

870127
1

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



AISLAMIENTO DE CLOSTRIDIUM DIFFICILE EN POBLACION
SANA Y EN PACIENTES QUE RECIBEN ANTIBIOTICOTERAPIA

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

MARIA DE LOS ANGELES CARRILLO SAAVEDRA

ASESOR: G. F. B. MA. DEL SOCORRO PULIDO G.

GUADALAJARA, JALISCO.

2002

TESIS CON
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.

Juan José Trujillo

Q.F.B. Rosa Ma. Muñoz Saucedo
Presidente
Comisión Revisora de Tesis.

Juan José Trujillo

I.Q. Juan José Trujillo del Río
Director
Escuela de Ciencias Químicas

AGRADECIMIENTOS

A Dios:

Por darme la vida y su amor.

A mis Padres: Luis y Luchy

A mi Hermana: Adriana

Por todo su amor y su fe.

Cariñosamente, a mis Abuelitos:

Francisco, Manuela y Elvira.

A mis amigos:

Por recibir mi amistad.

A mis Maestros:

**Por sus conocimientos y amistad
compartida.**

A mi Alma Mater:

Con profundo respeto.

**AISLAMIENTO DE CLOSTRIDIUM DIFFICILE
EN POBLACION SANA Y EN PACIENTES QUE
RECIBEN ANTIBIOTICOTERAPIA**

I N D I C E

	Página
INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	3
- Características del Género Clostridium	3
- Características Generales de Clostridium - difficile	5
Toxinas	6
Patogenia	7
Tratamiento	12
Inmunidad	13
MATERIAL Y METODO	14
- Procedimiento de aislamiento de Clostridium difficile a partir de heces	14
- Descripción de Técnica y Medios utilizados	
Medio de cultivo	16
Técnica de recipiente anaeróbico	16
Coloración de Gram	17
Prueba de Aerotolerancia	19
Principio básico de la fermentación de - hidratos de carbono	19
Movilidad	19
RESULTADOS	21
CONCLUSIONES Y DISCUSION	22
BIBLIOGRAFIA	23

INTRODUCCION

Conforme el uso de antibióticos profilácticos como terapéuticos continúa incrementándose en pacientes, así también las complicaciones directamente atribuibles a las drogas. Una de las complicaciones más comunes e inocuas observadas es la diarrea. Hasta hace 5 años, la causa exacta de la diarrea en este último grupo era elusiva, ahora muchos reportes clínicos así como de laboratorio han implicado a Clostridium difficile.

Se ha demostrado que es el organismo causante de colitis pseudomembranosa en 20% a 30% de los casos de diarrea asociada a antibióticos, pero su incidencia en la flora colónica normal del adulto es solamente en la región de 2%. En niños, sin embargo, el organismo ocurre más comúnmente, especialmente en lactantes, en los que alcanza un porcentaje de 78%. Tiende a ocurrir diarrea secundaria a Clostridium difficile en pacientes inmunosuprimidos de más de 60 años de edad. Ninguno de los sexos parece estar en más alto riesgo de desarrollo de esta complicación. La presencia de neutropenia, insuficiencia renal o cáncer, o el uso de quimioterapia, radioterapia y drogas inmunosupresoras tienden a incrementar el riesgo de desarrollo de colitis asociada con antibióticos.

Otros factores asociados son diabetes y el uso de hiperalimentación, los cuales ambos se correlacionan con depresión de la respuesta inmune.

Se desarrolla diarrea por Clostridium difficile en pacientes en tiempos variables después o durante la administración de antibióticos. El intervalo entre iniciación de antibióticos y el comienzo de síntomas a menudo es entre 4 y 10 días. La mayoría de los antibióticos han sido implicados en diarrea por Clostridium difficile. Administrados tanto -

oral, intramuscular, intravenosa y como tópicamente. Antiguamente se creía que la incidencia aumentaba después de la administración de drogas efectivas contra anaerobios. Parece no haber correlación bien sea con la duración de la terapia o la dosis de antibiótico. Puede ocurrir colitis por Clostridium difficile después de suspensión de terapia antibiótica, se han desarrollado diarrea un mes después del cese de la terapia y aún períodos de latencia más largos.

En ausencia de una historia de terapia antibiótica, un paciente con diarrea y cambios biopsicos sigmoidoscópicos y rectales de colitis puede ser erróneamente diagnosticada como colitis ulcerante o enfermedad de Crohn a menos que Clostridium difficile sea específicamente buscado porque los cambios sigmoidoscópicos e histológicos pueden ser inespecíficos. Esto tiene importantes implicaciones terapéuticas. La falla en reconocer colitis por Clostridium difficile puede tener un resultado fatal. El retardo en instituir el tratamiento correcto puede acarrear una morbilidad incrementada y asociarse con colitis prolongada y sus complicaciones. La mortalidad de la enfermedad, si ésta es reconocida pronto, debe ser baja, aunque una tasa de mortalidad variable ha sido ya reportada en la literatura.

