

11261
2ej
11

PROPIEDADES DE ADHERENCIA Y TOXIGENICIDAD DE CEPAS DE Clostridium
difficile AISLADAS DE POBLACION HOSPITALIZADA: ASOCIACION CON
DIARREA Y ADMINISTRACION DE ANTIBIOTICOS.

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS
BIOMEDICAS, AREA MICROBIOLOGIA PRESENTA:

BIOL. GERARDO GONZALEZ VALENCIA

ASESOR ACADEMICO: DR. JAVIER TORRES LOPEZ

1989

LIBRO 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.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	6
OBJETIVOS.....	7
HIPOTESIS.....	8
MATERIAL Y METODOS.....	9
RESULTADOS.....	18
DISCUSION.....	46
CONCLUSIONES.....	53
BIBLIOGRAFIA.....	54

RESUMEN

Clostridium difficile es el agente causal de la mayoría de los casos de colitis pseudomembranosa (CPM) y de algunos casos de diarrea asociada con el uso de antimicrobianos (DAA). Su patogenicidad esta dada cuando menos por una enterotoxina (toxina A) y una citotoxina (toxina B). Se ha sugerido que la capacidad de adherencia y de producción de otras enterotoxinas podrían estar involucrados, sin embargo no se ha comprobado; por tal motivo se realizó este estudio, cuyos objetivos fueron: 1) Estudiar en cepas de C. difficile la capacidad de adherencia a una superficie hidrofóbica y a células en cultivo; de producir toxinas A y B, y de inducir acumulación de líquidos en asa intestinal ligada de rata (AILR) 2) determinar alguna asociación entre la expresión de estos factores y la presencia de diarrea 3) identificar alguna asociación entre la expresión de los factores y la administración de antibióticos a pacientes y 4) identificar una posible asociación en la expresión de los factores. Se estudiaron 44 cepas aisladas de heces de pacientes hospitalizados, 27 de niños (13 con y 14 sin diarrea) y 17 de adultos (7 con y 10 sin diarrea). La capacidad de adherencia de las cepas a una superficie hidrofóbica se determinó, en cajas de Petri de poliestireno; y a células en cultivo utilizando células Hep-2. La producción de toxinas A y B se determinó probando el efecto de sobrenadantes de cultivos de las cepas sobre células CHO y MRC-5 respectivamente y la capacidad de inducir acumulación de líquido en AILR se realizó probando el efecto de los sobrenadantes en intestino de ratas. Se encontró diferencia significativa ($p < 0.02$) en cepas aisladas de adultos respecto a a las de niños en cuanto a capacidad de adherencia a células Hep-2. El 43% de las cepas se adhirió a poliestireno y el 37% a células Hep-2; el 30% produjeron toxinas A y B y el 56% causó acumulación de líquido en AILR. No se encontró asociación significativa ($P > 0.05$) entre la expresión de los factores y la presencia de diarrea o el uso de antimicrobianos; sin embargo, en adultos las cepas aisladas de casos de diarrea fueron más adherentes y toxigénicas que las de casos sin diarrea. Se encontró asociación significativa ($P < 0.05$) entre la capacidad de producir toxinas (A y B) y la de inducir acumulación de líquido en AILR. Ocho de las cepas que indujeron acumulación de líquido en AILR no produjeron toxinas A y B. Las conclusiones del estudio fueron: 1) Más del 40% de las cepas se adhirió a superficie hidrofóbica o a células en cultivo y produjeron citotoxinas y enterotoxinas 2) la capacidad de adherencia no estuvo asociada con la presencia de diarrea 3) la administración de antibióticos a los pacientes no seleccionó cepas toxigénicas o adherentes a células pero favoreció la selección de cepas adherentes a poliestireno y 4) la capacidad de las cepas de producir toxinas A y B sólo se asoció significativamente ($p < 0.05$) con la de inducir acumulación de líquido en AILR. La capacidad de adherencia a superficie hidrofóbica no se asoció con la de adherencia a células, lo que sugiere que se trata de mecanismos de adherencia independientes.

PROPIEDADES DE ADHERENCIA Y TOXIGENICIDAD DE CEPAS DE Clostridium difficile AISLADAS DE POBLACION HOSPITALIZADA: ASOCIACION CON DIARREA Y ADMINISTRACION DE ANTIBIOTICOS.

INTRODUCCION

Clostridium difficile es un bacilo Gram-positivo, anaerobio con espora subterminal capaz de producir toxinas, reconocido actualmente como causa de enfermedad intestinal asociada con el uso de antimicrobianos (4, 5, 11, 19, 21, 44). La enfermedad producida por esta bacteria, presenta un espectro de formas clinicas que van desde una diarrea leve, autolimitante y grados variables de colitis, hasta llegar a una colitis pseudomembranosa (CPM), que puede ser mortal (10, 22, 39). Se ha determinado que C. difficile es responsable de un 20 a 30% de los casos de diarrea asociada con el uso de antimicrobianos (DAA) y de colitis inespecificas y de más del 90% de los casos de CPM (22, 39, 44, 69).

La enfermedad intestinal producida por C. difficile es generalmente iatrogénica. El ambiente hospitalario es propicio para su establecimiento, debido principalmente al uso común de antimicrobianos (25, 28, 31, 41, 42). Casi todos los antimicrobianos pueden inducir la enfermedad, pero los que con mayor frecuencia la ocasionan son la ampicilina, las cefalosporinas y la clindamicina (4, 6, 23, 39, 54).

Se desconoce el mecanismo por el cual los antimicrobianos favorecen el establecimiento de C. difficile (39), aunque se ha sugerido que su uso altera la flora intestinal normal y baja la

resistencia a la colonización, lo cual favorece su adquisición y/o sobrecrecimiento (22, 39, 44).

Un aspecto no aclarado aún, es el relacionado a su participación en la diarrea infecciosa no asociada al uso de antimicrobianos. Algunos trabajos apoyan que C. difficile sólo ocasionalmente es causa de este tipo de diarrea, sin embargo los resultados de otros estudios sugieren que su presencia es determinante en la manifestación de esta enfermedad (7, 13, 14, 20, 23, 34, 49).

Se conoce que un gran número de niños y adultos pueden ser portadores asintomáticos de cepas altamente toxigénicas de C. difficile (22, 39, 44, 69). Sin embargo se desconoce porque cuando se encuentran bajo tratamiento antimicrobiano los niños son menos susceptibles a enfermar que los adultos (18, 39, 43, 56).

Existe evidencia de que el efecto patogénico de C. difficile está mediado al menos por dos toxinas, ambas de naturaleza proteica y altamente hidrofóbicas (1, 3, 39, 40, 57, 58, 66): a) una enterotoxina conocida como toxina A, con un peso molecular estimado de 440 a 500 Kd, la cual produce acumulación de líquido hemorrágico en intestinos delgado y grueso de conejo y rata, y es capaz de inducir acumulación de líquido en intestino de ratón lactante. Ocasiona también reacciones eritematosas e incrementa la permeabilidad vascular en piel de conejo. Es termolábil, resiste valores de pH ácido y básico, se inactiva con quimotripsina y papaina pero no con tripsina y tiene efecto citotóxico en células en cultivo (a nivel de miligramos) y b)

una citotoxina conocida como toxina B, con un peso molecular estimado de 360 a 470 Kd, que no provoca daño tisular ni acumulación de líquidos en intestino de conejo y de ratón lactante; se comporta igual que la toxina A en piel de conejo, es termolábil, se inactiva con valores de pH ácido y básico, así como con tripsina y quimotripsina y es aproximadamente mil veces más activa que la toxina A (a nivel de picogramos) en ensayos con células en cultivo.

Recientemente se han descrito otros posibles factores de virulencia de C. difficile: 1) Factores que alteran la motilidad intestinal (30), 2) enterotoxinas diferentes a la toxina A (27) y 3) capacidad de adherencia a células en cultivo y a superficies hidrofóbicas (70). Los factores que alteran la motilidad intestinal se han estudiado en filtrados de cultivos de C. difficile y se han cuantificado en mucosa del intestino delgado de conejos. Al parecer estos factores son sustancias termolábiles diferentes a las toxinas A y B, que no causan secreción ni daño tisular. Se desconoce aún, la participación de estos factores en la producción de enfermedad. Existe evidencia de que C. difficile produce otro tipo de enterotoxinas diferentes a la toxina A (27). Recientemente se han aislado y caracterizado péptidos tóxicos, referidos como fracción C, que son química y antigénicamente diferentes a las toxinas A y B (63). Estos péptidos causan acumulación de líquido en asa intestinal ligada de rata sin producir daño aparente en la mucosa (63). Se ha reportado también que la toxina B, definida como citotoxina por sus efectos sobre células en cultivo es capaz de inducir

hipersecreción en intestino delgado de rata sin causar daño tisular (62), su actividad enterotóxica es, sin embargo, altamente inestable. En varios patógenos microbianos la adherencia es un paso esencial para la colonización y posterior infección de superficies de mucosas (29, 46). Se sabe poco acerca de la participación de la capacidad de adherencia en la virulencia de C. difficile. Se ha descrito la presencia de fimbrias en algunas cepas de la bacteria (8, 44), y se ha sugerido que éstas igual que en otros grupos bacterianos (46), podrían funcionar como estructuras de adherencia a superficies mucosas de tracto intestinal, sin embargo no se ha demostrado experimentalmente. Tampoco se ha encontrado correlación entre la expresión de las fimbrias en el microorganismo y la presencia de enfermedad. Se ha reportado que C. difficile se adhiere en forma importante a dos líneas celulares del tracto intestinal (70), se desconoce, sin embargo, su capacidad para adherirse a células Hep-2, línea celular ampliamente utilizada en estudios sobre adherencia de Escherichia coli enteropatógena (15, 45, 32, 44).

(8) La adherencia de tipo inespecífico y mediada por interacciones hidrofóbicas, descrita originalmente en bacterias de vida libre degradadoras de hidrocarburos (51, 52), se ha estudiado también en bacterias de importancia médica (47, 50, 55, 70), en las que se ha planteado su posible participación como factor de virulencia, por evidencias de su importancia en el proceso de colonización. Se ha reportado que C. difficile puede adherirse por propiedades hidrofóbicas a poliestireno (70), sin embargo, se desconoce la importancia de esta propiedad en la virulencia de las cepas capaces de hacerlo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existe controversia sobre la participación de Clostridium difficile toxigénico y no toxigénico en formas menos severas de enfermedad intestinal que la CPM como son la diarrea y la colitis inespecíficas asociadas con el uso de antibióticos. Casi el 100% de las cepas aisladas de CPM son productoras de toxinas, lo que no sucede con las cepas aisladas de las formas menos graves. Esto hace pensar que en ellas posiblemente exista algún otro factor diferente a las toxinas A y B que este involucrado con la enfermedad. Recientemente se ha sugerido que la capacidad de adherencia podría ser otro factor de virulencia. No se ha demostrado sin embargo que esta tenga relación con la presencia de diarrea o con la administración de antibióticos. No se ha aclarado tampoco, si la capacidad de adherencia tiene alguna asociación con la toxigenicidad de las cepas. Por lo anterior resulta necesario realizar estudios que contribuyan a aclarar la participación de estos factores de virulencia en la producción de enfermedad y la posible expresión simultánea de dos factores, que pudiera aumentar la virulencia de las cepas.

OBJETIVOS

1. Estudiar en cepas aisladas de población hospitalizada (niños y adultos, con y sin diarrea): a) La capacidad de adherencia a superficie hidrofóbica (poliestireno) y a células en cultivo (Hep-2), b) producción de toxinas (A y B) y c) inducir acumulación de líquido en asa intestinal ligada de rata (AILR).
2. Determinar la posible asociación entre la expresión de estos factores y la presencia de diarrea en los pacientes estudiados.
3. Determinar la posible asociación entre la expresión de estos factores y la administración de antimicrobianos a los pacientes estudiados.
4. Identificar una posible asociación en la expresión de los factores de virulencia estudiados.

HIPOTESIS

1. Más del 30% de las cepas de Clostridium difficile aisladas de población hospitalizada presentan capacidad de adherencia y de producción de toxinas.
2. Las cepas aisladas de pacientes con diarrea son más adherentes y toxigénicas que las aisladas de pacientes sin diarrea.
3. Las cepas aisladas de pacientes con tratamiento antimicrobiano son más adherentes y toxigénicas que las aisladas de pacientes que no están bajo tratamiento.
4. Las cepas de C. difficile capaces de adherirse a células en cultivo son también capaces de adherirse a superficie hidrofóbica. Las cepas productoras de toxinas A y B son capaces también de inducir acumulación de líquido en asa intestinal ligada de rata.

