de temperatura entre -20° y 37°C durante 4 semanas, termolábil, estable en rangos de pH entre 4 y 10, se inactiva a pH más ácido o en presencia de tripsina y quimotripsina.

La toxina B no pierde su actividad a temperatura de -70°C , es termolábil, inestable a pH de 4 y 9, estable a pH neutro, se inactiva con tripsina, quimotripsina y amilasa (28).

La toxina B despierta en forma más temprana la respuesta humoral. Es posible medir niveles de toxina B en heces, pero no de la toxina A. Estas toxinas son letales para algunos roedores que han servido como modelo experimental para Clostridium difficile (24).

e.2.- EVIDENCIA DE UNA SEGUNDA ENTEROTOXINA.

En 1984, Banno y sus colaboradores describen una proteína inestable para Clostridium difficile, que era enterotoxigénica, pero no hemorrágica.

Desde entonces han habido otras publicaciones donde reportan enterotoxinas similares no hemorrágicas (4).

Nichell y colaboradores afirman que una sustancia tóxica similar a la de Banno fué evidente en sus experimentos, pero solamente estuvo presente una vez, después de varios intentos. Más recientemente, Giuliano describe una enterotoxina no hemorrágica distinta de la toxina A que tiene un peso molecular de 45,000 daltones, determinado por el método de PAGE, electroforesis en gel de poliacrilamida (21, 22). El análisis de esta proteína por cromatografía de líquidos (HPLC), demuestra que está contaminada con otras proteínas, incluyendo la proteína reactiva en látex (la cual demostraron que es distinta de la toxina A y de la B).

En un análisis más reciente, se filtraron varios cultivos de Clostridium difficile y se corrieron por cromatografía de líquidos, las fracciones se eluyeron en cloruro de sodio entre 0.42 y 0.63 molar, concentración que fué distinta a la de la toxina A, la cual eluye entre 0.27 y 0.35 molar.

Los puntos de elución bajo esas condiciones cromatográficas, demuestran que esta proteína es distinta de la molécula de bajo peso molecular (52,000 daltones) descrita por Rihn (4).

e.3.- OTROS FACTORES TOXIGENICOS.

Se han descrito últimamente otros dos factores toxigénicos. El primero es una proteína de alto peso molecular distinta de las toxinas A y B, que causa cambios en el potencial eléctrico en segmentos aislados del intestino de conejo. Para determinar qué factor juega un papel en este caso, se han tenido que examinar un número grande de cepas toxigénicas y no toxigénicas.

El segundo factor es una actin ADP-ribosil transferasa específica, detectada en una de las 15 cepas examinadas. Esta enzima, que tiene un peso molecular de 43 Kd, modifica covalentemente a las células productoras de enzima, de manera similar a la toxina C₂ de cadena larga de Clostridium botulinum. Aunque los productos aislados de esta enzima fueron de pacientes con colitis pseudomembranosa, los detalles dados acerca de otras cepas examinadas fueron insuficientes para indicar cualquier relación de la actin ADP-ribosil-transferasa específica con la virulencia. Estas observaciones preliminares implican que pocas cepas de Clostridium difficile producen esta enzima (4).

e.4.- OTROS FACTORES DE VIRULENCIA.

a.- ADHESION.

La adhesión a células huésped se conoce por ser importante en la expresión de virulencia de muchos patógenos. El aislamiento de Clostridium difficile a partir de lavados de tejido intestinal humano se demostró por primera vez en 1979 y la asociación con tejido cecal de hamsters en 1984.

Desde entonces se ha comparado la capacidad de una cepa avirulenta no toxigénica, una cepa altamente virulenta toxigénica y una pobremente virulenta toxigénica de Clostridium difficile para adherirse a diferentes regiones del tracto intestinal de hamsters pretratados con clíndamicina (4).

La cepa altamente virulenta toxigénica se adhiere a la mucosa intestinal significativamente mejor que las otras dos. Es posible valorar el papel de la toxina en asociación con la mucosa, después de administrar una preparación de la toxina de una cepa no toxigénica avirulenta, en forma intracecal a animales. Con los datos obtenidos en los experimentos anteriores, se ha demostrado que existen diferencias entre las cepas, en la capacidad de asociarse con la mucosa intestinal y en la capacidad de producción de toxina in vivo (4).

Se han realizado estudios preliminares sobre la capacidad de Clostridium difficile de adherirse in vitro a células de cultivos de líneas celulares de adenocarcinoma HT-29 o a cultivos de células epiteliales de humanos (HCEC), recuperadas de especímenes quirúrgicos, demostrando que no había una relación significativa a las células HT-29, pero sí había relación con las HCEC, sin tener en cuenta la virulencia o el potencial toxigénico de las cepas (10).

Las cepas de C. difficile examinadas no se adherían directamente a las membranas de HCEC, pero sí al material extracelular. Estas observaciones — iniciaron la búsqueda de factores específicos del potencial de adhesión. En esta búsqueda se descubrió que algunas cepas de C. difficile poseen fimbrias. Estas miden de 4 - 9 nm de diámetro y 6 micras de largo, parece ser que comienzan en los polos de la célula. El papel de estas fimbrias en la colonización y subsecuente expresión de virulencia de C. difficile, es confuso.

b.- CAPSULA.

Para muchas bacterias la posesión de una cápsula es un importante factor de virulencia. La posibilidad de que Clostridium difficile pueda producir material capsular es intrigante.

Trabajos recientes han demostrado que C. difficile requiere opsonización para una fagocitosis significativa, esto indica la presencia de un factor antifagocítico sobre la bacteria. Algunos procedimientos para eliminar carbohidratos de la superficie celular no han tenido éxito sobre la extensión de la fagocitosis; este resultado permite a los investigadores sugerir que una cápsula de polisacáridos puede ser el factor antifagocítico. Hay — evidencias preliminares de que algunas cepas de C. difficile producen material propio de una cápsula in vitro, que es similar, en algunas consideraciones, a la recientemente descrita pequeña cápsula de Bacteroides fragilis. El significado de estas observaciones necesita determinarse, especialmente por un examen en el microscopio electrónico, de una cepa toxigénica altamente virulenta y una toxigénica pobremente virulenta de C. difficile y detectar el material capsular extracelular (4).

c.- ENZIMAS HIDROLITICAS.

Sobre este tema se han realizado pocos trabajos de investigación. Hafiz seleccionó 21 cepas para actividad de hialuronidasa y encontró que todas ellas eran positivas, también encontró que la producción de hialuronidasa variaba de cepa a cepa. Se reconoció que de las seis aisladas solamente cinco fueron toxigénicas. Las seis aisladas también se examinaron para detectar la actividad de desoxirribonucleasa y se encontró negativa. En un estudio sobre enzimas hidrolíticas de bacterias anaerobias aisladas de infecciones humanas, Steffen y Hentges examinaron un aislamiento de C. difficile y encontraron que fué positivo para hialuronidasa, condroitin sulfatasa, gelatinasa y colagenasa, pero fué negativa para heparinasa, fibrinolisisina, lecitinasa y lipasa (4).

Popoff y Dodin seleccionaron 25 cepas de C. difficile aisladas de niños sanos y de niños con enterocolitis necrosante o colitis hemorrágica, para estudiar la actividad de neuraminidasa y encontraron nueve de ellas positivas.

