

11261 2e)
4

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FACULTAD DE MEDICINA

FRECUENCIA DE COLONIZACION POR Clostridium difficile
EN NIÑOS HOSPITALIZADOS Y CARACTERIZACION DE
LAS CEPAS AISLADAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(MICROBIOLOGIA)

PRESENTA

MARGARITA DE LA LUZ CAMORLINGA
PONCE

ASESORES ACADEMICOS:

DR. ONOFRE MUÑOZ HERNANDEZ
DR. FRANCISCO JAVIER TORRES LOPEZ

PROYECTO FINANCIADO POR CONACYT. CLAVE PCSABN - 02154

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	Página
INTRODUCCION	1
MATERIAL	31
METODOS	36
RESULTADOS	50
DISCUSION Y CONCLUSIONES	69
RESUMEN	83
REFERENCIAS	85

INTRODUCCION:

ANTECEDENTES HISTORICOS

La colitis inducida por antibióticos se reconoció como una complicación iatrogénica desde 1950 y se puede manifestar en forma benigna o en forma grave, potencialmente letal, conocida como colitis pseudomembranosa (CPM)^{23,70}.

Desde 1880 se reconoció a la CPM como una entidad clínica grave, aun antes del descubrimiento de los antibióticos, asociándose su etiología a factores tales como uremia, fractura espinal, intoxicación por metales pesados o como complicación de laparotomía exploradora y obstrucción intestinal; estos dos últimos eventos fueron considerados como las causas más frecuentes^{5,29}.

El uso de tetraciclina y cloranfenicol fue la primera asociación descrita relacionada con la CPM³⁸. Staphylococcus aureus fue el primer microorganismo al cual se atribuyó la etiología de la diarrea o enterocolitis que se presentaba con la terapia antimicrobiana. Diversos factores, entre ellos los reportes esporádicos de la enfermedad, influyeron para que durante algún tiempo esta patología permaneciera olvidada. La introducción de la lincomicina y clin-

damicina favoreció el aumento de casos de CPM renaciendo el interés por conocer el mecanismo de patogenicidad relacionado con su producción^{29,38}. A este respecto Larson y cols (1977), encontraron que al probar el sobrenadante de las heces de un paciente con CPM sobre células HeLa (carcinoma de cérvix) y células de riñón de mono Rhesus se ocasionaba efecto citopático sobre éstas⁴⁰.

Small (1968), observó que al administrar lincomicina en hamsters Sirio favorecía el desarrollo de una ileocecit⁶⁹. Posteriormente Barttlet y cols (1977) encontraron que al administrar en forma seriada contenido cecal de hamsters con ileocecit⁸ a hamsters sanos, les producía la misma enfermedad, lo mismo se observó cuando el contenido cecal era filtrado, lo que sugería que el factor desencadenante era toxina⁸. Fekety y cols probaron filtrados de heces de dos pacientes que habían desarrollado CPM, secundaria al uso de antibióticos, encontrando que se producía efecto citopático cuando fue probado sobre fibroblastos humanos²¹; asimismo, observaron que el efecto era neutralizado, cuando se adicionaba a una antitoxina clostridial (mezcla de antitoxinas clostridiales) y específicamente con la antitoxina de C. sordelli^{21,63}. Barttlet y cols (1978) reprodujeron estos resultados; observaron además que se presentaba sobrecreci-

miento de C. difficile, tanto en el contenido cecal de los hamsters tratados con clindamicina como en las muestras de pacientes con diarrea asociada a antibióticos⁷. Estos filtrados libres de células obtenidos de las heces de los pacientes, causaban efecto citotóxico en cultivos celulares y enterocolitis en hamsters. Ambos efectos podían ser neutralizados con antitoxina clostridial^{4,7}. Estas observaciones confirmaron que C. difficile y su citotoxina eran responsables de la colitis inducida por antibióticos. La neutralización de la toxina de C. difficile por antitoxina de C. sordelli se debe a un efecto de cruzamiento inmunológico^{41,63}.

Actualmente se considera que C. difficile puede estar implicado en más del 90% de los casos de CPM; la toxina se detecta en el 98% de estos casos y el bacilo se ha recuperado en el 20 a 25% de los casos de diarrea y colitis asociados al uso de antibióticos en adultos^{26,27}.

CARACTERISTICAS MICROBIOLOGICAS Y TOXIGENICAS DE Clostridium difficile.

METODOS DE LABORATORIO PARA SU IDENTIFICACION.

Clostridium difficile es un bacilo Gram positivo, anaerobio estricto, esporulado y móvil; presenta actividad bio-

química fermentando los carbohidratos con producción de ácido y gas², se diferencia de las otras especies de Clostridium por presentar espora subterminal y por no elaborar lipasa y fosfolipasa además de tener un perfil único de cromatografía de gases: a partir de glucosa produce ácido acético, propiónico, isobutírico, isovalérico y un pico alto de ácido isocaproico como productos finales⁵⁴.

C. difficile elabora dos toxinas: una es la toxina A que es una enterotoxina y otra la toxina B que es una citotoxina⁴⁶. Las diferencias descritas para las dos, se basan en las propiedades observadas después de su separación; utilizando sobrenadantes de cultivos de C. difficile, éstos son filtrados, concentrados y absorbidos a una columna de cromatografía de intercambio iónico (DEAE - sepharosa o DEAE sephadex)⁷². La toxina A eluye con solución de NaCl 0.1-0.2 M y la toxina B con NaCl 0.3-0.5 M^{3,44}. La toxina A ha sido purificada a homogeneidad utilizando diferentes métodos: a) precipitación de la toxina con regulador de acetatos pH5.5, b) cromatografía de afinidad sobre gel de agarosa y elución de la toxina con galactosa, c) electroforesis preparativa en un sistema discontinuo de reguladores²⁵.

La toxina B sólo ha sido purificada parcialmente y el uso de los métodos convencionales para purificación de proteí-

nas han sido inútiles. Los métodos probados incluyen precipitación con sulfato de amonio, precipitación con ácido acético, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de adsorción con hidroxilapatita^{25,72}.

Las dos toxinas presentan diferencias antigénicas⁴⁴, bioquímicas³ y, principalmente, biológicas⁷⁴. Las toxinas A y B también tienen algunas similitudes por ejemplo: son proteínas termolábiles, sensibles a la acción de las proteasas como quimiotripsina, resistentes a la acción de la amilasa y lipasa^{3,25}, tienen un contenido semejante de aminoácidos y ambas son de naturaleza hidrofóbica²⁵. Estas diferencias y similitudes están marcadas en las tablas 1 y 2.

La toxina A es una enterotoxina que presenta actividad citotóxica con una potencia mil veces menor que la toxina B, y da positiva la prueba de asa ligada de conejo con acumulación de líquidos y apariencia hemorrágica del tejido^{46,74}. Esta toxina tiene un peso molecular de 440 000 a 600 000 d, es resistente a valores extremos de pH (4 y 9) y no se inactiva por ADNasa ni ARNasa²⁵.

La toxina B, tiene un peso molecular de 107 000 a 550 000 y se ha demostrado que una preparación homogénea de la ci-

totoxina contiene cinco unidades proteicas citotóxicas relacionadas, con pesos moleculares estimados en 70 000, 160 000, 250 000, 280 000 y 340 000. Es sensible a valores extremos de pH (4 y 9), no es inactivada por ARNasa ni ADNasa, pero sí por metales pesados²⁵.

La toxina B es una citotoxina muy potente, cantidades del orden de 0.08 ng/ml causan arredondamiento de los cultivos y produce la muerte en ratón inoculado por vía intraperitoneal; inoculada al conejo por vía intradérmica le causa una lesión eritematosa y hemorrágica^{20,25}.

El aislamiento de C. difficile se hace con apoyo de varios medios selectivos y diferenciales, el más utilizado es el medio desarrollado por George y cols (1979), suplementado con cicloserina 500 mg/l, cefoxitina 16 mg/l, fructosa 6 ml/l y rojo neutro como indicador de pH 1 g/l, en forma abreviada se conoce como medio CCFA²⁸. Willey y col (1979) modificaron este medio, ellos emplearon cicloserina 250 mg/l y 10 mg de cefoxitina con mejores resultados⁸⁴; en este medio se pueden seleccionar a partir de heces desde 100 UFC/g y en los pacientes con CPM se han determinado cuentas de 10^4 a 10^5 UFC/g de heces²⁸.

Las esporas bacterianas son resistentes al calor y al al-

cohol, esta característica constituye una alternativa (añada al uso del medio selectivo) y mediante el choque con etanol o con calor, a partir de las muestras de heces, se eliminan las formas vegetativas y permanecen viables las esporas. Las muestras se tratan durante 30 minutos y posteriormente se inoculan en medio de gelosa sangre o en medios selectivos⁴³. El uso de medios de enriquecimiento que incrementan la proporción de C. difficile en muestras clínicas o bien la adición de taurocolato de sodio que estimula la germinación de esporas, favorecen el aislamiento⁸⁵.

Las placas se incuban en condiciones de anaerobiosis, por un período de 24 a 48 h. a 37°C; después de este tiempo las colonias de C. difficile, en el medio CCFA, se observan de un tamaño de 4 a 8 mm de diámetro, color amarillo cremoso con apariencia de vidrio molido, circulares, con bordes ligeramente filamentosos y poco umbonadas²⁸; la presencia del bacilo se confirma con la tinción de Gram y la ausencia de crecimiento de aerobiosis. Además, las colonias de C. difficile tienen la característica de presentar un color amarillo fluorescente bajo una lámpara de luz ultravioleta (longitud de onda 360 nm) en gelosa sangre y CCFA⁴².

La identificación confirmante de C. difficile puede hacerse utilizando pruebas bioquímicas y/o cromatografía de gases.

Actualmente resulta más sensible el método de cromatografía gas-líquido de captura de electrones y existe buena correlación entre la presencia de ácido isocaproico y la presencia de C. difficile en muestras de heces de pacientes con CPM, pero tiene la desventaja de ser un sistema con el que cuentan pocos laboratorios¹³.

La identificación final de C. difficile puede hacerse sin cromatografía de gases empleando pruebas bioquímicas, pero este procedimiento involucra más tiempo y material de laboratorio². La tabla 3 permite diferenciar a C. difficile de otras especies de Clostridium aisladas de muestras clínicas.

El porcentaje de reconocimiento de la presencia de C. difficile es mejor si se busca la presencia de la toxina además del cultivo para recuperar el microorganismo⁴⁵.

IDENTIFICACION DE LAS TOXINAS DE C. difficile.

La prueba de cultivo de tejidos ha sido extensamente empleada para la detección de la citotoxina de C. difficile directamente de las muestras de heces, la presencia de esta toxina en heces de adultos puede considerarse como un indicador de infección por C. difficile⁴⁵.

Hasta ahora todas las líneas celulares de mamífero probadas

han mostrado ser sensibles a la acción de las toxinas²⁵. Para realizar esta prueba se utiliza un filtrado estéril de las heces, se inocula sobre una capa confluyente de las células elegidas y se incuban a 37°C, los resultados de la prueba generalmente se tienen en 18 a 24 h, las muestras con títulos altos pueden mostrar cambios en 4 h. Los resultados pueden cuantificarse utilizando diluciones seriadas de las muestras de heces y se hace la prueba confirmatoria midiendo el efecto citopático sobre el cultivo mediante la neutralización del efecto con antitoxina de C. difficile o C. sordelli⁶³.

Se ha reportado poca o ninguna correlación entre los títulos de toxina y la severidad de la enfermedad. Bartlett (1984) reportó los títulos medios de toxina de 10^3 (1:1000) para pacientes con colitis pseudomembranosa, diarrea asociada a antibióticos, o personas con tratamiento antimicrobiano pero sin diarrea y en neonatos sanos y el mismo autor sugiere que la utilidad de la prueba es determinar un resultado positivo o negativo⁵.

La contraímmunoelectroforesis (CIE) es otra técnica que se ha empleado para detectar la presencia de la citotoxina en muestras de heces de pacientes con CPM; tiene la ventaja de ser un método rápido y fácil de realizar, pero su uso

ha venido a menos porque se han observado reacciones cruzadas con otros Clostridium⁸² o reacción positiva con antígenos del mismo C. difficile diferentes de la citotoxina⁸³. Renie y cols (1984) compararon la CIE con la prueba de citotoxicidad para el diagnóstico de la diarrea asociada a antibióticos y la CPM, observaron que con una estandarización cuidadosa de la prueba ésta puede usarse en los laboratorios de diagnóstico para búsqueda de C. difficile toxigénico y es tan específica como la prueba de citotoxicidad en cultivo de tejidos, además es una prueba rápida que se realiza en un promedio de dos horas⁶⁰. La cantidad de toxina necesaria para dar banda de precipitación es de 10 a 100 ng indicando que cantidades de mcg/g de muestra son necesarios y muchas muestras de pacientes con CPM no alcanzan estas concentraciones de toxina⁴⁵.

Se han desarrollado variaciones del ensayo inmunoenzimático (ELISA) para identificar las toxinas A y B, este tipo de pruebas están basadas en detección de las toxinas con anticuerpos específicos anti-A o anti-B⁴⁸. Lyerly y cols (1983), describieron una técnica inmunoenzimática específica para la identificación de la toxina A que no requiere de una separación inicial de la toxina y actualmente resulta muy ventajoso el uso de esta técnica para su detección⁴⁸.

Actualmente las técnicas de cultivos celulares son más sensibles que ELISA para la detección de la toxina B, pero ELISA resulta una técnica muy sensible para la detección de toxina A (detecta de 0.1 a 1 ng) además el tiempo requerido para realizarla es corto, 5 a 6 horas, por lo que por el momento se emplea ELISA para la detección de la toxina A⁴⁵.

