

720555



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
" IZTACALA "**

TOXIGENICIDAD DE CEPAS DE Clostridium difficile
AISLADAS DE NIÑOS Y ADULTOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

CARREÑO BIBIAN MA. CONSUELO



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.

A la memoria de mi Padre

Con todo cariño para mi Madre
una gran mujer en toda la
extensión de la palabra.

A mis hermanos:
Como un estímulo para
que sigan adelante.

A José Luis por todo el
amor y apoyo que siempre
me ha brindado incondi--
cionalmente.

Mi más sincero agradecimiento al M. en C. Francisco Javier torres Lopez por el valioso legado intelectual, por lo que le admiro y respeto.

 Así como a los Doctores Onofre Muñoz Hdez y Joaquín Sánchez Castillo por todas las facilidades prestadas para la elaboración de ésta tesis.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Bacteriología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional (Instituto Mexicano del Seguro Social) bajo la dirección del M. en C. Francisco Javier Torres Lopez.

Hospital lamentablemente desaparecido en el siniestro del 19 de Septiembre de 1985 y en memoria de los - que con él quedaron.

I N D I C E

	Pág.
Introducción	1
Material y Métodos	13
Resultados	24
Discusión y Conclusión	36
Resumen	41
Bibliografía	42

INTRODUCCION

La diarrea secundaria a la administración de antibióticos es una complicación frecuente en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Las manifestaciones van desde una diarrea banal autolimitante hasta un cuadro severo de colitis pseudomembranosa (CPM) (13).

Se acepta que Clostridium difficile es el agente causal de la CPM; una enfermedad en ocasiones fatal - que se produce casi siempre después de una terapia con antimicrobianos (1).

C. difficile es un bacilo gram positivo, anaerobio estricto, con capacidad para producir esporas. En 1935 fué descrito por C. Hall y E. O'Toole y lo llamaron Bacillus difficile por la dificultad para cultivarlo, éstos autores lo aislaron de las heces de niños aparentemente sanos (revisado en 11).

En 1955 De Sommer y Eysen independientemente reportaron que al administrar antibióticos a cerdos, éstos morían y presentaban vasodilatación de senos mesentéricos, petequias en el ileon y colon con hemorragia intestinal; los dos investigadores demostraron la presencia de "Clostridia" en los cerdos (revisado en 16).

En 1968 Small reportó una enterocolitis fatal en hamster tratados con lincomicina, posteriormente otros investigadores demostraron la producción de ileocecititis similar en hamster tratados con cefalotina, cefalexina

y cefoxitin y en conejos tratados con lincomicina ó - clindamicina (revisado en 16).

Larson y col. fueron los primeros investigadores que reportaron la presencia de una citotoxina en las heces de humanos que presentaban CPM (revisado en 11).

En 1978 Bartlett demostró que al inocular el contenido fecal, esterilizado por filtración, de un hamster con ileocecititis inducida por clindamicina a animales sanos éstos últimos desarrollaban la misma enfermedad. El mismo autor descubrió que C. difficile producía "in vitro" una toxina similar ó idéntica a la toxina que fué la causa de ileocecititis en los hamster que recibieron clindamicina (2).

Se demostró también que ésta era citopática y que podía ser neutralizada por la antitoxina polivalente - de gangrena gaseosa y por la antitoxina monovalente de Clostridium sordelli (35).

Más tarde en 1979 Rolfe y Sydney purificaron y caracterizaron parcialmente ésta citotoxina y la reportaron como: termolábil ya que se inactiva a 56°C por 30 minutos, inestable a un pH de 4 y 9 con un punto isoelectrico de 5.0, inactivable con tripsina y quimiotripsina, con un peso molecular de 530 mil daltones, capaz de incrementar la permeabilidad vascular en conejos y causar ileocecititis en hamster cuando es inyectada intracecalmente además de que causa cambios morfológicos (redondeamiento) a células en cultivo de tejidos (26).

Hasta entonces se consideraba que C. difficile era capaz de producir solo una toxina con actividad citotóxica neutralizable con antitoxina anti C. sordellii.

Pero en 1981 Nancy Taylor y colaboradores reportaron la presencia de una toxina con propiedades físicas y actividades biológicas diferentes a la citotoxina, - la cual se comportaba como enterotóxica y la denominaron toxina A.

También en 1981 Bartlett y col. encontraron que son cuando menos dos toxinas las producidas por C. difficile, una que se considera enterotóxica, la toxina A, ya que causa acumulación de fluido en asa ileal de conejo y la toxina B considerada citotóxica (30).

Posteriormente en 1982 Sullivan y col. logran una mejor purificación y caracterización de las toxinas A y B, pero hasta éste momento no se sabe si una ó ambas toxinas son las responsables de la patología vista en GPM y colitis asociada a antibióticos (CAA) en humanos (29).

Las diferencias en actividad biológica tanto en células de ovario de hamster chino (CHO), en células de epitelio cervical humano (HeLa) como en asa ligada de conejo y propiedades fisicoquímicas de éstas dos toxinas se muestran en la tabla 1 (9,21,29).

En 1982 Libby, Wilkins y col. utilizaron el modelo del hamster para determinar los efectos causados por éstas proteínas y el papel que juega cada una de e

TABLA 1

Diferencias en actividad biológica y propiedades fisicoquímicas entre las toxinas A y B de Clostridium difficile.

CARACTERISTICAS	Toxina A	Toxina B
Actividad citotóxica específicas (UC/mg) ⁺ sobre células CHO.	3.8×10^6	5.3×10^9
Concentración mínima necesaria para producir cambios morfológicos en células HeLa.	5.0 ug/ml	0.08 ng/ml
Letalidad en ratón expresada como LD ₁₀₀ mg.	1.1×10^4	2.1×10^4
Respuesta en asa ligada de conejo ml/cm por cada 50mg de toxina.	1.71 ± 0.42	0.44 ± 0.22
Inactivación con tripsina y - quimiotripsina.	positiva	positiva
Sensibilidad a pH.	se inactiva a pH 2.0	se inactiva a pH 2.0
Sensibilidad a temperatura.	se inactiva a 56°C por 6 minutos.	se inactiva a 56°C por 6 minutos.
Peso molecular.	550 000	360 000

+ UC- Unidades citotóxicas, cantidad mínima necesaria para producir efecto citotóxico en el 50 ó 100% de la monocapa.

llas en la cecitis asociada al uso de antibióticos. Para éste fin inocularon intracecalmente a un grupo de animales un toxoide de la toxina A, a otro grupo un toxoide de la toxina B, y a un tercero, el toxoide de ambas toxinas y el grupo control se inoculó con una preparación sin las toxinas de C. difficile. Para determinar si la respuesta inmune contra éstos toxoides podía reducir la severidad de la cecitis asociada a antibióticos, los hamster fueron inyectados subcutáneamente con clindamicina, para provocarles ileocecititis. Los hamster que recibieron el toxoide A produjeron anticuerpos contra la toxina A, pero no contra la toxina B, mientras que el toxoide B provocó la producción de anticuerpos contra la toxina B, pero no contra la toxina A y los inmunizados con el toxoide AB produjeron anticuerpos contra ambas toxinas y sólo éstos últimos sobrevivieron al tratamiento con clindamicina, mostrando un ciego de tamaño y apariencia normal y con concentraciones bajas de toxinas. Para determinar los efectos de cada toxina sobre los animales, los hamster no inmunizados fueron inyectados unos con toxina A purificada, observándose acumulación de fluido en el ciego, con poca hemorragia y otros con toxina B parcialmente purificada, observándose un ciego hemorrágico de tamaño normal. Los hamster no inmunizados, inyectados en el ciego con cada una de las toxinas, a las concentraciones alcanzadas por éstas después del tratamiento con -

clindamicina, murieron (18).