En un análisis de tres cepas altamente virulentas, tres pobremente virulentas y cinco no toxigénicas avirulentas, se encontró que ocho cepas eran positivas para hialuronidasa, 10 positivas para condroitin-4-sulfatasa, 10 para heparinasa, y 7 para colagenasa. (ver la siguiente tabla) tabla 1 (4).

ENZIMAS HIDROLITICAS DE Clostridium difficile.

CEPA	TOXIGENICIDAD	VIRULENCIA	HIALURONIDASA	CONDROITIN 4-SULFATASA	HEPARI- NASA	COLAGENASA
2B	+	ALTA	+	+	S	+
B-1	+	ALTA	+	+	+	S
PT	+	ALTA	+	+	S	S
Tra 5/5	+	BAJA	+	+	+	S
MA	+	BAJA	+	+	+	S
Bat	+	BAJA	-	-	S	-
N-1	-	AVIRULENTA	+	+	+	-
Kohn	-	AVIRULENTA	-	-	+	-
RY	-	AVIRULENTA	+	+	S	-
PN	-	AVIRULENTA	S	S	+	-
WS	-	AVIRULENTA	+	+	+	S

TABLA 1.

Nota: S = reacción positiva a la semana.

II. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

El protocolo de estudio de los pacientes con colitis pseudomembranosa debe iniciarse con pruebas como búsqueda de leucocitos en moco fecal y sangre oculta en heces, si no hay sangrado macroscópico aparente.

El diagnóstico definitivo de la enfermedad, se hacía hasta hace poco por rectosigmoidoscopia, en la cual se puede apreciar la mucosa edematosa, hiperemia con ulceraciones superficiales y placas blancoamarillentas de 1 a 5 cm de diámetro (pseudomembranas) adosadas a la membrana, éstas pueden llegar a unirse y cubrir grandes regiones del intestino (20, 28).

La rectosigmoidoscopia tiene la limitante de que si las lesiones están más allá del recto, no podrán verse.

Fakety y colaboradores encontraron que el 5 al 10 % de las pseudomembranas se localizan más allá de la flexión esplénica (2, 28).

Actualmente es conveniente efectuar biopsia rectal para poder observar los cambios microscópicos sufridos por la mucosa, éstos van de acuerdo con la severidad del padecimiento.

Al principio de la enfermedad se observan focos de necrosis epitelial, con formación de poca cantidad de exudado. La siguiente etapa presenta destrucción de las glándulas de la mucosa y la sustitución de las pseudomembranas, las cuales se componen de leucocitos polimorfonucleares, fibrina y detritus celulares (20).

En la última etapa de la enfermedad, que es la más severa, se encuentra destrucción estructural completa y la pseudomembrana firmemente unida a la mucosa.

Por otro lado, también es importante realizar estudios de laboratorio - clínico, y debido a que cada día es más frecuente la enfermedad, se han hecho un sin número de investigaciones, las cuales han dado como resultado una gran cantidad de métodos rápidos y más seguros para el diagnóstico.

Estos estudios son de tipo bacteriológico y de tipo inmunológico; los primeros enfocados a la detección de Clostridium difficile y los segundos a la - detección de sus toxinas y/o anticuerpos neutralizantes.

a.- OBTENCION DE MUESTRA.

Lo mismo que para otras bacterias anaerobias, la buena selección, recolección y transporte de muestras clínicas es muy importante para el diagnóstico - de laboratorio (12, 13).

Una alternativa para la recolección de muestras actualmente, es tomar - ésta directamente del recto con un hisopo estéril y depositarlo en un tubo que contenga un medio de transporte. Esta alternativa puede usarse en estudios - epidemiológicos o bien, para facilitar el cultivo de muestras fecales de todos los pacientes, sin tener en cuenta la disponibilidad. Los hisopos rectales se han usado para estudios de vigilancia de otros patógenos entéricos, pero su - sensibilidad para patógenos anaerobios no se había determinado bien (17).

Los hisopos rectales son inadecuados para las pruebas de toxinas, porque la cantidad de muestra obtenida es muy pequeña (11, 13).

Normalmente se requiere una muestra fecal reciente para el cultivo y otra para el ensayo de toxinas, si es líquida se requerirán de 25 a 50 ml y si es formada, alrededor de 50 gramos (11).

b.- DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO.

b.1 CULTIVOS PARA AISLAMIENTO.

Desde que Clostridium difficile se pudo aislar de muestras fecales de individuos sin diarrea, los cultivos para este microorganismo se han hecho un factor primario en las investigaciones epidemiológicas. El aislamiento de esta bacteria requiere de medios selectivos, como ya se mencionó anteriormente. Los medios más frecuentes para su aislamiento son: (cicloserina-fructosa-agar). CCFA (cicloserina-cefoxitina-fructosa- agar), TCCFA (taurocolato de sodio-cicloserina-cefoxitina-fructosa-agar), los cuales deben incubarse a 37°C, bajo condiciones de anaerobiosis, durante 48 horas. Estos medios además de servir como medios de aislamiento, también son medios diferenciales (3, 5, 8, 28).

Recientemente Bartley y Dowell (8) demostraron que una modificación de los medios anteriores son cicloserina manitol agar (M-CMA), y cicloserina - manitol sangre agar (M-CMBA), fueron superiores en cuanto a la recuperación del microorganismo a partir de muestras fecales. Sin embargo, otros estudios hechos en la Universidad de Nebraska tuvieron mucho más éxito con el medio de cicloserina cefoxitina agar, puesto que de 321 muestras clínicas estudiadas, 37 fueron positivas para C. difficile, de las cuales 34 (91.89 %) desarrollaron en M-CCA, 21 (56.76 %) en M-CMA y 20 (54.05 %) en M-CMBA.

En la tabla 2 se ve la concordancia de muestras que desarrollaron en los tres medios empleados.

COMPARACION DE MEDIOS PARA LA RECUPERACION DE C. DIFFICILE DE MUESTRAS FLCALES.

HI-CCA	M-CNBA	HI-CMA	CULTIVOS POSITIVOS	
			No.	%
+	+	+	14	38
+	-	-	12	32
+	+	-	4	11
+	-	+	4	11
-	+	+	2	5
-	-	+	1	3

TABLA 2.

Por los datos anteriores se sugiere que el medio cicloserina cefoxitina agar es superior a los otros medios en cuanto al aislamiento, además de que técnicamente es mucho más fácil de preparar, aunque éste no es un medio diferencial y no es un medio específico para Clostridium difficile, pocas bacterias pueden crecer fácilmente en él (8).

Otra alternativa en cuanto al cultivo del microorganismo en cuestión, es el uso de hisopos rectales para la toma de muestra, depositándola en un medio de transporte, se remueve el hisopo del tubo y se pasa a otro que contenga solución salina estéril, se agita y de esta muestra se inoculan 0.5 ml en tubos Vacutainer (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Rutherford N. J) que contengan 18.5 ml de medio líquido anaerobio pre-reducido suplementado con peptona (Becton Dickinson and Co.), al cual se le adiciona asépticamente cefoxitina (CSP). Este medio se debe incubar de 48 - 72 horas a 35° C. De la suspensión remanente se puede inocular un nuevo medio de cultivo Agar Difficile selectivo y se incuba anaeróbicamente en una jarra de Gas Pack, durante 48 horas a 35° C. El Agar Difficile contiene cicloserina 0.25 mg/ml, cefoxitina 16 mg/ml, y una suspensión de eritrocitos al 5 % en una infusión de agar base cerebro corazón (17).

b.2 IDENTIFICACION BIOQUIMICA.