MATERIAL Y METODOS

Origen de las cepas. Se estudiaron 44 cepas de C. difficile aisladas de heces de 42 pacientes hospitalizados y 2 de individuos no hospitalizados (una cepa por persona); 27 de las cepas se aislaron de niños, 13 de ellos con diarrea y 14 sin diarrea; en tanto que 17 fueron aisladas de adultos, 7 de ellos con diarrea y 10 sin diarrea. El origen de todas las cepas aisladas de niños, fue el Hospital de Pediatría del CMN del IMSS. De las cepas aisladas de adultos, 10 se obtuvieron del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubiran y 2 del Instituto Nacional de Cancerología de la Secretaría de Salud, 3 del Hospital de Infectología del Centro Médico la Raza del IMSS, y 2 de individuos no hospitalizados.

AISLAMIENTO

Método directo. Muestras de heces de cada individuo se diluyeron en proporción 1 : 2 en solución reguladora de fosfatos pH 7.2 (PBS). Se sembró 0.1 ml de cada dilución sobre placas de agar cicloserina-cefoxitin-fructosa (CCFA) (24) con 250 ug/ml de cicloserina y 8ug/ml de cefoxitin (16). Las placas se incubaron en anaerobiosis (10% de CO₂, 10% de H₂ y 80% de N₂) a 37 C durante 48 hrs.

Método de enriquecimiento. Simultáneo al cultivo directo, se inoculó un gramo de heces en medio de enriquecimiento que consistió de 37.5 g/l de gránulos de carne cocida (Difco, EUA), 17.5 g/l de infusión de cerebro corazón (Difco, EUA), 6 g/l de extracto de levadura (Difco, EUA) y 10 ml de solución de

hemina/menadiona (Gibco) (37). La incubación se hizo en anaerobiosis a 37 C durante 5 días después de los cuales se hicieron resiembras en medio CCFA.

IDENTIFICACION

Las colonias con morfología característica de C. difficile en medio CCFA, color blanco amarillentas, de 2 a 5 mm de diametro, ligeramente convexas, de bordes irregulares y con apariencia de vidrio molido se confirmaron por su capacidad de fluorescencia al exponerse a la luz ultravioleta (36), y mediante una serie estandar de pruebas bioquímicas que consistieron en: fermentación de carbohidratos lactosa (-), manitol (+), manosa (+), sacarosa (-), glucosa (+), maltosa (-) y xilosa (-); hidrólisis de la esculina (+); producción de indol (-); reducción de nitratos a nitritos (-) y digestión de leche (-) (2).

CONSERVACION

Una vez identificadas las cepas, se cultivaron en medio de carne cocida (37.5 g/l) (Difco, EUA) en anaerobiosis a 37 C durante 48 hrs (37). Estos cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente, hasta que se requirieron para los ensayos de capacidad de adherencia y de producción de toxinas.

ENSAYOS DE ADHERENCIA

Adherencia a superficie hidrofóbica (poliestireno). Para la determinación de capacidad de adherencia a superficie hidrofóbica, se utilizó el método de adherencia a poliestireno descrito por Rosenberg (52) modificado de la siguiente manera:

se utilizaron cajas de Petri de poliestireno de 35 X 10 mm (Falcon, EUA) como superficie hidrofóbica. Las cepas mantenidas en medio de carne cocida se cultivaron en agar de soya tripticaseína (Bioxon, Mex) en anaerobiosis a 37 C por 24 hrs. y se subcultivaron en las cajas de poliestireno que contenían 3 ml de caldo soya tripticaseína (Bioxon, Mex). Las cajas se incubaron en anaerobiosis a 37 C por 24 hrs; después se eliminó el caldo y las cajas se lavaron con agua corriente. Las bacterias que fueron capaces de mantenerse adheridas al sustrato hidrofóbico, se fijaron usando metanol y se tificaron con colorante de Giemsa (dilución 1 : 40 de una solución al 1%) por 20 min (70). Las placas se observaron con microscopio de luz con el objetivo de inmersión (800 aumentos) y se contó el número de bacterias adheridas en 10 campos. El resultado final se expresó como el número promedio de bacterias observadas por campo (bacterias/campo) en 10 campos. Se utilizaron como controles cepas de Acinetobacter calcoaceticus var. anitratus, la cepa RAG-1 que tiene una alta capacidad de adherencia por propiedades hidrofóbicas de superficie, fue el control positivo y la cepa MR-481, una mutante de la anterior sin la capacidad de adherencia, fue el control negativo. Estas cepas fueron proporcionadas por Mel Rosenberg (51) y por Wood-Helie (70).

Adherencia a células Hep-2. Para la determinación de la capacidad de adherencia a células en cultivo, se utilizó el método de adherencia a células Hep-2 descrito por Cravioto y cols (15) modificado de la siguiente manera: las células Hep-2 se mantuvieron en botellas de cultivo de tejidos de 25 cm² (Nunc,

Dinamarca) con medio 199 (In Vitro, Mex) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco, EUA) y penicilina-estreptomicina 50 UI y 50 ug/ml (In Vitro, Mex). Para el ensayo, las células se tripsinizaron y se suspendieron en el mismo medio, y se distribuyeron en placas de cultivo de tejidos de 24 pozos (Nunc, Dinamarca) que contenían laminillas circulares de vidrio como superficie para que crecieran las células. Se aplicaron 2 ml de suspensión celular en cada pozo. Las placas se incubaron a 37 °C hasta que el crecimiento alcanzó un 30% de confluencia. Poco antes de la realización del ensayo, se cambió el medio de mantenimiento por medio 199 suplementado con 1% de suero fetal bovino, sin antibióticos. El inóculo bacteriano se preparó de la siguiente manera: las cepas de *C. difficile* se cultivaron en agar soya tripticaseína (Difco, EUA) a 37 °C por 24 hrs. y se subcultivaron en 2 ml de caldo soya tripticaseína (Difco, EUA). Para obtener el paquete bacteriano, el crecimiento se centrifugó a 2000 rpm/15 °C/15min. (Sorvall RC-5B, rotor SM-24 Dupont Instruments, EUA). El paquete se resuspendió en medio 199 con 1% de suero fetal bovino sin antibiótico a una concentración de 1×10^9 bacterias/ml; se inocularon las placas que contenían las células Hep-2 con 0.1 ml de esta suspensión por pozo. Las placas se incubaron en anaerobiosis a 37 °C por una hora. Después se extrajeron las laminillas y empleando una jeringa se lavaron con medio 199 sin suero fetal y sin antibiótico. Enseguida se fijaron con una solución de formaldehído al 3.7% (v/v) durante 10 min y se tizaron con colorante de Giemsa. La adhesividad se midió bajo microscopia de luz con objetivo de inmersión. Se revisaron 100 células por laminilla y se contaron aquellas que tenían una o más

bacterias adheridas. El resultado se expresó como el número de células que tenían bacterias adheridas en 100 (%). Como control positivo del ensayo se empleó la cepa 29 de C. difficile (aislada de un adulto con diarrea asociada al uso de antibióticos) que en ensayos previos mostró consistentemente 50% o más de adherencia a células Hep-2.

ENSAYOS DE PRODUCCION DE TOXINAS

La capacidad de las cepas de producir toxinas B, A y otras enterotoxinas, se determinó mediante detección del efecto de sobrenadantes sobre cultivos celulares (59) y en asa intestinal ligada de rata (AILR), respectivamente (64).

Obtención de sobrenadantes. Para obtener los sobrenadantes, las cepas se inocularon en infusión de cerebro corazón (Difco, EUA) y se incubaron en anaerobiosis a 37 °C durante 96 hrs; se centrifugaron a 8000 rpm/4 C/20 min (Sorvall RC-5B, rotor SM-24 Dupont Instruments, EUA) y se filtraron a través de membranas de 0.45 µm (Millipore, EUA).

Producción de toxina B. Para la detección de la producción de toxina B se utilizaron células de fibroblastos de pulmón humano (MRC-5), que en estudios previos han mostrado ser sensibles a su efecto (59, 64). Las células se crecieron a confluencia en una microplaca de 96 pozos (Nunc, Dinamarca) con 200 µl de medio mínimo esencial diploide de Eagle (MEM 2n) por pozo, suplementado con glutamina, penicilina-estreptomicina (In Vitro, Mex) y 10% de suero fetal bovino (Gibco, EUA). Para neutralizar la posible actividad de toxina A (que interfiere con el ensayo de toxina B)

se mezclaron 20 ul de antitoxina A (55) con 20 ul de cada uno de los sobrenadantes y las mezclas se incubaron a temperatura ambiente por 45 min. Posteriormente se inocularon 20 ul de cada mezcla por pozo. Las microplacas se incubaron en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37 C durante 24 hrs después de lo cual se fijaron con una solución de formaldehído al 3.7% (v/v) durante 10 min y se tifieron por 20 min con colorante de Giemsa. La actividad de la toxina se detectó por efecto citopático sobre células MRC-5, que al microscopio se observa como redondamiento celular.

Cuantificación de la actividad de la toxina B. Para cuantificar la actividad de la toxina B, se mezclaron 20 ul de antitoxina A (55) con un volumen igual de sobrenadante de aquellas cepas que causaron efecto citopático sobre células MRC-5. Con la mezcla obtenida se prepararon diluciones triples seriadas en MEM^o diploide sin suero y sin antibiótico y se incubaron a 37 C durante 45 min. Cada dilución se inoculó a células MRC-5 crecidas a confluencia en microplacas de 96 pozos. Las placas se incubaron, fijaron y tifieron como se describió previamente en el ensayo de producción de toxina B y se observaron en el microscopio. Los resultados (efecto citopático) obtenidos se expresaron en unidades citotóxicas/ml (UC/ml), definidos como el inverso de la dilución máxima que causa redondeamiento celular en por lo menos 50% de las células (65).

Producción de toxina A. La producción de toxina A de C. difficile se determinó por el efecto de los sobrenadantes sobre células de ovario de hamster chino (CHO) (59, 64). Las células se crecieron a confluencia con medio F-12 (In Vitro, Mex)

suplementado con glutamina, penicilina-estreptomicina (In Vitro, Mex) y 6% de suero fetal bovino (Gibco, EUA). Posteriormente se desprendieron con tripsina (In Vitro, Mex), y se suspendieron en 1 ml de medio F-12. Una tercera parte de la suspensión se diluyó en 20 ml de medio F-12 y se distribuyó en microplacas de 96 pozos (Nunc, Dinamarca), agregando 200 μ l a cada pozo. Las microplacas se incubaron en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37 °C por una hora para permitir que las células se adhirieran. Para neutralizar la toxina B (que interfiere con la actividad de la toxina A) se mezclaron 20 μ l de antitoxina B (65) con 20 μ l de cada uno de los sobrenadantes y se incubaron a temperatura ambiente por 45 min. Posteriormente se inocularon 20 μ l de cada mezcla por pozo. Las microplacas se incubaron toda la noche en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37 °C después de lo cual se fijaron con una solución de formaldehído al 3.7% (v/v) durante 10 min y se tizaron por 20 min con colorante de Giemsa. La actividad se detectó por efecto citotónico sobre las células, que al microscopio se observa como elongación celular.

Cuantificación de la actividad de la toxina A. Para evitar que la actividad de la toxina B interfiriera en la cuantificación de la actividad de la toxina A se mezclaron 20 μ l de antitoxina B (65) con un volumen igual del sobrenadante de las cepas con actividad comprobada de toxina A. Con la mezcla obtenida, se prepararon diluciones triples seriadas en medio F-12 sin suero ni antibiótico y se incubaron a 37 °C durante 45 min. Cada dilución se inoculó por duplicado sobre células CHO crecidas a un 30% de confluencia en microplacas de 96 pozos. Las placas se incubaron,

fijaron y tifieron como se describió previamente en el ensayo de producción de toxina A. Los resultados (efecto citotónico) se expresaron en unidades elongantes/ml (UE/ml), definidas como la inversa de la máxima dilución que causa elongación en por lo menos un 25% de las células (64).

PRODUCCION DE OTRAS ENTEROTOXINAS.

La determinación de la producción de enterotoxinas se realizó también probando el efecto de los sobrenadantes en asa intestinal ligada de rata (64).

Ensayo de asa intestinal ligada de rata. Se utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley de 2 a 3 meses de edad mantenidas en ayuno por 24 hrs (63, 63, 64). Las ratas se anestesiaron con éter y se les practicó una incisión en la línea media del abdomen de manera que el intestino quedara expuesto. Enseguida se localizó el yeyuno y en su parte media se ligaron dos asas de prueba de aproximadamente 10 cm cada una, con una asa intermedia como testigo. Cada asa se inoculó con 1 ml de sobrenadante obtenido como se describió previamente. Se suturó la incisión abdominal y transcurridas 6 hrs se sacrificaron para extraer el intestino. La acumulación de líquidos se estimó a partir de la razón peso/longitud (mg/cm) en las asas de prueba después de restar el peso de las asas testigo inyectadas únicamente con PBS. Como control positivo de actividad enterotóxica, se utilizó la toxina de cólera (3 ug en un ml de PBS) la cual se inoculó del mismo modo que los sobrenadantes (63). Los sobrenadantes que indujeron acumulación de líquidos con un radio mg/cm mayor o igual a 60, que excede el valor reportado (menor de 50 mg/cm) de acumulación

espontanea de liquido en asas intestinales ligadas de rata (33), se consideraron con actividad enterotóxica.