Estas observaciones sugieren que la toxina A es - la responsable de la acumulación de fluido y que ambas toxinas causan hemorragia con diferente intensidad en el ciego de los hamster con cecitis asociada a antibióticos, además de que cualquiera de las dos toxinas después de un cierto tiempo, pueden causar la muerte.

En humanos C. difficile y su toxina se han aislado de las heces del 90 % de los niños menores de un año de edad en altas concentraciones, sin que se presente ningún síntoma gastrointestinal anormal por lo que se puede considerar como parte de la flora normal microbiana, pero en adultos el 99 % de los que presentan - CPM asociada a antibióticos presentan el microorganismo y los síntomas gastrointestinales correlacionan casi siempre con los resultados de los ensayos del cultivo de tejidos y con el potencial toxigénico de las cepas aisladas de ellos. Solo ocasionalmente se han encontrado adultos que presentan el microorganismo y son asintomáticos, Viscidi (1981) sugiere que ésto tal vez se deba a que algunas cepas de C. difficile no producen la toxina, que las concentraciones de toxina sean bajas ó que posiblemente el huésped no sea susceptible a la toxina (34).

Es interesante que C. difficile el agente causal de la CPM, pueda ser un comensal inofensivo en el tracto gastrointestinal de los niños y además que la inci-

dencia de GPM en los niños sea muy baja a pesar de que éste grupo es frecuentemente colonizado por el agente causal de la misma (25,28).

La frecuencia de aislamiento del microorganismo - en heces, ha sido establecida en los límites de 4-46 % en niños sanos menores de dos años de edad. En contraste con los valores de frecuencia de aislamiento reportados tanto en niños mayores como en adultos en los - que han sido menores del 4 % (5).

En los últimos años varios investigadores han reportado que un alto porcentaje de recién nacidos presentan en su intestino C. difficile y su citotoxina, - sin aparentes consecuencias clínicas, cuando menos en los primeros ocho meses de vida (4,15,23).

La frecuencia de aislamiento de C. difficile va--ría grandemente dependiendo del paciente y las condi--ciones del medio ambiente de las poblaciones estudia--das (6,17,27).

Se ha reportado la presencia de la actividad cito--tóxica debida a C. difficile en las heces de niños sa--nos (10,25), y aunque ambas toxinas tienen propiedades citotóxicas, es posible que la alta actividad citotóxi--ca de la citotoxina B encubra la presencia de la toxi--na A, si es así, los trabajos reportados sobre el tema han demostrado la presencia de la toxina B en el colon de los niños (a una concentración extremadamente alta y muy similar ó mayor a la encontrada en adultos con -

CPM) pero no se ha reportado la presencia de la toxina A, la cual es 17 veces más letal para los animales y es aproximadamente 100 veces menos citotóxica que la toxina B, además la antitoxina preparada contra la toxina A parcialmente purificada no neutraliza el efecto tóxico de la toxina B, sugiriendo que las dos son antigenicamente distintas (20,29).

Recientemente se ha demostrado la presencia de la toxina A en las heces de niños sanos por medio de un ensayo inmunoenzimático (19).

La frecuencia de la actividad citotóxica en las heces de niños es más baja que la frecuencia del microorganismo, y de hecho, los estudios in vivo e in vitro que han analizado el potencial toxigénico de las cepas aisladas de niños, establecen que la presencia de las cepas no toxigénicas es muy común; esto también ocurre en adultos que reciben antibióticos pero que no desarrollan colitis (7,17,24).

Puede ser que las dos poblaciones tengan algunos factores comunes que favorecen la colonización del intestino por cepas menos toxigénicas.

No está muy claro aún por qué los niños son altamente susceptibles a la colonización con C. difficile, mientras que los adultos son normalmente colonizados por otras especies de clostridia.

Actualmente una de las interrogantes es saber si existen diferencias entre las cepas que colonizan el -

intestino de los niños y de los adultos. Hasta ahora - no se ha descubierto que características hacen al niño resistente a la enfermedad producida por C. difficile.

Recientemente en experimentos realizados en animales se ha observado que las ratas y ratones recién nacidos son altamente susceptibles a la colonización con C. difficile cuando tienen entre 11 y 19 días de edad y los hamster de 4 a 11 días (5).

Cooperstock (1983) propone varias alternativas para dar una explicación a éste problema, él supone que se va perdiendo la susceptibilidad a la colonización con C. difficile debido al destete, ya que siendo posteriormente su comida sólida hay como consecuencia la aparición e incremento de otros organismos anaerobios que - podrían inhibir el crecimiento de C. difficile. Posiblemente en los niños ocurre algo similar ó en ellos - se pueden incluir factores tales como las condiciones bioquímicas ó nutricionales requeridas por éste microorganismo y que estén presentes en su colon.

Un mecanismo opcional que explique la susceptibilidad a la colonización podría ser la ausencia de inmunidad en la mucosa, específica contra componentes superficiales ó productos que permitan la colonización por éste microorganismo, ó tal vez se deba a factores protectores que se encuentren en la leche materna. Alternativamente el epitelio intestinal de los niños puede carecer de receptores para la toxina ó pueden existir factores químicos en el lumen que bloqueen la unión de

la toxina ó su actividad in vivo sobre las células blanco. El mismo autor estudió la influencia de la edad, el sexo y la dieta en la colonización con C. difficile en niños asintomáticos, por medio de la cantidad de antígenos de C. difficile presentes, él establece que fué claramente más alta en los niños que recibieron fórmula alimenticia (leche en polvo) a diferencia de aquellos que recibieron leche materna y ésta diferencia parece ser independiente de la edad (dentro del límite estudiado, 13 meses). Entre los niños que se alimentaban con pecho, el antígeno era menos frecuente, pero había una tendencia a aumentar a medida que se les daba comida suplementaria. El estudio mostró una distribución igual del antígeno de C. difficile por sexo (7).

En éste estudio tratamos de establecer si existen diferencias toxigénicas entre las cepas aisladas de niños y adultos, que pudieran explicar la resistencia de la población infantil a los efectos deletéreos de C. difficile. Las diferencias que postulamos como las responsables de la resistencia de los niños se pueden deber a que las cepas que los colonizan probablemente producen las toxinas A y B, pero que la toxina A sea biologicamente inactiva, ó que las cepas produzcan solamente la toxina B; ó bien que las cepas produzcan ambas toxinas pero biologicamente inactivas, para éste efecto se estudió la producción in vitro de las toxinas A y B, por medio de la actividad citotóxica sobre cul-

tivo de tejidos, y actividad enterotóxica en el asa ileal de conejo. También se estudió la presencia antigénica de éstas toxinas usando un ensayo inmunoenzimático.

OBJETIVO

Establecer si existen diferencias, en la producción y actividad de las toxinas A y B de Clostridium difficile entre las cepas aisladas de niños con diarrea, niños sanos, adultos con diarrea y adultos sanos.

MATERIAL Y METODOS

Cepas:

Se escogieron para su análisis 23 cepas de C. difficile, 22 aisladas en el laboratorio de infectología del Hospital de Pediatría, CMN, IMSS, y una cepa de referencia VPI 8484 donada por el Instituto Politécnico de Virginia, E.U.A. De las 22 cepas 8 fueron aisladas de 74 niños con diarrea, 2 de 26 niños que recibieron antibióticos, pero que no desarrollaron diarrea, 6 de 22 niños aparentemente sanos, 5 de 25 adultos con diarrea y 1 de 100 adultos sanos (32).

Estas cepas se enumeraron de la siguiente manera:

Las cepas de niños con diarrea: I-30, I-13, II-8, II-11, -
II-22, V-5, V-19 y V-31.

