



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

CLOSTRIDIUM DIFFICILE: UN
PATOGENO NOSOCOMIAL DE
IMPORTANCIA EPIDEMIOLÓGICA

TRABAJO MONOGRÁFICO DE
ACTUALIZACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

P R E S E N T A:

ANGÉLICA VEGA GARCÍA



MÉXICO, D. F.

2008



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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Prof. María del Carmen Cortés Decuir

Vocal: Prof. Rodolfo Pastelín Palacios

Secretario: Prof. Raúl Garza Velasco

1er Suplente: Prof. Adriana Guadalupe Chávez Mejía

2do Suplente: Prof. Estrella Cervantes García

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Biblioteca de la Facultad de Química y otras bibliotecas del Sector Salud.

QFB Raúl Garza Velasco
Asesor

Angélica Vega García
Sustentante

AGRADECIMIENTOS:

Al Profesor **Raúl Garza Velasco** por su apoyo y asesoría en la realización de este trabajo

Al los profesores que formaron parte del jurado para la evaluación de esta tesis

DEDICATORIAS:

A Dios: Gracias por darme la oportunidad de existir y permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida

A mis padres: Por ser los pilares más importantes de mi vida, por darme la oportunidad de cumplir uno de mis más anhelados sueños, por su infinito apoyo, sacrificio y por la vida misma

A mis hermanas: Erika, Gaby, Lulú y Adris por su infinito apoyo hoy y siempre, por todos los consejos, por enseñarme que la familia es lo más importante y por ser parte de mi vida

A Gadi: Por todo el apoyo y palabras de aliento en los momentos más difíciles así como por tantos momentos compartidos y llenos de felicidad

A todos mis compañeros de la carrera: Carol (gracias por todo el apoyo y amistad que me has brindado), Ana María (gracias por tu amistad incondicional y tus valiosos consejos), Jorge (gracias ser uno de mis mejores amigos), Malena (gracias por tu amistad), Aracne, Yola, Rodrigo Gutiérrez, Rodrigo Martínez, Selene, Brenda, Juan, Alejandro Velásquez (gracias por tu amistad a pesar de la distancia), a todos ustedes de nuevo gracias por haber hecho mi estancia en la Facultad una etapa inolvidable

A Jorge Urbina mi amigo de tantos por apoyarme siempre y por seguir conmigo

A la Universidad Nacional Autónoma de México la Máxima Casa de Estudios
por brindarme las bases para una vida profesional sólida

A la Facultad de Química: en donde dejo una parte muy importante de mi vida,
gracias por formarme como profesionista

*A veces el hombre más pobre deja a sus hijos la herencia
más rica*

Ruth E. Renkel

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
GENERALIDADES.....	4
CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS.....	6
a. Morfología.....	6
b. Cultivo.....	6
PATOGENIA Y PATOLOGÍA	
II. PATOGENIA.....	23
Factores de virulencia.....	23
a. Producción de toxinas.....	23
b. Adhesinas.....	43
c. Enzimas hidrolíticas.....	47
d. Cápsula.....	47
Epidemiología.....	48
a. Factores de riesgo.....	48
b. Grupos afectados.....	51
c. Otros factores de riesgo.....	51
III. PATOLOGÍA.....	53
a. Histología y cuadro clínico.....	53
a.1 Cuadro clínico.....	53
a.2 Histología.....	54
IV. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.....	56
a. Detección de <i>Clostridium difficile</i> en muestras fecales.....	57
b. Detección de las toxinas de <i>Clostridium difficile</i>	58
V. TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN.....	64

CONCLUSIONES.....	71
LISTA DE ABREVIATURAS.....	74
BIBLIOGRAFÍA.....	76

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la comunidad científica ha venido enfrentando el resurgimiento de nuevas enfermedades infecciosas, debido principalmente a la sorprendente evolución de los mecanismos con que cuentan los microorganismos para sobrevivir y superar las barreras que protegen al ser humano contra los agentes invasivos.

Entre los padecimientos que han reaparecido destacan la infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana, el síndrome respiratorio agudo grave, las estafilococcias por *Staphylococcus aureus* y la colitis pseudomembranosa ocasionada por *Clostridium difficile*. De hecho, recientemente esta última especie ha acaparado la atención de médicos e investigadores, en virtud de la elevada frecuencia, reincidencia y tasa de mortalidad de las afecciones que causa entre la población.

El agente etiológico se encuentra en cerca del 3% de los adultos sanos, en quienes se le detecta en forma esporulada e inactiva desde el punto de vista metabólico. Esta circunstancia cambia notablemente en los individuos hospitalizados sometidos a tratamientos con antimicrobianos de amplio espectro, los cuales reducen el importante efecto protector de la flora intestinal; bajo tales condiciones, las cifras se incrementan hasta 40%, detectándose formas vegetativas que se reproducen y liberan sus toxinas de acción entérica, éstas sin duda el principal factor de virulencia del microorganismo.

Tal como ocurre con numerosos patógenos, el conocimiento integral de los elementos que les confieren patogenicidad puede conducir a la implementación de mejores medidas diagnósticas, al desarrollo de regímenes terapéuticos más efectivos y, desde luego, al establecimiento de medidas preventivas más eficientes.

El presente trabajo aborda las temáticas de mayor actualidad asociadas a la virulencia y la detección de *Clostridium difficile*, así como al origen, los signos y síntomas que caracterizan a la colitis pseudomembranosa, un padecimiento cada vez más frecuente dentro del ambiente intrahospitalario.

OBJETIVOS

- ✓ Describir las características microbiológicas y bioquímicas que sustentan el aislamiento e identificación de *Clostridium difficile* en el laboratorio.

- ✓ Mencionar los principales factores de virulencia de esta especie, subrayando la acción y relevancia de las toxinas que sintetiza, así como los cuadros patológicos que éstas provocan al humano.

- ✓ Señalar las principales características de la colitis pseudomembranosa, así como las medidas diagnósticas, terapéuticas y preventivas asociadas a este padecimiento.

- ✓ Mencionar la importancia epidemiológica del patógeno en estudio.

GENERALIDADES

En 1935, Hall y O'Toole publicaron sobre el aislamiento de un nuevo bacilo, anaerobio estricto y toxigénico, a partir de heces de niños recién nacidos y que parecía ser un constituyente común de la flora habitual del intestino. Dicho microorganismo crecía lentamente y, debido a las dificultades que enfrentaban su aislamiento y estudio, le asignaron el nombre de *Bacillus difficilis*; tres años después se le denominó *Clostridium difficile*.

En 1937, Snyder difundió su trabajo consistente en el aislamiento de 17 cepas que mostraban muchas de las observaciones iniciales de Hall y O'Toole, incluyendo la relativa a la producción de una toxina letal para animales (conejos y cobayos) previa administración por vía subcutánea. En 1940, el propio Snyder aisló a *Clostridium difficile* a partir de heces de niños asintomáticos cuyas edades fluctuaban entre diez semanas y un año. Sin embargo, su clasificación como agente causal de enfermedades en humanas ocurrió hasta 1978.

En la década de los 60's, se aisló de pacientes con colitis pseudomembranosa asociada al tratamiento con antibióticos de amplio espectro. En esa época se pensaba que dicho padecimiento era producto de la isquemia en la mucosa intestinal o de una infección viral, hasta que Larson y cols, en 1977, observaron que las muestras de heces de pacientes afectados contenían una toxina que provocaba cambios

citopáticos en los cultivos de células, misma que era capaz de provocar enterocolitis en hámsteres.

En 1978 se identificó a *Clostridium difficile* como agente causal de la mencionada enfermedad y en la actualidad se afirma que la infección por este patógeno es responsable de prácticamente todos los casos de colitis pseudomembranosa y del 20 % de los episodios de diarrea asociada al consumo de antibióticos (24, 64, 92, 93, 159,160).

Por lo que se refiere a su taxonomía, el Manual de Bergey lo clasifica en la sección destinada a bacterias Gram positivas con bajo contenido de guanina-citosina, de la siguiente manera (21)

Clase: *Clostridia*

Orden I: Clostridiales

Familia I: *Clostridiaceae*

Género: *Clostridium*

Especie: *Clostridium difficile*

I. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

a. Morfología

Clostridium difficile presenta forma de bacilo Gram positivos, que mide 0.5 a 1 μm de ancho por 6 a 8 μm de largo y cuya movilidad está sustentada por flagelos peritricos de 0.5 a 1.9 μm de ancho por 3.0 a 6.9 μm de largo. Algunas cepas poseen múltiples fimbrias polares de 4 a 9 nm de diámetro y de más de 6 μm de longitud.

Se ha descrito cierto material extracelular (cápsula) en algunas cepas, el cual es difuso o compacto, presenta a menudo masas globulares adheridas y aparece tanto en cepas virulentas como en las avirulentas. Sus esporas son ovals y se evidencian en posición subterminal (consultar la figura 1). (35, 41).

b. Cultivo

Fuentes de aislamiento. Tal como sucede para numerosas afecciones de origen bacteriano, el diagnóstico de las patologías asociadas a *Clostridium difficile* se basa en el aislamiento del agente causal a partir de diversas fuentes, entre las cuales destacan las siguientes (104, 117)



Figura 1. Tinción de Gram en *Clostridium difficile*, en la cual se observan bacilos Gram positivos con esporas subterminales (flechas) (117)

- Evacuaciones fecales provenientes del 95% de individuos con colitis pseudomembranosa, del 10 al 15% de infantes sanos menores a 2 años de edad y del 3% de adultos sanos.
- Estiércol de una amplia variedad de mamíferos (vacas, burros, caballos, etc.).
- Heces de perros, gatos y roedores.
- Ropa de cama, camillas, sillas de paseo, ropa de neonatos, cestos de pañales, etc., del ambiente intrahospitalario.
- Suelo, heno, arena y agua

Cabe mencionar que Hafiz reportó el aislamiento de *Clostridium difficile* a partir del tracto urogenital de mujeres que padecían uretritis no específica, e inclusive, de la vagina del 72% de mujeres que eran atendidas en clínicas genitourinarias.

Más tarde Bartlett obtuvo los mismos resultados, aunque la presencia de este patógeno en especímenes urogenitales enfrenta un claro escepticismo entre la comunidad científica, debido a que no se han encontrado nuevas evidencias; a tal respecto, es importante señalar que no es una práctica común investigar la presencia de la bacteria en este tipo de muestras (16, 23).

Medios de cultivo. En las décadas más recientes se han desarrollado aún más medios cuya finalidad reside en facilitar el aislamiento y cultivo de *Clostridium difficile*. Hafiz y Oakley fueron los primeros en diseñar uno de corte selectivo, basado en el hecho de que el microorganismo puede desaminar la tirosina para formar ácido p-hidroxifenilacético; secuencialmente, la descarboxilación de este último produce p-cresol.

Lógicamente, pensando en que si un organismo produce un cierto metabolito, es muy probable que sea resistente a él, dichos autores incorporaron 0.2% de p-cresol al medio que habían diseñado, logrando un mayor aislamiento del bacilo a partir de muestras fecales de infantes, caballos, camellos y estiércol de burro. Más tarde, otros trabajos no redituaron los mismos, e inclusive, sugirieron que el p-cresol era inhibitorio para *Clostridium difficile* (23, 63).

George y cols lograron avances significativos con el medio Agar Fructosa-Cicloserina-Cefoxitina (CCFA), cuya exitosa combinación de antibióticos aporta una notable selectividad y su contenido en fructosa, con rojo neutro

como indicador de pH, promueven la diferenciación del microorganismo, el cual fermenta dicho carbohidrato (50, 91).

Posteriormente, se han ido realizando diversas modificaciones a la formulación de George, tales como la omisión de cicloserina y la sustitución de fructosa por manitol, para dar origen al Agar manitol cefoxitina (CMA) y al Agar sangre manitol cefoxitina (CMBA). Bartley y Dowell compararon estos dos medios con el CCFA, encontrando un 75% de recuperación de la bacteria en el CMBA, 65% en el CMA y 42% en el CCFA (17, 23).

Por otra parte, Arroyo y cols reportaron el aislamiento del microorganismo a partir del ambiente hospitalario, usando medios suplementados con sales biliares tales como colato y taurocolato, los cuales permiten mejorar la transformación de esporas en bacilos (7).

De acuerdo con los hallazgos asociados a medios de cultivo, aquellos que aportan los mejores resultados se mencionan a continuación:

- Agar *Clostridium difficile* (también denominado Agar Fructosa-Cicloserina-Cefoxitina) (CCFA)
- Agar Clostrisel
- Agar sangre anaerobio
- Agar manitol cefoxitina (CMA)
- Agar sangre manitol cefoxitina (CMBA)

- Agar taurocolato de sodio cicloserina cefoxitina fructosa (TCCFA)

Condiciones óptimas de incubación. El rango de crecimiento de *C. difficile* oscila entre 30 y 37 °C, siendo esta última su temperatura óptima; sin embargo, algunas cepas pueden crecer entre 25 y 45 °C (117).

Por su parte, el tiempo de incubación necesario para obtener un crecimiento aceptable en el primocultivo es de 48 h (117).

Cabe recordar que el género *Clostridium* incluye bacterias aerotolerantes y anaerobias estrictas y, en tal contexto, éste es el caso de *Clostridium difficile*. Al igual que otras bacterias anaerobias estrictas, el bacilo no produce las enzimas superóxido-dismutasa y catalasa, de allí parte de su intolerancia al oxígeno. La importancia de estas enzimas reside en el hecho de que catalizan una secuencia de reacciones tendientes a neutralizar un radical altamente reactivo llamado superóxido (O_2^-) y un metabolito que en niveles altos es tóxico: el peróxido de oxígeno (H_2O_2); ambos son producidos en presencia de oxígeno (consultar la figura 2) y las bacterias anaerobias carecen de estas importantes proteínas (98).

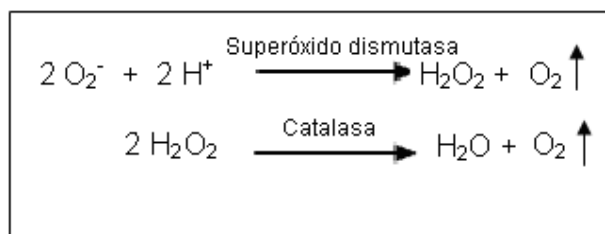


Figura 2. Reacciones catalizadas por las enzimas superóxido dismutasa y catalasa (98).

Sistemas empleados para el cultivo de bacterias anaerobias. Estudios comparativos han demostrado que los siguientes sistemas proporcionan resultados satisfactorios para llevar a cabo el cultivo de bacterias anaerobias asociadas a enfermedades humanas:

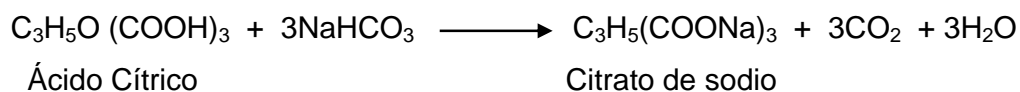
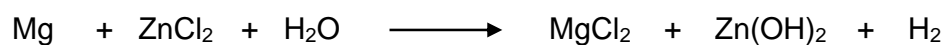
- Técnicas de frasco (jarra de anaerobiosis).
- Técnicas de cámara anaerobia con guantes.
- Tubos con película de Agar .
- Sistema Axonomat.

Técnicas de frasco. Los diferentes métodos para cultivar bacterias anaerobias incluyen el empleo de frascos Brewer, Baird-Tatlock, GasPak, McIntosh-Fildes, Oxoid, Scott Laboratories y Torbal. El principio básico involucrado es el mismo y consiste principalmente en la eliminación del oxígeno haciéndolo reaccionar con el H_2 que se agrega al sistema en presencia de un catalizador. Sin duda, la jarra GasPak es la más usada en los laboratorios de Microbiología, dada la facilidad de su manejo; el sistema no tiene conexiones exteriores ni requiere bombas de vacío, tanques de

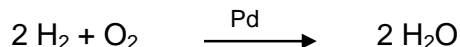
gas o manómetro. Tan sólo emplea paquetes desechables generadores de H_2 y CO_2 , así como un catalizador que funciona a temperatura ambiente.

La jarra anaeróbica GasPak está constituida esencialmente por un recipiente de vidrio, cuya tapa cierra herméticamente. En su interior se colocan los medios de cultivo inoculados, un sobre desechable generador de H_2 y CO_2 cortado en una de sus puntas y un indicador anaeróbico (correspondiente a la mezcla de azul de metileno- $NaHCO_3$ -glucosa). Posteriormente, se adicionan al sobre 10 mL de agua destilada y se coloca la tapa del recipiente, la cual a su vez contiene un catalizador (esferas de alúmina cubiertas de Paladio) en una cámara especial.

Dentro del recipiente se generan H_2 y CO_2 por medio de las siguientes reacciones:



Posteriormente, el hidrógeno producido reacciona con el oxígeno, formándose agua, lo que produce el ambiente anaerobio:



Cuando se ha creado el ambiente anaerobio, la solución indicadora vira de azul a incoloro y permanece de esa manera si no existen escapes que permitan el ingreso de oxígeno al sistema (48, 98).

Técnica de cámara anaerobia con guantes. Una cámara anaerobia con guantes corresponde a un sistema anaerobio autoabastecido que permite al microbiólogo procesar muestras y realizar la mayor parte de las técnicas bacteriológicas para aislamiento e identificación de bacterias anaerobias, sin la exposición al aire. Dicha cámara cuenta con una compuerta de entrada para la transferencia de materiales hacia el interior y exterior, así como unos guantes con extensión que habilitan al profesional para manipular sus muestras y cultivos.

Las cámaras con guantes apropiadas para el cultivo de anaerobios pueden construirse con diversos materiales, incluyendo acero, acrílico o fibra de vidrio. Sin lugar a dudas, las de plástico vinílico flexibles son las más utilizadas.

Para su uso, las cámaras se llenan con una mezcla gaseosa compuesta por 10% de H_2 , 5 a 10% de CO_2 y 80 a 85% de N_2 ; el oxígeno remanente se elimina merced a la acción catalizadora del paladio.

Si se construyen adecuadamente, estas cámaras resultan económicas para operar, ya que permiten el uso de medios convencionales y el costo

de los gases es mínimo. Una vez establecida, el mayor gasto es debido a la mezcla gaseosa de nitrógeno, hidrógeno y dióxido de carbono, utilizada para reemplazar el aire que ingresa durante el traslado de los materiales a la cámara (48, 98).

Tubos con película de agar. Este sistema utiliza medios de cultivo prerreducidos, generalmente sólidos, preparados en tubos con tapón de hule, a los cuales también se agrega un agente reductor, como clorhidrato de L-cisteína; a continuación, se esterilizan en autoclave y posteriormente se enfrían en una máquina giratoria para formar una capa fina en la superficie interna de los tubos con el medio solidificado. Para realizar la inoculación se puede utilizar una aguja que se introduce a través del tapón (impermeable al oxígeno), o bien, pasando una corriente suave de gas libre de oxígeno hacia el tubo por medio de una cánula estéril; de este modo, cada tubo posee una atmósfera anaerobia propia, si bien el sistema presenta la desventaja de requerir equipo especial poco accesible (48, 98).

Sistema Axonomat. El sistema consiste en una jarra en la que se crea un ambiente anaerobio mediante una técnica de evacuación-reemplazo del aire presente en la misma. Se hace pasar a través de él una mezcla gaseosa anaeróbica (80% de N₂, 10% de H₂ y 10% de CO₂) 3 veces. En cada ciclo, el 80% del aire contenido en la jarra es reemplazado por la mezcla gaseosa anaeróbica y, de esa manera, se garantiza que en el

tercer ciclo cualquier remanente de oxígeno haya sido eliminado. Como indicador se hace uso de azul de metileno además de un catalizador de paladio; cabe señalar que el sistema también incluye un programa de garantía de calidad interno que ejecuta pruebas adicionales (búsqueda de fugas y medición de la actividad del catalizador), con la ventaja de que la anaerobiosis se alcanza en un periodo de 1 a 2 h (164).

Morfología Macroscópica. En el agar sangre anaerobio las colonias de esta especie son de 3 a 5 mm de diámetro, no hemolíticas, blancas grisáceas con superficie mate, refringentes, de estructura interna cristalina e irregular, poco convexas y de márgenes rizoides; presentan una fluorescencia de amarillo-verdosa a roja cuando se observan bajo la luz ultravioleta. (Consultar la figura 3) (117).



Figura 3. Aspecto de las colonias de *C. difficile* en agar sangre (117)

Por su parte, las colonias obtenidas en CCFA, CMA, CMBA o TCCFA son grandes (de hasta 7 mm de diámetro), amarillo-naranjas, planas y de bordes irregulares, que viran el medio a naranja o amarillo, debido a la

fermentación de la fructosa o el manitol, según el carbohidrato contenido en el medio. Además, bajo la luz Ultravioleta presentan fluorescencia amarilla la cual se detecta después de las 24 h de incubación y durante los siguientes 5 a 6 días (consultar la figura 4). Por lo general, los cultivos manifiestan un olor característico a p-cresol (estiércol de caballo).