Por lo importante de su búsqueda en diarrea, con o sin presentarse antecedentes de terapia antibiótica, se pensó en un método fácil de adaptarse a un laboratorio no especializado, el cual se expone en este estudio.

GENERALIDADES

- Características del Género Clostridium:

Los componentes de este género son bacilos capaces de formar esporas, anaeróbicos y aerotolerantes, ampliamente distribuidos en ambientes marinos y terrestres de todo el mundo, principalmente en suelos abonados. Algunos habitan en el intestino grueso del hombre y animales como integrante de la microflora normal.

Aunque se han descrito más de 300 especies del género Clostridium, en la actualidad tan sólo se reconoce un tercio de ellos. Algunas de éstas son importantes en la producción de solventes orgánicos y otros productos metabólicos comercialmente útiles, otros son patógenas para el hombre y animales inferiores.

Ninguna de estas bacterias posee capacidad invasora notable para los tejidos del cuerpo. La patogenicidad de los bacilos anaeróbicos es atribuible más bien a su facultad de formar exotoxina potente, algunas de las cuales se encuentran entre las sustancias más tóxicas conocidas por el hombre.

La identificación de este género depende de la morfología celular, de la formación de esporas y de las características del cultivo. Ya que algunos Clostridium aerotolerantes son capaces de crecer en las superficies de agar fresco en condiciones aeróbicas, es posible confundirlos con algunas especies de Bacillus facultativos. Sin embargo, los miembros del género Clostridium forman esporas en condiciones anaeróbicas y normalmente no producen catalasa, mientras que las especies de Bacillus no esporulan en ambiente anaeróbico y normalmente son catalasa positiva.

Para el crecimiento del género Clostridium se necesitan medios orgánicos ricos, como sangre, suero y la supresión completa del oxígeno atmosférico, aunque las especies varían considerablemente en su tolerancia al oxígeno. Cuando hay oxígeno libre el crecimiento se interrumpe y mueren las células vegetativas, pero no así las esporas.

Dado que estos organismos tienden a difundirse formando una fina película sobre la placa de agar, es conveniente emplear un método de cultivo que inhiba esta dispersión. El ácido sórbico, polimixina B, hidrato de cloral, ácido sódico y algunas otras sustancias son muy útiles para aislar las especies de Clostridium en los cultivos mixtos.

La determinación de los productos finales del metabolismo mediante cromatografía de gases ha resultado muy útil para identificar las diversas especies de los anaerobios.

- Características Generales de Clostridium difficile:

Clostridium difficile fue descrito por primera vez en neonatos en 1935 por Hall y O'Toole, quienes demostraron que este organismo es patógeno de cobayos y conejos; y sugirieron que su patogenicidad es mediada por una exotoxina.

Antes que la etiología de colitis pseudomembranosa fuese delineada, el inusitado agrupamiento geográfico y temporal de casos implicaba que un agente infeccioso era responsable. La evidencia recopilada a lo largo de los últimos -- cuatro años implicaba firmemente a Clostridium difficile como causa de colitis pseudomembranosa tanto no antibiótica como antibiótica asociada. Evidencia reciente también indica que este organismo puede jugar un papel etiológico en la diarrea y exacerbación de enfermedad intestinal inflamatoria.

Clostridium difficile es un bacilo móvil, anaeróbico estricto, gram positivo, sus células generalmente de 2 a 8 micrómetros de longitud por 0.5 micrómetros de ancho, poseen esporas subterminales a terminales.

Se ha comprobado que los medios de cultivo selectivos utilizados para el aislamiento del género Clostridium, -- tales como Clostrisel agar, agar clostridial reforzado con para-cresol a 0.2% y agar yema de huevo-neomicina, son inhibidores del crecimiento de Clostridium difficile, sólo se ha podido obtener en el medio de cultivo enriquecido: agar sangre, y en el medio selectivo y diferencial: CCFA (agar de -- cicloserina, cefoxitina y fructosa).

Presenta fermentación a la glucosa, manitol y esculina, pero no así a la maltosa, lactosa, sacarosa. No produce indol, lecitinasa, lipasa, sulfuro de hidrógeno, licuefacción de la gelatina, digestión de carne, reducción de nitra-

to. La fermentación produce múltiples, pero poca cantidad - de ácidos: acético, isobutírico, isovalérico, valérico, butírico e isocaproico.

Toxinas:

Produce dos toxinas distintas, las cuales son lábiles al calor. Designadas A y B, son proteínas antigénicamente distintas de gran peso molecular, que son separadas mediante cromatografía de intercambio de iones. Estas dos toxinas son letales en animales experimentales y son citotóxicas en ensayos de cultivo tisular, aunque una de las toxinas, la toxina B, es mucho más activa que la otra, toxina A, contra todo tipo de células de cultivo tisular probados a la fecha. En adición a sus diferencias manifiestas en actividad citotóxica, estas toxinas difieren en otras actividades biológicas. Por ejemplo, la toxina A provoca una respuesta de líquido hemorrágico en el ensayo de asas intestinales del conejo, en tanto que la toxina B es consistentemente negativa. La toxina A también ocasiona una acumulación de líquido mucho mayor en el ensayo de ratón lactante que la toxina B, aun cuando la toxina B es más letal en el ensayo.

