



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

" Clostridium difficile, PAPEL E IMPORTANCIA EN LA
COLITIS PSEUDOMEMBRANOSA."

TRABAJO MONOGRAFICO

Que para obtener el título de

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

Presenta

MARICELA LOPEZ GALINDO

México, D. F.

1985



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Pág.
I. INTRODUCCION.....	1
II. GENERALIDADES.....	3
a. TAXONOMIA Y MORFOLOGIA.....	6
b. CULTIVO.....	8
c. PRODUCTOS EXTRACELULARES.....	40
d. RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS.....	58
e. CONSTITUCION ANTIGENICA.....	64
f. INMUNIDAD.....	65
III. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO.....	69
a. DIAGNOSTICO HISTOLOGICO.....	69
b. DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO.....	70
IV. TRATAMIENTO.....	93
V. PREVENCIÓN.....	97
VI. CONCLUSIONES.....	99
ANEXO I.....	104
ANEXO II.....	129
BIBLIOGRAFIA.....	144

I. INTRODUCCION

Durante las tres últimas décadas, el diseño de sistemas eficaces para crear anaerobiosis ha tenido tal éxito que, actualmente, no sólo se cuenta con mejores esquemas taxonómicos y pruebas para identificación de microorganismos anaerobios, sino que además, se han logrado muchos progresos en lo que se refiere al conocimiento del papel que desempeñan éstos en las enfermedades humanas, ya que su aislamiento a partir de todo tipo de muestras clínicas es cada vez más frecuente.

A la fecha, son ya innumerables las revisiones que establecen claramente que las bacterias anaerobias son, dada su elevada incidencia, importantes agentes etiológicos de casos clínicos, tales como abscesos cerebrales y pulmonares, peritonitis, sinusitis crónica, etc. Sin embargo, destacan recientemente por su relevancia dos "nuevas" enfermedades: el botulismo infantil y la colitis pseudomembranosa; esta última es la que ocupa el presente trabajo. Su agente etiológico, Clostridium difficile, produce dos potentes exotoxinas que, según investigaciones recientes, son responsables directas de las manifestaciones graves del padecimiento en cuestión; pero sin duda lo más relevante del caso, es que el microorganismo es un comensal habitual del intestino huma

no y desencadena el padecimiento sólo cuando el uso del medicamento de antibióticos altera notablemente el equilibrio de la flora microbiana en dicha región anatómica.

Sus índices de morbilidad y mortalidad son tan significativos que se ha originado una serie de investigaciones encaminadas a establecer las causas que favorecen el desarrollo de Clostridium difficile en las regiones intestinales afectadas, las fuentes posibles de contaminación tanto endógenas como exógenas, las metodologías más adecuadas involucradas en el diagnóstico del padecimiento, el tratamiento y las posibles medidas de prevención. Cabe mencionar que las actuales técnicas de laboratorio que se emplean en el diagnóstico de síndromes diarreicos resultan ineficaces para detectar el padecimiento en cuestión.

Por todo lo anteriormente referido, el objetivo -- del presente trabajo es describir las características de una enfermedad "nueva", de tal forma que constituya una base sólida para lograr su comprensión y, con ello, su control.

II. GENERALIDADES

La colitis pseudomembranosa se reconoció inicialmente en 1867, pero no fué sino hasta 1893 cuando Finney la reportó por primera vez como "enteritis ulcerativa con formación de membranas parecidas a las que aparecen en la difteria" (enterocolitis diftérica) (86).

Estudios subsecuentes realizados durante la década de los 50's y principios de los 60's demostraron que el uso de agentes antimicrobianos tales como la tetraciclina y el cloramfenicol se encontraban implicados en este tipo de daño (5).

Durante la misma década de los 60's, Prohoska y colaboradores sugirieron que el posible agente causal de la colitis pseudomembranosa era Staphylococcus aureus, basándose en cultivos y tinciones obtenidas a partir de las evacuaciones de pacientes afectados y, principalmente, en la detección de una enterotoxina producida por dicho patógeno. No obstante lo antes establecido, algunos investigadores no se mostraron de acuerdo con la hipótesis de que ese microorganismo fuera el agente etiológico del padecimiento (5,86,119).

Por su parte Small, a finales de la década de los 60's, continuó los estudios referentes a la relación existente entre el uso de antimicrobianos (específica-

mente clindamicina y lincomicina) y la aparición de lesión ileocecal en hamsters. Los resultados de sus investigaciones mostraron que la administración de dosis que oscilaban entre 10 y 400 mg de lincomicina por kg de peso provocaba en los animales diarrea, anorexia, hipotermia y, finalmente, la muerte en un intervalo de 3 a 5 días después de suministrado el antibiótico; asimismo, la evaluación histológica de las regiones intestinales afectadas reveló un proceso inflamatorio en el íleon, ciego y colon, caracterizado por congestión vascular, edema, infiltración celular y ruptura del epitelio intestinal. Sin embargo, en ese entonces estos resultados ganaron poca atención debido a que eran escasos los reportes de diarreas severas relacionadas con estos medicamentos (5,74,88,109,119).

No fué sino hasta el período comprendido entre los años de 1977 y 1978 cuando varios grupos de investigadores: Bartlett (9,12), George (45,46), Larson y Price -- (62,63), Onderdonk (88) y Rifkin (98), entre otros establecieron con fundamentos convincentes el papel etiológico de una toxina producida por Clostridium difficile (microorganismo descrito por primera vez en 1935 por -- Hall y O'Toole (88)). Las razones principales que condujeron a concluir que la causante directa de la enfermedad era una toxina, tuvieron origen en las siguientes -

observaciones:

- 1.- El padecimiento puede transferirse a animales sanos, inyectándoles intracecalmente el contenido cecal de otros que padecen inflamación hemorrágica del ciego, o bien filtrados de evacuaciones de pacientes con colitis pseudomembranosa.
- 2.- El cultivo de las evacuaciones del animal enfermo, empleando los medios adecuados, produce el desarrollo de Clostridium difficile en cantidades que se encuentran en función directa con la severidad del padecimiento.
- 3.- Inyecciones de Clostridium difficile (o bien del sobrenadante de sus cultivos) en el ciego de hamsters, producen una enfermedad idéntica a la que se observa cuando se administran antibióticos en concentraciones elevadas a animales no inoculados, recordando a la vez la colitis pseudomembranosa que se observa en humanos.
- 4.- La toxina presente en las evacuaciones muestra efectos citotóxicos sobre diferentes líneas celulares: modifica la permeabilidad de la membrana celular y provoca la lisis de la célula (74).
- 5.- Los efectos de la toxina en diferentes cultivos celulares pueden ser neutralizados con la antitoxina inducida por la exotoxina de Clostridium sordellii

(cuya toxina comparte determinantes antigénicas con la toxina de Clostridium difficile (28,74)); asimismo la inmunización de hamsters con esta antitoxina, antes de ser sometidos a la administración de antibióticos previene el desarrollo de cecitis hemorrágica en estos animales (1).

Estudios posteriores realizados durante 1980 y 1981, han demostrado que no es tan sólo una toxina la que toma parte en el desarrollo de la colitis pseudomembranosa (como inicialmente se pensaba), sino que son dos las responsables de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Las evidencias para esta conclusión tuvieron origen en los trabajos realizados por Bartlett (13) y Taylor (116,117), quienes lograron detectar que Clostridium difficile produce una segunda toxina que también tiene efectos citopáticos sobre cultivos celulares y -- que, cuando se aplica intracecalmente a hamsters, causa daños considerablemente más severos que los que provoca la primera toxina implicada en el padecimiento.

a. TAXONOMIA Y MORFOLOGIA.

a.1. TAXONOMIA.

Las bacterias anaerobias incluyen, microorganismos

Gram positivos y Gram negativos; en la Octava Edición del "Bergey's Manual" están clasificados en diferentes partes sobre la base de su reacción a la tinción de Gram, morfología celular y/o tolerancia al oxígeno.

El microorganismo descrito en el presente trabajo se encuentra clasificado en la Parte 15, la cual está destinada para bacilos y cocos formadores de endoesporas, que a su vez se agrupan en una familia y cinco géneros, a saber:

Familia: Bacillaceae

Géneros: I. Bacillus

II. Sporolactobacillus

III. Clostridium

IV. Desulfotomaculum

V. Sporosarcina

De acuerdo a lo anterior, puede establecerse que la clasificación taxonómica del microorganismo en estudio es la siguiente:

Familia: Bacillaceae

Género: Clostridium

Especie: C. difficile

a.2. MORFOLOGIA CELULAR.

Al igual que los microorganismos pertenecientes a su género, Clostridium difficile se presenta en forma de bacilos Gram positivos que no presentan agrupación característica y miden aproximadamente entre 1.3 y 1.6 μ de ancho por 3.1 a 6.4 μ de largo; sus extremos son redondeados, presentan esporas ovales, subterminales, son móviles debido a la presencia de flagelos peritricos y no poseen cápsula (52,110).

b. CULTIVO.

b.1. FUENTES DE AISLAMIENTO.

El desarrollo de métodos óptimos para lograr el -- cultivo de microorganismos anaerobios, ha permitido detectar diferentes fuentes de aislamiento a partir de -- las cuales se puede recuperar Clostridium difficile; -- las principales son:

- (a) Materia fecal de la mayoría (98%) de los pacientes que padecen colitis pseudomembranosa.
- (b) Evacuaciones de diferentes especies animales sanas (gatos, perros, caballos, vacas, monos, hamsters) - (20).
- (c) Areas intrahospitalarias (superficie de pisos y pa-

redes de las habitaciones) y objetos inanimados - - (colchones, ropa de cama, excusados y lavabos) que han sido utilizados por pacientes afectados; tam- - bién se puede aislar de las manos y evacuaciones -- del personal médico que atiende a éstos (40,41,57,- 78,79).

(d) Suelo (estiércol, lodo, arenas)(52).

(e) Evacuaciones de adultos y niños sanos (53,81,82,112).

Cabe señalar que se han encontrado reservorios de este microorganismo en el tracto urogenital de mujeres con enfermedades venéreas y en la orina de hombres que padecen uretritis inespecíficas; este dato que sin lugar a duda tiene singular interés desde otro punto de - vista diferente al que ocupa el presente trabajo, fué - obtenido por Hafiz (51), quien analizó a un total de -- 148 personas, de las cuales 106 eran mujeres con dife- - rentes enfermedades venéreas (gonorrea, herpes genital y tricomoniasis) y 42 hombres con uretritis inespecífi- - cas. Los resultados de este trabajo muestran que Clos- - tridium difficile estaba presente en las secreciones va- - ginales del 72% de las mujeres estudiadas y en el 100% de los exudados uretrales de los hombres involucrados - en el estudio.

b.2. MEDIOS DE CULTIVO.

Existen diferentes medios de cultivo para lograr el aislamiento y cultivo de Clostridium difficile; sin embargo, los que han proporcionado los mejores resultados, según Hafiz (52) quien logró aislar al microorganismo de recién nacidos, George (49) que comparó la efectividad de diferentes medios de cultivo para llegar a la recuperación de Clostridium difficile empleando como fuente de aislamiento muestras fecales de pacientes con colitis pseudomembranosa y otros padecimientos gastrointestinales (diarreas crónicas, enterocolitis necrotizante, colitis ulcerativa) y Wilson (127,128) quien investigó el efecto del taurocolato de sodio en la germinación de esporas y viabilidad de formas vegetativas de Clostridium difficile, son:

- (1) Agar clostrisel reforzado.
- (2) Gelosa sangre.
- (3) Medio CFA (cicloserina-fructosa-yema de huevo-agar).
- (4) Medio CCFA (cicloserina-cefoxitina-fructosa-yema de huevo-agar).
- (5) Medio TCCFA (taurocolato de sodio-cicloserina-cefoxitina-fructosa-agar).

Debido a la selectividad de sus componentes, los medios CFA, CCFA y TCCFA se consideran los más apropiados en la actualidad, ya que su índice de recuperación

es alto: pueden detectar a Clostridium difficile en las heces, si se encuentra en proporción igual o mayor de - 100 microorganismos/g.

(Para preparación y composición de los medios de cultivo consultar Anexo I).

b.3. CONDICIONES OPTIMAS DE INCUBACION.

b.3.1. TEMPERATURA.

La temperatura óptima de crecimiento para Clostridium difficile varía entre 30° y 37°C, desarrollándose aceptablemente en el intervalo de 25° a 45°C.

b.3.2. TIEMPO DE INCUBACION.

El tiempo de incubación necesario para obtener un desarrollo satisfactorio de Clostridium difficile es de 48 horas.

b.3.3. REQUERIMIENTOS DE OXIGENO.

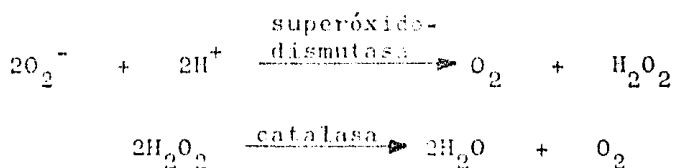
Una de las características más importantes del microorganismo en estudio es su incapacidad, no sólo para utilizar el oxígeno, sino para tolerarlo; por consiguiente, se hace necesario crear condiciones de anaerobiosis para lograr su óptimo desarrollo. La atmósfera necesaria para estos fines se compone de una mezcla ga-

cosa que contiene un 90% de H_2 y un 10% de CO_2 (23,91).

Cabe hacer notar que todavía no se ha aclarado la base para explicar la intolerancia al oxígeno de los microorganismos pertenecientes al género Clostridium y, - por supuesto, de otras bacterias anaerobias.

Una de las hipótesis más aceptadas que explican este hecho, se basa en la carencia de enzimas tales como la catalasa, peroxidasa y superóxido-dismutasa; esto, - en presencia de oxígeno, permite la acumulación intracelular de niveles tóxicos de H_2O_2 y de un radical altamente reactivo llamado superóxido (O_2^-) que normalmente les resultan letales. Esto no sucede en microorganismos aerobios y facultativos que están protegidos por estas enzimas.

La secuencia de reacciones para destruir estos metabolitos tóxicos es la siguiente:



SISTEMAS EMPLEADOS PARA EL CULTIVO DE BACTERIAS ANAEROBIAS.

Estudios comparativos han demostrado que los sistemas que se mencionan a continuación son satisfactorios para el cultivo de bacterias anaerobias comúnmente aso-

ciadas a diferentes padecimientos:

1. Jarra de anaerobiosis.
2. Cámara anaerobia.
3. Tubos giratorios con medio pre-reducido.

1. JARRA DE ANAEROBIOSIS.

Existen diferentes tipos de jarras para lograr el cultivo de bacterias anaerobias: jarra anaerobia de Brewer, Bair Tatlock, Mc Instosh-Fieldes, Torbal y Gas Pak; sin embargo, el principio químico para la eliminación del oxígeno en todas ellas es el mismo; consiste en hacer reaccionar todo el oxígeno presente con el hidrógeno que se ha adicionado al sistema, en presencia de un catalizador (paladio) para formar agua.

En la actualidad la jarra anaeróbica Gas Pak es la más usada en los laboratorios de Microbiología, dada la facilidad de su manejo; este sistema no tiene conexiones exteriores, pues no requiere bombas de vacío, tanque de gas, ni manómetro: emplea tan sólo paquetes desechables generadores de H_2 y CO_2 , y un catalizador que funciona a temperatura ambiente (con lo cual se evita la necesidad de conexión eléctrica para calentar el catalizador como sucede en sistemas tales como la jarra de Brewer).

La jarra anaeróbica Gas Pak está constituida esencialmente por un recipiente de vidrio cuya tapa cierra

coloración de la solución indicadora, de azul a incolora.

2. CAMARA ANAEROBIA.

Este sistema emplea cámaras fabricadas con plástico claro (flexible o rígido) provistas de una compuerta de entrada, para la transferencia de materiales dentro y fuera, y guantes para manipular dentro de ellas; además, contiene todo el equipo necesario (incluyendo incubadora) para llevar a cabo las técnicas microbiológicas convencionales y lograr el aislamiento e identificación de bacterias anaerobias en un ambiente totalmente libre de oxígeno.

Comercialmente se venden en dos tamaños: la cámara tipo A que tiene una bolsa de 165 cm de ancho por 81 cm de largo y 102 cm de alto con un par de mangas y guantes, y la cámara tipo B que consta de una bolsa grande de 213 cm de ancho por 80 cm de largo y 102 cm de altura y dos pares de mangas con guantes.

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 o el que pudiera introducirse en el sistema se elimina por la acción catalizadora del paladio. La humedad relativa dentro de estos dispositivos debe mantenerse en 70 y 85%; si ésta excede los valores permitidos se disminuye mediante el uso

de un gel desecante (óxido de silicio). No obstante la efectividad de estas cámaras, resulta costosa su adquisición.

J. TUBOS GIRATORIOS CON MEDIO PRE-REDUCIDO.

En este sistema se utilizan medios de cultivo pre-reducidos que se preparan en tubos con tapón de hule y atmósfera exenta de oxígeno. Al medio, generalmente sólido, se le adiciona un agente reductor (L-cisteína HCl) antes de esterilizarse, para ayudar a mantener un bajo potencial de óxido-reducción y prevenir cambios oxidativos dentro del sistema. Una vez esterilizado el medio, se usa un rodillo giratorio para formar una delgada capa de agar sobre la superficie interna del tubo, quedando con esto listo para ser inoculado. El medio se mantiene libre de oxígeno durante la inoculación, ya sea porque ésta se realice con aguja a través del tapón (impermeable al oxígeno) o bien, por pasaje de 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, pudiendo con ello incubarse en condiciones estándar y ser observado en cualquier momento sin la exposición indeseable de los anaerobios al oxígeno atmosférico. Este sistema presenta la desventaja de requerir equipo especial poco accesible.

3.4. MORFOLOGIA MACROSCOPICA.

Las principales características morfológicas de -- las colonias en los medios de cultivo antes mencionados, previas 48 horas de incubación, se describen a continuación:

GELOSA SANGRE.

Colonias grisáceas, circulares de aproximadamente 4.5 mm de diámetro, bordes enteros, poco convexas, con superficie sin brillo, no hemolíticas y que presentan cierta fluorescencia amarillo verdosa o verde pálido -- (49).

AGAR CLOSTRISSEL REFORZADO.

Las cepas de Clostridium difficile que desarrollan en este medio producen colonias grisáceas que miden a-- proximadamente entre 3 y 5 mm de diámetro, de bordes -- que pueden ir de mellados a enteros, planas y de super-- ficie lisa (52).

MEDIOS CFA, CCEFA Y TCCEFA.

Colonias circulares de color amarillo que miden a-- proximadamente 7.5 mm de diámetro, de bordes ligeramen-- te filamentosos, con apariencia translúcida, superficie lisa y ligeramente umbilicadas; se observa además que -- dichas colonias despiden una cierta fluorescencia amarillo oro (principalmente en el medio TCCEFA) que persiste

en ocasiones hasta 5 a 6 días. Por otra parte, es importante subrayar que existe una alteración en el color original del medio, debido a que la presencia de ciertos productos metabólicos incrementa el pH de éste, provocando el vire del indicador que contiene (rojo neutro); el cambio es de naranja a amarillo y se observa aproximadamente 2 a 3 mm alrededor de la colonia desarrollada (49,128).

Se ha observado (49) que la cicloserina y cefoxitina (antibióticos contenidos en los tres medios de cultivo) provocan una alteración en la morfología celular -- del microorganismo. Al realizar los frotis y tinciones correspondientes a las colonias desarrolladas en el medio CFA se observa un aumento en la longitud de la célula bacteriana y una disminución en el número de esporas, en comparación a lo manifestado en las preparaciones efectuadas a partir de cultivos obtenidos en gelosa sangre.

En cuanto al medio CCFA, los cambios sufridos en la morfología celular son aún mayores: la elongación -- del bacilo es todavía más marcada y se observa un número mucho menor de esporas. Sin embargo, si se realizan pases sucesivos en gelosa sangre la morfología celular vuelve a ser la descrita anteriormente.

Por otra parte, investigaciones recientes han señ

lado que la presencia de taurocolato de sodio en el medio TCCFA favorece ampliamente el proceso germinativo de las esporas de Clostridium difficile; la inclusión de este producto biliar en dicho medio, lo hace particularmente útil en el aislamiento del microorganismo a partir de aquellas muestras fecales en donde, por no ser procesadas rápidamente, se reduce considerablemente el número de formas vegetativas viables. En base a estas evidencias y tomando en consideración que, en situaciones normales las sales biliares que no son absorbidas en el íleon (parte terminal del intestino delgado) son metabolizadas por algunos miembros de la flora intestinal, se ha sugerido la posibilidad de que éste sea, en un momento dado, un mecanismo natural que contribuya a impedir la colonización del intestino por Clostridium difficile (127,128).

Asimismo, se ha detectado que el uso de lisozima origina un incremento en el proceso de conversión espora-forma vegetativa (81); por consiguiente, la adición de este componente a los medios de cultivo como CFA y CCFA los habilita como los más apropiados para lograr aislar al microorganismo a partir de ambientes hospitalarios en donde se encuentra principalmente en forma esporulada. Cabe destacar que relacionado con el género Clostridium, la forma exógena infectante para el hombre

de la espora.

MEDIOS LIQUIDOS.

En cuanto al crecimiento del microorganismo en medios líquidos, se ha observado que desarrolla moderadamente formando un sedimento de tipo granular; los más empleados en su investigación son los caldos infusión - cerebro corazón (III) y glucosa carne cocida (3,110).

b.5. PRUEBAS INVOLUCRADAS EN LA IDENTIFICACION DE Clostridium difficile.

No obstante que el desarrollo obtenido en medios de cultivo selectivos ayuda a realizar una identificación presuntiva del microorganismo, tanto por las características microscópicas como por las macroscópicas que en ellos se pueden apreciar, éstas no son suficientes para diferenciar la especie; por ello deben efectuarse una serie de pruebas bioquímicas. A continuación se presentan tablas en donde se indican los comportamientos bioquímicos de las principales especies del género Clostridium:

Tabla 2.1

	<i>C. Sphoi</i>	<i>C. bifementians</i>	<i>C. foedeli</i>	<i>C. leucobryces</i>	<i>C. leosus</i>	<i>C. subterminale</i>	<i>C. essensei</i>	<i>C. rufosus</i>	<i>C. scullum</i> A, B, C, D, F	<i>C. D, E, F</i>	<i>G</i>	<i>C. pizzum</i>	<i>C. acrobryces</i>	<i>C. histolicum</i>	<i>C. rufobryces</i>	<i>C. boyi</i> , tipo A	tipo B	tipo C	<i>C. ruficeps</i>	<i>C. haemolyticum</i>	<i>C. feisium</i>	<i>C. chavoi</i>	<i>C. subicum</i>	<i>C. pillicum</i>
Producción de H ₂ S	+	d	d	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ureasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Licuefacción de gelatina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis de caseína	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+
Reducción de NO ₃ ⁻	-	d	d	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	d	d	+	+	+	+	+	+	+
Producción de acetilmetilcarbinol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de indol	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lecitinasa	+	+	+	+	-	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lipasa	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Producción de toxinas	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Patogenicidad en animales de lab.	-	-	+	-	v	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hemólisis	-	v	v	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	w	d	+	+	+	+	-

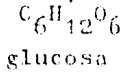
d.- 11 a 82% de las cepas dan resultados positivos.
w.- reacción débil.
v.- resultado variable.

b.6. FUNDAMENTOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS EMPLEADAS -
EN LA IDENTIFICACION DE Clostridium difficile.