De niños que recibieron antibió-
ticos pero que no desarrollaron
diarrea:

III-35 y III-23.

De niños aparentemente sanos: IV-2, IV-4, IV-8, IV-11, -
IV-21 y IV-28.

Las de adultos con diarrea: A-1, A-2, A-3, A-4 y A-7.

Y de un adulto sano: A-8.

Conservación de las cepas.

Para conservar las cepas, un cultivo de 48 hrs en caldo de infusión cerebro corazón de cada cepa, se usó pa-
ra impregnar tiras de papel filtro estériles, éstas se in-
trodujeron en bolsas de plástico estériles y se sellaron

con calor, éstas bolsitas se mantuvieron a -70°C (congelador Revco, Ultra Low).

Las cepas se recuperaron colocando las tiras de papel filtro sobre placas de agar infusión cerebro corazón (Bioxón 112-1), éstas se incubaron a 37°C en jarras para anaerobiosis (sistema Gas Pak, BBL) durante 24 a 48 hrs. Transcurrido el tiempo de incubación se seleccionaron colonias con las características morfológicas (forma, tamaño, color, etc.) propias de C. difficile; además en cada paso se realizaron tinciones de gram para reconocer los bacilos gram positivos esporulados. Una colonia con las características de C. difficile se picó y se inoculó a tubos que contenían medio de carne cocida (Difco 0267-01) - éstos se incubaron a 37°C por 24 a 48 hrs en una atmósfera anaeróbica y posteriormente se almacenaron en el refrigerador a -4°C hasta su uso.

Producción de toxinas.

Las toxinas se obtuvieron por dos métodos:

1.- Crecimiento en bolsa de diálisis. Preparación del inculo.- A partir de un crecimiento en tubos con 10 ml de medio de carne cocida, se tomaron aproximadamente 0.1 ml y se estriaron sobre agar infusión cerebro corazón. Después de 48 hrs de incubación a 37°C se seleccionó una colonia y se inoculó en 10 ml de caldo de infusión cerebro corazón y se incubó por 18 hrs a 37°C . Todas las incubaciones se hicieron en condiciones anaeróbicas (sistema Gas Pak).

Cultivo en bolsa de diálisis.- Se utilizó el método descrito por Wilkins y Lybby en 1980 (figura 1). Se tomó 1 ml del crecimiento de 18 hrs en caldo de infusión cere-

bro corazón y se inoculó dentro de un saco de diálisis con límite de exclusión de 6 000 a 8 000 daltones (Estrapar Medical Inc. Los Angeles California, E.U.A), que contenía 100 ml de agua destilada estéril; ésta se sumergió en un matrás que contenía un litro de caldo de infusión cerebro corazón estéril. El sistema se incubó a 37°C por 72 hrs. En éste sistema el microorganismo crece con los nutrientes que entran al saco de diálisis por gradiente de concentración (12).

Una vez terminado el crecimiento se recuperó el contenido del saco y se centrifugó a 3 000 rpm por 30 minutos, el sobrenadante se esterilizó por filtración usando membranas millipore de 0.45 μ . Este extracto se congeló a -20°C hasta su uso.

2.- Obtención de la toxina por crecimiento directo en medio ICC.- Se inocularon tubos que contenían 10 mililitros de caldo de infusión cerebro corazón, con 0.1 ml de un crecimiento en medio de carne cocida, éstos tubos se incubaron a 37°C por 120 horas en anaerobiosis, terminado el tiempo de incubación los cultivos se centrifugaron a 3 000 rpm durante 30 min. y el sobrenadante se esterilizó por filtración con membranas millipore de 0.45 μ el extracto estéril se congeló a -20°C hasta su uso (12,31).

Una vez obtenidas las toxinas, se concentraron de dos maneras:

1.- Precipitación con sulfato de amonio.- Del crecimiento en medio de carne cocida se tomaron aproxima-

damente 0.1 ml y se inocularon en tubos que contenían 10 ml de caldo de infusión cerebro corazón, posteriormente se incubaron por 18 hrs a 37°C. Al término de éste tiempo se tomó un mililitro del cultivo y se inoculó en un matraz con 100 ml de caldo de infusión cerebro - corazón, los matraces se incubaron a 37°C por 72 hrs. en jarras para anaerobiosis. después de éste tiempo - las muestras se centrifugaron a 8 000 rpm, 30 minutos, las toxinas del sobrenadante se precipitaron adicionando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a una concentración final de 50 % (29.1 g/100 ml), se dejaron reposar por 24 hrs a 4°C y se - centrifugaron a 8 000 rpm 30 min. Las toxinas precipitadas se resuspendieron en 5 ml de una solución reguladora de Tris (Sigma, T-1503) 0.05 M a un pH de 7.5 y - se dializaron contra la misma solución reguladora durante 72 hrs con cambios de regulador cada 18 hrs. Los dializados se pasaron a tubos de tapón de rosca y se - almacenaron a -20°C hasta su uso (26).

2.- Concentración por ultrafiltración.- Las muestras se concentraron filtrándolas con una membrana de amicon XM-100 A, con límite de exclusión de 100 mil - daltones, colocándolas en un vaso de amicon de 50 ml y aplicándoles una presión de 2 psi (kg/cm^2). El volumen inicial de cada muestra era de 50 ml y se concentró - hasta un volumen final de 1 a 2 ml.

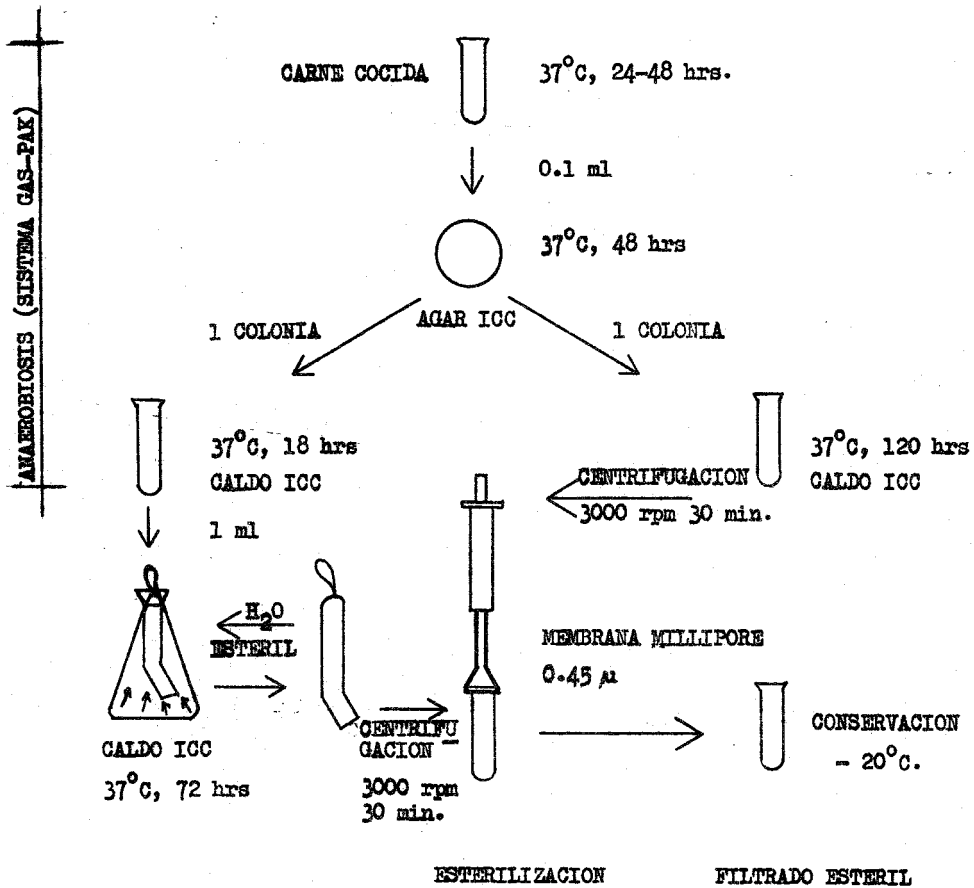


FIGURA 1.- OBTENCION DE LAS TOXINAS DE Clostridium difficile POR DOS METODOS: CRECIMIENTO EN BOLSA DE DIALISIS Y CRECIMIENTO DIRECTO EN MEDIO ICC.