Aunque la toxina A y la toxina B pueden ser cuantificadas por su actividad contra células de cultivo tisular, la mayor actividad de la toxina B interfiere con la detección de toxina A mediante este ensayo; las dos toxinas tienen que ser separadas antes del ensayo para determinar el título citotóxico de la toxina A. Las distintas actividades de estas toxinas en el asa intestinal del conejo y ensayos de ratón lactante indican que estos ensayos podrían ser provechosos en detectar toxina A; sin embargo, estos ensayos son tediosos y no muy sensitivos. Siendo la mejor elección, un ensayo inmunológico ligado a enzimas (ELISA) que es específico para toxina A y no requiere la separación inicial de toxinas A y B.

Patogenia:

Este organismo está implicado como el agente causante de diarrea antimicrobiana asociada y colitis pseudomembranosa. Se sabe que la terapia antimicrobiana es un importante factor para ello, porque selecciona para Clostridium difficile al alterar o eliminar flora intestinal, que es inhibitoria para este organismo. Algunos componentes de la flora intestinal normal, tales como lactobacilos, bacteroides y otros anaerobios suprimen el crecimiento o impiden la colonización de Clostridium difficile. Los antibióticos predisponen a enfermedad, inhibiendo estos organismos competitivos.

Los esfuerzos por analizar la supresión de Clostridium difficile por la flora normal han sido obstaculizados por la complejidad de la flora colónica normal. Por lo menos en humanos, esta flora consta de cientos de especies bacterianas, principalmente anaerobios estrictos.

En la actualidad, ampicilina, clindamicina, cefalosporina y gentamicina, son los agentes más frecuentes citados en inducir diarrea asociada con Clostridium difficile.

Se reportan en la literatura, casos de adultos que presentan Clostridium difficile y su toxina en sus excrementos mientras toman antibióticos pero permanecen asintomáticos aun cuando la toxina esté presente en títulos de 10^{-4} ó más, niveles que siempre han sido asociados previamente con síntomas intestinales.

El tratamiento con agentes antineoplásicos, en particular el metotrexato antagonista de ácido fólico, precipitan diarrea relacionada a Clostridium difficile y colitis pseudomembranosa, siendo la presentación clínica idéntica a la encontrada en pacientes que desarrollan diarrea asociada

a antibióticos y colitis, por lo que se debe sospechar de -- Clostridium difficile en pacientes que se desarrollan día -- rrea durante el curso de quimioterapia neoplásica o dentro -- de tres semanas de su discontinuación.

Siendo así el alto porcentaje de Clostridium --- difficile en pacientes tratados en oncología, habiendo reportes -- de 22.2% a 40%.

La incidencia en la flora colónica normal del adul -- to es solamente en la región de 2%, mientras que ésta es en lactantes de 78%.

En neonatos asintomáticos que nunca han recibido -- antibióticos albergan a Clostridium difficile en un 27.4%, -- aumentando el porcentaje en los bebés prematuros a 54.4%. -- Aún no es claro cómo los neonatos adquieren este organismo. Hay datos que sugieren que los neonatos fueron colonizados -- del ambiente probablemente por vía de las manos del personal de enfermería, es improbable que ocurra la adquisición madre -- bebé durante parto vaginal, puesto que se ha encontrado en -- neonatos dados a luz por operación cesárea. Los lactantes -- alimentados con fórmula especial son cuatro veces más proba -- bles de portar el organismo que aquellos alimentados exclusi -- vamente de leche materna, en tanto que los lactantes alimen -- tados de leche materna y que también reciben fórmula espe -- cial tienen una tasa de colonización intermedia. Los niños -- mayores de 3 años portan este organismo en menos de 4% hasta -- llegar a valores similares a los reportados en adultos sanos.

Aunque la portación de Clostridium difficile en la -- infancia es por lo general benigna, datos epidemiológicos -- pueden ayudar en evaluar posibles relaciones con diversas -- condiciones patológicas que se sabe ocurren dentro de este -- grupo de edad. Por ejemplo, es posible que condiciones ta -- les como pérdida de proteína durante diarrea aguda o síndro --

me de muerte repentina de lactantes pudieran ser influenciadas por colonización con este organismo.

La infección por Clostridium difficile debe ser -- considerada en la evaluación de niños pequeños con diarrea -- que no logran aumentar de peso, aún en ausencia de tratamiento antibiótico previo.

Hay situaciones en las cuales los neonatos están -- particularmente propensos a una enterocolitis necrotizante -- neonatal, tales como en transfusiones sanguíneas por enfermedad hemolítica del recién nacido, o bien en malestares respiratorios.