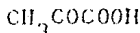
b.6.1. FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS.

Esta prueba manifiesta la capacidad de los microorganismos para fermentar (degradar) un carbohidrato específico con la consiguiente producción de ácido(s) o - - bien ácido(s) y gas. Las rutas utilizadas para efectuar la fermentación de carbohidratos, al igual que los productos finales formados, varían mucho en los distintos grupos microbianos dependiendo de los sistemas enzimáticos que poseen; de esta manera, la gama particular de - carbohidratos susceptibles de fermentación es un importante criterio taxonómico que se utiliza para la caracterización de géneros y especies bacterianas. La lista de carbohidratos que pueden servir como sustratos fermentables incluye polisacáridos (almidón, celulosa), -- trisacáridos (rafinosa), disacáridos (lactosa, maltosa, sacarosa), azúcares-ácidos (ácido glucónico, glucurónico), polihidroxiálcoholes (dulcitol, manitol, sorbitol) y monosacáridos (glucosa, fructosa, galactosa, arabinosa, xilosa, ribosa); asimismo, los productos finales característicos de la fermentación de estos sustratos comprenden los ácidos acético, láctico, fórmico, propiónico, succínico, acetoacético, butírico e hidroxibutírico, etanol, butanol, isopropanol, butanodiol, CO₂ y H₂.

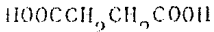
Carboidratos
(disacáridos, trisacáridos, polisacáridos)



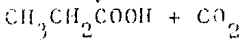
Ruta Embden-Meyerhof-Parnas



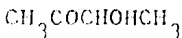
ác. pirúvico



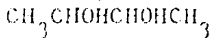
ác. succínico



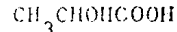
ác. propiónico



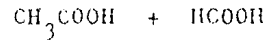
acetilmetilcarbinol



2,3-butilenglicol
(butanodiol)

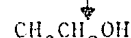
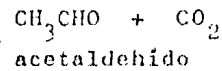
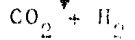


ác. láctico

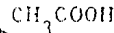


ác. acético

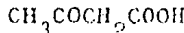
ác. fórmico



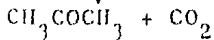
alcohol etílico
(etanol)



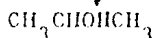
ác. acético



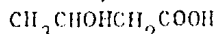
ác. acetoacético



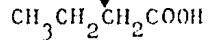
acetona



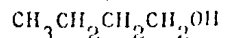
alcohol iso-
propílico
(isopropanol)



ác. β -hidroxibu-
tírico



ác. butírico



alcohol butílico
(butanol)

La fermentación puede detectarse fácilmente mediante el empleo de medios de cultivo líquidos o sólidos adicionados de un solo carbohidrato (cuyo análisis se encuentre en turno) y de un indicador ácido-base. De esta manera, si el microorganismo es capaz de fermentarlo -- ocurrirá una alteración específica en el color original del medio, provocada por la presencia de los productos finales del proceso. Los indicadores más empleados con esta finalidad y sus respectivos comportamientos se citan en la Tabla 2.4.

Entre los carbohidratos fermentados por Clostridium difficile (Tabla 2.3), existe uno en particular -- que, según un estudio realizado por Nakamura y colaboradores (84), su degradación se encuentra muy relacionada con la toxigenicidad del microorganismo; dicho trabajo establece que la coincidencia entre las cepas capaces -- de fermentar el sorbitol y la capacidad para elaborar -- toxinas es del 85% (Tabla 2.5).

Tabla 2.4.- Características de los indicadores usados en los medios de cultivo.

INDICADOR Y RANGO	pH				
	4	5	6	7	8
R rojo de me- tilo 4.4 - 6.0		rojo		amarillo	
Púrpura de bromocresol 5.4 - 7.0		amarillo		*	púrpura
Azul de -- bromotimol 6.0 - 7.6			amarillo	*	azul
R rojo de fe- nol 6.8 - 8.4			amarillo	*	rojo
R rojo neu- tro 6.8 - 8.0			rojo	*	amarillo

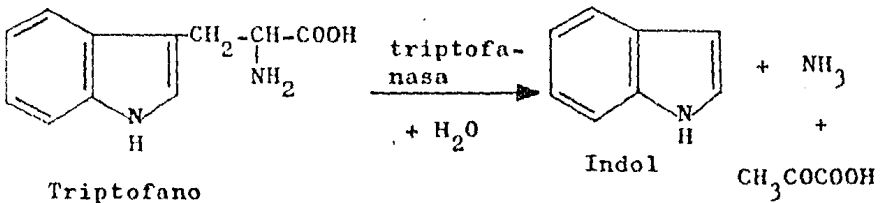
* El medio generalmente se ajusta a este pH.

Tabla 2.5.- Relación entre la fermentación de sorbitol y la toxigenicidad de -- Clostridium difficile.

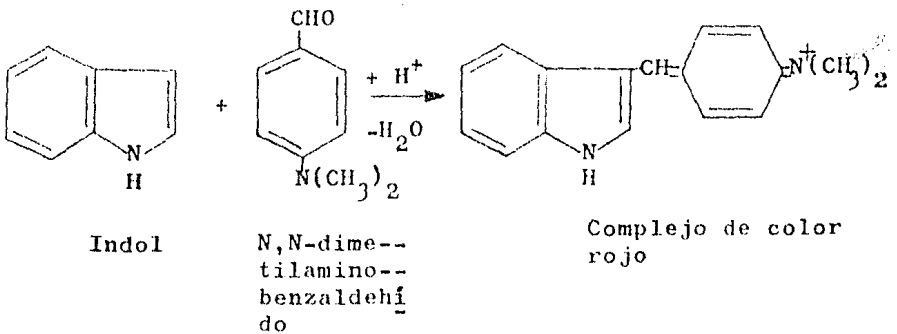
No. de cepas fermentado <u>r</u> as de sorbitol		No. de cepas no ferme <u>n</u> tadoras de sorbitol	
Toxigénicas	No toxigénicas	Toxigénicas	No toxigénicas
51	9	5	14

b.6.2. PRODUCCION DE INDOL.

El principio de esta prueba radica en la capacidad que poseen sólo ciertos grupos bacterianos para produ-- cir indol a partir de triptofano, a través de la tripto fanasa; esta enzima cataliza la desaminación del tripto fano desligando y descomponiendo únicamente la cadena - lateral de la molécula del aminoácido; de esta manera, el anillo aromático queda intacto:



El indol formado se detecta haciendo reaccionar este producto con N,N-dimetilaminobenzaldehído en medio ácido; el resultado de esta combinación es la formación de un complejo de color rojo que permite la visualización directa de la utilización del triptofano por el microorganismo en estudio. La reacción que se efectúa en la detección del indol, se indica a continuación:

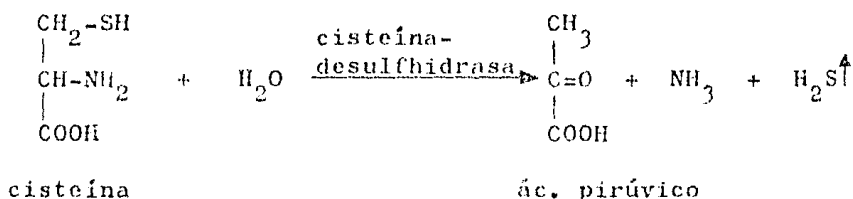


Los medios de cultivo apropiados para detectar la producción de indol deberán estar adicionados de peptonas que contengan una elevada concentración de triptofano, (como lo son el medio SIM o el caldo triptofano) y carecer de glucosa, ya que al parecer, ésta inhibe la producción de indol.

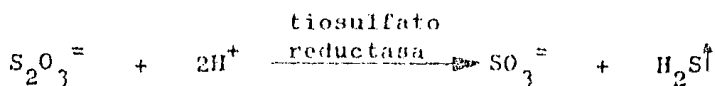
b.6.3. PRODUCCION DE H₂S (SULFURO DE HIDROGENO).

En la prueba de producción de H₂S, se investiga la capacidad de algunas especies bacterianas para liberar, en forma de sulfuro (S²⁻), el azufre presente en ciertos

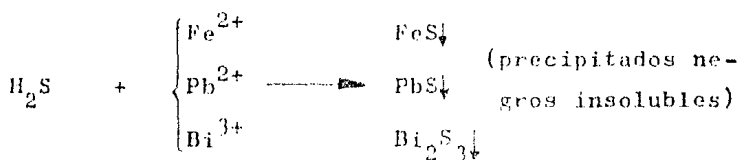
compuestos. Según algunos investigadores, la producción de H_2S a partir de compuestos orgánicos que contienen azufre, se debe a la acción de la enzima cisteína-desulfhidrasa (anteriormente llamada cisteínasa) sobre la cisteína presente en las peptonas que comúnmente se adicionan a los medios de cultivo apropiados para esta prueba. La reacción que se sugiere puede representarse como sigue:



Por otro lado, entre las fuentes inorgánicas de azufre que con el mismo fin se adicionan a los medios de cultivo, se encuentra el tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$); se supone que la producción de H_2S a partir de este compuesto se debe a un mecanismo diferente al que se postula para la producción de H_2S a partir de cisteína: el tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{=}$), es reducido a sulfuro ($\text{S}^{=}$) por acción de una tiosulfato reductasa en presencia de un agente reductor que actúa como donador de electrones:



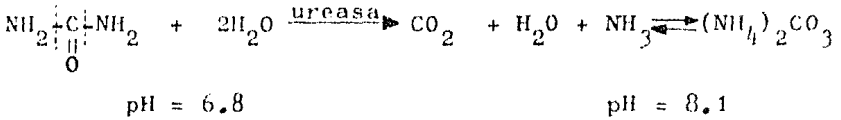
La detección del H_2S , ya sea que se haya obtenido a partir de compuestos orgánicos o inorgánicos, se logra al combinarse éste con sales de metales pesados tales como, sulfato ferroso, sulfato de hierro y amonio, acetato de plomo, sulfito de bismuto y citrato de hierro y amonio; de esta manera se forman los sulfuros correspondientes, cuya coloración característica (precipitados insolubles color negro), permite la sencilla y rápida identificación de microorganismos productores de H_2S .



Entre los medios de cultivo que comúnmente se emplean para investigar esta propiedad, se encuentran los siguientes: agar sulfito de bismuto, agar de sulfuro y citrato, agar de hierro y lisina, agar de hierro de Kligler, agar de hierro y triple azúcar y medio SIM.

b.6.4. PRODUCCION DE UREASA.

Esta prueba se fundamenta en la capacidad que tienen ciertos grupos bacterianos de hidrolizar la urea -- por acción de la enzima ureasa, de acuerdo con la siguiente reacción:

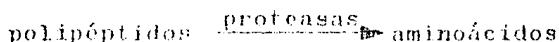
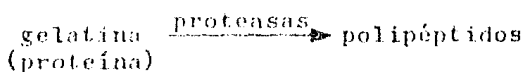


El amoníaco resultante de la hidrólisis reacciona en solución para formar como producto final carbonato de amonio; este último originará que la mezcla de reacción se torne alcalina incrementándose el pH de 6.8 a 8.1.

La detección de microorganismos productores de ureasa, puede conseguirse mediante el uso de medios de cultivo, ya sean sólidos o líquidos (agar urea, caldo urea), que contengan el sustrato (urea) y cuyo indicador ácido-base exhiba una variación específica dentro del rango mencionado; usualmente se emplea rojo de fenol, dado que vira de naranja (pH=6.8) a rojo intenso o lila (pH=8.1).

b.6.5. LICUEFACCION DE GELATINA.

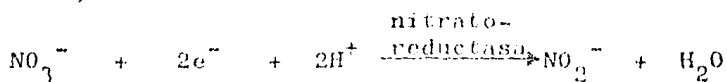
La licuefacción de la gelatina es una prueba que permite detectar la actividad proteolítica de las bacterias. Esta propiedad está determinada por la capacidad del microorganismo en estudio para producir proteasas; el catabolismo de la gelatina por estas enzimas es un proceso que se efectúa en dos etapas y su producto final es una mezcla de aminoácidos:



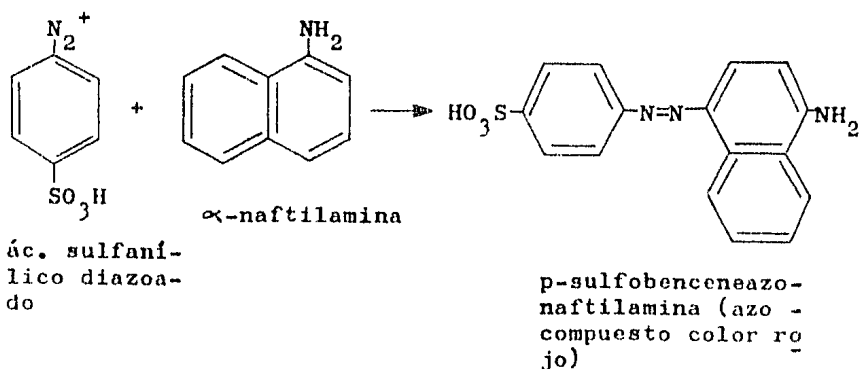
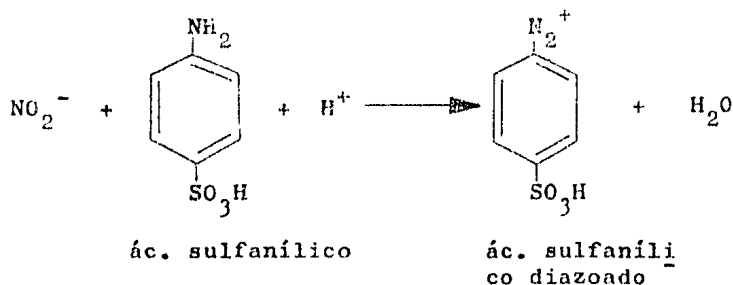
Este proceso se logra detectar mediante la observación de la licuefacción del medio de cultivo que contiene el sustrato proteico una vez transcurrido el tiempo apropiado de incubación.

b.6.6. REDUCCION DE NITRATOS (NO_3^-).

La reducción de nitratos es una propiedad que se basa en la facultad que poseen algunas bacterias para transformar estos compuestos (NO_3^-) en nitritos (NO_2^-) por mediación de la enzima nitrato-reductasa; la reacción que representa este proceso es la siguiente:

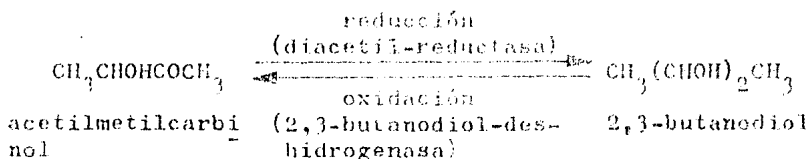


La presencia de nitritos (NO_2^-) en el medio de cultivo se detecta mediante la adición de ácido sulfanílico y α -naftilamina; en este caso, los nitritos y el ácido sulfanílico reaccionan formándose una sal de diazonio que, a su vez, se combina con α -naftilamina produciendo un azocompuesto de color rojo de acuerdo con las siguientes reacciones:

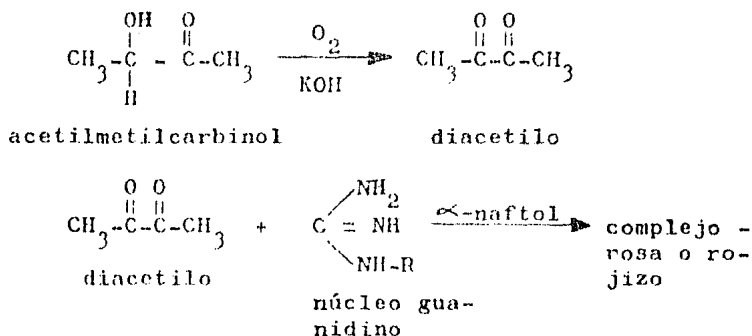


En algunos casos suelen obtenerse resultados falsos negativos debido a que el microorganismo en estudio reduce el NO_3^- a otros productos como NH_3 , N_2 , NO o N_2O no existiendo entonces NO_2^- que reaccione con el ácido sulfanílico; de aquí que, en caso de que la reacción resulte negativa, sea necesario adicionar una pequeña cantidad de zinc (este último actúa reduciendo los nitratos a nitritos). De esta forma, si los nitratos están presentes por no haber sido convertidos enzimáticamente,

2,3-butanodiol es un sistema reversible de óxido-reducción:

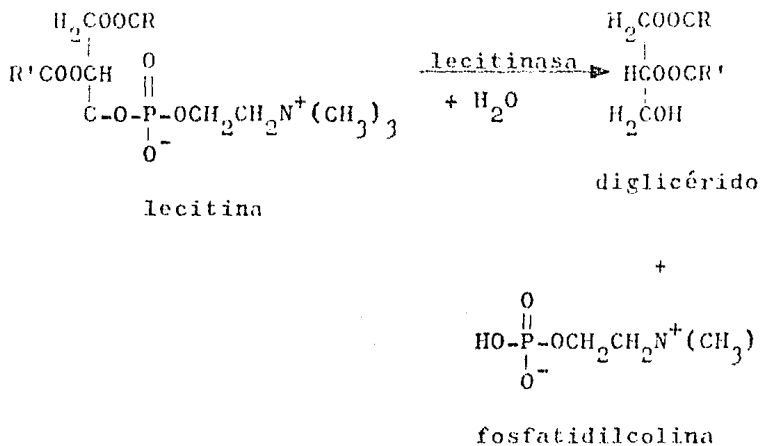


Para detectar este proceso generalmente se emplea la prueba de Voges Proskauer, que se basa en poner de manifiesto al precursor del 2,3-butanodiol: el acetilmetilcarbinol; la identificación de este producto se logra mediante la adición de hidróxido de potasio (KOH) y α -naftol al medio de prueba (comúnmente caldo MR/VP). La presencia del KOH y α -naftol implica la conversión del acetilmetilcarbinol a diacetilo, por oxidación espontánea en medio alcalino. Este último compuesto se condensa con el núcleo guanidino de la peptona presente en el medio de cultivo para formar un complejo rosa o rojizo. Las reacciones involucradas en la detección del acetilmetilcarbinol son las siguientes:



E.S.B. PRODUCCION DE LECITINASA.

Esta prueba se fundamenta en la facultad que poseen algunas especies bacterianas de hidrolizar lecitina por acción de la enzima lecitinasa, conforme a la siguiente reacción:

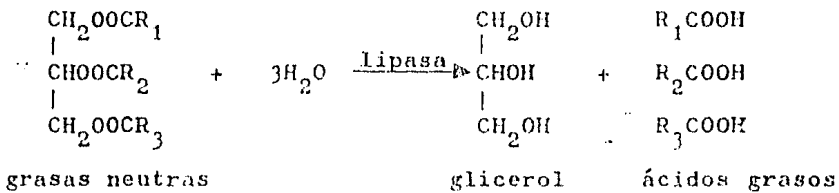


La prueba para detectar la producción de lecitinasa usualmente se realiza inoculando el microorganismo en estudio en un medio sólido al que se ha incorporado yema de huevo como fuente de lecitina; después de la incubación correspondiente, la presencia de una zona clara alrededor de las colonias desarrolladas indica que el microorganismo es capaz de producir esta enzima. Se ha propuesto que el mecanismo que ocasiona el aclaramiento de la zona circundante a la colonia se debe a la combinación de tres factores:

- (a) La insolubilidad del diglicérido formado, una vez hidrolizada la lecitina.
- (b) Las grasas liberadas a partir de la yema de huevo, después de ocurrida la hidrólisis.
- (c) Las proteínas no hidrosolubles de la yema de huevo (vitelina y vitelenina), que precipitan con las grasas libres.

b.6.9. PRODUCCION DE LIPASA.

La hidrólisis de las grasas es una prueba que permite investigar la actividad lipolítica de algunas especies microbianas; su fundamento radica en la capacidad que poseen dichas especies para convertir las grasas -- neutras (triglicéridos) en glicerol y ácidos grasos, -- por acción de la enzima lipasa:

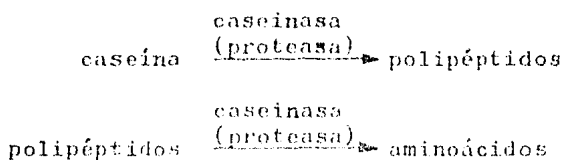


Para detectar la presencia de microorganismos lipolíticos, usualmente se emplean medios basales adicionales de material lipídico como aceite de algodón, aceite de olivo, gliceril-tributarato o yema de huevo. En ellos, la producción de la enzima se demostrará por la aparición de zonas claras alrededor de las colonias de

sarrolladas, así como por la presencia de un brillo perlado en aquellos medios que contengan yema de huevo como sustrato lipídico.

b.6.10. HIDROLISIS DE CASEINA.

Esta es una prueba que se basa en la capacidad que tienen algunos grupos bacterianos para degradar la caseína (componente proteico de la leche) por acción de enzimas proteolíticas:



El resultado de esta actividad proteolítica se detecta empleando medios de cultivo sólidos adicionados de caseína en forma de sal sódica (caseinato de sodio), o bien polvo de leche desnatada; en éstos, la hidrólisis de la proteína se pondrá de manifiesto por el aclaramiento que presente el medio de cultivo alrededor de las colonias de los microorganismos con esta propiedad.

(Para composición y preparación de los medios de cultivo empleados en las pruebas bioquímicas consultar Anexo I).

c. PRODUCTOS EXTRACELULARES.

c.1. PRODUCTOS EXTRACELULARES QUE ORIGINAN LA PATOGENICIDAD DE Clostridium difficile.

Estudios recientes sobre el particular, han sugerido que la patogenicidad de este microorganismo radica principalmente en su capacidad para producir dos potentes exotoxinas: toxina A (enterotoxina) y toxina B (citotoxina), que aunque poseen pesos moleculares similares difieren en cuanto a sus propiedades físicas, actividad biológica y especificidad antigénica (113,117).

Las principales fuentes de obtención de ambas toxinas son las evacuaciones de pacientes que padecen colitis pseudomembranosa, materia fecal de hamsters con ileocecititis inducida con antibióticos y cultivos puros de Clostridium difficile (25).

c.1.1. PURIFICACION DE LAS TOXINAS.

Los estudios correspondientes dieron inicio en 1979 con la purificación de la citotoxina. Entre los primeros intentos para lograr la purificación de la citotoxina, destacan los trabajos realizados por Taylor y Bartlett (114) quienes, empleando un esquema de purificación que involucraba procedimientos de ultrafiltración, precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, filtración en gel y

cromatografía de intercambio iónico, estimaron que el peso molecular de esta toxina era de 240,000 daltons.

De igual manera, Rolfe y Finckold (100) intentaron la purificación del que hasta ese momento se consideraba como único agente etiológico de la colitis pseudomembranosa: la citotoxina elaborada por Clostridium difficile; para lograr su propósito usaron el mismo esquema de purificación que Taylor y Bartlett (114), pero obtuvieron un producto de peso molecular de 530,000 daltons.