Aunque con el desarrollo obtenido en los medios de cultivo selectivos podemos realizar una identificación presuntiva del microorganismo, por las características propias de las colonias en cada medio, es necesario realizar una serie de pruebas bioquímicas para diferenciar la especie. En las siguientes tablas se encuentra el comportamiento de Clostridium difficile frente a

algunas de ellas.

Durante el metabolismo bacteriano se obtienen varios productos de fermentación, siendo los principales, los ácidos: acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, isocaproico. Es importante mencionar que C. difficile es una de las pocas especies que producen ácidos valérico e isocaproico.

FERMENTACION DE HIDRATOS DE CARBONO.

GLUCOSA	+
MALTOSA	-
LACTOSA	-
SACAROSA	-
MANITOL	+
FRUCTOSA	+

OTRAS PRUEBAS BIOQUIMICAS

HIDROLISIS DE GELATINA	+
HIDROLISIS DE CASEINA	-
PRODUCCION DE INDOLO	-
LECITINASA	-
LIPASA	-
UREASA	-
HEMOLISIS	-
REDUCCION DE NITRATOS	-

c.- DIAGNOSTICO INMUNOLOGICO.

c.1 INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA.

Algunos investigadores han adoptado la técnica de inmunofluorescencia directa para la detección de Clostridium difficile a partir de las muestras fecales, haciendo extensiones de éstas, fijándolas con etanol y cubriéndolas con anticuerpos anti- Clostridium difficile marcados con isotiocianato de fluoresceína, se observan las preparaciones en el microscopio de luz ultravioleta y sólo se detectará fluorescencia si el microorganismo está presente (29).

Las técnicas de anticuerpos fluorescentes se basan en la especificidad de combinación del antígeno con el anticuerpo correspondiente y en las propiedades fisicoquímicas de ciertos colorantes que tienen la capacidad de absorber luz de pequeña longitud de onda y emitir instantáneamente una longitud de onda mayor, a estos colorantes se les llama fluorocromos, Figura 1 (25).

La fluorescencia es la emisión de luz de un color (de una longitud de onda), mientras una sustancia es irradiada con luz de un color diferente. Los fluorocromos más empleados en los laboratorios clínicos son la rodamina y la fluoresceína y de éste, el isotiocianato de fluoresceína, que se fija con facilidad a las proteínas mediante enlaces covalentes a un pH alcalino, su absorción máxima es a 517 nm donde emite su color verde característico. La técnica de la inmunofluorescencia fue introducida por Coons, quien empleaba beta antraceno, un compuesto fluorescente de color azul, poco después su grupo empleó sueros antiespecie conjugados con fluoresceína, la cual emi-

te una luz verde que puede ser diferenciada de la fluorescencia de color azul de muchos tejidos.

INMUNOFLOURESCENCIA DIRECTA

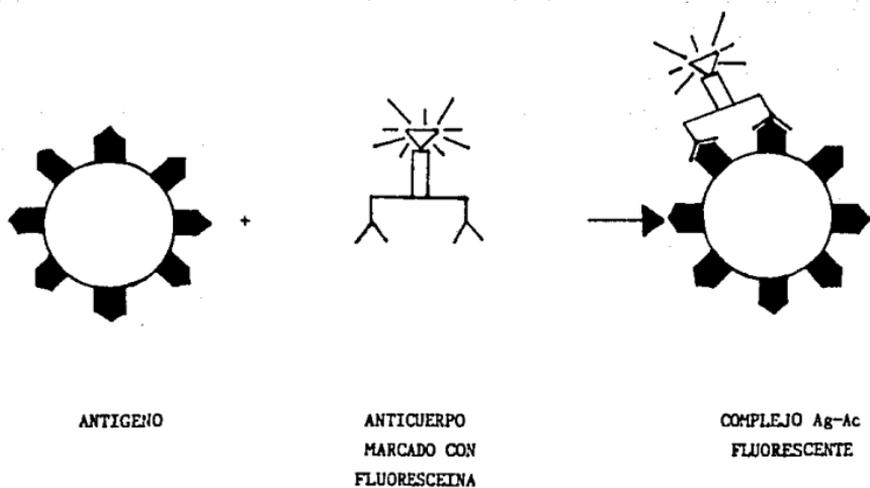


FIGURA 1

c.2 ELISA (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY).

En estudios hechos por Yolken y colaboradores, se demostró que con una variante del método de ELISA, era posible detectar Clostridium difficile en las evacuaciones de pacientes afectados (33).

Utilizaron placas de poliestireno recubiertas de anticuerpos anti-Clostridium difficile, adicionándoles una suspensión de las heces, después de incubar y lavar se adicionó otro anticuerpo contra Clostridium difficile ahora preparado en cabra, finalmente se agregó otro anticuerpo antigamaaglobulina de cabra marcada con fosfatasa alcalina y como revelador se utilizó p-nitrofenilfosfato.

Encontraron resultados muy satisfactorios pues obtuvieron que el 100 % de sus muestras positivas, comparadas con el cultivo de tejidos para ensayar su citotoxicidad, también fueron positivas (33).

En los últimos años los métodos inmunoenzimáticos han permitido el diagnóstico de muchas enfermedades. Se basan primordialmente en el empleo de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, cuya actividad catalítica sobre un sustrato específico, facilita la identificación y cuantificación del antígeno o anticuerpo en estudio. Una variante utilizada en estos métodos es el que se basa en la competencia que existe entre un antígeno marcado y uno no marcado, por unirse a una cantidad limitada de anticuerpo. Primeramente se lleva a cabo el acoplamiento físico o químico de una determinada cantidad de anticuerpo a una fase sólida que puede ser : poliestireno, polipropileno, o polivinilo. Después de ser adsorbido el anticuerpo, se agrega el antígeno marcado con la enzima y de manera simultánea una mezcla de antígeno marcado y la muestra problema, después de un período de incubación y de efectuar el lavado correspondiente, se adiciona el sustrato adecuado, se incuba nuevamente

y se mide la absorbancia del producto de la reacción enzimática. Se debe --
elaborar una curva patrón en la cual se extrapola el valor de las absorbancias
obtenidas y esto determinará la concentración (1, 25).

El inmunoensayo ELISA muestra ser una excelente promesa, pero su valor
práctico para los laboratorios clínicos dependerá del desarrollo comercial y
de su disponibilidad (1, 11).

c.3 DETECCION DE TOXINAS EN CULTIVO DE TEJIDOS.

La detección de la citotoxina de Clostridium difficile en muestras fecales de pacientes con diarrea o colitis pseudomembranosa debe ser rápida para el cuidado óptimo del paciente. La prueba de citotoxicidad en cultivo de tejidos es un procedimiento aceptado para la detección de dicha toxina dentro de las 24 horas de inoculación. De cualquier manera, puede haber retraso en la prueba por la llegada tarde de la muestra o si no se utiliza el cultivo celular adecuado. Este procedimiento resulta ser considerablemente confiable además de ser muy sensible ya que es posible detectar cantidades de hasta 500 ng de toxina/ml (9,14, 16).

Se han hecho varios estudios para determinar qué tipo de línea celular es el más apropiado para las toxinas de este microorganismo, entre las más utilizadas están las constituidas por células amnióticas humanas, células He-La (células de cáncer de cervix), de riñón de hamster (BHK-21), células McCoy, de riñón de conejo, fibroblastos pulmonares humanos (WI-38), de hepatoma de rata (MHC), células Vero, células de riñón de mono verde africano (AGMK) células de riñón de mono rhesus (RKK) y células MRC-5 (11, 16).