ANALISIS DE RESULTADOS.

La asociación entre capacidad de adherencia y producción en toxinas con la presencia de diarrea y tratamiento antimicrobiano de los pacientes de los cuales fueron aisladas, se determinó mediante un análisis de χ^2 con corrección de Yates o por Prueba de Probabilidad exacta de Fisher cuando las muestras fueron muy pequeñas (53).

RESULTADOS

CAPACIDAD DE ADHERENCIA A DOS TIPOS DE SUPERFICIE

Capacidad de adherencia a superficie hidrofóbica (poliestireno)

Dado que en la literatura no existen criterios de positividad para establecer si una cepa de C. difficile es adherente o no al poliestireno, el primer paso en nuestra evaluación fue determinar valores para estimar el grado de adherencia. Para tal efecto se realizó un análisis del comportamiento de adherencia de las cepas estudiadas (Tabla 1), encontrándose que más del 50% presentaron adherencia entre 0 y 4 bacterias/campo, mientras que el resto la presentaron entre 5 y más de 15 bacterias/campo. De acuerdo con esta distribución, se consideraron como cepas adherentes a aquellas que mostraron más de 5 bacterias/campo. Presentaron adherencia 10 (59%) de 17 cepas aisladas de adultos y 11 (41%) de 27 aisladas de niños (Tabla 3). La diferencia entre éstas no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

Se analizó la posible asociación entre capacidad de adherencia y presencia de diarrea; expresaron adherencia 8 (40%) de 20 cepas aisladas de individuos con diarrea y 13 (54%) de 24 aisladas de individuos sin diarrea (Tabla 4). Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

Para analizar posibles diferencias en la expresión de la capacidad de adherencia de cepas aisladas de niños y de adultos, se estudiaron como grupo por separado. Fueron adherentes, 4 (31%) de 13 cepas aisladas de niños con diarrea y 7(50%) de 14 aisladas de niños sin diarrea (Tabla 5); la

diferencia no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$). En las cepas aisladas de adultos, presentaron adherencia 4 (57%) de las 7 aisladas de individuos con diarrea y 6 (60%) de las 10 aisladas de individuos sin diarrea (Tabla 5); la diferencia tampoco fue estadísticamente significativa ($p = 0.37$).

Se analizó también, la posible asociación del grado de adherencia de las cepas con la presencia de diarrea (Fig. 1). El grado de adherencia de las cepas aisladas de niños con o sin diarrea fue similar (promedios de 22 y 23 bacterias/campo respectivamente), mientras que el de las aisladas de adultos con diarrea fue mayor (promedio 21 bacterias/campo) que el de las aisladas de adultos sin diarrea (promedio 11 bacterias/campo).

Capacidad de adherencia a células Hep-2. Al igual que con la adherencia a superficie hidrofóbica, se estableció un criterio de positividad para determinar la capacidad de adherencia de cepas de *C. difficile* a células Hep-2. La estimación de valores de adherencia (Tabla 2) mostró que más del 60% de las cepas presentaron una adherencia entre 0 y 9%, mientras que las restantes entre 10 y más del 50%. De acuerdo con esta distribución se consideraron adherentes aquellas cepas que mostraron 10% o más de adherencia a células Hep-2. Fueron adherentes, 10 (59%) de las 17 cepas aisladas de adultos y 7 (26%) de las 27 aisladas de niños (Tabla 3). La diferencia entre éstas fue estadísticamente significativa ($p < 0.02$), lo cual sugiere que las cepas aisladas de adultos expresan mayor capacidad de adherencia a células Hep-2 que las aisladas de niños.

El análisis de la posible asociación entre presencia de diarrea

y capacidad de adherencia a células Hep-2 mostró que: de 20 cepas aisladas de individuos con diarrea y de 24 sin diarrea, 5 (25%) y 12 (50%) respectivamente fueron adherentes (Tabla 4); esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

Para determinar posibles diferencias en la expresión de la capacidad de adherencia de cepas aisladas de niños y de adultos, se estudiaron como grupo por separado. Fueron adherentes, 4 (31%) de 13 cepas aisladas de niños con diarrea y 6 (43%) de 14 aisladas de niños sin diarrea (Tabla 5). La diferencia entre éstas fue estadísticamente significativa ($p = 0.047$), sin embargo, no se encontró asociación entre capacidad de adherencia de las cepas con la presencia de diarrea. De las cepas aisladas de adultos, 4 (57%) de 7 aisladas de individuos con diarrea y 6 (60%) de 10 aisladas de individuos sin diarrea fueron adherentes (Tabla 6). La diferencia entre éstas no fue estadísticamente significativa ($p = 0.37$).

Se analizó también el grado de adherencia en asociación con la presencia de diarrea, encontrándose que las cepas aisladas de niños con diarrea fueron menos adherentes que las aisladas de niños sin diarrea; en tanto que las cepas aisladas de adultos con diarrea fueron más adherentes (promedio 37%) que las aisladas de adultos sin diarrea (promedio 29%) (Fig. 2).

CAPACIDAD DE PRODUCCION DE TOXINAS

Producción de toxinas A y B. De las cepas 44 cepas estudiadas, las 13 que produjeron toxina A también produjeron toxina B. Siete (26%), de las 27 cepas aisladas de niños y 6 (35%) de las 17

cepas aisladas de adultos fueron toxigénicas (Tabla 3). La diferencia entre estas no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

Se analizó la posible asociación entre toxigenicidad de las cepas y la presencia de diarrea. Cinco (25%) de las 20 cepas aisladas de pacientes con diarrea y 8 (33%) de las 24 aisladas de pacientes sin diarrea fueron toxigénicas (Tabla 4). Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

Cuando se estudiaron por separado cepas aisladas de niños y de adultos, se encontraron con mayor frecuencia cepas toxigénicas en niños sin diarrea (5 de 14, 36%) que en niños con diarrea (2 de 13, 15%) (Tabla 5). En las cepas aisladas de adultos, la producción de toxinas fue más frecuente en las cepas aisladas de individuos con diarrea (3 de 7, 43%) que en las aisladas de individuos sin diarrea (3 de 10, 30%). Tanto en las cepas aisladas de niños como en las aisladas de adultos las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas ($p = 0.17$ y $p = 0.33$ respectivamente).

Se analizó también si el grado de toxigenicidad de las cepas tenía alguna asociación con la presencia de diarrea en los grupos estudiados (Figs. 3 y 4). Respecto al grado de producción de toxina A, se encontró similitud entre cepas aisladas de niños con y sin diarrea; en tanto las aisladas de adultos con diarrea fueron más toxigénicas que las aisladas de adultos sin diarrea (Fig. 3). En cuanto al grado de producción de toxina B, las cepas aisladas de niños sin diarrea fueron más citotóxicas que las aisladas de niños con diarrea; mientras que las aisladas de adultos con diarrea fueron más citotóxicas que las aisladas de

adultos sin diarrea (Fig. 4).

Capacidad de inducir acumulación de líquidos en asa intestinal ligada de rata (AILR). Se analizaron 36 cepas, incluidas en éstas las 13 toxigénicas (Tabla 3); los sobrenadantes de 20 (56 %) de ellas indujeron acumulación de líquidos en AILR; los sobrenadantes de 6 (43%) de las 14 aisladas de adultos y 14 (64%) de las 22 aisladas de niños indujeron acumulación de líquido en AILR (Tabla 3). Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

El análisis de la posible asociación entre capacidad de inducir acumulación de líquido en AILR y la presencia de diarrea mostró que 8 (40%) de 20 cepas aisladas de individuos con diarrea y 11 (69%) de 24 aisladas de individuos sin diarrea indujeron acumulación de líquido en AILR (Tabla 4). Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

Para analizar posibles diferencias en la expresión de la capacidad de inducir acumulación de líquido en AILR de cepas aisladas de adultos y de niños, se estudiaron como grupo por separado. Los sobrenadantes de 6 (46%) de 13 cepas aisladas de niños con diarrea y los de 8 (89%) de 9 aisladas de niños sin diarrea indujeron acumulación de líquido en AILR; esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($P = 0.052$) (Tabla 5). Los sobrenadantes de 2 (29%) de 7 cepas aisladas de adultos con diarrea y de 3 (43%) de 7 cepas aisladas de adultos sin diarrea indujeron acumulación de líquidos en AILR (Tabla 6); esta diferencia tampoco fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$). Se analizó también, si el grado de inducción de acumulación de

líquido tenía asociación con la presencia de diarrea (Fig. 5). Los sobrenadantes de cepas aisladas de niños con diarrea indujeron menor acumulación de líquidos (promedio 141 mg/cm) que los sobrenadantes de cepas aisladas de niños sin diarrea (promedio 167 mg/cm). En las cepas aisladas de adultos los sobrenadantes aquellas aisladas de pacientes con diarrea indujeron menor acumulación de líquido en AILR (promedio 265 mg/cm) que los de cepas aisladas de pacientes sin diarrea (promedio 347 mg/cm) (Tabla 6).

POSIBLE ASOCIACION ENTRE LA EXPRESION DE DOS FACTORES Y EL ESTADO CLINICO

De las 6 posibles combinaciones de los 2 factores estudiados solamente 2 presentaron alguna asociación con el estado clínico de los pacientes: capacidad de producción de toxinas A y B con inducción de acumulación de líquidos en AILR (Tox/AILR) y capacidad de adherencia a células Hep-2 con inducción de acumulación de líquidos en AILR (AC/AILR). La expresión Tox/AILR se encontró en 4 (20%) de 20 cepas aisladas de pacientes con diarrea y en 8 (50%) de 16 aisladas de pacientes sin diarrea (Tabla 4); la diferencia entre estas fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$). La expresión AC/AILR no se encontró en ninguna de 13 cepas aisladas de niños con diarrea; mientras que se presentó en 3 (33%) de 9 cepas aisladas de niños sin diarrea (Tabla 5); esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 0.054$). No se encontró asociación de Tox/AILR y AC/AILR con el estado clínico cuando se analizaron por separado las cepas aisladas de adultos (Tabla 6).

INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON ANTIBIOTICOS EN LA EXPRESION DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA

Influencia sobre la adherencia a superficie hidrofóbica (poliestireno). Diez (37%) de 27 cepas aisladas de pacientes con tratamiento antimicrobiano y 11 (65%) de 17 cepas aisladas de pacientes sin tratamiento antimicrobiano fueron adherentes a poliestireno (Tabla 7). Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Cuando se estudiaron por separado cepas aisladas de niños, se encontró que fueron adherentes: 4 (25%) de 16 aisladas de los niños que habían recibido tratamiento antimicrobiano y 7 (64%) de 11 cepas aisladas de niños que no lo habían recibido (Tabla 8); la diferencia encontrada no fue estadísticamente significativa ($p = 0.053$), lo cual podría sugerir que el tratamiento selecciona cepas sin capacidad de adherencia a poliestireno. El análisis por separado de las cepas de adulto mostró que 6 (55%) de 11 de las cepas aisladas de individuos que habían recibido tratamiento antimicrobiano y 4 (67%) de 6 que no lo habían recibido fueron adherentes a poliestireno (Tabla 9); la diferencia encontrada no fue estadísticamente significativa ($p > 0.35$).

Influencia sobre la capacidad de adherencia a células. Diez (37%) de 27 cepas aisladas de pacientes con tratamiento antimicrobiano y 7 (41%) de 17 aisladas de pacientes sin tratamiento fueron adherentes a células Hep-2 (Tabla 7); esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

Cuando se analizaron por separado cepas aisladas de niños y de adultos, se encontró que fueron adherentes a células Hep-2 4

(25%) de 16 cepas aisladas de niños que habían recibido tratamiento antimicrobiano y 3 (27%) de 11 cepas aisladas de niños que no lo habían recibido (Tabla 8); esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($P = 0.33$). En cepas aisladas de adultos, 6 (54%) de 11 aisladas de pacientes con tratamiento y 4 (67%) de 6 aisladas de pacientes sin tratamiento fueron adherentes a células Hep-2 (Tabla 9); esta diferencia tampoco fue estadísticamente significativa ($p = 0.35$).

Influencia sobre la capacidad de producción de toxinas A y B. En cuanto a la producción de toxinas, 7 (26%) de 27 cepas aisladas de pacientes con tratamiento antimicrobiano y 6 (35%) de 17 aisladas de pacientes sin tratamiento produjeron toxinas A y B (Tabla 7); la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

En cepas aisladas de niños fueron toxigénicas 2 (13%) de 16 aisladas de pacientes con tratamiento y 5 (71%) de 11 aisladas de pacientes sin tratamiento (Tabla 8); la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 0.06$). En cepas aisladas de adultos, 5 (54%) de 11 aisladas de pacientes con tratamiento y 1 (17%) aislada de 6 pacientes sin tratamiento fueron productoras de toxinas (Tabla 9); la diferencia encontrada en éstas tampoco fue estadísticamente significativa ($p = 0.22$).