Aswell y colaboradores (3), por su parte emplearon para la purificación de la citotoxina un esquema diferente que incluía la ultrafiltración, filtración en gel y precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; para estos investigadores, la citotoxina resultante tenía un peso molecular de 600,000 daltons.

Humphrey (55), también reportó la purificación de la citotoxina a partir de evacuaciones de hamsters con cecitis inducida con antibióticos; el esquema de purificación elegido en este caso, se integró por procedimientos de ultracentrifugación, ultrafiltración, precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y filtración en gel y el peso molecular estimado para el producto purificado fué de 107,000 daltons.

Durante 1980 y 1981, varios investigadores entre ellos Bartlett (13), Taylor (116,117) y Sullivan (113),

lograron la separación y purificación de una segunda toxina elaborada por Clostridium difficile: la toxina A; el esquema de separación y purificación incluyó los siguientes procedimientos: ultrafiltración, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico (con elución en gradiente de concentración) y precipitación con $(NH_4)_2SO_4$ y CH_3COOH . El peso molecular estimado para esta segunda toxina fué de 550,000 daltons.

c.1.2. PROPIEDADES DE LAS TOXINAS.

TOXINA A.

De esta toxina se conoce poco debido a que su hallazgo es prácticamente muy reciente; sin embargo, a la fecha se han logrado establecer las siguientes propiedades (113,117):

- a) Su peso molecular se estima entre 440,000 y 550,000 daltons.
- b) Es estable en un intervalo de temperatura entre -20° y $37^{\circ}C$ durante 4 semanas.
- c) Es termolábil; pierde un 99% de su actividad cuando se le expone a una temperatura de $56^{\circ}C$ durante 6 minutos.
- d) Es estable en rangos de pH entre 4 y 10.
- e) Es inactiva a pH de 2.
- f) Es inactivada cuando se trata con tripsina y quimo--

tripsina.

- g) Letalidad en ratones (16 h después de administrada la toxina por vía intraperitoneal): $LD_{50} = 0.01 \mu\text{g}$.
- n) Concentración mínima para causar cecitis en hamsters: $0.05 \mu\text{g}$.

TOXINA B.

Esta toxina ha sido más ampliamente estudiada; las propiedades que de ella se conocen se enumeran a continuación (27, 100, 113, 117):

- a) Su peso molecular se estimó entre 240,000 y 530,000 daltons (de acuerdo al esquema de purificación empleado).
- b) No pierde su actividad cuando se mantiene a una temperatura de -70°C ; a temperatura ambiente ($20-25^{\circ}\text{C}$) y a 37°C pierde gradualmente su actividad en lapsos de 4 semanas y 10 días respectivamente (Figura 2.1).

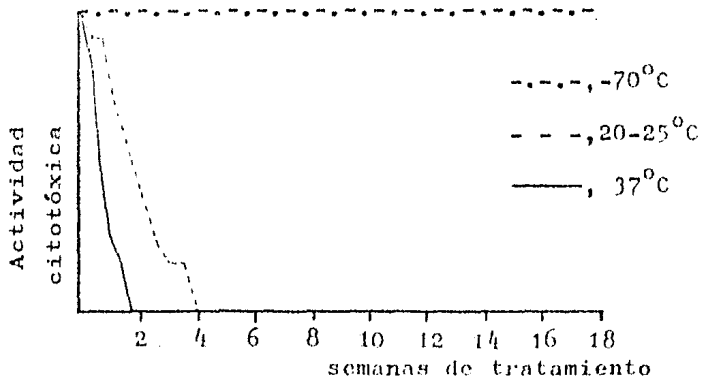


Figura 2.1.- Efecto de diferentes temperaturas en la actividad de la citotoxina.

- c) Es termolábil; se inactiva cuando se expone a 50°C durante 30 minutos, o bien a 100°C durante 1 minuto.
- d) Es inestable a valores de pH extremos (4 y 9) y estable a pH neutro.
- e) Tiene un punto isoeléctrico de 5.0
- f) Se inactiva cuando se le trata con tripsina, quimotripsina y amilasa y no se ve afectada cuando se trata con lipasa. Estos resultados sugieren que su naturaleza química es glicoproteica.
- g) No posee actividad de DNasa, RNasa, fosfolipasa A₂, fosfolipasa C, gelatinasa, caseinasa, acetilcolinesterasa, neuraminidasa, hialuronidasa y collagenasa.
- h) Al ser tratada con compuestos organomercuriales, por ejemplo etilmercurisalicilato, o gluconato ferroso, FeSO₄, Mg(OH)₂ y Al(OH)₃ se inactiva; esto se debe, principalmente, a que en el enlace entre estas sustancias y la toxina participan los grupos sulfhidrilo de esta última. La inactivación puede preverse -- adicionando cisteína, puesto que con ello la reacción se verificará con los grupos sulfhidrilo de la cisteína y escasamente con los de la toxina.
- i) Letalidad en ratones (16 h después de administrada -- la toxina por vía intraperitoneal): LD₅₀ = 4.4 µg.
- j) Concentración mínima para causar cecitis en hamsters: 125.0 µg.

2.1.3. REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES PARA LA PRODUCCION DE LA CITOTOXINA.

Se han investigado varios medios de cultivo con el fin de determinar aquellos que por su composición, estimulan una mayor producción de la citotoxina; los resultados obtenidos indican que es necesaria la presencia de péptidos de bajo peso molecular para su producción. Asimismo, se ha observado que la omisión de glucosa y de vitaminas del complejo B en los medios de cultivo, reduce entre dos y cuatro veces la cantidad de toxina producida (100).

Entre los medios de cultivo de los que se han reportado los mejores resultados, se cuentan los caldos - infusión cerebro corazón y glucosa carne cocida, así como un medio sintético ideado por VareL y Bryant adicionado de peptonas (Tabla 2.6); no obstante que los tres aportan buenas condiciones para la producción de la citotoxina, el más utilizado es el caldo infusión cerebro corazón, por el hecho de ser el menos complejo y más accesible (3,100,122).

Tabla 2.6.- Producción de la citotoxina de Clostridium difficile en diferentes medios de cultivo.

Medio		Título de citotoxina ^a
Glucosa carne cocida		8192*
Peptona proteosa #3 + extracto de levadura		1024
Peptona proteosa #3 + glucosa + extracto de levadura		4096
Infusión cerebro corazón		8192*
Tioglicolato		2048
Tioglicolato + glucosa		4096
Medio de Varel y Bryant - adiciona- do de:	mezcla de aminoácidos	ND ^b
	1% de peptona phytone	1024
	1% de extracto de levadura	2048
	1% de hidrolisado de caseína	1024
	1% de bacto-triptona	1024
	1% de bacto-peptona	1024
	0.5% de peptona proteosa #3	512
	1% de peptona proteosa #3	2048
	2% de peptona proteosa #3	4096
	3% de peptona proteosa #3	8192*
	5% de peptona proteosa #3	4096

a Título de citotoxina: recíproco de la máxima dilución de toxina que causa una alteración completa en la morfología de un cultivo de células amnióticas humanas.

b No se detectó actividad citotóxica.

* Medios de cultivo en los que es mayor la producción de citotoxina.

c.1.4. EFECTOS CITOPATICOS DE LA CITOTOXINA DE Clostridium difficile.

El descubrimiento de los efectos citopáticos en -- cultivo de tejidos es probablemente el hallazgo más importante en lo que toca al reconocimiento y caracterización de la citotoxina producida por Clostridium difficile. Curiosamente, la detección de estos efectos se llevó a cabo por primera vez en un laboratorio de Virología a principios de 1977 (61), cuando se sometieron -- muestras fecales de pacientes con colitis pseudomembranosa (confirmada por sigmoidoscopia) a métodos rutinarios para el aislamiento de enterovirus (debido a que -- se obtuvieron resultados negativos tanto de cultivos fecales como para el hallazgo de parásitos). Se observó -- que la inoculación de cultivos celulares con diluciones crecientes de suspensiones fecales de estos pacientes ocasionaba una disminución en la actividad citopática; por lo tanto, se propuso como explicación alternativa la presencia de una toxina como la responsable de -- los cambios observados en los cultivos celulares empleados.

Una vez que se estableció que la toxina que causaba los fenómenos citopáticos era producida por Clostridium difficile (9,12,45,46,62,63,88,98), Chang y colaboradores (32) estudiaron detalladamente estos efectos em

pleando para ello cultivos de células amnióticas humanas; éstos fueron inoculados con citotoxina obtenida de evacuaciones de hamsters (previamente tratados con clindamicina) e incubados por lapsos de 1,2,3,4,5,24 y 48 horas. Las primeras alteraciones en la morfología celular se detectaron al cabo de 3 horas de incubación alcanzando su máximo después de 48 horas de tratamiento con la citotoxina; se observó que para entonces las células se habían redondeado y separado de la superficie a la que estaban adheridas.

El análisis efectuado con ayuda del microscopio electrónico reveló que las células presentaban marcados cambios en la superficie de las mismas, que incluía la formación de "microcordilleras" o cadenas globulares que condujeron a la retracción de la membrana celular y, finalmente, a la lisis de la célula. La citada degeneración citolítica se observó aproximadamente una hora después de que se habían expuesto las células a la acción de la toxina, debido probablemente a que la toxina provoca la modificación de la membrana celular (principal efecto lesivo que se le reconoce a esta toxina).

A partir de estos hallazgos, se ha dado paso a la investigación de las bases químicas que generan la interacción entre la citotoxina y la membrana celular. En los trabajos que se han desarrollado al respecto, se em

de los eritrocitos humanos (ya que se encontró que la citotoxina se une firmemente a la membrana de estas células) y, además, diferentes compuestos químicos a los cuales se analiza su capacidad para impedir el enlace toxina-membrana celular y, consecuentemente, deducir la naturaleza química del sitio receptor de la toxina B en la célula huésped.

Los resultados obtenidos en tales investigaciones indican que entre los compuestos que no inhiben la unión toxina-membrana se encuentran: glucosa, ribosa, arabinosa, manosa, galactosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, N-acetilmanosamina, ácido N-acetilneuramínico, lactosa, sacarosa, lactulosa, neuraminidasa, saponina y amantadina y, por otra parte, los que sí interfieren en el establecimiento del enlace son los esteroides y los ácidos biliares; entre los primeros figuran el colesterol, coprosterol, sitosterol y, entre los ácidos biliares, los ácidos desoxicólico, cólico, quenodesoxicólico y litocólico (Tabla 2.7). Estos datos sugieren que el receptor celular es posiblemente de origen lipídico (29).

Tabla 2.7.- Concentración mínima de esteroides y ácidos biliares que inhibe la unión toxina-membrana.

Compuesto	MIC (mM)
Colesterol	0.25
Coprosterol	0.25
Sitosterol	0.12
Ac. desoxicólico	0.03
Ac. cólico	0.06
Ac. quenodesoxicólico	0.03
Ac. litocólico	0.006

c.1.5. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS TOXINAS.

La actividad biológica de las toxinas se ha investigado empleando diferentes animales de experimentación; las pruebas efectuadas en conejos, muestran que la toxina A produce una respuesta positiva cuando se aplica a segmentos de íleon (asa ligada), mientras que la B no produce alteración alguna, aún cuando la cantidad de toxina empleada sea más alta que la que se ha logrado determinar en humanos y animales que padecen colitis pseudomembranosa e ileocectitis, respectivamente. La respuesta positiva consiste en la acumulación de un fluido viscoso hemorrágico en los segmentos de intestino inyectados con la toxina A, que se detecta por el crecimiento

del asa ligada (Tabla 2.8) (68).

Tabla 2.8.- Respuesta obtenida al efectuar la inyección de toxinas A y B de Clostridium difficile en asa ligada de conejo.

Muestra	Relación Volumen/longitud (ml/cm) ^a
Toxina A	1.71 ± 0.42
Toxina B	0.44 ± 0.22
Control positivo ^b	1.44 ± 0.11
Control negativo ^c	0.03 ± 0.03

a Relación entre el volumen de fluido acumulado y la -- longitud del segmento intestinal ensayado, en un tiempo determinado. Se considera como respuesta positiva aquella cuyo cociente sea mayor de 1.0

b Control positivo: toxina de Vibrio cholerae.

c Control negativo: solución salina amortiguada con fosfatos (pH=7.4)

Por otra parte, cuando cualquiera de las toxinas -- se administra intradérmicamente a conejos, aparecen lesiones eritematosas y/o hemorrágicas en la zona de inoculación y, al mismo tiempo se observa un incremento en la permeabilidad vascular; este último efecto se logra detectar mediante la inyección intravenosa de un colorante (azul de Evans), transcurridas 18 horas de la inoculación intradérmica de las toxinas; ya que el paso de

dicho colorante a través de las paredes vasculares con permeabilidad aumentada permite evaluar el daño causado de acuerdo al diámetro de la zona que aparece teñida. Los resultados de estas pruebas mostraron que ambas respuestas son más severas cuando se emplea la toxina A - (Figura 2.2) (68).

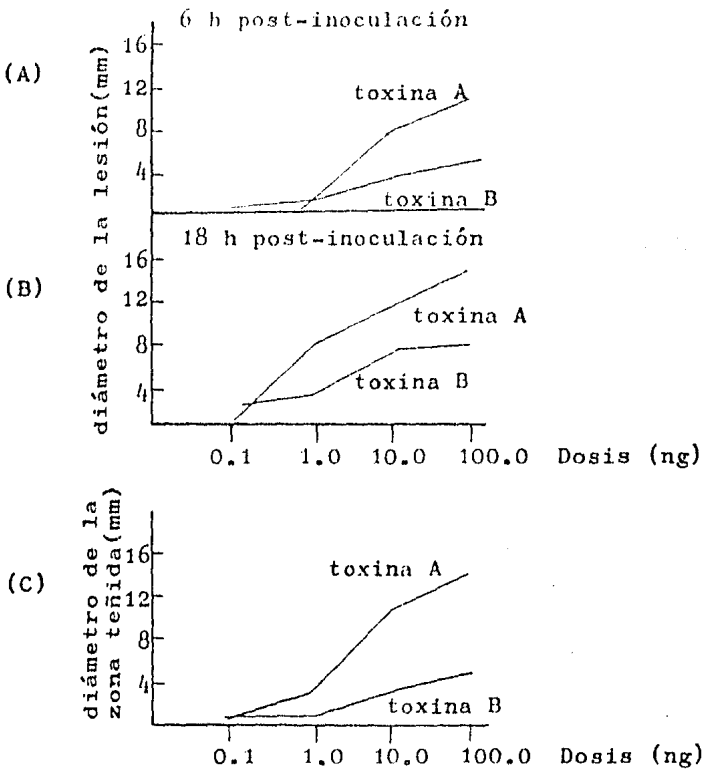


Figura 2.2.- Respuestas obtenidas tras la aplicación de las toxinas A y B. Las gráficas (A) y (B) corresponden a la producción de lesiones eritematosas y/o hemorrágicas y la (C) al incremento en la permeabilidad vascular.

Conforme a los resultados observados en las gráficas se pensaría que la toxina B es menos lesiva que la A, lo cual no coincide con lo establecido, en cuanto a que la toxina B es 1,000 veces más citotóxica que la A (113); posiblemente la explicación de este hecho radica en la mayor susceptibilidad de las células subcutáneas a la acción de la toxina A y no de la B.

Por lo que se refiere a la utilización de ratones recién nacidos, se ha observado que cuando se les administra intragástricamente toxina A se produce una respuesta positiva que consiste en una gran acumulación de fluidos; sin embargo, al serles aplicada la toxina B -- por la misma vía no se obtiene ninguna alteración significativa en cuanto a acumulación de fluidos, pero en -- cambio desencadena la formación de lesiones hemorrágicas severas que resultan letales para estos animales -- (68).

Estudios análogos a los antes referidos se han realizado en hamsters (67) y los resultados obtenidos demuestran que al serles aplicada la toxina A intracecalmente, el tamaño del ciego alcanza el doble de lo normal y cuando se les administra la B, el ciego no sufre alteraciones.

Además de este efecto, se detectó que el ciego de los animales inyectados con toxina A se presentaba mode

radamente hemorrágico y con acumulación de líquidos, en tanto que los tratados con toxina B sólo se mostraban severamente hemorrágicos.

Desde el punto de vista histológico, los estudios correspondientes muestran que, en ambos casos (con toxina A y B), la lesión predominante es la necrosis multifocal del epitelio superficial de la mucosa intestinal con extensión hacia la submucosa (67).

Todas las observaciones citadas sugieren que la capacidad de la toxina A para producir tales respuestas en los animales estudiados, la hacen muy probablemente la principal responsable de los cuadros diarreicos observados en la colitis pseudomembranosa y, que ambas (tanto la A como la B) podrían estar asociadas (en mayor o menor grado) con los daños causados al epitelio colónico.

c.1.6. MECANISMO DE ACCION DE LAS TOXINAS.

Hasta el momento es poco lo que se conoce acerca del mecanismo de acción de cada una de las toxinas producidas por Clostridium difficile.

Investigaciones recientes realizadas por Hughes (54) demuestran que el extracto crudo de ambas toxinas mezcladas estimula la secreción de cloruros y reduce la absorción de sodio a través de la mucosa intestinal; esta alteración en el transporte iónico se ve suprimida -

cuando se elimina el calcio del medio.

Por otra parte, se ha logrado establecer que las - toxinas no tienen influencia sobre la actividad de la - adenilato ciclasa y, consecuentemente, tampoco incremen- tan la cantidad de AMP cíclico intracelular (34,54).

Lo que hasta ahora se acepta, es que una o ambas - toxinas activan primero un proceso secretorio antes de ejercer un daño al epitelio colónico; esta hipótesis -- puede explicar el cuadro clínico que aparece frecuente- mente en la colitis pseudomembranosa; es decir, primero la aparición de cuadros diarreicos y, posteriormente, - la presencia de graves lesiones hemorrágicas en el co- lon.

c.2. PRODUCTOS EXTRACELULARES QUE AYUDAN A LA IDENTIFI- CACION DE Clostridium difficile.

Los productos extracelulares que actualmente se -- consideran útiles en la detección e identificación de - Clostridium difficile, son primordialmente el p-cresol y el ácido caproico, puesto que se ha demostrado que su producción es una característica común de las cepas de este microorganismo (85,91,93).

En el año de 1976, Elsdén y colaboradores (38) re- portaron que Clostridium difficile elabora p-cresol co- mo producto final del metabolismo de la tirosina; poste-

riormente, Phillips y Rogers (91), basándose en esta observación, diseñaron un método que permite una identificación rápida de Clostridium difficile. Este método se basa en el uso de un medio de cultivo selectivo (consultar Anexo I) adicionado de ácido p-hidroxifenilacético (precursor del p-cresol), que permite el desarrollo del microorganismo y la producción de p-cresol; este último compuesto es después identificado por medio de cromatografía gas-líquido (Figura 2.3) (Consultar Anexo II).

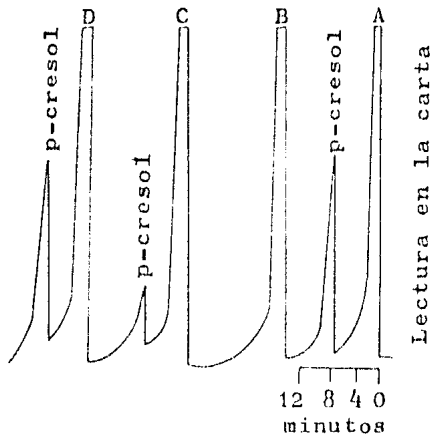


Figura 2.3.- Cromatograma de:

- A: solución estándar de p-cresol ($10 \mu\text{mol/l}$).
- B: medio de cultivo estéril.
- C: producción de p-cresol por Clostridium difficile después de 24 horas de incubación.
- D: producción de p-cresol por Clostridium difficile después de 48 horas de incubación.

Nunez-Montiel y colaboradores (85), basándose en estudios preliminares (77), desarrollaron un nuevo medio de cultivo (caldo NT) que por su composición (consultar Anexo I) favorece la producción no sólo de p-cresol, sino también de ácido caproico por el microorganismo; esto ha facilitado la identificación de Clostridium difficile en base a la detección de estos productos. Cabe señalar que no existe otra especie del género Clostridium que sea capaz de producir ambos productos a la vez en dicho medio, por lo que el empleo de éste resulta de gran valor en la caracterización del microorganismo (85).

El método de elección para demostrar la presencia de p-cresol y ácido caproico, comprende su extracción de los cultivos, ya sea con éter o cloroformo y el posterior análisis de los extractos mediante cromatografía gas-líquido (consultar Anexo II).

Además de los productos mencionados, existen cepas de Clostridium difficile que son capaces de producir una serie de ácidos orgánicos (uno, dos o todos a la vez), cuyo análisis cromatográfico puede ser de utilidad en la identificación del microorganismo; entre éstos, se incluyen los ácidos acético, butírico, isobutírico, isocaproico, propiónico y valérico (85,93).

1. RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS.

Durante los tres últimos años, la lista de antibióticos asociados a la colitis pseudomembranosa se ha incrementado considerablemente; sin embargo, los antibióticos más frecuentemente involucrados son: clindamicina, lincomicina, penicilina G, ampicilina, oxacilina, flucloxacilina, cefalosporinas, tetraciclina, eritromicina, rifampicina y metronidazol (8,36,47).

A continuación se mencionan algunos resultados obtenidos por diferentes investigadores encargados de analizar la susceptibilidad de Clostridium difficile a los antimicrobianos.

CLINDAMICINA Y LINCOMICINA.

George y colaboradores (47), realizaron pruebas in vitro de la sensibilidad de Clostridium difficile a estos medicamentos y los resultados obtenidos mostraron que el 13% de las cepas aisladas a partir de pacientes que padecen colitis pseudomembranosa son resistentes: - la concentración mínima inhibitoria establecida es de - 1,024 $\mu\text{g/ml}$.

La resistencia observada sugiere que la enfermedad puede tener origen, tanto en humanos como en animales - de laboratorio cuando les son administrados estos antibióticos en dosis que no alcancen la concentración men-

cionada en el intestino. Se ha demostrado que cuando se administran clindamicina y lincomicina por vía oral, -- los niveles fecales son: 125 a 448 y 900 $\mu\text{g/g}$ de heces respectivamente, concentraciones que se encuentran por abajo de la considerada como mínima inhibitoria para -- las cepas resistentes de este microorganismo (10,47,50).

PENICILINAS.

No obstante que Dzink (36), George (47) y Shuttleworth (107) han reportado que la mayoría de las cepas - de Clostridium difficile (80-90%) aisladas de pacientes con colitis pseudomembranosa, son sensibles a concentraciones iguales o menores de $4 \mu\text{g/ml}$, tanto de penicilina G como de ampicilina, recientemente se han observado casos patológicos (8,36,76) asociados al uso no sólo de la misma penicilina G y de ampicilina, sino que, en general, de otros tipos de penicilina; entre estos últimos se incluyen: oxacilina, dicloxacilina, carbenicilina y flucloxacilina (24,43,76,87,104).

CEFALOSPORINAS.