TABLA 1

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE LAS TOXINAS A Y B DE
Clostridium difficile

	TOXINA A	TOXINA B
Peso molecular	440-600 000	340-500 000
Inactivación por:		
Calor	+	+
Proteasas	+	+
Lipasa	-	-
Amilasa	-	-
Oxidación	+	+
pH 4 y 9	-	+
Presencia de:		
Aminoácidos		
Altas cantidades	asp,glu,gly	asp,glu,gly
Bajas cantidades	his,met,cys	his,met,cys
Hexosa/pentosa	-	-
Aminoazúcares	-	-
Fósforo	-	-
Naturaleza hidrofóbica	+	+
Punto isoeléctrico	5.5	3.8

asp = ácido aspártico
his = histidina

glu = ácido glutámico
met = metionina

gly = glicina
cys = cisteína

Tomado de: Florin I. Intoxication of cultured mammalis cells with Clostridium difficile toxin B.
Doctor Thesis²⁵.

TABLA 2

EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS TOXINAS A Y B DE
Clostridium difficile

	TOXINA A	TOXINA B
Prueba de asa ligada de conejo	+	-
Acumulación de líquidos de ratón lactante	+	-
Citotoxicidad	+	+++
Permeabilidad vascular (piel de conejo)	+	+
Letalidad en ratón (I.P.)	+	+
Letalidad en hamster (I.C.)	+	+

I.P. = intraperitonealmente

I.C. = intracecalmente

Tomado de: Florin I. Intoxication of cultured mammalian cells with Clostridium difficile toxin B. Doctor Thesis²⁵.

CARACTERISTICAS DE LA COLITIS PSEUDOMEMBRANOSA.

El cuadro clínico puede presentarse como diarrea leve, colitis moderada o colitis con la formación de pseudomembranas. Los síntomas pueden aparecer de 4 a 5 días después de haber iniciado la ingestión del antimicrobiano o hasta tres semanas después de haber terminado^{23,26}. La sintomatología puede persistir de 10 a 14 días, cuando no se da tratamiento específico; asimismo, como en otras enfermedades diarreicas, hay un desbalance de electrolitos, hipoalbuminemia y choque pudiendo llegar a la muerte^{2,21}.

La CPM se considera una enfermedad iatrogénica, está caracterizada por la presencia de placas inflamatorias sobre la mucosa del colon; éstas son elevadas, edematosas, hiperémicas, mayores de 20 mm de diámetro, éstas tienden a alargarse, para dar lugar a las pseudomembranas, las cuales están formadas por células necróticas del epitelio, leucocitos, fibrina y moco. Al microscopio la necrosis de lámina propia, es vista con infiltración de células polimorfonucleares, sin embargo, no se ha observado invasión del bacilo a la mucosa o pseudomembranas^{21,55}.

Los antimicrobianos más frecuentemente asociados a la CPM son: clindamicina, ampicilina y las cefalosporinas, aunque actualmente se considera que la mayoría de los antimicro-

crobianos y algunas drogas antineoplásicas como: 5-fluoracilo, metrotexato, adrimicina y otros, pueden inducir la CPM²⁷.

El tratamiento del padecimiento consiste en la administración de vancomicina, metronidazol o bacitracina, cuando la enfermedad no ha cedido después de suprimir los antimicrobianos^{6,76}.

No se conocen en forma definitiva los mecanismos indicados en la patogénesis de la enfermedad. Se ha observado que además del papel que juega C. difficile y sus toxinas, otro factor de riesgo importante para el desarrollo de la enfermedad lo es la alteración de la microecología intestinal¹⁰. Se ha llegado a esta conclusión por el hecho de que C. difficile puede estar colonizando el intestino de una persona sana sin causar daño, necesitándose en algunos casos de un factor desencadenante como la terapia antimicrobiana para que se observe. Sin embargo algunos casos se presentan sin este factor^{4,35,53}.

EPIDEMIOLOGIA DE LA INFECCION POR Clostridium difficile.

Clostridium difficile fue aislado inicialmente por Hall y Otoole (1935), de las heces de niños sanos, recién nacidos. Estos investigadores lo denominaron originalmente Bacillus difcibilis reflejando las dificultades que tuvieron en su aislamiento³².

A pesar de que el conocimiento de este organismo data de hace mucho tiempo, existe escasa información acerca de su epidemiología; por ejemplo, se desconoce cuáles son las fuentes de adquisición del bacilo y sus mecanismos de diseminación.

La frecuencia con que este microorganismo se aísla es muy variable y depende en gran parte de la población que se esté analizando. Los estudios realizados con adultos sanos norteamericanos, europeos y mexicanos han indicado que C. difficile es poco común en esta población y se reportan cifras de 0 a 3%^{27,50}, en cambio en trabajadores japoneses se ha encontrado el microorganismo con una frecuencia de 11.4%⁵². Algunos autores consideran que esto puede indicar variaciones entre grupos étnicos o bien puede ser el reflejo de las variaciones que existen en las técnicas de aislamiento del microorganismo²⁷.

Se menciona que 15 a 70% de los neonatos y 30 a 65% de los niños menores de un año de edad están colonizados y se sabe que C. difficile puede formar parte de su flora normal intestinal^{27,39}. Una de las observaciones más interesantes con C. difficile es que los niños pueden tener cepas de C. difficile toxigénicas con altos títulos de toxinas A y B en sus heces y ser asintomáticos^{19,79}, este fenómeno también ha sido observado en hamsters lactantes, la razón de esto se desconoce hasta ahora⁸.

Se ha calculado que el 50% o más de los niños son colonizados con C. difficile toxigénico y son asintomáticos^{45,62}, aunque C. difficile en la población pediátrica no siempre se comporta como comensal⁴⁹. La protección en los niños puede deberse a varios factores entre los que se cuenta el calostro el cual contiene sustancias, quizás anticuerpos secretores, los cuales neutralizan las toxinas A y B²⁷, estos ayudarían a proteger al niño del efecto de las toxinas, aunque esto no ocurriría en los niños alimentados por fórmula¹⁷; otra hipótesis es que los niños pueden carecer de receptores para las toxinas en su intestino⁴³. Actualmente el conocimiento de los mecanismos que hacen refractario al niño a la acción de las toxinas de C. difficile es una de las líneas de investigación que más se trabaja en diversos laboratorios.

La frecuencia de colonización por este microorganismo puede modificarse bajo ciertas condiciones; por ejemplo, en los adultos hospitalizados y sometidos a tratamiento antimicrobiano la frecuencia de C. difficile aumenta sin que se presenten complicaciones gastrointestinales en un 10 a 20% de los casos⁵; en cambio, en los niños los antibióticos no parecen modificar la frecuencia de colonización⁷⁹. En la tabla No. 4 se presentan las frecuencias de colonización para diferentes poblaciones y grupos de edad.

Se ha considerado que C. difficile puede causar aproximadamente 25% de los casos de diarrea asociada a antibióticos; además de su papel en enfermedades gastrointestinales ha habido reportes de su aislamiento en material clínico diferente de heces, Smith y King (1962) reportaron el aislamiento del bacilo de heridas infectadas de la pierna de un soldado⁷⁰, Rampling y cols (1985) recuperaron a C. difficile junto con Bacteroides sp y otros organismos entéricos de hemocultivo de pacientes con leucemia⁵⁹. Se ha reportado el aislamiento del microorganismo de algunos casos de osteomielitis, pleuritis, peritonitis, septicemia e infecciones del tracto urogenital, pero estos son raros⁴⁵. A pesar de numerosos estudios para definir las fuentes de contaminación de C. difficile permanece la duda de si ésta es de origen endógeno o exógeno o bien si ambas fuentes

TABLA 4

FRECUENCIA DE COLONIZACION INTESTINAL POR
Clostridium difficile EN POBLACION DE DIFERENTES EDADES

POBLACION ESTUDIADA	FRECUENCIA DE AISLAMIENTO DE <u>C. difficile</u>
Neonatos sanos	15-70% ^{41,81}
Neonatos en la Unidad de Cuidados Intensivos	21-59% ⁸⁹
Niños menores de un año de edad	27-65% ^{32,34,81}
Adultos sanos	0-11.4% ^{30,52,58}
Población geriátrica	12% ⁵⁰

son importantes en la adquisición del bacilo⁵⁰. Los estudios iniciales indicaban que el neonato podía adquirir a C. difficile de su propia madre durante el nacimiento^{34,50}, pero los trabajos ulteriores no apoyan este concepto. Larson y cols (1982) tomaron muestras vaginales y de heces a 17 madres de niños colonizados con el objeto de aislar a C. difficile y obtuvieron resultados negativos en todas las madres estudiadas; sin embargo los niños aparecían colonizados lo que indica una adquisición nosocomial del bacilo³⁹. Otra evidencia para esta adquisición intrahospitalaria de C. difficile es el hecho de que la proporción de aislamiento del bacilo no disminuye en niños nacidos por cesárea⁸⁹. El estudio de Hafiz y cols (1975) sugiere que el tracto urogenital podría ser una fuente de transmisión del bacilo, aislaron a C. difficile en 72% de 108 muestras vaginales de mujeres asistiendo a una clínica de enfermedades venéreas y en el 100% de 42 cultivos uretrales³¹, desafortunadamente otros autores han fallado para detectar a C. difficile del tracto genitourinario de hombres o mujeres con hijos colonizados¹, así, la posibilidad de identificar esta vía como reservorio del bacilo no ha sido confirmada.

Los estudios epidemiológicos indican que C. difficile puede adquirirse de fuentes ambientales. Kim y cols (1981) aislaron a C. difficile en 85 de 910 (9.3%) muestras de pisos,

baños, camas, cabeceras, ropa de cama y lavabos de áreas cercanas a pacientes con diarrea y en 13 de 497 (2.6%) de áreas de pacientes sin diarrea, además aislaron el bacilo de manos y heces de personal hospitalario asintomático³⁷, los estudios de otros autores han obtenido resultados semejantes y también apoyan la adquisición nosocomial del bacilo. Ha habido evidencias de la transmisión del bacilo de persona a persona y de la diseminación del microorganismo de una fuente común³⁹, lo cual ha sido comprobado con la aparición de brotes de CPM asociada a una sola cepa¹⁴. Trabajos con modelos animales han mostrado que C. difficile fácilmente puede adquirirse de un ambiente contaminado²⁴.

La contaminación de áreas y la diseminación del bacilo por pacientes o personal contaminado se ven ayudadas por la larga sobrevivencia de las esporas de C. difficile, ya que han sido recuperadas de superficies contaminadas a propósito después de 5 meses³⁷.

Otras fuentes exógenas del bacilo han sido descritas, y se ha recuperado a C. difficile de: tierra, lodo, arena y de materia fecal de perros, gatos y aves. Es posible que una persona susceptible a adquirir el patógeno en tratamiento antimicrobiano podría infectarse después del contacto con algunos de estos animales reservorios, sin embargo, la

transmisión animal-hombre requiere de más estudio¹².

Otra posible fuente de adquisición del bacilo es la ingestión de alimentos contaminados con esporas. El trabajo de Gurian y cols (1982) sugiere la adquisición de C. difficile de salmón contaminado, pero los intentos de aislar a C. difficile de alimentos han sido infructuosos³⁰.

Con los conocimientos que se tienen hasta ahora no es posible determinar qué fuentes endógena, exógena o ambas son importantes en la adquisición de C. difficile. Un sistema de tipificación para diferenciar cepas específicas de C. difficile sería una herramienta útil para resolver muchas de las dudas que existen hasta ahora; por ejemplo, se esclarecería, durante un brote intrahospitalario de infección asociada a C. difficile, la posible fuente de diseminación del bacilo o establecer si existe diseminación cruzada entre los pacientes, también se podría diferenciar en pacientes con recidivas si esto ocurre por reinfección endógena o exógena, lo que permitiría un mejor manejo del paciente.

Se ha propuesto una variedad de métodos para tipificar las cepas de C. difficile y algunos aún se encuentran en fase de investigación. Wust y cols (1982), con el objeto de definir el origen endógeno o exógeno de 16 cepas de C. diffi-

cile aisladas durante un brote de diarrea en una área quirúrgica emplearon 5 técnicas utilizadas con otros géneros bacterianos: electroforesis en gel de agarosa para detección de plásmidos, inmunoelectroforesis cruzada para detección de antígenos extracelulares, electroforesis en gel de poliacrilamida para análisis de proteínas solubles, pruebas para citotoxicidad y sensibilidad a antibióticos. En doce de las cepas aisladas se demostró que probablemente eran la misma cepa y se detectaron por electroforesis cuatro perfiles de plásmidos diferentes, trece de los aislamientos tenían perfiles idénticos. Además investigaron 35 aislamientos de C. difficile de diferentes áreas geográficas y observaron que 24 cepas no tenían plásmidos detectables y 11 presentaban patrón de plásmidos diferentes a los encontrados a las cepas del brote⁸⁸. Sell y cols (1983) describieron el aislamiento de fagos y bacteriocinas de C. difficile y su uso en la tipificación de cepas de este género bacteriano. De 254 cepas probadas, la sensibilidad a fagos mostró nueve grupos diferentes, la tipificación de fagos junto con bacteriocinas incrementó el número de cepas tipificables en un 50%, muchos de los aislamientos no pudieron tipificarse. En los aislamientos de diferentes ciudades se observaron una gran variedad de patrones⁶⁶.

Tabaqchali y cols (1984) utilizaron electroforesis de proteínas marcadas con azufre 35; lograron diferenciar el 98% de 250 cepas integrándolas en 9 grupos diferentes denominados con las letras A,B,C,D,E,W,X,Y y Z. Los grupos X y E se aislaron de brotes de colitis asociada a antibióticos en las áreas de oncología y ortopedia respectivamente, se aislaron de pacientes y del ambiente lo que probó la infección cruzada entre pacientes y la adquisición intrahospitalaria de C. difficile⁷³. Delmee y cols (1985) desarrollaron un esquema de tipificación basados en la seroagrupación por aglutinación en placa de las cepas tratadas con formol y antisuero de conejo, las cepas obtenidas en un brote mostraron el mismo patrón de aglutinación, correspondieron al serogrupo C, fermentaron sorbitol y produjeron citotoxina lo que les permitió diferenciarlas del resto de las cepas de otras áreas hospitalarias¹⁸. Mulligan y cols (1986) lograron diferenciar un grupo de cepas de C. difficile usando aglutinación en placa y electroforesis en gel de poliacrilamida, obtuvieron títulos de aglutinación altos con cepas homólogas (cepas aisladas del mismo paciente o del ambiente). Los dos métodos probados mostraron buena correlacion y pueden emplearse como un sistema para diferenciar cepas y realizar estudios epidemiológicos⁵¹. Los resultados obtenidos con los diferentes métodos de tipificación empleados han coincidido en apoyar

la adquisición nosocomial de C. difficile, la existencia de diseminación cruzada entre pacientes y la existencia de áreas contaminadas por una sola cepa^{14,18}.