Figura 4. Aspecto de las colonias de *C. difficile* en el medio CCFA (116)

En el medio TCCFA, las colonias de este microorganismo tienen el mismo aspecto que en los antes mencionados, pero se ha comprobado que el taurocolato (o colato) presente favorece el proceso de transformación de espora a bacilo (48, 117).

Por último, en el agar Clostrisel se obtienen colonias grisáceas de aproximadamente 3 a 5 mm de diámetro, con bordes mellados a enteros, planas y de superficie lisa.

Por lo que se refiere a los medios líquidos, éstos suelen resemejarse después del aislamiento en los medios selectivos, para la realización de pruebas bioquímicas, destacando los caldos infusión cerebro corazón (BHI) y glucosa carne cocida, en los cuales la bacteria desarrolla moderadamente formando un sedimento de tipo granular (117).

Pruebas de identificación. Si bien la identificación presuntiva de *Clostridium difficile* se realiza vía la detección de las colonias típicas en el cultivo, la observación de los frotis teñidos al Gram y la percepción del olor característico, la identificación definitiva depende del patrón de los productos metabólicos por Cromatografía de gas-líquido y la caracterización bioquímica.

Las tablas 1 y 2 resumen los comportamientos bioquímicos de las principales especies del género *Clostridium*.

Tabla 1. Comportamiento bioquímico de las especies de *Clostridium* con esporas subterminales aisladas con más frecuencia (98).

Prueba	<i>C. argentinense</i>	<i>C. baratii</i>	<i>C. bifermentans</i>	<i>C. botulinum</i>	<i>C. butyricum</i>	<i>C. celatum</i>	<i>C. chauvoei^b</i>	<i>C. clostridioforme</i>	<i>C. difficile</i>	<i>C. fallax</i>	<i>C. glycolicum</i>	<i>C. haemolyticum^d</i>	<i>C. histolyticum</i>	<i>C. male nominatum</i>	<i>C. novyi^{d,e}</i>	<i>C. perfringens^{e,f}</i>	<i>C. putrificum</i>	<i>C. septicum^e</i>	<i>C. sordellii</i>	<i>C. sphenoides</i>	<i>C. sporogenes^e</i>	<i>C. subterminale</i>	<i>C. symbiosum</i>
Aerotolerante	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toxigénico	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	No	Sí	No	No	Sí	±	No	Sí	Sí	No	Sí	Sí	No	No	No	No
Hemólisis, 5% de SBA	γ	α,β,γ	V [†] β	β	γ	α,β	β	γ	β	β	γ	γ	β	V	β ^{im}	γ ^h β	V [†] β	β	Vβ	γ	V [†] β	V [†] β	β
Esporas, forma y ubicación	So ^{lj}	So ^{tk}	So ^l	So ⁱ	So ^l	So ^m	So ^{lm}	So ^{lm,n}	So ^{lo}	So ^{lm}	So ^p	So ^j	So ^{mr}	So/Sr ^{jj}	So ^{lm}	So ^{mrst}	So/Sr ^{lk}	So ^r	So ^{lqu}	So ^{tk}	So ^r	So ^{rv}	So/Sr
Reducción de Nitratos	-	V	V	-	V	V	+	V	-	-	-	-	-	V	V	V	-	V	V	V	-	-	-
Crecimiento en NaCl al 6.5 %	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NR	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NR	NG	NR	V	NG	NG
Crecimiento en Bilis al 20%	NG	NG	NG	NG	NR	NG	NG	V	NR	NG	NG	NG	NG	NG	NG	G	NG	NR	NG	NG	V	NG	NG
Digestión de la carne cocida	V	NR	+	V	-	NR	-	NR	-	-	NR	-	+	-	V	-	-	-	+	NR	+	+	V [†] C
Leche	VD	C	D	VD	ACG ^W	AC	-	C	-	AC	-	AC	D	-	V	ACG ^W	CD	AC	D	C	D	DC	C
H ₂ S	+	NR	V	V	-	+	-	V	V	+	NR	-	V	NR	-	-	+	-	V [†]	+	+	V [†]	NR
Movilidad	+	-	+ ^x	+	+	+	+	V	+	+	V	+	+ ^x	V	V [†]	-	+	+	+	+	+	V [†]	V [†]
Indol	-	-	+	-	-	NR	-	V	-	-	NR	+	-	+	V	-	-	-	+	+	-	-	-
Licuefacción de la gelatina	+	-	+	+	-	NR	+	-	+ ^y	-	NR	+	+	-	+	+	NR	+	+	-	+	+	NR
Lectinasa	-	+	+	V	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	V [†]	+	-	-	+	-	-	V	-
Lipasa	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	+	-	-
Hidrólisis de la esculina	-	+	-	-	V	+	-	+	-	+	V	-	-	-	-	-	-	V	V	-	+	-	-
Hidrólisis del almidón	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	V	-	-	-
Ureasa	+	NR	- ^z	-	-	+	-	NR	-	-	NR	-	-	NR	-	V	NR	-	+	NR	NR	-	NR
Voges- Proskauer(VP)	-	NR	-	-	-	NR	-	NR	-	-	NR	-	-	NR	-	V	NR	-	-	V	NR	-	NR

So, esporas subterminales ovales; Sr, esporas subterminales redondas; SBA, agar con sangre de oveja; NG, sin crecimiento; NR, no se dispone de resultados; V, resultados variables; V*, variable, por lo común positivo; V-, variable, por lo común negativo; D, digestión; C, coágulo; A, producción de ácido(+); G, gas.

^aAntes *C. botulinum* G y algunas cepas no toxigénicas de *C. hastiforme* y *C. subterminale*

^bClasificación como *C. chauvoei* o *C. fesi*. Patógenos para herbívoros (vegetales)

^cEspecies de clostridios toxigénicos más comunes. *C. difficile* distinguido con facilidad de *C. sporogenes*, al cual se asemeja íntimamente desde el punto de vista fenotípico, por su capacidad de fermentar el manitol y por su incapacidad de digerir la carne o la leche o de producir lipasa

^d*C. haemolyticum* y *C. novyi* figuran entre los patógenos bacterianos conocidos más exigentes para su desarrollo y sensibles al oxígeno

^eClostridios de la gangrena gaseosa aislados con más frecuencia: *C. novyi*, *C. perfringens*, y *C. septicum*; *C. perfringens* es el patógeno bacteriano que se encuentra más ampliamente

^fHemólisis sinérgica (fenómeno de CAMP) entre *C. perfringens* y *Streptococcus agalactiae*

^gLa mayoría de los clostridios son anaerobios obligados; sin embargo, *C. histolyticum*, *C. canis* y *C. tertium* crecen en presencia de aire en medios enriquecidos; a menudo confundido con bacilos anaerobios (p. ej. Lactobacilos) dado que son catalasa negativos y no forman esporas en condiciones aerobias

^hDoble zona de hemólisis; a y b

ⁱLas esporas pueden distender las células

^jRara vez se observan esporas

^kLas esporas también pueden ser terminales

^lEsporas centrales subterminales

^mLas esporas se localizan en forma terminal, subterminal o central

ⁿLas esporas a menudo son difíciles de demostrar

^oRaras veces observadas en localización terminal

^pEsporas a menudo terminales; con frecuencia aparecen como esporas libres

^qLeve deformación

^rCélulas distendidas

^sLas esporas raras veces se observan in vivo o en las condiciones habituales in vitro; las células por lo común son gramnegativas

^t*C. perfringens* posee cepas no formadoras de esporas

^uA menudo aparecen como esporas libres

^vLas esporas en ocasiones se localizan de manera central

^wFermentación tormentosa

^xPerezoso

^yLento

^z*C. bifementans* diferenciado de *C. sordelli*, con el que se asemeja mucho en las características fenotípicas, por la reacción de ureasa negativa

Tabla 2. Fermentación de azúcares de las especies de *Clostridium* con esporas subterminales (98).

	<i>C. argentinense</i>	<i>C. baratii</i>	<i>C. bifermentans</i>	<i>C. botulinum</i>	<i>C. butyricum</i>	<i>C. celatum</i>	<i>C. chauvoei</i>	<i>C. clostridiforme</i>	<i>C. difficile</i>	<i>C. fallax</i>	<i>C. glycolicum</i>	<i>C. haemolyticum</i>	<i>C. histolyticum</i>	<i>C. malenominatum</i>	<i>C. novyi</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>C. putrificum</i>	<i>C. septicum</i>	<i>C. sordellii</i>	<i>C. sphenoides</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. subterminale</i>	<i>C. symbiosum</i>
Arabinosa	-	-	-	V ⁻	V	-	-	V	V	-	-	-	-	NR	V ⁻	-	-	-	V	V	-	-	V
Celobiosa	-	A	-	-	A	A	-	V	A ^w	-	-	-	NR	-	-	V	-	A ^w	-	A	-	-	-
Dulcitol	-	NR	-	-	-	NR	V	NR	-	-	NR	-	-	NR	-	V	A	A	-	-	-	-	NR
Galactosa	-	A ^w	-	V ⁻	A	A	A	A ^w	-	A	-	-	-	NR	-	A	V	V	-	V	-	-	A ^w
Glucosa	-	A	A	A	A	NR	A	NR	A	A	NR	A	-	NR	A	A	A	A	A	A	A	-	NR
Inositol	-	NR	-	V ⁻	V	NR	-	NR	V	-	NR	V	-	NR	V ⁺	A	-	-	-	V	-	-	NR
Lactosa	-	A ^w	-	-	A	A	A	V	-	-	-	-	-	-	-	A	A	-	-	V	-	-	V ⁻
Melibiosa	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	-	V	-	-	-	-	-	-	-
Maltosa	-	A ^w	A	V	A	A	A	A ^w	-	A	V	-	-	V	V	A	A	A	A	A	V	-	-
Manitol	-	-	-	-	V	-	-	-	+/-	-	-	-	-	NR	-	-	-	-	-	A	-	-	V
Manosa	-	A	V ⁻	V ⁻	A	A	A	A	A	A	-	V	-	NR	V ⁻	A	A	A	V	A	-	-	V
Rafinosa	-	-	-	-	A	-	-	V	-	-	-	-	-	NR	V ⁻	V	-	-	V	A	-	-	-
Ramnosa	-	-	-	-	-	-	-	NR	-	-	-	NR	-	-	NR	-	NR	-	-	A	-	-	-
Ribosa	-	-	V	V ⁻	A	V	A	V	V	V	-	-	-	-	V	V	V	V	V	V	-	-	-
Salicina	-	A ^w	-	V ⁻	A	A	-	V	V	-	-	-	V	NR	-	V	V	V	-	A	V	-	-
Sorbitol	-	-	V	V ⁻	-	-	-	-	V	V	V	-	-	NR	-	-	-	-	-	-	V	-	-
Sacarosa	-	A	-	V	A	A	A	A ^w	-	-	-	-	-	-	V	A	-	-	-	A	V	-	-
Trehalosa	-	-	-	V ⁻	A	A	-	A	V	-	-	-	-	-	-	V	V	V	-	V	V	-	-
Xilosa	-	-	V	-	A	-	-	A ^w	A	A	V	-	-	-	-	-	-	-	V	A	-	-	-

A, producción de ácido(+); A^w, débilmente ácido; V, resultados variables; V⁺, variable, por lo común positivo, V⁻, variable, por lo común negativo, NR, no se dispone de resultados; +/-, la mayoría de las cepas son positivas pero se pueden encontrar cepas negativas.

Identificación por Cromatografía de Gas- Líquido y Resonancia Magnética.

Entre las primeras investigaciones en esta área destacan los trabajos de Phillips y Rogers, quienes se basaron en el hecho de que *Clostridium difficile* elabora p-cresol como producto final del metabolismo de la tirosina.

Para empezar la prueba, el microorganismo se siembra en un medio de cultivo selectivo adicionado de ácido p-hidroxifenilacético; éste es un precursor del p-cresol, lo que permite el desarrollo del bacilo y la producción de p-cresol, compuesto que después es identificado por cromatografía de gas-líquido.

Aunque la técnica resulta efectiva para efectuar la identificación de la especie en cuestión, lo cierto es que ha caído en desuso debido a la necesidad de cultivar previamente al microorganismo (133).

En tal contexto, recientemente se ha estado combinando la cromatografía de gas-líquido con la resonancia magnética, aplicando el método para muestras fecales en las que se buscan los compuestos orgánicos volátiles producidos por el metabolismo de la bacteria, entre los cuales se incluyen ácidos de cadena corta (acético, butírico, isocaproico y butanoico), aldehídos (2-hidroxi-benzaldehído), fenoles (4-metil-fenol y 2-metoxi-fenol), y furanos (5-metil-2-furancarboxi-aldehído, 2-furancarboxi-aldehído y metil-furancarboxi-aldehído) (consultar la figura 5).

Los furanos se encuentran en mayor cantidad y, junto con los ácidos acético, butírico y butanoico, representan los principales metabolitos que evidencian la presencia del agente causal, ya que su producción se considera una característica común de las cepas de *Clostridium difficile* (140).

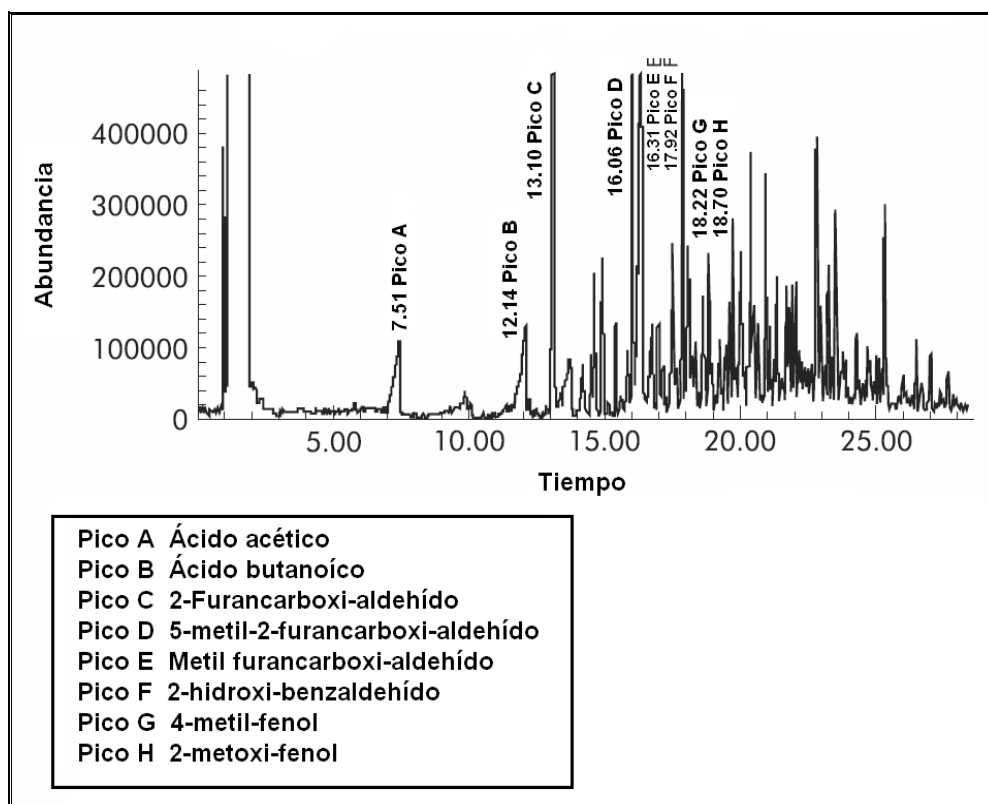


Figura 5. Cromatograma típico del perfil de compuestos orgánicos volátiles producidos por *Clostridium difficile* (Cromatografía de Gas-Líquido y Resonancia Magnética) (140).

PATOGENIA Y PATOLOGÍA

II. PATOGENIA

Factores de virulencia

a. Producción de toxinas

Los principales factores de virulencia de *Clostridium difficile* corresponden a dos exotoxinas: la toxina A (TcdA del inglés *Toxin Clostridium difficile A*), una enterotoxina de 308 Kilodaltones (KDa) y, la toxina B (TcdB), citotoxina de 270 KDa. Diversos estudios han comprobado que la TcdB es mil veces más potente que la TcdA (como citotoxina) en cultivos de tejido, pero no actúa como enterotoxina en animales (136, 138).

Recientemente, se ha caracterizado una tercera toxina, denominada toxina binaria (CDT por sus palabras en inglés *Clostridium difficile binary Toxin*), pero su impacto en la enfermedad aún no se ha logrado aclarar (61).

Aspectos genéticos (*Locus* de patogenicidad)

En las cepas toxigénicas, los genes que codifican para TcdA y TcdB (*tcdA* y *tcdB*, respectivamente) se encuentran localizados en un segmento de ADN denominado *locus* de patogenicidad por los genetistas, el cual tiene una longitud aproximada de 19.6 Kilobases (Kb). Adicionalmente, este *locus* contiene tres fragmentos: *tcdR*, *tcdE* y *tcdC*, relacionados

estrechamente con la regulación de la producción de toxinas (consultar la figura 6) (145).

El fragmento *tcdR*, se encuentra localizado río arriba del gen *tcdB* y su expresión es coordinada por los genes de ambas toxinas, funcionando como un regulador positivo en la síntesis de toxinas (101, 105,106).

El fragmento *tcdE* (también llamado dominio de translocación-inserción a la membrana) se ubica entre los genes *tcdA* y *tcdB* y su función consiste en permitir la entrada de ambas toxinas al interior de la célula, para lo cual cuenta con características hidrofóbicas que lo habilita para aumentar la permeabilidad de la membrana “blanco” (167).

Finalmente, el fragmento *tcdC* se encuentra río abajo del gen *tcdA* y se transcribe en dirección opuesta a los genes de las dos toxinas. Esta secuencia funge como un regulador negativo de la producción de toxinas (73).

Es importante mencionar que en las cepas no toxigénicas el *locus* de patogenicidad está sustituido por un fragmento de AND de 115 pares de bases, que corresponde a una región no codificante (163).

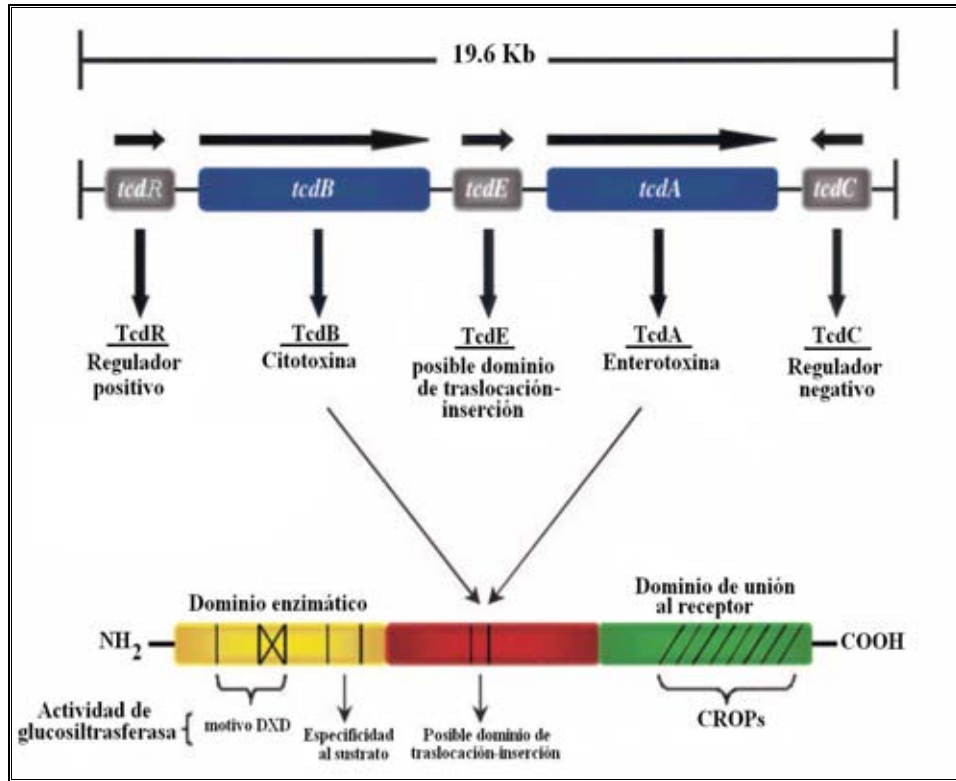


Figura 6. Locus de patogenicidad (183)

Secuencias genéticas

El gen que codifica para la toxina A fue clonado y secuenciado por Dove y cols. Tiene una longitud de 8,133 pares de bases y 2,710 aminoácidos. La figura 7 muestra su secuencia.