Este grupo de antibióticos se encuentra asociado a un número reducido de casos de colitis pseudomembranosa; sin embargo, es importante hacer notar que Clostridium difficile ha resultado ser relativamente resistente a -

la mayoría de las cefalosporinas ensayadas in vitro (11, 47); en este grupo de antibióticos, se tienen datos de que la cefalotina (36,47), cefalexina (107) y cefoxitina (36,107) muestran capacidad tóxica contra este microorganismo a concentraciones de 64 a 128 $\mu\text{g/ml}$, 128 a 256 $\mu\text{g/ml}$ y 64 a 128 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

TETRACICLINA.

Los resultados de los estudios realizados por Dzik (36) y Shuttleworth (107), muestran que el 87% de las cepas aisladas a partir de pacientes que padecen colitis pseudomembranosa son sensibles a concentraciones iguales o menores de 1 $\mu\text{g/ml}$.

En un trabajo efectuado por Nakamura y colaboradores (83), se encontró que existe cierta relación entre la sensibilidad que muestra Clostridium difficile a la tetraciclina y la toxigenicidad del mismo; los resultados obtenidos en esta investigación indicaron que 42 -- (70%) de 60 cepas sensibles a este medicamento (MIC \leq 1.56 $\mu\text{g/ml}$) mostraron ser altamente citotóxicas, mientras que sólo 1 (5%) de las 19 cepas resistentes (MIC = 100 $\mu\text{g/ml}$) resultó ser citotóxica en grado equivalente al observado en las cepas sensibles (Tabla 2.9).

Tabla 2.9.- Relación entre la citotoxicidad de Clostridium difficile y su susceptibilidad a la tetraciclina.

Susceptibilidad a la tetraciclina	No. de cepas	No. de cepas (%) que muestran citotoxicidad (CU/50 μ d) de:		
		0	64-512	1,024-16,384
Resistente	19	13(68)	5(26)	1 (5)
Sensible	60	11(18)	7(12)	42(70)

a Unidad citotóxica CU/50 μ d: recíproco de la máxima dilución de filtrado (toxina) que causa que las células BHK-21/WI-2 (cultivo de células de riñón de hamster recién nacido) adquieran forma redonda.

CLORAMFENICOL.

Los estudios realizados con este medicamento (36) han mostrado que el 72% de las cepas de Clostridium difficile obtenidas de pacientes que padecen colitis pseudomembranosa son inhibidas a una concentración de - - 1 μ g/ml, mientras que el 100% de las sometidas a la acción de este antibiótico resultaron ser sensibles a una concentración de 64 μ g/ml. Este antimicrobiano inicialmente se relacionó con el desarrollo de la colitis pseudomembranosa (5); sin embargo, hasta el momento no se han reportado casos en los que su uso sea patogénico.

ERITROMICINA.

Las pruebas de sensibilidad in vitro para este antibiótico, muestran que aproximadamente el 75% de las cepas aisladas de pacientes que sufren colitis pseudomembranosa es sensible a concentraciones iguales o menores de $2 \mu\text{g/ml}$, mientras que el 25% restante es resistente a una concentración de $1,024 \mu\text{g/ml}$ (36,44). No obstante que se ha determinado que cuando se administra eritromicina por vía oral se alcanzan niveles fecales que varían entre 500 y $2,700 \mu\text{g/g}$ de heces, se han reportado casos en los que la colitis pseudomembranosa se asocia a terapias previas con dicho antibiótico (44).

RIFAMPICINA.

Los ensayos realizados con este antibiótico mostraron que el 100% de las cepas de Clostridium difficile - obtenidas de pacientes afectados por colitis pseudomembranosa, son sensibles a concentraciones menores o iguales a $1 \mu\text{g/ml}$ (47,83); a pesar de este resultado ya se han reportado casos en los que el uso de este antibiótico ha inducido el desarrollo de la enfermedad (21,73).

BACITRACINA.

Para la bacitracina se ha reportado una sensibilidad del 90% de las cepas de Clostridium difficile aisladas

das de las evacuaciones de pacientes que sufren colitis pseudomembranosa; su concentración mínima inhibitoria oscila entre 32 y 64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (47).

METRONIDAZOL.

Los estudios de sensibilidad in vitro para este medicamento, indican que el 99% de las cepas de Clostridium difficile son sensibles a concentraciones iguales o menores a 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (36,47,107). Este medicamento inicialmente resultó efectivo en el tratamiento de la colitis pseudomembranosa (18,90); sin embargo, reportes recientes han mostrado que el metronidazol puede también asociarse a casos de la enfermedad (92,105,120).

VANCOMICINA.

Los resultados de las pruebas realizadas in vitro, indican que Clostridium difficile es altamente sensible a este antibiótico, observándose que el 100% de las cepas estudiadas son sensibles a concentraciones no mayores de 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (47,83,107). También hay que hacer notar que el nivel fecal que se alcanza cuando se administra por vía oral este antibiótico, es de 3,100 $\mu\text{g}/\text{g}$ de heces; valor que es 775 veces mayor que la máxima concentración a la cual se inhibe el desarrollo del microorganismo (47). Por tal razón y debido a los resultados ob-

servados in vivo (tanto en humanos como en animales de experimentación), se ha elegido a la vancomicina como el medicamento apropiado para el tratamiento de la colitis pseudomembranosa (47,107).

e. CONSTITUCION ANTIGENICA.

Los resultados de los estudios enfocados a la investigación de la estructura antigénica de Clostridium difficile, muestran que este microorganismo posee dos carbohidratos que le confieren especificidad inmunológica (94,96); uno de ellos ha sido extraído de la pared celular empleando NaOH 0.5 M y su análisis químico muestra que está constituido por glucosa, manosa, galactosamina y fósforo en proporción molar 2 : 0.65 : 1 : 0.63, respectivamente; pero como se ha observado que aún eliminando el fósforo de este polímero (mediante tratamiento enzimático), sus propiedades antigénicas no se ven alteradas, se piensa que este elemento no forma parte de dicha determinante antigénica.

El otro antígeno, se logró extraer de la membrana celular mediante el uso de fenol al 80%; los resultados del análisis químico correspondiente, establecieron la siguiente composición: glucosa, glucosamina, fosfatos y ácidos grasos en proporción molar 2 : 1 : 1.6 : 0.04, respectivamente. El tratamiento de este segundo antige-

no con una solución alcalina (pH 11.5) libera la porción de ácidos grasos, observándose que la fracción restante se comporta inmunológicamente igual que la estructura completa extraída de la pared celular.

Los mismos estudios redituaron el conocimiento de que ambos carbohidratos, tanto el presente en la pared celular como el extraído de la membrana citoplásmica, reaccionan cuando se les pone en contacto con suero anti-Clostridium sordellii; esto sugiere que Clostridium difficile y Clostridium sordellii comparten determinantes antigénicas y que la elaboración de un sistema serológico específico para la detección de Clostridium difficile supondría la inclusión de sueros adsorbidos con los antígenos de Clostridium sordellii (94,96).

f. INMUNIDAD.

La inmunidad que se observa en la colitis pseudomembranosa es primordialmente de tipo antitóxico y no antibacteriano; experimentos realizados en hamsters (67) han demostrado que la inmunización activa de estos animales con toxoide A o bien con toxoide B, provoca la producción de altos títulos de anticuerpos contra la toxina correspondiente (Tabla 2.10).

Tabla 2.10.- Título de anticuerpos de hamsters inmunizados con toxoide A y B.

Título contra	Título de anticuerpos ^a de los hamsters inmunizados con:	
	Toxoide A	Toxoide B
Toxina A	10,240 - 20,480	N ^b
Toxina B	N	20,480

a Título expresado como el recíproco de la máxima dilución de suero que neutraliza la actividad citotóxica de la toxina correspondiente en un cultivo de células CHO-K1 (células ováricas de hamster chino).

b No se detectó neutralización de la actividad citotóxica de la toxina correspondiente.

Sin embargo, se ha observado (67) que no obstante que los animales hayan sido previamente inmunizados (in distintamente con cualquiera de los toxoides: A o B) no existe protección alguna, ya que si se les administra clindamicina no se reduce la severidad de los daños que ésta induce en el ciego de dichos animales; este hecho hace suponer que una protección efectiva implicaría la inmunización de los animales con un toxoide preparado con ambas toxinas (toxoides AB). Estudios realizados al respecto (67), han mostrado que hamsters inmunizados con toxoide AB quedan completamente protegidos de las consecuencias letales que ocasiona la presencia de am--

bas toxinas.

Asimismo, se ha practicado la inmunización pasiva de ratones con las antitoxinas correspondientes y, en tal caso, los resultados obtenidos muestran que los ratones inmunizados con antitoxina A quedan protegidos -- tan sólo contra la actividad de la toxina A pero no -- frente a la acción lesiva de la toxina B y viceversa, -- demostrándose con ello que ambas toxinas son antigénicamente diferentes (66).

Por lo que toca a la respuesta inmunológica observada en pacientes con colitis pseudomembranosa, estudios recientes (2,123), han demostrado la presencia de anticuerpos contra ambas toxinas, aunque en los casos -- agudos de la enfermedad el paciente posee un título mayor de anticuerpos contra la toxina B que contra la A. Además, se detectó que durante el período de convalecencia no sólo persiste el predominio de los anticuerpos -- contra la toxina B, sino que su título se incrementa -- cuatro veces o más con respecto al determinado en las -- fases iniciales del padecimiento. Aronsson y colaboradores (2) sugieren que el hallazgo de títulos menores de anticuerpos frente a la toxina A podría atribuirse a -- una menor producción de toxina A, a una baja absorción de la misma a través del intestino, o bien a que la toxina A posee una inmunogenicidad inferior a la de la B.

Es importante hacer notar, que aún no se ha establecido si los anticuerpos formados desempeñan un papel importante en la protección contra posibles reinfecciones.

III. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

El diagnóstico de la colitis pseudomembranosa en el laboratorio requiere de estudios histológicos y bacteriológicos; los primeros están encaminados a poner de manifiesto las lesiones características de la enfermedad mediante el empleo de la proctosigmoidoscopia y, los segundos, se enfocan esencialmente a la detección de Clostridium difficile y/o de sus toxinas en las evacuaciones del paciente.

a. DIAGNOSTICO HISTOLOGICO..

En general, las lesiones que se presentan en la colitis pseudomembranosa muestran las siguientes características:

- Macroscópicamente, se observan como múltiples placas (pseudomembranas) grises, blancas o amarillentas de 2 a 5 cm de diámetro, adheridas a la mucosa del colon; en etapas avanzadas de la enfermedad, dichas placas pueden llegar a unirse y cubrir grandes regiones del intestino grueso (5,74).

- Microscópicamente, exhiben una variedad de cambios que, de acuerdo con la severidad del padecimiento, se han clasificado dentro de tres grupos (97):

1. El primero comprende aquellas lesiones que se -

presentan al principio de la enfermedad y consiste en necrosis focal del epitelio intestinal, con la presencia de un pequeño exudado en la lámina propia.

2. El segundo se caracteriza por la destrucción de glándulas propias de la mucosa y la sustitución de éstas por pseudomembranas compuestas por fibrina, mucina y leucocitos polimorfonucleares.

3. En el tercero (la forma más avanzada de la enfermedad), los cambios que se observan son más severos; existe necrosis estructural completa de la lámina propia y la presencia de una pseudomembrana firmemente unida.

En ningún tipo de lesión se han encontrado evidencias de invasión bacteriana de la mucosa intestinal ni se ha detectado la presencia de estructura microbiana alguna en las pseudomembranas (74).

b. DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO.

b.1. METODOS PARA LA DETECCION DE Clostridium difficile EN MUESTRAS FECALES.

b.1.1. CULTIVO.

El método más práctico para aislar a Clostridium -

difficile a partir de las evacuaciones de los pacientes afectados, es aquél en el que dichas muestras se inoculan directamente en los medios de cultivo selectivos antes mencionados (CFA, CCFA y TCCFA); la incubación se lleva a cabo en condiciones de anaerobiosis, a 37°C y durante 48 horas (74). La identificación posterior del microorganismo se realiza considerando las características bioquímicas y/o serológicas mencionadas en el capítulo anterior (Figura 3.1).

Por otro lado, se ha propuesto el uso de etanol absoluto como agente selectivo en el aislamiento de Clostridium difficile a partir de materia fecal (19,130); dentro de esta metodología, en lugar de los medios de cultivo selectivos antes citados se utiliza agar infusión cerebro corazón adicionado de hemina, vitamina K₁, cisteína y sangre desfibrinada de caballo (19). En este caso, el paso inicial consiste en mezclar diluciones de la muestra fecal con etanol absoluto (esterilizado por tindalización) a una concentración final del 50%, y dejar reposar durante 1 hora a temperatura ambiente; posterior a este tratamiento, la muestra se inocula en el medio de cultivo y se procesa bajo las condiciones de incubación ya señaladas (19). (Para detalles en la metodología consultar Anexo II).

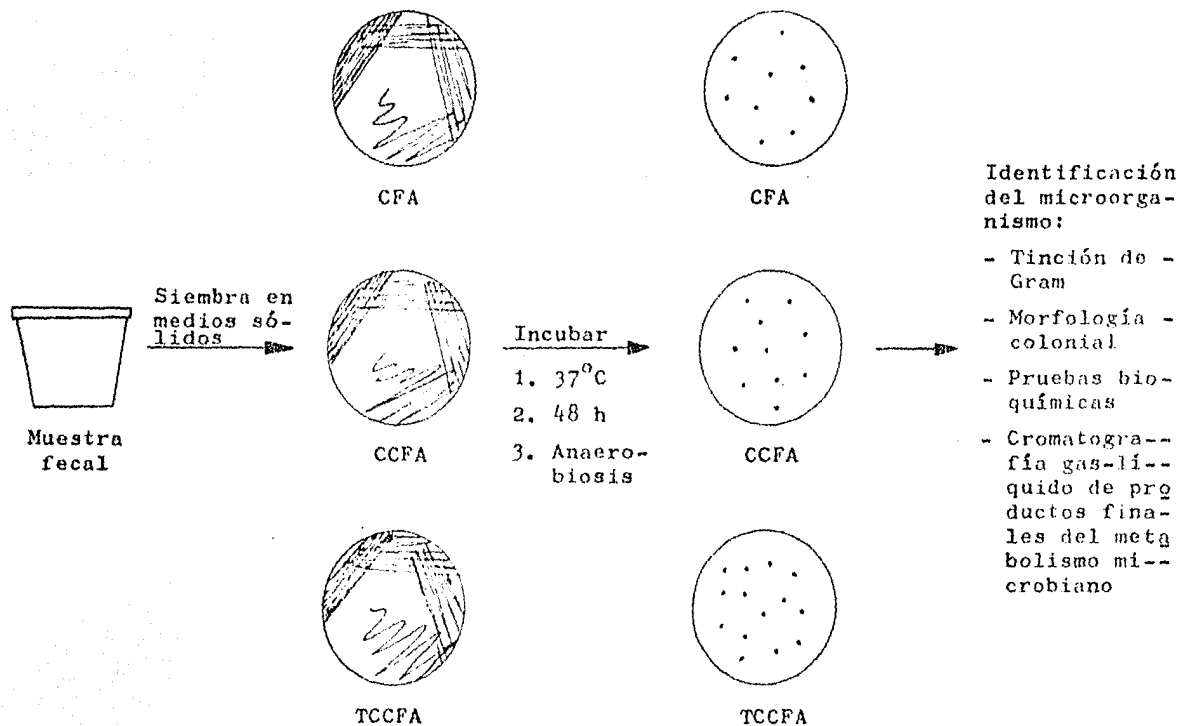


Figura 3.1.- Método de aislamiento e identificación de Clostridium difficile a partir de muestras fecales.

b.1.2. INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA.

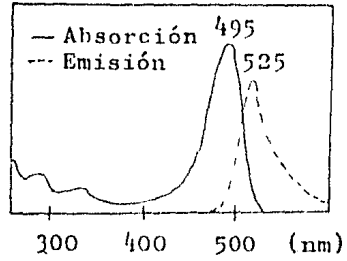
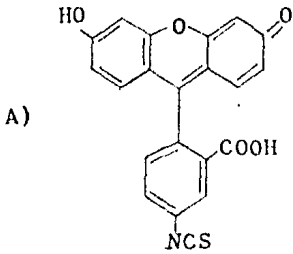
El fundamento básico del que dependen las técnicas que emplean anticuerpos fluorescentes, es la especificidad de la combinación del antígeno con el anticuerpo correspondiente y de las propiedades fisicoquímicas especiales de ciertos colorantes conocidos como fluorocromos; estos últimos tienen la capacidad de absorber luz de pequeña longitud de onda y emitir instantáneamente una luz de longitud de onda mayor. Los fluorocromos que habitualmente se emplean para marcar (conjugarse) anticuerpos son fluoresceína y rodamina (generalmente bajo la forma de isotiocianatos), produciendo una fluorescencia amarillo verdosa y rojo naranja respectivamente (Figura 3.2); no obstante que ambos ofrecen buenos resultados, el isotiocianato de fluoresceína tiene dos ventajas importantes sobre la rodamina: (a) el ojo humano es más sensible a la fluorescencia amarillo verdosa y (b) es más común observar autofluorescencia de tono rojizo que amarillo verdosa.

La elección de la técnica depende en gran parte de la información que se desea obtener; en general, se usa la técnica directa para identificar un antígeno desconocido y la indirecta cuando se intenta la detección de anticuerpos.

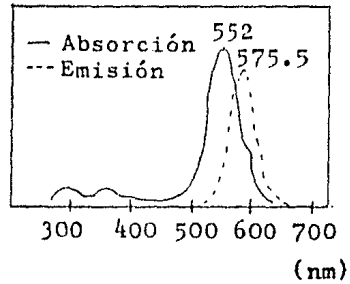
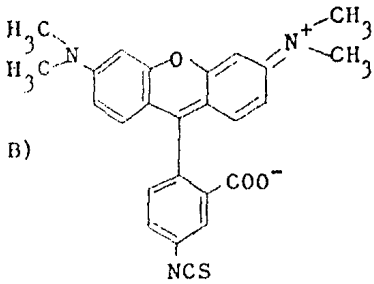
Para efectuar la técnica directa (Figura 3.3), las

extensiones del material problema se cubren con el anticuerpo específico marcado con fluoresceína y se deja -- que reaccione con el antígeno en cuestión; transcurrido el tiempo apropiado, el anticuerpo que no se combinó se elimina mediante lavados y, posteriormente, se procede a examinar la preparación al microscopio de luz UV para determinar la presencia o ausencia del antígeno correspondiente.

La técnica indirecta (Figura 3.4) se realiza en -- dos etapas: en la primera se hace reaccionar el antígeno con su anticuerpo y, en la segunda, se adiciona un -- segundo anticuerpo, una antigammaglobulina marcada con fluoresceína, que permitirá visualizar la reacción antígeno-anticuerpo inicial y, con ello, detectar la presencia del antígeno o anticuerpo en estudio.



Isotiocianato de fluoresceína



Isotiocianato de tetrametilrodamina

Figura 3.2.- Espectros de absorción y emisión:

- A) Isotiocianato de fluoresceína conjugado.
- B) Isotiocianato de tetrametilrodamina con jugado.

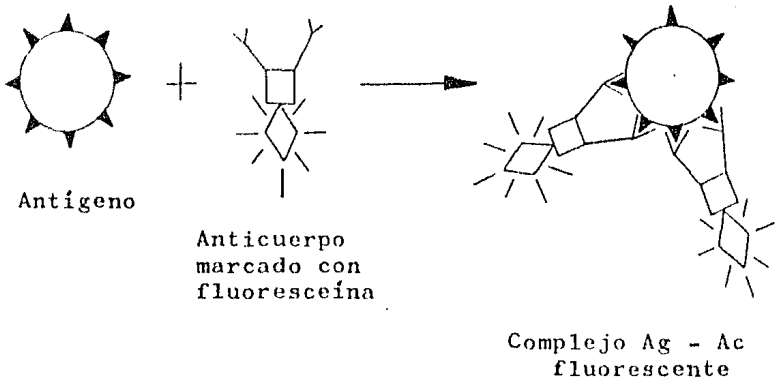
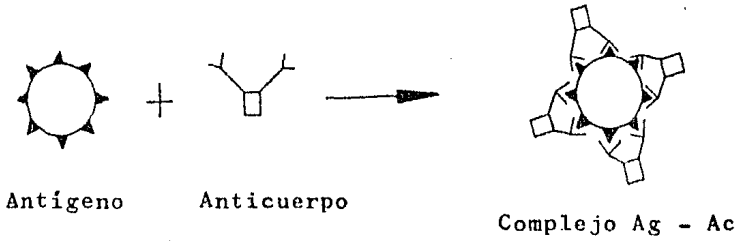


Figura 3.3.- Inmunofluorescencia directa.

Primera etapa:



Segunda etapa:

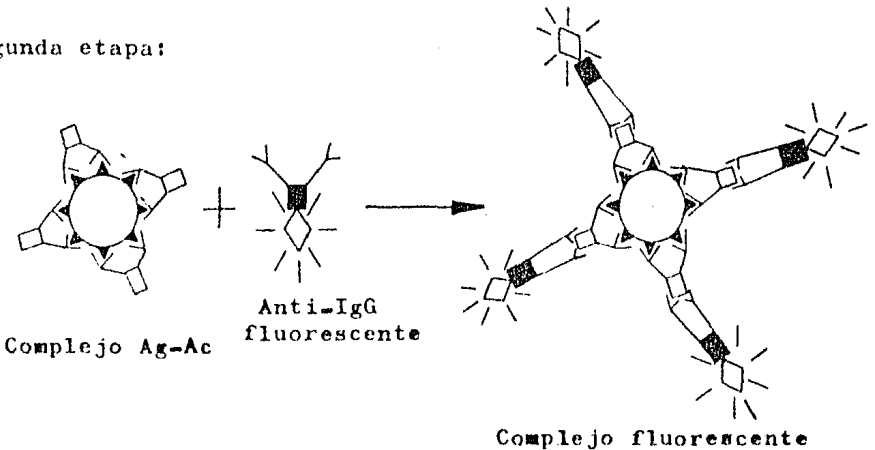


Figura 3.4.- Inmunofluorescencia indirecta.

Wilson y colaboradores (129) adaptaron la técnica directa para detectar a Clostridium difficile directamente en las evacuaciones del paciente; en este caso, - extensiones de las muestras fecales en estudio, previamente fijadas con etanol, se cubren con anticuerpos anti-Clostridium difficile marcados con isotiocianato de fluoresceína y al observar dichas preparaciones en el microscopio de luz UV se detectará fluorescencia sólo - si el microorganismo está presente en la muestra examinada. (Para detalles en la metodología consultar Anexo II).

Un total de 158 pacientes afectados fué investigado mediante esta técnica, cultivo y análisis de toxicidad en líneas celulares (129) y los resultados obtenidos revelaron una coincidencia del 93%, lo cual indica que el empleo de anticuerpos fluorescentes puede constituir un buen recurso para diagnosticar rápida y confiablemente la colitis pseudomembranosa en el laboratorio.

b.1.3. E L I S A.

Durante los últimos años el desarrollo de métodos inmunoenzimáticos ha permitido adaptarlos como instrumentos importantes en el diagnóstico de diversas enfermedades. Estos se basan en el empleo de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, cuya actividad catalítica sobre un sustrato específico, facilita la identifi

ficación y cuantificación del antígeno o anticuerpo en estudio. Las enzimas que generalmente se utilizan para este propósito son: fosfatasa alcalina y peroxidasa.