Se cree que en los casos de tolerancia a la toxina de Clostridium difficile por el colon del lactante puede deberse a un factor neutralizante humoral o antitoxina, ya fue -- ra adquirida de sangre materna o producida por el lactante -- mismo.

Clostridium difficile ha sido recuperado del suelo y de las heces de diversos animales y por lo tanto es un contaminante de productos alimenticios.

Se sabe que un número de animales que pudieran ser considerados como una fuente alimentaria como patos, gansos, ganado vacuno, han sido demostrados como portadores de -- Clostridium difficile.

También se ha encontrado en estiércol de caballos, burros, camellos, focas, liebres y venados.

El transporte de este organismo por animales predilectos caseros se encontró ser común en un 23%. En vista a esto, las mascotas caseras pueden actuar como una fuente de

infección y enfermedad subsecuente para personas en la comunidad, tales como las que reciben terapia antibiótica, aunque en la mayoría de los casos de enfermedad mediana por Clostridium difficile el organismo es adquirido del ambiente por un huésped susceptible a infección. Esto no puede ser necesariamente sólo en pacientes hospitalizados pero sí en su mayoría. Muestras tomadas de objetos utilizados en hospitales, tales como: cucharillas rectales, cómodos, se han reportado en la literatura en un porcentaje de 3.2% a 9%. Esto indica que la contaminación ambiental es importante en la propagación de Clostridium difficile en pacientes hospitalizados.

El organismo persiste sobre superficies en el ambiente del paciente, puesto que la spora del organismo es resistente a desinfectantes de hospital, excepto a glutaraldehído alcalino.

Los rasgos clínicos de colitis por Clostridium difficile son variables. Diarrea está presente en un 95% de los pacientes, siendo ésta acuosa y color café, presentándose de 6 a 10 evacuaciones intestinales diariamente, pero hay reportes de hasta 20 evacuaciones por día. Dolor abdominal entre 19% y 50%.

Los hallazgos físicos son inespecíficos, con fiebre en 80% de los pacientes y diarrea sanguinolenta en un 10%.

Otros signos objetivos incluyen evidencia de anomalías patológicas abdominales agudas en 10%, hipoactividad intestinal en 10%. Leucocitosis en 80 a 90% y una respuesta leucemoide intensa hasta 10%. La albúmina sérica y concentraciones de transferina se hallan frecuentemente deprimidas.

Existe una elevada correlación entre colitis por Clostridium difficile y el aspecto radiológico de impresión colónica de pulgar, dilatación de intestino delgado y engrosamiento haustral. El examen con enema de bario demuestra un contorno o impresión de pulgar velludo irregular, el cual es inespecífico.

Puede ser establecido el diagnóstico de colitis -- por Clostridium difficile mediante proctosigmoidoscopia o colonoscopia visualizando la característica mucosa edematosa - friable cubierta por placas elevadas blanquecino-amarilla, - compuestas de moco, células inflamatorias y células epiteliales esfaceladas. La biopsia es innecesaria si se observan lesiones típicas. Los hallazgos negativos con sigmoidoscopia rígida, no descartan una colitis pseudomembranosa, ya -- que una proporción considerable de casos ocurren proximales al límite del instrumento. El diagnóstico diferencial habrá de incluir colitis de Crohn, colitis ulcerante idiopática e infecciones con otros patógenos intestinales tales como: -- Salmonella, Shigella, Entamoeba histolítica, Campylobacter, -- Yersinia, Strongyloides y Staphylococcus.

Complicaciones graves, poco usuales, de diarrea y colitis por Clostridium difficile son: perforación colónica y megacolon tóxico. A veces es necesaria una colectomía extensa. Inversamente, el reconocimiento de la enfermedad a menudo permite terapia no operatoria en pacientes sospechosos de tener otros trastornos abdominales agudos.

Hasta hoy sólo se ha reportado un caso en la literatura de peritonitis fatal causada por Clostridium difficile en un neonato.

En un 20% de pacientes que no han recibido terapia antimicrobiana se presenta colitis por Clostridium difficile,

lo que sugiere que la no relacionada a antibióticos puede -- ser más prevalente de lo que ha sido previamente reconocido.

Clostridium difficile es común en infecciones in -- testinales, no así en extra-intestinales, aunque sí hay re -- portes de algunos casos, tales como abscesos de bazo.

Recientemente se ha encontrado en el tracto genito urinario en gran proporción en pacientes que se sospechaba -- de enfermedades venéreas. Considerándosele como causa de -- uretritis no específica en hombre. El aislamiento de --- Clostridium difficile de los tractos urogenitales es de 72% en -- mujeres que acuden a clínicas de enfermedades venéreas.

Tratamiento:

Existen algunas alternativas terapéuticas. Si la presentación clínica lo permite, los antibióticos deben ser discontinuados. En 30% de los pacientes, la terminación de la terapia antibiótica produce un cese bastante rápido y du -- radero de la diarrea. Los pacientes deben ser hidratados y nutridos adecuadamente, tomarse precauciones de aislamiento entérico.