1	msliskeeli	klaysirpre	neyktiltnl	deynklttnn	nenkylqlkk	lnesidvfmn
61	kyktssrnra	lsnlkkdilk	eviliknsnt	spveknlhfv	wiggevsdia	leyikqwadi
121	naeyniklwy	dseaflvntl	kkaivesstt	ealqlleeei	qnpqfdnmkf	ykkrmefiyd
181	rqrkrfinyyk	sqinkptvpt	iddiikshlv	seynrdetvl	esyrtnslrk	insnhgidir
241	anslftteqel	lniysqelln	rgnlaaasdi	vrlalalknfg	gvylvdvmlp	gihsdlfkti
301	srpssigldr	wemikleaim	kykkyinnyt	senfdkldqq	lkdnfkliie	sksekseifs
361	klenlnvsdl	eikiafalgs	vinqaliskq	gsyltnlvie	qvknryqfln	qhlnpaiesd
421	nnftdttkif	hdslnfsata	ensmfltkia	pylqvgfmpe	arstislsgp	gayasayydf
481	inlqentiek	tlkasdlief	kfpennslql	teqeinslws	fdqasakyqf	ekyvrdytdg
541	slsedngvdf	nkntaldkny	llnknipsnn	veeagsknyv	hyiiqlqgdd	isyeatcnlf
601	sknpknsiii	qnmnesaks	yflsddgesi	lelnkyripe	rlknkekvkv	tfighgkdef
661	ntsefarlsv	dsisneissf	ldtikldisp	knvevnllgc	nmfsydfnve	etypgkllls
721	imdkitstlp	dvnknsitig	anqyevrins	egrkellahs	gkwinkeean	msdlsskeyi
781	ffdsidnklk	aksknipgla	sisediktll	ldasvspdtk	filnlnklai	essigdyiyy
841	eklepvnii	hnsiddlide	fnllevsde	lyelkklenn	dekylisfed	isknnsystsv
901	rfinksnge	vyvetekeif	skysehitke	istiknsiit	dvngnlldni	qldhtsqvnt
961	lnaaffiqsl	idyssnkdv	ndltsvkvq	lyaqlfstgl	ntiydsiqlv	nlisnavndt
1021	invlptiteg	ipivstildg	inlgaaike	ldehdpllk	eleakvgvla	inmslsiaat
1081	vasivgigae	vtifllpiag	isagipslvn	nelilhdkat	svvnyfnhls	eskkyygplkt
1141	eddkilvpid	dlviseidfn	nnsiklgtcn	ilameggsgh	tvtgnidhff	sspsisship
1201	slsiysaigi	etenldfskk	immlpnapsr	vfwwetgapv	glrslendgt	rlldsirdly
1261	pgkfywrfya	ffdyaittlk	pvyedtniki	kldkdrnfi	mptittneir	nklsysfdga
1321	ggtyslllss	ypistninls	kddlwfnd	nevreisien	gtikkgklik	dvlskidink
1381	nkliignqti	dfsgdidnkd	ryiflftceld	dkisliiein	lvaksyslll	sgdknyllisn
1441	lsntiekint	lgldskniay	nytdesnnyk	fgaisktsqk	siihykkdsk	nilefyndst
1501	lefnskdfia	edinvmkdd	intitgkyyv	dnntdksidf	sislvsknqv	kvnglylnes
1561	vyssyldfvk	nsdghhntsn	fmnlfldnis	fwklfgfeni	nfvidkyftl	vgktnlgyve
1621	ficdnknid	iyfgewktss	skstifsgng	rnnvvepiyn	pdtdgedists	ldfsyeplyg
1681	idryinkvli	apdlytslin	intnyysney	ypeiivlnpn	tfhkkvninl	dsssfeykws
1741	tegsdfilvr	yleesnkkil	qkirikgils	ntqsfnkmsi	dfkdikklsl	gyimsnfksf
1801	nseneldrdh	lgfkiiidnkt	yyydedsklv	kglininns	fyfdpiefnl	vtgwqtingk
1861	kyyfdintga	altsykiing	khfyfnndgv	mqlgvfkgpd	gfeyfapant	qnnniegqai
1921	vyqskfltn	gkkyfydnns	kavtgwriin	nekyyfnpnn	aiaavglqvi	dnnkyfyfnpd
1981	taiiskgwqt	vngsryyfdt	dtaiafngyk	tidgkhfyfd	sdcvvkigvf	stsngefeyfa
2041	pantynnnie	qqai vyqskf	ltlngkkyyf	dnnskavtgl	qtidskkyyf	ntntaeaatg
2101	wqtidgkky	fntntaeaat	gwqtidgkky	yfntntaias	tgytiingkh	fyfntdgimq
2161	igvfkpgngf	eyfapantda	nniegqaily	qnefltlngk	kyyfgsdsk	vtgwriinnk
2221	kyyfnpnai	aaihltinn	dkyfyfydgi	lqngyitier	nnfyfdanne	skmvtgvfkg
2281	pngfeyfapa	nthnnniegq	aivyqnkflt	lngkkyfydn	dskavtqwgt	idgkkyfyfnl
2341	ntaeaatgwq	tidgkkyfyfn	lntaeaatgw	qtidgkkyyf	ntntfiastg	ytsingkhfy
2401	fntdgimqig	vfkpgngfey	fapantdann	iegqailyqn	kfltlngkky	yfgsdskavt
2461	glrtidgkky	yfntntavav	tgwqtingkk	yyfntntsia	stgytiisgk	hfyfntdgim
2521	qigvfkpgpd	feyfapantd	anniegqair	yqnrfllyhd	niyyfgnnsk	aatgwwtidg
2581	nryyfepta	mgangyktid	nknfyfrngl	pqigvfkgsn	gfeyfapant	danniegqai
2641	ryqnrflhll	gkiyyfgnns	kavtqwgtin	gkvyfyfmpdt	amaaagglfe	idgvyyffgv
2710	dgvkapgigy					

Figura 7. Secuencia de aminoácidos del gen de la toxina A (44).

Por su parte, el gen que codifica para la toxina B cuenta con una longitud de 7,098 pares de bases y 2,341 aminoácidos. La secuenciación y análisis fue realizada por Barroso y cols (Consultar la figura 8).

1	mslvnrkqle	kmanvrfrtq	edeyvailda	leeyhmsen	tvvekyklk	dinsltdiyi
61	dtykksgnk	alkkfkeylv	tevllekn	ltpveknlf	vwigqindt	ainyinqwkd
121	vnsdynvnvf	ydsnaflint	lkkvtvesai	ndtlesfren	lndprfdynk	ffrkrmeiyy
181	dkqknfinyy	kaqreenpel	iiddivktyl	sneyskeide	lntyieesln	kitqnsyndv
241	rnfeefkng	sfnyeqelv	erwnlaas	ilrisalkei	ggmyldvdm	pgiqpdlfes
301	iekpssvtvd	fwemtkleai	mkykeyipey	tsehfdmlde	evqssfesvl	askskkseif
361	sslgdmeasp	levkiafnsk	giinqglisv	kdsycsnliv	kqienrykil	nnslnpaise
421	dndfntttnt	fidsimae	adngrfmmel	gkylrvgffp	dvkttinlsg	peayaayqd
481	llmfkegsmn	ihlieadlrn	feisktnisq	steqemaslw	sfddarakaq	feeykrnyfe
541	gslgeddnld	fsqniivdke	yllekissla	rssegyihy	ivqlqgkis	yeaacnlfak
601	tpydsvlfqk	niedseiayy	ynpgdgeiqe	idkykipsii	sdrpkiklft	ighgkdefnt
661	difagfdvds	lsteieaaid	lakedispks	ieinllgcnm	fsysinveet	ypgklllkvk
721	dkiselmpsi	sqdsiiivan	qyevrinseg	rrelldhsge	winkeesiik	disskeyisf
781	npkenkitvk	sknlpelstl	lqeirnnsns	sdieleekvm	lteceinvis	nidtqiveer
841	ieeaknltsd	sinyikdefk	liesisdalc	dlkqqneled	shfisfedis	etdegfsirf
901	inketgesif	vetektifse	yanhiteeis	kikgtifdtv	ngklvkkvnl	dtthevntln
961	aaffiqslie	ynsskeslsn	lsvamkvqvy	aqlfstglnt	itdaakvvel	vstaldetid
1021	llptlseglp	iiatiidgvs	lgaaikeise	tsdpllrqei	eakigimavn	ltaattait
1081	sslgiasgfs	illvplagis	agipslvne	lvlrkatkv	vdyfkhsylv	etegvftlld
1141	dkimmpqddl	viseidfnnn	sivlgkceiw	rmeggsghtv	tddidhffsa	psityrephl
1201	siydvlevqk	eeldskdlm	vlpnapnrvf	awetgwtpgl	rslendgtkl	ldrirdnyeg
1261	efywryfafi	adalittltp	ryedtnirin	ldsntsrsvf	piitteyire	klsysfygsg
1321	gtyalslsqy	nmginielse	sdvwiidv	vvrdrviesd	kikkgdlieg	ilstlsieen
1381	kiilnshein	fsgevnsgng	fvsltfisile	ginaiievd	lksykillis	gelkilmlns
1441	nhiqqkidyi	gfnselqkni	pysfvdsegk	engfingstk	eglfvselpd	vliskvymd
1501	dskpsfgyys	nnlkdvkvit	kdnvniltgy	ylkddikisl	stlqdekti	klsvhldes
1561	gvaailkfmn	rkgnntnsts	lmsflesmni	ksifvnflqs	nikfildanf	iisgttsigq
1621	feficdendn	iqpyfikfnt	letnytllyg	nrqnmi vepn	ydlldsgdis	stvinfsqky
1681	lygidscvkn	vvispniytd	einitpvyet	nntypevivil	danyinekin	vnindlsiry
1741	vwsndgndfi	lmtseenkv	sqvkirfvnv	fkdktlankl	sfnfsdkqdv	pvseillsft
1801	psyyedglig	ydlglvslyn	ekfyinnfgm	mvsgliyind	slyyfkppvn	nlitgfvvvg
1861	dkyyfnpin	ggaasigeti	iddknnyfnq	sgvlqtgvfs	tedgfkyfap	antldenleg
1921	eaiftgkli	ideniyyfdd	nyrgavewke	ldgemhyfsp	etgkafkgl	qigdykyyfn
1981	sdgvmqkgfv	sindnkhyfd	dsgvmkvgyt	eidgkhfyfa	engemqigvf	ntedgfkyfa
2041	hhnedlgn	geeisysgil	nfnnkiyyfd	dsftavvgwk	dledgskyyf	dedtaeayig
2101	lslindgqyy	fnddgimqvg	fvvindkvfy	fsdsgiesg	vqniddnyfy	iddngivqig
2161	vfdtsdgyky	fapantvndn	iygqaveysg	lvrvgedvyy	fgetyietg	wiydmenesd
2221	kyfnpetkk	ackginlidd	ikyyfdekgi	mrtglisfen	nnyyfnenge	mqfgyinied
2281	kmfyfgedgv	mqigvntpd	gfkyfahqnt	ldenfegesi	nytgwldlde	kryyftdeyi
2341	aatgsviidg	eeyyfdpda	qlvise			

Figura 8. Secuencia de aminoácidos del gen de la toxina B (12).

La tabla 3 muestra las abreviaturas de los aminoácidos que constituyen las toxinas de *Clostridium difficile*.

Nombre	Abreviatura
Alanina	A
Arginina	R
Asparagina	N
Ácido aspártico	D
Cistina	C
Glutamina	Q
Ácido glutámico	E
Glicina	G
Histidina	H
Isoleucina	I
Leucina	L
Lisina	K
Metionina	M
Fenilalanina	F
Prolina	P
Serina	S
Treonina	T
Triptofano	W
Tirosina	Y
Valina	V

Tabla 3. Lista de abreviaturas de los aminoácidos que constituyen las toxinas de *Clostridium difficile* (36)

Toxinotipos de *Clostridium difficile*

Las investigaciones sobre TcdA y TcdB se han basado en la cepa de referencia VPI 10463, lo que desde luego implica el hallazgo de modificaciones genéticas de ambas toxinas en aislamientos clínicos. Rupnik y cols desarrollaron un confiable sistema de tipificación, basado en el polimorfismo del *locus* de patogenicidad del microorganismo, que involucra deleciones e inserciones en los genes *tcdA*, *tcdB* y en los

fragmentos accesorios *tcdR*, *tcdE* y *tcdC*. A la fecha se han descrito 22 toxinotipos, tomando como referencia a la cepa VPI 10463, la que por obvio corresponde al toxinotipo 0. La figura 9 muestra las características genéticas de cada toxinotipo (58, 144, 147).

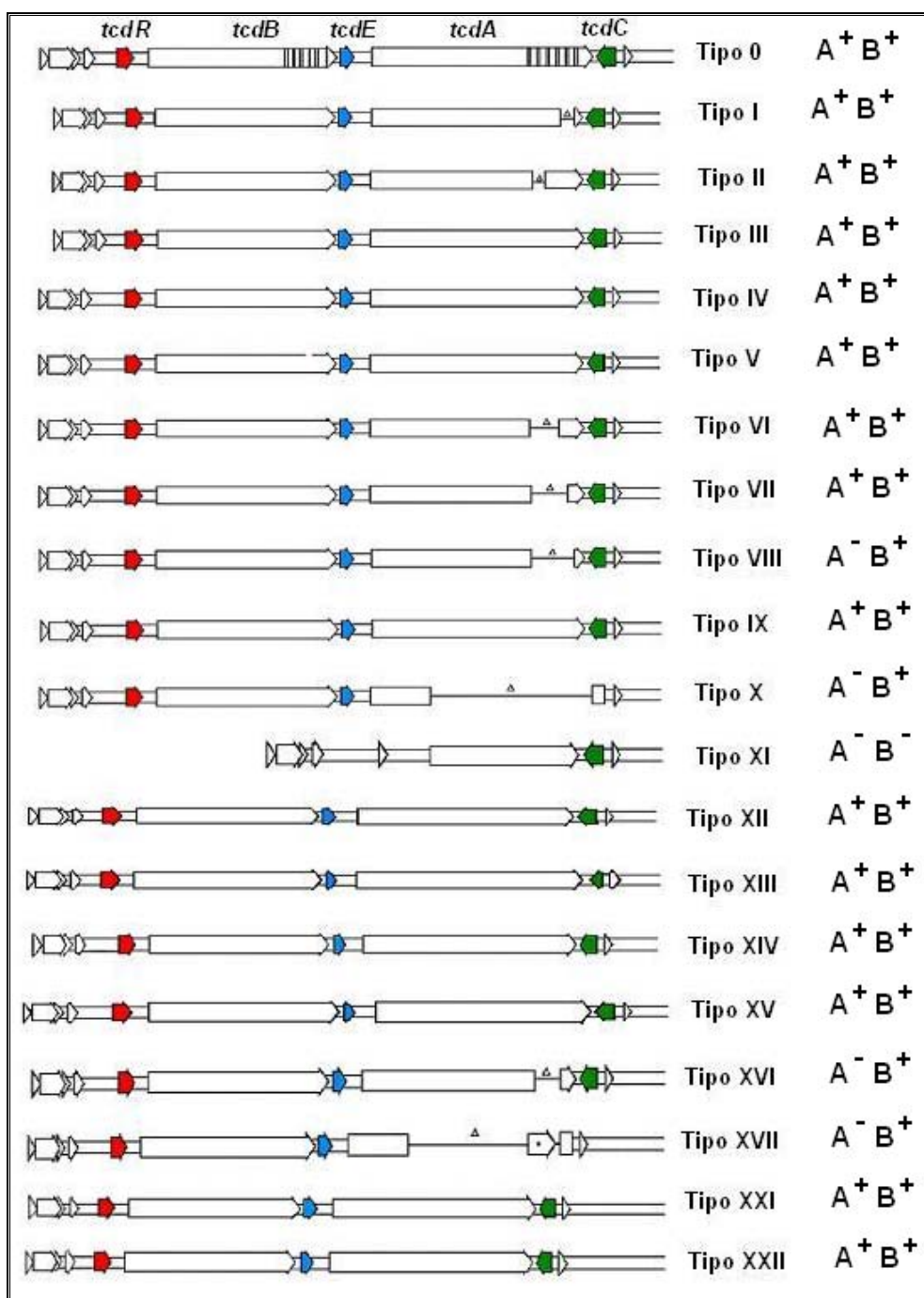


Figura 9. Toxinotipos de *Clostridium difficile*. Las líneas verticales en los genes *tcdA* y *tcdB* del toxinotipo 0 indican alguna homología entre ambos. Los triángulos indican deleciones en esa parte del gen. A⁺, producción de TcdA; A⁻, no produce TcdA; B⁺, producción de TcdB; B⁻, no produce TcdB (58, 144, 147).

Señales ambientales que regulan la expresión de las toxinas

Las señales ambientales que modulan la expresión de las toxinas aún no son claras, si bien los estudios *in vitro* indican que dicha expresión puede aumentar bajo condiciones de estrés (como en presencia de antibióticos) y al ocurrir represión catabólica (46, 100).

En el primer caso, algunos trabajos se enfocaron en observar la influencia que podrían ejercer diversos agentes antimicrobianos en la producción de toxinas, encontrándose que niveles subinhibitorios de penicilina y vancomicina aumentaban la concentración de toxinas en los cultivos de la bacteria (125).

En el segundo caso, se utilizaron medios definidos con limitaciones de biotina (0.05nM), observándose un incremento en la producción de toxinas de hasta 64 veces en TcdB y de 34 veces en TcdA (197).

Por otra parte y, en contraste con estas observaciones, Karlsson encontró que una mezcla de nueve aminoácidos (cisteína, glicina, isoleucina, leucina, metionina, prolina, treonina, triptofano y valina) disminuía la producción de toxinas *in vitro*, y que los propios derivados de los mismos aminoácidos daban lugar a un efecto similar. Esos resultados generaron la propuesta de que la administración de tales aminoácidos en el colon humano podría representar una nueva terapia para la diarrea asociada a *Clostridium difficile* (79, 80).

Aún a pesar de las demostraciones anteriores, a la fecha no se ha logrado establecer cuáles son los factores que regulan la expresión de las toxinas y cómo llevan a cabo esa función, por lo que es necesario continuar trabajando alrededor de esta trascendental temática.

Mecanismo de acción y dominios funcionales de las toxinas

Receptores de TcdA y TcdB en la superficie celular

La unión al receptor significa el primer paso “clave” en el proceso de entrada de las toxinas a la célula “blanco”. En el caso de TcdA, su receptor es el disacárido Gal β 1-4GlcNAc, el cual se encuentra en los antígenos del grupo sanguíneo Lewis I, X y Y (177). Otros reportes señalan que la TcdA también reconoce al sacárido Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc, lo cual parece ser intrascendente, debido a que este receptor no está presente en células humanas sino en varias especies animales (87, 183).

Por otro lado, el grupo de Pothoulakis comprobó que el tratamiento de células “blanco” con la enzima galactosidasa reducía la unión de TcdA a aquellas, debido quizá a que un posible receptor proteico, la sacarosa-isomaltasa, interfería la interacción; cabe mencionar que esta enzima se encuentra en células del ileón del conejo, pero está ausente en células del colon humano. Estas indefiniciones dejan ver con claridad que aún no se detecta con certeza al receptor proteico para la TcdA (137).

Análogamente, el receptor de la TcdB no se ha logrado caracterizar y, hasta el momento, se acepta que la toxina afecta a un amplio rango de tipos celulares, lo cual sugiere que su receptor podría catalogarse como ubicuota (183).

Endocitosis mediada por receptor y traslocación a la membrana

Una vez que las toxinas han reconocido a su receptor, inicia el proceso de entrada de aquellas a la célula “blanco”, lo cual en ambos casos ocurre mediante endocitosis; es decir, tiene lugar la invaginación de la membrana citoplasmática para formar una vesícula denominada endosoma, que posteriormente se fusiona con el lisosoma para digerir el contenido endosómico. Durante el evento las toxinas suelen escapar del endosoma, debido a que el pH ácido en el interior de este compartimiento promueve que se generen cambios estructurales en ellas: se expone su dominio hidrofóbico TcdE y ello permite la salida de TcdA y TcdB al citosol (13, 43, 52, 69, 113, 131,142).

“Blancos” intracelulares de las toxinas de C. difficile y muerte celular

Después de la internalización al citosol por parte de la TcdA y TcdB, ambas se dirigen a sus “blancos” específicos: el grupo de las GTPasas Rho, Rac y Cdc42. Las toxinas inactivan a estas enzimas vía la glucosilación de la Treonina 37 de Rho y de la Treonina 35 de Rac y de Cdc42 (37, 76, 77, 113, 139, 174, 187).

Es importante tomar en cuenta que las proteínas de la familia Rho constituyen una subfamilia de las proteínas Ras, que engloba al menos a quince miembros conocidos, incluidos los prototipos RhoA, Rac y Cdc42, los cuales representan un regulador primario del citoesqueleto de actina en las células eucariontes. RhoA media la creación de las fibras de estrés, la motilidad y las adhesiones focales, mientras que Rac y Cdc42 están relacionadas con la formación del lamellipodium y el filopodium, extensiones estructurales esenciales para el movimiento y la adaptación al ambiente durante la migración celular. De manera conjunta, las proteínas Rho juegan un papel crucial en la morfogénesis, el control del ciclo celular, la regulación de la transcripción y la apoptosis (2, 103, 153).