Dentro de los métodos que hacen uso de enzimas como marcadores se encuentra el denominado ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) que permite detectar diversos antígenos y anticuerpos.

PRINCIPIOS DE LAS VARIANTES DE ELISA COMUNMENTE EMPLEADAS EN EL DIAGNOSTICO:

a) DETECCION DE ANTIGENOS UTILIZANDO ANTIGENOS MARCADOS.

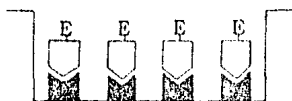
Las pruebas que utilizan esta variante se basan en la competencia que se establece entre un antígeno marcado y uno no marcado, por unirse a una cantidad limitada de anticuerpo. En este tipo de prueba, la primera operación que se realiza es el acoplamiento físico o químico de la cantidad apropiada de anticuerpo a una fase sólida (placas de poliestireno, polipropileno o polivinilo). Una vez adsorbido el anticuerpo, se adiciona separadamente pero de manera simultánea, el antígeno marcado con la enzima y una mezcla constituida por antígeno marcado y muestra en la que se sospecha que existe el antígeno en estudio; después de un período de incubación determinado y de que se ha efectuado el lavado correspondiente, se agrega el sustrato adecuado y, previa incubación, se mide la absorbancia del producto de la reacción enzimática tanto en las placas en donde sólo se --

adicionó antígeno marcado, como en aquellas en las que se colocó la mezcla. La concentración del antígeno en las muestras problema, se obtiene extrapolando en una curva patrón el valor de la diferencia de absorbancias determinadas en ambos casos (Figura 3.5).

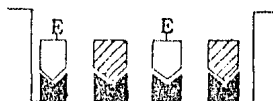
1. Adsorción del anticuerpo específico a la fase sólida.



2. Adición del antígeno marcado (2A) y del antígeno marcado + muestra problema (2B) en forma separada. Incubación.

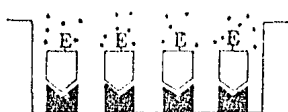


2A

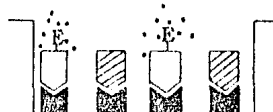


2B

3. Incubación, una vez adicionado el sustrato revelador y medición de la absorbancia del producto de reacción.



3A



3B

$$\text{Conc. del Ag en la muestra problema} = \text{Abs}_{3A} - \text{Abs}_{3B}$$

Figura 3.5.- ELISA competitivo para la detección de antígenos.

b) DETECCION DE ANTIGENOS UTILIZANDO ANTICUERPOS MARCADOS (METODO DEL DOBLE ANTICUERPO).

En esta prueba, el antígeno contenido en la muestra, reacciona con un exceso de anticuerpo adsorbido a la fase sólida, previa incubación; posteriormente, se lava adecuadamente y se adiciona un segundo anticuerpo dirigido contra el antígeno bajo investigación pero ahora marcado con la enzima y, a continuación (previo lavado), se agrega el sustrato específico para cuantificar el producto de reacción. En este caso, la concentración del producto de la reacción enzimática es directamente proporcional a la concentración del antígeno presente en la muestra problema (Figura 3.6).

1. Adsorción del anticuerpo específico a la fase sólida.



2. Incubación con la muestra problema.



3. Incubación con el segundo anticuerpo marcado con la enzima.



4. Incubación con el sustrato revelador.



Figura 3.6.- ELISA: método del doble anticuerpo para la detección de antígenos.

c) DETECCION DE ANTICUERPOS.

En el caso de que se efectúen investigaciones inversas para diagnosticar la enfermedad, el procedimiento que generalmente se emplea para la detección y cuantificación de anticuerpos es, en esencia, el siguiente: el antígeno, que es ahora la partícula acoplada a la fase sólida, es incubado con una dilución elevada del suero problema; después del lavado correspondiente, los anticuerpos unidos a la fase sólida (antígeno) se detectan incubando el complejo formado con un exceso de anti-gammaglobulina humana marcada con enzima. Una vez transcurrido el tiempo adecuado y efectuado el lavado correspondiente, se adiciona el sustrato indicado, el cual será convertido por la enzima para formar un producto de reacción colorido (Figura 3.7).

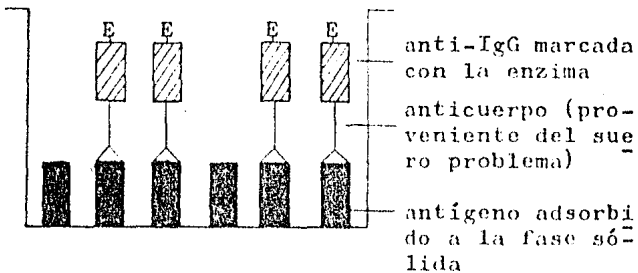


Figura 3.7.- Secuencia de unión antígeno-anticuerpo en la detección de anticuerpos por ELISA.

Yolken y colaboradores (132) adaptaron una de las variantes de ELISA para detectar Clostridium difficile en las evacuaciones de los pacientes afectados; éste emplea placas de poliestireno recubiertas de anticuerpos anti-Clostridium difficile, a las cuales se adiciona -- una suspensión de las evacuaciones problema (suspensión al 10% en solución salina amortiguada con fosfatos); -- tras un período de incubación, se lava y, a continuación, se adiciona un segundo anticuerpo contra Clostridium difficile preparado en cabras. La comprobación de que este último quedó unido revela que el microorganismo se encuentra en la materia fecal y, por tanto, que es el probable agente etiológico del padecimiento; para lograrlo, se agrega un tercer anticuerpo ahora anti--mmaglobulina de cabra marcada con fosfatasa alcalina -- (previa incubación y lavado) y p-nitrofenilfosfato como sustrato revelador (Figura 3.8).

Los resultados obtenidos al emplear este método -- han sido satisfactorios, pues el 100% de las muestras -- que resultaron positivas con éste, también lo fueron al ensayar su citotoxicidad en cultivo de tejidos. Estos -- datos muestran por lo tanto, que esta metodología ofrece otra alternativa para la detección rápida de Clostridium difficile directamente en las evacuaciones de los pacientes afectados (132).

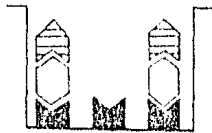
1. Adsorción del primer anticuerpo anti-Clostridium difficile (preparado en conejos) a la fase sólida.



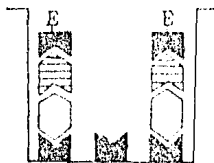
2. Incubación con la muestra problema -- (suspensión de las evacuaciones del paciente afectado).



3. Incubación con el segundo anticuerpo anti-Clostridium difficile (preparado en cabra).



4. Incubación con un tercer anticuerpo: antigammaglobulina de cabra marcada con la enzima (fosfatasa alcalina).



5. Adición del sustrato revelador (p-nitrofenilfosfato)

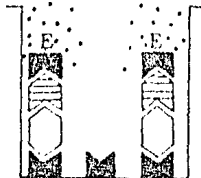


Figura 3.8.- Detección de Clostridium difficile mediante ELISA.

b.2. METODOS PARA LA DETECCION DE LAS TOXINAS PRODUCIDAS POR Clostridium difficile.

b.2.1. CITOTOXICIDAD EN CULTIVO DE TEJIDOS.

La detección de las toxinas producidas por Clostridium difficile empleando diferentes cultivos celulares, resulta un proceso no sólo considerablemente confiable, sino además muy sensible para el diagnóstico de la colitis pseudomembranosa (5,6,7,74): es posible detectar -- cantidades de hasta 500 ng de toxina/ml (69).

Para llevar a cabo esta técnica, es necesario efectuar la centrifugación de las muestras fecales por investigar (si éstas no son líquidas, se deberá preparar un extracto acuoso de las mismas); el sobrenadante así obtenido se mezcla con una serie de antibióticos (penicilina, estreptomycin, polimixina, neomicina, anfotericina B) para evitar contaminaciones posteriores, o bien, se filtra a través de una membrana con poro de 0.45μ de diámetro. Posteriormente, se inoculan alícuotas de estas preparaciones en el correspondiente cultivo celular y se incuban hasta observar algún cambio en la morfología de las células (5,74): el tiempo en el que aparecen los efectos citopáticos es inversamente proporcional a la cantidad de toxina presente. Cuando existen altas concentraciones de toxina, los cambios pueden apare

cer al final de la primera hora de incubación; en situación contraria se les podrá observar sólo después de 24 o 48 horas (27).

En cuanto a los tipos de células que se pueden emplear, se ha observado que la gran mayoría suele ser -- susceptible al efecto de ambas toxinas (35); entre los cultivos celulares que con mayor éxito se han utilizado se cuentan los constituidos por células amnióticas humanas, de riñón de hamster (BHK-21), HeLa, de riñón de conejo, fibroblastos pulmonares humanos (WI-38), de células de ovario de hamster chino (CHO), de hepatoma de rata (MHC) o de tumores adrenales de ratón (YI) (31,35). No obstante que en todos ellos ambas toxinas inducen -- cambios morfológicos similares, se ha detectado que la B es 1,000 veces más citotóxica que la A (Tabla 3.1)(35, 113).

Tabla 3.1.- Efecto citotóxico de las toxinas A y B de Clostridium difficile en diferentes cultivos celulares.

Toxina	Concentración ^a	Cambios morfológicos sufridos - por diferentes tipos de células: ^b			
		YI	CHO	HeLa	MHC
A	20.00 $\mu\text{g/ml}$	++	++	++	++
	5.00 $\mu\text{g/ml}$	++	++	+	++
	1.25 $\mu\text{g/ml}$	++	+	-	++
	0.31 $\mu\text{g/ml}$	++	-	-	+
	0.08 $\mu\text{g/ml}$	+	-	-	-
	0.02 $\mu\text{g/ml}$	-	-	-	-
B	20.00 ng/ml	++	++	++	++
	5.00 ng/ml	++	++	++	++
	1.25 ng/ml	++	++	++	++
	0.31 ng/ml	++	++	++	++
	0.08 ng/ml	++	+	+	+
	0.02 ng/ml	+	-	-	-

a Concentración final de toxina en el cultivo celular.

b ++, la totalidad de las células redondeadas; +, la mayoría pero no todas las células redondeadas; -, células sin cambio morfológico después de 18 horas de incubación.

YI - Cultivo de células de tumores adrenales de ratón.

CHO - Cultivo de células ováricas de hamster chino.

HeLa- Cultivo de células de carcinoma de cérvix.

MHC - Cultivo de células de hepatoma de rata.

Una variante complementaria que incrementa la representatividad de esta metodología, es la demostración de que los efectos citopáticos pueden ser neutralizados mediante la antitoxina apropiada; esto resulta necesario para dar especificidad a la prueba, dado que en el caso de algunos desórdenes gastrointestinales y aún en personas aparentemente sanas pueden existir otros agentes inclusive de carácter toxigénico, que provocan cambios en la morfología celular (5,6): estudios realizados por Bartlett (6), indican que en las evacuaciones de aproximadamente un 15% de pacientes con diversas enfermedades gastrointestinales no relacionadas al empleo de antimicrobianos, se encuentran toxinas citopáticas de diferente naturaleza.

En cuanto a la metodología, la neutralización se efectuaba anteriormente incubando filtrados de las evacuaciones de los pacientes con antitoxina inducida por la exotoxina de Clostridium sordellii durante un periodo de tiempo determinado y, a continuación, adicionando esta mezcla al cultivo celular elegido para la prueba (28). Actualmente, aunque se sigue casi el mismo procedimiento, ya no se emplea dicha antitoxina, pues ahora se cuenta con sueros que contienen anticuerpos frente a las dos toxinas elaboradas por Clostridium difficile; con ello se ha logrado incrementar la especificidad de este método diagnóstico (37,66). (Para detalles en la -

Hasta hace pocos años la contrainmuno-electroforesis fué propuesta como instrumento para el diagnóstico de la colitis pseudomembranosa (103,124,131); los primeros intentos por aplicarla fueron realizados por Welch y colaboradores (124), quienes la emplearon en la identificación de cepas toxigénicas de Clostridium difficile. Por otro lado, Ryan y asociados (103) hicieron uso de ella para desarrollar una prueba rápida y sensible que permitiera detectar las toxinas de Clostridium difficile directamente en las evacuaciones de los pacientes afectados (para detalles en la metodología consultar Anexo II); este paso fué importante dado que hasta ese momento, las toxinas de este microorganismo solamente podían identificarse utilizando el análisis de toxicidad en cultivos celulares (103).

Los resultados obtenidos con dicho método fueron satisfactorios, ya que se demostró que su sensibilidad era comparable a la de la prueba en la que se emplean cultivos celulares (Tabla 3.2) (103).

Además de lo antes mencionado, la contrainmuno-electroforesis ofrece las ventajas de ser un método sencillo, específico, relativamente económico y rápido (el tiempo requerido para llevarse a cabo, incluyendo la preparación de las muestras fecales, oscila entre 75 y 90 minutos), por lo que parecía haberse encontrado una prueba eficaz para el diagnóstico de la colitis pseudo-

membranosa (103,124); sin embargo, estudios posteriores (56,60,65,106,125) han demostrado que el uso de la contraelectroforesis conduce a un alto porcentaje de resultados falsos-positivos (Tabla 3.3).

Poxton y Byrne (95) han establecido que la aparente falta de especificidad se debe a que la antitoxina - comúnmente empleada en este método contiene, además de anticuerpos frente a las toxinas de Clostridium difficile, anticuerpos contra antígenos de superficie del propio microorganismo; de tal forma que aunque no estén -- presentes las toxinas, basta que existan antígenos somáticos para que aparezcan las líneas de precipitación.

Estudios subsecuentes realizados por West y Wilkins (125) corroboraron este hecho al demostrar que -- cuando se emplean como antígeno sobrenadantes de cultivos no toxigénicos de Clostridium difficile, también aparecen bandas de precipitación de características similares a las obtenidas en presencia de toxina.

Es importante señalar que la frecuente presencia - de Clostridium sordellii y Clostridium bifermentans en las evacuaciones humanas, puesto que forman parte de la flora intestinal, contribuye a la obtención de resultados falsos-positivos, ya que está comprobado que estas dos especies comparten al menos una determinante antigénica con Clostridium difficile y, por ende, reaccionan

con la antitoxina que se suele usar (60,94,95,124).

Considerando lo antes expuesto resultaría conveniente evaluar nuevamente este método pero ahora utilizando una antitoxina adecuadamente purificada (que sólo contenga anticuerpos frente a ambas toxinas), para establecer la utilidad de la contrainmunolectroforesis en el diagnóstico de la enfermedad).

Tabla 3.2.- Comparación de la sensibilidad de la CIE y la prueba de citotoxicidad en cultivos celulares cuando se aplican en la detección de las toxinas de Clostridium difficile

Método	Resultado con la dilución correspondiente de toxina control; ^a					
	Sin diluir	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Citotoxicidad en cultivos - celulares	+	+	+	+	-	-
Contrainmuno-electrofore--sis (CIE)	+	+	+	+	-	-

a Toxina control: sobrenadante del cultivo de una cepa toxigénica de Clostridium difficile

Tabla 3.3.- Porcentaje de resultados falsos - positivos en diferentes estudios.

Referencia	% de falsos-positivos
Jarvis ⁵⁶	15%
Levine ⁶⁵	24%
Sands ¹⁰⁶	47%

IV. TRATAMIENTO

Considerando el cuadro clínico característico de la colitis pseudomembranosa (diarrea abundante -de 10 a 20 evacuaciones al día- a veces con moco y sangre, cólicos abdominales, náuseas, vómito, fiebre, leucocitosis e hipoalbuminemia) las medidas terapéuticas inmediatas que ayudan a mejorar la condición del paciente incluyen (48,74,109,119,126):

- a. La supresión del o de los antibióticos que desencadenaron el proceso.
- b. La administración por vía endovenosa de soluciones que mantengan el equilibrio electrolítico y prevengan la deshidratación del paciente.
- c. La eliminación de agentes antiperistálticos (atropina, belladona o difenoxilato), con el objeto de ayudar a disminuir el tiempo de contacto de las toxinas con la mucosa intestinal y, por consiguiente, el daño causado a ésta.

Además de estas medidas, la parte esencial del tratamiento radica en el empleo de agentes antimicrobianos para la erradicación del microorganismo; el antibiótico que hasta el momento ha dado los mejores resultados es la vancomicina. La administración de este medicamento es por vía oral y en dosis que oscilan, según la severi

dad del padecimiento, entre 0.5 y 2.0 g/día durante - - 7 a 14 días; la diarrea, la fiebre y demás síntomas des aparecen después de 2 a 5 días de haberse iniciado la - antibioticoterapia. Asimismo, se ha determinado que la concentración de las toxinas en las evacuaciones disminuye después de transcurridos 1 a 2 días de tratamiento (15,39,48,75,99,108,109).

No obstante los buenos resultados obtenidos con el uso de la vancomicina, en algunos casos se ha presentado el problema de recaídas, días después (aproximadamente entre 4 y 21) de concluida la terapia con dicho medicamento; sin embargo, se ha observado que la administración de vancomicina nuevamente resuelve la sintomatología definitivamente (14,42,72,126). Al respecto se han propuesto dos posibles mecanismos que explican el origen de las recaídas. El primero de ellos establece que existe una reinfección del medio ambiente cuando todavía la flora normal del intestino no está perfectamente restablecida para prevenir la proliferación de Clostridium difficile (14,39) y, el segundo, postula que Clostridium difficile puede sobrevivir al tratamiento en -- forma esporulada, recolonizando nuevamente el intestino cuando se suprime el antibiótico (14,89).

Dado el alto costo de la vancomicina, se ha propuesto el uso de la bacitracina como alternativa en el

tratamiento de la enfermedad; las experiencias que se tienen con este antibiótico indican que su administración por vía oral en dosis de 100,000 U/día durante 7 a 10 días resuelve satisfactoriamente las manifestaciones clínicas que se presentan (30,118).

Además de la terapia encaminada a la erradicación del microorganismo existe la dirigida a la inactivación de las toxinas; esta última se logra mediante la administración oral de resinas de intercambio aniónico en dosis de 16 g/día durante 2 a 5 días. Las resinas que regularmente se usan con este fin son colestiramina y colestipol, ambas son capaces de unirse a las toxinas de Clostridium difficile tanto in vivo como in vitro (48,59,115).

Desafortunadamente, esta terapia no ha reportado buenos resultados puesto que tan sólo se beneficia al paciente mientras existen las resinas a nivel intestinal; de tal manera, que al suprimirse éstas se presentan nuevamente los síntomas (48,59). Para que el empleo de estas resinas resulte eficaz, se ha sugerido su combinación con dosis elevadas de vancomicina (2 g/día), de tal forma que a la vez que se inactive a las toxinas existentes, se elimine al microorganismo productor de las mismas (115).

En un intento por encontrar nuevos métodos de tra-

tamiento, se ha ensayado el restablecimiento de la flora normal mediante enemas fecales; esta medida terapéutica se basa en el hecho de que la presencia de una flora inalterada constituye el mejor mecanismo de defensa del huésped para inhibir el establecimiento y desarrollo de microorganismos patógenos. Los enemas se preparan con muestras fecales de individuos sanos, asegurándose que éstas estén libres de virus, parásitos y bacterias patógenas; aplicándose al paciente dos veces al día. Hasta el momento este método se ha empleado sólo en pacientes que no responden a la terapia comúnmente aceptada, obteniéndose resultados positivos en un 80% de los casos atendidos con este tipo de tratamiento. La recuperación de estos pacientes fué rápida, ya que el tiempo requerido para ello osciló entre 5 y 12 días (22, 48).

Finalmente, se recomienda la cirugía para aquellos casos en los que, por no haber respuesta a ningún tipo de tratamiento, la enfermedad evoluciona hasta el grado de presentarse perforaciones en el colon (48).

V. PREVENCIÓN

La medida más recomendable para prevenir el desarrollo no sólo de la colitis pseudomembranosa, sino de muchas otras enfermedades intestinales de origen bacteriano, es evitar el mal uso de los antimicrobianos. Sin embargo, actualmente se estudian otros recursos en animales de experimentación que pueden aparecer posteriormente como opciones aceptables; uno de ellos es la administración oral de preparaciones bacterianas elaboradas con ciertas especies microbianas integrantes de la flora normal del intestino que, según se ha demostrado, son capaces de inhibir el desarrollo de Clostridium difficile (48,71,101,102). Esta medida está dirigida sobre todo a pacientes que están o serán sometidos a tratamientos antimicrobianos prolongados (48). Las especies que suprimen la proliferación de Clostridium difficile son: Streptococcus faecalis, Streptococcus faecium, Streptococcus mitis, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus bulgaricus, Bifidobacterium adolescentis, Bifidobacterium infantia y Bifidobacterium longum (71,101,102).

Estudios realizados en hamsters han demostrado que la administración de LACTINEX (preparación comercial de Lactobacillus acidophilus y Lactobacillus bulgaricus)

previene el desarrollo de ileocecit^{is} inducida por el tratamiento con antibióticos (48).

Otra medida profiláctica que se ha sugerido, es la aplicación del toxoide preparado con ambas toxinas (tox^oide AB); los resultados obtenidos en este caso, muestran que los animales así tratados quedan completamente protegidos del efecto lesivo de las toxinas (67).

No obstante que las medidas citadas pudieran resultar aplicables en la prevención de la colitis pseudomembranosa, cabe señalar que también es importante tomar las siguientes precauciones para evitar la posible transmisión del padecimiento (48):

- (1) El aislamiento de los pacientes afectados.
- (2) La descontaminación de las habitaciones ocupadas -- por los mismos.
- (3) La esterilización del instrumental empleado en el examen de los pacientes (sigmoidoscopia y proctoscopia).

VI. CONCLUSIONES

1. En lo que se refiere al aislamiento de Clostridium -
difficile:

- la fuente primordial es la materia fecal de los pa-
cientes afectados.
- los medios CFA, CCFA y TCCFA se consideran los de
elección, aunque se ha comprobado que el último da
los mejores resultados.
- el uso de taurocolato de sodio y lisozima en di- -
chos medios favorece en gran medida la recupera- -
ción del microorganismo en forma esporulada.

2. Por lo que respecta a las toxinas:

- en ellas radica la patogenicidad del microorganis-
mo.
- el efecto principal de la toxina A es la acumula--
ción de fluidos, por lo que se le considera la res-
ponsable de los cuadros diarreicos observados en -
la colitis pseudomembranosa.
- la actividad de la toxina B es primordialmente ci-
totóxica: modifica la permeabilidad de la membrana
celular; posee acción selectiva sobre células del
epitelio colónico.
- el mecanismo de acción de cada una de ellas se des-
conoce.

- son antigénicamente diferentes.
3. Por lo que toca a la acción de los antimicrobianos - frente al microorganismo:
- es altamente resistente a: clindamicina, lincomicina, cefalotina, cefalexina y cefoxitina.
 - es sensible a: penicilina G, ampicilina, tetraciclina, cloramfenicol, eritromicina, rifampicina, bacitracina, metronidazol y vancomicina.
4. En relación con la estructura antigénica, Clostridium difficile:
- posee dos carbohidratos que le confieren especificidad inmunológica: uno de ellos presente en la pared celular y el otro en la membrana citoplásmica.
 - comparte determinantes antigénicas con Clostridium sordellii y Clostridium bifermentans.
5. En cuanto a la inmunidad que se observa en la colitis pseudomembranosa:
- es primordialmente de tipo antitóxico y no antibacteriano.
 - en los casos agudos de la enfermedad y aún en los períodos de convalecencia, el paciente posee un título mayor de anticuerpos contra la toxina B que contra la A.
 - no se ha establecido todavía si los anticuerpos -- formados tienen un papel importante en la protec--

ción del individuo contra posibles reinfecciones.