Influencia sobre la capacidad de inducir secreción de líquido en AILR. Indujeron secreción de líquido en AILR, 13 (52%) de 25 cepas aisladas de pacientes con tratamiento antimicrobiano y 7 (64%) de 11 aisladas de pacientes sin tratamiento (Tabla 7); la diferencia encontrada no fue estadísticamente significativa ($p =$

0.23).

En cepas aisladas de niños, indujeron secreción de líquidos en AILR, 8 (53%) de 15 aisladas de aquellos que recibieron tratamiento y 6 (86%) de 7 aisladas de aquellos que no recibieron tratamiento (Tabla 8); la diferencia no fue estadísticamente significativa ($P = 0.14$). En tanto que de las cepas aisladas de adultos, indujeron secreción de líquido en AILR 5 (50%) de 10 aisladas de pacientes con tratamiento antimicrobiano y una (25%) de 4 aisladas de pacientes sin tratamiento (Tabla 9); esta diferencia tampoco fue estadísticamente significativa ($p = 0.33$).

Influencia sobre la expresión de dos factores. La expresión AC/AILR se encontró, en 4 (16%) de 25 cepas aisladas de pacientes con tratamiento antimicrobiano y en 2 (18%) de 11 cepas aisladas de pacientes sin tratamiento (Tabla 7); la diferencia encontrada no fue estadísticamente significativa ($p = 0.35$).

En cepas aisladas de niños se encontró que 2 (13%) de 15 aisladas de los que recibieron tratamiento y una (14%) de 7 aisladas de los que no recibieron tratamiento expresaron AC/AILR (Tabla 8). La diferencia encontrada no fue estadísticamente significativa ($P = 0.47$). En cepas aisladas de adultos, AC/AILR se expresó, en 2 (20 %) de 10 cepas aisladas de individuos que recibieron tratamiento y en una (25%) de 4 aisladas de aquellos que no recibieron tratamiento (Tabla 9); esta diferencia tampoco fue estadísticamente significativa ($p = 0.49$).

La expresión Tox/AILR se encontró en, 7 (28%) de 25 cepas aisladas de pacientes con tratamiento antimicrobiano y en 5 (45%) de 11 cepas aisladas de pacientes sin tratamiento (Tabla 7); la

diferencia no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

En cepas aisladas de niños, expresaron Tox/AiLR 2 (15 %) de 15 cepas aisladas de los que recibieron tratamiento y 5 (71 %) de 7 aisladas de los que no lo recibieron (Tabla 8); la diferencia encontrada fue altamente significativa ($P = 0.013$), lo que sugiere que el tratamiento antimicrobiano en cepas aisladas de niños selecciona cepas que no expresan Tox/AiLR. En cepas aisladas de adultos, se encontró expresión Tox/AiLR en 5 (50%) de 10 cepas aisladas de los que recibieron tratamiento pero no en cepas aisladas de aquellos que no recibieron tratamiento (Tabla 9); la diferencia encontrada no fue estadísticamente significativa ($p = 0.125$).

ASOCIACION ENTRE POSIBLES FACTORES DE VIRULENCIA (Tabla 10)

La asociación entre los factores estudiados se determinó mediante un análisis de χ^2 con corrección de Yates. Dicho análisis consistió en asociar en las cepas la expresión de cada factor con la expresión de cada uno de los otros factores.

De las 21 cepas que expresaron capacidad de adherencia a superficie hidrofóbica: 9 (43%) fueron adherentes a células Hep-2, 6 (29%) produjeron toxinas y 7 (19%) indujeron secreción de líquido en AiLR (Tabla 10); en estas cepas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) con ninguno de estos factores, lo anterior sugiere que no existe asociación en la expresión de capacidad de adherencia a poliestireno en las cepas estudiadas con la expresión de ninguno de los otros factores incluida la capacidad de adherencia a

células Hep-2.

De las 17 cepas que expresaron capacidad de adherencia a células Hep-2: 9 (53%) fueron adherentes a poliestireno, 4 (24%) produjeron toxinas A y B y 6 (35%) indujeron secreción de líquidos en AILR (Tabla 10); en estas cepas tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) con ninguno de los otros factores, lo cual indica que tampoco existe asociación en la expresión de capacidad de adherencia a células con la expresión de ninguno de los otros factores incluida la capacidad de adherencia a poliestireno.

De las 13 cepas productoras de toxinas A y B: 6 (46%) fueron adherentes a poliestireno y 4 (31%) a células Hep-2, y 12 indujeron acumulación de líquidos en AILR. En estas cepas sólo se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) con la capacidad de inducir acumulación de líquido en AILR, lo cual significa que en estas cepas existe asociación entre capacidad de producir toxinas A y B e inducir acumulación de líquido en AILR.

De las 20 cepas que indujeron acumulación de líquidos en AILR: 7 (35%) fueron adherentes a poliestireno y 6 (30%) a células Hep-2, en tanto 12 (60%) fueron productoras de toxinas A y B. En estas cepas sólo se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) con la capacidad de producir toxinas A y B lo cual significa que existe asociación entre la capacidad de inducir acumulación de líquido en AILR y la capacidad de producir toxinas A y B.

T A B L A 1

DISTRIBUCION SEGUN EL GRADO DE ADHERENCIA DE CEPAS
DE Clostridium difficile A UNA SUPERFICIE
HIDROFOBICA (POLIESTIRENO)

GRADO DE ADHERENCIA (BACT/CAMPO)*	F R E C U E N C I A	
	No. DE CEPAS	(%)
0 - 4	23	(52.28)
5 - 9	7	(15.91)
10 - 14	6	(16.63)
15	8	(18.18)
T O T A L	44	(100.0)

*Promedio de bacterias/campo después de leer 10 campos con la lente de inmersión.

T A B L A 2

DISTRIBUCION SEGUN EL GRADO DE ADHERENCIA DE CEPAS
DE Clostridium difficile A CELULAS Hep-2.

GRADO DE ADHERENCIA (%)*	F R E C U E N C I A	
	No. DE CEPAS	(%)
0 - 9	27	(61.36)
10 - 19	1	(2.28)
20 - 29	7	(15.91)
30 - 39	6	(13.63)
40 - 49	1	(2.28)
50	2	(4.54)
T O T A L	44	(100.0)

* % expresa el número de células en 100 que tuvieron una o más bacterias adheridas.

T A B L A 3

CAPACIDAD DE ADHERENCIA Y DE PRODUCCION DE TOXINAS DE
 CEPAS DE Clostridium difficile AISLADAS DE DIFERENTES PACIENTES

ORIGEN DE LA CEPA	n	F A C T O R			
		ADHERENCIA A POLIESTIRENO No. (%)	ADHERENCIA A CELULAS Hep-2 No. (%)	PRODUCCION DE TOXINAS A Y B No. (%)	ASA LIGADA DE RATA No. (%)
ADULTOS	n = 17	10 (59)	10 (59)	6 (35)	6 ^a (43)
NIÑOS	n = 27	11 (41)	7 (26)	7 (26)	14 ^b (64)
T O T A L:	N = 44	21 (48)	17 (39)	13 (30)	20 (56)
		p > 0.05	p < 0.02	p > 0.05	p > 0.05

a Análisis de 14 cepas

b Análisis de 22 cepas

T A B L A 4

ASOCIACION ENTRE PRESENCIA DE DIARREA Y LOS POSIBLES FACTORES DE VIRULENCIA DE LAS CEPAS DE Clostridium difficile AISLADAS DE NIÑOS Y ADULTOS.

ORIGEN DE LA CEPA	F A C T O R						AC/AILR No. (%)	TOX/AILR No. (%)
	ADHERENCIA A PO- LLESTIRENO (AP) No. (%)	ADHERENCIA A CE- LULAS Hep-2 (AC) No. (%)	PRODUCCION DE TOXINAS A Y B (TOX) No. (%)	ASA LIGADA DE RAYA (AILR) No. (%)				
TOTAL CON DIARREA n = 20	8 (40)	5 (25)	5 (25)	8 (40)	2 (10)	4 (20)		
TOTAL SIN DIARREA n = 24	13 (54)	12 (50)	8 (33)	11*(69)	4*(25)	8*(50)		
TOTAL	21	17	13	19	6	12		
	p > 0.05	p < 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p = 0.17	p < 0.05		

* Análisis de 16 cepas.

T A B L A 5

ASOCIACION ENTRE PRESENCIA DE DIARREA Y LOS POSIBLES FACTORES DE VIRULENCIA
DE LAS CEPAS DE Clostridium difficile AISLADAS DE NIÑOS.

ORIGEN DE LA CEPA	F A C T O R						TOX/AILR No. (%)
	ADHERENCIA A PO- LIESTIRENO (AP) No. (%)	ADHERENCIA A CE- LULAS Hep-2 (AC) No. (%)	PRODUCCION DE TOXINAS A Y B (TOX) No. (%)	ASA LIGADA DE RATA (AILR) No. (%)	AC/AILR No. (%)		
NIÑOS CON DIARREA n = 13	4 (31)	1 (8)	2 (15)	5 (46)	0 (0)	2 (15)	
NIÑOS SIN DIARREA n = 14	7 (50)	6 (43)	5 (36)	8*(89)	3*(33)	5* (56)	
T O T A L	11	7	7	14	3	7	
	p > 0.05	p = 0.047	p = 0.17	p = 0.052	p = 0.054	p = 0.064	

* Análisis de 9 cepas.

T A B L A 6

ASOCIACION ENTRE PRESENCIA DE DIARREA Y LOS POSIBLES FACTORES DE VIRULENCIA
DE LAS CEPAS DE Clostridium difficile AISLADAS DE ADULTOS.

ORIGEN DE LA CEPA	F A C T O R						TOX/AILR No. (%)
	ADHERENCIA A PO- LLESTIRENO (AP) No. (%)	ADHERENCIA A CE- LULAS Hep-2 (AC) No. (%)	PRODUCCION DE TOXINAS A Y B (TOX) No. (%)	ASA LIGADA DE RATA (AILR) No. (%)	AC/AILR No. (%)		
ADULTOS CON DIARREA n = 7	4 (57)	4 (57)	3 (43)	2 (29)	2 (29)	2 (29)	
ADULTOS SIN DIARREA n = 10	6 (60)	6 (60)	3 (30)	3*(43)	1*(14)	3*(43)	
T O T A L	10	10	6	5	3	5	
	p=0.37	p=0.37	p=0.33	p=0.40	p=0.40	p=0.36	

* Analisis de 7 cepas.

T A B L A 7

ASOCIACION ENTRE EL USO DE ANTIBIOTICOS Y LOS POSIBLES FACTORES
DE VIRULENCIA DE LAS CEPAS DE Clostridium difficile AISLADAS DE NIÑOS Y ADULTOS

ORIGEN DE LA CEPA	F A C T O R					AC/AILR No. (%)	TOX/AILR No. (%)
	ADHERENCIA A PO- LIESTIRENO (AP) No. (%)	ADHERENCIA A CE- LULAS Hep-2 (AC) No. (%)	PRODUCCION DE TOXINAS A Y B (TOX) No. (%)	ASA LIGADA DE RATA (AILR) No. (%)			
TOTAL CON TRATA- MIENTO n = 27	10 (37)	10 (37)	7 (26)	13 ^a (52)	4 ^a (16)	7 ^a (28)	
TOTAL SIN TRATA- MIENTO n = 17	11 (65)	7 (41)	6 (35)	7 ^b (64)	2 ^b (18)	5 ^b (45)	
T O T A L	21 p < 0.05	17 p > 0.05	13 p > 0.05	20 p = 0.23	6 p = 0.35	12 p > 0.05	

a Análisis de 25 cepas
b Análisis de 11 cepas

T A B L A 8

ASOCIACION ENTRE EL USO DE ANTIBIOTICOS Y LOS POSIBLES FACTORES
DE VIRULENCIA DE LAS CEPAS DE Clostridium difficile AISLADAS DE NIÑOS

ORIGEN DE LA CEPA	F A C T O R						TOX/AILR No. (%)
	ADHERENCIA A PO- LIESTIRENO (AP) No. (%)	ADHERENCIA A CE- LULAS Hep-2 (AC) No. (%)	PRODUCCION DE TOXINAS A Y B (TOX) No. (%)	ASA LIGADA DE RATA (AILR) No. (%)	AC/AILR No. (%)		
TOTAL CON TRATA- MIENTO n = 16	4 (25)	4 (25)	2 (13)	8 ^a (53)	2 ^a (13)	2 ^a (13)	
TOTAL SIN TRATA- MIENTO n = 11	7 (64)	3 (27)	5 (45)	6 ^b (86)	1 ^b (14)	5 ^b (71)	
T O T A L	11	7	7	14	3	7	
	p=0.053	p=0.33	p=0.06	p=0.14	p=0.47	p=0.013	

a Análisis de 15 cepas

b Análisis de 7 cepas

T A B L A 9

ASOCIACION ENTRE EL USO DE ANTIBIOTICOS Y LOS POSIBLES FACTORES
DE VIRULENCIA DE LAS CEPAS DE Clostridium difficile AISLADAS DE ADULTOS