Determinación de la actividad biológica de las toxinas A y B de Clostridium difficile.

El esquema # 1 muestra el procesamiento de las - muestras para la búsqueda de las toxinas A y B de Clostridium difficile.

a) Determinación de la actividad enterotóxica de la toxina A.- En 1953 De, S.N y Chaterje desarrollaron el método de asa ligada de conejo el cual se utilizó - para estudiar la enterotoxicidad de las cepas. Se utilizaron para el ensayo conejos Nueva Zelanda, sanos, - de aproximadamente 4 meses de edad.

Los conejos se mantuvieron en ayuno por 24 hrs an tes del ensayo. Para la operación, el conejo se sujetó de las cuatro extremidades, se les rasuró de la parte abdominal y se les desinfectó con una solución de Iodo Alcohol; se aplicó anestesia local inyectando 2.5 ml - de xilocaina al 0.01 % por via subcutánea e intramuscu lar en la línea media abdominal de la región epigastri ca y umbilical, posteriormente se colocó un campo abier to estéril y se hizo una incisión de aproximadamente 5 centímetros, abriendo cuidadosamente con equipo de di sección estéril, se localizó el intestino delgado y se sacó completamente, se hicieron varias asas de 5 a 7 - centímetros de longitud en la región del ileon, con hi lo ceda anacap calibre 000, en cada asa se inoculó un mililitro del sobrenadante esterilizado por filtración (método de obtención 1), se hicieron 18 asas por ileon y se inocularon 9 para dejar una asa intermedia por ca

Esquema # 1.- PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA LA BUSQUEDA DE LAS
TOXINAS A Y B DE C. difficile.

FILTRADOS
ESTERILES

DETERMINACION DE LA PRESENCIA
ANTIGENICA DE LAS TOXINAS CON
ELISA.

ANTITOXINA A

ANTITOXINA B

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD
BIOLOGICA DE LAS TOXINAS.

CITOTOXICIDAD: CELULAS Hela

ENTEROTOXICIDAD: ASA ILEAL
EN CONEJO

da muestra como control. Al terminar de inocular las muestras el intestino se introdujo al vientre del conejo y se suturó con hilo y aguja (atraumatic 1/2 circulo redonda T-5), la herida se cubrió con gasa y cinta adhesiva.

Posteriormente se realizó el mismo procedimiento inoculando los filtrados de las cepas obtenidos por los diferentes métodos descritos anteriormente.

Transcurridas 18 hrs se sacrificó al animal, se extrajo el intestino delgado y se determinó la relación volumen/longitud (ml/cm) para cada asa. Se consideró una respuesta positiva cuando la relación entre el volumen de fluido contenido en el asa sobre la longitud de la misma era igual ó mayor a 1.0 (8).

b) Determinación de la actividad citotóxica.- Para estudiar la capacidad citotóxica de las cepas se utilizaron células de epitelio cervical humano (HeLa), éstas células fueron crecidas en botellas para cultivos celulares (NUNC) de 80 cm² de superficie con 20 ml de medio de crecimiento que contiene: medio mínimo esencial con sales de Hanks, suero bovino fetal, bicarbonato, 100 u/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina; cuando las células formaron una monocapa se pasaron a microplacas de 96 pozos para cultivos celulares (NUNC), para ello se les quitó el medio de crecimiento, se bañó la monocapa con 3 ml de tripsina al 0.25%, se agitó sobre las células por unos segundos y se desechó, las botellas se incubaron 10 min a 37°C, -

transcurrido el tiempo de incubación, se les agregaron 6 ml de medio de crecimiento desprendiéndose así la monocapa; se agitó con una pipeta para deshacer los agregados celulares, se pasaron a un matraz con 14 ml más de medio de crecimiento y de éste matraz se llenaron las microplacas colocando 200 μ l de la suspensión en cada pozo, las placas se incubaron a 37°C por 24 hrs en una atmósfera de oxígeno y CO₂ (9).

Del filtrado obtenido del crecimiento de las cepas en 10 ml de caldo de infusión cerebro corazón por 5 días (Método de obtención # 2), se hicieron diluciones dobles seriadas de 1:2 a 1:5120 en medio mínimo esencial y se inocularon 20 μ l de cada muestra sobre las células, se incubaron nuevamente a 37°C en una atmósfera de oxígeno y CO₂. Los cambios morfológicos se observaron a las 24 y 48 hrs. El título de la toxina fue definido como el inverso de la más alta dilución de la muestra a la que todavía había efecto citotóxico cuando menos en el 50 % de las células.

Las muestras que resultaron positivas en el ensayo anterior se incubaron con antisueros contra un extracto parcialmente purificado de C. difficile, por media hora antes de inocularlas nuevamente sobre las células. A las 24 y 48 horas se observaron los cambios morfológicos, se consideró que el efecto se debió a las toxinas de C. difficile cuando hubo neutralización de la actividad con el antisuero.

Determinación de la presencia antigénica de las toxinas A y B por el ensayo inmunoenzimático.

El extracto del crecimiento en caldo por 5 días - también se analizó para detectar antígenos específicos de toxina A y B. Se utilizó el ensayo inmunoenzimático (ELISA) descrito recientemente para la toxina A (22).

Los antisueros y toxinas puras fueron donados por el Dr. Tracy Wilkins (Instituto Politecnico de Virginia, Virginia E.U.A.).

El desarrollo es el siguiente:

a) Se utilizaron microplacas de 96 pozos (Dynatech-Immunolon) a las cuales se adicionaron 300 μ l de una dilución 1/1000 (en solución reguladora de bicarbonatos, pH 9.6) de un antisuero preparado en conejo contra cabra. La placa se incubó toda la noche a 37⁰C. - Posteriormente la placa se vació y se lavó una vez con una solución reguladora de fosfatos pH 7.4 y Tween 20 al 0.05 % (SRF-T).

b) A cada pozo se le añadieron 200 μ l de las diluciones del antígeno hechas en solución reguladora de fosfatos, en nuestro caso fueron las muestras obtenidas del crecimiento en caldo de infusión cerebro corazón por 5 días, de las cuales se hicieron diluciones -dobles seriadas de 1:2 a 1:256, la placa se incubó una hora a 37⁰C.

c) Posteriormente la placa se vació y se lavó 5 - veces con SRF-T, en el segundo lavado la placa se incubó 3 min con SRF-T.

d) Después se adicionó a cada pozo 200 μ l de una dilución 1/500 (en SRF-T que contenía 0.1 % de suero - neutro de conejo) del anticuerpo contra toxina A ó toxina B originado en cabra. La placa se incubó una hora a 37°C.

e) Transcurrido el tiempo de incubación, la placa se vació y se lavó de la misma manera que el lavado anterior.

f) Después de lavar se agregaron 200 μ l del conjugado diluido 1/500 (en SRF-T más 0.1 % de suero neutro de conejo) a cada pozo, éste consiste de un suero de conejo con anticuerpos anti inmunoglobulina G de cabra, conjugado con fosfatasa alcalina y se incubó una hora a 37°C.

g) La placa se lavó 5 veces con SRF-T y se adicionaron 200 μ l del sustrato a cada pozo, consistente de P-nitrofenil fosfato a una concentración de 1 mg/ml en regulador dietanol amina pH 9.8, la placa se incubó 30 minutos en la obscuridad a temperatura ambiente.