La vancomicina continúa siendo el puntal de la te -- rapia, no obstante su alto costo y disponibilidad muy limita -- da. Esta es un antibiótico producido por Streptomyces --- orientalis, su mecanismo de acción implica la inhibición de la -- síntesis del mucopéptido de la pared celular, o sea que inhibe la utilización del disacárido (pentapéptido)-P-fosfolípido, • y el funcionamiento de la membrana celular también es dañado.

Bacitracina y metronidazol, también parecen ser -- efectivos. La recurrencia repetida de enterocolitis asocia --

da a Clostridium difficile es rara pero molesta para el paciente aquejado. Siendo con cualquiera de los antibióticos mencionados de un 14% en lapsos de 2 a 3 semanas después de la discontinuación de tratamiento. Estas recaídas pueden ser causadas por reinfección con Clostridium difficile de una fuente ambiental o persistencia de esporas en el tracto gastrointestinal. La infusión rectal de enemas preparados de heces frescas y lactobacilos oralmente administrados es la terapia propuesta en estos casos. Esto de acuerdo con los postulados de Van der Waij, quien recalcó la importancia de la flora intestinal anaeróbica normal para mantener una ecología intestinal normal.

Inmunidad:

Se hallan presentes anticuerpos de toxina A en 64% de pacientes de más de dos años de edad y anticuerpos de toxina B, en pacientes mayores de seis meses en un 66%, con enfermedad inducida por Clostridium difficile, lo cual indica que desarrollan respuestas serológicas a una o a ambas toxinas.

Estudios recientes revelan un aumento significativo en el título de anticuerpo IgG para toxina A o B.

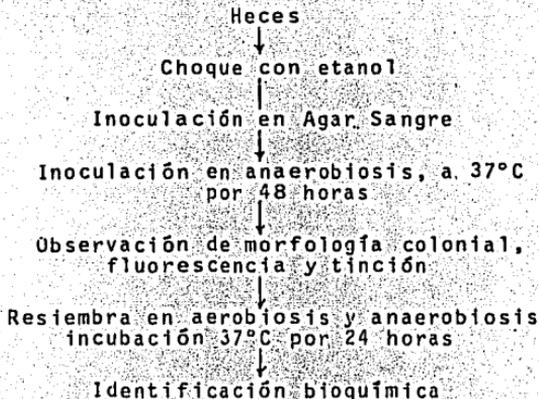
MATERIAL Y METODO

Se estudiaron 100 muestras en materia fecal correspondientes a igual número de personas, de una Institución de Medicina Social.

Se formaron dos grupos: el primero constituido por 75 personas adultas que no presentaban síntomas gastrointestinales y sin antibioticoterapia. El segundo formado por -- las 25 personas hospitalizadas, debido a procesos infecciosos diversos y por tal motivo habían recibido terapéutica -- antimicrobiana por lo menos durante dos semanas. En este -- grupo se incluyó un lactante de 8 meses de edad.

Las muestras fueron colectadas en frascos estériles y enviadas al laboratorio para ser procesadas de inmediate de la siguiente manera:

Procedimiento de aislamiento de Clostridium difficile de heces:



a) Las muestras tomadas fueron expuestas a un choque, con una solución de alcohol etílico al 96% con solución salina estéril al 0.85% v/v, por un tiempo de 30 minutos, esto con la finalidad de eliminar gran parte de la flora acompañante de Clostridium difficile.

b) Posteriormente se tomó una pequeña muestra de suspensión, con la ayuda de un hisopo estéril, ésta se descargó en un cuadrante del medio de cultivo enriquecido: agar sangre; donde se sembró por el método de aislamiento por estrías, se dejó en incubación anaeróbica, esto se llevó a cabo por el sistema Gas-Pak a 37°C.

c) Después de ese tiempo de incubación se observó el crecimiento de las colonias aisladas, y de acuerdo a su morfología típica: diametro de 3 a 4.5 mm, color amarillo, opacas, bordes ligeramente irregulares, y fluorescencia: verde - amarilla a verde pálido, observada en la cámara de luz ultravioleta (lámpara de Wood).

d) Reconocidas las colonias típicas, se realizó una tinción Gram, para comprobar que se trataba de un bacilo Gram positivo esporulado, presentando esas características microscópicas se verificó su aerotolerancia por medio de siembra en medio de cultivo: agar sangre, e incubación en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, por un tiempo de 24 horas.

e) De las colonias que presentaron una anaerobiosis estricta, se procedió a la inoculación de las pruebas bioquímicas: Manitol, Lactosa, Sacarosa, Maltosa, Fructosa, las cuales se incubaron a 37°C en condiciones de anaerobiosis con el sistema Gas-Pak por 48 horas.

f) La determinación de la movilidad se llevó a cabo por el método directo.

g) Después del tiempo de incubación se procedió a la lectura y comprobación de los resultados por comparación con las Tablas de identificación existentes en la literatura.