Los sistemas de tipificación se encuentran en fase de investigación y se espera que un sistema de tipificación práctico pueda ayudar a contestar preguntas acerca de la epidemiología de C. difficile, sus fuentes de diseminación, forma de transmisión y el fenómeno de recaídas o reinfección. El sistema de tipificación con fagos es de los métodos que ofrecen más esperanzas como un sistema aceptable para tipificación¹². La investigación de mayor número de fagos por varios laboratorios debe ser prioritaria en aquellos interesados en este campo, esto incrementaría el número de cepas que pueden tipificarse.

PATOGENICIDAD DE Clostridium difficile

La patogenicidad de C. difficile se atribuye por lo menos a la presencia de dos toxinas: la toxina A y la toxina B^{3,4}. Un factor que altera la motilidad intestinal³⁶ posiblemente también sea importante como otro factor de virulencia así como la capacidad de adherirse a las células de huésped. La adherencia es un paso crucial para muchos patógenos entéricos en la producción de la infección⁸⁷ pero este mecanismo en C. difficile aún está en fase de estudio. Wood

Helie y cols (1986) observaron la capacidad de adherencia a placas de poliestireno, células intestinales de embrión humano y células de colon de adulto. Todas las cepas probadas presentaron adherencia en ambas líneas celulares aunque los porcentajes de organismos adheridos variaron, sus resultados sugirieron que la hidrofobicidad podía ser un factor de virulencia en C. difficile y esta atracción no específica era seguida por una adherencia más específica. Ambos procesos probablemente contribuyen a la colonización intestinal por este bacilo⁸⁷.

Se ha observado que cuando se cultiva en medio líquido C. difficile se produce la concentración máxima de ambas toxinas durante la fase de lisis celular. No se sabe hasta ahora lo que pasa "in vivo", pero con los estudios realizados en modelo animal se observó que las dos toxinas son esenciales en la patogénesis de la colitis asociada a antibióticos. Al retar hamsters vacunados con una de las toxinas o con ninguna, éstos morían, en cambio los animales que habían sido vacunados con ambos toxoides sobrevivían al reto con las toxinas⁴⁴. Lyerly y cols (1985) notaron que al administrar intragástricamente a animales de laboratorio cantidades altas de toxina B, no se observaba ninguna respuesta significativa en el animal a menos que se administrara una mezcla de las toxinas A y B, o bien que

al dar al hamster la toxina B, éste tuviera ligeramente dañado el ciego. Estos resultados sugieren que ambas toxinas actúan sinérgicamente y que la acción de la toxina B se presenta después del daño celular causado al tejido por la toxina A⁴⁷. En general podemos decir que los mecanismos que permiten el sobrecrecimiento de C. difficile en el tracto gastrointestinal de niños y adultos son poco claros y la enfermedad se presenta cuando se altera algún factor en la ecología intestinal²⁷. Se considera que la flora intestinal representa una barrera natural que interfiere con el establecimiento de bacterias patógenas⁶⁵; no obstante C. difficile se asocia o se propicia su actividad patógena en los siguientes cuadros: terapia antimicrobiana, quimioterapia de cáncer, enfermedad isquémica intestinal, terapia con corticoesteroides y enfermedad de Hirschprung, hay reportes raros de enfermedad sin ninguna terapia o factor predisponente y no se observa ningún factor común en todos los casos anteriores como no sea el compromiso del hospedero.

Los estudios de animales tratados con antimicrobianos confirman que para C. difficile hay un factor protector conocido como resistencia a la colonización de la flora intestinal normal⁶⁵. Rolfe y cols (1981) observaron el efecto inhibitorio de 23 géneros bacterianos de flora fecal anaerobia contra C. difficile. El mayor efecto antagonista se

observó con Lactobacillus y Streptococcus grupo D; otros autores confirmaron además la inhibición de C. difficile por algunas E. coli, Candida spp y anaerobios de los géneros Bacteroides spp y Clostridium spp entre otros⁷⁷, los mecanismos por los que se ejerce esta inhibición son desconocidos aún, pero se ha observado que cepas de C. difficile no toxigénicas pueden interferir con el establecimiento de C. difficile toxigénicas⁸⁶.

Rolfe (1984) observó que la presencia de ácidos grasos volátiles producía "in vitro" inhibición del crecimiento de C. difficile⁶⁴.

Existen numerosos reportes acerca de la frecuencia de colonización en menores de 1 año de edad¹² y está bien documentada la resistencia a la enfermedad en este grupo. La frecuencia de colonización en adultos también está bien documentada y sabemos la importancia de C. difficile en complicaciones intestinales en este grupo. Sin embargo, la población intermedia (> 1 a 15 años) ha sido poco estudiada; desconocemos la frecuencia de colonización tanto sintomática como asintomática, por lo que es conveniente analizar qué características presentan las cepas que colonizan a estos niños hospitalizados. ¿Adquieren el bacilo dentro o fuera del hospital?, ¿es patógeno para los niños mayores de 1 año

HIPOTESIS

En pacientes hospitalizados de 2 a 15 años de edad, la frecuencia de colonización por C. difficile es similar a la observada en población adulta hospitalizada.

En pacientes hospitalizados predominan ciertas cepas de C. difficile con características diferentes a las de cepas que colonizan pacientes fuera del hospital.

OBJETIVOS

Determinar la frecuencia de colonización por Clostridium difficile en niños hospitalizados menores de 15 años de edad.

Caracterizar las cepas de C. difficile aisladas para determinar similitudes y diferencias entre ellas.

MATERIAL

1. Material para el aislamiento e identificación de C. difficile:
 - a) Medio selectivo de CCFA: proteosa peptona 40 g, Na_2HPO_4 1 g, MgSO_4 , anhidro 0.1 g, fructosa (Sigma) 6g, NaCl 2 g, rojo neutro al 1% 3 ml, cicloserina (Sigma) 250 mg, Cefoxitina (Merck) 10 mg, agar bacteriológico 20 g, en 1000 ml de agua destilada²⁸.
 - b) Gelosa sangre (Bioxon) de carnero al 5%.
 - c) Medio de carne (Difco) para conservación de las cepas³³.
 - d) Las pruebas bioquímicas se realizaron de acuerdo a las pruebas recomendadas por Lennett EH² (Tabla 3).
 - e) Cepas tipo de C. difficile S2723 y 10463 (amablemente donadas por el Dr. T. Wilkins del Instituto Politécnico de Virginia). Utilizadas como controles positivos para medios de cultivo y pruebas diferenciales.
2. Material y reactivos para cultivos celulares:

a) Línea de células CHO (células de ovario de hamster chino) propagadas en botellas de 25 cm² (Nunc).

b) Medios empleados: Medio F 12 (In Vitro, S.A.) adicionado de suero fetal de ternera (Sigma) al 10% para crecimiento, al 3% para mantenimiento y medio mínimo esencial (MEM) (In Vitro, S. A.) al 5% de suero para realizar los ensayos de citotoxicidad²⁰.

c) Reactivos empleados: Tripsina (Difco) al 0.025% utilizada para desprender las células y solución de bicarbonato de sodio al 7.5% para ajustar el pH de los medios.

d) Cepa de C. difficile IV-8 aislada de un niño sano y toxigénica⁷⁹, utilizada como control positivo en las pruebas de citotoxicidad.

e) Antitoxina de C. sordelli (Bureau of Biologic, FDA Bethesda, Maryland 20205), se utilizó para realizar las pruebas de neutralización⁶³.

3. Material y reactivos para caracterizar las cepas por su sensibilidad antimicrobiana:

a) Medio de agar Brucella (Difco) con sangre de car-

nero al 5% para las pruebas de sensibilidad antimicrobiana³³.

- b) Amikacina Mead Johnson de México, S. A.
- c) Cefoxitin Eli Lilly y Cía. de México, S.A.
- d) Cicloserina Sigma, EUA.
- e) Cloranfenicol Lakeside, S. A. México.
- f) Clindamicina Up John, S. A. México.
- g) Gentamicina Sheramex, S. A. México.
- h) Kanamicina Bristol de México, S. A.
- i) Metronidazol Laboratorios Zapata, S. A. México.
- j) Penicilina Lakeside, S. A. México.
- k) Tetraciclina Lederle Cynamic de México, S. A.
- l) Trimetroprim-sulfametoxazol Roche, S. A. México.

4. Medios y reactivos empleados para las pruebas de sensibilidad a fagos y bacteriocinas⁶⁶.

a) Caldo de infusión cerebro corazón (BHI) suplementado: Adicionar $\text{Ca}^{++} 0.136 \text{ mM}$ y $\text{Mg}^{++} 0.03 \text{ mM}$.

Preparación: Pesar un gramo de MgCl_2 y adicionarle 50 ml de agua desionizada y usar 2.25 ml por litro. Pesar un gramo de CaCl_2 y adicionar 75 ml de agua desionizada y usar 5.5 ml por litro.

- b) Agar blando: Caldo BHI con agar bacteriológico al 5%.
- c) 9 cepas indicadoras para fagos Cld 2,6,7,9,11,13,16,17,19. Nueve cepas productoras de fagos: Cld 2,6,7,8,11,13,16,17,19. Doce cepas productoras de bacteriocinas B 33A, 83,810,1700,1537,1481,778,809,1995,806,1811,1320. (Estas cepas fueron amablemente donadas por el Dr. Fekety de la Universidad de Michigan, EUA).

5. Material y reactivos empleados en la caracterización de las cepas por su perfil de plásmidos⁷⁷.

- a) Agar e infusión cerebro corazón (BBL) prerreducido por ebullición en baño maría³³.
- b) Regulador TES (Tris) (Sigma) 0.5 M, ácido etileneaminotetracético (Sigma) 0.05 M, NaCl (Merck) 0.05M pH 8.
- c) Sacarosa al 25% en regulador TES.
- d) Lisozima (Sigma) al 1.5% en regulador TES.
- e) Solución de ácido etilendiaminotetracético (Sigma)

- al 20% en regulador TES.
- f) Solución de RNAasa (Sigma) 5 mg/ml en regulador TES.
- g) Solución de lauril sulfato de sodio (Sigma) al 20% en regulador TES.
- h) Solución de NaCl (Merck) 5M.
- i) Fenol (Merck) destilado.
- j) Solución de cloroformo alcohol isoamílico (Merck) en proporción 24:1.
- k) Acetato de sodio (Sigma) 3M pH 8.6.
- l) Etanol absoluto (Merck).
- m) Agarosa tipo II (Sigma) del 0.8% al 1%.
- n) Agua desionizada.
- o) Cepas control: Escherichia coli PRD C600, Escherichia coli R 100, Bacillus subtilis 168 TRC2 THB33.

Estas cepas fueron amablemente donadas por el Dr. Everardo Curiel de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

METODO

POBLACION ESTUDIADA:

En este trabajo se estudiaron 273 niños hospitalizados en la sala de Infectología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional, de diferentes edades (desde recién nacidos hasta quince años de edad), sin importar su estado clínico, tipo de tratamiento, estado nutricional, o tiempo de estancia en la sala. De cada uno de los niños se obtuvo por lo menos una muestra de heces, de 82 de ellos más de una, dando un total de 416 muestras.

Las muestras de heces se colectaron durante el período de agosto de 1985 a julio de 1986, fueron procesadas inmediatamente o conservadas a -70°C hasta su estudio. Se llevó un registro de cada paciente en relación a su edad, sexo, talla, consistencia de la muestra y presencia o no de diarrea (ver hoja de recolección de datos).

El estado nutricional de los niños se estableció conside-

rando la relación, talla y peso ideal para la edad, comparada con los centiles de las tablas de Ramos Galván en niños de la ciudad de México⁶¹.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE C. difficile^{2,28,34}.

El mismo día que se tomaron las muestras, se hicieron diluciones de las heces 1:20 y 1:200 en solución reguladora de fosfatos pH 7.4 y se inoculó 0.1 ml de cada dilución en el medio selectivo CCFA, se incubaron a 37°C por 48 h en anaerobiosis (80% N₂ 10% CO₂ 10% H₂), esta atmósfera se obtuvo al inyectar la mezcla de los gases en una estufa de anaerobiosis (Diagrama No. 1).

La búsqueda de colonias sospechosas se hizo a las 48 h de incubación, ayudados por una lámpara de luz ultravioleta y por la morfología colonial característica de C. difficile. Se seleccionaron colonias color blanco amarillento, de 2 a 5 mm de diámetro, ligeramente umbonadas, bordes filamentosos con apariencia de vidrio molido, además en el medio el indicador de pH vira en presencia de ácido proveniente de la fermentación de la fructosa, estas colonias fluorescen bajo la luz de una lámpara de luz ultravioleta con un color amarillo verdoso⁴². Las colonias sospechosas se resembraron en gelosa sangre por duplicado y se incuba-

ron una en atmósfera aerobia y otra anaerobia a 37°C por 48 h. Las colonias que crecieron en anerobiosis pero no en aerobiosis y con características morfológicas de C. difficile, se pasaron a caldo tioglicolato prerreducido y se incubaron nuevamente en anaerobiosis a 37°C durante 48 h. Estos cultivos se utilizaron para inocular las pruebas bioquímicas: producción de ácido de glucosa, manosa, manitol, xilosa, sacarosa, lactosa; además producción de undol, reducción de nitratos, hidrólisis de esculina, comportamiento en leche tornasolada (Tabla 3). Estas pruebas fueron incubadas en las condiciones descritas antes e interpretadas a las 48 h de incubación².

ENSAYO PARA LA TOXICIDAD

Las diluciones 1:20 de las muestras de heces de los pacientes se centrifugaron a 5000 rpm por 20 minutos, el sobrenadante se esterilizó por filtración con filtros Millipore de 0.45 μ .