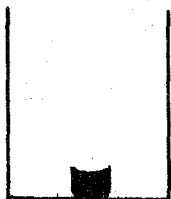
h) La reacción se paró añadiendo 20 μ l de NaOH, - 5 M a cada pozo y se leyó la intensidad de color a 405 nanómetros en un aparato Titerteck Multistack (fig 3).

Para poder cuantificar las toxinas presentes en los filtrados se hicieron curvas patrón usando toxinas puras a concentraciones conocidas y se hizo el ensayo para cada concentración. Las curvas se hicieron graficando densidad óptica contra concentración de toxina, la sensibilidad del ensayo para la toxina A fué de 5 -

ng/ml y para la toxina B de 500 ng/ml.

Los resultados de Densidad Optica (D.O) para cada filtrado se interpolaron en las curvas patrón para obtener la cantidad de nanogramos por mililitro de toxina producida por nuestras cepas.

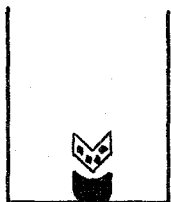
Figura 2.- Determinación cuantitativa de las toxinas A y B por ensayo inmunoenzimático.



Placa con el primer anticuerpo (antiextracto semipurificado producido en conejo).

37°C toda la noche.

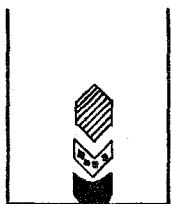
Lavado



Adición de la muestra.

37°C, 1 hora.

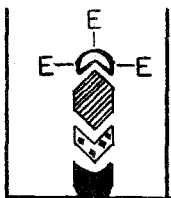
Lavado



Adición del anticuerpo específico (antitoxina A ó antitoxina B), producido en cabra.

37°C, 1 hora.

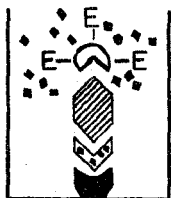
Lavado



Adición de la anti IgG de cabra conjugada con fosfatasa alcalina.

37°C, 1 hora.

Lavado



Adición del sustrato (P-Nitrofenil-Fosfato).

RESULTADOS

Aislamiento e identificación de C. difficile.

C. difficile se aísla mejor, a partir de las heces, en un medio selectivo y diferencial que contiene cicloserina, cefoxitina, fructuosa y yema de huevo (C CFA) y un medio que contiene cicloserina, fructuosa y yema de huevo (CFA) en comparación con un medio de gelosa sangre. El diámetro de las colonias de C. difficile fué de aproximadamente 4.5 mm en gelosa sangre y de 7.5 mm aproximadamente en CCFA, después de 48 hrs de incubación. Las colonias cuando se observan bajo una fuente de luz "negra" presentan un color amarillo oro fluorescente cuando crecen sobre gelosa sangre - después de 48 hrs de incubación. Las colonias de C. difficile crecidas sobre CCFA y CFA son irregulares y con filamentos finos en el borde, además el color naranja inicial del medio cambió a amarillo en 2 a 3 mm alrededor de la colonia ya que C. difficile fermenta la fructuosa y ésto hace que cambie el pH, acidificando el medio (14).

En agar de infusión cerebro corazón, las colonias de C. difficile presentaban las siguientes características: un diámetro aproximado de 7 a 9 mm, forma umbonada que se extiende con la estría, con bordes irregulares y filamentosos, de color crema, brillantes y - translúcidas.

En una preparación con tinción de Gram se observava

ron bacilos largos, Gram positivos con esporas subterminales.

Para comprobar la identidad de las cepas además de los resultados de las pruebas bioquímicas, se realizó un ensayo inmunoenzimático (ELISA). En éste ensayo se utilizó un antisuero contra un extracto semipurificado del cultivo de una cepa de referencia (VPI 8484). Los resultados mostraron la presencia de antígenos de C. difficile en los filtrados obtenidos de todas las cepas ensayadas (tabla 2).

TABLA 2

Comprobación de la identidad de las cepas de Clostridium difficile por el ensayo inmunoenzimático.

Cepa	Anti AB ⁺ (D.O) 1:100	Cepa	Anti AB ⁺ (D.O) 1:100
VPI 8484	0.530	IV-21	0.667
I-13	0.622	IV-28	0.458
I-30	0.477	V-5	0.435
II-8	0.493	V-19	0.620
II-11	0.511	V-31	0.607
II-22	0.673	A-1	0.921
III-35	0.379	A-2	0.938
III-23	0.613	A-3	0.386
IV-2	0.560	A-4	0.835
IV-4	0.564	A-7	0.430
IV-8	0.272	A-8	0.239
IV-11	0.631		

+ Para la prueba se utilizó un antisuero contra un extracto semipurificado del cultivo de una cepa de referencia (VPI 8484).

Ensayos Biológicos

a) Determinación de la enterotoxina en asa ligada de conejo.- Se utilizó éste método para demostrar la presencia de la enterotoxina A en los sobrenadantes de los cultivos crecidos en la bolsa de diálisis ó bien en los sobrenadantes estériles de cultivos estacionarios de 5 días (ver material y metodos).

Los sobrenadantes de los cultivos que se obtuvieron en la bolsa de diálisis dieron resultados poco satisfactorios ya que sólo los filtrados de las cepas A-7 y 1V-2 dieron una respuesta positiva pero débil y las cepas control y de referencia dieron respuesta negativa. En un intento por obtener mejores resultados se aumentó la concentración de la toxina A en los sobrenadantes, precipitando 100 ml de la muestra con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50 % de saturación seguida de diálisis exhaustiva contra tris 0.05 M, pH 7.5 quedando un volumen final de 5 ml. El procedimiento dió como resultado preparaciones 20 veces más concentradas, - sin embargo aún con éste método sólo las cepas control positivo, aeromonas enterotóxicas, la cepa de referencia - VPI 8484 y la cepa A-7, dieron resultados satisfactorios por lo que se abandonó éste método en favor del descrito a continuación.

Las cepas a estudiar en el ensayo de asa ileal se - crecieron también en caldo de infusión cerebro corazón por cinco días a 37°C sin agitar y en condiciones anaerobias. Los sobrenadantes de éstos cultivos se esterilizaron por filtración para luego ser inoculados. De ésta manera se detectó la toxina en dos de las 16 cepas aisladas de niños y en cuatro de las seis cepas de adultos así co-

mo en las cepas control positivo, Escherichia coli H 104-07 y la cepa de referencia VPI 8484. De las cepas positivas de niños, una fué aislada de un niño con diarrea, - mientras que la otra fué aislada de un niño sano, de las cepas positivas de adultos todas fueron aisladas de pacientes que sufrían diarrea (tabla 3).

b) Ensayo de citotoxicidad.- En las pruebas de citotoxicidad se tomaron como respuestas positivas aquellas en las que al menos el 50 % de las células presentaban -- cambios morfológicos. El título de la toxina fué definido como el inverso de la más alta dilución de la muestra a la que todavía hay efecto citopático.

Para probar los filtrados obtenidos de la bolsa de - diálisis se hicieron diluciones decimales seriadas de 10^{-1} a 10^{-8} . Como control positivo se utilizó la cepa de referencia VPI 8484. Solamente las preparaciones obtenidas de la cepa de referencia y de dos cepas aisladas de adultos con diarrea produjeron cambios sobre las células con un título de 1000 unidades citotóxicas por mililitro.