Un estudio hecho en el laboratorio provincial Cadham, Canadá, demostró que las células Vero y las McCoy son las mejores para la detección de toxinas de Clostridium difficile en filtrados fecales (16).

Los cultivos celulares se hicieron crecer en matraces apropiados, con medio Eagle mínimo esencial, al cual se le adicionaron L-glutamina, gentamicina y mycostatin, esta solución se llevó a un pH de 7.2 con bicarbonato de sodio y se le agregó suero de corazón fetal bovino inactivado, se le agregó tripsina y EDTA en amortiguador de fosfatos, las células viables quedaron como semilla

para crecimiento. Se utilizaron 30 muestras fecales que contenían C. difficile, éstas se diluyeron, se filtraron y después se hicieron diluciones conocidas. Las diluciones se aplicaron en los cultivos que ya previamente tenían de 18 a 24 horas de incubación, se incluyeron controles positivos y negativos, - estos problemas se incubaron a 37°C con 5 % de CO₂ y 98 % de humedad y después de 18 a 24 horas de incubación se examinaron los cambios sufridos en su morfología.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla número 5.

RESULTADOS OBTENIDOS EN DIFERENTES LINEAS CELULARES.

DILUCIONES FINALES	NUMERO DE TOXINAS POSITIVAS DE FILTRADOS FECALES DETECTADOS POR LAS LINEAS CELULARES				
	McCoy	Vero	MRC-5	AGMK	RMK
1/50	0	0	2	4	6
1/100 - 1/200	9	12	9	8	6
1/500	8	5	5	4	1
1/1000 - 1/2000	10	11	8	4	3
1/4000 - 1/8000	3	2	0	0	0
TOTAL DE FILTRADOS POSITIVOS	30/30	30/30	22/30	16/30	10/30
RESULTADOS NEGATIVOS	0	0	8	14	20

TABLA 5.

c.4 PRUEBA DE CITOTOXICIDAD EN CULTIVOS DE TEJIDOS.

En apariencia, la mayoría de las cepas toxigénicas de Clostridium difficile producen una citotoxina que causa efectos citopatotóxicos en ciertas clases de cultivos celulares, que pueden neutralizarse con antitoxina en un ensayo de neutralización de la toxina. Este ensayo no es una prueba para la enterotoxina de C. difficile, la cual puede detectarse con un modelo en hamsters. En general, la presencia de citotoxina en extractos de heces libres de células se relaciona con dicho microorganismo mediante una enfermedad intestinal. Sin embargo, la citotoxina puede detectarse en heces de individuos sanos, -- particularmente en niños o infantes menores de 1 año, a quienes asintómicamente los coloniza el microorganismo (13).

Para llevar a cabo esta técnica, las muestras fecales líquidas deberán -- centrifugarse, si son muestras sólidas o semisólidas se les adicionará diluyente de gelatina amortiguado, pH 7.0, o amortiguador salino de fosfatos (PHS), -- dejando la suspensión para que se extraiga durante toda la noche a 4°C, después se centrifuga y se guarda el sobrenadante. Este deberá filtrarse a través de una membrana de 0.45 micras. Con 0.1 ml de este filtrado, más 0.1 ml de diluyente de gelatina amortiguado se inocula el cultivo celular, que para esta -- prueba el más utilizado es el de fibroblastos pulmonares humanos (WI-38)..

Se debe observar el cultivo celular a las 4, 24 y 48 horas de incubación a 35°C. La mayoría de las células son positivas entre las 18 y 24 horas de incubación (11, 13).

Para la prueba de neutralización con antitoxina, se adicionan 0.2 ml de -- antitoxina polivalente de gangrena gaseosa (Lederle Laboratories, American Cyanamid Co., Pearl River, N. Y.), antitoxina de Clostridium sordellii (Leder-

le or Food and Drug Administration Bureau of Biologics, Rockville, Md.), o antitoxina de C. difficile (disponible de T. D. Wilkins, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg) a 0.2 ml de sobrenadante fecal libre de células y se mezclan (11, 13).

Posteriormente se debe inocular un tubo que contenga cultivo celular - WI-38 con 0.2 ml de la mezcla hecha con anterioridad, se incuba y se observan los efectos citotóxicos.

Si la toxina ha sido neutralizada, no deberán observarse efectos citotóxicos, uno de los más observados es que las células se vuelven redondas con radiaciones citoplásmicas (también llamado cambio actinomórfico) (11, 13).

También puede determinarse el título de la toxina haciendo varias diluciones del sobrenadante en diluyente de gelatina amortiguado, los resultados se relacionan con lo severo de la enfermedad. Este método no se usa mucho en los laboratorios de rutina debido al gran trabajo que representa (11).

c.5 CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (CIE).

Revisiones recientes han propuesto al método de contrainmunolectroforesis como un procedimiento para la identificación y detección de las citotoxinas de Clostridium difficile (11).

Ryan y colaboradores utilizaron este método pensando en desarrollar una prueba rápida y sensible que permitiera detectar las toxinas de C. difficile directamente de las evacuaciones de los pacientes. Los resultados que obtuvieron fueron buenos ya que demostraron que su sensibilidad era comparable con la empleada en el método de cultivos celulares (23). (TABLA 6).

Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que el método conduce a un alto porcentaje, 47 %, de resultados falsos positivos (32). Esto se debe a que la antitoxina empleada en el método contiene, además de los anticuerpos frente a las toxinas de C. difficile, anticuerpos contra antígenos de su superficie del propio microorganismo, de tal manera que aunque no estén presentes las toxinas, bastará que existan antígenos somáticos para que aparezcan líneas de precipitación.

Por otro lado, es importante mencionar que algunas especies de Clostridium, como C. sordellii y C. bifermentans, comparten determinantes antigénicas, por lo menos una, con C. difficile, por lo cual reaccionan con la antitoxina que se usa (2).

COMPARACION DE LA SENSIBILIDAD DE LOS METODOS CIE Y PRUEBA DE CITOTOXICIDAD
 EN CULTIVOS CELULARES PARA Clostridium difficile.

DILUCION DE TOXINA	CONTRAIMUNOELECTRO- FORESIS.	CITOTOXICIDAD EN CULTIVOS CELULARES.
Sin diluir	+	+
10^{-1}	+	+
10^{-2}	+	+
10^{-3}	+	+
10^{-4}	-	-
10^{-5}	-	-

TABLA 6.

c.6 PRUEBA DE AGLUTINACION EN LATEX.

En enero de 1986, Banno y colaboradores desarrollaron una prueba rápida de aglutinación en látex para la detección de la toxina A de C. difficile - (CDT Latex Test) (Marion Laboratories, Kansas City, MO). En marzo del mismo año, Lyerly y Wilkins reportaron que el equipo de los laboratorios Marion no reaccionaba con la toxina A, aunque era un método más rápido y sencillo que los otros. Ahora se sabe que la prueba de látex reacciona con cepas no tóxicas de C. difficile, tan bien como con las que producen toxina A y B (3, 11).

Sin embargo, se han seguido haciendo más estudios acerca de este método, Peterson y colaboradores reportaron que la prueba de CDT Latex parece ser - equivalente al ensayo de citotoxinas en cultivo de tejidos (3).