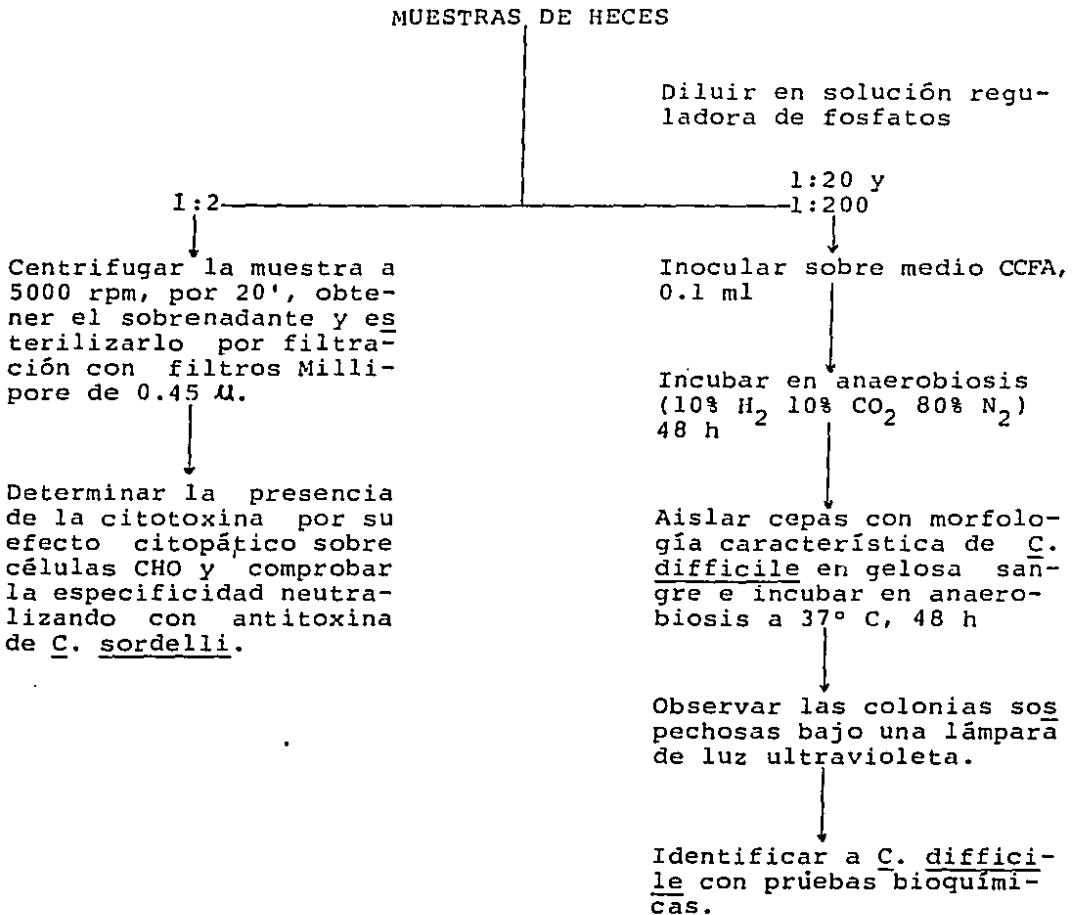
Se utilizaron cultivos de células CHO, las cuales se propagaron en botellas de 25 cm² con medio F12, hasta confluencia total, posteriormente fueron desprendidas con tripsina 0.025%, se les adicionó 20 ml de medio MEM con 5% de suero fetal de ternera y de esta suspensión celular se depositaron 200 microlitros en cada pozo de una microplaca; la placa

se incubó a 37°C en cámara húmeda (5% de CO₂ y 85% de humedad relativa)²⁰ hasta su confluencia total. Las microplacas presentaron un crecimiento celular uniforme, se inocularon con 20 microlitros de dos diferentes diluciones de las muestras de heces (una dilución 1:20 y la otra una dilución 1:200). Las dos diluciones fueron probadas por duplicado y las placas se incubaron de la misma forma antes descrita. Se realizaron observaciones a las 24 y 48 h y se consideraban positivas cuando se presentaba un arredondamiento por efecto citopático en más del 50% de las células. El testigo positivo fue la cepa IV-8, una cepa altamente toxigénica. El título de la toxina se expresó como la inversa de la máxima dilución en la que aún se observaba más del 50% de las células con efecto citopático. Para demostrar que el efecto era específico de la citotoxina de C. difficile, las muestras positivas, se probaron nuevamente, adicionando 50 microlitros de la antitoxina de C. sordelli diluida 1:10⁶³; si se observaba neutralización del efecto citopático, se consideraba positiva la presencia de la citotoxina de C. difficile.

CARACTERIZACION DE LAS CEPAS DE Clostridium difficile.

La tipificación de las cepas se hizo de acuerdo a su capacidad para producir citotoxina "in vitro", sensibilidad antimicrobiana, sensibilidad a fagos y bacteriocinas y a

DIAGRAMA No. 1
 AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE Clostridium difficile
 Y SU CITOTOXINA



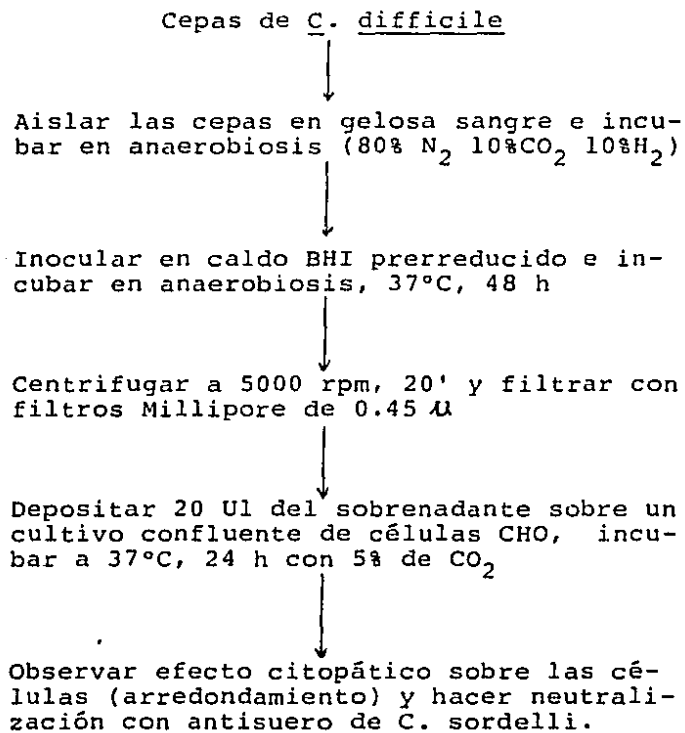
su perfil de plásmidos.

a. Producción de citotoxina "in vitro". (Diagrama No. 2).

Las cepas se aislaron en gelosa sangre, posteriormente se inocularon en caldo BHI prerreducido y se incubaron a 37°C por 48 horas en anaerobiosis (80% N₂ 10% CO₂ 10% H₂).

Los cultivos ya crecidos se centrifugaron a 5000 rpm durante 20' y el sobrenadante obtenido se esterilizó por filtración a través de una membrana Millipore de 0.45 μ . Se preparó una microplaca con células CHO en forma semejante a la utilizada para el ensayo de citotoxicidad, en cada pozo de la microplaca se inocularon 20 microlitros de los sobrenadantes y todas las cepas se trabajaron por duplicado. Aquellas cepas que daban positivo el efecto citopático, con más del 50% de arredondamiento del cultivo celular, se les hizo prueba de neutralización con antitoxina de C. sordelli y se cuantificó la producción de citotoxina haciendo diluciones seriadas al doble de cada uno de los sobrenadantes

DIAGRAMA No. 2

PRODUCCION DE CITOTOXINA IN VITRO

positivos. El título reportado correspondió a la inversa del título máximo en que aún se observaba efecto citopático en más del 50% de las células.

b. Sensibilidad a los antimicrobianos.

Se determinó la sensibilidad a los antimicrobianos a las 50 cepas de C. difficile identificadas empleando la técnica de dilución seriada en placa, siguiendo las recomendaciones dadas por el Instituto Politécnico de Virginia³³. Se utilizó como medio base agar brucella adicionado de 5% de sangre de carnero. El inóculo bacteriano se preparó creciendo las cepas en caldo BHI prerreducido incubando en anaerobiosis por 24 horas a 37°C. Se utilizó el replicador de Steers para depositar en la superficie del agar los inóculos bacterianos². Las concentraciones empleadas de cada antimicrobiano fueron desde 0.25 a 128 ug/ml. Los resultados se expresaron como la concentración mínima inhibitoria (CMI) en ug/ml.

c. Sensibilidad a fagos⁶⁶ (Diagrama No. 3).

1. Obtención del lisado: Las cepas tipo de C. difficile se crecieron en caldo BHI durante 24 h a 37°C, en anaerobiosis, después de este tiempo se adicionó mitomi-

cina C a una concentración final de 3 ug/ml. Se incubaron nuevamente por 24 h a 37°C, se centrifugaron a 5000 rpm por 10' y el sobrenadante obtenido se esterilizó por filtración a través de una membrana Millipore de 0.45 u.

2. Purificación del fago: Para obtener el fago puro, la cepa indicadora se creció en caldo BHI durante toda la noche, se mezcló con 2 ml de agar blando (45°C), se depositó en una caja petri conteniendo agar BHI y se aplicaron tres gotas del lisado obtenido en el paso anterior, se homogenizaron sobre la superficie del agar y se incubaron en anaerobiosis a 37°C por 24 horas.

Las placas líticas que se produjeron, se picaron con una pipeta Pasteur, se transfirieron a un tubo con agar blando y se depositaron en una placa de agar BHI previamente inoculada con la cepa indicadora. Se incubaron toda la noche y se observó la presencia de placas líticas, este paso se repitió dos veces más antes de tener la cosecha final. Para cosechar la placa de BHI con los fagos se cubrió con 5 ml de caldo BHI, se dejó 60' y se raspó con un abatelenguas, el material obtenido se depositó en un tubo estéril

SENSIBILIDAD A FAGOS DE C. difficile

OBTENCION DEL LISADO

Crecer las cepas portadoras de fagos de C. difficile en caldo BHI

↓
Incubar a 37°C, 24 h

Adicionar mitomicina C a una concentración final de 3 ug/ml

↓
Incubar a 37°C, 24 h

Centrifugar a 5000 rpm, 10' y esterilizar por filtración con filtros Millipore de 0.45 U

PROPAGACION DEL FAGO

Crecer las cepas indicadoras en caldo BHI toda la noche

↓
Mezclar con agar BHI blando, dejar gelificar y depositar en la superficie 3 gotas del lisado

↓
Incubar en anaerobiosis a 37°C, 24 h

↓
Picar con pipeta Pasteur las placas líticas formadas, transferir a un tubo con BHI blando e inocular nuevamente la cepa indicadora

↓
Incubar en anaerobiosis toda la noche

↓
Cubrir la placa con caldo BHI y el sobrenadante obtenido centrifugarlo a 5000 rpm, 20' y esterilizarlo por filtración

↓
Mezclar con la cepa indicadora, en una proporción fago/bacteria 1/1000

↓
Incubar toda la noche a 37°C

↓
Obtener el sobrenadante y esterilizarlo por filtración. Aplicar este filtrado sobre la superficie de agar de cada una de las cepas problema de C. difficile e incubar en anaerobiosis.

se centrifugó a 5000 rpm durante 20' y el sobrenadante se esterilizó por filtración con un filtro Millipore de 0.45 μ . El filtrado obtenido se guardó a 4°C.

3. Propagación del fago: El filtrado obtenido en el paso anterior se titula, una vez titulado se mezcló con la cepa indicadora en caldo BHI suplementado en una proporción fago/bacteria 1/1000, se incubó toda la noche a 37°C. Se centrifugó y se obtuvo el sobrenadante, se esterilizó por filtración y se guardó a 4°C.

4. Tipificación de las cepas problema: Se obtuvo un cultivo confluyente de cada una de las cepas problema, a éstos se les aplicó unas gotas del filtrado de los fagos, se incubó a 37°C por 24 horas y se observó la formación de placas líticas. Todas las incubaciones se realizaron en anaerobiosis.

d. Sensibilidad a bacteriocinas de Clostridium difficile⁶⁶.

1. Obtención de las bacteriocinas: Se obtuvo un cultivo de toda la noche de la cepa portadora de bacteriocina en caldo BHI suplementado, se descartó el so-

brenadante, el precipitado se resuspendió en 100 ml de caldo BHI suplementado, se adicionó mitomicina C a una concentración final de 3 ug/ml, se incubó toda la noche, se centrifugó a 5000 rpm, durante 20', el sobrenadante se depositó sobre una botella limpia y se adicionaron 28 g de sulfato de amonio por cada 100 ml de sobrenadante, se dejó toda la noche a 4°C agitando ligeramente y se centrifugó a 15000 rpm durante 20', nuevamente se retuvo el precipitado el cual se resuspendió en 10 ml de caldo BHI suplementado. Se filtró con filtros Millipore de 0.45 μ y se conservó congelado a -70°C.

2. Tipificación de las cepas problema: Las cepas se crecieron toda la noche en agar BHI, y sobre el crecimiento homogéneo se depositaron varias gotas del filtrado obtenido en el paso anterior, se incubó toda la noche y se observó la formación de placas de inhibición del crecimiento. Todas las incubaciones se realizaron en anaerobiosis.

e. Perfil de plásmidos. Técnica de Smith y cols⁷¹.

1. Las cepas se crecieron durante toda la noche en 25 ml de caldo BHI prerreducido. De este crecimien-

to se obtuvo el paquete celular, por centrifugación, se lavó con regulador TES y se centrifugó nuevamente; el sedimento se resuspendió en 0.2 ml de solución de sacarosa al 25% y se adicionaron 50 ul de solución de lisozima al 1.5%. Se mantuvo a 37°C durante 30', posteriormente se dejó por 10' en baño de hielo.