Cuando las células se inocularon con las preparaciones precipitadas con Sulfato de amonio, solo la cepa de - referencia y la de un adulto con diarrea dieron una res-- puesta positiva con un título de 100 unidades citotóxicas por mililitro.

Para inocular el filtrado obtenido del crecimiento por cinco días a 37°C se hicieron diluciones dobles seriadas de 1:20 a 1:10240, las cepas que dieron una respuesta positiva fueron: una de ocho cepas de niños con diarrea, una de seis cepas aisladas de niños sanos y todas las cepas de adultos con diarrea. Así mismo, las cepas control dieron resultados positivos como se esperaba. En ésta -

TABLA 3

Determinación de la actividad enterotóxica de las cepas aisladas de los difentes pacientes por ensayo en asa ileal de Conejo.

GRUPO	CEPAS PROBADAS	POSITIVAS	COCIENTE VOL/LONG ⁺
- Niños con diarrea	8	1	1.0
- Niños que recibieron antibióticos sin desarrollar diarrea.	2	0	-
- Niños aparentemente sanos	6	1	1.4
- Adultos con diarrea	5	4	1.2
			1.2
			1.4
			1.4
- Adultos aparentemente sanos	1	0	-
- Cepas de referencia	1	1	1.2

+ La acumulación de fluido se expresa como el cociente del volumen de fluido acumulado entre la longitud del asa inoculada, - cociente con un valor de 1.0 ó más fueron consideradas como positivas.

prueba de citotoxicidad, cuyos resultados se muestran en la tabla 4, los ensayos se repitieron en cinco ocasiones en cada una de las cuales cada determinación se hizo por duplicado.

Es de hacer notar que todas las cepas que dieron - respuestas positivas en el asa ileal de conejo también - dieron una respuesta positiva en el ensayo de citotoxicidad. Solo una cepa aislada de un adulto con diarrea fué negativa en el asa ileal pero dió una respuesta de citotoxicidad positiva (tabla 4).

Por otra parte, se probó la capacidad de neutralización del efecto citopático de las toxinas con un antisuero obtenido contra una preparación semipurificada de toxinas de C. difficile. La actividad de las cepas que dieron efecto citotóxico, se neutralizó con éste antisuero.

Determinación de las toxinas A y B por el ensayo inmunoenzimático (ELISA).

En éste ensayo semicuantitativo se determinaron las concentraciones aproximadas de las toxinas A y B presentes en los filtrados obtenidos de cada cepa. Para éste - objetivo se hicieron dos curvas patrón utilizando soluciones de las toxinas A y B puras a concentraciones conocidas, graficando la concentración de toxina contra densidad óptica a 405 nm (ver material y métodos). Las determinaciones de las concentraciones de toxinas se hicieron por interpolación en aquella zona en que la curva - con las toxinas puras se comporta como una recta. La sensibilidad fué de 5 a 100 ng/ml para la toxina A y de 100 a 500 ng/ml para la toxina B (gráficas 1 y 2).

Las cantidades más altas de toxinas A y B se detecta

TABLA 4

Determinación de la actividad citotóxica de las capas aisladas de los diferentes pacientes, sobre una monocapa de células epiteliales (HeLa)

G R U P O	CEPAS PROBADAS	POSITIVAS	CITOTOXICIDAD (Título)
- Niños con diarrea	8	1	80
- Niños que recibieron antibióticos sin de- sarrollar diarrea	2	0	-
- Niños aparentemente sanos	6	1	5120
- Adultos con diarrea	5	5	2560 640 80 2560
- Adultos aparentemente sanos	1	0	-
- Cepas de referencia	1	1	2560

+ El título de citotoxicidad está expresado como el inverso de la más alta dilución de la muestra a la que todavía hay efecto citopático en el 50% de la monocapa.

ron en los filtrados obtenidos de tres cepas aisladas de niños, la cepa II-22, la cepa II-8 y la cepa IV-8 así como en los filtrados de cinco cepas aisladas de adultos A-1, A-2, A-3, A-4 y A-7 y la cepa de referencia VPI 8484 (tabla 5).

Dado que en los filtrados de las cepas IV-4, V-5 y -III-23 se detectaron solo cantidades de toxina A y en el filtrado de la cepa I-30 solamente se detectó la toxina B éstos se concentraron 25 veces por ultrafiltración con una membrana XM 100 A y se realizó nuevamente el ensayo. Después de éste paso de concentración se detectaron las dos toxinas en los filtrados de las cepas IV-4 y I-30 (tabla 5).

En las cepas restantes no se demostró la presencia de ninguna de las dos toxinas in vitro, en las condiciones en las que se hizo el ensayo.

TABLA 5

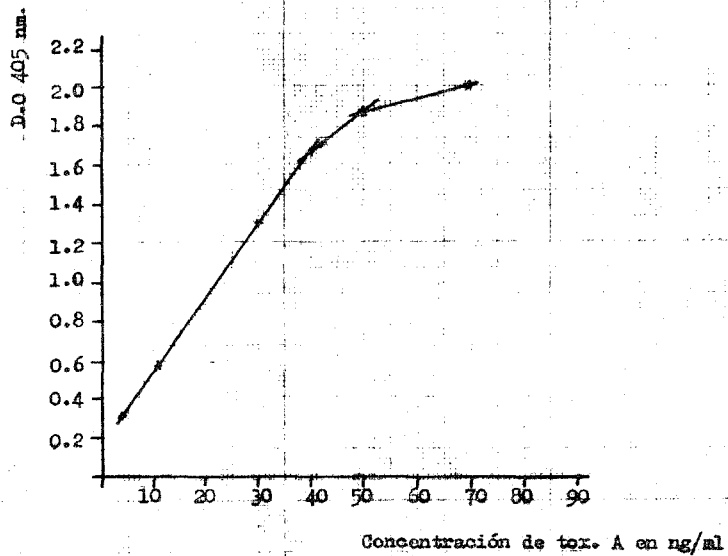
Determinación cuantitativa de las toxinas A y B
por ensayo inmunoenzimático.

GRUPO	CEPAS PROBADAS	POSITIVAS	Tox A ng/ml	Tox B ng/ml
- Niños con diarrea	8	3	25.75	3050
			45.85	3350
			48.6	4766
- Niños que recibieron antibióticos sin de- sarrollar diarrea	2	0	-	-
- Niños aparentemente sanos	6	2	50.15	17750
			1313.66	101600
- Adultos con diarrea	5	5	275.2	17125
			62.3	5733
			95.9	6933
			152.0	15250
			69.4	3300
- Adultos aparentemente sanos	1	0	-	-
- Cepa de referencia	1	1	25.33	5766

Grafica 1

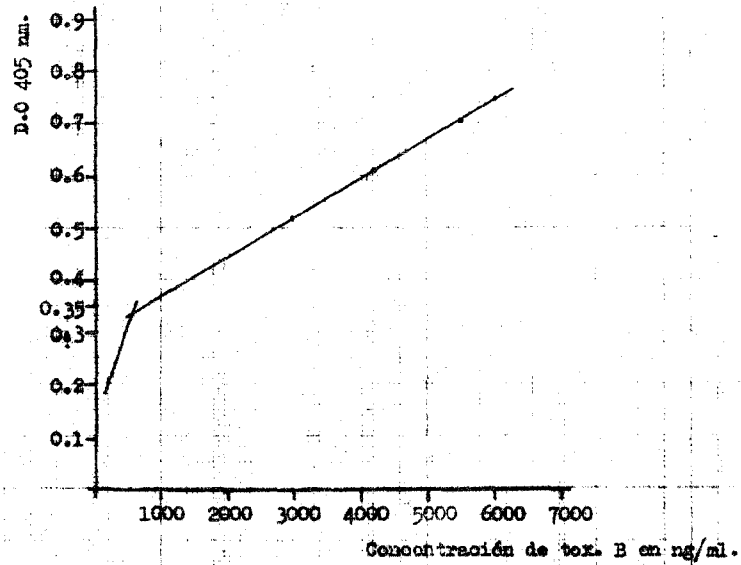
34

Curva estandar para la toxina A



Nota: Los valores de densidad óptica se interpolaron solo cuando tenían valores de 0.5 y 1.6.