Para este método, las muestras fecales se mezclan con 0.5 ml de solución amortiguadora y se centrifugan. Dos gotas del sobrenadante se agregan a uno de los círculos de la placa de prueba, se agrega una gota del reactivo - de detección, el cual contiene partículas de látex recubiertas con anticuerpos de conejo, los cuales reaccionarán con el antígeno de C. difficile en - las muestras, y se mezclan. Se rotan por tres minutos. Si el antígeno de C. - difficile está presente en el sobrenadante fecal, se observará aglutinación en las partículas de látex, si no está presente no se observará dicha aglu- tinación, y la suspensión en el círculo de prueba aparecerá lechoso. Deberá introducirse en esta prueba también un control negativo, en el cual no debe- rá aparecer aglutinación (11, 13).

Al ser la prueba CDT Latex tan nueva, ha permitido la realización de va- rios estudios acerca de ella.

Miles y colaboradores (19) hacen una evaluación de esta prueba utilizando cepas de Clostridium difficile citotoxina positiva, citotoxina negativa, y otras bacterias que se había publicado daban reacción cruzada en esta prueba, como C. sporogenes, una cepa de C. botulinum proteolítica, y Pentostreptococcus anaerobius.

De 739 cepas, que representaban 78 especies de bacterias, 63 fueron anaerobias y 15 fueron facultativas.

Las 139 cepas de C. difficile citotoxina positiva, las 35 citotoxina negativa, una cepa de C. botulinum (proteolítica, tipo E), y 25 cepas de C. sporogenes dieron reacción positiva para la prueba de CDT Latex.

Estos resultados se pueden comparar con los de Lyerly los cuales indican que tanto las cepas toxigénicas como las no toxigénicas de C. difficile producen una proteína no toxigénica de aproximadamente 43,000 daltones, diferente de la toxina A, y que dicha proteína reacciona en la prueba de CDT Latex. También encontró que C. sporogenes y P. anaerobius producen un antígeno que contiene una subunidad de 43,000 daltones que da reacción cruzada, es una proteína que es bioquímica e inmunológicamente muy similar a la proteína de C. difficile que reacciona en la prueba de CDT Latex (15).

Kelly y colaboradores (10) realizaron otro estudio comparando la CDT - Latex Test, con el ensayo de citotoxina en cultivo celular y cultivo bacteriológico. Encontraron que de 40 pacientes que tenían diarrea asociada a Clostridium, 70 % fueron positivas para el ensayo de citotoxina, 78 % para la prueba de aglutinación en látex y 90 % para el cultivo bacteriológico. De 53 pacientes que no tuvieron diarrea asociada a Clostridium (CAD), 2 % fueron positivas para el ensayo de citotoxina, 8 % para prueba de aglutinación en látex y 4 % para el cultivo bacteriológico. TABLA 7.

COMPARACION DE RESULTADOS POR LOS METODOS DE AGLUTINACION EN LATEX DE CITOTOXINA Y CULTIVO BACTERIOLOGICO PARA PACIENTES CON Y SIN CAD.

PRUEBA	PACIENTES POSITIVOS			
	CON CAD		SIN CAD	
	n=40		n=53	
	Núm	%	Núm	%
CITOTOXINA	28	70	1	2
AGLUTINACION EN LATEX	31	78	4	8
CULTIVO	36	90	2	4

TABLA 7.

Los resultados sugieren que la prueba de aglutinación en látex puede usarse para el diagnóstico rápido de CAD, especialmente en laboratorios que no pueden realizar con facilidad cultivos celulares. Sin embargo, la detección de CAD se realiza mucho mejor cuando la prueba de látex se usa en combinación con el cultivo o el ensayo de citotoxinas.

c.7 SISTEMAS COMERCIALES PARA LA IDENTIFICACION DE Clostridium difficile.

Clostridium difficile puede identificarse presuntivamente en muchas instancias, por sus características de cultivo y su morfología celular, pero para tener una identificación definitiva se requieren pruebas adicionales. En la actualidad se han desarrollado varios sistemas comerciales para identificación de anaerobios, en forma de equipos (kits).

Head y Ratnam (7) comparan el API ZYM SYSTEM con otros métodos como son-API AN-Ident, API 20A, Minitex Anaerobe II y RapId-ANA SYSTEMS.

El API ZYM SYSTEM (Analytab Products, Plainview, N. Y.) es un micrométodo semicuantitativo que contiene 20 microescavaciones, las cuales contienen sustrato cromogénico deshidratado, para detección de las actividades enzimáticas desarrolladas correspondientes. En la línea de pruebas se inoculan las muestras y se incuban anaeróticamente a 37° C por 4 horas, después se agregan los reactivos para el sustrato cromogénico. Los resultados de las reacciones coloridas se indican en forma decreciente de la actividad enzimática y están graduadas en una escala de 0 a 5 en comparación con la carta control de color. De los otros kits evaluados por los autores mencionados, RapId-ANA (Innovative Diagnostic Systems, Decatur, Ga), AN-Ident y API 20A (Analytab Products), y Minitex Anaerobe II (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md), los dos primeros son similares a API ZYM en designación, función y detección de enzimas preformadas; en cambio, API 20A y Minitex usan sustratos para fermentación de carbohidratos y detección de enzimas similares a las pruebas convencionales que requieren de 24 a 48 horas de incubación antes de poder leer los resultados.

Los resultados obtenidos en este estudio se muestran en la tabla 8.

COMPARACION DE SISTEMAS COMERCIALES PARA IDENTIFICACION DE ANAEROBIOS CON EL API ZYM SYSTEM PARA IDENTIFICACION DE Clostridium difficile.

SISTEMA DE IDENTIFICACION	TIEMPO DE INCUBACION (h)	INTERPRETACION DE RESULTADOS	SIMPLICIDAD DE MANUFACTURA	SENSIBILIDAD (%)	REPRODUCIBILIDAD (%)
AN-IDENT	4	+	++	77.9	98.1
RapId-ANA	4	++	++++	88.6	100
Minitek	48	++	+	90.9	95.2
API 20A	48	+	++	95.5	98.8
API ZYM	4	++++	+++	100	100

TABLA 8.

Nota: + = pobre, ++ = favorable, +++ = buena, ++++ = mejor.

c.8 MARCADORES EPIDEMIOLOGICOS DE Clostridium difficile.

Se han identificado un extenso rango de marcadores epidemiológicos para Clostridium difficile. Estos se basan en las características fenotípicas del microorganismo, tales como resistencia a antibióticos, susceptibilidad a los bactericidas o a los bacteriófagos, patrones de proteínas electroforéticas y marcadores inmunológicos. Los métodos para determinar los marcadores genéticos incluyen plásmidos, análisis de DNA de restricción de endonucleasa y patrones de restricción de RNA ribosomal. Estos métodos se han aplicado a varias categorías de estudios epidemiológicos y han contribuido al mejor entendimiento de enfermedades asociadas a Clostridium difficile. Los métodos se basan, para su desarrollo, en el uso de proteínas marcadas con metionina (S³⁵) y un mecanismo automatizado de análisis por computadora, que han hecho posible el reconocimiento de 15 distintos tipos de C. difficile, basados en mejores patrones de proteínas radio-marcadas. Estas proteínas fueron de cepas específicas e inmunogénicas, demostradas por análisis de inmunotransferencia y de DNA de restricción de endonucleasa. Los estudios epidemiológicos revelan infecciones cruzadas entre pacientes, adquisición hospitalaria, y una relación directa entre síntomas y tipos de C. difficile.