2. Se adicionaron 80 ul de EDTA 0.25 M y después de 15' se agregó ARN asa (5 mg/ml), se dejó a temperatura ambiente por 15' y se adicionó 20 ul de lauril sulfato de sodio al 20% y 100 ul de NaCl 5M, la mezcla se guardó a 0°C toda la noche.

3. Después de que transcurrió este tiempo, se centrifugó a 1000 rpm, a 4°C durante 20', el lisado obtenido se transfirió a un tubo de plástico y se hicieron extracciones repetidas con fenol (vol/vol) a temperatura ambiente, la fase acuosa se retuvo después de centrifugar nuevamente. Este procedimiento se repitió varias veces hasta eliminar el fenol.

4. El ADN se precipitó con la adición de 0.1 volumen de acetato de sodio 3M y dos volúmenes de etanol. Esta mezcla se dejó a -70°C por dos horas y se centrifugó a 15000 rpm a -20°C por 20', se eliminó el

etanol y el ADN precipitado se resuspendió en 60 μ l de agua desionizada.

5. Las preparaciones de ADN se analizaron por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0.8%. El corrimiento del gel se hizo con regulador de acetatos pH 7.9 a 100 volts durante aproximadamente 2 horas y media. Las cepas control y las cepas problema fueron sometidas al mismo proceso de lisis y corrimiento en el gel.

RESULTADOS:

En las tablas 5 y 6 se observa la frecuencia de colonización por C. difficile notándose semejanza entre las frecuencias de colonización de los niños de 1 a 12 meses y los de 13 meses a 5 años y observamos que esta frecuencia tiende a disminuir al aumentar la edad, de 8.3% a 4.2% (tabla 8).

En la tabla 7 se presentan los factores asociados y la frecuencia de colonización encontrándose que aproximadamente 10% de los niños eutróficos menores de un año fueron colonizados por C. difficile en cambio en niños desnutridos esta cifra fue sólo de 5%. En los niños mayores de un año las frecuencias de aislamiento son semejantes de 5.9% y 8.3% entre niños eutróficos y desnutridos, respectivamente.

El tratamiento antimicrobiano presentó cifras significativas observándose que aquellos niños que no recibieron tratamiento antimicrobiano tenían una frecuencia de colonización de 21.7% contra una de 5.2% en aquellos niños que recibieron antibióticos; sin embargo no se encontró ninguna asociación con diarrea intrahospitalaria con excepción de un niño del grupo de mayores de un año. En el grupo sin diarrea la frecuencia de colonización fue muy semejante a

la observada cuando se agruparon los niños en relación con el tratamiento antimicrobiano, es decir, se observó una diferencia significativa que indica mayor colonización en el grupo que no había recibido antimicrobianos (5.9% en el grupo con antimicrobianos contra 22.7% en el grupo sin antimicrobianos).

En la tabla 8 se presenta la relación entre el tiempo de estancia hospitalaria y la frecuencia de colonización con C. difficile observándose que 8.8% de los niños ingresaron al hospital colonizados con C. difficile, notándose que los niños con una estancia hospitalaria mayor de 30 días presentan la mayor frecuencia de colonización (14.7%).

En la tabla 9 observamos la frecuencia de aislamiento de C. difficile y la presencia de diarrea en niños mayores y menores de un año de edad. La frecuencia de aislamiento de C. difficile en el grupo de niños menores de un año con diarrea y sin diarrea presentó similitud (13.3 y 10.1%) respectivamente. En los niños con diarrea la toxina se encontró en una frecuencia de 10% a diferencia de los niños sin diarrea donde sólo se detectó en 3.3%. En los niños mayores de un año sólo se aisló el bacilo en niños sin diarrea (aproximadamente 10%).

Las 50 cepas aisladas en este estudio se caracterizaron por: producción de citotoxina "in vitro", sensibilidad antimicrobiana, sensibilidad a fagos y bacteriocinas y perfil de plásmidos.

Estas cepas se distribuyeron en:

23 cepas de origen intrahospitalario: Las cepas aisladas de pacientes hospitalizados con más de 72 h que habían dado negativo el cultivo para búsqueda de C. difficile al ingreso al hospital.

6 cepas de origen extrahospitalario: Las cepas aisladas de pacientes en las primeras 72 h de hospitalización.

21 cepas de origen no clasificable: Las cepas aisladas de pacientes con una estancia hospitalaria mayor de 72 h y sin cultivo previo para búsqueda de C. difficile.

En la tabla 10 se presentan los títulos de producción de citotoxina de las 50 cepas de C. difficile observándose que un porcentaje considerable de cepas fueron no citotóxicas (62%). Solamente dos cepas de origen no clasificable presentaron título de 4096. La mayor proporción de cepas citotóxicas fue encontrada en cepas extrahospitalarias.

En la tabla 11 se presentan los resultados de concentración inhibitoria mínima (CIM) de las cincuenta cepas a los doce

antimicrobianos probados, observándose que el 100% de las cepas fue sensible a concentraciones menores de 0.5 ug/ml de metronidazol. Las CIM obtenidas con tetraciclina, penicilina y clindamicina nos permitió agrupar las cepas dentro de 12 resistotipos (tabla 12). Para el caso de la tetraciclina se encontró gran variabilidad en las CIM, observándose cepas sensibles a concentraciones menores de 0.25 ug/ml y a concentraciones mayores de 128 ug/ml.

Para la penicilina se encontró una CIM de 8 ug/ml para el 98% de las cepas; para clindamicina la CIM encontrada fue mayor de 128 ug/ml para el 80% de las cepas. Las cepas se consideraron tetraciclina sensibles cuando tuvieron una CIM menor de 2 ug/ml, intermedia cuando tuvieron una CIM de 4 a 16 ug/ml y resistentes mayor de 32. Penicilina sensibles con CIM menor de 4 ug/ml, intermedios de 8 a 16 ug/ml, resistentes mayor de 32. Clindamicina sensibles menos de 4 ug/ml, intermedia 8 a 16 ug/ml y resistentes mayor de 32.

En la tabla 13 se presenta la descripción de la sensibilidad a fagos y bacteriocinas asignando una letra mayúscula a cada uno de los diferentes patrones obtenidos.

En las tablas 14 y 15 se observa la sensibilidad a fagos y

bacteriocinas respectivamente. Es notable el hecho de que aproximadamente 37% de las cepas no fueron sensibles a los fagos y bacteriocinas probados, el 21% de las cepas fueron sensibles al fago Cl 7 y el 26% fue sensible a la bacteriocina B1811.

En la tabla 16 se presenta la caracterización de las 50 cepas y observamos que en cepas intrahospitalarias el resistotipo V, el tipo fagobacteriocínico B y no citotóxicas, fueron los más abundantes; en cepas extrahospitalarias el resistotipo VII, los tipos fagobacteriocínicos A y B y citotóxicas fueron más comunes; en cepas no clasificables el resistotipo V, el tipo fagobacteriocínico E y no citotóxicas fueron los más abundantes.

Observamos que los resistotipos VII y X se presentan en el 50% de las cepas y en las tres procedencias estudiadas, en cambio el resistotipo II solamente se presentó en una cepa de origen intrahospitalario y el resistotipo I sólo se encontró en una cepa de origen no clasificable.

En la tabla 17 se muestra la colonización de 16 pacientes con C. difficile y se observa que 8 pacientes estaban colonizados con 2 cepas de patrón fagobacteriocina o citotoxicidad diferente, lo que nos permitió caracterizarlas

como cepas distintas y 8 pacientes se colonizaron con 2 cepas iguales.

T A B L A 5

FRECUENCIA DE AISLAMIENTO DE Clostridium difficile Y/O CITOTOXINA
EN MUESTRAS DE HECEs DE 273 NIÑOS HOSPITALIZADOS

PACIENTES GRUPOS DE EDAD	COPROCULTIVOS No.	AISLAMIENTO DE <u>C. difficile</u>	
		CULTIVO No. (%)	TOXINA
0-30 días	29	---	1(3.4)
31 días-12 meses	176	15(8.5)	7(3.9)
13 meses-5 años	112	12(10.7)	5(4.5)
6 - 15 años	99	5(5.0)	3(3.0)
T O T A L	416	32(7.7)	16(3.8)

T A B L A 6

FRECUENCIA DE COLONIZACION INTESTINAL POR Clostridium difficile
EN NIÑOS HOSPITALIZADOS DE ACUERDO A SU EDAD

GRUPOS ETARIOS	No. DE NIÑOS ESTUDIADOS	No. y (%) DE NIÑOS HOSPITALIZADOS		
		CULTIVO	TOXINA	CULTIVO y/o TOXINA
0-30 días	16	0 (0)	0 (0)	0 (0)
1-12 meses	103	8(7.7)	3(3.0)	10(9.7)
13 meses-5 años	84	5(6.0)	2(2.3)	7(8.3)
6 - 15 años	70	1(1.4)	2(2.8)	3(4.2)
T O T A L	273	14(5.1)	7(2.6)	20(7.4)

p > 0.05 entre todos los grupos etarios.

T A B L A 7

FACTORES ESTUDIADOS POR SU POSIBLE ASOCIACION CON LA COLONIZACION INTESTINAL POR
C. difficile EN NIÑOS HOSPITALIZADOS

FACTORES	No. DE NIÑOS ESTUDIADOS		FRECUENCIA DE COLONIZACION POR <u>C. difficile</u>		T O T A L	
	< 1 AÑO	>1 AÑO	< 1 AÑO No. (%)	> 1 AÑO No. (%)	No.	(%)
Estado Nutricional						
-Eutróficos y desnutridos de 1er.grado	74	118	7 (9.4)	7 (5.9)	14	(7.2)
-Desnutridos II, III	39	24	2 (5.1)	2 (8.3)	4	(6.3)
Antimicrobianos						
-Con antimicrobiano	96	109	5 (5.2)*	8 (7.3)	13	(6.3)
-Sin antimicrobiano	23	45	(21.7)*	2 (4.4)	7	(10.2)
Diarrea						
-Con antimicrobiano	12	6	0 (0.0)	0 (0.0)	0	(0.0)
-Sin antimicrobiano	1	7	0 (0.0)	1 (14.2)	1	(12.5)
Sin diarrea						
-Con antimicrobiano	84	103	5 (5.9)*	8 (7.7)	13	(6.9)
-Sin antimicrobiano	22	38	5 (22.7)*	1 (2.6)	6	(10.0)

* p < 0.05

T A B L A 8

RELACION DEL TIEMPO DE ESTANCIA Y COLONIZACION INTESTINAL
POR C. difficile EN NIÑOS HOSPITALIZADOS

DIAS DE ESTANCIA	No. DE MUESTRAS		No. y (%) CULTIVO y/o TOXINA		No. (% ACUMULADO)
	NINOS < 1 AÑO	NINOS >1 AÑO	NINOS < 1 AÑO	NINOS > 1 AÑO	
0 - 3	37	43	3 (8.1)	4 (9.3)	7 (8.8)
4 - 7	44	73	5 (11.3)	6 (8.2)	18 (18.2)
8 - 15	50	47	5 (10.0)	4 (8.5)	27 (27.4)
16 - 30	30	39	1 (3.5)	3 (7.6)	31 (33.2)
- 30	16	18	4 (25.0)	1 (5.5)	36 (47.9)
T O T A L	177	220	18 (10.2)	18 (8.2)	36 (47.9)

p >0.005 entre todos los períodos analizados.

T A B L A 9

AISLAMIENTO DE Clostridium difficile Y SU CITOTOXINA DE NIÑOS MAYORES Y MENORES DE 1 AÑO
DE EDAD, CON O SIN DIARREA.

	<u>No. de Pacientes</u>	<u>C. difficile</u> <u>No. %</u>	<u>CITOTOXINA</u> <u>No. %</u>
MENORES DE UN AÑO:			
- Con diarrea	30	4 (13.3)	3 (10)
- Sin diarrea	89	10 (10.1)	3 (3.3)
MAYORES DE UN AÑO:			
- Con diarrea	13	--	1 (7.7)
- Sin diarrea	141	14 (9.9)	17 (12)

T A B L A 10

RELACION DE LA FRECUENCIA DE PRODUCCION DE CITOTOXINA IN VITRO DE 50 CEPAS
DE Clostridium difficile.

ORIGEN	No. TOTAL DE CEPAS	TITULO DE TOXINA					No citotóxicas	
		4096	256	128	64	32		16
No. (%)								
INTRAHOSPITA- LARIAS	23		4(17.3)			1(4.3)	18(78.2)	
EXTRAHOSPITA- LARIAS	6		1(16.6)	1(16.6)	1(16.6)	1(16.6)	2(33.6)	
NO CLASIFICABLE	21	2(9.6)	3(14.2)		3(14.2)	1(4.7)	1(4.7)	11(52.3)
T O T A L	50	2(4.0)	8 (16)	1(2.0)	4(8.0)	3(6.0)	1(2.0)	31(62.0)

T A B L A 11

SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO DE 50 CEPAS* DE Clostridium difficile.

AGENTE ANTIMICROBIANO	% ACUMULADO DE CMI (ug/ml)											
	0.25	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	128
TMP/SMX										2	20	100
KANAMICINA										4	16	100
CEFOXITIN										24	24	100
CICLOSERINA									2	2	2	100
CLINDAMICINA								2	4	12	18	100
AMIKACINA								4	16	48	100	100
GENTAMICINA								6	24	46	60	100
CLORANFENICOL				2	8	50	78	96	100	100	100	100
PENICILINA				18	62	92	98	98	98	98	98	100
AMPICILINA			6	22	72	98	100	100	100	100	100	100
TETRACICLINA	10	10	16	20	28	42	42	52	76	82	82	100
METRONIDAZOL	54	78	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

* De las 50 cepas: 23 de origen intrahospitalario, 6 extrahospitalarios y 21 no clasificables.