En tal contexto, la afectación de estas proteínas provoca la condensación de actina y, consecuente, el redondeo de las células “blanco”, daños a nivel de su membrana y la muerte celular vía apoptosis (consultar la figura 10). Cuando esta última tiene lugar por efecto de las toxinas del microorganismo, el redondeo y la muerte de las células implicadas corresponden a dos eventos temporalmente distintos. TcdB es capaz de inducir el mencionado redondeo en un lapso menor de 2 h y la muerte ocurre 24 h más tarde, lo que de alguna manera explica la evolución de la enfermedad, con efectos citopáticos que más tarde derivan en la muerte celular. (25, 65, 71, 141, 157).

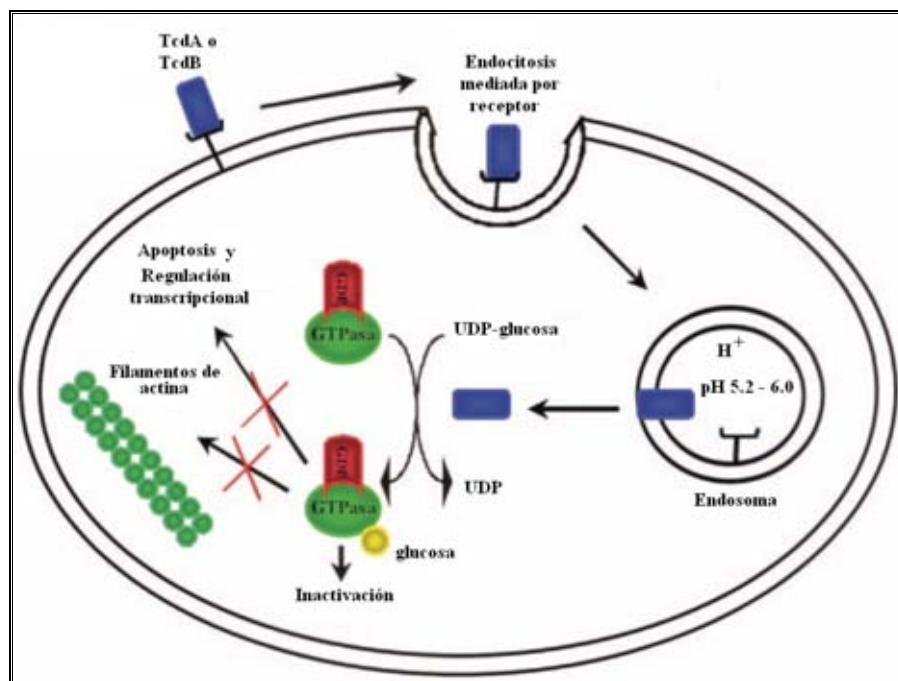


Figura 10. Visión general de las modificaciones intracelulares de TcdA y TcdB. Tanto TcdA como TcdB actúan como glucosiltransferasas, modificando e inactivando a Rho, Rac, y Cdc42, vía la transferencia de un azúcar, usando como sustrato a la UDP-glucosa. Los efectos resultantes incluyen la condensación de actina, la pérdida de la regulación transcripcional y la apoptosis (183)

Organización del dominio enzimático

En las toxinas de *Clostridium difficile*, el dominio necesario para llevar a cabo la glucosilación de las proteínas Rho se encuentra cercano a la región amino-terminal (N-terminal) (consultar la figura 6) (72, 184).

En dicho dominio existen residuos de aminoácidos que resultan esenciales para mantener la actividad catalítica de las toxinas. Tal es el caso de un motivo denominado DXD y del triptofano 102, ya que eventuales

mutaciones en estas secuencias dan lugar a moléculas incapaces de glucosilar GTPasas *in vitro* (26, 27).

Organización del dominio de unión al receptor

Tanto TcdA como TcdB presentan un dominio de unión al receptor que se encuentra vecino a su carbonilo terminal (C-terminal) y funciona como una secuencia que reconoce al receptor y promueve la endocitosis de las toxinas (consultar la figura 6). Ese dominio está constituido por más de 38 unidades de oligopéptidos, denominados CROPS (del inglés *combined repetitive oligopeptides*) (54, 55, 151).

Particularmente TcdA presenta 5 grupos de CROPS, cuyo tamaño fluctúa entre 21 y 50 aminoácidos (Consultar la figura 11). TcdB también posee 5 grupos de CROPS, de los cuales 4 son homólogos a los CROPS de TcdA. (182).

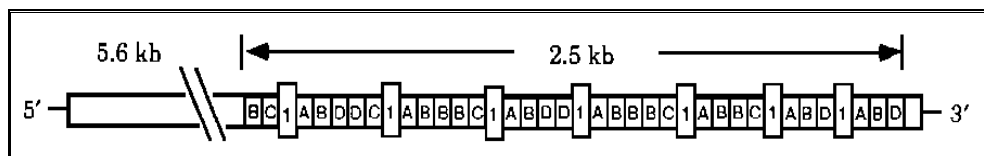


Figura 11. CROPS de TcdA. Los 5 grupos se denominan A, B, C, D y 1 (182).

Los CROPS de TcdA actúan como sitios de unión a receptores que contienen residuos de galactosa, tales como el sacárido Gal₁₋₃Gal₁₋₄GlcNAc, al cual se le ha ubicado en la superficie de células epiteliales del intestino de hámsters y conejos (87, 143, 144, 193).

Papel de TcdA y TcdB en la enfermedad

En la colitis pseudomembranosa, uno de los efectos atribuidos a las dos toxinas involucradas consiste en la ruptura de las “tight junctions” (un tipo de unión intercelular del tejido intestinal), lo que altera la integridad del epitelio entérico (51).

Dicho trastorno genera una vía de paso de los neutrófilos hacia el lumen del intestino, lo que contribuye notablemente a la formación de las características pseudomembranas sobre el epitelio (consultar la figura 12) (82, 83, 94, 161).

En este sentido, es preciso subrayar que los leucocitos polimorfonucleares provocan drásticos incrementos de los intermediarios reactivos del oxígeno y la secreción de monofosfato de adenosina (AMP). La importancia de este último compuesto reside en el hecho de que el AMP es convertido en adenosina (por una 5'-ectonucleotidasa) en el lado apical de las células epiteliales, lo cual inhibe la secreción de cloruros hacia el lumen intestinal (Figura 12) (99).

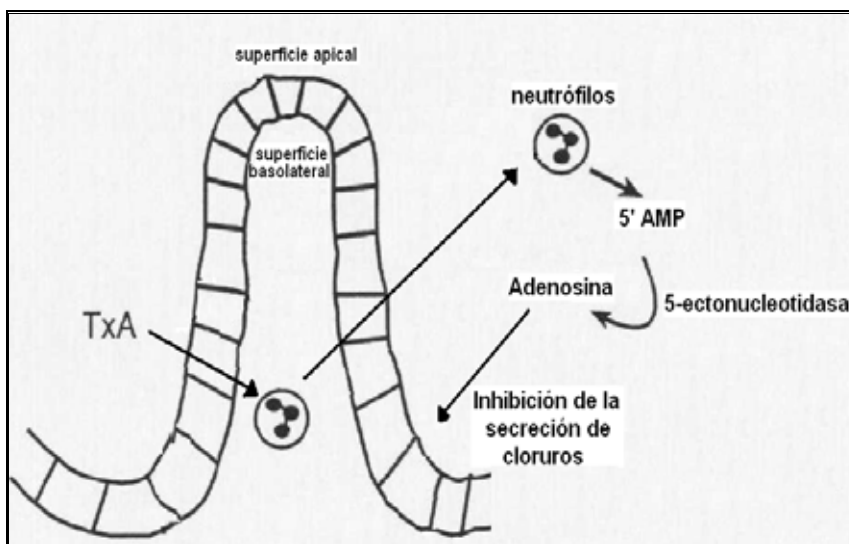


Figura 12. Efecto de los neutrófilos en el lumen intestinal (99).

La TcdA ejerce interesantes efectos sobre los macrófagos, monocitos y mastocitos, lo que conduce a la secreción de las citocinas proinflamatorias IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α (Consultar la figura 13). La IL-1 y el TNF- α estimulan la biosíntesis de prostaglandinas (PGs), vía la activación de la fosfolipasa A₂ y de la ciclooxigenasa 2, respectivamente (34, 66, 186). Cabe agregar que la activación de las PGs y en especial de la E₂, incrementa la secreción de electrolitos y agua en el intestino. De hecho, muchos de los efectos inflamatorios y secretorios disminuyen con la administración de inhibidores del factor activador de plaquetas, de la fosfolipasa A₂ y de la síntesis de PGs (3, 86).

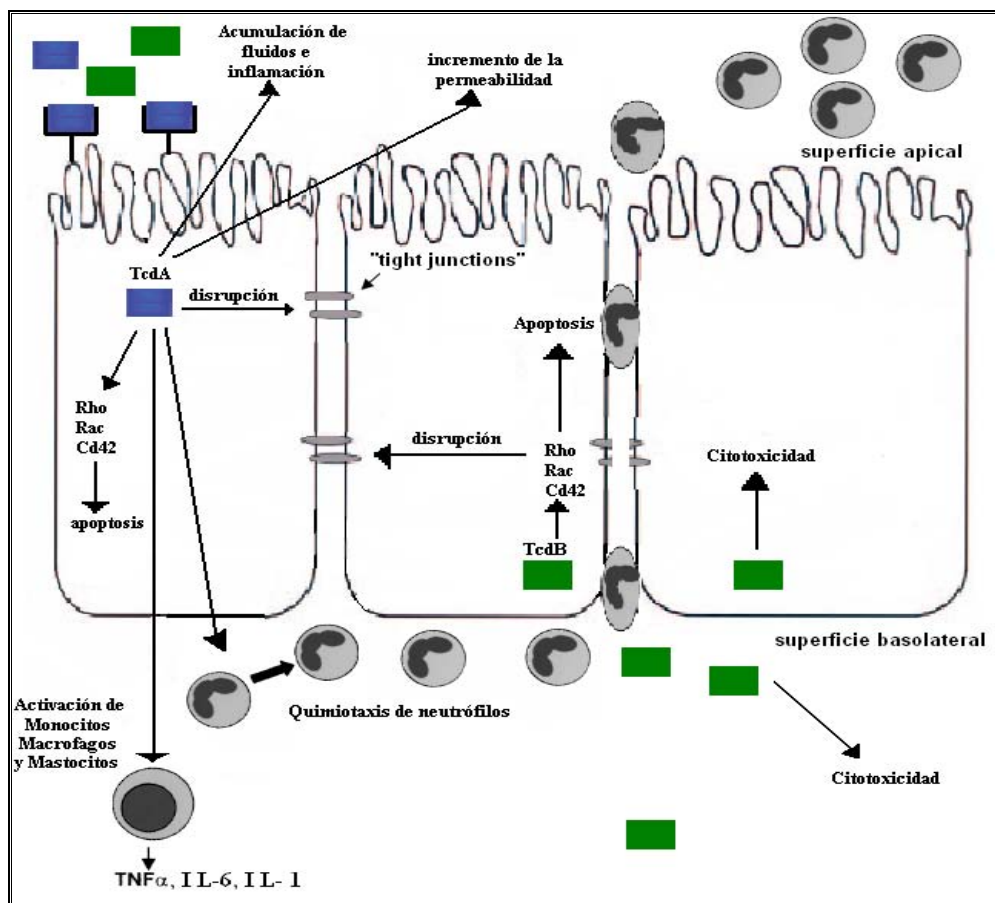


Figura 13. Efectos celulares de TcdA y TcdB en el epitelio intestinal (183)

Adicionalmente, se ha relacionado a la TcdA con las neuronas de la submucosa: Mantyh y cols encontraron que un antagonista de la sustancia P atenúa la respuesta intestinal en ratas tratadas con la toxina. La sustancia P corresponde a un pequeño péptido que se encuentra en el tejido intestinal y en el sistema nervioso central, actúa como neurotransmisor y se le ha asociado a la diarrea inflamatoria. El mecanismo por el cual la TcdA modula la producción de la sustancia P aún se desconoce, pero se ha demostrado que al tratarse el ileon de ratas con la toxina se incrementa la producción de dicha sustancia P y que ello conduce a la activación de los mastocitos (32,102).

Los efectos de la TcdA que contribuyen a la generación de la colitis pseudomembranosa se pueden resumir de la siguiente manera:

- Aumento de la permeabilidad epitelial
- Producción de citocinas y quimiocinas
- Infiltración de neutrófilos
- Activación de las neuronas de la submucosa
- Producción de intermediarios reactivos de oxígeno
- Activación de mastocitos, macrófagos y monocitos
- Producción de sustancia P
- Daño directo a la mucosa intestinal

Cepas TcdA⁻ causantes de enfermedad

Diversos estudios habían establecido que TcdB no causaba daño en el intestino a menos que TcdA estuviera presente, e inclusive, se concluía que ambas toxinas actuaban de manera sinérgica. Sin embargo, recientemente se ha venido incrementando el número de reportes sobre aislados clínicos de cepas de *Clostridium difficile* TcdA negativas (TcdA⁻) pero TcdB positivas (5, 115, 134, 135). Tal es el caso de los toxinotipos VIII, X, XVI y XVII, en los cuales se observa que el gen que codifica para la toxina A presenta una deleción vecina al C-terminal, que da lugar a la producción de una proteína trunca incapaz de causar daño (146).

Se han propuesto dos posibles explicaciones para la existencia de estas cepas: la primera infiere que TcdB puede tener un papel aún más importante en la enfermedad que el que se le reconocía previamente, o bien, sustituye o compensa la ausencia de TcdA. Ello está sugerido en un reporte cuyos autores percibieron que TcdB tenía un gran potencial como enterotoxina (152, 183).

La segunda propone que la detección de cepas TcdA⁻ podría provenir de algún evento de selección ocurrido dentro del hospedero (183).

Es importante mencionar que hasta el momento no se sabe cual es el impacto clínico de estas cepas ya que no se han encontrado diferencias significativas entre la enfermedad producida por cepas TcdA⁺ y TcdA⁻ (95).

Inmunidad frente a TcdA y TcdB

La primera línea de defensa contra la infección ocasionada por *Clostridium difficile* reside en la presencia de la flora habitual del intestino, la cual limita el crecimiento de este patógeno tanto *in vivo* como *in vitro*. Un segundo factor de protección consiste en la acidez gástrica, que reduce el número de esporas viables e inactiva las toxinas ingeridas. A las anteriores se suma el peristaltismo normal del intestino, ya que este movimiento evacua del tracto digestivo a la bacteria y a sus toxinas (38).

A pesar de la importante participación de estos mecanismos defensivos, la respuesta inmune humoral parece ser determinante y capaz de definir la duración y severidad de la enfermedad. Así lo demuestran los trabajos de Kyne, quien observó que sólo el 50% de los pacientes que son colonizados desarrolla la patología y que, además, el análisis del suero en los enfermos evidencia niveles séricos de anticuerpos IgG e IgM contra la toxina A hasta tres veces más altos en los individuos que presentan diarrea que en los asintomáticos. El hallazgo incluye solamente a los anticuerpos contra la toxina A pero no se descarta algún fenómeno similar asociado a la B (90, 132).

La respuesta inmune de la mucosa también protege contra la infección por *Clostridium difficile*: Kelly y cols reportaron que los anticuerpos IgA de la mucosa intestinal actúan inhibiendo la unión de la toxina A a su receptor (84).

Finalmente, la inmunización representa otro mecanismo estudiado. Durante la década de los 80s se observó que la inoculación de pequeñas dosis de toxina A en hámsters hembras protegía a las crías de éstas (85). A pesar de estos resultados, es claro que el análisis de la inmunología de *Clostridium difficile* requiere de una amplia profundización, para determinar el potencial de la eventual inmunización en humanos (49).

Otras toxinas producidas por *Clostridium difficile*

Además de TcdA y TcdB, algunas cepas de *Clostridium difficile* producen una tercera toxina, denominada toxina binaria (CDT por *Clostridium difficile binary toxin*). La frecuencia de las cepas que la sintetizan fluctúa entre 8.3% y 23.5%, habiéndose detectado la toxina en heces de humanos y de algunos equinos y caninos (58, 146, 172).

Genéticamente, la CDT está conformada por un dominio enzimático de 48kDa (CDTa, por *Clostridium difficile binary toxin a*), la cual funciona como una ADP-ribosiltransferasa y, además, por un dominio de unión de 99kDa (CDTb), que permite la entrada de CDTa a la célula hospedera (61, 62).

Barbut y cols reportaron que las cepas CDT positivas causan síntomas más severos que las no productoras de esa toxina (9), lo que no necesariamente coincide con lo establecido por otros autores quienes concluyen que el espectro de la enfermedad es el mismo para ambos tipos de cepas (57, 144, 146). Por lo tanto, se puede afirmar que mientras el papel de TcdA y TcdB ya se ha reconocido como esencial en la afección, la posible contribución de CDT aún no se ha aceptado en forma general.

b. Adhesinas

Para numerosos patógenos que ocasionan toxi-infecciones, la expresión de la virulencia a menudo abarca la producción y acción de toxinas y

adhesinas. Mientras las toxinas son secretadas al medio extracelular para que actúen sobre el sitio “blanco”, las adhesinas capacitan a los microorganismos para adherirse a las células del hospedero. *Clostridium difficile* lesiona los tejidos basándose predominantemente en la acción de TcdA y TcdB, si bien su posibilidad de colonizar previamente el intestino depende de proteínas que presentan propiedades adhesivas, entre las cuales destacan las siguientes:

Flagelos

Clostridium difficile debe su movilidad a flagelos peritricos que miden 0.5 a 1.9 μm de ancho por 3.0 a 6.9 μm de largo y que son el producto de dos genes: *fliC* y *fliD*. El primero da lugar a una proteína de 39 KDa denominada Flagelina que corresponde al mayor componente estructural del flagelo y, el segundo, origina una molécula proteica de 56 Kda, la proteína Cap, requerida para el anclaje del flagelo a la membrana bacteriana (169).

Si bien se ha comprobado que tanto las cepas flageladas como las no flageladas contienen ambos genes, aún se desconoce porqué sólo parte de ellas presentan dichos organelos (170).

Tasteyre y cols realizaron algunos experimentos *in vitro* en los cuales comparó la adherencia de la bacteria al tejido intestinal murino y porcino, observando que la unión sólo ocurría al tejido de ratón, debido

probablemente a que éste presentaba un receptor para el flagelo. Hasta el momento, se acepta que los flagelos representan el principal factor de virulencia que promueve la adhesión de *Clostridium difficile* a la mucosa intestinal (168).

Proteínas de la superficie bacteriana

Recientemente se han estudiado algunas proteínas superficiales de *Clostridium difficile* que podrían contribuir a la colonización, destacando los trabajos de Waligora y cols. Ellos detectaron a la Cwp66 (por *clostridial wall protein*), de 66 Kda y que *in vitro* muestra propiedades como adhesina; inclusive, en bacterias tales como *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus saprophyticus* moléculas similares también funcionan como autolisina, aspecto que aún no se ha logrado comprobar en la Cwp66 (185).

Hennequin localizó a la Fbp68 (por *fibronectin-binding protein*), de 68 kDa, que posibilita la unión bacteriana a fibronectina, una importante glicoproteína que se encuentra en los fluidos corporales y en la matriz extracelular de los vertebrados, y cuya función sería la de adherir el bacilo a la matrix extracelular, fibrinógeno, colágeno y vitronectina (68).

Por otro lado, se detectó otro grupo de proteínas que forman parte de la capa S, una estructura asociada a la superficie bacteriana de numerosos géneros (150). Estudios bioquímicos han demostrado que la capa S de *Clostridium difficile* está formada por dos grupos: uno de 36 KDa,

denominado proteínas de bajo peso molecular de la capa S y, el restante, de 45 KDa, conocido como proteínas de alto peso molecular de la capa S (194). El grupo de Calabi realizó el análisis de la secuencia que codifica para estas proteínas y encontró que ambos grupos son productos de un mismo gen, *slpA* (por *Surface Layer Proteins*) (31).

La bacteria se une *in vitro* a las células Hep-2 (células de carcinoma laríngeo humano) vía la capa S, e *in vivo* se ha demostrado el mismo patrón en ratones, lo que ha sugerido que se trata de una adhesina relevante (30).