Descripción de Técnica y Medios utilizados:

- Medio de cultivo enriquecido:

Agar Sangre el cual es un medio no selectivo de -- uso general.

- Técnica de recipiente anaerobio:

El frasco Gas-Pak, es el sistema más comúnmente -- utilizado en los laboratorios clínicos. El principio básico de estos recipientes, es eliminar el oxígeno por reacción con hidrógeno añadido al sistema, en presencia de un catalizador. El oxígeno es reducido a agua del modo siguiente:



Es importante el empleo de un catalizador activo -- en sistema. En este frasco se emplea un catalizador frío -- compuesto por gránulos de alúmina recubiertos con paladio -- que no requiere calentamiento. El catalizador frío no sólo es más conveniente, sino que tampoco presenta riesgo de ex -- pl -- o -- s -- i -- o -- n. El catalizador frío puede inactivarse en frasco de -- bido a la producción de sulfuro de hidrógeno u otros produc -- tos metabólicos volátiles de las bacterias. En este siste -- ma, las condiciones anaeróbicas se producen mediante el gene -- rador de hidrógeno dióxido de carbono descartable, estos se -- utilizan abriendo el envase del generador y colocándolo den -- tro del recipiente. Si añaden aproximadamente 10 ml de agua

para permitir la generación de hidrógeno y dióxido de carbono, y la tapa se cierra herméticamente, si la tapa no se nota caliente al tacto en pocos minutos o no aparecen gotas de condensación en la superficie interna del vidrio en 30 minutos, se debe abrir el frasco y descartar el envase del generador. Una junta defectuosa en la tapa que permite el escape del gas, o gránulos de catalizador inactivados son las causas más comunes de fracaso en este sistema. Las condiciones anaerobias deben ser también controladas al utilizar esta técnica, mediante la inclusión de un indicador de potencial de óxido reducción. Puede disponerse de tiras de azul de metileno. Como alternativa, se puede colocar un tubo con unos mililitros de azul de metileno - NaHCO_3 -glucosa. El azul de metileno es azul cuando está oxidado y blanco cuando está reducido. Por lo tanto se logran condiciones anaerobias, la solución de azul de metileno se vuelve gradualmente incolora y permanece así si no hay escapes que permiten la entrada de oxígeno al sistema. Si la solución cambia de incolora a azul, significa que hay una falla que impide establecer convenientemente la anaerobiosis dentro del frasco, lo cual puede invalidar los resultados.

- Coloración de Gram:

1. Preparar un extendido fino del material en estudio y dejarlo secar al aire.
2. Fijar el material al portaobjeto de modo que no sea arrastrado durante el proceso de tinción, pasando el portaobjeto 3 ó 4 veces por la llama de un mechero de Bunsen.
3. Colocar el preparado sobre un soporte de tinción y cubrir la superficie con solución de cristal violeta.
4. Luego de un minuto de exposición al cristal violeta lavar bien con agua destilada o buffer.

5. Cubrir el preparado con fodo de Gram durante 1 minuto. Lavar nuevamente con agua.

6. Sostener el portaobjeto entre el pulgar y el índice y bañar la superficie con unas gotas del decolorante acetona-alcohol hasta no arrastrar más colorante violeta. Esto requiere habitualmente unos 10 segundos o menos.

7. Lavar con agua corriente y colocar nuevamente el portaobjeto sobre el soporte. Cubrir la superficie con contracolor safranina durante 1 minuto. Lavar con agua y que se seque el extendido.

8. Examinar el preparado al microscopio con objetivo 100 X de inmersión (aceite). Las bacterias Gram positivas se tiñen de azul oscuro; las bacterias Gram negativas aparecen rojo rosadas.

El violeta de Genciana actúa como colorante primario, que se une a la pared celular bacteriana luego de un tratamiento con una solución débil de fodo. Algunas especies bacterianas, debido a la naturaleza química de sus paredes celulares, poseen la capacidad de retener el cristal violeta, aún luego del tratamiento con un decolorante orgánico, tal como una mezcla de acetona y alcohol. Tales bacterias se denominan Gram positivas. Las bacterias Gram negativas, presumiblemente debido a un mayor contenido lipídico en su pared celular pierden la coloración primaria del cristal violeta cuando son tratadas con el decolorante. El colorante secundario o contracolor utilizado en la técnica de Gram es la safranina. Las bacterias Gram negativas, que han perdido el cristal violeta, aparecen rojas o rosadas vistas al microscopio, habiendo fijado la safranina como contracolor a sus paredes celulares.

- Prueba de Aerotolerancia:

Cada tipo de colonia de la placa de aislamiento -- anaerobio, se transfiere a placas de agar sangre aerobias -- (CO al 5% o frasco con vela) y anaerobias, las cuales se incuban durante 24 horas. Es conveniente inocular cuadrantes o sextos de una placa de agar sangre común para llevar a cabo estudios de aerotolerancia de 4 a 6 colonias aisladas en una placa primaria.