TABLA 12

DESCRIPCION DE LOS RESISTOTIPOS

<u>PATRON DE SENSIBILIDAD</u>			<u>TIPO ASIGNADO</u>
T ^r	C ^r	P ^r	I
T ⁱ	C ⁱ	P ^s	II
T ^s	C ^r	P ^r	III
T ^r	C ⁱ	P ^s	IV
T ^r	C ^r	P ^s	V
T ^r	C ⁱ	P ^r	VI
T ⁱ	C ^r	P ^s	VII
T ⁱ	C ^r	P ^r	VIII
T ^s	C ^s	P ^r	IX
T ^s	C ^r	P ^s	X
T ^s	C ⁱ	P ^s	XI
T ⁱ	C ⁱ	P ^r	XII

T. Tetraciclina	C. Clindamicina	P. Penicilina
r. resistente	i. intermedio	s. sensible

TABLA 13

DESCRIPCION DE LA CARACTERIZACION CON FAGOS Y BACTERIOCINAS

PATRON DE SENSIBILIDAD A FAGOS ^a Y/O BACTERIOCINAS ^b	TIPO ASIGNADO
No tipificables	A
C1 7; B 1537	B
B83;778, 809,1995,33A,806	C
B1811,810,1481,1320,1700	D
C12(13);B1811,810,1481,1320,1700	E
C12,6,9,11,13,16,17,19; B1811,810, 1481,1320,1700,1537	F
C1 16, 19; B1811, 810, 1481	G
C1 14,15,16,17,19,20,21; B1537	H
C1 11,13,14,15,16,20,21,22; B1537	I
Crecimiento pobre ^c	J

a) C1 es fagos

b) B es bacteriocina

c) Crecimiento pobre fue cuando no hubo confluencia en él.

T A B L A 14

RELACION DE LA SENSIBILIDAD A FAGOS DE 42 CEPAS DE C. difficile SELECCIONADAS

ORIGEN	No. de Cepas	No. (%) F A G O T I P O					N O TIPIFICABLES*
		C12	C12,6	C12,13	C17	C1 11,13 C1 14,15	
INTRAHOSPITALARIAS	18	2(11.1)		1(5.5)	4(22.2)	1(5.5)	10(55.5)
EXTRAHOSPITALARIAS	6	1(16.6)			2(33.3)		3(50.0)
NO CLASIFICABLES	18	3(16.6)	4(22.2)	3(16.6)	3(16.6)	2(11.1)	3(16.6)
T O T A L	42	6(14.2)	4(9.5)	4(9.5)	9(21.5)	1(2.3) 2(4.6)	16(38.0)

*Cepas no sensibles a los fagos probados.

T A B L A 15

RELACION DE LA SENSIBILIDAD A BACTERIOCINAS DE 42 CEPAS DE C. difficile SELECCIONADAS

ORIGEN	No. de Cepas	BACTERIOCINAS				NO	
		B 83	B1811	B1811,1537	B1537	TIPIFICABLES*	(%)
INTRAHOSPITALARIAS	18	1(5.5)	4(22.2)		4(22.2)	9	(50.0)
EXTRAHOSPITALARIAS	6	1(16.6)	1(16.6)		2(33.3)	2	(33.3)
NO CLASIFICADAS	18	1(5.5)	6(33.3)	4(22.2)	3(16.6)	4	(22.2)
TOTAL	42	3(7.1)	11(26.1)	4(9.5)	9(21.4)	15	(35.7)

*Cepas no sensibles a las bacteriocinas probadas.

T A B L A 16

CARACTERIZACION DE 50 CEPAS DE C. difficile SELECCIONADAS DEL ESTUDIO DE 273 NIÑOS HOSPITALIZADOS

PROCEDENCIA	No. TOTAL DE CEPAS	CITOTOXINA		RESISTOTIPO		TIPO FAGOBACTERIOCINICO		
		TITULO	No. (%)	No.	(%)	No.	(%)	
INTRAHOSPITALARIA	23	No citotóxicas	18(78.2)	II	1(4.3)	A	7	(41.7)
		256	4(17.3)	V	13(47.8)	B	4	(23.5)
		32	1(4.3)	VII	5(26.0)	C	1	(5.8)
				X	4(21.7)	D	1	(5.8)
						E	3	(17.6)
						T	1	(5.8)
EXTRAHOSPITALARIA	6	No citotóxicas	2(33.3)	VII	3(49.9)	A	2	(33.3)
		256	1(16.6)	X	3(33.3)	B	2	(33.3)
		128	1(16.6)			C	1	(16.6)
		64	1(16.6)			E	1	(16.6)
		32	1(16.6)					
NO CLASIFICABLE	21	No citotóxicas	11(52.3)	I	1(4.8)	A	2	(10.5)
		4096	2(9.5)	V	10(52.3)	B	3	(16.0)
		256	3(1.2)	VII	4(23.8)	C	1	(5.3)
		64	3(14.2)	X	6(19.0)	E	7	(36.8)
		32	1(4.8)			F	4	(21.0)
		16	1(4.8)			H	2	(10.5)

Solamente se identificó material extracromosomal en dos cepas de origen intrahospitalario.

T A B L A 17

COLONIZACION DE PACIENTES CON UNO O DOS TIPOS DE CEPAS DE C. difficile

CLASIFICACION DE PACIENTES CARACTERISTICAS DE LAS CEPAS AISLADAS

Pacientes colonizados con
dos diferentes cepas:

1. A, No Tox/ B, No Tox
2. C, Tox / A, No Tox
3. E, Tox / A, Tox
4. C, Tox / A, No Tox
5. C, Tox / E, No Tox
6. D, No Tox/ J, No Tox
7. E, Tox / E, No Tox
8. B, Tox / B, No Tox

TOTAL: 16 CEPAS DIFERENTES

Pacientes colonizados con
dos cepas similares:

1. A, No Tox/ A, No Tox
2. F, No Tox/ F, No Tox
3. A, No Tox/ A, No Tox
4. B, No Tox/ B, No Tox
5. A, No Tox/ A, No Tox
6. E, Tox / E, Tox
7. B, No Tox/ B, No Tox
8. H, Tox / H, Tox

TOTAL: 16 CEPAS SIMILARES

Número de pacientes = 16

Letras mayúsculas: Patrón fagobacteriocínico.

Tox: Toxigénico.

DISCUSION:

Durante la década pasada se reconoció a C. difficile como el agente etiológico de la colitis y colitis pseudomembranosa asociadas al uso de antibióticos, su papel patogénico en la edad pediátrica es aún motivo de controversia, muchos de los lactantes son asintomáticos, aunque tengan el bacilo y la citotoxina en heces, sin embargo algunos lactantes han desarrollado colitis pseudomembranosa^{22,35}.

Existen numerosos reportes donde se informa que C. difficile coloniza el intestino de neonatos con una frecuencia de 2 a 52% (Larson y cols 1982³⁹, Viscidi y cols 1981⁸¹). En el presente trabajo (tablas 5 y 6) la frecuencia de colonización por C. difficile presentó semejanza entre los niños de 1 a 12 meses y los de 13 meses a 5 años y observamos que esta frecuencia disminuyó al aumentar la edad, el grupo de niños mayores de 6 años presentó la colonización más baja observándose una frecuencia de 4.2%. Es interesante hacer notar que el grupo de niños de 1 a 5 años de edad presentan frecuencias de colonización semejantes a las de los niños menores de 1 año de edad (9.7% vs 8.3%). Se conocen pocos trabajos en los que se estudiaran niños mayores de 1 año de edad, el de Viscidi y cols (1981)⁸¹, a semejanza de nosotros reporta una frecuencia de coloniza-

ción de 9% en niños menores de 2 años de edad, a diferencia de nosotros Holst y cols (1981) informan una frecuencia de 64% en niños menores de 8 meses y 4% en niños mayores³⁴.

El reducido grupo de recién nacidos no presentó colonización por C. difficile, resultados diferentes a lo reportado por Cooperstock y cols (1983)¹⁷, él informa de 33% de frecuencia en la identificación del antígeno en niños menores de 4 semanas de edad, pero él utilizó el método de contrainmunolectroforesis para identificar al bacilo, método muy discutido actualmente por dar resultados falsos positivos⁸³. Las explicaciones a este hecho pueden ser varias; como la falta de exposición al bacilo, ya ha sido demostrada la necesidad de un ambiente contaminado para colonizarse⁸⁰, aunque esto es poco probable porque en las mismas salas donde estaban hospitalizados los recién nacidos había otros pacientes colonizados.

En general podemos decir que la frecuencia de colonización de los niños menores de un año de edad en la población estudiada por nosotros es menor a la referida por otros autores^{34,81} y los resultados obtenidos en el mismo hospital en otro trabajo, donde Torres y cols (1984) reportan 23.4% de colonización⁷⁹. Larson y cols observaron variaciones

de 2% a 52% en las frecuencias de colonización por C. difficile en tres diferentes salas de un mismo hospital⁴¹, otros autores consideran que las frecuencias de colonización observadas dependen de la población estudiada⁵⁰.

En la tabla 7 se observa que el estado nutricional de los niños parece influir en la frecuencia de colonización por C. difficile observándose que los menores de un año no desnutridos presentan un 9.4% a diferencia de los niños desnutridos que presentaron una frecuencia de colonización de 5.1%, esta diferencia es menos marcada en los niños mayores de 1 año. Estudios realizados con modelos animales han revelado que aquellos animales con una dieta rica en proteínas disminuyen el tiempo de muerte debida a cecitis por C. difficile, después de la administración de cefazolin⁶⁸.

La influencia de los antibióticos en la frecuencia de colonización (tabla 7), fue un fenómeno dependiente de la edad. En los niños menores de un año el uso de antibióticos disminuyó significativamente, la frecuencia de colonización fue 21.7% sin antimicrobiano a 5.2% con antimicrobiano. Este efecto inhibitorio de los antibióticos sobre la frecuencia de colonización en los lactantes ya había sido notado por Holts y cols (1981) y otros autores^{34,79},

mientras que en los niños mayores de un año de edad la frecuencia observada por nosotros fue ligeramente mayor en los niños recibiendo antibióticos que en la población sin este tratamiento (7.3% vs 4.4%), efecto similar al observado en adultos²³.

La diarrea asociada al uso de antibióticos no parece afectar la colonización en ninguno de los niños estudiados así como el uso o no de antibióticos (tabla 7).

Es interesante señalar que en los niños mayores de un año, sin diarrea se observó una colonización mayor (7.7%) cuando estos niños estaban recibiendo antibióticos que en ausencia de ellos (2.6%), fenómeno semejante a lo que ocurre en adultos, grupo al que el uso de antimicrobianos es un factor de riesgo ya que disminuye la resistencia a la colonización y puede llevar a una colitis o colitis pseudomembranosa⁴⁹.

Otro de los factores analizados fue el tiempo de estancia hospitalaria (tabla 8) y nuestros resultados coinciden con lo señalado por Sheretz y col (1982) al señalar que una estancia hospitalaria prolongada incrementa el riesgo de colonización por C. difficile⁷¹. El ambiente hospitalario es una posible fuente de adquisición del bacilo ya que se

han recuperado esporar de las superficies y con supervivencia hasta de cinco meses²⁴, sin embargo es importante señalar que 8.8% de los niños llegaron colonizados al hospital, esto sugiere que C. difficile está distribuido también en el medio ambiente como por ejemplo el suelo, animales, etc.³⁷.

Los niños menores de un año de edad presentaron menor resistencia a la colonización, en poco tiempo (menos de 15 días) su frecuencia de colonización fue mayor que la observada en niños mayores de 1 año, 11.3% y 8.2% respectivamente (tabla 8).

Los niños con una estancia hospitalaria mayor de 30 días presentaron las frecuencias de colonización más altas, esto fue más notorio en el grupo de niños menores de 1 año (25%) vs 5.5% en los mayores, hecho mencionado antes, al señalar que los niños menores de un año de edad parecen presentar una resistencia menor a la colonización respecto a los niños mayores de un año; 25% y 5.5% respectivamente, en una estancia mayor de 30 días. Sheretz y col (1982) aislaron C. difficile de 22 de 37 neonatos y esta alta prevalencia neonatal la atribuyeron a la diseminación nosocomial y sugieren que C. difficile sirve como marcador para infección cruzada en las unidades de cuidados neonatales⁶⁷.

Para definir con mayor precisión el origen de las cepas es necesario contar con un sistema de tipificación adecuado, que permitiría la identificación de cepas aisladas de fomites, personal portador asintomático, los mecanismos de diseminación del bacilo y definir si la enfermedad asociada a C. difficile resulta de la multiplicación de bacilos endógenos o exógenos por la adquisición de cepas del ambiente hospitalario.

En nuestro estudio la clasificación de las cepas de C. difficile de origen intrahospitalario o extrahospitalario, no pudo realizarse en todos los casos porque no siempre fue posible contar con una muestra de heces al ingreso del paciente, de esta forma, las cepas que no reunieron los requisitos señalados en el capítulo de Material y Métodos, fueron consideradas como no clasificables. Del total de cepas estudiadas 23 se consideraron como de adquisición intrahospitalaria, 6 extrahospitalarias y 21 no clasificables.

En la tabla 10 observamos la frecuencia de producción de toxina "in vitro" de las cepas probadas, notando que el 62% de éstas fueron no citotóxicas. En las cepas de origen intrahospitalario el 78% fueron no citotóxicas a diferencia de las cepas de origen extrahospitalario (33.3%),

esto podría indicarnos que las cepas distribuidas en el ambiente hospitalario, la mayoría son no citotóxicas, lamentablemente no pudimos tomar muestras del ambiente y confirmar esto.

En las tablas 14 y 15 observamos la sensibilidad de las cepas a los fagos probados y a las bacteriocinas respectivamente. Estos métodos son considerados sencillos y útiles en la tipificación de C. difficile y existen varios trabajos preliminares de la utilidad para clasificar a este bacilo⁸⁹. En nuestro estudio más del 30% de las cepas fueron no sensibles a los fagos y bacteriocinas probados y esto se observó en cepas de diferente origen, esto fue más evidente con las cepas intrahospitalarias las cuales presentaron 55 y 50% de cepas no tipificables con fagos y bacteriocinas probados. El resto de las cepas presentó sensibilidad a los fagos y bacteriocinas en frecuencias semejantes entre cepas de los diferentes orígenes probados (tablas 14 y 15).