ORIGEN DE LA CEPA	F A C T O R					AC/AILR No. (%)	TOX/AILR No. (%)
	ADHERENCIA A PO- LLESTIRENO (AP) No. (%)	ADHERENCIA A CE- LULAS Hep-2 (AC) No. (%)	PRODUCCION DE TOXINAS A Y B (TOX) No. (%)	ASA LIGADA DE RATA (AILR) No. (%)			
TOTAL CON TRATA- MIENTO n = 11	6 (55)	6 (54)	5 (45)	5 ^a (50)	2 ^a (20)	5 ^a (50)	
TOTAL SIN TRATA- MIENTO n = 6	4 (67)	4 (67)	1 (17)	1 ^b (25)	1 ^b (25)	0 ^b (0)	
T O T A L	10	10	6	6	3	5	
	p=0.35	p=0.35	p=0.22	p=0.33	p=0.49	p=0.125	

^a Análisis de 10 cepas

^b Análisis de 4 cepas

T A B L A 10

ASOCIACION EN LA EXPRESION DE LOS DIFERENTES FACTORES DE VIRULENCIA
DE CEPAS DE Clostridium difficile AISLADAS DE NIÑOS Y ADULTOS

F A C T O R	ADHERENCIA A POLIESTIRENO No. (%)	ADHERENCIA A CELULAS Hep-2 No. (%)	PRODUCCION DE TOXINAS A Y B No. (%)	ASA LIGADA DE RATA No. (%)
ADHERENCIA A POLIESTIRENO n = 21	9 (43)	6 (29)	7 (19)	
ADHERENCIA A CELULAS n = 17	9 (53)	4 (24)	6 (35)	
PRODUCCION DE TOXINAS A Y B n = 13	6 (46)	4 (31)	12 (92)*	
ASA LIGADA DE RATA n = 20	7 (35)	6 (30)	12 (60)*	

* $p < 0.05$

$\chi^2 = 8.92$

FIG. 1. Capacidad de adherencia a una superficie hidrofóbica (poliestireno) de las cepas de *E. difficile* aisladas de población hospitalizada.

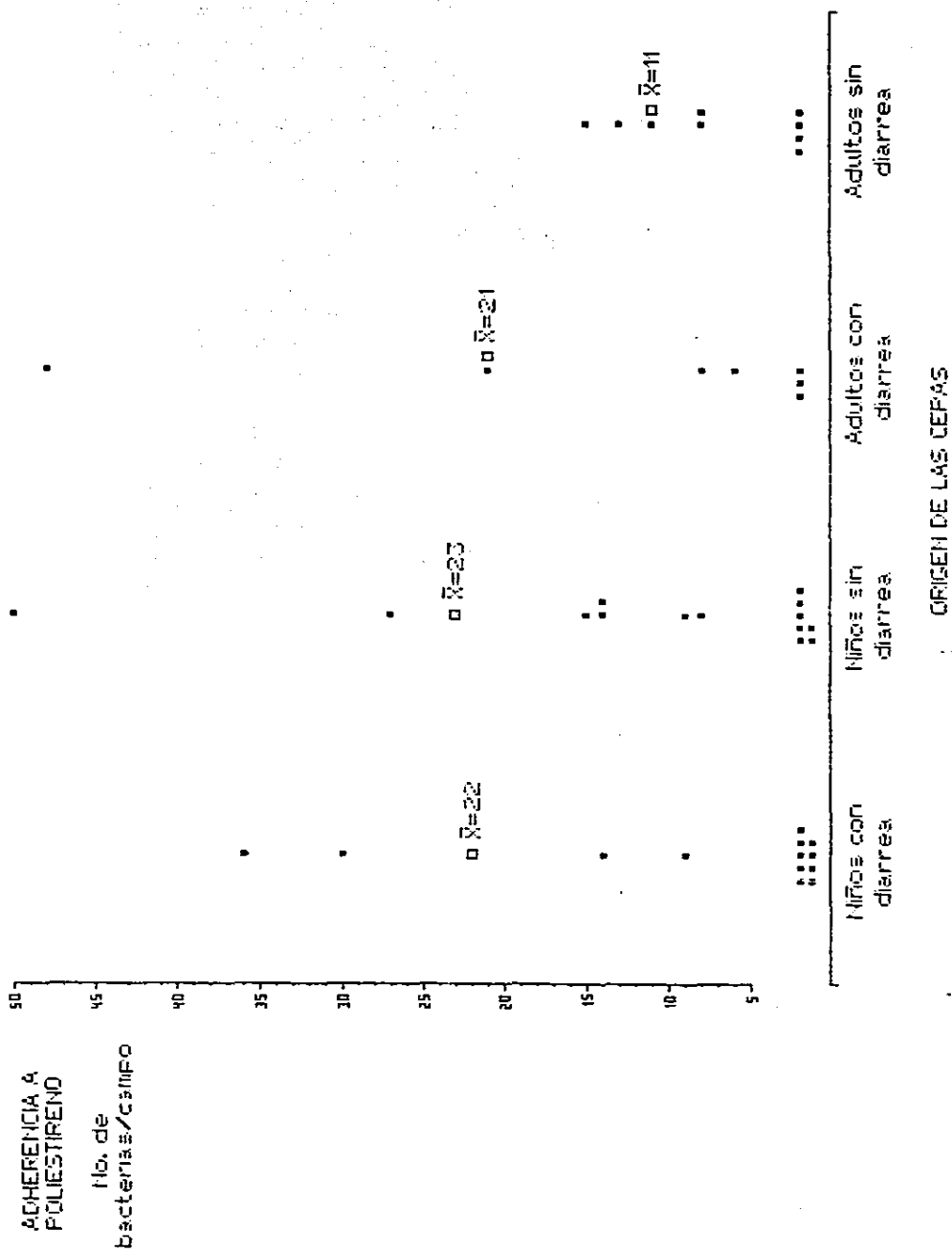


FIG. 2. Capacidad de adherencia a células Hep-2 de los cepos de *C. citriflavus* aislados de población hospitalizada.

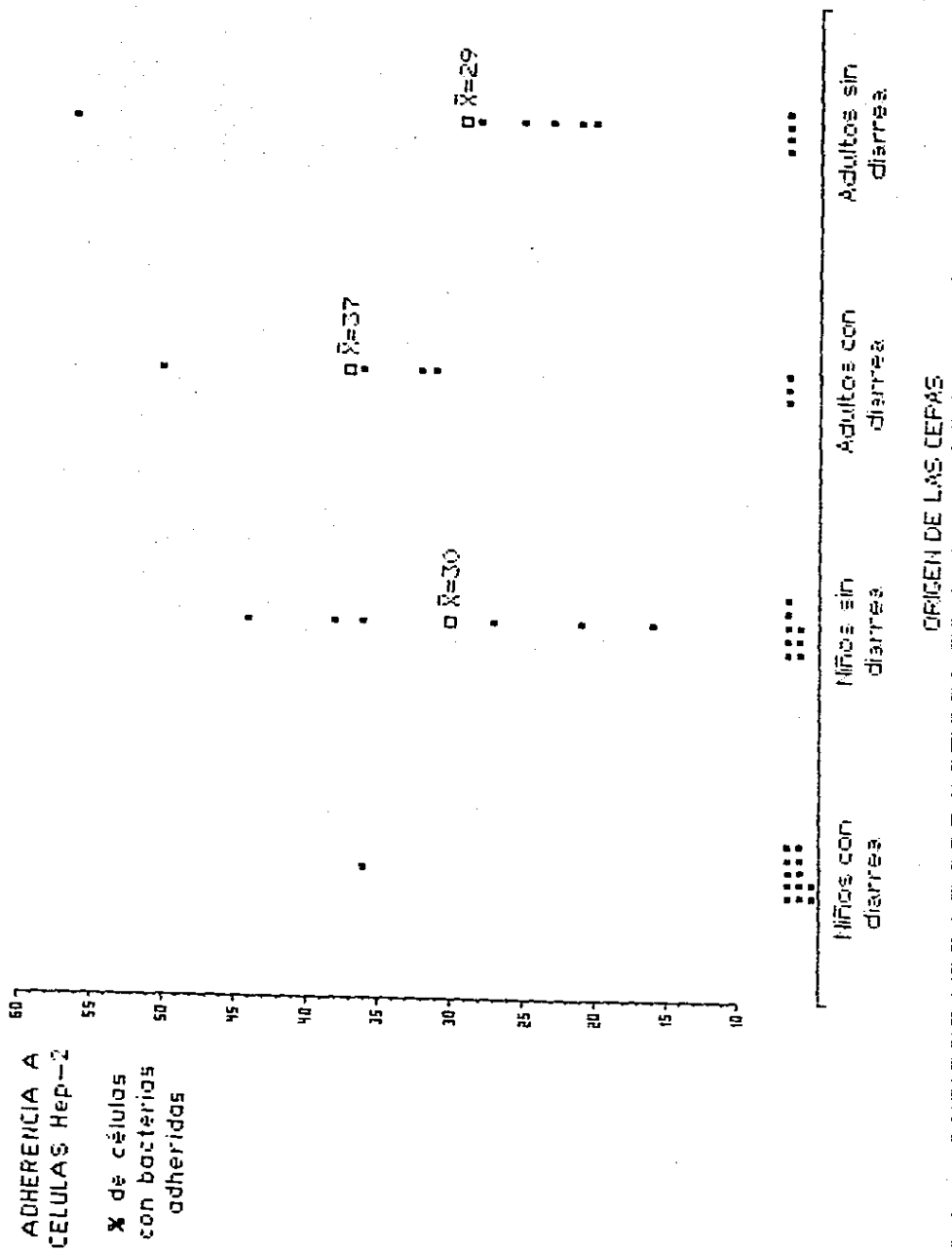


FIG. 3. Producción de toxina "A" por cepas de *E. coli* aisladas de población hospitalizada.

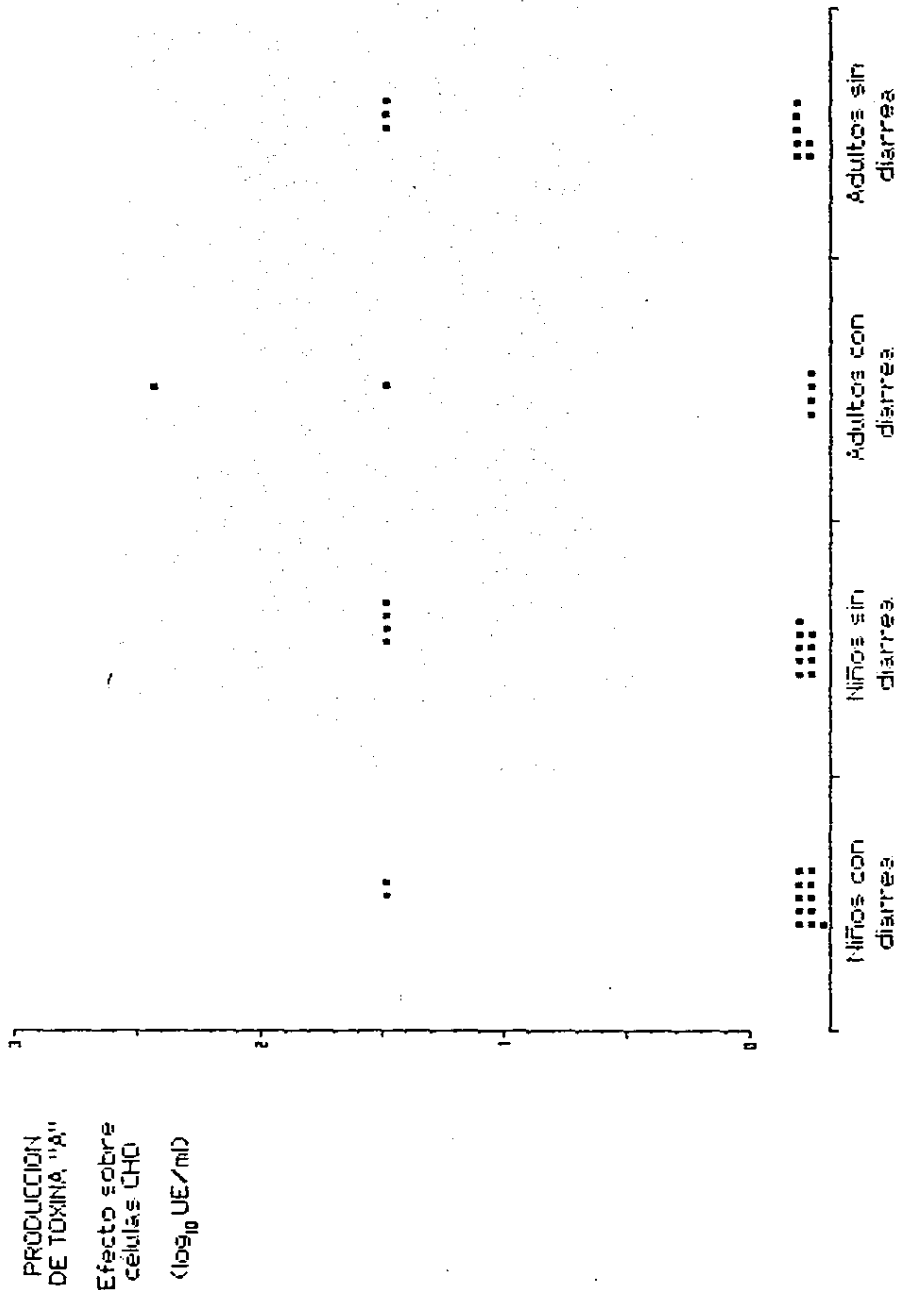


FIG. 4. Producción de toxina "B" por cepas de *C. difficile* aisladas de población hospitalizada.