6. En lo que se refiere al diagnóstico de laboratorio - de la colitis pseudomembranosa:

- el definitivo se establece cuando además de observar las lesiones características de la enfermedad, se demuestra la presencia de las toxinas y/o el microorganismo en la materia fecal de los pacientes afectados.
- la detección de Clostridium difficile en las evacuaciones del paciente se logra mediante: cultivo, inmunofluorescencia directa o métodos inmunoenzimáticos (ELISA).
- la introducción de métodos inmunológicos para detectar al microorganismo directamente de las muestras fecales, trae consigo una reducción en el tiempo requerido para establecer el diagnóstico.
- en algunos casos la rapidez en el diagnóstico es decisiva para el paciente por la severidad del daño causado.
- las toxinas producidas por Clostridium difficile se ponen de manifiesto mediante la investigación de su citotoxicidad en cultivos celulares y a través de técnicas de contraimmunoelectroforesis.
- el empleo de cultivos celulares en la detección de las toxinas se considera hasta el momento el recur

so más confiable y sensible.

- si no se adsorbe el suero empleado en la contrainmunolectroforesis es inespecífica pues conduce a un alto porcentaje de resultados falsos-positivos.

7. Por lo que respecta al tratamiento de la enfermedad:

- inicialmente incluye la supresión del o de los antimicrobianos que desencadenaron el proceso y la administración intravenosa de electrolitos.
- el antibiótico de elección es la vancomicina.
- el dirigido a la inactivación de las toxinas no ha reportado buenos resultados.
- en algunos casos el uso de enemas fecales resulta satisfactorio.

8. Por lo que toca a las medidas que ayudan a prevenir la colitis pseudomembranosa:

- la principal radica en evitar el uso indiscriminado de los antimicrobianos.
- se estudia la posible administración oral de preparaciones bacterianas que inhiben la proliferación de Clostridium difficile.
- se investiga la efectividad de la aplicación de toxoide preparado con ambas toxinas (toxoides AB).

9. Con respecto al desarrollo de la enfermedad:

- el mecanismo que lo induce radica en el desequilibrio que sufre la flora normal del intestino por -

el uso desmedido de antimicrobianos ya que dicho -
cambio favorece la multiplicación de cepas toxigé-
nicas de Clostridium difficile resistentes al o --
los antibióticos administrados.

- los antimicrobianos que con mayor frecuencia se --
asocian a la colitis pseudomembranosa son: clinda-
micina, lincomicina y ampicilina, aunque ya se ha
comprobado que existen otros.
- se presenta primordialmente en personas adultas.

ANEXO I

COMPOSICION Y PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

AGAR CLOSTRISEL REFORZADO

Medio descrito para usarse en el cultivo de microorganismos anaerobios esporogénicos; recientemente se ha reportado su utilidad en el aislamiento de Clostridium difficile.

Composición:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Extracto de levadura	3.0
Extracto de carne de res	10.0
Peptona Trypticase	10.0
Dextrosa	5.0
NaCl	5.0
Acetato de sodio	3.0
Almidón soluble	1.0
Cisteína	0.5
Agar	13.5

pH final 6.8 ±

Preparación:

Hacer una suspensión de 51 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Mezclar totalmente y calentar agitando frecuentemente. Hervir durante un minuto.

Distribuir y esterilizar en autoclave a 115°C (10 li- -
bras de presión) durante 15 minutos.

MEDIO CFA (CICLOSERINA-FRUCTOSA-YEMA DE HUEVO-AGAR)

Medio ideado para emplearse en el aislamiento de Clos-
tridium difficile.

Composición:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Proteosa peptona	40.0
Na ₂ HPO ₄	5.0
KH ₂ PO ₄	1.0
NaCl	2.0
MgSO ₄ anhidro	0.1
Fructosa	6.0
Agar	20.0
Sol. de rojo neutro al 1% en etanol	3.0 ml
pH final	6.8 ±

Preparación:

Mezclar bien todos los componentes. Hervir durante un -
minuto y esterilizar a 121°C (no más de 15 libras de --
presión) durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a
50°C y añadir 500 µg/ml de cicloserina y finalmente adi-
cionar 5 ml de una suspensión al 50% en solución salina
estéril de yema de huevo; se agita vigorosamente y se -
reparte en cajas Petri estériles en cantidades de apro-

ximadamente 17 a 20 ml.

MEDIO CCFA (CICLOSERINA-CEFOXITINA-FRUCTOSA-YEMA DE HUEVO-AGAR)

Medio ideado para utilizarse en el aislamiento de Clostridium difficile.

Composición:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Proteosa peptona	40.0
Na_2HPO_4	5.0
KH_2PO_4	1.0
NaCl	2.0
MgSO_4 anhidro	0.1
Fructosa	6.0
Agar	20.0
Sol. de rojo neutro al 1% en etanol	3.0 ml
pH final 6.8 \pm	

Preparación:

La preparación es la misma que en el medio CFA, la diferencia radica solamente en que al momento de agregar la cicloserina se agrega también la cefoxitina en concentración de 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

MEDIO TCCFA (TAUROCOLATO DE SODIO-CICLOSERINA-CEFOXITINA-FRUCTOSA-AGAR)

Medio descrito para usarse en el aislamiento de Clostridium difficile; la presencia de taurocolato de sodio en éste favorece especialmente la germinación de las esporas de dicho microorganismo.

Composición:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Proteosa peptona	40.0
Na ₂ HPO ₄	5.0
KH ₂ PO ₄	1.0
NaCl	2.0
MgSO ₄ anhidro	0.1
Fructosa	6.0
Taurocolato de sodio	1.0
Agar	20.0
Sol. de rojo neutro al 1% en etanol	3.0 ml
pH final 6.8 ±	

Preparación:

Mezclar bien todos los componentes. Hervir durante un minuto y esterilizar a 121°C (no más de 15 libras de presión) durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 50°C y añadir 500 µg/ml de cicloserina y 16 µg/ml de cefoxitina. Se mezcla perfectamente y se reparte en cajas Petri estériles en cantidades de aproximadamente 17 a -

20 ml.

GELOSA SANGRE

Medio empleado para el cultivo y propagación de Clostridium difficile.

Composición:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Peptona Trypticase	15.0
Peptona Phytone	5.0
NaCl	5.0
Agar	15.0

pH final 7.3 †

Preparación:

Se suspenden 40 g de polvo en un litro de agua destilada. Se mezcla bien y se calienta agitando frecuentemente. Se hierve durante un minuto, se distribuye y esteriliza a 121°C (no más de 15 libras de presión) durante 15 minutos. Una vez esterilizado, se deja enfriar aproximadamente a 40 - 45°C y se agrega un 5 a 10% del volumen total de sangre de carnero desfibrinada. Se vacía en las placas correspondientes.

BASE DE AGAR ROJO DE FENOL

Medio sólido apropiado para usarse en las pruebas de fermentación de carbohidratos indicadas para la identi-

ficación de Clostridium difficile.

Composición:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Peptona Trypticase 10.000

NaCl 5.000

Agar 15.000

Rojo de fenol 0.018

pH final 7.4 \pm

Preparación:

Se suspenden 30 g del polvo en un litro de agua destilada y se agregan 5 a 10 g/l del carbohidrato que se desea estudiar. Si este produce baja de pH, reajústelo. - Se calienta agitando frecuentemente y se hierve durante un minuto. Se distribuye y esteriliza a 118°C (12 libras de presión) durante 15 minutos.

BASE DE CALDO ROJO DE FENOL

Medio líquido al que se le pueden agregar carbohidratos para determinar con exactitud las diferentes reacciones de fermentación que son útiles en la identificación de Clostridium difficile.

Composición:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Peptona Trypticase 10.000

NaCl 5.000
Rojo de fenol 0.018
pH final 7.4 \pm

Preparación:

Se disuelven 15 g del polvo en un litro de agua destilada, agregándole de 5 a 10 g/l del carbohidrato que se desea estudiar. Para investigar la formación de gases se pueden emplear los tubos de Durham. Cuando el medio se va a destinar al cultivo de microorganismos anaerobios se le pueden agregar 0.5 a 1.0 g de agar o bien 0.5 g de L-cisteína HCl. El medio ya preparado se distribuye en los tubos correspondientes y se esteriliza a 116 - 118°C (no más de 12 libras de presión) durante 15 minutos.

CALDO TRIPTOFANO

Medio empleado para identificar a Clostridium difficile en base a la producción de indol a partir de triptofano.

Composición:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Triptona 10.0

Preparación:

Disolver por calentamiento, repartir en tubos porciones de 5 ml y esterilizar a 121°C (no más de 15 libras de presión) durante 15 minutos.

MEDIO SIM

Medio semisólido que se usa en la identificación de - - Clostridium difficile, basándose en la producción de -- sulfuro de hidrógeno y formación de indol.

Composición:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Peptona Trypticase	20.0
Peptona Thione	6.1
Sulfato de hierro y amonio	0.2
Na ₂ S ₂ O ₃	0.2
Agar	3.5

pH final 7.3 [±]

Preparación:

Se suspenden 30 g del material seco en un litro de agua destilada. Mezclar bien y cuando se obtenga la suspen-- sión uniforme, calentar frecuentemente y hervir durante un minuto. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121^oC (15 libras de presión) durante 15 minutos.

AGAR DE HIERRO DE KLIGLER

Medio que se utiliza para identificar a Clostridium di-- fficile en base a la producción de sulfuro de hidrógeno y fermentación de glucosa y lactosa.

Composición:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Peptona Polypeptone	20.000
Lactosa	10.000
Dextrosa	1.000
NaCl	5.000
Citrato de hierro y amonio	0.500
Na ₂ S ₂ O ₃	0.500
Agar	15.000
Rojo de fenol	0.025
pH final 7.4 ±	

Preparación:

Se suspenden 52 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Mezclar bien y calentar agitando frecuentemente. Hervir durante un minuto, distribuir en tubos y esterilizar a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Se deja enfriar en posición inclinada, de manera de obtener extremos prolongados. Para mayor exactitud, el agar de hierro de Kligler se debe usar el mismo día de su preparación o fundirse y solidificarse antes de usarlo.

AGAR DE HIERRO Y LISINA

Medio empleado en la identificación de Clostridium difficile, basándose en la producción de sulfuro de hidrógeno.

Composición:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Peptona Gelysate	5.00
Extracto de levadura	3.00
Dextrosa	1.00
L-lisina	10.00
Citrato de hierro y amonio	0.50
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	0.04
Púrpura de bromocresol	0.02
Agar	13.50
pH final 6.7 [±]	

Preparación:

Hacer una suspensión de 33 g del material seco en un litro de agua destilada. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Distribuir en tubos, de preferencia con tapa de rosca. Esterilizar en autoclave a 121^oC durante 12 minutos. Enfriar en posición inclinada para formar extremos profundos. Cerrar firmemente las -tapas para evitar evaporación durante el almacenamiento.

AGAR DE HIERRO Y TRIPLE AZUCAR (AGAR TSI)

Medio usado para identificar a Clostridium difficile en base a la formación de sulfuro de hidrógeno y fermentación de lactosa, glucosa y sacarosa.

Composición:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Peptona Polypeptone	20.000
NaCl	5.000
Lactosa	10.000
Sacarosa	10.000
Dextrosa	1.000
Sulfato de hierro y amonio	0.200
Na ₂ S ₂ O ₃	0.200
Rajo de fenol	0.025
Agar	13.000
pH final 7.3 ±	

Preparación:

Para preparar el medio haga una suspensión con 59.4 g - del material deshidratado en un litro de agua destilada. Mezcle totalmente y después caliente agitando frecuentemente. Hierva durante un minuto, vierta en tubos llenándolos más o menos a un tercio de su capacidad, y esterilice en autoclave a no más de 118°C durante 15 minutos. Los tubos deben enfriarse en posición inclinada para -- que se formen declives con fondo profundo.

AGAR SULFITO DE BISMUTO

Medio empleado en la identificación de Clostridium difficile, basándose en la producción de sulfuro de hidrógeno.

Composición:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Peptona Polypeptone	10.000
Extracto de carne	5.000
Dextrosa	5.000
Na ₂ HPO ₄	4.000
FeSO ₄	0.300
Indicador de sulfito de bismuto ..	8.000
Verde brillante	0.025
Agar	20.000
pH final 7.5 †	

Preparación:

Haga una suspensión con 52 g del polvo en un litro de - agua destilada. Mezcle bien y cuando se logre una sus- pensión uniforme caliente agitando frecuentemente. Hier- va durante un minuto, déjela enfriar a unos 45°C. Agite el medio o haga rotar los recipientes para que se disper- se el precipitado y vierta en placas usando unos 20 ml para cada una. Las placas deben estar descubiertas par- cialmente hasta que se seque la superficie del medio. El medio en las placas debe usarse el mismo día de su - preparación.

AGAR DE SULFURO Y CITRATO

Medio que se utiliza para identificar a Clostridium di-
fficile en base a la producción de sulfuro de hidrógeno.

Composición:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Citrato de sodio	3.000
Dextrosa	0.200
Extracto de levadura	0.500
Cistina	0.100
Citrato de hierro y amonio	0.400
K_3PO_4	1.000
NaCl	5.000
$Na_2S_2O_3$	0.080
Rojo de fenol	0.012
Agar	14.000
pH final 6.7 [±]	

Preparación:

Haga una suspensión con 24 g del polvo en un litro de -
agua destilada. Mezcle y caliente agitando frecuentemen-
te, hierva durante un minuto. Distribuya en tubos para
cultivos inclinados con bastante fondo. Esterilice en -
autoclave de 118 a 121°C (12 a 15 libras de presión) du-
rante 15 minutos.

AGAR UREA

Medio que se usa en la identificación de Clostridium di-
fficile, basándose en la utilización de urea.

Composición:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Peptona Gelysate	1.000
Dextrosa	1.000
NaCl	5.000
KH_2PO_4	2.000
Urea	20.000
Rojo de fenol	0.012
pH final 6.8 \pm	

Preparación:

Se disuelven 29 g del polvo en 100 ml de agua destilada. Se esteriliza por filtración. Se disuelven por ebullición 15 g de agar en 900 ml de agua destilada. Esterilice en autoclave a 121°C (15 libras de presión durante 15 minutos, enfríe a 50°C y agregue a los 100 ml de la base de agar urea estéril. Mezcle bien y distribuya asépticamente en tubos estériles, deje endurecer el medio en posición inclinada de manera de obtener fondos profundos. A un pH de 6.8 a 7.0 el medio solidificado debe tener un color amarillo rosado ligero. No vuelva a fundir el agar inclinado.

CALDO UREA

Medio empleado para identificar a Clostridium difficile en base a la producción de ureasa.

Composición:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Urea	20.00
KH_2PO_4	9.10
Na_2HPO_4	9.50
Extracto de levadura	0.10
Rojo de fenol	0.01
pH final 6.8 \pm	

Preparación:

Se usan 3.87 g para cada 100 ml de agua destilada. Cuando el polvo se haya disuelto, se pasa a través de un filtro bacteriológico estéril, por ejemplo Seitz o de bujía. Se distribuye en porciones de 0.5 a 2 ml en tubos pequeños estériles. Si se desea, se pueden emplear cantidades más grandes, pero las reacciones son más lentas. Si no es posible conseguir un filtro, el medio se puede esterilizar en autoclave, siempre que los tubos no se coloquen muy apretados, llevando la presión durante 7 a 10 minutos a 5 libras o a 8 libras durante 20 minutos. Este medio generalmente da buenos resultados sin esterilizar, si se prepara y se inocula inmediatamente.

GELATINA NUTRITIVA

Medio que se usa en la identificación de Clostridium difficile, basándose en la licuefacción de la gelatina.

Composición:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Peptona Gelysate	5.0
Extracto de carne de res	3.0
Gelatina	120.0
pH final 6.8 ±	

Preparación:

Se suspenden 128 g del medio deshidratado en un litro - de agua destilada. Caliéntese a 50°C hasta que el medio esté bien disuelto. Se distribuye y esteriliza a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos.

MEDIO THIOGEL

Medio tioglicolado que se emplea en la investigación de la actividad proteolítica de Clostridium difficile, característica útil en su identificación.

Composición:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Peptona Trypticase	18.00
Peptona Phytone	3.00
Dextrosa	6.00
NaCl	2.50
Tioglicolato de sodio	0.50
Agar	0.70
L-cistina	0.25
Na ₂ SO ₃	0.10

Gelatina 50.00

pH final 7.0 \pm

Preparación:

Se suspenden 80 g del material deshidratado en un litro de agua destilada, preferiblemente precalentada. Mezcle y deje reposar durante 5 minutos. Distribuya en tubos de ensayo de 15 x 200 o de 15 x 150 llenándolos hasta la mitad. Esterilice a 118°C durante 15 minutos. El medio Thiogel debe guardarse a temperatura ambiente, y si está en tubos tapados con torunda de algodón, se puede usar hasta tres semanas después de su preparación. Si se ha puesto en tubos cerrados, se puede conservar por mayor tiempo. Los mejores resultados se obtienen si antes de usarse se hierve durante dos minutos y se enfría a temperatura ambiente.

CALDO NITRATO

Medio empleado para identificar a Clostridium difficile, basándose en la reducción de nitratos.

Composición:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Peptona Trypticase 20.0

Na₂HPO₄ 2.0

Dextrosa 1.0

Agar 1.0

KNO_3 1.0

pH final 7.2 [±]

Preparación:

Se agregan 25 g del polvo en un litro de agua destilada mezclando bien hasta su dispersión. Se calienta agitando frecuentemente para que hierva durante un minuto y se distribuye en tubos de ensayo regulares, llenándolos hasta la mitad. Se esteriliza a 118° o 121°C durante 15 minutos. Si el medio ha sido preparado hace más de dos días, se debe hervir durante dos minutos y enfriar antes de usarlo.

CALDO MR/VP (MEDIO DE CLARK Y LUBS)

Medio que se usa en la identificación de Clostridium difficile en base a la producción de acetilmetilcarbinol.

Composición:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Peptona Polypeptone 7.0

Dextrosa 5.0

K_2HPO_4 5.0

pH final 6.9 [±]

Preparación:

Se suspenden 17 g del polvo en un litro de agua destilada y se mezcla bien, si es necesario, caliéntese un poco hasta disolverlo. Se distribuye y esteriliza entre -

118 y 121°C (no más de 15 libras de presión) durante --
15 minutos.

AGAR YEMA DE HUEVO

Medio empleado para identificar a Clostridium difficile,
basándose en la producción de lecitinasa y lipasa.

Composición:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Peptona Trypticase	5.00
Extracto de levadura	5.00
NaCl	2.50
Na ₂ SO ₃	0.10
L-triptofano	0.20
Vitamina K ₁	0.01
Glucosa	2.00
Na ₂ HPO ₄	5.00
MgSO ₄	0.01
L-cistina	0.40
Hemina	0.01
Agar	20.00

pH final 7.4 ±

Preparación:

Se mezclan todos los componentes en un litro de agua --
destilada a excepción de la L-cistina y hemina; estos --
componentes se disuelven previamente en 5 ml de NaOH 1N

antes de añadirse al medio. Una vez integrados todos -- los componentes, caliente agitando frecuentemente hasta disolver el agar. Esterilice en autoclave a 121⁰C (15 - libras de presión) durante 15 minutos. Después de esterilizada la base, se enfría a aproximadamente 55 - 60⁰C y se le adiciona una suspensión de yema de huevo (100 ml por litro de base); finalmente se distribuye en las placas correspondientes usando 17 a 20 ml de medio para cada una de ellas.

AGAR DE AZUL ALCOHOL

Medio empleado para identificar a Clostridium difficile, basándose en la producción de lipasa.

Composición:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Azul alcohol	0.15
Peptona Trypticase	10.00
Extracto de levadura	5.00
Agar	17.00

pH final 7.0 ±

Preparación:

Haga una suspensión con 33 g del material seco en un litro de agua destilada. Caliente agitando frecuentemente hasta que se disuelva el agar. Añada 25 a 30 ml de aceite de algodón o de aceite de olivo u otra emulsión lipíde

dica. Mezcle y distribuya. Esterilice a 121⁰C (15 libras de presión) durante 15 minutos.

AGAR TRIBUTIRINA

Medio usado para identificar a Clostridium difficile, - basándose en la producción de lipasa.

Composición:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Peptona	5.0
Extracto de levadura	3.0
Gliceril tributirato	10.0
Agar	20.0

pH final 7.5 [±]

Preparación:

Disuelva los componentes en un litro de agua destilada y caliente agitando frecuentemente hasta disolver el -- agar. Distribuya y esterilice a 121⁰C (15 libras de presión) durante 15 minutos.

AGAR CASEINATO DE SODIO

Medio utilizado en la identificación de Clostridium difficile en base a la producción de enzimas que actúan -- sobre la caseína.

Composición:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Caseinato de sodio	2.00
Dextrosa	1.00
K_3PO_4	0.20
$MgSO_4$	0.20
$FeSO_4$	0.01
Agar	16.00
pH final 6.8 \pm	

Preparación:

Haga una suspensión con 19.4 g del polvo en un litro de agua destilada. Mezcle bien y caliente durante un minuto. Distribuya y esterilice en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos.

AGAR LECHE DESNATADA

Medio que se emplea para identificar a Clostridium difficile, basándose en la hidrólisis enzimática de la caseína.

Reconstituir cualquiera de los agares nutritivos deshidratados con la mitad del volumen de agua recomendado, calentar hasta la disolución del agar y dejar enfriar a 55°C. Añadir el mismo volumen de leche desnatada esterilizada (preferiblemente dializada), vertiendo seguidamente a las placas. Se puede utilizar leche de vaca fresca descremada, esterilizada por tindalización (vapor fluente durante 30 minutos en 3 días sucesivos), o

en autoclave con una presión de 10 libras durante 10 minutos. También resulta conveniente la leche desnatada - deshidratada que se obtiene en el comercio; ésta se usa al 10% en agua destilada, utilizando el mismo procedimiento de esterilización mencionado.

CALDO NT (CALDO NORLEUCINA-TIROSINA)

Medio que permite el desarrollo de Clostridium difficile y favorece la producción de p-cresol y ácido caproico, productos extracelulares de gran utilidad en la - - identificación del microorganismo.

Composición:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Tripticaseína	5.0
Extracto de levadura	5.0
NaCl	2.5
Na ₂ SO ₃	0.1
L-norleucina	2.0
Tirosina	2.0
Solución de sales VPI	40.0 ml

pH final 7.6 ±

Solución de sales VPI:

CaCl ₂	0.2 g
MgSO ₄	0.2 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g

KH_2PO_4 1.0 g

Preparación:

De la solución de sales VPI:

Mezclar bien el CaCl_2 y MgSO_4 en 300 ml de agua destilada. Cuando están disueltos agregar 500 ml más de agua destilada y añadir las sales restantes. Seguir mezclando hasta que todas las sales estén disueltas y finalmente agregar 200 ml de agua destilada. Conservar a 4°C .