En la tabla 16 se presenta la caracterización de las 50 cepas y observamos que los patrones de sensibilidad antibiótica VII y X se encuentran en cepas de origen intrahospitalario, extrahospitalario y no clasificable, el patrón II sólo se encontró en una cepa de origen intrahospitala-

rio (4.3%). En cepas de C. difficile estudiadas por Wust y cols⁸⁸, se observó que las CIM de muchos de los antibióticos probados tuvieron una clasificación limitada y muchos de los antibióticos probados fueron de poca utilidad para propósitos de tipificación de las cepas, estos resultados fueron semejantes a lo observado por nosotros (tabla 11). Se encontraron patrones de sensibilidad semejantes entre 7 de los antibióticos probados y solamente tetraciclina, clindamicina y penicilina sirvieron para determinar resistotipos (tabla 12). Es evidente que los antibiogramas solos no permiten diferenciar a las cepas, por lo que es necesario recurrir a otros métodos para lograr una mejor diferenciación de las cepas.

Observamos que las cepas probadas presentaron sensibilidad semejante a los fagos y bacteriocinas probados (tablas 14 y 15) y tenemos que 27 cepas fueron sensibles a las bacteriocinas y 26 sensibles a fagos, cuando se determinó el patrón fago y el tipo bacteriocínico, se incrementó el número de cepas caracterizadas por este método a 31 cepas (tabla 16).

El 22% de las cepas 11/50 se clasificaron con el patrón A que corresponde a las no sensibles a fagos y bacteriocinas probados y este efecto también se observó en las cepas de

los otros orígenes. Las cepas de patrones D e I sólo se observaron en cepas de origen intrahospitalario (2 cepas), mientras que los patrones F y H sólo se observaron en cepas de origen no clasificable (4 y 2 cepas respectivamente). Las cepas de los grupos A, B, C, E se encontraron en los tres grupos estudiados (tabla 16). Es conveniente señalar que las cepas estudiadas no fueron el resultado de un brote de infección hospitalaria, sino un estudio de incidencia a través de un año, por lo que los patrones de sensibilidad a fagos y bacteriocinas y los otros marcadores biológicos probados están indicando una dinámica compleja de diseminación y una prevalencia elevada de las cepas en la sala de Infectología del Hospital. En un estudio realizado en el mismo Hospital 2 años antes que el nuestro, se encontró también una proporción más alta de cepas no toxigénicas que toxigénicas. Muchas de las cepas aisladas en este estudio tuvieron los tipos fagobacteriocínico A y B, los cuales también fueron los más frecuentes en nuestro estudio. La persistencia de las cepas con tipos A y B por casi cuatro años nos habla de una contaminación continua con estas cepas¹⁵. Estos resultados proveen evidencia de la importancia de C. difficile como fuente de infección intrahospitalaria y se sugiere que algunas cepas pueden permanecer por años en el ambiente.

Zeed y cols (1984) confirmaron la adquisición nosocomial de C. difficile ya que encontraron que el 97% de las cepas aisladas presentaban el mismo tipo y confirmaron esto por la ausencia del bacilo de madres e hijos en el parto⁸⁹.

Otros estudios con sistemas de tipificación diferentes confirman la adquisición intrahospitalaria de C. difficile y además la diseminación de una sola cepa en brotes¹⁴.

El 38.2% de las cepas (19/50) (tabla 16) fueron productoras de toxina y se presentaron en cualquiera de los resistotipos o de los patrones de sensibilidad a fagos o bacteriocinas. En las cepas extrahospitalarias sólo hubo una cepa con título de 128 y entre las cepas de los otros orígenes no se encontró ninguna con este título, sin embargo el porcentaje tal alto de cepas no toxigénicas (62%) dificulta diferenciar las cepas por este método.

La heterogeneidad de las cepas se manifestó claramente al observar que 8 pacientes estaban colonizados por cepas diferentes simultáneamente (tabla 17), esta diferencia se estableció en base a patrones fágicos y tipos bacteriocínicos y a su capacidad de producir toxina.

Se sabe que las cepas no toxigénicas pueden inhibir el es-

establecimiento de cepas toxigénicas, posiblemente el porcentaje tan alto de cepas no toxigénicas observado por nosotros tenga relación con la falta de sintomatología en la población estudiada (tabla 9) y observamos que las frecuencias de colonización entre los niños con diarrea y sin diarrea son semejantes (13.3 vs 10.1) respectivamente, en niños menores de un año de edad mientras que en los mayores de 1 año (9.9%) es observado en los niños sin diarrea, la presencia de la citotoxina fue mayor en los niños con diarrea menores de 1 año (10%) que en los niños sin diarrea (3.3%), pero esta diferencia no fue significativa. Los reportes de que C. difficile y su citotoxina pueden estar presentes en niños asintomáticos son varios^{19,79}, sin embargo también se han reportado casos de diarrea asociados a este bacilo³⁷.

Es posible que la falta de relación entre C. difficile y enfermedad obedezca a la presencia de mayor número de cepas no toxigénicas entre la población estudiada, la presencia de la citotoxina es una mejor prueba diagnóstica⁴³. Además la presencia del bacilo o la toxina no es suficiente para causar enfermedad en niños, posiblemente el estudio de los receptores de la toxina, factores de adherencia del bacilo o el papel de la flora normal como barrera para el establecimiento de C. difficile puedan dar respuesta

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

para resolver esta contradicción.

El patrón de plásmidos es un método que ha resultado ser útil con algunos géneros bacterianos, pero en nuestro estudio solamente pudimos ver la presencia de plásmidos en dos cepas de origen intrahospitalario.

Wust y cols⁸⁸ mostraron cuatro perfiles de plásmidos correspondientes a 16 cepas de C. difficile aisladas de un brote. Además observaron que 24/35 cepas aisladas de fuentes geográficamente diferentes no tuvieron plásmidos y las 11 cepas restantes tenían patrones de plásmidos diferentes a las cepas aisladas del brote. Sin embargo en la experiencia de otros autores observaron que 30 - 60% de los aislamientos de C. difficile podían carecer de plásmidos y esto podía deberse a la falta de material extracromosomal o por fallas en el método usado para revelar su presencia¹⁶.

Dependiendo del método usado se han encontrado plásmidos en 18 a 80% de las cepas de C. difficile aisladas, lo que indica gran variabilidad en los resultados¹⁶.

En conclusión podemos decir que la frecuencia de colonización por C. difficile va a depender de la edad del pacien-

te, siendo mayor en los niños de 1 mes a 12 meses (9.7%) y la frecuencia disminuye a 4.2% en mayores de 6 años de edad, frecuencia semejante a la de adultos.

Los niños de 1 a 5 años presentan semejanzas de colonización con la población de menores de 1 año.

El estado nutricional y la presencia de diarrea no parecen influir en la colonización notándose un ligero incremento en los niños eutróficos menores de 1 año y mayores de 1 año aunque esto no fue estadísticamente significativo.

Los antibióticos influyeron de manera negativa, ya que los niños sin tratamiento presentaron frecuencias de colonización mayores.

En la caracterización de las cepas se obtuvieron mejores resultados con el método de sensibilidad a fagos y bacteriocinas, pero sería conveniente aumentar el número de cepas productoras de los mismos para poder caracterizar un número mayor de cepas.

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS. Clostridium difficile.

	<u>SALA I</u>	<u>SALA II</u>
NOMBRE: _____	10 11	24 21
CEDULA: _____ EDAD: _____	9 12	23 22
SEXO: _____ PESO: _____ TALLA: _____	4 5	16 17
FECHA DE INGRESO: _____	3 6	15 18
FECHA DE ESTUDIO: _____	2 7	14 19
DIAS ESTANCIA: _____	1 8	13 20

DIAGNOSTICO PRINCIPAL: _____

TRATAMIENTO: _____

ANTIBIOTICOS	F. DE INICIO	F. DE SUSPENS.	DOSIS	VIA
_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____

LA DIARREA APARECIO ANTES DEL TRATAMIENTO: _____ DURANTE: _____ DESPUES: _____

No. DE DIAS EN QUE APARECIO LA DIARREA A PARTIR DEL INICIO DEL ANTIBIOTICO: _____

No. DE EVACUACIONES EN 24 H.: _____ DURACION DIAS: _____ LIQUIDA: _____

SEMILIQUIDA: _____ MOCO: _____ SANGRE: _____ FIEBRE: _____

COMPLICACIONES: _____

CITOLOGIA FECAL: LEUCOS: _____ X CAMPO PMN: _____ MON: _____ ERITROCITOS: _____

COPROCULTIVO: _____

CULTIVO DE C. difficile: _____

EFECTO CITOPATICO: _____ NEUTRALIZACION: _____

TOXINA A: _____ PH: _____

RECTOSIGMOIDOSCOPIA: _____

RESUMEN:

Con el objeto de conocer la frecuencia de colonización por C. difficile en niños hospitalizados y caracterizar las cepas aisladas, durante 11 meses se tomaron semanalmente muestras de heces a niños hospitalizados en la sala de infectología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional. En total se colectaron 416 muestras de 273 niños, desde recién nacidos hasta 15 años de edad. Se aisló C. difficile utilizando el medio selectivo de CCFA (cicloserina, cefoxitina, fructosa, agar) y se detectó la presencia de la citotoxina por su efecto citopático en células CHO.

Se observó que la frecuencia de colonización por C. difficile fue mayor en el grupo de niños de 1 a 12 meses de edad (9.7%); los niños mayores, de 1 a 5 años, se colonizaron con una frecuencia ligeramente menor a la del grupo de menores (8.3%); al aumentar la edad esta frecuencia de colonización disminuyó a 4.2% en el grupo de 6 a 15 años de edad, frecuencia que se aproxima a la reportada en adultos.

La frecuencia de colonización no parece estar influida por la condición nutricional o la presencia de diarrea; sin embargo, los antibióticos ejercieron una influencia negativa en el grupo de niños menores de un año; así, la frecuencia de colonización fue mayor en aquellos que no tuvieron tratamiento antimicrobiano (22.7% / 5.2%).

Las cincuenta cepas aisladas del estudio se clasificaron, de acuerdo a su procedencia, en: 23 de origen hospitalario, 6 extrahospitalarias y 21 no definidas. Todas las cepas fueron caracterizadas por su producción de citotoxina in vitro, su resistencia a antibióticos y su sensibilidad a fagos y bacteriocinas.

En las tres procedencias estudiadas observamos que el 50% de las cepas fueron no citotóxicas; solamente se encontraron dos cepas que produjeron toxina en un título de 4096 y ambas correspondieron a la clasificación de no definidas; el título de 64 sólo se encontró en una cepa extrahospitalaria. Respecto a los resistotipos, los más frecuentes fueron el V (23/50 cepas), el X (13/50 cepas) y el VII (12/50 cepas), identificados en los tres orígenes estudiados.

Con la sensibilidad a fagos y bacteriocinas encontramos que el tipo B fue el más frecuentemente observado en cepas de los tres orígenes. Los tipos D e I sólo se presentaron en dos cepas intrahospitalarias. El 22% de las cepas no mostraron sensibilidad a los fagos y bacteriocinas empleadas. La aplicación conjunta del tipo fagobacteriocínico con la producción de citotoxina, nos permitió observar que 8 de los pacientes estudiados estaban colonizados simultáneamente por dos cepas distintas.

Los resultados obtenidos de este estudio nos dan a conocer las frecuencias de colonización en niños hospitalizados, menores de 15 años de edad, población que en nuestro país no había sido objeto de investigación hasta la fecha. La caracterización de las cepas nos permitió confirmar la adquisición hospitalaria de C. difficile así como la persistencia por varios años de algunos tipos de cepas dentro del ambiente hospitalario.

REFERENCIAS:

1. Al Jumaili F, Shibley J, Lishman M y Record CO. Incidence and origin of C. difficile in neonates. J. Clin. Microbiol. 1984; 19: 77-78.
2. Allen SD. Clostridium. In: Lennette EH, Bellows A, Hausler W y Shadomy HJ (Eds). Manual of Clinical Microbiology. 4th ed. 1985. Washington DC. pp. 434-444.
3. Banno Y, Kobayashi T, Kono H, Watanabe K, Ueno K y Nozama Y. Biochemical characterization and biologic actions of two toxins (D-1 and D-2) from Clostridium difficile. Rev. Infect. Dis. 1984; 6: S11-S20.
4. Bartlett JG. Antibiotic associated pseudomembranous colitis. Rev. Infect. Dis. 1979; 1: 530-539.
5. Bartlett JG. Antibiotic associated colitis. Disease a month, 1984. Eds. Year Book Medical Publishers Inc. Chicago, Illinois. pp. 1-25.
6. Bartlett JG. Treatment of antibiotic associated pseudomembranous colitis. Rev. Infect. Dis. 1984; 6: S235-S241.
7. Bartlett JG, Chang TW, Gurwith M, Gorbach SL y Onderdonk AB. Antibiotic associated pseudomembranous colitis due to toxin producing Clostridia. N. Engl. J. Med. 1978; 298: 531-534.

8. Bartlett JG, Onderdonk AB, Cisneros AB y cols. Clindamycin associated colitis due to toxin producing species of Clostridium in hamsters. J. Infect. Dis. 1977; 136: 701-705.
9. Bartlett JG, Taylor NW, Chang TW. Clinical and laboratory observations in Clostridium difficile colitis. Am. J. Clin. Nutr. 1981; 33: 2521-2526.
10. Borriello SP y Barclay FE. An in vitro model of colonization resistance to Clostridium difficile infection. J. Med. Microbiol. 1986; 21: 299-309.
11. Borriello SP, Honour P. Concomitance of cytotoxigenic and noncytotoxigenic Clostridium difficile in stool specimens. J. Clin. Microbiol. 1983; 18: 1006-1007.
12. Borriello SP. Antibiotic associated diarrhea and colitis. 1984. 1a. Ed. Martinus Nihoff Publishers, Boston MA, pp. 1-71.
13. Brooks JB, Nuñez MO, Basta MI y Hierholzer JC. Studies of stools from pseudomembranous colitis, rotaviral and diarrheal syndromes by frequency pulsed electron capture gas liquid chromatography. J. Clin. Microbiol. 1984; 20: 549-560.
14. Burdon DW. Clostridium difficile: The epidemiology and prevention of Hospital acquired (editorial). Infection 1982; 10: 203-204.