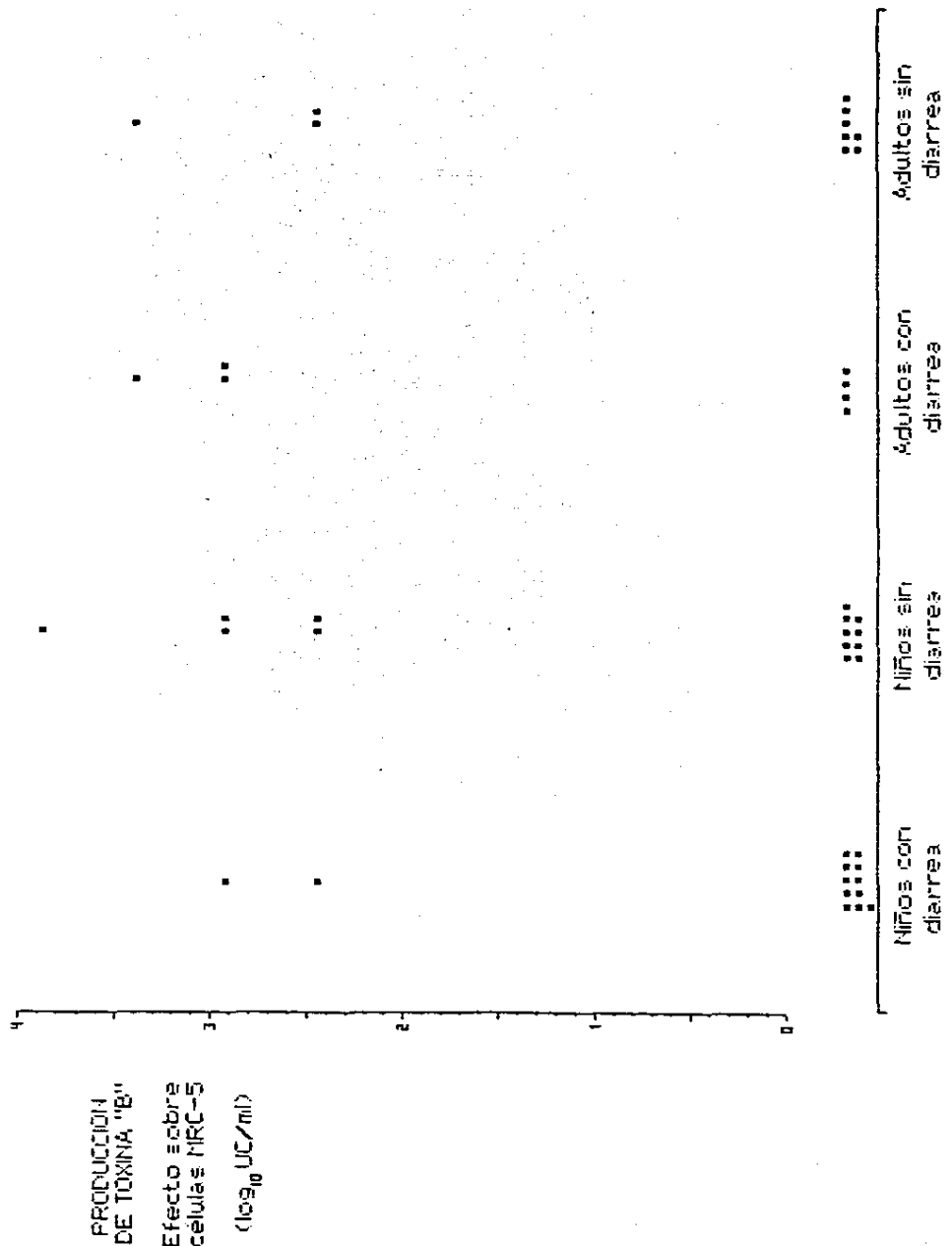


FIG. 5. Acumulación de líquidos en asa ligada de rata por cepas de *C. difficile* aisladas de población hospitalizada.

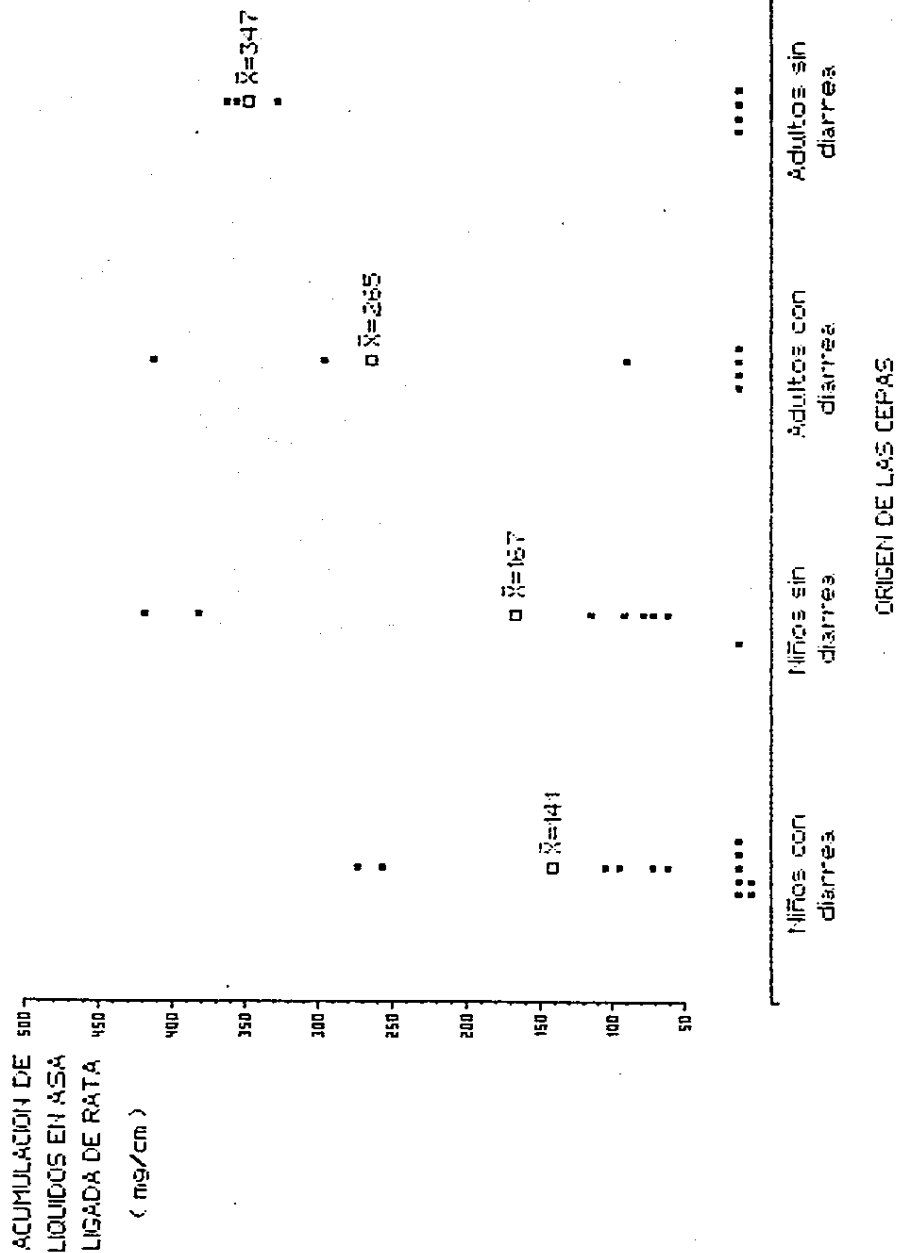


FIG. 6. Asociación entre la producción de toxina "A" con la capacidad de causar acumulación de líquidos en asa ligada de rata en cepas de *C. botulinum*.

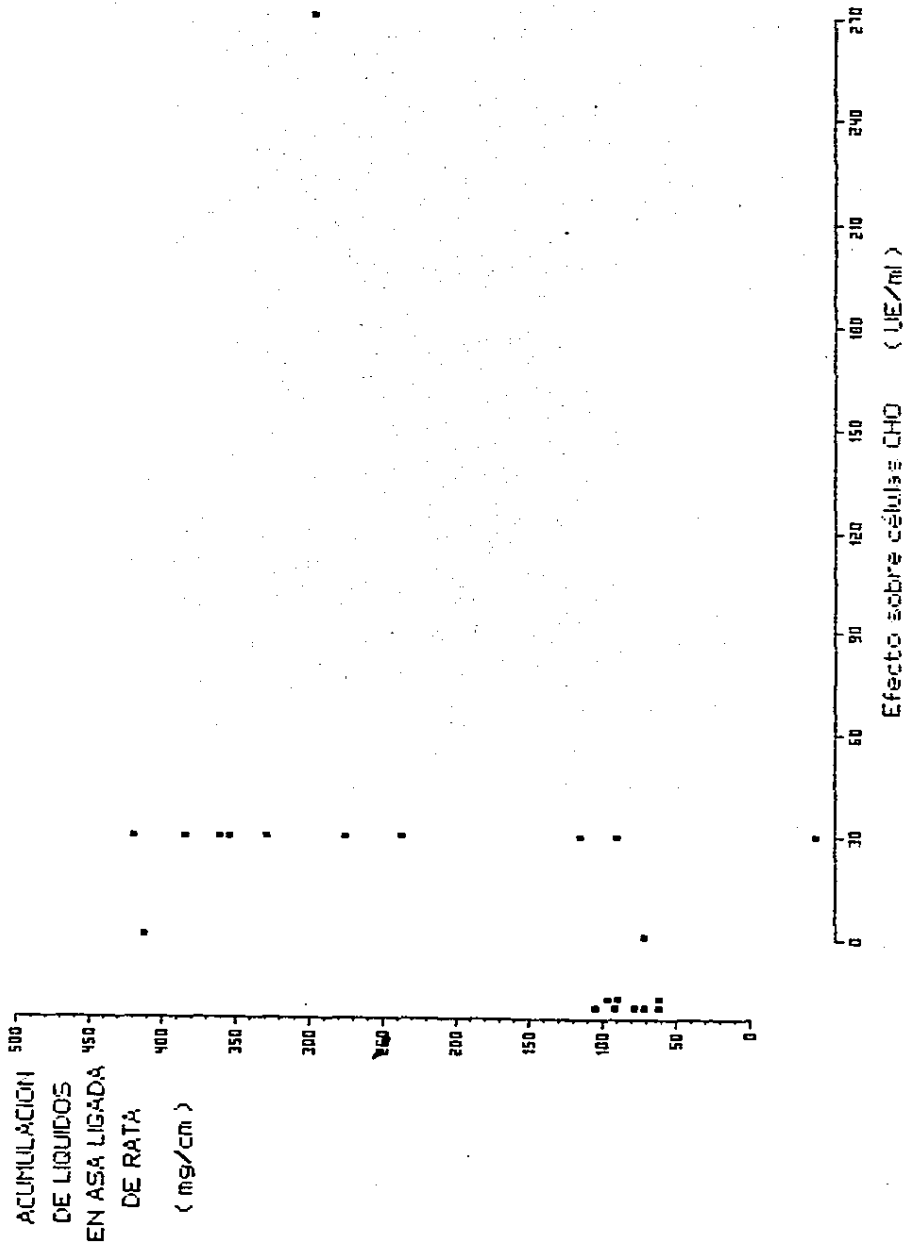
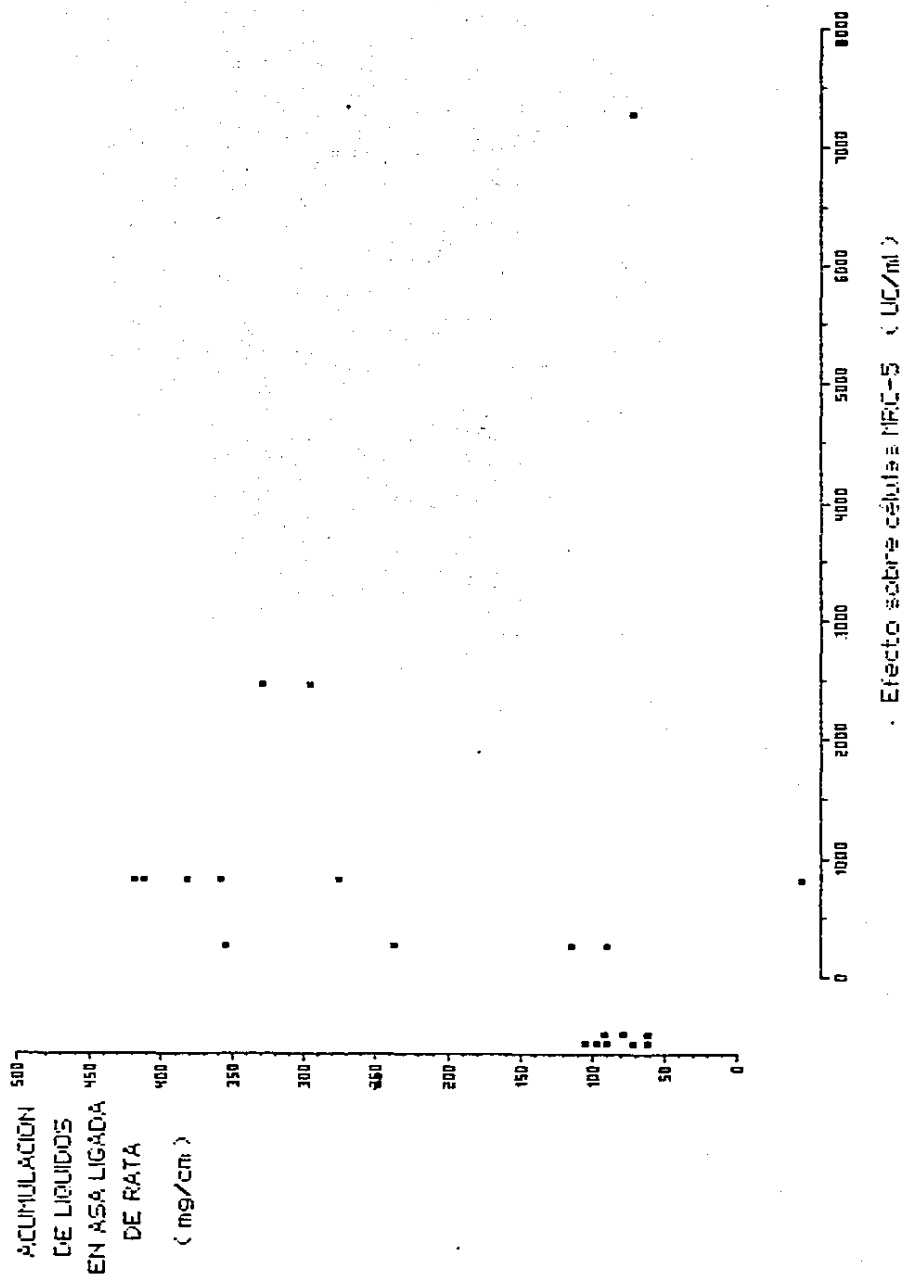