Los reportes del grupo de casos de colitis asociada a antibióticos y los primeros resultados de los estudios en animales, sugieren que la contaminación del medio ambiente y las infecciones cruzadas, han sido importantes en la etiología de las epidemias, pero aún con pruebas convincentes para las infecciones hospitalarias éstas no han tenido sentido debido a la ausencia de esquemas confiables de tipificación. La introducción de métodos de tipifica-

ción deberá ser importante en las aplicaciones epidemiológicas y deberá valorarse la diferenciación entre el potencial patogénico y cepas no patogénicas (26).

Fue en 1982 cuando Wust usó una variedad de métodos para demostrar que una epidemia de colitis asociada a antibióticos en un hospital en Zurich fue causada por una cepa de C. difficile, sus descubrimientos fueron corroborados por Hachler y Wust en 1984 con el uso del método de bacteriófago descrito por Sell en 1983 (26).

Durante los cinco años pasados, se introdujeron varios esquemas de tipificación basados en distintos marcadores epidemiológicos de C. difficile.

PRUEBAS Y MARCADORES EPIDEMIOLOGICOS.

a).- Prueba de sensibilidad a antibióticos.

Los antibiogramas se han usado en la diferenciación entre cepas de C. difficile, pero son de valor limitado en estudios epidemiológicos. Los resultados in vitro han demostrado que las MICs de la mayoría de los antibióticos empleadas para C. difficile, se encuentran dentro de un estrecho rango y que las cepas tienen ambas características, altamente sensibles o altamente resistentes; sin embargo, algunas cepas tienen resistencia variable. Las cepas que son resistentes a eritromicina, rifampicina, cloranfenicol, tetraciclina y clindamicina pertenecen a un solo tipo, el W, y las cepas de otra sensibilidad o resistencia pertenecen a otro tipo diferente (18, 26).

b.- Prueba de susceptibilidad a los bactericidas y a los bacteriófagos, de cepas de Clostridium difficile.

Esta técnica fué primeramente desarrollada por Sell y se ha aplicado sucesivamente en estudios epidemiológicos. El número de estas marcas de sensibilidad se ha extendido y se han observado no menos de 40 patrones diferentes (26).

c.- Patrones electroforéticos de proteínas.

Se han usado varias preparaciones de proteínas celulares y superficiales de C. difficile como marcadores epidemiológicos de acuerdo a las diferentes proteínas separadas por SDS-PAGE (Sodio-Dodecil-Sulfato-Poliacrilamida-Gel-Electroforesis) (18, 21, 22, 27), seguidas de autorradiografía y de proteínas radio-marcadas (26).

d.- Marcadores Inmunológicos.

Los métodos que se usan como marcadores inmunológicos, son la inmunoelectroforesis cruzada y la inmunotransferencia (18, 21). Estos métodos se han usado en identificación e indicios de cepas responsables de epidemias, pero hasta aquí no hay forma de basarse en esquemas reales de tipificación. Los métodos de serogrupos se basan en aglutinación de células tratadas con formol con varios sueros de conejo.

En 1985 Deince desarrolló un método rápido de aglutinación basado en seis sueros adsorbidos. Algunos serogrupos son homogéneos, pero otros, particularmente el serogrupo A, son heterogéneos y consisten en cepas con menos de 12 patrones electroforéticos. La serotipificación se ha aplicado extensamente en estudios epidemiológicos. Los resultados inmunológicos de los laboratorios en los cuales se usan diferentes sueros, son difíciles de comparar debido a que carecen de reactivos estandarizados (26).

e.- Marcadores Genéticos.

El análisis de plásmidos fué el primero utilizado por Wust (26). Por consiguiente, este método puede usarse en cepas que contengan patrones de plásmidos específicos, pero su aplicación ha sido limitada, debido a que sólo del 30 - 60 % de las cepas de C. difficile poseen plásmidos (18, 21). Se ha aplicado el método de huellas dactilares (patrón) de restricción de endonucleasa (31), que aunque es útil y definitivo, es también complicado y consume mucho tiempo. Más recientemente, Wilson y Kuijper aplicaron las pruebas de RNA ribosomal a C. difficile (30).

f.- Uso de proteínas marcadas con Metionina (S^{35}).

Este método se basa en la incorporación de Metionina (S^{35}) en las proteínas celulares, la separación de estas proteínas se hace por SDS-PAGE y subsecuentemente por autorradiografía. Por el uso de este método se han detect

tado nueve tipos distintos de cepas, que se designaron A, B, C, D, E, W, X, Y, Z; más recientemente se han identificado seis tipos adicionales basados - en el método de proteínas radio-marcadas (26).

g.- Inmunotransferencia (IMUNOELOTTING).

Para determinar si las bandas de la prueba anterior eran específicas e inmunogénicas, se investigaron por inmunotransferencia determinantes antigénicas comunes y específicas de las nueve cepas estándar de C. difficile. Se consiguieron sueros de conejo contra cada una de las nueve cepas y antígenos homólogos y heterólogos de cada una de ellas y contra Clostridium sordellii y Clostridium septicum. Los resultados demostraron la presencia de proteínas comunes (C_1 , C_2 y C_3) entre los nueve tipos estándar con sueros heterólogos y homólogos; en suma, hubo respuesta de los tipos específicos con los sueros homólogos. Además, cuando las proteínas de C. difficile marcadas con metionina (S^{35}), fueron inmunotransferidas con sueros homólogos y heterólogos, la - inmunotransferencia y la autorradiografía demostraron la misma respuesta específica de cepa (18, 21, 26).

h.- Huellas dactilares en DNA (DNA fingerprinting).

El análisis de restricción bacteriana de DNA de endonucleasa (BRENDA) de C. difficile, se usó como una prueba epidemiológica adicional y confirmó las distintas observaciones entre varios tipos de cepas. La restricción de endo-

nucleasas BamHI, EcoRI, Sal I y Sma I producen bandas insuficientes para distinguir las de las demás cepas. Sin embargo, Hind III produce alta resolución en fragmentos de restricción de DNA y se seleccionó como la más confiable. - Los resultados demuestran que cada tipo de células pueden identificarse por proteínas radio-marcadas, pero también pueden distinguirse únicamente por - digestión del patrón de DNA (5, 26).

III.- PRONOSTICO.

Los pacientes más comunmente afectados son los inmunocomprometidos, la gente mayor y aquéllos que sufren una cirugía; aunque al mismo tiempo, hay portadores asintomáticos de Clostridium difficile y de sus toxinas entre los neonatos y los niños (26).

También se ha encontrado una alta incidencia de C. difficile en heces de niños que al nacer tienen bajo peso, o en los prematuros, que al haber nacido con un Apgar bajo requirieron cuidados especiales postnatales tales como oxigenoterapia y uso de incubadora al nacer (6).

La colitis pseudomembranosa puede ser mortal si el padecimiento no se reconoce a tiempo y se trata. La enfermedad tiene una mortalidad cercana al 20 % en pacientes mayores de 50 años y en enfermos crónicos, la muerte se debe generalmente a alguna de las complicaciones. En los casos benignos y en los pacientes jóvenes con tratamiento adecuado, el pronóstico es excelente.

En los niños la mortalidad es elevada (30 - 40 %). A pesar de que el cuadro haya sido grave, si el paciente se recupera, no quedan secuelas en el colon (20).

IV.- DISCUSION.