15. Camorlinga PM, Gamboa M, Barragen J, Muñoz O, Fekety FR y Torres JF. Epidemiological aspects of Clostridium difficile in a pediatric hospital and its role in diarrheal disease. Eur. J. Clin. Microbiol. 1987; 6: 542-546.
16. Clabots CR, Peterson LR y Gerding DN. Characterization of a nosocomial Clostridium difficile outbreak by using plasmid profile typing and clindamicin susceptibility testing. J. Infect. Dis. 1988; 158: 731-736.
17. Cooperstock M, Riegler L, Woodruff CW y Onderdonk A. Influence of age, sex and diet on asymptomatic colonization of infants with Clostridium difficile. J. Clin. Microbiol. 1983; 17: 830-833.
18. Delmee ST, Homel M y Wanters G. Serogrouping of Clostridium difficile strains by slide agglutination. J. Clin. Microbiol. 1985; 21: 323-327.
19. Donta ST y Myers MG. Clostridium difficile toxin in asymptomatic neonates. J. Pediatr. 1982; 100: 431-433.
20. Donta ST, Sullivan NM y Wilkins TD. Differential effects of Clostridium difficile toxin on tissue cultured cells. J. Clin. Microbiol. 1982; 15: 1157-1158.
21. Citado por: Dowell VR. Antibiotic associated colitis. Hospital practice 1979; : 75-80.

22. Elstner CL, Lindsay AN, Book S y Matsen J. Lack of relationship of Clostridium difficile to antibiotic associated diarrhea in children. *Pediatr. Infect. Dis.* 1983; 2: 364-366.
23. Fekety R. Antibiotic associated colitis. *Clin. Microbiol. Newsletter* 1981; 3: 63-65.
24. Fekety R, Kim KH, Batts DH, Browne MA, Cudmore J, Toshniwal R y Wilson KH. Studies on the epidemiology of antibiotic associated Clostridium difficile colitis. *Am. J. Clin. Nutr.* 1980; 33: 2527-2532.
25. Florin I. Intoxication of cultured mammalis cells with Clostridium difficile toxin B. Doctor thesis. Department of Bacteriology. Karolinska Institute, Stockholm, Sweden.
26. George WL. Antimicrobial agent associated colitis and diarrhea. *West. J. Med.* 1980; 133: 115-123.
27. George WL. The carrier state: Clostridium difficile. *J. Antimicrob. Chemother.* 1986; 18 (S1): S47-S58.
28. George WL, Sutter VL, Citron D y Finegold SM. Selective and differential medium for isolation of Clostridium difficile. *J. Clin. Microbiol.* 1979; 9: 214-219.
29. Goulston SJ, Mc Govern VJ. Pseudomembranous colitis. *Gut.* 1965; 62: 207-212.
30. Gurian L, Ward TT y Katon RM. Possible food borne transmission in a case of pseudomembranous colitis due to Clostridium difficile. *Gastroenterology* 1982; 83: 465-469.

31. Hafiz S, Mc Entergart MG, Morton RS y Waitkins SA. Clostridium difficile in the urogenital tract of males and females. Lancet 1975; 1: 420-421.
32. Hall J, O'Toole E. Intestinal flora in a new born infants with a description of a new pathogenic anaerobe Bacillus difficilis. Am. J. Dis. Child. 1935; 49: 390-402.
33. Holdeman LV, Cato EP y Moore WE. 1977. Anaerobe Laboratory Manual. 4th. Ed. Blacksburg: Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg Virginia. pp. 79-150.
34. Holst E, Helin y Mardh P. Recovery of Clostridium difficile from children. Scand. J. Infect. Dis. 1981; 13: 41-45.
35. Hyams JS, Berman M y Hegalson H. Non antibiotic associated enterocolitis caused by Clostridium difficile in an infant. J. Pediatr. 1981; 99: 750-752.
36. Justus PG, Martin JL, Goldberg DA, Taylor NS, Bartlett JG, Alexander RW y Mathias JR. Myoelectric effects of Clostridium difficile motility altering factors distinct from its cytotoxin and enterotoxin in rabbits. Gastroenterology 1982; 83: 836-843.
37. Kim KH, Fekety R, Batts DH, Brown D, Cudmore M, Silva J y Waters D. Isolation of Clostridium difficile from the environment and contacts of patients with antibiotic associated colitis. J. Infect. Dis. 1981; 143: 42-50.

38. Lance G. Antimicrobial agent associated colitis and diarrhea: Historical background and clinical aspects. Rev. Infect. Dis. 1984; 6 (S2): S208-S213.
39. Larson HE, Barclay FE, Honour P y Hill D. Epidemiology of Clostridium difficile in infants. J. Infect. Dis. 1982; 146: 727-733.
40. Larson HE, Parry JV, Price AB, Davies DR, Dolvy J y Turrell DA. Undescribed toxin in pseudomembranous colitis. Brit. Med. J. 1977; 1: 1246-1248.
41. Larson HE, Price AB, Honour P, Borriello SP. Clostridium difficile and the etiology of pseudomembranous colitis. Lancet 1978; 1: 1063-1066.
42. Levett PN. Effect of basal medium upon fluorescence of Clostridium difficile. Letters. Applied Microbiol. 1985; 7: 75-76.
43. Levett PN. Laboratory aspects of Clostridium difficile infection PHLS. Microbiology Digest. 1986; 3: 12-15.
44. Libby JM y Wilkins TD. Production of antitoxin of two toxins of Clostridium difficile and immunological comparison of the toxins by cross neutralization studies. Infect. Immun. 1982; 35: 374-376.
45. Lysterly DM, Krivan HC y Wilkins TC. Clostridium difficile: Its disease and toxins. Clin. Microbiol. Rev. 1988; 1: 1-18.

46. Lyerly DM, Lockwood DE, Richarson SH y Wilkins TD. Biological activities of toxins A and B of Clostridium difficile. Infect. Immun. 1982; 35: 1147-1150.
47. Lyerly DM, Saum KE, McDonald DK y Wilkins TD. Effects of Clostridium difficile toxins given intragastrically to animals. Infect. Immun. 1985; 47: 349-352.
48. Lyerly DM, Sullivan NM y Wilkins TD. Enzyme linked immunosorbent assay for Clostridium difficile toxin A. J. Clin. Microbiol. 1983; 17: 72-78.
49. Merida V, Moerman J, Colart J, Lemmens P y Vandepitte J. Significance of Clostridium difficile and its cytotoxin in children. Eur. J. Pediatr. 1986; 144: 494-496.
50. Mulligan M. Epidemiology of Clostridium difficile induced intestinal disease. Rev. Infect. Dis. 1984; 6 (S2): S222-S228.
51. Mulligan ME, Halebian S, Kwok Y y cols. Bacterial agglutination and polyacrylamida gel electrophoresis. J. Infect. Dis. 1986; 153: 267-273.
52. Nakamura S, Mikama M, Nakashio N y cols. Isolation of Clostridium difficile fom the feces and the antibody in sera of young and elderly adults. Microbiol. Immunol. 1981; 25: 345-351.
53. Peikin SR, Galdibini J y Bartlett JG. Role of Clostridium difficile in a case of non antibiotic associated pseudo-membranous colitis. Gastroenterology 1980; 79: 948-949.

54. Potvliege C, Labbe M y Yourensownky. Gas-liquid chromatography as a screening test for Clostridium difficile. Lancet 1981; 2: 1105.
55. Price AB, Davies DR. Pseudomembranous colitis. J. Clin. Pathol. 1977; 30: 1-12.
56. Poxton IR, Aronsson B, Mollby R, Nord C y Collee JG. Immunochemical fingerprinting of Clostridium difficile strain isolated from an outbreak of antibiotic associated colitis and diarrhea. J. Med. Microbiol. 1984; 17: 317-324.
57. Ramos GR. Somatometría pediátrica. Arch. Invest. Med. 1975; 6: 83.
58. Ramos RA, Giono CS y Pichardo R. Aislamiento de Clostridium difficile en población sana y en pacientes que reciben antibiótico-terapia. Infectología 1984; 4: 231-234.
59. Rampling A, Warren RE, Bevon PC, Hoggorth CE, Smirsky D y Hayhol F. Clostridium difficile in haematological malignancy. J. Clin. Pathol. 1985; 38: 445-451.
60. Rennie RD, Elliot JM, Nardini MA y Thornley JH. Criteria for detection of Clostridium difficile toxin production by counterimmunoelectroforesis. J. Clin. Microbiol. 1984; 20: 923-926.
61. Richardson BA, Alcock PA y Gray J. Clostridium difficile and its toxin in healthy neonates. British Med. J. 1983; 287: 878.

62. Rietra PJ, Slateurs RW y Meuwissen SG. Clostridial toxin in faeces of healthy infants. *Lancet* 1978; 2: 319.
63. Kifkin GD, Fekety FR y Silva J. Antibiotic induced colitis implication of toxin neutralized by Clostridium sor-delli antitoxin. *Lancet* 1977; 2: 1103-1106.
64. Rolfe RD. Role of volatile fatty acids in colonization resistance to Clostridium difficile. *Infect. Immun.* 1984; 45: 185-191.
65. Rolfe RD, Helebian S y Finegold SM. Bacterial interference between Clostridium difficile and normal fecal flora. *J. Infect. Dis.* 1981; 143: 470-475.
66. Sell TL, Schaberg DR Fekety R. Bacteriophage and bacteriocin typing scheme for Clostridium difficile. *J. Clin. Microbiol.* 1983; 17: 1148-1152.
67. Sherertz RJ, Sarubbi FA. The prevalence of Clostridium difficile and toxin in a nursery population a comparison between patients with necrotizing enterocolitis and asymptomatic group. *J. Pediatr.* 1982; 100: 435-439.
68. Silva J, Fekety R, Christine W y cols. Inciting and etiological agents of colitis. *Rev. Infec. Dis.* 1984; 6 (S1): S214-S221.
69. Small JD. Fatal enterocolitis in hamsters given lincomycin hydrochloride. *Lab. Animal. Care* 1968; 18: 411-420.
70. Smith L y King O. Occurrence of Clostridium difficile in infections of man. *J. Bacteriol.* 1962; 84: 65-67.

71. Smith CJ, Markowitz SM y Macrina FL. Transferable tetracycline resistance in Clostridium difficile. Antimicrob. Ag. Chemother. 1981; 19: 997-1003.
72. Sullivan NM, Pellett S y Wilkins TD. Purification and characterization of toxins A and B of Clostridium difficile. Infect. Immun. 1982; 35: 1032-1040.
73. Tabaqchali S, Holland D, O'Farrell S y Silman R. Typing scheme for Clostridium difficile: its application in clinical and epidemiological studies. Lancet 1984; 1: 935-938.
74. Taylor HS, Thorne GM y Bartlett S. Separation of an enterotoxin from the cytotoxin of Clostridium difficile. Clin. Res. 1980; 28: 285.
75. Tedesco FJ, Barton RW y Alpers DH. Clyndamycin associated colitis. A prospective study. Ann. Inter. Med. 1974; 81: 429-433.
76. Tedesco F, Markham R, Gurwith M, Christie D, Bartlett JG. Oral Vancomycin for antibiotic associated pseudomembranous colitis. Lancet 1978; 2: 226-228.
77. Torres JF, Camorlinga PM y Muños O. Actividad inhibitoria de la flora fecal contra la multiplicación de Clostridium difficile. Arch. Invest. Med. 1986; 17: 147-153.
78. Torres FJ, Carreño CB y Muñoz O. Producción de toxinas A y B por cepas de Clostridium difficile aisladas en lactantes y adultos. Arch. Invest. Med. 1986; 16: 121-126.

79. Torres JF, Cedillo R, Sánchez J, Dillman C, Giono S y Muñoz O. Prevalence of Clostridium difficile and its cytotoxin in infants in Mexico. J. Clin. Microbiol. 1984; 20: 274-275.
80. Toshniwal R, Silva J, Fekety Y y Kim K. Studies on the epidemiology of colitis due to Clostridium difficile in hamsters. J. Infect. Dis. 1981; 143: 51-54.
81. Viscidi R, Willey S y Bartlett JG. Isolation rates and toxigenic potentials of Clostridium difficile isolates from various patient populations. Gastroenterology 1981; 81: 5-9.
82. Welch DF, Menge SK y Matsen JM. Identification of toxigenic Clostridium difficile by counterimmunoelectrophoresis. J. Clin. Microbiol. 1980; 11: 470-473.
83. West SE y Wilkins TD. Problems associated with counterimmunoelectrophoresis assay for detecting Clostridium difficile toxin. J. Clin. Microbiol. 1980; 11: 470-473.
84. Willey SH y Bartlett JG. Cultures for Clostridium difficile in stools containing a cytotoxin neutralized by Clostridium sordelli antitoxin. J. Clin. Microbiol. 1979; 10: 880-884.
85. Wilson KH, Kennedy MJ y Fekety IR. Use of sodium taurocholate to enhance spore recovery on a medium selective for Clostridium difficile. J. Clin. Microbiol. 1982; 15: 443-446.

86. Wilson KH, Sheagren JN. Antagonism of toxigenic Clostridium difficile by non toxigenic C. difficile. J. Infect. Dis. 1983; 147: 733-736.
87. Wood Helie SJ, Dalton HP y Shadomy S. Hydrophobic and adherence properties of Clostridium difficile. Eur. J. Clin. Microbiol. 1986; 5: 441-445.
88. Wust J, Sullivan N, Hardegber V y Wilkins TD. Investigation of an outbreak of antibiotic associated colitis by various typing methods. J. Clin. Microbiol. 1982; 16: 1096-1101.
89. Zedd AJ, Sell TL, Schaberg DR, Fekety FR y Cooperstock MS. Nosocomial Clostridium difficile reservoir in a neonatal intensive care unit. Pediatr. Infect. Dis. 1984; 3: 429-432.