Propiedades inmunológicas de las adhesinas de *Clostridium difficile*

El suero de los pacientes con colitis pseudomembranosa presenta anticuerpos contra algunas adhesinas, como es el caso de FliC y FliD. Con base en esta observación, O'Brien y cols, probaron los efectos de la inmunización pasiva en hámsters, inoculándoles anticuerpos anti-proteínas de la superficie bacteriana. Dichos autores observaron que el progreso de la infección disminuye, al inhibirse la unión del patógeno al tejido intestinal e incrementarse la fagocitosis (122). Este hallazgo ha evidenciado que, durante el curso de la enfermedad, algunas adhesinas inducen una respuesta humoral muy importante para la defensa del hospedero, lo que ha dado lugar al desarrollo de vacunas que puedan proteger al humano de la colitis pseudomembranosa (128, 129).

c. Enzimas hidrolíticas

Steffen, Seddon y Fedorko observaron la producción de hialuronidasa, condroitina-4-sulfatasa, gelatinasa, colagenasa y L-prolina-aminopeptidasa, por parte del microorganismo. De hecho, la detección de esta última ha fundamentado el desarrollo de un nuevo método para la identificación rápida de *Clostridium difficile*, ya que realmente son escasas las bacterias que dan positiva esta prueba bioquímica. Por su parte, la hialuronidasa es utilizada por el bacilo para hidrolizar el ácido hialurónico y producir N-acetilglucosamina, molécula necesaria para su metabolismo. En conjunto, este grupo de enzimas aumenta la disponibilidad de nutrientes en el intestino y, por ende, promueve el establecimiento de la bacteria en los tejidos del hospedero, aunque aún no se ha logrado correlacionar su concentración con la virulencia de las cepas (50, 154, 162).

d. Cápsula

Los trabajos de Davies y Borriello con 9 cepas toxigénicas y 6 no toxigénicas revelaron la presencia de una cápsula compacta o difusa, dependiendo de la clona estudiada; ellos emplearon Rutenio rojo para marcar el glicocálix (41). Un año más tarde Baldassarri reportó que dicha cápsula medía 30 a 80 nm en algunos aislados de pacientes con colitis pseudomembranosa y 10 a 20 nm en los provenientes de niños asintomáticos. Hasta el momento, los estudios concluyen que este factor

de virulencia tiene solo actividad antifagocitaria y no propiedades adhesivas (8).

Epidemiología

a. Factores de riesgo

Uso de antibióticos de amplio espectro

Desde los 60s y hasta la fecha, la administración de antibióticos de amplio espectro está considerada como el más significativo y frecuente factor de riesgo en lo tocante a la aparición de la enfermedad asociada a *Clostridium difficile*. La razón principal de esta afirmación reside en el hecho de que una de las principales defensas contra la colonización del tejido gastrointestinal radica en el mantenimiento del ecosistema entérico. Así, cuando algún invasor oportunista alcanza esos tejidos, su crecimiento será limitado o nulo, merced a los componentes de la flora habitual, fenómeno conocido como “resistencia a la colonización”.

Sin embargo, es claro que la administración de antibióticos puede destruir el mencionado equilibrio y permitir al patógeno establecerse o incrementar su número en los tejidos intestinales, ante la abrupta ausencia de los simbiontes sensibles al antimicrobiano en turno. La tabla 4 menciona a los antibióticos más comúnmente implicados en este proceso (49, 192).

<i>Alto riesgo</i>	<i>Riesgo Moderado</i>	<i>Riesgo bajo</i>
Cefalosporinas	Ampicilina, amoxicilina	Aminoglucosidos
Clindamicina	Co-trimazol	Metronidazol
	Macrolidos	Quinolonas
	Tetraciclinas	Rifampicina

Tabla 4. Antibióticos y su riesgo en la adquisición de *Clostridium difficile* (192)

Clindamicina

En 1970 surgió un mayor interés por la colitis pseudomembranosa, después de la publicación de un estudio que reportó a 200 pacientes que habían sido tratados con clindamicina y, de los cuales, el 21% desarrolló diarrea y el 10% colitis pseudomembranosa; una reunión originada por el fenómeno dio lugar al término “colitis asociada a clindamicina” (78, 92).

Prácticamente al mismo tiempo, se observó que el antimicrobiano también inducía cecitis letal en hámsters y que el filtrado de heces de estos animales contenía una toxina capaz de manifestar citotoxicidad en cultivos de células (15). Actualmente, el antibiótico es raramente prescrito, lo que ha disminuido su incidencia en los casos de colitis.

Cefalosporinas

Las cefalosporinas están consideradas como un importante factor de riesgo para adquirir diarrea asociada a *Clostridium difficile*, en especial las denominadas de tercera generación, tales como ceftazidima y ceftriaxona. De hecho, son más potentes que otros antibióticos de amplio espectro incluidas la gentamicina y las penicilinas, por lo que numerosos autores proponen su uso racional en la búsqueda de reducir los casos de colitis pseudomembranosa (6, 14, 33, 60,120).

Fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas tales como la ciprofloxacina y ofloxacina se han relacionado ocasionalmente con *Clostridium difficile*. Un ejemplo de ello es un reporte en el que se implicó a la ciprofloxacina con la bacteria, aunque inicialmente existía un diagnóstico previo de salmonelosis, lo que hace posible que este cuadro haya sido el que desencadenó la patología en vez de la fluoroquinolona (18, 29, 70, 96, 108, 192).

En apoyo a la observación anterior, se publicó un estudio que demostró que, de 213 pacientes que recibieron ciprofloxacina como monoterapia, ninguno desarrolló la enfermedad (59).

Como suele suceder, McCusker y cols reportaron una fuerte asociación entre las fluoroquinolonas y la colitis pseudomembranosa, patología muy

parecida a la que se origina con clindamicina. Sin embargo, la mayoría de los autores clasifica a las fluoroquinolonas como antibióticos de bajo riesgo (107, 192)

b. Grupos afectados

Los grupos más afectados por *Clostridium difficile* son los conformados por pacientes hospitalizados y en especial quienes sufren de deterioro inmunológico, tales como los ancianos mayores que han recibido terapia de antibióticos; cabe agregar que la probabilidad de adquirir al patógeno se incrementa con el tiempo de hospitalización (4, 39, 89, 109).

Otro grupo vulnerable está constituido por 10 al 15% de los niños recién nacidos e infantes de hasta 2 años, en los que se llegan a encontrar toxinas en niveles similares a las de los adultos con colitis severa. Sin embargo, es preciso subrayar que algunos no desarrollan síntomas aparentes (23, 136, 155), al parecer debido a que, en etapas tempranas de la vida, el receptor para la toxina A aún no se desarrolla en cantidades importantes (47).

c. Otros factores de riesgo

Otros factores predisponentes, aunque por fortuna de baja incidencia, consisten en las cirugías gastrointestinales, la presencia de sondas de succión nasogástrica, el manejo odontológico con antibióticos de amplio

espectro, las enfermedades crónicas graves, sobre todo las renales, hepáticas y causantes de inmunodepresión, los procedimientos gastrointestinales no invasivos repetidos (endoscopías), el uso de antiulcerosos, la quimioterapia, la estancia en unidades de terapia intensiva, la alimentación por sonda pospilórica, la infección cruzada con las manos del personal médico y la contaminación de superficies y objetos tales como los termómetros electrónicos rectales (11, 126, 136).

Además, en años recientes, *Clostridium difficile* ha surgido como una de las causas de diarrea crónica en los pacientes con SIDA (189).

III. PATOLOGÍA

a. Histología y cuadro clínico

a.1 Cuadro Clínico

Se debe sospechar de la enfermedad asociada a *Clostridium difficile* en todo paciente que presente diarrea a partir del tercer día de hospitalización (definida como más de tres deposiciones blandas o líquidas al día y por más de dos días consecutivos), sin alguna causa que la explique y, en especial, al tratarse de casos en los que exista antecedente de uso de antibióticos en los tres meses previos.

El espectro clínico correspondiente es amplio y comprende, en orden de gravedad, el estado de portador asintomático, la diarrea simple o asociada a colitis, la colitis pseudomembranosa y la colitis fulminante (con o sin megacolon tóxico) (28, 74, 143).

Los signos y síntomas aparecen generalmente en forma abrupta durante el tratamiento antibiótico (aunque en el 20% de los casos pueden aparecer dentro de los 60 días posteriores), y consisten en diarrea acuosa, fiebre de moderada intensidad, dolor abdominal, náuseas, anorexia, distensión abdominal, deshidratación y compromiso del estado general; en el laboratorio, se observan leucocitosis, hipoalbuminemia y alteraciones hidroelectrolíticas (28, 74, 143). Dichos síntomas aparecen con mayor intensidad y frecuencia a medida que la patología evoluciona, desde

diarrea simple hasta las formas más graves (136). El 20% de los casos graves se pueden presentar sin diarrea, apareciendo como un abdomen agudo, con íleo, signos sépticos y falla orgánica múltiple, especialmente en pacientes con otro tipo de padecimientos (28, 74).

a.2 Histología

En general, las lesiones de la colitis pseudomembranosa muestran las siguientes características:

Macroscópicamente, se observa una alteración difusa de la mucosa colónica, la cual adquiere un color rojo intenso, con erosiones superficiales y parcialmente cubiertas por placas blanco-amarillentas de aproximadamente 2 a 10 mm de diámetro; éstas corresponden a las características pseudomembranas que dan origen al nombre del padecimiento (consultar la figura 14) (81).

Microscópicamente, se observan tres tipos de lesiones, de acuerdo con la severidad del cuadro:

Lesión tipo I o temprana. Se caracteriza por necrosis epitelial en forma de parches, acompañada de un exudado de fibrina y neutrófilos en la luz del colon.

Lesión tipo II. Es más exudativa y prominente, por lo que es conocida como lesión tipo volcán, ya que aparece como una ulceración epitelial, en tanto que la mucosa circundante permanece intacta.

Lesión tipo III. Se caracteriza por necrosis epitelial difusa y una ulceración recubierta por una pseudomembrana compuesta por mucina, fibrina, leucocitos y desechos celulares.

Cuando la infección se resuelve, la mucosa regresa a la normalidad, aunque persiste una irregularidad glandular residual (136).

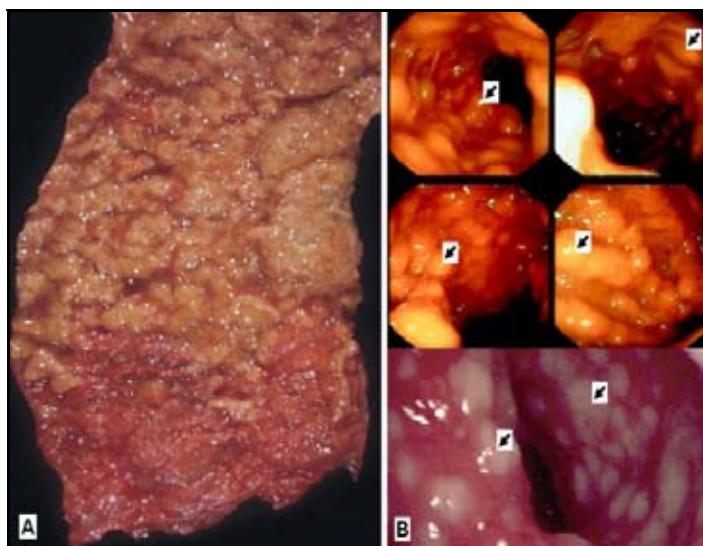


Figura 14. Colitis pseudomembranosa. **A.** Espécimen del colon post-mortem. **B.** Imagen endoscópica de las pseudomembranas: se observan las placas amarillentas típicas de la enfermedad (flechas) (24,75)

IV. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Manejo de la muestra

La realización del diagnóstico en el laboratorio se basa principalmente en el análisis de evacuaciones fecales líquidas o semisólidas, de las cuales en general se recolectan 10 a 20 mL. Los especímenes sólidos únicamente se emplean en el caso de estudios epidemiológicos, en los cuales se trata de determinar el índice de portadores sanos de una cierta población.

La recolección se efectúa en recipientes estériles de vidrio o plástico que no contienen medio de transporte. Para la óptima recuperación del microorganismo, la muestra se debe procesar dentro de las dos primeras horas posteriores a la obtención ya que, el número de células vegetativas viables disminuye rápidamente. En caso de que no se pueda realizar el análisis se debe de conservar a 5°C un máximo de 2 días.

Las muestras en las cuales se busca a las toxinas deben mantenerse a 5°C por un máximo de 3 días, o bien, se pueden congelar a -70°C bajo condiciones anaerobias. La congelación a -20°C no se recomienda, ya que la actividad citotóxica disminuye dramáticamente (53, 117).

a. Detección de *Clostridium difficile* en muestras fecales

Cultivo

El cultivo de las muestras pretende demostrar la presencia del patógeno en las evacuaciones de los pacientes afectados. Para ello, es necesario realizar un pre-tratamiento de las heces, que permita seleccionar las esporas de *Clostridium difficile* y evitar el crecimiento de otros microorganismos. Los dos procedimientos más utilizados son el tratamiento con alcohol y el tratamiento con calor. En el primero, se colocan volúmenes iguales de la muestra y etanol absoluto (o al 95%) en un tubo, se mezclan suavemente y el contenido se incuba durante 1 h a 22–25°C, en agitación constante; posteriormente, algunas alícuotas se siembran en los medios CCFA, agar sangre anaerobio o agar yema de huevo. En el segundo, un tubo con medio carne-almidón-glucosa es precalentado a 80°C en baño María durante 5 minutos; se le adiciona 1 mL de la muestra y se calienta por 10 minutos más, antes de ser enfriado con agua a temperatura ambiente; la suspensión es sembrada en alguno de los tres medios antes mencionados (117, 118).

La incubación de los cultivos se lleva a cabo en condiciones de anaerobiosis, a 37°C durante 48 h. La identificación posterior del microorganismo se realiza con base en las características microscópicas, macroscópicas, en las pruebas bioquímicas y a través de cromatografía de gas-líquido o resonancia magnética (117).

b. Detección de las toxinas de *Clostridium difficile*

Pruebas de citotoxicidad en cultivos de células

Si bien existen múltiples métodos para la detección de las toxinas de *Clostridium difficile* en heces, el ensayo de citotoxicidad en cultivo de células es el que se considera como estándar de oro, contra el cual se evalúan las nuevas tecnologías.

En este sentido, el método se fundamenta en la detección del efecto citotóxico de la toxina B en cultivos de células. Para ello, se diluye 1:3 la muestra fecal, empleando como diluyente una solución amortiguadora de fosfatos, y el contenido se centrifuga a 2,500 g por 30 minutos; a continuación, se separa el sobrenadante, se filtra a través de una membrana con poro de 0.45 μm de diámetro y se inoculan 100 μL del filtrado en placas con cultivo celular, incluida una adicionada con antitoxina de *Clostridium sordelii*, la cual neutraliza los efectos citotóxicos de las toxinas de *Clostridium difficile*. Este último requisito resulta necesario para aportar especificidad al método, ya que algunas muestras fecales podrían contener otras sustancias que indujeran el efecto citotóxico. Las placas se incuban a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂, y los efectos (el redondeo de las células) se examinan a las 24 y 48 h (consultar la figura 15) (42, 178, 180).

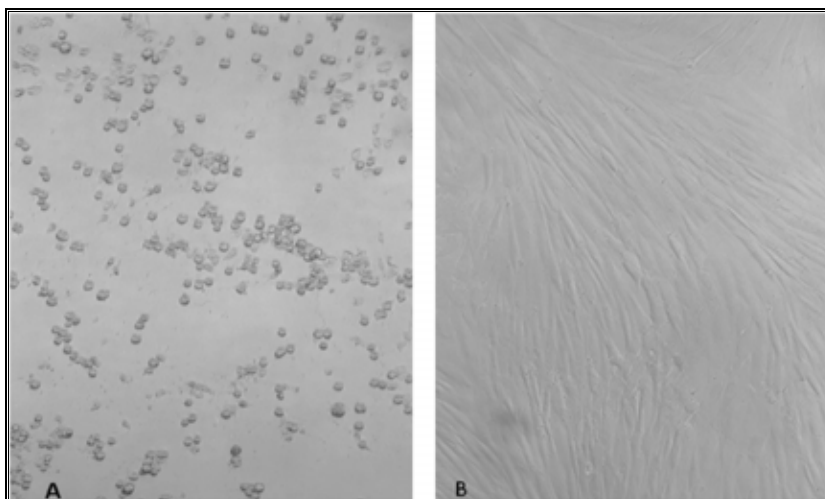


Figura 15. Efectos citotóxicos originados por la toxina B de *Clostridium difficile*. Células de fibroblastos humanos inoculadas en ausencia (A) y presencia (B) de antitoxina de *Clostridium sordellii* (5).

Los tipos celulares utilizados más comúnmente incluyen células de fibroblastos humanos de pulmón e intestino, ovario de hámster chino (CHO), adrenales de ratón, neuroblastoma de ratón, riñón de hámster (Vero) y adenocarcinoma de cervix (HeLa) (23).

El método posee una alta sensibilidad y especificidad: 94 al 100% y 99%, respectivamente. Sin embargo, se presentan ciertas desventajas, destacando el tiempo requerido para observar los efectos citotóxicos (24 a 48 h) y la eventual inactivación de la toxina B, lo que resulta en falsos negativos. Por tal motivo, se han desarrollado nuevos métodos que permiten un diagnóstico rápido de la enfermedad (42,117, 178).

Es importante mencionar que existe una variante del método antes mencionado, a la cual se conoce como “cultivo toxigénico”; consiste en realizar el ensayo de citotoxicidad a partir del microorganismo recuperado

en la placa del primocultivo. Para ello, se inoculan varias colonias en un caldo de enriquecimiento, como el caldo de infusión cerebro corazón (BHI), éste se incuba en anaerobiosis a 37°C durante 24 h y se filtra el contenido empleando una membrana cuyo poro sea de 0.45 μm de diámetro; a continuación, se utilizan 100 μL del filtrado para realizar el ensayo de citotoxicidad. Debido a que el cultivo toxigénico requiere de un mayor tiempo, generalmente no se utiliza y se prefiere buscar a las toxinas directamente en las heces (198).

Contrainmunolectroforesis

La contraimunolectroforesis (CIE) es un método muy sensible que permite realizar la detección de toxinas en un número grande de muestras, es sencilla y los resultados pueden obtenerse en 45 a 60 minutos. La técnica se basa en dejar difundir en el seno de un gel, tanto el antígeno como el anticuerpo; cuando ambos entran en contacto se forman líneas de inmunoprecipitado que manifiestan homología. La mencionada difusión se lleva a cabo bajo la influencia de un campo eléctrico y el uso de soluciones amortiguadoras de distinta concentración iónica promueve el efecto electroendosmótico: el agua del amortiguador se protona y migra hacia el cátodo arrastrando a los anticuerpos, hasta que se encuentran con el antígeno dando origen a las bandas de inmunoprecipitación (Consultar la figura 8) (23).

Ryan y cols (1980) fueron los primeros investigadores en aplicar la CIE para el diagnóstico, determinando una sensibilidad del 100% y una especificidad del 80% (148). En este entonces se pensó que la CIE era un método de diagnóstico rápido para *Clostridium difficile*; sin embargo, West y Wilkins observaron que también aparecían líneas de inmunoprecipitado cuando se analizaban cepas no toxigénicas, debido a que la antitoxina utilizada contenía anticuerpos frente a las toxinas A y B, aunque también anticuerpos contra diversos antígenos superficiales del propio microorganismo (188). De esta manera, se concluyó que el método resultaba altamente sensible pero poco específico, por lo que era conveniente usar una antitoxina purificada que solo presentara anticuerpos frente a las toxinas A y B de *Clostridium difficile*). Cabe subrayar que este método ha caído en desuso, debido a las desventajas antes mencionadas.

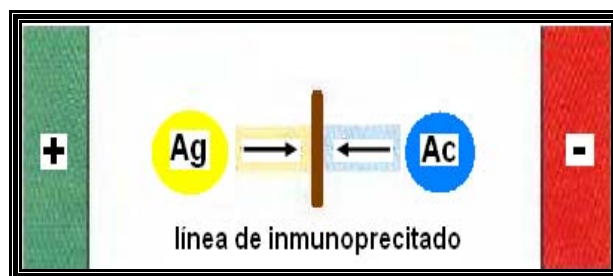


Figura 16. Método de contraelectroforesis para la detección de las toxinas de *Clostridium difficile*. Ag, antígeno. Ac, Anticuerpo (23)

Ensayo de aglutinación con partículas de látex

Este método consiste en el uso de anticuerpos acoplados a partículas de látex, los cuales al entrar en contacto con el antígeno correspondiente participan en una reacción de aglutinación cuya claridad es incuestionable. Inicialmente, Shahrabadi y cols desarrollaron este ensayo para detectar la toxina A en heces; sin embargo, se reconocía a una enzima bacteriana, la glutamato deshidrogenasa (GDH), que se encuentra tanto en cepas toxigénicas como no toxigénicas y, además, también es producida por otros microorganismos anaerobios; por esta razón, el método posee una baja especificidad, de 48 a 59%, pero una alta sensibilidad, del 95 al 96%. Aun así, se utiliza ampliamente como un método de “screening”, ya que se trata de una técnica rápida, fácil de realizar y que no requiere de un equipo costoso (136, 156, 200).

Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA)

Desde la década de los 80s se empezó a evaluar un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para detectar a las toxinas en muestras fecales (199). A la fecha, este método es el que se utiliza habitualmente, ya que tiene la ventaja de ser rápido (los resultados se pueden obtener en 1 a 2 h) y fácil de realizar, una sensibilidad de 75 a 85%, y su especificidad es alta, de 92 a 94%, cifras que aumentan cuando se analiza una segunda muestra (123, 200).

La variante que se utiliza corresponde a la ELISA tipo “sándwich”, en la que se emplean dos anticuerpos dirigidos contra la toxina A. El primero se encuentra fijo a la microplaca en la que se añade una alícuota de la muestra fecal: si dicha toxina está presente en la muestra, durante la incubación de 1 a 2 h se unirá al anticuerpo fijo. En el siguiente paso, se adiciona el segundo anticuerpo el cual, además de reconocer a la toxina A se encuentra conjugado con una enzima (fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano o β -galactosidasa) que generará un producto colorido al entrar en contacto con el sustrato (consultar la figura 9) (158).