FIG. 7. Asociación entre la producción de toxina "B" con la capacidad de causar acumulación de líquidos en asa ligada de rata en cepas de *C. difficile*.



DISCUSION

A pesar de los avances en el estudio de la patogenicidad de Clostridium difficile logrados hasta la fecha, incluida la purificación y caracterización de las toxinas A y B (3, 57) y el desarrollo de un modelo animal de la enfermedad (15, 48) se desconoce aún el mecanismo por el cual esta bacteria produce colitis y diarrea en humanos. El modelo de la enfermedad en hamsters ha permitido mostrar el nivel patógeno de C. difficile en el desarrollo de CFM, sin embargo no lo ha aclarado respecto a la DAA y a la colitis inespecífica. No se ha podido determinar tampoco si alguna de las toxinas descritas hasta ahora, tiene participación preponderante en alguna de las formas clínicas de la enfermedad asociada con Clostridium difficile y se sabe poco respecto a la posible participación en las mismas de factores de virulencia tales como la capacidad de adherencia y otras enterotoxinas. Acerca de la capacidad de adherencia por ejemplo, una revisión reciente sobre las toxinas y la enfermedad producida por C. difficile, cuando se refiere a otros posibles factores de virulencia no hace mención alguna de ella (39), otro estudio (70) sin embargo sugiere que posiblemente participe en la colonización del tracto intestinal y contribuya en la producción de enfermedad. En el presente estudio, igual que en uno previo (70), se investigó la capacidad de capacidad de adherencia in vitro a dos diferentes sustratos (superficie hidrofóbica y a células en cultivo), pero a diferencia de dicho estudio, se determinó la posible existencia de asociación entre la capacidad de adherencia de las cepas y la presencia de enfermedad (Tablas

4, 5 y 6). Con excepción de la asociación: adherencia a células con presencia de diarrea en cepas aisladas de adultos ($p = 0.02$) (Tabla 3) no se encontró otro tipo de asociación.

En cuanto a la asociación del grado de adherencia a ambos sustratos con la diarrea, los resultados obtenidos parecen indicar participación de la capacidad de adherencia en la diarrea de adultos más no en la de niños, ya que en promedio, las cepas aisladas de adultos con diarrea fueron más adherentes a ambos sustratos que las de adultos sin diarrea, en tanto que las cepas aisladas de niños con diarrea, fueron casi igual o menos adherentes a poliestireno y a células respectivamente, que las aisladas de niños sin diarrea (Figs. 1 y 2). En la presente investigación casi la mitad de las cepas que se analizaron se aislaron de casos de diarrea, pero ninguna de las formas clínicas más graves de la enfermedad asociada con C. difficile. Tal vez la capacidad de adherencia sea más importante en cepas aisladas de colitis o CPM que en diarrea. Sin embargo no existen estudios hasta el momento que permitan confirmarlo.

En algunos grupos bacterianos como estreptococos del grupo A y Acinetobacter calcoaceticus var. anitratus se ha visto que la capacidad de adherencia por propiedades hidrofóbicas puede asociarse con la capacidad de adherencia a células (47, 51). En las cepas de C. difficile estudiadas no se encontró asociación similar (Tabla 10). Un estudio realizado con hamsters para establecer un espectro de virulencia de C. difficile basado en el análisis de varios factores de virulencia (9) mostró que de 9 cepas de origen diverso estudiadas, ninguna presentó propiedades

hidrofóbicas. Los ensayos de adherencia de este estudio, en cambio, detectaron la presencia de propiedades hidrofóbicas en casi la mitad de las cepas estudiadas.

Para el ensayo de adherencia a células en cultivo, se utilizaron células Hep-2, a diferencia de las células de colon de adulto humano y embrionarias intestinales humanas, utilizadas en un estudio previo con C. difficile (70); esto quizá influyó en que los resultados de adherencia a células fueran más bajos, sin embargo el ensayo de adherencia a células Hep-2 ha probado ser muy útil para estudiar la adherencia en otras bacterias enteropatógenas (15, 45, 52).

Se ha propuesto que la administración de antimicrobianos puede influir en la capacidad y grado de adherencia bacteriana. En Escherichia coli por ejemplo se ha visto que su capacidad de adherencia parece incrementarse después de la exposición a bajas concentraciones de antibióticos (68), en cambio en Haemophilus influenzae de tipo B parece inhibirse (26). En el presente estudio no se encontró asociación entre adherencia (a superficie hidrofóbica y a células) y administración de antimicrobianos (Tablas 7, 8 y 9); por el contrario, se detectó un mayor porcentaje de cepas adherentes en entre las aisladas de pacientes que no recibieron tratamiento antimicrobiano, lo anterior sugeriría una selección de cepas no adherentes por el tratamiento,

El reciente descubrimiento de la presencia de fimbrias en células vegetativas de C. difficile (8) ha hecho pensar que estos apéndices pudieran estar involucrados in vivo en la capacidad de adherencia específica y, en consecuencia, con la colonización;

sin embargo al igual que con la adherencia in vitro también no se ha determinado su participación en la producción de enfermedad. Estudios etiológicos y epidemiológicos acerca de infección por C. difficile (39, 44) han aclarado muy poco sobre la participación de las toxinas A y B en la producción de enfermedad. Un estudio reciente en el que se empleó el modelo del hamster (9) mostró que la eficiencia para colonizar el intestino y la capacidad de generar rápidamente altos niveles de toxina A in vivo determinaban mayor virulencia en algunas cepas. En ese estudio no se encontró relación entre patogenicidad y capacidad para producir toxinas A y B in vitro. Esta última observación concuerda con los resultados presentados en el presente trabajo, ya que tampoco se encontró asociación estadísticamente significativa entre la producción de toxinas in vitro y presencia de diarrea. Como en el caso de la capacidad de adherencia, las cepas aisladas de adultos con diarrea fueron más citotóxicas y enterotóxicas que las aisladas de adultos sin diarrea mientras que en niños se observó lo contrario (Figs. 3 y 4). Lo anterior sugiere que los adultos son más sensibles a las cepas que expresan estos factores que los niños. De hecho está bien documentado en la literatura (16, 18, 35, 39, 43, 44, 56, 60, 61) que los niños son portadores asintomáticos de cepas toxigénicas frecuentemente y los resultados de este estudio indican que también son portadores asintomáticos de cepas adherentes. Como ya se mencionó para adherencia, en el caso de producción de toxinas in vitro quizá exista una asociación más clara con cuadros clínicos más graves como colitis inespecífica y CPM.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio y con observaciones clínicas previas (4, 5, 7, 22) el papel de C. difficile en diarrea aguda en niños es muy dudoso; mientras que en adultos pudiera ser más importante, aunque en éstos el resultado final de la interacción huésped-parásito parece depender mucho, no sólo de la virulencia del germen, sino también de el estado del huésped. Se ha sugerido la existencia de ciertos factores de riesgo, tales como abatimiento de la flora intestinal normal, tipo de dieta, potencial redox o producción de proteasas que favorecen el desarrollo de enfermedad (22), sin embargo no existen estudios que lo comprueben. Estas observaciones indican, que al igual que con otros enteropatógenos, el huésped participa activamente en el resultado de la infección que conduce a enfermedad (12).

Los estudios realizados hasta ahora sobre factores de virulencia de C. difficile (8, 30, 70) no reportan si éstos tienen o no asociación con la capacidad de producir toxinas A y B. En el presente trabajo se investigó esta posibilidad (Tabla 10). Sólo se encontró asociación significativa entre capacidad de inducir acumulación de líquidos en AIRR y de producción de toxinas A y B. Este hallazgo era esperado, ya que se ha reportado (33, 38) que la toxina A ejerce efecto enterotóxico en diferentes modelos animales. Por otra parte, no se encontró asociación entre la expresión de los dos tipo de adherencia estudiados, lo cual indica que posiblemente se trate de mecanismos de adherencia independientes.

En este estudio se detectó en los sobrenadantes de las cepas que se estudiaron una actividad enterotóxica diferente a la causada

por las toxinas A y B de C. difficile en 8 de 20 cepas que indujeron acumulación de líquido en AIR (Fig. 6). Ninguna de los sobrenadantes de estas cepas causó acumulación de líquido hemorrágico, como sucede comunmente con la toxina A de C. difficile (40). La enterotoxina o toxina A tiene un mecanismo de acción diferente al de las enterotoxinas de Vibrio cholerae (CT) y a la toxina termolábil de Escherichia coli (LT) que inducen acumulación de líquido sin producir daño en la mucosa intestinal (27, 33). La actividad enterotóxica descrita en este estudio induce acumulación de líquido en AIR sin producir daño a la mucosa intestinal, lo que sugeriría un mecanismo de acción similar al descrito para las toxinas CT y LT, pero diferente al producido por la toxina A, posibilidad que, sin embargo, todavía no se ha investigado; esta actividad enterotóxica es diferente también a la toxina o fracción C producida por C. difficile descrita recientemente (63), que se sabe, también induce acumulación de líquido en AIR sin producir daño en la mucosa intestinal, pero que sin embargo, tiene efecto citotónico sobre células en cultivo, lo cual no sucede con la actividad enterotóxica descrita en este trabajo.

Un hecho singular que se notó fue que 7 de las cepas en cuyos sobrenadantes se detectó esta actividad enterotóxica se aislaron de niños (4 de niños con y 3 de niños sin diarrea), y solamente una de un adulto con diarrea. Quizá se trate de una toxina importante en diarrea aguda en niños.

En un plazo corto será interesante caracterizar esta actividad enterotóxica y determinar su mecanismo de acción y posibles

semejanzas y diferencias con la toxina A y con otras enterotoxinas conocidas.

CONCLUSIONES

1. Más del 40% de las cepas fueron capaces de adherirse a superficie hidrofóbica o a células en cultivo y de producir citotoxinas y enterotoxinas.
2. La capacidad de adherencia y la toxigenicidad de las cepas no estuvo asociada con la presencia de diarrea en los pacientes estudiados.
3. La administración de antibióticos a los pacientes no seleccionó cepas toxigénicas o cepas adherentes a células pero favoreció el enriquecimiento de cepas adherentes a superficie hidrofóbica.
4. La capacidad de las cepas de producir toxinas A y E sólo se asoció significativamente ($p < 0.05$) con la de inducir acumulación de líquidos en asa intestinal ligada de rata. La capacidad de adherencia a superficie hidrofóbica no se asoció significativamente con la de adherirse a células, lo cual sugiere que se trata de mecanismos de adherencia independientes.