Del medio de cultivo:

Se disuelven los componentes, se distribuyen en tubos de 16 x 125 y se esterilizan a 121°C (no más de 15 libras de presión).

MEDIO CCFA MODIFICADO

Medio que permite el desarrollo de Clostridium difficile y favorece la producción de p-cresol, producto extracelular útil en la identificación del microorganismo.

Composición:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Proteosa peptona	40.0
Na_2HPO_4	5.0
KH_2PO_4	1.0
NaCl	2.0
MgSO_4 anhidro	0.1
Fructosa	6.0

Agar 20.0
Sol. de rojo neutro al 1% en etanol 3.0 ml
pH final 6.8 ±

Preparación:

Mezclar bien todos los componentes. Hervir durante un -
minuto para disolución del agar. Esterilizar a 121°C --
(no más de 15 libras de presión) durante 15 minutos. En-
friar aproximadamente a 50°C y añadir 250 µg/ml de ci--
closerina, 8 µg/ml de cefoxitina, 5 ml de una suspen- -
sión al 50% en solución salina estéril de yema de huevo;
se agita vigorosamente y, finalmente, se adiciona una -
solución estéril de ácido p-hidroxifenilacético a una -
concentración final de 0.1% (p/v). Se distribuye en ca-
jas Petri estériles usando 17 a 20 ml para cada una.

ANEXO II

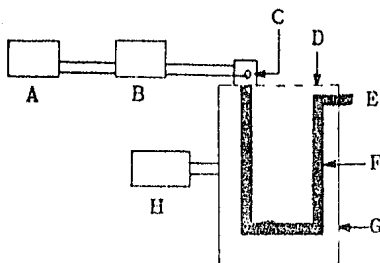
MÉTODOS

CROMATOGRAFIA GAS - LIQUIDO.

La cromatografía gas-líquido (CGL) es una técnica que permite separar y cuantificar sustancias que tienen la propiedad de ser volátiles o bien formar derivados - que también lo sean.

INSTRUMENTOS

En la figura que a continuación se presenta se encuentran los componentes esenciales de un cromatógrafo gas-líquido.



Componentes básicos de un cromatógrafo gas-líquido: (A) registrador de gráfica de tira, (B) electrómetro, (C) detector, (D) entrada de la muestra, (E) entrada del gas portador, (F) columna, (G) estufa regulada y (H) programador - para controlar la temperatura de la estufa.

REGISTRADOR:

El registrador es simplemente un dispositivo electromecánico que mide la salida del voltaje del electrómetro y la presenta en una gráfica de tira que posteriormente se analizará para poder hacer la interpretación adecuada.

ELECTROMETRO:

Básicamente, el electrómetro es un instrumento electrónico que puede medir corrientes muy pequeñas y amplificarlas linealmente. La señal amplificada alimenta entonces el dispositivo de lectura, que de ordinario es un registrador de gráfica de tira.

DETECTOR:

Los detectores de los cromatógrafos gas-líquido son en general de tres tipos: de llama de hidrógeno, de conductividad térmica y de captura de electrones; de éstos el de uso más común es el primero y consiste en una pequeña asa de platino montada a 2.5 cm aproximadamente por encima del portillo de salida de la columna; sobre este portillo va montada una boquilla de metal, por la cual se introduce el hidrógeno y en donde se mezclan este gas y el efluente de la columna. De esta manera los iones formados por la combustión del efluente en la llama serán recogidos por el asa de platino y producirán una pequeña corriente entre la boquilla y el anillo

de platino; esta corriente es detectada y amplificada por el electrómetro y enviada al registrador.

GAS PORTADOR:

El gas portador se introduce cerca de la parte superior de la columna y del punto en donde ha de inyectarse la muestra, siendo generalmente un gas inerte como helio o argón, que fluye a velocidad constante por la columna.

COLUMNA:

La columna es usualmente de vidrio o de acero inoxidable empaquetada con un soporte sólido inerte, como tierra de diatomeas, que se reviste de una fina capa de fase líquida que ordinariamente es algún compuesto de silicio que no sea volátil y que no reaccione con la sustancia que interesa.

PROGRAMADOR:

El programador es una combinación de controles electrónicos, cuya función básica es procurar el control de la temperatura de la estufa de la columna. La estufa se regula generalmente dentro de una variación de $0,1^{\circ}\text{C}$ y puede cambiarse a velocidad lineal y constante desde -1°C por minuto a 50°C por minuto. Este cambio de temperatura durante una medición ayuda a producir separaciones de sustancias que han entrado en la fase líquida; de esta manera a medida que cambia la temperatura, van siendo eluidos selectivamente de la columna los compo-

nentes respectivos de la muestra, conforme a sus diferencias de volatilidad.

PRINCIPIOS DE FUNCIONAMIENTO

Para llevar a cabo la investigación de la sustancia que interesa, inicialmente deberá inyectarse una muestra de la misma en el portillo de entrada de la columna del cromatógrafo; una vez introducida la muestra, inmediatamente es volatilizada y transportada por el gas portador a la fase líquida del soporte sólido que se encuentra en el interior de la columna; la separación ocurre entonces como resultado de la solubilidad y velocidad de difusión diferentes de cada uno de los componentes de la muestra gasificada, al entrar en contacto con la fase líquida. Así, las diversas fracciones de la muestra gaseosa tienden a pasar por la columna a velocidades distintas y, por consiguiente, a aparecer en el detector a tiempos diferentes. Cuando son eluidas de la columna estas bandas (por el gas portador) hacia la llama del detector se produce una irrupción de iones, se provoca con ello un aumento en la corriente del detector. Este incremento es detectado y amplificado por el electrómetro y enviado al registrador en donde la señal es transformada, apareciendo impresa en una gráfica de tira; de esta manera, a medida que cada una de las bandas es eluida de la columna van surgiendo picos suce

sivos en la gráfica del registrador. El tiempo que tarda en aparecer cada uno de los picos en la gráfica del registrador desde el momento en que se inyectó la muestra es el tiempo de retención, magnitud que es característica de cada sustancia. Si se consigue buena resolución en el cromatógrafo y los picos formados en la gráfica son claros, se puede establecer que la altura del pico es proporcional a la concentración.

PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA IDENTIFICACION DE ACIDOS GRASOS VOLATILES POR CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO.

Este procedimiento se usa para la identificación de ácidos grasos volátiles de cadena corta que son solubles en éter; entre éstos se incluyen los ácidos acético, butírico, caproico, isobutírico, isocaproico, isovalérico, propiónico y valérico.

Los pasos a seguir son los siguientes:

- 1.- Inocular 7 a 8 ml de caldo peptona-extracto de levadura-glucosa (o bien el medio de cultivo indicado para el microorganismo en estudio) con 0.05 a 0.1 ml de un cultivo del microorganismo.
- 2.- Incubar en anaerobiosis durante 48 horas a 37°C o hasta obtener desarrollo.
- 3.- Transferir 2.0 ml del cultivo a un tubo con tapón de rosca limpio (si se trata de desarrollo en medio sólido, remover las colonias sospechosas y el

área circundante de las mismas y seguir el mismo procedimiento), acidificar éste a pH de 2 adicionando 0.2 ml de H_2SO_4 al 50% (v/v).

- 4.- Añadir 1 ml de éter etílico, cerrar el tubo y mezclar por inversión del tubo aproximadamente 20 veces.
- 5.- Centrifugar a 1500 - 2000 rpm hasta romper la emulsión éter-cultivo.
- 6.- Colocar la mezcla éter-cultivo a $-20^{\circ}C$ o en un baño de hielo con alcohol hasta que la porción acuosa se congele.
- 7.- Rápidamente separar la capa etérea y colocarla en un tubo con tapón de rosca limpio. Si se considera necesario, adicionar $CaCl_2$ anhidro al extracto etéreo para eliminar el agua residual.
- 8.- Inyectar $14 \mu l$ del extracto en la columna de un cromatógrafo gas-líquido.
- 9.- Identificar los ácidos grasos volátiles por comparación de los tiempos de elución (retención) de los productos en los extractos con una mezcla conocida de ácidos tratada bajo las mismas condiciones y el mismo día.

AISLAMIENTO DE Clostridium difficile A PARTIR DE MUES--
TRAS FECALES TRATADAS CON ETANOL ABSOLUTO.

Procedimiento:

- 1.- Preparar diluciones en serie de 10 (10^{-1} a 10^{-7}) -
de la muestra problema con Caldo Infusión Cerebro
Corazón (BHI).
- 2.- De la primera dilución tomar 0.5 ml y mezclarlos -
con un volumen igual de etanol absoluto (esterili-
zado por tindalización) y dejar reposar durante --
1 hora a temperatura ambiente. Proceder de igual -
manera con las demás diluciones.
- 3.- Tomar 0.1 ml de cada mezcla e inocular en Agar In-
fusión Cerebro Corazón suplementado con hemina, vi
tamina K_1 , cisteína y sangre desfibrinada de caba-
llo (almacenado a temperatura ambiente y en condi-
ciones de anaerobiosis al menos dos días antes de
su uso).
- 4.- Incubar a 37°C durante 48 horas en condiciones de
anaerobiosis.
- 5.- Identificar al microorganismo aislado de acuerdo a
los siguientes criterios: morfología cultural, - -
reacciones bioquímicas y cromatografía gas-líquido
de productos extracelulares.

DETECCION DE Clostridium difficile EN MUESTRAS FECALES
POR INMUNOFUORESCENCIA DIRECTA.

Procedimiento:

- 1.- Inmunización de conejos con cepas toxigénicas de -
Clostridium difficile para la obtención del suero
correspondiente (suero anti-Clostridium difficile).
- 2.- Selección del suero para conjugación:
 - (a) Hacer frotis de las cepas utilizadas en la inmuni-
zación de los conejos y fijarlos con etanol absolu-
to durante 5 minutos.
 - (b) Lavar con solución salina amortiguada con fosfatos
(PBS) pH = 7.2
 - (c) Cubrir los frotis con los sueros obtenidos después
de concluido el esquema de inmunización e incubar-
los durante 1 hora a 25°C y 100% de humedad relati-
va.
 - (d) Lavar con PBS (pH = 7.2).
 - (e) Cubrir nuevamente los frotis pero ahora con anti-
gammaglobulina de conejo marcada con isotiocianato
de fluoresceína e incubar durante 1 hora a 25°C y
100% de humedad relativa.
 - (f) Lavar con PBS (pH = 7.2) y secar.
 - (g) Examinar con microscopio de luz UV eligiendo aque-
llos sueros que muestren mayor fluorescencia.
- 3.- Preparación del conjugado fluorescente:

- (a) Separar la fracción globulínica de los sueros seccionados mediante precipitación con solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
- (b) Determinar la concentración de proteína obtenida usando el método de Biuret.
- (c) Adicionar isotiocianato de fluoresceína en la siguiente proporción: 30 mg de fluorocromo/g de proteína.
- (d) Incubar durante 2.5 horas a temperatura ambiente.
- (e) Eliminar el exceso de isotiocianato de fluoresceína con diálisis repetitivas en PBS (pH = 9.0) a 4°C .
- (f) Agregar 0.1% de azida de sodio al conjugado y conservarlo a 4°C protegido de la luz.

4.- Procesamiento de la muestra:

- (a) Realizar extensiones de las muestras fecales en estudio sobre un portaobjetos y fijarlas con etanol absoluto durante 15 minutos.
- (b) Lavar con PBS (pH = 7.2).
- (c) Cubrir las preparaciones con el conjugado fluorescente (diluido 1:20) durante 30 minutos a 25°C y 100% de humedad relativa.
- (d) Lavar la preparación con PBS (pH = 7.2) y cubrir con la misma solución durante 10 minutos.
- (e) Secar y examinar con microscopio de luz UV repor--

tándose con cruces la intensidad de la fluorescencia observada (0 a ++++). Considerar como resultado positivo aquella fluorescencia mayor de ++ y como negativa la menor de ++.

- (f) Montar un control positivo, empleando las cepas de Clostridium difficile utilizadas en la inmunización de los conejos.

DETECCION DE LAS TOXINAS DE Clostridium difficile EM- -
PLEANDO CULTIVOS CELULARES.

Procedimiento:

- 1.- Centrifugar las evacuaciones problema a 10,000 rpm en una centrífuga refrigerada (4°C) durante 30 minutos; si éstas no son líquidas se prepara un extracto acuoso de las mismas, adicionando el mismo volumen de solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) $\text{pH} = 7.2$
- 2.- Separar y filtrar el sobrenadante a través de un filtro Millipore (membrana con poro de 0.45μ de diámetro) o bien separar y mezclar el sobrenadante con los siguientes antibióticos: penicilina G - - 100 U/ml, estreptomycin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, polimixina - - 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, neomicina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y anfotericina B -- 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- 3.- Tripsinizar el monoestrato celular elegido para -- llevar a cabo la prueba con una suspensión de tripsina al 25% y resuspender con medio condicionado - para su desarrollo.
- 4.- Ajustar la concentración celular a aproximadamente 75,000 células/ml de suspensión.
- 5.- Colocar en cada pozo de la placa para microtitulación 1 ml de la suspensión celular e incubar a - - 37°C bajo atmósfera que contenga 5 a 10% de CO_2 du

- rante 24 horas.
- 6.- Preparar diluciones en serie de 10 de los filtrados de las evacuaciones con PBS (pH = 7.2) e inocular alicuotas de 50 μ l de cada una de ellas en los pozos correspondientes de las placas previamente preparadas.
 - 7.- Incubar a 37°C en atmósfera que contenga 5 a 10% de CO₂ durante 48 horas, examinando los cultivos - cada hora durante las primeras 8 horas y después a las 24 y 48 horas, con el fin de detectar cualquier cambio en la morfología celular.
 - 8.- Como control positivo deberán emplearse diluciones del sobrenadante del cultivo de una cepa toxigénica de Clostridium difficile y como negativo, solución PBS.

Todos los filtrados que muestren evidencias de citotoxicidad deberán someterse a neutralización con la antitoxina específica; para tal efecto, se repite el mismo procedimiento sólo que ahora antes de inocular las alicuotas del filtrado es necesario la incubación previa de partes iguales de éstas y de la antitoxina diluida 1:25 durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se procede en la misma forma que se ha indicado. La antitoxina empleada en este caso está preparada en conejos y contiene an

DETECCION DE LAS TOXINAS DE Clostridium difficile EM- -
PLEANDO CULTIVOS CELULARES.

Procedimiento:

- 1.- Centrifugar las evacuaciones problema a 10,000 rpm en una centrífuga refrigerada (4°C) durante 30 minutos; si éstas no son líquidas se prepara un extracto acuoso de las mismas, adicionando el mismo volumen de solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) $\text{pH} = 7.2$
- 2.- Separar y filtrar el sobrenadante a través de un filtro Millipore (membrana con poro de 0.45μ de diámetro) o bien separar y mezclar el sobrenadante con los siguientes antibióticos: penicilina G - - 100 U/ml, estreptomicina $50 \mu\text{g/ml}$, polimixina - - $100 \mu\text{g/ml}$, neomicina $100 \mu\text{g/ml}$ y anfotericina B -- $25 \mu\text{g/ml}$.
- 3.- Tripsinizar el monoestrato celular elegido para -- llevar a cabo la prueba con una suspensión de tripsina al 25% y resuspender con medio condicionado para su desarrollo.
- 4.- Ajustar la concentración celular a aproximadamente 75,000 células/ml de suspensión.
- 5.- Colocar en cada pozo de la placa para microtitulación 1 ml de la suspensión celular e incubar a - - 37°C bajo atmósfera que contenga 5 a 10% de CO_2 du

- rante 24 horas.
- 6.- Preparar diluciones en serie de 10 de los filtrados de las evacuaciones con PBS (pH = 7.2) e inocular alicuotas de 50 μ l de cada una de ellas en los pozos correspondientes de las placas previamente preparadas.
 - 7.- Incubar a 37°C en atmósfera que contenga 5 a 10% de CO₂ durante 48 horas, examinando los cultivos - cada hora durante las primeras 8 horas y después a las 24 y 48 horas, con el fin de detectar cualquier cambio en la morfología celular.
 - 8.- Como control positivo deberán emplearse diluciones del sobrenadante del cultivo de una cepa toxigénica de Clostridium difficile y como negativo, solución PBS.

Todos los filtrados que muestren evidencias de citotoxicidad deberán someterse a neutralización con la antitoxina específica; para tal efecto, se repite el mismo procedimiento sólo que ahora antes de inocular las alicuotas del filtrado es necesario la incubación previa de partes iguales de éstas y de la antitoxina diluida 1:25 durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se procede en la misma forma que se ha indicado. La antitoxina empleada en este caso está preparada en conejos y contiene an

ticuerpos frente a las dos toxinas de Clostridium diffi-
cile (A y B).

Se consideran positivos aquellos filtrados que adem
más de provocar efectos citopáticos en el 100% de las -
células tratadas sean neutralizados con la antitoxina -
específica.

Se consideran negativos aquellos filtrados que aund
que induzcan cambios en la morfología celular no sean -
neutralizados con la antitoxina específica.

DETECCION DE LAS TOXINAS DE Clostridium difficile EN --
MUESTRAS FECALES POR CONTRAINMUNOELECTROFORESIS.

Procedimiento:

- 1.- Si las muestras son sólidas, diluir 1:2 con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) pH=7.2 y centrifugar a 10,000 rpm durante 30 minutos; si éstas son líquidas sólo centrifugar a la misma velocidad y tiempo, no hacer dilución.
- 2.- Filtrar a través de un filtro Millipore (membrana con poro de 0.45 μ de diámetro) y mantener en refrigeración el filtrado hasta efectuar la prueba.
- 3.- Preparar las placas de gel de agarosa (10 x 7 cm) practicando en ellas pozos de 3 mm de diámetro con una separación de 10 mm entre cada uno.
- 4.- Colocar 10 μ l de antitoxina de Clostridium difficile y de filtrado en los pozos que corresponden al ánodo y cátodo respectivamente.
- 5.- Llevar a cabo la electroforesis empleando el sistema de enfriamiento adecuado.
- 6.- Condiciones para la electroforesis:
 - a. Amortiguador: dietil-barbiturato acetato pH=8.2 (fuerza iónica=0.05).
 - b. Voltaje: 100 V
 - c. Intensidad de la cámara: 35 a 40 mA
 - d. Tiempo de corrimiento: 45 a 60 minutos

7.- Incluir control positivo y negativo:

Positivo: sobrenadante del cultivo de una cepa toxigénica de Clostridium difficile.

Negativo: Solución salina amortiguada con fosfatos (pH = 7.2).

8.- Observar si existe la formación de bandas de precipitación.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Allo M., Silva J., Fekety R., Rifkin G. D. and Was-
kin H. "Prevention of clindamycin-induced colitis -
in hamsters by Clostridium sordellii antitoxin". --
Gastroenterology. 76: 351-355. (1979).
- 2.- Aronsson B., Ganström M., Möllby R. and Nord C. E.
"Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for anti-
bodies to Clostridium difficile toxins in patients
with pseudomembranous colitis and antibiotic asso-
ciated diarrhoea". J. Immunol. Methods. 60: 341-350.
(1983).
- 3.- Aswell J. E., Ehrich M., Van Tassell R. L., Tsai --
Ch-Ch., Holdeman L. V. and Wilkins T. D. MICROBIOLO-
GY. Characterization and comparison of Clostridium
difficile and other clostridial toxins. American So-
ciety for Microbiology. Washington, D. C. (1979).
- 4.- Bailey W. R., Scott E. G. DIAGNOSTICO MICROBIOLOGI-
CO. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, (1973).
- 5.- Bartlett J. G. "Antibiotic-associated colitis". Cli-
nics in Gastroenterology. 8(3): 783-801. (1979).
- 6.- Bartlett J. G. MICROBIOLOGY. Antimicrobial agent-
associated pseudomembranous colitis in patients. --
American Society for Microbiology. Washington, D. C.
(1979).