Debido a la reciente detección de cepas patógenas de *Clostridium difficile* toxina A negativa - toxina B positiva, se han desarrollado kits que detectan a ambas toxinas (97).

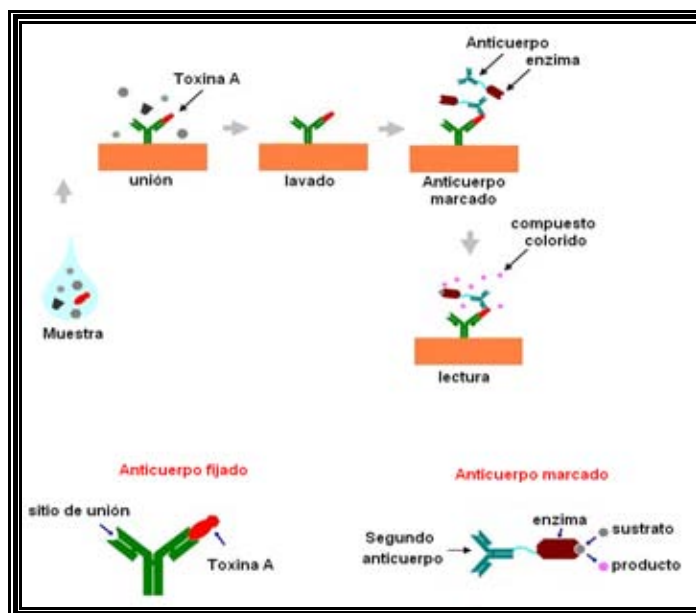


Figura 17. Método de ELISA tipo “sándwich” para la detección de toxinas de *Clostridium difficile* en heces (158).

V. TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN

Manejo inicial

El primer paso para llevar a cabo el tratamiento de la diarrea asociada a *Clostridium difficile* consiste en suspender la administración del antibiótico de amplio espectro que causó la enfermedad; el 15 a 25% de los pacientes mejoran con solo esta medida. El segundo paso reside en restituir el equilibrio hidroelectrolítico y evitar el uso de fármacos antiperistálticos (loperamida y difenoxilato), ya que éstos aumentan el tiempo de residencia de las toxinas en el intestino (110, 111).

Terapia con antibióticos

Los agentes orales usados como primera línea terapéutica incluyen al metronidazol en dosis de 250 a 500 mg, 4 veces al día durante 7 a 14 días, y a la vancomicina (125 a 500 mg) 4 veces al día por 5 a 14 días. De esta manera, el 95% de los pacientes muestran signos evidentes de recuperación. Cabe señalar que, hasta ahora, no se han encontrado diferencias significativas en cuanto a la respuesta que se obtiene con uno u otro antimicrobiano; sin embargo, el metronidazol suele ser el de primera elección debido a su bajo costo y la vancomicina generalmente se elige para los casos más severos, pacientes embarazadas, o bien, enfermos que no toleran al primero o son alérgicos a él (20).

Los intentos por encontrar mejores antibióticos para tratar la infección han conducido a probar a la bacitracina, ácido fusídico, rifampicina y

teicoplanina; empero, no se han obtenido resultados superiores a los que proporcionan el metronidazol y la vancomicina (45, 121, 166, 195)

Recaídas

Frecuentemente, los regímenes terapéuticos antes mencionados aportan resultados satisfactorios; la diarrea mejora dentro de los primeros 4 días de tratamiento y desaparece durante las 2 primeras semanas. Es importante consignar que el 12 al 24% de los pacientes pueden desarrollar nuevos episodios de diarrea alrededor de los 2 meses posteriores al tratamiento y, desde luego, es necesario insistir con la antibiòticoterapia para resolver la sintomatología en forma definitiva. La tabla 4 incluye algunas estrategias para evitar las recaídas.

<p>Primera recaída</p> <ul style="list-style-type: none"> - 10 a 14 días de terapia con metronidazol o vancomicina <p>Segunda recaída</p> <ul style="list-style-type: none"> - Terapia con vancomicina <ul style="list-style-type: none"> 125 mg cada 6 horas por 7 días 125 mg cada 12 horas por 7 días 125 mg al día por 7 días 125 mg en días alternos hasta completar 6 días 125 mg cada 3 días por 9 días <p>Múltiples recaídas</p> <ul style="list-style-type: none"> - Terapia con vancomicina más colestiramina 4 g dos veces al día - <i>S. boulardii</i> en combinación con metronidazol y vancomicina - Vancomicina 125 mg 4 veces al día y rifampicina 600 mg dos veces al día por 7 días - Inmunoglobulina intravenosa

Tabla 5. Tratamiento de recurrencias en diarreas causada por *Clostridium difficile* (124)

Al parecer, las recaídas se presentan cuando se suspende el régimen terapéutico y, con base en ello, las esporas endógenas que aún no habían sido destruidas germinan en el intestino, en donde la flora habitual se encuentra desequilibrada. Por el contrario, las reinfecciones ocurren comúnmente debido a la exposición del paciente a una nueva cepa, con frecuencia debido a contaminación de las manos del personal hospitalario o del propio ambiente nosocomial (10, 191).

Probióticos

Los probióticos representan una mezcla de microorganismos vivos, que generalmente son administrados al paciente para reestablecer la flora habitual después de una antibióticoterapia, aunque también son importantes en cuanto a que estimulan la respuesta inmune y aumentan la producción de enzimas que degradan toxinas patógenas (112). Para el tratamiento secundario de la enfermedad, los microorganismos más utilizados incluyen a *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus paracasei* subespecie *paracasei*, en dosis de 5×10^{10} UFC (unidades formadoras de colonias)/ día, así como a *Saccharomyces boulardii*, en dosis de 2×10^{10} UFC/día. Estos se administran junto con el antibiótico de elección durante un período de 28 a 38 días (119, 165, 196). Los resultados han sido satisfactorios, puesto que la aparición de recaídas disminuye significativamente (110).

Enemas fecales

Con la misma finalidad de restituir la flora habitual en el menor tiempo posible, se ha ensayado con la utilización de enemas fecales. Estos corresponden a preparados con muestras fecales de individuos sanos, asegurándose de que estén libres de virus, parásitos y bacterias patógenas; se aplican al paciente 2 veces al día. Los pacientes que reciben este tipo de tratamiento muestran resultados positivos en el 80% de los casos y el 90% de ellos no sufre de recaídas. Este método ha caído en desuso, debido a que no se ha estandarizado y a que no continúan generándose datos que sustenten su eficacia (130, 179).

Adsorbentes

Además de la terapia encaminada a la erradicación del microorganismo, también es importante la destinada a la inactivación de las toxinas; en este caso, destaca la del uso de adsorbentes tales como las resinas de intercambio iónico (colestiramina y colestipol) y diversos polímeros sintéticos. Con respecto a las primeras, se ha comprobado que se unen a las toxinas, tanto "*in vivo*" como "*in vitro*"; sin embargo, no se observan diferencias significativas entre los pacientes tratados con resinas y los que no se someten a dicha terapia; además, la administración conjunta con vancomicina no es recomendable, debido a que el antibiótico tiene la propiedad de unirse a ellas (114, 127, 171).

Por lo que respecta a los polímeros sintéticos, estos son compuestos aniónicos de alto peso molecular recubiertos con oligosacáridos; los más

comúnmente utilizados incluyen al Synsorb 90, Tolevamer y GT160-246. Se administran en dosis de 6 g por día junto con el antibiótico de elección y sus resultados son buenos: alrededor del 80% de los pacientes se recupera dentro de los primeros 10 días del régimen terapéutico (40, 67, 88)

Productos inmunes

Los estudios de Kyne y cols han demostrado que la respuesta inmune del hospedero representa un importante factor que define el curso de la enfermedad (90, 132). Con base en este hallazgo, se desarrollaron dos productos: el primero, es una inmunoglobulina humana que contiene altos niveles de anticuerpos IgG dirigidos contra la toxina A de la bacteria; se administra a los pacientes por vía intravenosa, en dosis de 200 a 500 mg/kg por un período de 2 a 3 semanas, en combinación con el antimicrobiano de elección (metronidazol o vancomicina). Los resultados que proporciona suelen ser satisfactorios, ya que los pacientes se recuperan rápidamente y no experimentan posteriores recaídas. Cabe señalar que aún hacen falta estudios “control” que determinen la dosis exacta del producto y la duración del tratamiento (19, 149, 190)

El segundo corresponde a un polvo oral que contiene anticuerpos policlonales aislados a partir de leche de vacas inmunizadas con toxoide inactivado con formaldehído. Este producto es administrado 3 veces al día durante 2 semanas, junto con metronidazol o vancomicina y, frecuentemente, los pacientes se recuperan y no sufren de recaídas

aunque, al igual que con la terapia de inmunoglobulinas, se requiere de más estudios “control” para estandarizar la administración (175, 181).

Complicaciones

En los casos en los que el enfermo no responde positivamente a ninguno de los productos terapéuticos antes mencionados, la cirugía constituye el último recurso, ya que el padecimiento suele evolucionar hasta el grado de presentar perforaciones en el colon, abdomen agudo o megacolon tóxico. En este grupo de pacientes, la mortalidad es alta, en rangos de 32 al 50% de los casos (22, 56).

Medidas preventivas

Igual que en muchas otras enfermedades, la prevención resulta la mejor opción para combatir a la colitis pseudomembranosa y, en general, a las afecciones por *Clostridium difficile*. Las principales recomendaciones son las siguientes:

- Restricción en el uso de antibióticos, tanto para erradicar infecciones ajenas a *Clostridium difficile*, como para prevenir la reincidencia de la colonización intestinal por esta especie.
- Aislamiento de los pacientes afectados.
- Educación del personal encargado del cuidado de estos pacientes.
- Escrupuloso lavado de manos del personal nosocomial para evitar las transmisiones por esta vía.

- Desinfección de los objetos contaminados. Los desinfectantes efectivos incluyen al hipoclorito de sodio y a las soluciones de formaldehído.
- Uso de termómetros rectales desechables.

Finalmente, una nueva opción profiláctica que aún se encuentra bajo investigación es el uso de vacunas. Hasta el momento se ha probado la inmunización en animales con toxoide A y B de *Clostridium difficile* inactivado con formalina, observándose que los animales quedan completamente protegidos contra el efecto de las toxinas (176). Otros estudios realizados en individuos sanos han mostrado que la administración parenteral del toxoide A de *Clostridium difficile* genera un alto título de anticuerpos; a este respecto, serán importantes las pruebas que se realizarán en individuos que presentan la enfermedad (1).

CONCLUSIONES

1. La fuente principal de aislamiento de *Clostridium difficile* son las personas afectadas por la colitis pseudomembranosa. Los medios de cultivo más eficaces son el CCFA, CMA, CMBA y TCCFA; una vez obtenido el desarrollo de colonias sospechosas, éstas se someten a pruebas bioquímicas y sus productos metabólicos se pueden detectar por cromatografía gas-líquido.
2. El principal factor de virulencia del agente causal consiste en las toxinas A y B, así como en la CDT; no obstante, el patógeno también cuenta con adhesinas, flagelos, enzimas hidrolíticas y cápsula
3. Genéticamente, las toxinas se encuentran codificadas en un segmento de ADN, denominado *locus* de patogenicidad, el cual está conformado por tres fragmentos (*tcdR*, *tcdE* y *tcdC*); éstos están relacionados estrechamente con la regulación de la síntesis de las tres exotoxinas.
4. Un nuevo método de tipificación basado en el polimorfismo del *locus de patogenicidad* permite diferenciar 22 toxinotipos diferentes; así mismo, los factores ambientales que regulan la expresión de las toxinas aún no se han logrado establecer.
5. Hasta el momento sólo el receptor para la toxina A se ha logrado identificar. Las toxinas ingresan a la célula blanco vía endocitosis y

glucosilando a las GTPasas Rho, desencadenando alteraciones fisiológicas y morfológicas que contribuyen directamente a la patología de la enfermedad.

6. Recientemente se han detectado cepas no productoras de toxina A que también ocasionan el padecimiento; sin embargo, aún es necesario establecer cuál es su impacto clínico.
7. El papel de la respuesta humoral durante el desarrollo de la enfermedad se ha clasificado como determinante, ya que la severidad y duración de la enfermedad está en función directa de la concentración de anticuerpos generados por el hospedero.
8. El factor de riesgo más importante para la ocurrencia de la colitis pseudomembranosa consiste en la administración de antibióticos de amplio espectro (cefalosporinas de tercera generación y clindamicina) en pacientes hospitalizados con deterioro inmunológico.
9. En los enfermos se detectan niveles de toxina iguales a los observados en niños aparentemente sanos de hasta de 2 años de edad.
10. El cuadro clínico del padecimiento suele incluir fiebre, dolor abdominal, náuseas, anorexia, distensión abdominal y deshidratación; mediante endoscopía se pueden evidenciar las típicas placas amarillentas que se ubican en el intestino.

11. El ensayo de citotoxicidad en cultivos de células es la prueba considerada como estándar de oro, detecta el efecto citotóxico de la toxina B y posee una alta sensibilidad y especificidad. La contraelectroforesis y los ensayos con partículas de látex se han sustituido por métodos inmunoenzimáticos tales como la técnica de ELISA.
12. La primera medida terapéutica consiste en la suspensión del antibiótico que desencadenó el cuadro patológico; la siguiente reside en la administración de metronidazol o vancomicina y las anteriores deben complementarse con la incorporación de probióticos y el empleo de enemas fecales, adsorbentes y productos inmunes.
13. Las medidas preventivas deben incluir la restricción en la prescripción de antibióticos relacionados con la enfermedad y la capacitación al personal médico para evitar que éste funcione como foco de transmisión.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
AMP	Monofosfato de adenosina
BHI	Caldo Infusión cerebro-corazón
CCFA	Agar Fructosa Cicloserina Cefoxitina
CDT	Toxina binaria (<i>Clostridium difficile</i> binary Toxin)
CHO	Células de ovario de hámster chino
CIE	Contrainmunolectroforesis
CMA	Agar Manitol Cefoxitina
CMBA	Agar sangre Manitol Cefoxitina
CROPS	Unidades de repetición de oligopéptidos (combined repetitive oligopeptides)
Cwp66	Proteína de la pared (Clostridial wall protein)
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
Fbp68	Proteína de unión a Fibronectina (Fibronectin-binding protein)
GDH	Glutamato deshidrogenasa
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
Hela	Células de adenocarcinoma de cervix
IL-1	Interleucina I
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
Kb	Kilobases
Kda	Kilodaltones
mL	Mililitros
mm	Micrometros
µL	Microlitros
nm	Nanometros
O₂	Radical superóxido

PGs	Prostaglandinas
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia humana
slpA	Proteínas de la capa superficial (Surface Layer Proteins)
TCCFA	Agar Taurocolato de sodio Cicloserina Cefoxitina
TcdA	Toxina A (Toxin <i>Clostridium difficile</i> A)
TcdA⁻	Cepas no productoras de la toxina A
TcdB	Toxina B (Toxin <i>Clostridium difficile</i> B)
tcdD	Regulador negativo de la síntesis de toxinas
tcdE	Dominio de translocación-inserción a la membrana
tcdR	Regulador positivo en la síntesis de toxinas
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral α
UFC/día	Unidades formadoras de colonias/día
Vero	Células de riñón de hámster

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Aboudola S., Kotloff K.L., Kyne L., Warny M., Kelly E.C., Sougioultzis S., Giannasca P.J., Monath T.P. and Kelly C.P., *Clostridium difficile* vaccine and serum immunoglobulin G antibody response to toxin A, *Infect. Immun.*, 2003; 71: 1608–1610.
- 2.- Adamson P., Marshall C.J., Hall A. and Tilbrook P.A., Posttranslational modifications of p21 rho proteins, *J. Biol. Chem.*, 1992; 267: 20033–20038.
- 3.-Alcantara C., Stenson F.W., Steiner S.T. and Guerrant L.R., Role of inducible cyclooxygenase and prostaglandins in *Clostridium difficile* Toxin A-Induced Secretion and Inflammation in an Animal model, *The Journal of Infectious Diseases*, 2001; 5(184): 648.
- 4.- Al-Eidan F.A., McElroy J.C., Scott M.G. and Kearney M.P., *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in hospitalized patients, *J. Clin. Pharm. Ther.*, 2000; 25(2): 101-109.
- 5.- Alfa M.J., Kabani A., Lyerly D., Moncrief S., Neville L.M., Al-barrak A., Harding G.K.H., Dyck B., Olekson K. and Embil J.M., Characterization of a Toxin A-Negative, Toxin B-Positive Strain of *Clostridium difficile* Responsible for a Nosocomial Outbreak of *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea, *J. Clin. Microbiol.*, 2000; 38(7): 2706–2714.
- 6.- Aronsson B., Mollby R. and Nord C.E., Antimicrobial agents and *Clostridium difficile* in acute enteric disease: epidemiological data from Sweden, 1980–1982, *Journal of Infectious Diseases*, 1985; 151: 476–81.
- 7.- Arroyo G.L., Rousseau J. and Willey B.M., Use of a selective enrichment broth to recover *Clostridium difficile* from stool swabs stored under different conditions, *Journal of clinical Microbiology*, 2005; 43(10): 5341-5343.
- 8.- Baldassarri L., Donelli G., Cerquetti M. and Mastrantonio P., Capsule-like structures in *Clostridium difficile* strains, *Microbiologica*, 1991; 14(4): 295-300.
- 9.- Barbut F., Decré D., Lalande V.R., Burghoffer B., Noussair L., Gigandon A., Espinasse F., Raskine L., Robert J., Mangeol A., Branger C. and Petit J., Clinical features of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea due to binary toxin (actin-specific ADPribosyltransferase)-producing strains, *J. Med. Microbiol.*, 2005; 54: 181–185.
- 10.- Barbut F., Richard A., Hamadi K., Chomette V., Burghoffer B. and Petit J.C., Epidemiology of recurrences or reinfections of *Clostridium difficile*-associated diarrhea, *J. Clin. Microbiol.*, 2000; 38: 2386–2388.

- 11.- Barnett J., Thomlinson D., Perry C., Marshall R., MacGowan A.P., An audit of the use of manual handling equipment and their microbiological flora implications for infection control, *J. Hosp. Infect.*, 1999; 43(4): 309-13.
- 12.- Barroso L A., Wang S.Z., Phelps C.J., Johnson J.L. and Wilkins T.D., Nucleotide sequence of *Clostridium difficile* toxin B gene, *Nucleic. Acids. Res.*, 1990; 18: 4004.
- 13.- Barth H., Pfeifer G., Hofmann F., Maier E., Benz R. and Aktories K., Low pH-induced formation of ion channels by *Clostridium difficile* toxin B in target cells, *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 10670–10676.
- 14.- Bartlett J.G., Antibiotic-associated diarrhea, *Clinical Infectious Diseases*, 1992; 15: 573–81.
- 15.- Bartlett J.G., Onderdonk A.B., Cisneros R.L. and Kasper D.L., Clindamycin-associated colitis due to toxin-producing species of *Clostridium* in hamsters, *Journal of Infectious Diseases*, 1977; 136: 701–705.
- 16.- Bartlett J.G., Rolfe R.D. and Finegold, Introduction In *Clostridium difficile*: its Role in Intestinal Disease, Academic Press, 1988; 1–13.
- 17.- Bartley S.L. and Dowell V.R., Comparison of media for the isolation of *Clostridium difficile* from faecal specimens, *Laboratory Medicine*, 1991; 22: 335–338.
- 18.- Bates J., Wilcox H., Spencer C. and Harris M., Ciprofloxacin and *Clostridium difficile* infection, *Lancet*, 1990; 336: 1193.
- 19.- Beales L.P., Intravenous immunoglobulin for recurrent *Clostridium difficile* diarrhea, *Gut*, 2002; 51: 456.
- 20.- Beloosesky Y., Grosman B., Marmelstein V. and Grinblat J., Convulsions induced by metronidazole treatment for *Clostridium difficile*-associated disease in chronic renal failure, *Am. J. Med. Sci.*, 2000; 319: 338–339.
- 21.- Boone R.D. and Castenholz W.R., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2ª edición, vol. 1, editorial Springer, 2001; U.S.A.
- 22.- Bradbury W. and Barrett S., Surgical aspects of *Clostridium difficile* colitis, *Br. J. Surg.*, 1997; 84: 150–159.
- 23.- Brazier J.S., The diagnosis of *Clostridium difficile*-associated disease, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1998; 41(Supl. C): 29-40.
- 24.- Brian W., Hurley D. and Cuong C.N., The Spectrum of Pseudomembranous Enterocolitis and Antibiotic-Associated Diarrhea, *Arch. Intern. Med.*, 2002; 162: 2177-2184.