Desde la era preantibiótica se conoce a la colitis pseudomembranosa, causada por Clostridium difficile, pero se le había relacionado con cirugía abdominal, y no se le relacionaba con los antimicrobianos como en la actualidad se hace. Dicha enfermedad es causada por el crecimiento excesivo del microorganismo en el colon, generalmente después de que la flora ha sido alterada con terapia antimicrobiana.

Debido a que en la actualidad se usan los antibióticos indiscriminadamente, la enfermedad se presenta con más frecuencia y por lo cual un grupo más grande de investigadores han enfocado su atención hacia ella.

Actualmente se conocen mejor las características del microorganismo, se sabe que posee dos carbohidratos que le dan especificidad inmunológica, que comparte determinantes antigénicas con Clostridium sordellii y Clostridium bifermentans, que posee aparte de las toxinas A y B ya conocidas, otra enterotoxina que es no hemorrágica y además se han descrito otros dos factores toxigénicos que son una proteína de alto peso molecular y una actín ADP-ribosil transferasa específica; y otros factores de virulencia que son adhesión, cápsula y enzimas hidrolíticas.

Lo anterior hace ver que el diagnóstico de laboratorio cada día debe ser más acertado y más rápido debido a la patogenicidad del microorganismo, anteriormente el diagnóstico definitivo se hacía por rectosigmoidoscopia, esta técnica tenía la limitante de que si las lesiones estaban más allá del recto no se podían ver. Hoy en día existen nuevas técnicas que son de bajo costo, rápidas y precisas.

El diagnóstico de la colitis pseudomembranosa y de la diarrea asociada a Clostridium difficile se basan en cultivos del microorganismo y en la detección de las citotoxinas en filtrados de heces.

Los cultivos para Clostridium difficile son frecuentemente positivos en pacientes con diarrea asociada a antibióticos, pero los microorganismos también pueden aislarse de individuos normales.

Entre los medios mayormente usados están CFA, CCFA, TCCFA y recientemente los medios de cicloserina-cefoxitina-agar, y el agar Difficile, los cuales han demostrado ser tan buenos como los primeros en cuanto al aislamiento y selectividad.

Sin embargo, los métodos inmunológicos han demostrado ser más adecuados para el diagnóstico de esta enfermedad. Se han utilizado métodos como la inmunofluorescencia directa en la cual se detecta fluorescencia si el microorganismo está presente. Este es un método bueno, pero es costoso y no todos los laboratorios pueden tenerlo como una técnica de rutina.

Se ha utilizado también el método de ELISA en el cual es posible detectar a Clostridium difficile en las evacuaciones de los pacientes afectados, éste puede ser un excelente método, pero su valor práctico dependerá del desarrollo comercial y de su disponibilidad.

El método de detección de toxinas en cultivos de tejidos es el método más confiable, además de ser muy sensible ya que es posible detectar cantidades de hasta 500 ng de toxina/ml, sin embargo es un método muy laborioso y no todos los laboratorios tienen la posibilidad de tener un cultivo celular.

Otra técnica utilizada es la contrainmunolectroforesis, es un método bueno, pero que todavía da resultados falsos positivos, debido a las determi

nantes antigenicas que comparte C. difficile y por lo cual el suero debe ser adsorbido antes de utilizarse.

Una de las técnicas más recientes es el prueba de aglutinación en látex la cual puede utilizarse para el diagnóstico rápido de colitis asociada a Clostridium, especialmente en laboratorios que no pueden realizar con facilidad cultivos celulares. Sin embargo es mucho mejor diagnóstico cuando se utiliza la prueba de látex en combinación con el cultivo celular o el ensayo de citotoxinas.

Por otro lado es importante mencionar, que debido a que la enfermedad - se está detectando con más frecuencia, se han hecho una serie de pruebas a - las cuales se les ha nombrado marcadores epidemiológicos, con ellos se ha - podido hacer una tipificación de Clostridium difficile y se han podido obtener diferentes tipos como son: A, B, C, D, E, W, X, Y, Z. Sin embargo, estos métodos son aún demasiado sofisticados por lo que únicamente se utilizan en laboratorios de investigación y aún no es posible utilizarlos como métodos - de rutina.

Estas pruebas incluyen , prueba de sensibilidad a antibióticos, la cual es de valor limitado en estudios epidemiológicos debido a que varias cepas de Clostridium difficile son altamente sensibles o altamente resistentes y algunas son de resistencia variable; prueba de susceptibilidad a los bactericidas y a los bacteriófagos, patrones electroforéticos de proteínas, marcadores inmunológicos, marcadores genéticos, uso de proteínas marcadas con metionina (S^{35}), inmunotransferencia y huellas dactilares en DNA.

V.- CONCLUSIONES.

- 1.- En relación con el aislamiento e identificación de Clostridium difficile:
 - existen varias fuentes de aislamiento siendo la más importante, la materia fecal de los enfermos que padecen la enfermedad. .
 - actualmente existen medios comerciales en forma de kits, que sirven — para la identificación de C. difficile, siendo el más confiable el — API ZYM SYSTEM.
- 2.- En cuanto a las toxinas:
 - ellas son las responsables de la patogenicidad del microorganismo.
 - la toxina A que es la enterotoxina, la toxina B que tiene actividad de citotoxina y se demuestra la evidencia de una enterotoxina que es no — hemorrágica y de peso molecular de 45,000 daltones.
 - son antigénicamente diferentes.
- 3.- Por lo que respecta a factores toxigénicos y de virulencia:
 - se han descrito últimamente dos factores toxigénicos más, el primero es una proteína de alto peso molecular distinta de las toxinas A y B, que causa cambios en el potencial isoeléctrico de segmentos aislados del — intestino de conejo, y el segundo es una actin-ribosil transferasa específica, que modifica covalentemente a las células, de manera similar a la toxina C₂ de C. botulinum.
 - los factores de virulencia descritos últimamente para C. difficile son: adhesión, cápsula y enzimas hidrolíticas.

4.- Con referencia al diagnóstico de laboratorio:

- la detección de Clostridium difficile se logra mediante cultivo, pruebas bioquímicas, pruebas inmunológicas e inmunoenzimáticas.
- la introducción de métodos inmunológicos ha reducido notablemente el tiempo para determinar el diagnóstico.
- la detección de toxinas en cultivos celulares es uno de los métodos más confiables, pero poco accesible para la mayoría de los laboratorios.
- la contraelectroforesis es una técnica reciente con la cual se pueden poner de manifiesto las toxinas del microorganismo, pero hay que adsorber el suero para eliminar los resultados falsos positivos.
- la técnica de aglutinación en látex es una técnica nueva, muy confiable, de bajo costo y que reduce en gran forma el tiempo del diagnóstico.
- las pruebas llamadas marcadores epidemiológicos han permitido la identificación de nueve tipos de cepas de C. difficile. Estas son pruebas muy sofisticadas que se hacen únicamente a nivel de investigación.