BIBLIOGRAFIA

1. Abrams GD, Allo M, Rifkin GD, Fekety R y Silva J. Mucosal damage mediated by clostridial toxins in experimental clindamicin-associated colitis. *Gut*. 1980. 21: 493-499
2. Allen SD. Clostridium. En Lennette EH, Ballows A, Hausler Jr. WJ y Shadomy HJ (ed.). Manual of Clinical Microbiology. 4a. 1985. American Society for Microbiology. EUA. Pags. 434-444
3. Banno Y, Kobayashi T, Kono H, Watanabe K, Ueno K y Nosawa Y. Biochemical characterization and biological actions of two toxins (D-1 y D-2) from C. difficile. *Rev Infect Dis*. 1984. 6: S11-S20
4. Bartlett JG, Chang TW, Gurtwith M, Gorbach SL y Onderdonk AB. Antibiotic associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. *N Engl J Med*. 1978. 298: 531-534
5. Bartlett JG, Chang TW, Taylor NS y Onderdonk AB. Colitis induced by Clostridium difficile. *Rev Infect Dis*. 1979. 1: 376-378
6. Bartlett JG, Taylor NS, Chang TW y Drink J. Clinical and laboratory observations in Clostridium difficile colitis. *Am Clin Nutr*. 1980. 33: 2521-2526
7. Bolton RP, Sheriff RJ y Read AE. Clostridium difficile associated diarrhoea: a role of inflammatory bowel disease. *Lancet*. 1980 i: 383-384
8. Borriello SP, Davies HA y Barclay FE. Detection of fimbriae amongst strains of Clostridium difficile. *FEMS Microbiol Lett*. 1988. 49: 65-67
9. Borriello SP, Motley JM, Mitchell TJ, Barclay FE, Welch AR, Price AD y Stephen J. Clostridium difficile-a spectrum of virulence and analysis of putative virulence determinants in the hamster model of antibiotic-associated colitis. *J Med Microbiol*. 1987. 24: 53-64
10. Borriello SP y Larson HE. Antibiotics and pseudomembranous colitis. *J Antimicrob Chemother*. 1981. 7: S53-S62
11. Bret AL, Todorozuk J, Sahn DF y Hanaver SB. Clostridium difficile culture-positive toxin-negative diarrhea. *Am J Gastroenterol*. 1986. 81: 940-943
12. Brett FB y Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol Rev*. 1989. 53: 210-230
13. Brett RP, Foxton JR, Murdoch JMcC, Brown R, Byrne MD y Colle JG. Clostridium difficile in association with sporadic diarrhoea. *Brit Med J*. 1982. 284: 230-233
14. Brett RP y Wallace E. Clostridium difficile-associated diarrhoea. *J Infect*. 1984. 8: 123-128
15. Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM y Rowe D. An adhesive factor found in strains of Escherichia coli belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol*. 1979. 3: 95-99
16. Camorlinga FM, Gamboa M, Barragan JJ, Muñoz HO, Fekety FR y Torres J. Epidemiological aspects of Clostridium difficile in a pediatric hospital and its role in diarrheal disease. *Eur J Clin Microbiol*. 1987. 6: 542-546
17. Chang TW, Bartlett JG, Gorbach SL y Onderdonk AB. Clindamicin induced enterocolitis in hamsters as a model of pseudomembranous colitis in patients. *Infect Immun*. 1978. 20: 526-527

18. Donta ST y Myers MG. Clostridium difficile toxin in asymptomatic neonates. J Pediatr. 1982. 100: 431-434
19. Dowell VR. Antibiotic-associated colitis. Hospital Practice. 1977. Abril: 75-80
20. Falsen E, Kayser B, Nelhs L, Nygren B y Svedhem A. Clostridium difficile in relation to enteric bacterial pathogens. J Clin Microbiol. 1980. 12: 297-300
21. Fekety RD. Antibiotic-associated colitis. Clin Microbiol Newsletter. 1981. 3: 63-65
22. George WL. Antimicrobial agent-associated colitis and diarrhea: Historical background and clinical aspects. Rev Infect Dis. 1984. 6: 520B-521C
23. George WL, Rolfe RD y Finegold SM. Clostridium difficile and its cytotoxin in feces of patients with antimicrobial agent-associated diarrhea and miscellaneous conditions. J Clin Microbiol. 1982. 15: 1049-1053
24. George WL, Sutter VL, Citron D y Finegold SM. Selective and differential medium for isolation Clostridium difficile. J Clin Microbiol. 1979. 9: 214-219
25. Gilligan FH, McCarthy LR y Genta VM. Relative frequency of Clostridium difficile in patients with diarrheal disease. J Clin Microbiol. 1981. 14: 26-31
26. Gilsdorf JR y Jespersen JM. Effect of antibiotics on adherence of Haemophilus influenzae type B. Antimicrob Agents Chemother. 1986. 30: 370-374
27. Giuliano M, Piemonte F y Gianfrilli FM. Production of an enterotoxin different from toxin A by Clostridium difficile. FEMS Microbiol Lett. 1980. 50: 191-194
28. Heard SR, O'Farrell S, Holland DC, Bartlett NJ y Tabacchali S. The epidemiology of Clostridium difficile with use of a typing scheme: nosocomial acquisition and cross-infection among immunocompromised patients. J Infect Dis. 1986. 153: 159-162
29. Holt SC. Bacterial adhesion in pathogenesis: an introductory statement. En: Schlessinger D (ed.) Microbiology. 1982. American Society for Microbiology. EUA. Pags. 261-263
30. 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. Gastroenterol. 1982. 83: 836-842
31. Kim KH, Fekety R, Batts DH. Isolation of Clostridium difficile from environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis. J Infect Dis. 1981. 143: 42-50
32. Knutton S, Baldwin T, William PH y McMeish AS. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli. Infect Immun. 1989. 57: 1290-1297.
33. Lange S. A rat model for an in vivo assay of enterotoxic diarrhea. FEMS Microbiol Lett. 1982. 15: 239-242
34. Larson HE, Borriello PS, Honour P y Welch A. Clostridium difficile and its toxin in human disease. En: Academic Press London (ed.) Bacterial protein toxins. 1984. Inglaterra. pags. 339-344
35. Larson HE, Price AB, Honour P y Borriello SP. Clostridium

difficile and the aetiology of pseudomembranous colitis. Lancet.

1978. i: 1063-1066

36. Levett FN. Effect of basal medium upon fluorescence of Clostridium difficile. Letts Applied Microbiol. 1985. 1: 75-76

37. Levett FN. Use of enrichment cultures for the isolation of Clostridium difficile from stools. Microbios Letters. 1984. 25: 67-69

38. Lonroth I y Lange S. Toxin A of Clostridium difficile production, purification and effect in mouse intestine. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand. 1983. 91: 395-400

39. Lysterly DM, Krivan HC y Wilkins TD. Clostridium difficile: its disease and toxins. Clin Microbiol Rev. 1988. 1: 1-18

40. Lysterly DM, Lockwood DE, Richardson SH y Wilkins TD. Biological activities of toxins A and B of Clostridium difficile. Infect Immun. 1982. 35: 1147-1150

41. Malamou-Ladas H, O'Farrell S, Nash JQ, Tabaqchali S. Isolation of Clostridium difficile from patients and environment of hospital wards. J Clin Pathol. 1983. 36: 88-92

42. McFarland LV, Mulligan ME, Richard YY y Stamm WE. Nosocomial acquisition of Clostridium difficile infection. N Engl J Med. 1989. 320: 204-210

43. Merida V, Moerman J, Colaert J, Lemmens P y Vandepitte J. Significance of Clostridium difficile and cytotoxin in children. Eur J Clin Pediatr. 1986. 144: 494-496

44. Mulligan ME. Epidemiology of Clostridium difficile induced intestinal disease. Rev Infect Dis. 1984. 6: 5222-5228

45. Nataro JF, Scaletsky IC, Kaper JB, Levine MM y Trabulsi LR. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic Escherichia coli. Infect Immun. 1985. 40: 378-383

46. Ofek I y Beachey EH. Bacterial adherence. Adv Intern Med. 1980. 25: 503-532

47. Ofek I, Whitnack E y Beachey EH. Hydrophobic interactions of group A Streptococci with hexadecane droplets. J Bacteriol. 1983. 154: 139-145

48. Price AB, Larson HE y Crow J. Morphology of experimental antibiotic associated enterocolitis in the hamster: a model human pseudomembranous colitis and antibiotic-associated diarrhoea. Gut 1979. 20: 467-475

49. Riley TV, Wymer V, Bamford VW y Bowman RA. Clostridium difficile in general practice and community health. J Hyg Camb. 1986. 96: 13-17

50. Rosenberg M, Blumberg Y, Judes H, Bar-Ness R, Rubinstein E, y Mazor Y. Cell surface hydrophobicity of pigmented and non pigmented clinical Serratia marcescens strains. Infect Immun. 1986. 51: 932-935

51. Rosenberg M, Perry A, Bayer EA, Gutnick DL, Rosenberg E y Ofek I. Adherence of Acinetobacter calcoaceticus RAG-1 to human epithelial cells and to hexadecane. Infect Immun. 1981. 33: 29-33

52. Rosenberg M. Bacterial adherence to polystyrene: a replica method of screening for bacterial hydrophobicity. Appl Environment Microbiol. 1981. 42: 375-377

53. Siegel S. Estadística no paramétrica. 2a. 1980. México. Pags. 120-137

54. Silva J, Fekety R, Werk C, Ebricht J, Cudmore M, Batts D,

Sirjamaki C y Lukens J. Inciting and etiologic agents of colitis.

Rev Infect Dis. 1984. 6: S214-S221

55. Smyth CJ, Jonsson P, Olson E, Soderlind G, Rosengren J, Hjertens S y Wadstrom T. Differences in hydrophobic surface characteristic of porcine enteropathogenic Escherichia coli with or without K88 antigen as revealed by hydrophobic interaction chromatography. Infect Immun. 1978. 22: 462-472

56. Stark PL, Lee A y Parsonage BD. Colonization of large bowel by Clostridium difficile in healthy infants: quantitative study. Infect Immun. 1982. 35: 895-899

57. Sullivan NM, Pellets S y Wilkins TD. Purification and characterization of toxins A and B of Clostridium difficile. Infect Immun. 1982. 35: 1032-1040

58. Taylor NS, Thorne GM y Bartlett JG. Comparison of two toxins produced by Clostridium difficile. Infect Immun. 1981. 34: 1036-1043

59. Thelestam M y Florin I. Cytopathogenic action of Clostridium difficile toxins. J Toxicol. 1984. 3: 137-180

60. Torres J, Carreño BC y Muñoz HO. Producción de toxinas A y B por cepas de Clostridium difficile aisladas de lactantes y adultos. Arch Inv Med. 1985. 16: 121-125

61. Torres J, Cedillo R, Sanchez J, Dillman C, Giono S y Muñoz HO. Prevalence of Clostridium difficile and its cytotoxin in infants in México. J Clin Microbiol. 1984. 20: 274-275

62. Torres J y Lonroth I. Production, purification and characterization of Clostridium difficile toxic proteins different from toxin A and from toxin B. Biochim Biophys Acta. 1989. En prensa.

63. Torres J, Jennische E, Lang S y Lonroth I. Enterotoxins from Clostridium difficile: Diarrheogenic potency and morphological effects in the rat intestine. Gut. 1989. En prensa.

64. Torres J y Lonroth I. Comparison of methods for the production and purification of toxin A from Clostridium difficile. FEMS Microbiol Letters. 1988. 52: 41-46

65. Torres J y Lonroth I. Purification and characterization of two forms of toxin B produced by Clostridium difficile. FEBS Lett. 1988. 233: 417-420

66. Triadafilopoulos G, Photoulakis C, O'Brien MJ y Lamont JT. Differential effects of Clostridium difficile toxins A and B in rabbit ileum. Gastroenterol. 1987. 93: 273-279

67. Viscidi R, Willey S y Bartlett JG. Isolation rates and toxigenic potential of Clostridium difficile isolates from various patient population. Gastroenterol. 1981. 81: 5-9

68. Vosbeck K, Mett H, Huber U, Bohn J y Petignat M. Effects of low concentrations of antibiotics on Escherichia coli adhesion. Antimicrob Agents Chemother. 1982. 21: 864-869

69. Wilkins TD. Role of Clostridium difficile toxins in disease. Gastroenterol. 1987. 93: 389-390

70. Wood-Helie SJ, Dalton HP y Shadomy S. Hydrophobic and adherence properties of Clostridium difficile. Eur J Clin Microbiol. 1986. 5: 441-445