- 25.- Brito G.A., Fujji J., Carneiro-Filho B.A., Lima A.A., Obrig T. and Guerrant R. L., Mechanism of *Clostridium difficile* toxin A-induced apoptosis in T84 cells, *J. Infect. Dis.*, 2002; 186: 1438–1447.
- 26.- Busch C., Hofmann F., Gerhard R. and Aktories K., Involvement of a conserved tryptophan residue in the UDP-glucose binding of large clostridial cytotoxin glycosyltransferases, *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 13228–13234.
- 27.- Busch C., Hofmann F., Selzer J., Munro S., Jeckel D., and Aktories K., A common motif of eukaryotic glycosyltransferases is essential for the enzyme activity of large clostridial cytotoxins, *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 19566–19572.
- 28.- Cabezón Román G., pseudomembranous colitis (PMC), *Gastr. Latinoam.*, 2004; 15(2): 116 - 119.
- 29.- Cain B. and O'Connor E., Pseudomembranous colitis associated with ciprofloxacin, *Lancet*, 1990; 336:946.
- 30.- Calabi E., Calabi F., Phillips A.D. and Fairweather N.F., Binding of *Clostridium difficile* Surface Layer Proteins to Gastrointestinal Tissues, *Infection and Immunity*, 2002; 70(10): 5770–5778.
- 31.- Calabi E., Ward S., Wren B., Paxton T., Panico M., Morris H., Dell A., Dougan G. and Fairweather N., Molecular characterization of the surface layer proteins from *Clostridium difficile*, *Mol. Microbiol.*, 2001; 40: 1187–1199.
- 32.- Calderon G.M., Torres-Lopez J., Lin T.J., Chavez B., Hernandez M., Munoz O., Befus A.D. and Enciso J.A., Effects of toxin A from *Clostridium difficile* on mast cell activation and survival, *Infect. Immun.*, 1998; 6: 2755–2761.
- 33.- Cartmill T.D., Panigrahi H., Worsley M.A., McCann D.C., Nice C.N. and Keith E., Management and control of a large outbreak of diarrhoea due to *Clostridium difficile*, *Journal of Hospital Infection*, 1994; 27: 1–15.
- 34.- Castagliuolo I., Keates A.C., Wang C.C., Pasha A., Valenick L., Kelly C.P., Nikulasson S.T., LaMont J.T. and Pothoulakis C., *Clostridium difficile* toxin A stimulates macrophage-inflammatory protein-2 production in rat intestinal epithelial cells, *J. Immunol.*, 1998; 160: 6039–6045.
- 35.- Cato E.P., George W.L. and Finegold S.M., Genus *Clostridium*, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1986; Vol. 2,1141-1200.
- 36.- Chang R., Química, 6ª edición, editorial McGraw-Hill, 1999; 979-980, E.U.A.

- 37.- Chaves-Olarte E., Florin I., Boquet P., Popoff M., Von Eichel-Streiber C. and Thelestam M., UDP-glucose deficiency in a mutant cell line protects against glucosyltransferase toxins from *Clostridium difficile* and *Clostridium sordellii*, J. Biol. Chem., 1996; 271: 6925–6932.
- 38.- Ciaran P.K. and LaMont J.T., *Clostridium difficile* infection, Annual Review of Medicine, 1998; 49: 375-390.
- 39.- Clabots R., Johnson S. and Olson M., Acquisition of *Clostridium difficile* by hospitalized patients: evidence for colonized new admissions as the source of infection, J. Infect. Dis., 1992; 166: 561–567.
- 40.- Davidson D., Peppe J. and Louie T., A phase 2 study of the toxin binding polymer Tolevamer in patients with *Clostridium difficile*-associated diarrhea, In First International *Clostridium difficile* Symposium, Slovenia, May 2004; 5–8.
- 41.- Davies H.A. and Borriello S.P., Detection of capsule in strains of *Clostridium difficile* of varying virulence and toxigenicity, Microb. Pathog., 1990; 9(2): 141-146.
- 42.- Delmée M., Broeck J.V., Simon A., Janssens M. and Avesani A., Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* associated diarrhoea: a plea for culture, J. Med. Microbiol., 2005; 54: 187-191.
- 43.- Donelli G., Loredana F., Fabbri A., Fiorentini C. and Mastrantonio P., Enteric Toxins from Bacteria Colonizing Human Gut, Microbial Ecology in Health and Disease, 2000; Supl. 2: 194– 208.
- 44.- Dove C.H., Wang S.Z., Price S.B., Phelps C.J., Lyerly D.M., Wilkins T.D. and J.L. Johnson, Molecular characterization of the *Clostridium difficile* toxin A gene, Infect. Immun., 1990; 58: 480–488.
- 45.- Dudley M.N., McLaughlin J.C., Carrington G., Frick J., Nightingale C.H. and Quintiliani R., Oral bacitracin vs vancomycin therapy for *Clostridium difficile*-associated diarrhea. A randomized double-blind trial, Arch. Intern. Med., 1986; 146: 1101–1104.
- 46.- Dupuy B. and Sonenshein A.L., Regulated transcription of *Clostridium difficile* toxin genes, Mol. Microbiol., 1998; 27: 107–120.
- 47.- Eglow R., Pothoulakis C., Itzkowitz S., Diminished *Clostridium difficile* Toxin A Sensitivity in Newborn Rabbit Ileum Is Associated with Decreased Toxin A Receptor, J. Clin. Invest., 1992; 90: 822-829.
- 48.- Esclapez A.B. and Luengo F.M., *Clostridium difficile*: características biológicas y metodología para el aislamiento, caracterización y detección de toxinas, 1992; Universidad de Murcia.

- 49.- Farrell J. and LaMont T., Pathogenesis and clinical manifestations of *Clostridium difficile* diarrhea and colitis, *Curr. Topics. Microbiol. Immunol.*, 2000; 250: 109–25.
- 50.- Fedorko D.P. and Williams E.C., Use of cycloserine-cefoxitin-fructose agar and L-Proline-aminopeptidase (PRO Discs) in the rapid identification of *Clostridium difficile*, *Journal of clinical microbiology*, 1997; 35(5): 1258-1259.
- 51.- Feltis B.A., Wiesner S.M., Kim A.S., Erlandsen S.L., Lyerly D.L., Wilkins T.D. and Wells C.L., *Clostridium difficile* toxins A and B can alter epithelial permeability and promote bacterial paracellular migration through HT-29 enterocytes, *Shock*, 2000; 14: 629–634.
- 52.- Florin I. and Thelestam M., Internalization of *Clostridium difficile* cytotoxin into cultured human lung fibroblasts, *Biochim. Biophys. Acta* 763: 383–392.
- 53.- Freeman J. and Wilcox H., The effects of storage conditions on viability of *Clostridium difficile* veget cells and spores and toxin activity in human faeces, *Journal of Clinical Pathology*, 2003; 56(2): 126-128.
- 54.- Frey S.M. and Wilkins T.D., Localization of two epitopes recognized by monoclonal antibody PCG-4 on *Clostridium difficile* toxin A, *Infect. Immun.*, 1992; 60: 2488–2492.
- 55.- Frisch C., Gerhard R., Aktories K., Hofmann F. and Just I., The complete receptor-binding domain of *Clostridium difficile* toxin A is required for endocytosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003; 300: 706–711.
- 56.- Gerding N., Treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2000; 250: 127–139.
- 57.- Geric B., Johnson S., Gerding D.N., Grabnar M. and Rupnik M. Frequency of binary toxin genes among *Clostridium difficile* strains that do not produce large clostridial toxins, *J. Clin. Microbiol.*, 2003; 41(11): 5227-5232.
- 58.- Geric B., Rupnik M., Gerding D.N., Grabnar M. and Johnson S., Distribution of *Clostridium difficile* variant toxinotypes and strains with binary toxin genes among clinical isolates in an American hospital, *J. Med. Microbiol.*, 2004; 53: 887–894.
- 59.- Golledge C.L., Carson C.F., O'Neill G.L., Bowman R.A. and Riley T.V., Ciprofloxacin and *Clostridium difficile* associated diarrhoea, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1992; 30: 141–7.
- 60.- Golledge C.L., McKenzie T. and Riley V., Extended spectrum cephalosporins and *Clostridium difficile*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1989; 23: 929–31.

- 61.- Gonçalves C., Decré D., Barbut F., Burghoffer B. and Petit J., Prevalence and Characterization of a Binary Toxin (Actin-Specific ADP-Ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*, J. Clin. Microbiol., 2004; 42(5): 1933–1939.
- 62.- Gülke I., Pfeifer G., Liese J., Fritz M., Hofmann F., Aktories K. and Barth, Characterization of the Enzymatic Component of the ADPRibosyltransferase Toxin CDTa from *Clostridium difficile*, Infection and Immunity, 2001; 69(10): 6004–6011.
- 63.- Hafiz S. and Oakley C.L., *Clostridium difficile*: isolation and characteristics, Journal of Medical Microbiology, 1976; 9: 129–136.
- 64.- Hall I.C. and O'Toole E., Intestinal flora in new-born infants, Am. J. Dis. Child, 1935; 49: 390-402.
- 65.- He D., Hagen S.J., Pothoulakis C., Chen M., Medina N.D., Warny M., and LaMont J.T., *Clostridium difficile* toxin A causes early damage to mitochondria in cultured cells, Gastroenterology, 2000; 119: 139–150.
- 66.- He D., Sougioultzis S., Hagen S., Liu J., Keates S., Keates A.C., Pothoulakis C. and Lamont J.T., *Clostridium difficile* toxin A triggers human colonocyte IL-8 release via mitochondrial oxygen radical generation, Gastroenterology, 2002; 122: 1048–1057.
- 67.- Heerze D., Kelm A., Talbot A. and Armstrong D., Oligosaccharide sequences attached to an inert support (SYNSORB) as potential therapy for antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis, J. Infect. Dis., 1994; 169: 1291–1296.
- 68.- Hennequin C., Janoir C., Barc M., Collignon A. and Karjalainen T., Identification and characterization of a fibronectin binding protein from *Clostridium difficile*, Microbiology, 2003; 149: 2779–2787.
- 69.- Henriques B., Florin I. and Thelestam M., Cellular internalisation of *Clostridium difficile* toxin A, Microb. Pathog., 1987; 2: 455–463.
- 70.- Hillman J., Gopal G., Harris R., Ciprofloxacin as a cause of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in an HIV antibody positive patient, Journal of Infection, 1990; 21: 205–207.
- 71.- Hippenstiel S., Schmeck B., N'Guessan P.D., Seybold J., Krull M., Preissner K., Eichel-Streiber C.V. and Suttorp N., Rho protein inactivation induced apoptosis of cultured human endothelial cells, Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol., 2002; 283: L830–838.
- 72.- Hofmann F., Busch C., Prepens U., Just I. and Aktories K., Localization of the glucosyltransferase activity of *Clostridium difficile* toxin B to the N-terminal part of the holotoxin, J. Biol. Chem., 1997; 272: 11074–11078.

- 73.- Hundsberger T., Braun V., Weidmann M., Leukel P., Sauerborn M. and Von Eichel-Streiber C., Transcription analysis of the genes *tcdA-E* of the pathogenicity locus of *Clostridium difficile*, Eur. J. Biochem., 1997; 244: 735–742.
- 74.- Iseman D.T., Hamza S.H. and Eloubeidi M.A., Pseudomembranous (*Clostridium difficile*)colitis, Gastrointest. Endosc., 2002; 56(6): 907.
- 75.- Johnson S., Kent S.A., O’Leary K.J., Merrigan M.M, Sambol S.P., Peterson L.R., and Gerding D.N., Fatal Pseudomembranous Colitis Associated with a Variant *Clostridium difficile* Strain Not Detected by Toxin A Immunoassay, Ann. Intern. Med., 2001; 135: 434-438.
- 76.- Just I., Selzer J., Wilm M., Rex G., Von Eichel-Streiber C., Mann M. and Aktories K., The enterotoxin from *Clostridium difficile* (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins, J. Biol. Chem., 1995a; 270: 13932–13936.
- 77.- Just I., Selzer J., Wilm M., Von Eichel-Streiber C., Mann M. and Aktories K., Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B, Nature, 1995b; 375: 500–503.
- 78.- Kabins S.A. and Spira T.J., Outbreak of clindamycin associated colitis, Annals of Internal Medicine, 1975; 83: 830–831.
- 79.- Karlsson S., Burman L.G. and Akerlund T., Suppression of toxin production in *Clostridium difficile* VPI 10463 by amino acids, Microbiology, 1999; 145 (Pt 7): 1683–1693.
- 80.- Karlsson S., Lindberg A., Norin E., Burman L.G. and Åkerlund T., Toxins, Butyric Acid, and Other Short-Chain Fatty Acids Are Coordinately Expressed and Down-Regulated by Cysteine in *Clostridium difficile*, Infection and Immunity, 2000; 68(10): 5881–5888.
- 81.- Kawamoto S., Horton K. and Fishman E., Pseudomembranous Colitis: Spectrum of Imaging Findings with Clinical and Pathologic Correlation, Radiographics, 1999; 19: 887-897.
- 82.- Kelly C.P., Becker S., Linevsky J.K., Joshi M.A., O’Keane J.C., Dickey B.F., LaMont J.T. and Pothoulakis C., Neutrophil recruitment in *Clostridium difficile* toxin A enteritis in the rabbit, J. Clin. Investig., 1994a; 93: 1257–1265.
- 83.- Kelly C.P., Pothoulakis C. and LaMont J.T., *Clostridium difficile* colitis, N. Engl. J. Med., 1994b; 330: 257-262.
- 84.- Kelly C.P., Pothoulakis C., Orellana J. and LaMont J.T., Human colonic aspirates containing immunoglobulin A antibody to *Clostridium difficile* toxin A inhibit toxin A-receptor binding, Gastroenterology, 1992; 102(1): 35-40.

- 85.- Kim H., Iaconis P. and Rolfe D., Immunization of adult hamsters against *Clostridium difficile*-associated ileocectitis and transfer of protection to infant hamsters, *Infect. Immun.*, 1987; 55: 2984–2992.
- 86.- Kim J.M., Kim J.S., Jun H.C., Oh Y.K., Song I.S. and Kim C.Y., Differential expression and polarized secretion of CXC and CC chemokines by human intestinal epithelial cancer cell lines in response to *Clostridium difficile* toxin A, *Microbiol. Immunol.*, 2002; 46: 333–342.
- 87.- Krivan H.C., Clark G.F., Smith D.F. and Wilkins T.D., Cell surface binding site for *Clostridium difficile* enterotoxin: evidence for a glycoconjugate containing the sequence Gal₁-3Gal₁-4GlcNAc, *Infect. Immun.*, 1986; 53: 573–581.
- 88.- Kurtz C.B, Cannon E.P , Brezzani A, Pitruzzello M., Dinardo C., Rinard E., Acheson W.K.D., Fitzpatrick R, Kelly P., Shackett K., Papoulis T.A, Goddard J.P., Barker R.H., Palace J.P. and Klinger J.D., GT160-246, a Toxin Binding Polymer for Treatment of *Clostridium difficile* Colitis, *Antimicrob. Agents. Chemother*, 2001; 45(8): 2340–2347.
- 89.- Kyne L., Merry C., OConnell B., Kelly A., Keane C. and O'Neill D., Factors associated with prolonged symptoms and severe disease due to *Clostridium difficile*, *Age ageing*, 1999; 28(2): 107-13.
- 90.- Kyne L., Warny M., Qamar A. and Kelly C.P., Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea, *Lancet*, 2001; 357: 189–193.
- 91.- Lance W.G., Sutter V.I., Citron D. and Finegold S.M., Selective and Differential Medium for Isolation of *Clostridium difficile*, *Journal of Clinical Microbiology*, 1979; 9(2): 214-219.
- 92.- Larson H.E. and Price A.B., Pseudomembranous colitis: presence of clostridial toxin, *Lancet*, 1977; 1312-1314.
- 93.- Larson H.E., Price A.B., Honour P. and Borriello S.P., *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranouscolitis, *Lancet*, 1978; 20: 1063-1066.
- 94.- Lima A.A. and Ribeiro R.A., The involvement of macrophagederived tumour necrosis factor and lipoxygenase products on the neutrophil recruitment induced by *Clostridium difficile* toxin B, *Immunology*, 1997; 91: 281–288.
- 95.- Limaye A., Turgeon D., Cookson B. and Fritsche T., Pseudomembranous Colitis Caused by a Toxin A2 B1 Strain of *Clostridium difficile*, *J. Clin. Microbiol.*, 2000; 38(4): 1696–1697.
- 96.- Low N. and Harries A., Ciprofloxacin and pseudomembranous colitis, *Lancet*, 1990; 336: 1510.

- 97.- Lozniewski A., Rabaud C., Dotto E., Weber M. and Mory F., Laboratory Diagnosis of *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea and Colitis: Usefulness of Premier Cytoclone A+B Enzyme Immunoassay for Combined Detection of Stool Toxins and Toxigenic *C. difficile* Strains, *J. Clin. Microbiol.*, 2001; 39(5): 1996–1998.
- 98.- MacFaddin J.F., Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica, 3ªedición, Editorial Medica Panamericana, 2003; Buenos Aires, Argentina.
- 99.- Madara J.L., Patapoff T.W., Gillece-Castro T.B., Colgan T.S.P., Parkos C.A., Delp C. and Mrsny R.J., 5'-adenosine monophosphate is the neutrophil-derived paracrine factor that elicits chloride secretion from T-84 intestinal epithelial cell monolayers, *J. Clin. Invest.*, 1993; 91: 2320-2325.
- 100.- Maegawa T., Karasawa T., Ohta T., Wang X., Kato H., Hayashi H. and Nakamura S., Linkage between toxin production and purine biosynthesis in *Clostridium difficile*, *J. Med. Microbiol.*, 2002; 51: 34–41.
- 101.- Mani N., Lyras D., Barroso L., Howarth P., Wilkins T., Rood J.I., Sonenshein A.L. and Dupuy B., Environmental response and autoregulation of *Clostridium difficile* TxeR, a sigma factor for toxin gene expression, *J. Bacteriol.*, 2002; 184: 5971–5978.
- 102.- Mantyh C.R., Pappas T.N., Lapp J.A., Washington M.K., Neville L.M., Ghilardi J.R., Rogers S.D., Mantyh P.W. and Vigna S.R., Substance P activation of enteric neurons in response to intraluminal *Clostridium difficile* toxin A in the rat ileum, *Gastroenterology*, 1996; 111: 1272–1280.
- 103.- Marshall C.J., Protein prenylation: a mediator of protein-protein interactions, *Science*, 1993; 259: 1865–1866.
- 104.- Martirosian G., Recovery of *Clostridium difficile* from Hospital Environments, *Journal of Clinical Microbiology*, 2006; 44(3): 1202–1203.
- 105.- Marvaud J.C., Eisel U., Binz T., Niemann H. and Popoff M.R., TetR is a positive regulator of the tetanus toxin gene in *Clostridium tetani* and is homologous to *botR*, *Infect. Immun.*, 1998a; 66: 5698–5702.
- 106.- Marvaud J.C., Gibert M., Inoue K., Fujinaga Y., Oguma K. and Popoff M.R., *botR/A* is a positive regulator of botulinum neurotoxin and associated non-toxin protein genes in *Clostridium botulinum*, *A. Mol. Microbiol.*, 1998b; 29: 1009–1018.
- 107.- McCusker M.E., Harris A.D., Perencevich E. and Roghmann M.C., Fluoroquinolone use and *Clostridium difficile*-associated diarrhea, *Emerging Infectious Diseases*, 2003; 9(6): 730-733.

- 108.- McFarland L.V., Bauwens J.E., Melcher S.A., Surawicz C.M., Greenberg R.N. and Elmer G.W., Ciprofloxacin associated *Clostridium difficile* disease, *Lancet*, 1995; 346(8980): 977–978.
- 109.- McFarland L.V., Surawicz C.M., Greenberg R.N., Bowen K.E., Melcher S.A. and Mulligan M.E., Possible role of cross transmission between neonates and mothers with recurrent *Clostridium difficile* infections, *Am. J. Infect. Control*, 1999; 27(3): 301-303.
- 110.- McFarland V., A review of the evidence of health claims for biotherapeutic agents, *Microb. Ecol. Health Dis.*, 2000b; 12: 65–76.
- 111.- McFarland V., Brandmarker A. and Guandalini S., Pediatric *Clostridium difficile*: a phantom menace or clinical reality?, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2000c; 31: 220–231.
- 112.- McFarland V., Normal flora: diversity and functions, *Microb. Ecol. Health Dis.*, 2000a; 12: 193–207.
- 113.- Mitchell M.J., Laughon B.E. and Lin S., Biochemical studies on the effect of *Clostridium difficile* toxin B on actin in vivo and in vitro, *Infect. Immun.*, 1987; 55: 1610–1615.
- 114.- Mogg G.A., George R.H., Youngs D., Johnson M., Thompson H., Burdon D.W. and Keighley M.R., Randomized controlled trial of colestipol in antibiotic-associated colitis, *Br. J. Surg.*, 1982; 69(3): 137–139.
- 115.- Moncrief S., Zheng L., Neville L. and Lyerly D., Genetic Characterization of Toxin A-Negative, Toxin B-Positive *Clostridium difficile* Isolates by PCR, *J. Clin. Microbiol.*, 2000; 38(8): 3072–3075.
- 116.- Muñoz P., Palomo J., Yáñez J. and Bouza E., Clinical microbiological case: a heart transplant recipient with diarrhea and abdominal pain, *Clin. Microbiol. and Infec.*, 2001; 7(8): 451-452.
- 117.- Murray Patrick R., *Clinical Microbiology*, 8^a edición, Volumen 1, Editorial ASM Press Washington, 2003; E.U.A.
- 118.- Mylonakis E, Ryan E, Calderwood S., *Clostridium difficile*-associated diarrhea, *Arch. Intern. Med.*, 2001; 161: 525-533.
- 119.- Naaber P., Smidt I., Štšepetova J., Brilene T., Annuk H. and Mikelsaar M., Inhibition of *Clostridium difficile* strains by intestinal Lactobacillus species, *J. Med. Microbiol.*, 2004; 53: 551–554.
- 120.- Nelson D.E., Auerbach S.B., Baltch A.L., Desjardin E., Beck-Sague C., Rheal C., Smith R.P. and Jarvis W.R., Epidemic *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: role of second- and third-generation cephalosporins, *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 1994; 15(2): 88–94.