5.- Por lo que toca al pronóstico:

- los pacientes más afectados son los adultos, los inmunocomprometidos, las personas que sufren alguna cirugía, los neonatos que al nacer tienen bajo peso y los prematuros.
- la mortalidad es cercana al 20 % en personas mayores de 50 años, y en enfermos crónicos.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Aronsson B., Ganstrom M., Mollby R. and Nord C. E. "Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to Clostridium difficile toxins in patients with pseudomembranous colitis and antibiotic associated — diarrhoea". J. Immunol. Methods. 60:341-350. (1983).
- 2.- Bartlett J. G. "Clostridium difficile: Clinical Considerations". Rev. - Infect. Dis. 12(2): 243-251. (1990).
- 3.- Bennett R. G., Laughon B. E., Mundy L. N., Bobo L. D., Gaydos Ch. A., - Greenough W. B., Bartlett J. G. "Evaluation of a latex agglutination - test for Clostridium difficile in two nursing home outbreaks". J. Clin. Microbiol. 27(5): 889-893. (1989).
- 4.- Borriello S. P., Davies H. A., Kamiya S., Reed P. J., and Seddon S. "Virulence factors of Clostridium difficile". Rev. Infect. Dis. 12(2): 185-191. (1990).
- 5.- Clabots C. R., Peterson L. R., and Gerding D. N. "Characterization of a nosocomial Clostridium difficile outbreak by using plasmid profile typing and clindamycin susceptibility testing". J. Infect. Dis. 158(4): - 731-736. (1988).
- 6.- Encarnacion A., N. G. Francisco., Rodriguez S., Pimentel R., Mendoza H. R. "Clostridium difficile en heces de niños con y sin diarrea". Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 43(9): 550-554. (1986).
- 7.- Head C. B., and Ratnam S. " Comparison of API ZYN system with API AN— Ident, API 20A, Minitek Anaerobe II, and RapID-ANA systems for identification of Clostridium difficile". J. Clin. Microbiol. 26(1): 144-146. - (1988).

- 8.- Iven P. C., Booth S. J., and Woods G. L. "Comparison of media for screening of diarrheic stools for the recovery of Clostridium difficile". J. Clin. Microbiol. 27(9): 2105-2106. (1989).
- 9.- Jones R. L., Adney W. S., and Shideler R. K. "Isolation of Clostridium difficile and detection of cytotoxin in the feces of diarrheic foals in absence of antimicrobial treatment". J. Clin. Microbiol. 25(7): 1225-1227. (1987).
- 10.- Kelly M. T., Champagne S. G., Sherlock C. H., Noble M. A., Freeman H. J. and Smith J. A. "Commercial latex agglutination test for detection of Clostridium difficile associated diarrhea". J. Clin. Microbiol. 25(7): 1244-1247. (1987).
- 11.- Koneman E. W., Allen S. D., Dowell V. R. Jr., Janda W. M., Sommers H. M. Winn W. C. Jr.
COLOR ATLAS AND TEXTBOOK OF DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY.
3rd ed.
J. B. Lippincott Co.
USA. (1988).
- 12.- Lennete E. H., Balows A., Hausler W. J., Truant J.
MICROBIOLOGIA CLINICA.
3^a ed.
Editorial Medica Panamericana.
Buenos Aires. (1982).
- 13.- Lennete E. H., Balows A., Hausler W. J. Jr., Shadomy H. J.
MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY.
4^o ed.
American Society for Microbiology. (1985).

- 14.- Lysterly D. M., Sullivan N. M. and Wilkins T. D. "Enzyme-linked immunosorbent assay Clostridium difficile toxin A". J. Clin. Microbiol. 17(1): 72-78. (1983).
- 15.- Lysterly D. M., Ball D. W., Toht J., and Wilkins T. D. "Characterization of cross-reactive proteins detected by culturette brand rapid latex test for Clostridium difficile". J. Clin. Microbiol. 26(3): 397-400. (1988).
- 16.- Maniar A. C., Williams T. W., and Hammond G. W. "Detection of Clostridium difficile toxins in various tissue culture monolayer". J. Clin. Microbiol. 25(10): 1999-2000. (1987).
- 17.- Mcfarland L. V., Coyle M. B., Kremer W. H., and Stamm W. E. "Rectal swab cultures for Clostridium difficile surveillance studies". J. Clin. Microbiol. 25(11): 2241-2242. (1987).
- 18.- McKay I., Coia J. E., Poxton I. R. " Typing of Clostridium difficile causing diarrhoea in an orthopaedic ward". J. Clin. Pathol. 42: 511-515. (1989).
- 19.- Miles B. L., Siders J. A., and Allen S. D. "Evaluation of a commercial latex test for Clostridium difficile for reactivity with C. difficile and cross-reactions with other bacteria". J. Clin. Microbiol. 26(11): 2452-2455. (1988).
- 20.- Mizrahi M. L., and Muñoz H. O.
INFECCIONES ENTERICAS. FISIOPATOLOGIA Y TRATAMIENTO DE SUS COMPLICACIONES.
2^o ed.
Editorial Manual Moderno.
México D. F. (1984).

- 21.- Mulligan M. E., Peterson L. R., Kwok R. Y., Clabots C. R., and Gerding D. N. "Immunoblots and plasmid fingerprints compared with serotyping and polyacrylamide gel electrophoresis for typing Clostridium difficile". J. Clin. Microbiol. 26(1): 41-46. (1988).
- 22.- Pantosti A., Cerquetti M., and Mastrantonio G. P. "Electrophoretic characterization of Clostridium difficile strains isolated from antibiotic-associated colitis and other conditions". J. Clin. Microbiol. 26(3): 540-543. (1988).
- 23.- Sands M., Yungbluth M. and Sommers H. M. "The nonvalue of counterimmunoelectrophoresis for the direct rapid detection of Clostridium difficile toxin in stool filtrates". Am. J. Clin. Pathol. 79(3): 375-377. (1983).
- 24.- Smith L. D. and Holt J. G.
BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMIC BACTERIOLOGY.
9th ed.
Williams and Wilkins Co.
USA. (1984).
- 25.- Stites D. P., Stobo J. D., Fudenberg H. H., Wells J. V.
INMUNOLOGIA BASICA Y CLINICA.
5ª ed.
Editorial El Manual Moderno. S. A. de C. V.
México D. F. (1985).
- 26.- Tabaqchali S. "Epidemiologic markes of Clostridium difficile". Rev. Infect. Dis. 12(2): 192-199. (1990).
- 27.- Toma S., Lesiak G., Magus M., Lo H., and Delmee M. "Serotyping of Clostridium difficile". J. Clin. Microbiol. 26(3): 426-428. (1988).

- 28.- Torregosa F. L., Olarte J., Rodríguez S. R. S., Santos P. J. I., Velásquez J. L.

ENFERMEDADES DIARREICAS EN EL NIÑO.

9ª ed.

Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México "Federico Gómez",
México D. F. (1988).

- 29.- Wilson K. H., Silva J. and Fekety F. R. "Fluorescent-antibody test for -
detection of Clostridium difficile in stool specimens". J. Clin. Micro-
biol. 16(3): 464-468. (1982).
- 30.- Wilson K. H., Blitchington R., Hindenach B. and Greene R. C. "Species -
specific oligonucleotide probes for rRNA of Clostridium difficile and -
related species". 26(12): 2484-2488. (1988).
- 31.- Wren B. W. and Tabaqchali S. "Restriction endonuclease DNA analysis of
Clostridium difficile". 25(12): 2402-2404. (1987).
- 32.- Wu T. C. and Fung J. C. "Evaluation of the usefulness of counterimmuno-
electrophoresis for diagnosis of Clostridium difficile-associated coliti-
tis in Clinical specimens". J. Clin. Microbiol. 17(4): 610-613. (1983).
- 33.- Yolken R. H., Whitcomb L. S., Wilkins T. "Enzyme immunosorbent assay for
detection of Clostridium difficile antigen". J. Infect. Dis. 144(5): 378.
(1983).