- 7.- Bartlett J. G. "Experimental studies of antibiotic-associated colitis". Scand. J. Infect. Dis. (Suppl) 22: 11-15. (1980).
- 8.- Bartlett J. G. "Antimicrobial agents implicated in Clostridium difficile toxin-associated colitis". -- Johns Hopkins Med. J. 149: 6-9. (1981).
- 9.- Bartlett J. G., Chang T. W., Gurwith M., Gorbach Sh. L. and Onderdonk A. B. "Antibiotic-associated colitis due to toxin-producing clostridia". N. Engl. J. Med. 298(10): 531-534. (1978).
- 10.- Bartlett J. G., Chang T. W., Moon N. and Onderdonk A. B. "Antibiotic-induced lethal enterocolitis in -- hamsters: studies with eleven agents and evidence -- to support the pathogenic role of toxin-producing -- clostridia". Am. J. Vet. Res. 39(9): 1525-1530. (1978).
- 11.- Bartlett J. G., Willey S. H., Chang T. W. and Lowe B. "Cephalosporin-associated pseudomembranous colitis due to Clostridium difficile". JAMA. 242(24): 2683-2685. (1979).
- 12.- 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". J. Infect. Dis. 36(5): 701-705. (1977).
- 13.- Bartlett J. G., Taylor N. S., Chang T. W. and Dzink J. "Clinical and laboratory observations in Clostri-

- diu difficile colitis". Am. J. Clin. Nutr. 33: 2521-2526. (1980).
- 14.- Bartlett J. G., Tedesco F. J., Shull S., Lowe B. -- and Chang T. W. "Symptomatic relapse after oral vancomycin therapy of antibiotic-associated pseudomembranous colitis". Gastroenterology. 78(3): 431-434. (1980).
- 15.- Batts D. H., Martin D., Holmes R., Silva J. and Fekeky R. "Treatment of antibiotic-associated Clostridium difficile diarrhea with oral vancomycin". J. - Pediatr. 97(1): 151-153. (1980).
- 16.- BBL, MANUAL DE PRODUCTOS Y PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO. Editores Asociados, S. A. México, (1974).
- 17.- Blazevic D. J., Ederer G. M. PRINCIPLES OF BIOCHEMICAL TESTS IN DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY. John Wiley -- and Sons, Inc. New York, (1975).
- 18.- Bolton R. P. "Clostridium difficile-associated colitis after neomycin treated with metronidazole". Br. Med. J. 2(6203): 1479-1480. (1979).
- 19.- Borriello S. P. and Honour P. "Simplified procedure for the routine isolation of Clostridium difficile from faeces". J. Clin. Pathol. 34(10): 1124-1127. - (1981).
- 20.- Borriello S. P., Honour P. and Barclay F. "Cross-infection and Clostridium difficile". Lancet. 2(8299):

661. (1982).
- 21.- Boriello S. P., Jones R. H. and Phillips I. "Rifampicin-associated pseudomembranous colitis". Br. Med. J. 281(6249): 1180-1181. (1980).
- 22.- Bowden T. A., Mansberger A. R. and Lykins L. E. - - "Pseudomembranous enterocolitis: mechanism of restoring floral homeostasis". Am. Surg. 47(4): 178-183. (1981).
- 23.- Brettle R. P., Poxton L. R., Murdoch J. Mc C., - - Brown R., Byrne M. D. and Collee J. G. "Clostridium difficile in association with sporadic diarrhoea". Br. Med. J. 284: 230-233. (1982).
- 24.- Brook I. "Isolation of toxin producing Clostridium difficile from two children with oxacillin and dicloxacillin-associated diarrhea". Pediatrics. 65(6): 1154-1156. (1980).
- 25.- Bryskier A., Doll J., Labro M. T. et Andrieu J. - - "Rôle de Clostridium difficile et de sa toxine dans les colites pseudo-membraneuses". Ann. Biol. Clin. 39(1): 1-8. (1981).
- 26.- Cruickshank R., Duguid J. P., Swan R. H., Marmion R. H. MEDICAL MICROBIOLOGY. Vol. II, 12th ed., Longman Inc. USA, (1975).
- 27.- Chang T. W., Bartlett J. G. and Taylor N. S. "Clostridium difficile toxin". Pharmac. Ther. 13(3): - -

- 441-452. (1981).
- 28.- Chang T. W., Gorbach Sh. L. and Bartlett J. G. "Neutralization of Clostridium difficile toxin by Clostridium sordellii antitoxins". Infect. Immun. 22(1): 418-422. (1978).
- 29.- Chang T. W., Gorbach Sh. L. and Bartlett J. G. "Inhibition of binding of Clostridium difficile toxin by steroids". J. Infect. Dis. 142(1): 113. (1980).
- 30.- Chang T. W., Gorbach Sh. L., Bartlett J. G. and Sagainur R. "Bacitracin treatment of antibiotic-associated colitis and diarrhea caused by Clostridium difficile toxin". Gastroenterology. 78(6): 1584-1586. (1980).
- 31.- Chang T. W., Lauermann M. and Bartlett J. G. "Cytotoxicity assay in antibiotic-associated colitis". J. Infect. Dis. 140(5): 765-770. (1979).
- 32.- Chang T. W., Lin P. S., Gorbach Sh. L. and Bartlett J. G. "Ultrastructural changes of cultured human amnion cells by Clostridium difficile toxin". Infect. Immun. 23(3): 795-798. (1979).
- 33.- Davis B. D., Dulbecco R., Eisen H. M. and Ginsberg H. S. MICROBIOLOGY. 3th ed., Harper and Row Medical Publishers Inc. USA, (1980).
- 34.- Donta S. T. and Shaffer S. J. "Effects of Clostridium difficile toxin on tissue-cultured cells". In-

- fect. Dis. 141(2): 218-222. (1980).
- 35.- Donta S. T., Sullivan N. and Wilkins T. D. "Differential effects of Clostridium difficile toxins on tissue-cultured cells". J. Clin. Microbiol. 15(6): 1157-1158. (1982).
- 36.- Dzik J. and Bartlett J. G. "In vitro susceptibility of Clostridium difficile isolates from patients with antibiotic-associated diarrhea or colitis". Antimicrob. Agents Chemother. 17(4): 695-698. (1980).
- 37.- Ehrich M., Van Tasell R. L., Libby J. M. and Wilkins T. D. "Production of Clostridium difficile antitoxin". Infect. Immun. 28(3): 1041-1043. (1980).
- 38.- Elsdon S. R., Hiron M. G. and Waller J. M. "The end products of the metabolism of aromatic aminoacids - by clostridia". Arch. Microbiol. 107: 283-288. (1976).
- 39.- Fekety R. MICROBIOLOGY. Prevention and treatment of antibiotic-associated colitis. American Society for Microbiology. Washington, D. C. (1979).
- 40.- Fekety R., Kim K-H., Batts D. H., Browne R. A., Cudmore M. A., Silva J., Toshniwal R. and Wilson K. H. "Studies on the epidemiology of antibiotic-associated Clostridium difficile colitis". Am. J. Clin. -- Nutr. 33: 2527-2532. (1980).
- 41.- Fekety R., Kim K-H., Brown D., Batts D. H., Cudmore M. and Silva J. "Epidemiology of antibiotic asso-

- ciated colitis; isolation of Clostridium difficile from the hospital environment". Am. J. Med. 70(4): 906-908. (1981).
- 42.- Finch R. G., Mc Kim Thomas H. J., Lewis M. J., Slack R. C. B. and George R. H. "Relapse of pseudomembranous colitis after vancomycin therapy". Lancet. 2: 1076-1077. (1979).
- 43.- Friedman R. J., Mayer I. E., Galambos J. T. and - - Hersh T. "Oxacillin-induced pseudomembranous colitis". A. J. Gastroenterol. 73(5): 445-447. (1980).
- 44.- Gantz N. M., Zawacki J. K., Dickerson J. and Bartlett J. G. "Pseudomembranous colitis associated - - with erythromycin". Ann. Intern. Med. 91(6): 866-867. (1979).
- 45.- George R. H., Symonds J. M., Dimock F., Brown J. D., Arabi Y., Shinagawa N., Keighley M. R. B., Alexander-Williams J. and Burdon D. W. "Identification of Clostridium difficile as a cause of pseudomembranous colitis". Br. Med. J. 1(6114): 695. (1978).
- 46.- George W. L., Goldstein E. J. C., Sutter V. L., Ludwig Sh. L. and Finegold S. M. "Aetiology of antimicrobial-agent-associated colitis". Lancet. 1(8068): 802-803. (1978).
- 47.- George W. L., Kirby B. D., Sutter V. L. and Finegold S. M. MICROBIOLOGY. Antimicrobial susceptibili

- ty of Clostridium difficile. American Society for Microbiology. Washington, D. C. (1979).
- 48.- George W. L., Rolfe R. D. and Finegold S. M. "Treatment and prevention of antimicrobial agent-induced colitis and diarrhea". Gastroenterology. 70(2): - - 366-372. (1980).
- 49.- George W. L., Sutter V. L., Citron D. and Finegold S. M. "Selective and differential medium for isolation of Clostridium difficile". J. Clin. Microbiol. 9(2): 214-219. (1979).
- 50.- Gill C. J. and Pallasch T. J. "Clindamycin associated pseudomembranous colitis: a potentially fatal - adverse drug reaction", JADA. 102: 507-509. (1981).
- 51.- Hafiz S., Mc Entegart M. G., Morton R. S. and Waitings S. A. "Clostridium difficile in the urogenital tract of males and females". Lancet. 1(7904): - 420-421. (1975).
- 52.- Hafiz S. and Oakley C. L. "Clostridium difficile: - isolation and characteristics". J. Med. Microbiol. 9: 129-137. (1976).
- 53.- Holst E., Helin I. and Mardh P-A. "Recovery of Clostridium difficile from children". Scand. J. Infect. Dis. 13: 41-45. (1981).
- 54.- Hughes S., Warhurst G., Turnberg L. A., Higgs N. B., Giugliano L. G. and Drasar B. S. "Clostridium diffi-

- cile toxin-induced intestinal secretion in rabbit - ileum in vitro". Gut. 24: 94-98. (1983).
- 55.- Humphrey C. D., Condon C. W., Cantley J. R. and Pittman F. E. "Partial purification of a toxin found in hamsters with antibiotic-associated colitis". Gastroenterology. 76: 468-476. (1979).
- 56.- Jarvis W., Nunez-Montiel O., Thompson F., Dowell V., Towns M., Morris G. and Hill E. "Comparison of bacterial isolation, cytotoxicity assay and counter-immunoelectrophoresis for the detection of Clostridium difficile and its toxin". J. Infect. Dis. 147(4): 778. (1983).
- 57.- Kim K.-H., Fekety R., Batts D. H., Brown D., Cudmore M., Silva J. and Waters D. "Isolation of Clostridium difficile from the environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis". J. Infect. Dis. 143(1): 42-50. (1981).
- 58.- Koneman E. W., Allen S. D., Dowell V. R., Sommers H. M. COLOR ATLAS AND TEXTBOOK OF DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY. 1st ed., J. B. Lippincott Co. USA, (1979).
- 59.- Kreutzer E. W. and Milligan F. D. "Treatment of antibiotic-associated pseudomembranous colitis with cholestyramine resin". Johns Hopkins Med. J. 143(3): 67-72. (1978).
- 60.- Kurzynski T. A., Cembrowski G. S. and Kimball J. L.

- "The use of CIE for detection of Clostridium difficile toxin in stool filtrates: laboratory and clinical correlation". Am. J. Clin. Pathol. 79(3): 370 - 374. (1983).
- 61.- Larson H. E., Parry J. V., Price A. B., Davies D. R., Dolby J. and Tyrrell D. A. J. "Undescribed toxin in pseudomembranous colitis". Br. Med. J. 1: 1246-1248. (1977).
- 62.- Larson H. E. and Price A. B. "Pseudomembranous colitis: presence of clostridial toxin". Lancet. 2: 1312-1314. (1977).
- 63.- Larson H. E., Price A. B., Honour P. and Borriello S. P. "Clostridium difficile and the aetiology of pseudomembranous colitis". Lancet. 1(8073): 1063-1066. (1978).
- 64.- Lennete E. H., Balows A., Hausler W. J., Truant J. MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA. 3a. ed., Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, (1982).
- 65.- Levine H. G., Kennedy M. and La Mont J. T. "Counter immunoelectrophoresis vs. cytotoxicity assay for detection of Clostridium difficile". J. Infect. Dis. 145(3): 398. (1982).
- 66.- Libby J. M. and Wilkins T. D. "Production of antitoxins to two toxins of Clostridium difficile and immunological comparison of the toxins by cross neu

- tralization studies". *Infect. Immun.* 35(1): 374-376. (1982).
- 67.- Libby J. M., Jortner B. S. and Wilkins T. D. "Effects of the two toxins of Clostridium difficile in antibiotic associated cecitis in hamsters". *Infect. - Immun.* 36(2): 822-829. (1982).
- 68.- Lyerly D. M., Lockwood D. E., Richardson S. H. and Wilkins T. D. "Biological activities of toxins A -- and B of Clostridium difficile". *Infect. Immun.* - - 35(3): 1147-1150. (1982).
- 69.- Lyerly D. M., Sullivan N. M. and Wilkins T. D. "Enzyme-linked immunosorbent assay for Clostridium difficile toxin A". *J. Clin. Microbiol.* 17(1): 72-78. (1983).
- 70.- Mac Fadin J. F. *BIOCHEMICAL TESTS FOR IDENTIFICATION OF MEDICAL BACTERIA*. 1st ed., Williams and Wilkins Co. Baltimore, (1976).
- 71.- Malamou-Ladas H. and Tabaqchali S. "Inhibition of Clostridium difficile by faecal streptococci". *J. - Med. Microbiol.* 15: 569-574. (1982).
- 72.- Marrie T. J., Faulkner R. S., Badley B. W. D., Hartlen M. R., Comeau R. T. and Miller H. R. "Pseudomembranous colitis: isolation of two species of cytotoxic clostridia and successful treatment with vancomycin". *Can. Med. Assoc. J.* 119(4): 1058-1060. (1978).

- 73.- Melange M., Vanheurverzwyn R., Fiasse R., Bommelaer G., Larpent J. L., Rumeau J. L. and Ribet A. "Pseudomembranous colitis and rifampicin". *Lancet*. 2(8205): 1192. (1980).
- 74.- Moar J. J. and Silva J. "Pseudomembranous enterocolitis and the aetiological role of Clostridium difficile; an overview of the recent literature". *S. Afr. Med. J.* 60(16): 623-625. (1981).
- 75.- Mogg G. A., Keighley R. B., Burdon D. W., Williams J. A., Youngs D., Johnson M., Bentley S. and George R. H. "Antibiotic-associated colitis - a review of 66 cases". *Br. J. Surg.* 66: 738-742. (1979).
- 76.- Morgan R. J., Gemmel C. G., Lang W., Lee F. D. and Russell R. I. "Clostridium difficile from the stool of a patient with pseudomembranous colitis following ampicillin plus flucloxacillin (Magnapen) therapy". *Postgrad. Med. J.* 56: 65-66. (1980).
- 77.- Moss C. W. and Nunez-Montiel O. L. "Analysis of short chain acids from bacteria by gas-liquid chromatography with a fused silica capillary column". *J. Clin. Microbiol.* 15(2): 308-311. (1982).
- 78.- Mulligan M. E., George W. L., Rolfe R. D. and Finegold S. M. "Epidemiological aspects of Clostridium difficile induced diarrhea and colitis". *Am. J. Clin. Nutr.* 33: 2533-2538. (1980).

- 79.- Mulligan M. E., Rolfe R. D., Finegold S. M. and - -
George W. L. "Contamination of a hospital environ--
ment by Clostridium difficile". Curr. Microbiol. --
3(3): 173-175. (1979).
- 80.- Nakamura R. M., Dito R. W. and Tucker III E. S. LA-
BORATORY AND RESEARCH METHODS IN BIOLOGY AND MEDICI-
NE. Vol. 3. Immunoassays in the Clinical Laboratory
Alan R. Liss Inc. New York, (1979).
- 81.- Nakamura Sh., Mikawa M., Nakashio S., Takabatake M.,
Okado I., Yamakawa K., Serikawa T., Okamura S. and
Nishida S. "Isolation of Clostridium difficile from
the feces and the antibody in sera of young and el-
derly adults". Microbiol. Immunol. 25(4): 345-351.
(1981).
- 82.- Nakamura Sh., Nakashio S., Inamatsu T., Nishida N.,
Taniguchi N. and Nishida S. "Toxigenicity of Clos--
tridium difficile isolates from patients and heal--
thy adults". Microbiol. Immunol. 24(10): 995-997. -
(1980).
- 83.- Nakamura Sh., Nakashio S., Mikawa M., Yamakawa K.,
Okamura S. and Nishida S. "Antimicrobial susceptibi-
lity of Clostridium difficile from different sour--
ces". Microbiol. Immunol. 26(1): 25-30. (1982).
- 84.- Nakamura Sh., Serikawa T., Mikawa M., Nakashio S.,
Yamakawa K. and Nishida S. "Agglutination, toxigeni

- city and sorbitol fermentation of Clostridium difficile". Microbiol. Immunol. 25(9): 863-870. (1981).
- 85.- Nunez-Montiel O. L., Thompson F. S. and Dowell V. R. "Norleucine-tyrosine broth for rapid identification of Clostridium difficile by gas-liquid chromatography". J. Clin. Microbiol. 17(2): 382-385. (1983).
- 86.- O' Connor T. W. "Pseudomembranous enterocolitis: a historical and clinical review". Dis. Colon Rectum. 24: 445-448. (1981).
- 87.- O' Meara T. F. and Simmons R. A. "Carbenicillin and pseudomembranous enterocolitis". Ann. Intern. Med. 92: 440-441. (1980).
- 88.- Onderdonk A. B. and Bartlett J. G. "The biological and clinical significance of Clostridium difficile". CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 13(3): 161-172. (1981).
- 89.- Onderdonk A. B., Cisneros R. L. and Bartlett J. G. "Clostridium difficile in gnotobiotic mice". Infect. Immun. 28(1): 277-282. (1980).
- 90.- Pashby N. L., Bolton R. P. and Sherriff R. J. "Oral metronidazole in Clostridium difficile colitis". Br. Med. J. 1(6178): 1605-1606. (1979).
- 91.- 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. 34: 642-644. (1981).

- 92.- Portnoy D., Anantrai S., Murray D. and Richards G. K. "Pseudomembranous colitis: multiple relapses after treatment with metronidazole". *Can. Med. Assoc. J.* 124(12): 1603-1605. (1981).
- 93.- Potvliege C., Labbé M. and Yourassowsky E. "Gas-liquid chromatography as screening test for Clostridium difficile". *Lancet.* 2(8255): 1105. (1981).
- 94.- Poxton I. R. and Byrne M. D. "Immunological analysis of the EDTA-soluble antigens of Clostridium difficile and related species". *J. Gen. Microbiol.* -- 122: 41-46. (1981).
- 95.- Poxton I. R. and Byrne M. D. "Detection of Clostridium difficile toxin by counterimmunoelectrophoresis: a note of caution". *J. Clin. Microbiol.* 14(3): 349. (1981).
- 96.- Poxton I. R. and Cartmill Ivor T. D. "Immunochemistry of cell-surface carbohydrate antigens of Clostridium difficile". *J. Gen. Microbiol.* 128: 1365 - 1370. (1982).
- 97.- Price A. B. and Davies D. R. "Pseudomembranous colitis". *J. Clin. Pathol.* 30: 1-12. (1977).
- 98.- Rifkin G. D., Fekety F. R., Silva J. and Sack R. B. "Antibiotic-induced colitis implication of a toxin neutralized by Clostridium sordellii antitoxin". -- *Lancet.* 2(8048): 1103-1106. (1977).

- 99.- Roberts R. K. and Seneviratne E. "Vancomycin therapy Clostridium difficile". Med. J. Aust. 2: 98. -- (1980).
- 100.- Rolfe R. D. and Finegold S. M. "Purification and - characterization of Clostridium difficile toxin". Infect. Immun. 25(1): 191-201. (1979).
- 101.- Rolfe R. D. and Finegold S. M. "Inhibitory interac- tions between normal fecal flora and Clostridium - difficile". Am. J. Clin. Nutr. 33: 2539. (1980).
- 102.- Rolfe R. D., Helebian Sh. and Finegold S. M. "Bac- terial interference between Clostridium difficile and normal fecal flora". J. Infect. Dis. 143(3): - 470-475. (1981).
- 103.- Ryan R. M., Kwasnik I. and Tilton R. C. "Rapid de- tection of Clostridium difficile toxin in human fe- ces". J. Clin. Microbiol. 12(6): 776-779. (1980).
- 104.- Saadah H. A. "Carbenicillin and pseudomembranous - enterocolitis". Ann. Intern. Med. 93(4): 645. (1980).
- 105.- Saginur R., Hawley Ch. R. and Bartlett J. G. "Coli- tis associated with metronidazole therapy". J. In- fect. Dis. 141(6): 772-774. (1980).
- 106.- Sands M., Yungbluth M. and Sommers H. M. "The non- value of counterimmunoelectrophoresis for the di- - rect rapid detection of Clostridium difficile to- - xin in stool filtrates". Am. J. Clin. Pathol. 79(3):

375-377. (1933).

- 107.- Shuttleworth R., Taylor M. and Jones D. M. "Antimicrobial susceptibilities of Clostridium difficile". J. Clin. Pathol. 33: 1002-1005. (1980).
- 108.- Silva J., Batts D. B., Fekety R., Plouffe J. F., Rifkin G. D. and Baird I. "Treatment of Clostridium difficile colitis and diarrhea with vancomycin". Am. J. Med. 71: 815-822. (1981).
- 109.- Silva J. and Fekety F. R. "Clostridia and antimicrobial enterocolitis". Ann. Rev. Med. 32: 327-333. (1981).
- 110.- Smith L. D. S. and Hobbs G. BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. 8th ed., Williams and Wilkins Co. USA, (1974).
- 111.- Sonnerwirth A. C. and Jarrett L. GRADWOHL'S CLINICAL LABORATORY METHODS AND DIAGNOSIS. Vol. 2, 8th ed., C. V. Mosby Co. USA, (1980).
- 112.- Stark P. L., Lee A. and Parsonage B. D. "Colonization of the large bowel by Clostridium difficile in healthy infants: quantitative study". Infect. Immun. 35(3): 895-899. (1982).
- 113.- Sullivan N. M., Pellet S. and Wilkins T. D. "Purification and characterization of toxins A and B of Clostridium difficile". Infect. Immun. 35(3): 1032-1040. (1983).

- 114.- Taylor N. S. and Bartlett J. G. "Partial purification and characterization of cytotoxin from Clostridium difficile". Rev. Infect. Dis. 1: 379-385. (1979).
- 115.- Taylor N. S. and Bartlett J. G. "Binding of Clostridium difficile cytotoxin and vancomycin by anion-exchange resins". J. Infect. Dis. 141(1): 92-97. (1980).
- 116.- Taylor N. S., Thorne G. M. and Bartlett J. G. "Separation of an enterotoxin from the cytotoxin of Clostridium difficile". Clin. Res. 28: 285 A (1980).
- 117.- Taylor N. S., Thorne G. M. and Bartlett J. G. "Comparison of two toxins produced by Clostridium difficile". Infect. Immun. 34(3): 1036-1043. (1981).
- 118.- Tedesco F. J. "Bacitracin therapy in antibiotic-associated colitis". Dig. Dis. Sci. 25(10): 783-784. (1980).
- 119.- Tedesco F. J. "Antibiotic-associated colitis an abating enigma". J. Clin. Gastroenterol. 3(3): 221-224. (1981).
- 120.- Thomson G., Clark A. H., Hare K. and Spilg W. G. "Pseudomembranous colitis after treatment with metronidazole". Br. Med. J. 282(6267): 864-865. (1981).
- 121.- Van Vunakis H. METHODS IN ENZYMOLOGY. Part A, Vol. 70, Immunochemical Techniques. Academic Press. New

York, (1980).

- 122.- Varel V. H. and Bryant M. P. "Nutritional features of Bacteroides fragilis subsp. fragilis". Appl. Microbiol. 18(2): 251-257. (1974).
- 123.- Viscidi R., Laughon B. E., Yolken R., Bo-Linn P., Moench T., Ryder R. W. and Bartlett J. G. "Serum - antibody response to toxins A and B of Clostridium difficile". J. Infect. Dis. 148(1): 93-100. (1983).
- 124.- Welch D. F., Menge S. K. and Matsen J. M. "Identification of toxigenic Clostridium difficile by - - counterimmunoelectrophoresis". J. Clin. Microbiol. 11(5): 470-473. (1980).
- 125.- West S. E. H. and Wilkins T. D. "Problems associated with counterimmunoelectrophoresis assays for - detecting Clostridium difficile toxin". J. Clin. - Microbiol. 15(2): 347-349. (1982).
- 126.- Wilkinson I. J., Rich G., Moore B. and Philpot R. "Relapse of antibiotic-associated colitis after -- vancomycin therapy". Med. J. Aust. 1: 321-323. - - (1980).
- 127.- Wilson K. H. "Efficiency of various bile salt preparations for stimulation of Clostridium difficile spore germination". J. Clin. Microbiol. 18(4): - - 1017-1019. (1983).
- 128.- Wilson K. H., Kennedy M. J. and Fekety F. R. "Use

- of sodium taurocholate to enhance spore recovery - on a medium selective for Clostridium difficile". J. Clin. Microbiol. 15(3): 443-446. (1982).
- 129.- Wilson K. H., Silva J. and Fekety F. R. "Fluorescent-antibody test for detection of Clostridium difficile in stool specimens". J. Clin. Microbiol. 16(3): 464-468. (1982).
- 130.- Willey S. H. and Bartlett J. G. "Cultures for Clostridium difficile in stools containing a cytotoxin neutralized by Clostridium sordellii antitoxin". J. Clin. Microbiol. 10(6): 880-884. (1979).
- 131.- Wu T. C. and Fung J. C. "Evaluation of the usefulness of counterimmunoelectrophoresis for diagnosis of Clostridium difficile-associated colitis in clinical specimens". J. Clin. Microbiol. 17(4): 610 - 613. (1983).
- 132.- Yolken R. H., Whitcomb L. S., Marien G., Bartlett J. D., Libby J., Ehrlich M. and Wilkins T. "Enzyme immunosorbent assay for detection of Clostridium difficile antigen". J. Infect. Dis. 144(4): 378. - (1981).