121.- Nomura K., Matsumoto Y., Yoshida N., Taji S., Wakabayashi N., Mitsufuji S., Horike S., Morita M., Okanou T. and Taniwaki M., Successful treatment with rifampin for fulminant antibiotics-associated colitis in a patient with non-Hodgkin's lymphoma, *World J. Gastroenterol.*, 2004; 10(5): 765–766.

122.- O'Brien J.B., McCabe M.S., Athié-Morales V., McDonald G.S.A., NíEidhin D.B. and Kelleher D.P., Passive immunisation of hamsters against *Clostridium difficile* infection using antibodies to surface layer proteins, *FEMS Microbiology Letters*, 2005; 246: 199–205.

123.- O'Connor D., Hynes P. and Cormican M., Evaluation of Methods for Detection of Toxins in Specimens of Feces Submitted for Diagnosis of *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea, *J. Clin. Microbiol.*, 2001; 39(8): 2846–2849.

124.- Ohl M., Stevermer J., What are effective therapies for *Clostridium difficile*-associated diarrhea?, *The Journal of Family Practice*, 2005; 54(2): 176-178.

125.- Onderdonk A.B., Lowe B.R. and Bartlett J.G., Effect of environmental stress on *Clostridium difficile* toxin levels during continuous cultivation, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1979; 38: 637–641.

126.- Pallasch J., *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis, *J. Calif. Dent. Assoc.*, 1999; 27(5): 405-409, 411-413.

127.- Pantosti A., Luzzi I., Cardines R. and Gianfrilli P., Comparison of the in vitro activities of teicoplanin and vancomycin against *Clostridium difficile* and their interactions with cholestyramine, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 1985; 28: 847–848.

128.- Péchiné S., Gleizes A., Janoir C., Gorges-Kergot R., Barc M.C., Delmée M. and Collignon A., Immunological properties of surface proteins of *Clostridium difficile*, *J. Med. Microbiol.*, 2005b; 54: 193–196.

129.- Péchiné S., Janoir C and Collignon A., Variability of *Clostridium difficile* Surface Proteins and Specific Serum Antibody Response in Patients with *Clostridium difficile*-Associated Disease, *J. Cli. Microbiol.*, 2005a; 43(10): 5018–5025.

130.- Persky E. and Brandt J., Treatment of recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea by administration of donated stool directly through a colonoscope, *Am. J. Gastroenterol.*, 2000; 95: 3283–3285.

131.-Pfeifer G., Schirmer J., Leemhuis J., Busch C., Meyer D.K., Aktories K. and Barth H., Cellular uptake of *Clostridium difficile* toxin B. Translocation of the N-terminal catalytic domain into the cytosol of eukaryotic cells, *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 44535–44541.

- 132.- Phillips C., Serum antibody responses to *Clostridium difficile* toxin A: predictive and protective?, *Gut*, 2001; 49: 167–168.
- 133.- Phillips K.D. and Rogers P.A., Rapid detection and presumptive identification of *Clostridium difficile* by p-cresol production on a selective medium, *J. Clin. Pathol.*, 1981; 34: 642-644.
- 134.- Pituch H., Kreft D., Obuch-Woszczatyński P., Wultańska D., Meisel-Mikołajczyk F., Łuczak M. and Belkum A., Clonal Spread of a *Clostridium difficile* Strain with a Complete Set of Toxin A, Toxin B, and Binary Toxin Genes among Polish Patients with *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea, *J. Clin. Microbiol.*, 2005; 43(1): 472–475.
- 135.- Pituch H., Van Den Braak N., Van Leeuwen W., Van Belkum A., Martirosian G., Obuch-Woszczatyński P., Łuczak M. and Meisel-Mikołajczyk F., Clonal dissemination of a toxin-A-negative/toxin-B-positive *Clostridium difficile* strain from patients with antibiotic-associated diarrhea in Poland, *Clin. Microbiol. Infect.*, 2001; 7: 442–446.
- 136.- Portillo-López M., Castellanos-Urdaibay M. and Cortés-Nava E., Infección por *Clostridium difficile*, *Gac. Méd. Méx.*, 2002; 138(1): 57-65.
- 137.- Pothoulakis C., Gilbert R.J. and Cladaras C., Rabbit sucrase-isomaltase contains a functional intestinal receptor for *Clostridium difficile* toxin A, *J. Clin. Investig.* 1996; 98: 641–649.
- 138.- Poutanen S.M. and Simor A.E., *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults, *Canadian Medical Association Journal*, 2004; 171: 51-57.
- 139.- Poxton I.R., McCoubrey J. and Blair G., The pathogenicity of *Clostridium difficile*, *Clin. Microbiol. Infect.*, 2001; 7: 421–427.
- 140.- Probert C.S.J., Jones P.R.H. and Ratcliffe N.M., A novel method for rapidly diagnosing the causes of diarrhoea, *Gut*, 2004; 53: 58–61.
- 141.- Qa'Dan M., Ramsey M., Daniel J., Spyres L.M., Safiejko-Mrocza B., Ortiz-Leduc W. and Ballard J.D., *Clostridium difficile* toxin B activates dual caspase-dependent and caspase-independent apoptosis in intoxicated cells, *Cell. Microbiol.*, 2002; 4: 425–434.
- 142.- Qa'Dan M., Spyres L.M. and Ballard J.D., pH-induced conformational changes in *Clostridium difficile* toxin B, *Infect. Immun.*, 2000; 68: 2470–2474.
- 143.- Rolfe R.D. and Song W., Purification of a functional receptor for *Clostridium difficile* toxin A from intestinal brush border membranes of infant hamsters, *Clin. Infect. Dis.*, 1993; 16(Supl. 4): S219 –S227.

- 144.- Rupnik M., Avesani V., Janc M., Von Eichel-Streiber C., and Delmée M., A novel toxinotyping scheme and correlation of toxinotypes with serogroups of *Clostridium difficile* isolates, J. Clin. Microbiol., 1998; 36: 2240–2247.
- 145.- Rupnik M., Dupuy B., Fairweather N.F., Gerding D.N., Johnson S., Just I., Lyerly D.M., Popoff M.R., Rood J.I., Sonenshein A.L., Thelestam M., Wren B.W., Wilkins T.D. and Von Eichel-Streiber C., Revised nomenclature of *Clostridium difficile* toxins and associated genes, J. Med. Microbiol., 2005; 54: 113–117.
- 146.- Rupnik M., Grabnar M. and Geric B., Binary toxin producing *Clostridium difficile* strains, Anaerobe, 2003a; 9: 289–294.
- 147.- Rupnik M., Kato N., Grabnar M. and Kato H., New Types of Toxin A-Negative, Toxin B-Positive Strains among *Clostridium difficile* Isolates from Asia, J. Clin. Microbiol., 2003b; 41(3): 1118–1125.
- 148.- Ryan R.W., Kwasnik I. and Tilton R.C., Rapid detection of *Clostridium difficile* toxin in human feces, J. Clin. Microbiol., 1980; 12: 776–779.
- 149.- Salcedo J., Keates S., Pothoulakis C., Warny M., Castagliuolo I., LaMont J.T. and Kelly C.P., Intravenous immunoglobulin therapy for severe *Clostridium difficile* colitis, Gut, 1997; 41(3): 366–370.
- 150.- Sara M. and Sleytr U.B., S-layer proteins, J. Bacteriol., 2000; 182: 859–868.
- 151.- Sauerborn M., Leukel P. and Von Eichel-Streiber C., The C-terminal ligand-binding domain of *Clostridium difficile* toxin A (TcdA) abrogates TcdA-specific binding to cells and prevents mouse lethality, FEMS Microbiol., Lett., 1997; 155: 45–54.
- 152.- Savidge T.C., Pan W.H., Newman P., O'brien M., Anton P.M. and Pothoulakis C., *Clostridium difficile* toxin B is an inflammatory enterotoxin in human intestine, Gastroenterology, 2003; 125(2): 413–420.
- 153.- Schirmer J. and Aktories K., Large clostridial cytotoxins: cellular biology of Rho/Ras-glucosylating toxins, Biochimica et Biophysica Acta, 2004; 1673: 66–74.
- 154.- Seddon S.V., Hemingway I. and Borriello S.P., Hydrolytic enzyme production by *Clostridium difficile* and its relationship to toxin production and virulence in the hamster model, J. Med. Microbiol., 1990; 31: 169–174.
- 155.- Settle C.D., Wilcox M.H., Fawley W.N., Corrado O.J., Hawkey T.M., Prospective study of the risk of *Clostridium difficile* diarrhea in elderly patients following treatment with cefotaxime or piperacillin – tazobactam, Aliment. Pharmacol. Ther., 1998; 12(12): 1217-1223.

- 156.- Shahrabadi M.S., Bryan L.E., Gaffney D., Coderre S.E., Gordon R. and Pai C.H., Latex agglutination test for detection of *Clostridium difficile* toxin in stool samples, *J. Clin. Microbiol.*, 1984; 20(3): 339–341.
- 157.- Shoshan M.C., Florin I. and Thelestam M., Activation of cellular phospholipase A2 by *Clostridium difficile* toxin B, *J. Cell. Biochem.*, 1993; 52: 116–124.
- 158.- Si-Wu Fu, Ya-Li Zhang, Dian-Yuan Zhou, Development of an ELISA kit using monoclonal antibody to *Clostridium difficile* toxin A, *World J. Gastroenterol.*, 2004; 10(18): 2747-2749.
- 159.- Snyder M.L., Further studies on *Bacillus difficilis*, *J. Infect. Dis.*, 1937; 49: 390-402.
- 160.- Snyder M.L., The normal fecal flora of infants between two weeks and one year of age, *J. Infect. Dis.*, 1940; 66: 1-16.
- 161.- Souza M.H., Melo-Filho A.A., Rocha M.F., Lysterly D.M., Cunha F.Q., Lima A.A. and Ribeiro R.A., The involvement of macrophage-derived tumour necrosis factor and lipoxygenase products on the neutrophil recruitment induced by *Clostridium difficile* toxin B, *Immunology*, 1997; 91: 281–288.
- 162.- Steffen E.K. and Hentges D.J., Hydrolytic enzymes of anaerobic bacteria isolated from human infections, *J. Clin. Microbiol.*, 1981; 14: 153–156.
- 163.- Stuart H.C., Yajarayma J.T. and Joseph S.Jr., Analysis of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile* strains, *The Journal of Infectious Diseases*, 2000; 181(2): 659-663.
- 164.- Summanen P.H. and McTeague M., Comparison of Recovery of Anaerobic Bacteria Using the Anoxomat1, Anaerobic Chamber, and GasPak1Jar Systems, *Anaerobe*, 1999; 5: 5-9.
- 165.- Surawicz C.M., McFarland L.V., Greenberg R.N., Rubin M., Fekety R., Mulligan M.E., Garcia R.J., Brandmarker S., Bowen K., Borjal D. and Elmer G.W., The search for a better treatment for recurrent *Clostridium difficile* disease: use of high-dose vancomycin combined with *Saccharomyces boulardii*, *Clin. Infect. Dis.*, 2000; 31(4): 1012–1017.
- 166.- Swedish CDAD Study Group, Treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis with an oral preparation of teicoplanin; a dose finding study, *Scand. J. Infect. Dis.*, 1994; 26: 309–316.
- 167.- Tan K.S., Wee B.Y. and Song K.P., Evidence for holin function of *tcdE* gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*, *J. Med. Microbiol.*, 2001; 50: 613–619.

- 168.- Tasteyre A., Barc M.C, Collignon A., Boureau H. and Karjalainen T., Role of FliC and FliD Flagellar Proteins of *Clostridium difficile* in Adherence and Gut Colonization, *Infection and Immunity*, 2001; 69(12): 7937–7940.
- 169.- Tasteyre A., Barc M.C, Karjalainen T., Dodson P., Hyde S., Bourlioux P. and Borriello P., A *Clostridium difficile* gene encoding flagellin, *Microbiology*, 2000a; 146: 957–966.
- 170.- Tasteyre A., Karjalainen T., Avesani V., Delmée M., Collignon A., Bourlioux P. and Barc M.C., Phenotypic and Genotypic Diversity of the Flagellin Gene (*fliC*) among *Clostridium difficile* Isolates from Different Serogroups, *J. Clin. Microbiol.*, 2000b; 38(9): 3179–3186.
- 171.- Taylor S. and Bartlett G., Binding of *Clostridium difficile* cytotoxin and vancomycin by anion-exchange resins, *J. Infect. Dis.*, 1980; 141: 92–97.
- 172.- Terhes G., Urbán E., Sóki J., Hamid K.A. and Nagy E., Community-Acquired *Clostridium difficile* Diarrhea Caused by Binary Toxin, Toxin A, and Toxin B Gene-Positive Isolates in Hungary, *J. Clin. Microbiol.*, 2004; 42(9): 4316–4318.
- 173.- Tetsuo M. and Takamori N., Basic and Clinical Aspects of *Clostridium difficile* Colitis, *Rev. Gastroenterology*, 2004; 24: 263-269.
- 174.- Thelestam M. and Bronnegard M., Interaction of cytopathogenic toxin from *Clostridium difficile* with cells in tissue culture, *Scand. J. Infect. Dis.*, 1980; Supl. 22: 16–29.
- 175.- Thorig L., De Groot N. and Hensgens M.H., Bovine hyperimmune whey protein concentrate with specific biological activity as a replacement ingredient, *Innov. Food Technol.*, 2001; 57–60.
- 176.- Torres F., Lyerly M., Hill E. and Monath P., Evaluation of formalinin-activated *Clostridium difficile* vaccines administered by parenteral and mucosal routes of immunization in hamsters, *Infect. Immun.*, 1995; 63: 4619–4627.
- 177.- Tucker K.D. and Wilkins T.D., Toxin A of *Clostridium difficile* binds to the human carbohydrate antigens I, X, and Y, *Infect. Immun.*, 1991; 59: 73–78.
- 178.- Turgeon D.K., Novicki T.J., Quick J., Carlson L., Miller P., Ulness B., Cent A., Ashley R., Larson A., Coyle M., Limaye A.P., Cookson B.T. and Fritsche T.R., Six Rapid Tests for Direct Detection of *Clostridium difficile* and Its Toxins in Fecal Samples Compared with the Fibroblast Cytotoxicity Assay, *J. Clin. Microbiol.*, 2003; 41(2): 667–670.
- 179.- Tvede M. and Rask-Madsen J., Bacteriotherapy for chronic relapsing *Clostridium difficile* diarrhoea in six patients, *Lancet*, 1989; 1: 1156–1160.

- 180.- Van Den Berg R.J., Bruijnesteijn Van Coppenraet L.S., Gerritsen H.J., Endtz H.P., Van Der Vorm E.R. and Kuijper E.J., Prospective Multicenter Evaluation of a New Immunoassay and Real-Time PCR for Rapid Diagnosis of *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea in Hospitalized Patients, *J. Clin. Microbiol.*, 2005; 43(10): 5338–5340.
- 181.- Van Dissel J.T., De Groot N., Hensgens C.M.H., Numan S., Kuijper E.J., Veldkamp P. and Wout J.V., Bovine antibody-enriched whey to aid in the prevention of a relapse of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: preclinical and preliminary clinical data, *J. Med. Microbiol.*, 2005; 54: 197–205.
- 182.- Von Eichel-Streiber C., Laufenberg-Feldmann R., Sartingen S., Schulze J. and Sauerborn M., Comparative sequence analysis of the *Clostridium difficile* toxins A and B, *Mol. Gen. Genet.*, 1992; 233: 260–268.
- 183.- Voth E.D. and Ballard D.J., *Clostridium difficile* Toxins: Mechanism of Action and Role in Disease, *Clinical Microbiology Reviews*, 2005; 18(2): 247–263.
- 184.- Wagenknecht-Wiesner A., Weidmann M., Braun V., Leukel P., Moos M. and Von Eichel-Streiber C., Delineation of the catalytic domain of *Clostridium difficile* toxin B-10463 to an enzymatically active N-terminal 467 amino acid fragment, *FEMS Microbiol. Lett.*, 1997; 152: 109–116.
- 185.- Waligora A.J., Hennequin C., Mullany P., Bourlioux P., Collignon A. and Karjalainen T., Characterization of a Cell Surface Protein of *Clostridium difficile* with Adhesive Properties, *Infection and Immunity*, 2001; 69(4): 2144–2153.
- 186.- Warny M., Keates A.C., Keates S., Castagliuolo I., Zacks J.K., Aboudola S., Qamar A., Pothoulakis C., LaMont J.T. and Kelly C.P., p38 MAP kinase activation by *Clostridium difficile* toxin A mediates monocyte necrosis, IL-8 production, and enteritis, *J. Clin. Investig.*, 2000; 105: 1147–1156.
- 187.- Wedel N., Toselli P., Pothoulakis C., Faris B., Oliver P., Franzblau C. and LaMont T., Ultrastructural effects of *Clostridium difficile* toxin B on smooth muscle cells and fibroblasts, *Exp. Cell Res.*, 1983; 148: 413–422.
- 188.- West E. and Wilkins D., Problems associated with counterimmunoelectrophoresis assays for detecting *Clostridium difficile* toxin, *J. Clin. Microbiol.*, 1982; 15: 347–349.
- 189.- Willingham F., Ticona E. and Taylor N., Diarrhea and *Clostridium difficile* infection in Latin American patients with AIDS, *Clin. Infect. Dis.*, 1998; 27(3): 487-93.

- 190.- Wilcox H., Descriptive study of intravenous immunoglobulin for the treatment of recurrent *Clostridium difficile* diarrhea, J. Antimicrob. Chemother., 2004; 53: 882–884.
- 191.- Wilcox H., Fawley N., Settle D. and Davidson A., Recurrence of symptoms in *Clostridium difficile* infection – relapse or reinfection?, J. Hosp. Infect., 1998; 38: 93–100.
- 192.- Wilcox H., Respiratory antibiotic use and *Clostridium difficile* infection: is it the drugs or is it the doctors?, Thorax, 2006; 55: 633-634.
- 193.- Wren B.W., A family of clostridial and streptococcal ligand-binding proteins with conserved C-terminal repeat sequences, Mol. Microbiol., 1991; 5: 797–803.
- 194.- Wright A., Wait R., Begum S., Crossett B., Nagy J., Brown K. and Fairweather N., Proteomic analysis of cell surface proteins from *Clostridium difficile*, Proteomics, 2005; 5: 2443–2452.
- 195.- Wullt M. and Odenholt I., A double-blind randomized controlled trial of fusidic acid and metronidazole for treatment of an initial episode of *Clostridium difficile*-associated diarrhea, J. Antimicrob. Chemother., 2004; 54: 211–216.
- 196.- Wullt M., Hagslatt L. and Odenholt I., *Lactobacillus plantarum* 299v for the treatment of recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a double-blind, placebo-controlled trial, Scand. J. Infect. Dis., 2003; 35: 365–367.
- 197.- Yamakawa K., Karasawa T., Ikoma S. and Nakamura S., Enhancement of *Clostridium difficile* toxin production in biotin-limited conditions, J. Med. Microbiol., 1996; 44: 111–114.
- 198.- Yassin S., Young-Fadok T., Zein N. and Pardi D., *Clostridium difficile* associated diarrhea and colitis, Mayo Clin. Proc., 2001; 76: 725-30.
- 199.- Yolken R.H., Whitcomb L.S., Marien G., Bartlett J.D., Libby J., Ehrich M. and Wilkins T., Enzyme immunoassay for the detection of *Clostridium difficile* antigen, Journal of Infectious Diseases 1981; 144(4): 378.
- 200.- Zheng L., Keller S.F., Lyerly D.M., Carman R.J., Genheimer C.W., Gleaves C.A, Kohlhepp S.J., Young S., Perez S. and Ye K., Multicenter Evaluation of a New Screening Test That Detects *Clostridium difficile* in Fecal Specimens, J. Clin. Microbiol., 2004; 42(8): 3837–3840.