Curva estandar para la toxina B



Nota: Los valores de densidad óptica se interpolaron solo cuando tenían valores de 0.37 y 0.73.

DISCUSION Y CONCLUSION

En éste estudio la prueba de ELISA fué más sensible que los ensayos biológicos para la detección de las toxinas A y B de C. difficile, pero en cada uno de éstos ensayos no pudimos detectar toxinas producidas en bajas cantidades y fué necesario concentrar los filtrados para demostrar su presencia.

La frecuencia de cepas toxigénicas fué más alta en adultos, mientras que en los filtrados obtenidos de las cepas aisladas de niños la frecuencia de las toxinas fué más baja, solo 3 de entre 8 niños con diarrea y 2 de 6 niños sanos presentaron cepas que producían éstas toxinas, en los filtrados de las cepas aisladas de niños que recibieron antibióticos pero que no desarrollaron diarrea no se encontraron las toxinas por ELISA ni por ensayos biológicos.

Cooperstook (5) observó que en las heces de niños sanos, la concentración de la toxina B puede ser similar a la de adultos con colitis pseudomembranosa, éstos datos concuerdan con nuestros resultados in vitro ya que la cepa más toxigénica se aisló de un niño aparentemente sano y ésta produce aproximadamente 6 veces la cantidad de ambas toxinas, toxina A (1313.6 ng/ml) y toxina B (101,600 ng/ml) que la cepa más toxigénica aislada de adultos (275.2 ng/ml de toxina A y 17.125 ng/ml de toxina B). El niño del cual se aisló ésta cepa no desarrolló ningún sintoma gastrointestinal y la citotoxina no se encontró en sus heces, aunque la frecuencia de cepas toxigénicas sea menor en niños que en adultos. En los filtrados de las cepas restantes aisladas de niños con diarrea no se detectaron las toxinas

con el método de ELISA, ni aún concentrando los filtrados 25 veces por ultrafiltración. Probablemente éstas cepas de C. difficile fueron negativas en ensayos biológicos y ELISA porque no producen cantidades detectables de cada toxina cuando crecen bajo las condiciones usadas en éste trabajo, pero tal vez las producen cuando crecen bajo diferentes condiciones.

Ciertos autores suponen que algunas cepas de C. difficile no producen cantidades detectables de citotoxina cuando crecen in vitro (32).

En éste estudio el 7 % de los niños y el 25 % de los adultos con diarrea presentaron la toxina en sus heces y todos los que presentaron la toxina en las heces tuvieron cepas toxigénicas. No siempre que se aísla el microorganismo se demuestra la presencia de las citotoxinas, ya que no todas las cepas las producen, posiblemente ésta sea una de las explicaciones de porqué en los filtrados de las cepas de los niños no se hayan detectado las toxinas aunque éstos presenten diarrea ó tal vez en éstos casos la diarrea puede deberse a otra causa incluso a la presencia de otro microorganismo diferente a C. difficile. Si las cepas no siempre producen la toxina también podría explicarse el hecho de que los niños pueden ser colonizados por el microorganismo y sean asintomáticos. Sin embargo como también aislamos cepas toxigénicas en niños aparentemente sanos deben ser otros los factores que condicionen la resistencia a las toxinas.

Aunque nosotros solo analizamos el filtrado de una cepa aislada de un adulto sano, no se detectaron en él las 4 toxinas por el ensayo inmunoenzimático, ni dió respuesta positiva en los ensayos biológicos, ésto concuerda con los

resultados descritos por Bartlett y Varki, ellos reportaron que la citotoxina se detecta en las heces de casi todos los pacientes con colitis pseudomembranosa asociada a antibióticos, aproximadamente en el 25 % de los que presentan diarrea asociada a antibióticos y solo en ocasiones muy raras en pacientes con enfermedades gastrointestinales no relacionadas con antimicrobianos ó en adultos sanos (3,33).

En adultos sanos es muy difícil encontrar el microorganismo, Viscidi en 1981 reportó que de 60 adultos sanos estudiados ninguno presentó el microorganismo ni la citotoxina (34).

Aunque nosotros solo analizamos una cepa aislada de un adulto sano, ésta fué el resultado de un rastreo en 100 individuos y solo en uno se logró aislar el microorganismo, otros estudios han mostrado que en adultos que recibieron antibióticos pero que no desarrollaron diarrea la frecuencia de cepas no toxigénicas fué más alta que la frecuencia de cepas toxigénicas. Sin embargo en algunos de éstos adultos han sido aisladas cepas toxigénicas y la citotoxina ha sido detectada en sus heces como sucede en infantes, parecería que los factores (ó el factor) que favorecen la colonización con cepas no toxigénicas (ó que producen baja cantidad de toxina) y la resistencia a la presencia de las toxinas en el colon no son exclusivas de los niños.

También Viscidi reportó que de 23 niños sanos estudiados, dos presentaron el microorganismo y uno la

citotoxina (34).

Es de hacer notar que en nuestro estudio dos de las seis cepas aisladas de niños sanos produjeron cantidades importantes de las toxinas, incluso cantidades mayores que las detectadas en los filtrados de las cepas aisladas de adultos con diarrea asociada a antibióticos.

El mismo autor reportó que de 215 adultos con diarrea, 138 presentaron el microorganismo y de éstos en 130 se detectaron las toxinas, ésto es posible porque también se ha encontrado que en algunos individuos no se detecta el microorganismo pero si presentan las toxinas en sus heces (34).

En nuestro caso se encontró que 6 de 25 adultos con diarrea presentaron el microorganismo pero todos los filtrados obtenidos de esas cepas presentaron cantidades detectables de toxinas por ELISA (tabla 5) y todas fueron positivas en los ensayos biológicos (tabla 4).

De las tres cepas productoras de toxinas, aisladas de niños con diarrea, sólo una de ellas mostró citotoxicidad y enterotoxicidad, las otras fueron negativas en los ensayos biológicos, ésto tal vez se deba a que las toxinas producidas por éstas cepas son biológicamente inactivas.

Las características de las diferentes muestras corroboran la veracidad del objetivo, ya que si bien no existen diferencias en la producción y actividad de -

las toxinas, si hay diferencias en la cantidad de cepas toxigénicas por grupo.

Como se puede observar en los resultados, todos los adultos que sufrían de diarrea presentaban el microorganismo y todas las cepas produjeron cantidades detectables de toxina con una alta actividad biológica incluso un poco mayor que la de las cepas aisladas de niños con diarrea. De las 10 cepas aisladas de niños con diarrea, sólo 3 produjeron cantidades detectables de toxinas y de éstas sólo una con actividad biológica, ésto confirma una vez más que aunque el microorganismo se encuentre en las heces, éste no necesariamente produce las toxinas, cuando menos no in vitro y bajo las condiciones preestablecidas en el estudio.

De las 6 cepas aisladas de niños sanos sólo dos produjeron la toxina y de ellas sólo una presentó actividad biológica, en cambio de las 5 cepas aisladas de adultos con diarrea, las 5 produjeron la toxina con actividad citotóxica y enterotóxica. Por ello decimos que si bien no difieren en la producción y actividad de las toxinas si en la proporción de cepas toxigénicas aisladas de los diferentes grupos.