- Principio básico de la fermentación de los hidratos de carbono:

La molécula de monosacáridos, se desdoblan en una serie de compuestos de tres carbonos, el más importante es - el ácido pirúvico (vía anaerobia de Embden Meyerhof).

Muchas bacterias utilizan hidratos de carbono mediante lo que se llama una fermentación ácida mixta, en la -- cual se produce finalmente una variedad de ácidos orgánicos que se derivan del ácido pirúvico. Las bacterias difieren - en los hidratos de carbono que pueden utilizar y en los ti - pos y cantidades de ácidos mixtos producidos. Estas diferen - cias de actividad enzimática constituyen una de las caracte - rísticas importantes por las cuales se reconocen las diferen - tes especies.

- Movilidad:

La movilidad bacteriana es otra característica im - portante en la identificación final de una especie. Las bac - terias se mueven por medio de flagelos, cuyo número y ubica - ción varía en las diferentes especies. Se dispone de tincio - nes flagelares para esta determinación, pero no se utilizan corrientemente.

La movilidad bacteriana se puede comprobar directamente colocando una gota de caldo de cultivo sobre un portaobjeto y observándola al microscopio. Esta técnica se utiliza principalmente para detectar la movilidad de las especies bacterianas que no desarrollan bien en los medios de agar.

R E S U L T A D O S

De 100 muestras de materia fecal, se aisló a ----
Clostridium difficile en 4 de ellas, de las cuales:

75 muestras de población adulta, clínicamente sa -
nas, se encontró Clostridium difficile en 2 (2.66%).

25 muestras de pacientes bajo tratamiento antimicrobiano, encontrándose a dos de ellas positivas (8%), una de las cuales provenía del único paciente lactante presente en el estudio.

Con el procedimiento utilizado fue posible obtener colonias aisladas a las 48 horas de incubación en el medio de cultivo enriquecido: Agar Sangre. Las características morfológicas: 3 a 2 mm aproximadamente de diámetro, color amarillo claro, opacas, circulares con bordes ligeramente filamentosos, de perfil plano, y de fluorescencia amarillo-verde a verde pálido, de las colonias de Clostridium difficile, permitiendo una identificación presuntiva por simple inspección ocular de las cajas de cultivo.

Aunque en el medio de cultivo utilizado hay crecimiento de gran parte de la flora bacteriana que acompaña a Clostridium difficile, en este estudio se obtuvo una mínima parte de crecimiento, esto debido al choque con solución de alcohol etílico a que fue expuesta la muestra fecal.

Según otro estudio realizado a la par del presente, se comprobó que en la serie de muestras tratadas en ambos estudios, el hallazgo del género enteropatógeno: Salmonella, no correspondió a las muestras positivas para Clostridium difficile.

CONCLUSIONES Y DISCUSION

El procedimiento propuesto para el aislamiento de Clostridium difficile, a partir de muestras fecales, es recomendado por el presente estudio, al poseer las ventajas: de ser una fácil, rápida, económica y accesible metodología para ello, pudiéndose llevar a cabo en cualquier laboratorio no especializado.

Lo anterior basándose en los resultados obtenidos, los cuales fueron satisfactorios al compararse éstos con los reportados en la literatura, en cuanto a población sana se refiere; pero no tanto así en pacientes con antibioticoterapia presente, justificándose esto por el pequeño número de muestras tratadas.

También reforzó el estudio, el aislamiento de Clostridium difficile, en la única muestra fecal tomada de un paciente lactante de 8 meses de edad, el cual recibía terapia antimicrobiana desde 3 semanas antes. Este dato aunque no tiene un valor estadístico, por ser único, se puede relacionar con los datos existentes en anteriores reportes, en que la incidencia en lactantes y neonatos es alta. Lo cual corrobora a que Clostridium difficile es una bacteria de baja prevalencia en la población general adulta, no siendo así en los lactantes menores de un año de edad, lo que sugiere que la madurez del epitelio intestinal influye en su adhesión al mismo.

B I B L I O G R A F I A

1. Cooperstock M, Riegle L, Woodruff C, Oderdonk A: In - fluence of Age, Sex, and Diet on Asymptomatic Coloniza - tion of Infants with Clostridium difficile. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 17; N^o 5; pp 830-833; 1983.
2. Shibley M, Lishman A, Record D: Incidence and Origin of Clostridium difficile in Neonates. Journal of Cli - nical Microbiology. Vol. 19; N^o 1; pp 77-78; 1984.
3. Gordon R: Metronidazole or Vancomycin for Clostridium difficile associated Diarrhoea. THE LANCET. Vol. 12; pp 17; 1983.
4. Lishman A, Jumaili A, Elshibly E, Hey E: Clostridium difficile isolation in Neonates in a Special Care Unit. Scand. J. Gastroenterol. Vol. 19; N^o 3; pp 442-444; -- 1984.
5. Genta V, Gilligan P, McCarthy L: Clostridium difficile Peritonitis in a neonate. Arch. Pathol. Lab. Med. Vol. .08; N^o 1; pp 82-83; 1984.
6. Borriello S, Honour P, Barclay F: Foodborne Transmi - ssion of Clostridium difficile. Gastroenterology. Vol. 84; pp. 201; 1983.
7. Borriello S, Honour P, Turner T, Barclay F: Household pets as a potential reservoir for Clostridium difficile infection. J. Clinical Pathol. Vol. 36; pp. 84-87; 1983.
8. Malamou-Ladas H, Nash J, Tabaqchali: Isolation of Clos - tridium difficile from patients and the enviroment of - hospital yards. J. Clin. Pathol. Vol. 36; pp. 88-92; 1983.