RESUMEN

En éste estudio se pretendió definir si existen diferencias en el potencial toxigénico de cepas de Clostridium difficile aisladas de niños, comparadas con cepas aisladas de adultos. Se analizan las cepas aisladas para producción de toxina A utilizando la prueba de asa intestinal de conejo y un ensayo inmunoenzimático, y para la toxina B, ensayos en cultivos de tejidos. Se encontró que las cepas toxigénicas fueron menos frecuentes entre los aislamientos de niños (6 de 16) que entre los aislamientos de adultos (5 de 6). Estos resultados sugieren que las cepas no productoras, así como las poco productoras de toxinas, son más frecuentes entre los niños.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Adler, S.P., Chandrica, T. and Berman, W.F. (1981) Clostridium difficile associated with pseudomembranous colitis. Am. J Dis. Child. 135: 820-822.
- 2.- Bartlett, J.G., Chang, T.W., Gurwith, M., Gorbach, S.J. and Onderdonk, A.B. (1978) Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. N. Engl. J Med. 298: 531-534.
- 3.- Bartlett, J.G. (1979) Antibiotic-associated pseudomembranous colitis. Infect. Dis. 1: 123-131.
- 4.- Boening, D.A., Fleisher, G.R., Campos, J.M., Hulko wer, and Quinlan, R.W. (1982) C. difficile in a pediatric outpatient population. Pediatric. Infect. Dis. 1: 336-340.
- 5.- Cooperstock, M.S. and Zeed, A.J. (1983) Intestinal flora of infants of human intestinal microflora in health and disease. Hentges, D.J., Ed. Academic Press. p. 19-24.
- 6.- Cooperstock, M.S., Steffen, E., Yalken, R., and Onderdonk, A. (1982) C. difficile in normal infants and Sudden infants death syndrome; an association with infant formula feeding. Pediatrics. 70: 91-95.

- 7.- Cooperstock, M.S., Riegle, L., Woodrott, W.C. and Onderdonk, A.B. (1983) Influence of age, sex and diet on asymptomatic colonization of infants with C. difficile. Journal of Clinical Microbiology. 17: 830-833.
- 8.- De, S.N. and Chatterge. (1953) An experimental study of the mechanism of action of Vibrio cholerae on the intestinal mucous membrane. J. Pathol Bacteriol. 66: 559-562.
- 9.- Donta, S.T., Sullivan, N.M. and Wilkins, T.D. (1982) Differential effects of C. difficile toxins on tissue cultured cells. J. Clin. Microbiol. 15: 1157-1158.
- 10.- Donta, T.S. and Myers, M.G. (1982) C. difficile toxin in asymptomatic neonates. J. Pediatr. 100:435-439.
- 11.- Dowell, V.R. (1979) Antibiotic-associated colitis. Hospital practice. 75-80.
- 12.- Ehrich, M., Vantassel, R.L., Libby, J.M. and Wilkins, T.D. (1980) Production of C. difficile anti-toxin. Infectious and Immun. 28: 1041-1043.
- 13.- Fekety, R. (1981) Antibiotic-associated colitis--revisited. Clin. Microbiol. Newsletter. 3: 63-65.

- 14.- George, W.L., Sutter, V.L., Citron, D. and Fine--gold, S.M. (1979) Selective and diferential medium for isolation of C. difficile. J. Clin. Microbiol. 9: 214-219.
- 15.- Holts, E., Helin, I. and Mardh, P. (1981) Recovery of C. difficile from children. Scand. J. Infectious Dis. 13: 41-45.
- 16.- Lance, W.G., Rolfe, R.D., Sutter, V.L. and Fine--gold, S.M. (1979) Diarrhea and colitis associated with antimicrobial therapy in man and animals. Am. J. Clin. Nutr. 32: 251-257.
- 17.- Larson, H.I., Barclay, F.E., Honour, P. and Vill, I.D. (1982) Epidemiology of C. difficile in in--fants. J. Infect. Dis. 146: 727-733.
- 18.- Libby, J.M., Jortner, B.J. and Wilkins, T.D. (19--82) Effects of the two toxins of C. difficile in antibiotic associated cecitis in hamster. Infect. Immun. 36: 822-829.
- 19.- Libby, J.M., Donta, S.T. and Wilkins, T.D. (1983) C. difficile toxin A in infants. J. Infect. Dis. 148: 606.
- 20.- Libby, J.M. and Wilkins, T.D. (1982) Production of antitoxins to two toxins of C. difficile and immunological comparison of the toxins by cross--neutralization studies. Infect. Immun. 35: 374-376.

- 21.- Lyerly, D.M., Lockwood, D.E. and Wilkins, T.D. -
(1982) Biological activities of toxins A and B of
C. difficile. Infetc. Immun. 35: 1147-1150.
- 22.- Lyerly, D.M., Sullivan, N.M. and Wilkins, T.D. -
(1983) Enzyme linked immunosorbent assay for C. -
difficile toxin A. J. Clin. Microbiol. 17: 72-78
- 23.- Mardh, P., Helin, I., Collen, J., Oberg, M. and
Holts, E. (1982) C. difficile toxin in faecal spe
cimens of healthy children and children with dia-
rrhea. Acta Paediatr. Scand. 71: 275-278.
- 24.- Richardson, S.A., Alcock, P.A. and Gray, J. (1983)
C. difficile and its toxin in healthy neonates.
Br. Med. J. 287: 878.
- 25.- Rietra, P.G., Slaterus, K.W., Zanen, H.C. and Meu-
wissen. (1978) Clostridial toxin in faeces of --
healthy infants. Lancet. 2: 319.
- 26.- Rolfe, R.D. and Sydney, F.M. (1979) Purification
and characterization of C. difficile toxin. Infec-
tious Immun. 25: 191-201.
- 27.- Sherertz, R.J., and Sarobbi, F.A. (1982) The pre-
valence of C. difficile and toxin in a nursery po-
pulation: a comparison between patients with ne-
crotizing enterocolitis and an asymptomatic group.
J. Pediatr. 100: 435-439.

- 28.- Stark, P.L., Lee, A. and Parsonage, B.D. (1982) - Colonization of the large bowel by C. difficile - in healthy infants: quantitative study. Infect. Immun. 35: 895-899.
- 29.- Sullivan, N.M., Pellets, S. and Wilkins, T.D. (1982) Purification and characterization of toxins A and B of C. difficile. Infect. Immun, 35: 1032-1040.
- 30.- Taylor, N.S., Thorne, G.M. and Bartlett, J.G. (1981) Comparison of two toxins produced by C. difficile. Infect. Immun. 34: 1036-1043.
- 31.- Taylor, N.S. and Bartlett, J.G. (1979) Partial purification and characterization of a cytotoxin - from C. difficile. Rev. of Infectious Diseases. 1: 379-385.
- 32.- Torres, J., Sanchez, J., Dillman, C., Giono, S - and Muñoz, O. (1984) Prevalence of C. difficile and its cytotoxin in infants in Mexico. J. Clin. Microbiol. 20: 274-275.
- 33.- Varki, N.M. and Aquino, T.I. (1982) Isolation of C. difficile from hospitalized patients without antibiotic- associated diarrhea or colitis. J. of Clin. Microbiol. 16: 659-662.

- 34.- Viscidi, R., Willey, S. and Bartlett, J.G. (1981)
Isolation rates and toxigenic potential of C. difficile isolates from various patient populations.
Gastroenterology. 81: 5-9.
- 35.- Willey, S.H. and Bartlett, J.G. (1979) Cultures -
for C. difficile in stools containing a cytotoxin
neutralized by Clostridium sordellii antitoxin. J
Clin. Microbiol. 10: 880-884.