9. Ellis M, Watson B, Milewski P, Jones G: Clostridium -
difficile colitis unassociated with antibiotic therapy. Br. J. Surg. Vol. 70; pp. 242-243; 1983.
10. Liston T: Clostridium difficile toxin Associated with
Chronic Diarrhea and Failure to Gain Weight. Clinical
Pediatrics. Vol. 6; pp. 458-459; 1983.
11. Schwan A, Sjolín S, Trottestam U, Aronsson B: Relapsing
Clostridium difficile Enterocolitis Cured by Rectal In-
fusion of Normal Faeces. Scand, J. Infecto. Dis. Vol.
16; pp. 211-215; 1984.
12. Oishi J, Mulligan E, Finegold S: Failure to Detect ---
Clostridium difficile in Foods. The Journal of Infec -
tious Diseases. Vol. 148; N° 2; pp. 360; 1983.
13. Viscidi R, Laughon, Yolken R, Bo-Linn P, Moench T, Ryder,
Bartlett J: Serum Antibody Response to Toxins A and B
of Clostridium difficile. The Journal of Infectious --
Diseases. Vol. 148; N° 1; pp. 93-96; 1983.
14. Frick J: Clostridium difficile Colitis in Surgical Pa-
tients. The American Journal of Infectious Diseases. -
Vol. 147; N° 2; pp. 227; 1983.
15. Rial D, Finegold S: Intestinal Beta-lactamase Activity
in Ampicillin- induced, Clostridium difficile Associated
Ileocectitis. The Journal of Infectious Diseases. Vol.
147; N° 2; pp. 227; 1983.
16. Wilson K, Sheagren J: Antagonism of toxigenic Clostri-
dium difficile by Nontoxigenic Clostridium difficile. -
The Journal of Infectious Disease. Vol. 147; N° 4; pp.
733; 1983.

17. Lyster D, Sullivan N, Wilkins T; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Clostridium difficile Toxin A. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 17; N^o 1; pp. 72-78; 1983.
18. Miller S, Koornhof; Clostridium difficile Colitis --- Associated with the Use of Antineoplastic Agents. Eur. J. Microbiol. Vol. 3; N^o 1; pp. 10-13; 1984.
19. George L, Sutter L, Citron D; Selective and Differential Medium for Isolation of Clostridium difficile. -- J. Clin. Microbiol. Vol. 20; N^o 1; pp. 45-50; 1984.
20. Trevor-Willis A; Anaerobic Bacteriology Clinical and Laboratory Practice. Third Edition; Butterworths, -- London; 1977.
21. Rosenberg J, Walker, Welch J; Clostridium difficile - Colitis in Surgical Patients. The American Journal of Surgery; Vol. 147; N^o 4; pp. 98; 1984.
22. Anderson R; Isolation Rate and Toxigenic Potential of Clostridium difficile isolates From patients with Cystic Fibrosis. The Journal of Infectious Diseases. Vol. 148; N^o 1; pp. 89; 1983.
23. Jarvis W, Nunez O, Thompson F, Vowell D; Comparison of Bacterial Isolation, Cytotoxicity Assay, and Counterimmunoelectrophoresis for the detection of Clostridium difficile and its toxin. The Journal of Infectious Diseases. Vol. 47; N^o 4; pp. 778; 1983.
24. Cohen B, Mendelson J; Splenic Abscess due to Clostridium difficile. The Journal of Infectious Diseases. Vol. 47; N^o 6; pp. 87; 1983.

25. Rosenberg J, Walker M: Prospective study of Gram --- Stained stool smears in diagnosis of *Clostridium diffi*cile colitis. J. Clin. Microbiolog. Vol. 17; Nº 5; - 1983.
26. Koneman E, Allen S, Dowelly: Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana, S.A. Buenos Aires, Argentina; 1983.
27. Freeman B: Tratado de Microbiología de Burrows. 21a. Edición. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V. México, D.F. 1983.
28. Davidsohn I, Henry J: Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. Sexta edición. Salvat Editores, S.A.; Barcelona, España; 1981.
29. Larson H: The Experimental Pathogenesis of Antibiotic Related Colitis. Scand. J. Dis. Suppl. 22; pp. 7-10; 1980.
30. Bartlett J: Experimental Studies of Antibiotic Associated Colitis. Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 22; -- pp. 11-15; 1980.