

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA



***CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*: DETECCIÓN Y
SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA EN DIARREAS
NOSOCOMIALES EN EL HOSPITAL SAN JUAN DE DIOS**

Trabajo final de graduación para optar por el título de
Licenciatura en Microbiología y Química Clínica.

Natassia Camacho Matamoros
Carlos Andrés Espinoza Solís

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

2005

Dedicatoria

Natassia:

A mis padres, a mi hermana y al resto de mi familia por brindarme su cariño y apoyo incondicional para hacer realidad esta meta.

Carlos:

A mis padres, por convertirme en el mar donde desemboca el caudal de sus ríos.

A mi hermana, por soportarme.

A Natassia, por haber sido mi cómplice en este empeño.

Agradecimientos

Damos muchas gracias a Dios por permitirnos concluir esta meta.

A las Dras. Evelyn Rodríguez y María del Mar Gamboa, por todas sus enseñanzas y su apoyo. Gracias por su paciencia y por habernos guiado durante la realización de este proyecto.

A Carlos Rodríguez, por su amistad y su apoyo.

A Pablo, Martín y Laura, por sus consejos, su ayuda desinteresada y por tantos ratos agradables.



**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
VICERRECTORÍA DE DOCENCIA**

**FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA
CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO**

Acta de presentación de Requisito Final de Graduación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el siete de julio del año 2005, con el objeto de recibir el informe oral de los estudiantes **NATASSIA CAMACHO MATAMOROS Y CARLOS ANDRES ESPINOZA SOLÍS**, carnés A00813 y 991445, según corresponde, quienes se acogen al Reglamento de Trabajos Finales de Graduación bajo la modalidad de **PRACTICA DE GRADUACIÓN**, para optar por el grado académico de **LICENCIADOS EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA** y el título profesional de **DOCTORES EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA**.

Están presentes los siguientes miembros del tribunal:

Dra Ingrid Salas Campos **PRESIDENTE**
Dr. Steve Quirós Barrantes
Dra. Evelyn Rodríguez Cavallini
Dra. María del Mar Gamboa Coronado
Dr. Carlos Rodríguez Rodríguez

ARTICULO 1

El presidente informa que los expedientes de **NATASSIA CAMACHO MATAMOROS Y CARLOS ANDRES ESPINOZA SOLÍS**, contienen todos los documentos de rigor, incluyendo el recibo de pago de los derechos de graduación. Declara que los postulantes cumplieron con todos los demás requisitos del plan de estudios correspondientes, y por lo tanto, se solicita que proceda a hacer la exposición.

ARTICULO 2

Los postulantes **NATASSIA CAMACHO MATAMOROS Y CARLOS ANDRES ESPINOZA SOLÍS**, hacen la exposición oral de su trabajo de graduación titulo "*Clostridium perfringens*: detección y susceptibilidad antimicrobiana en diarreas nosocomiales en el Hospital San Juan de Dios."

ARTICULO 3

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan a los Postulantes durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.


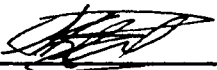
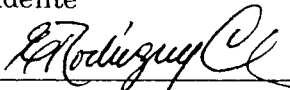

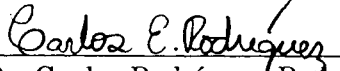

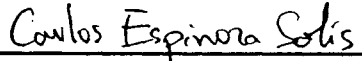
ARTICULO 4

El tribunal considera el trabajo final de graduación satisfactorio y le confiere la calificación de: 10.0

ARTICULO 5

El presidente del Tribunal comunica a los Postulantes el resultado de la deliberación y los declara acreedores al grado de Licenciados en Microbiología y Química Clínica y al título profesional de Doctores en Microbiología y Química Clínica.

Se le indica la obligación de presentarse al acto público de juramentación al que serán oportunamente convocados. Se da lectura al acta que firman los Miembros del Tribunal Examinador y los Postulantes, a las 2:55 horas.

 Dra. Ingrid Salas Campos Presidente	 Dr. Steve Quirós Barrantes
 Dra. Evelyn Rodríguez Cavallini	 Dra. María del Mar Gamboa Coronado
 Dr. Carlos Rodríguez Rodríguez	 Natassia Camacho Matamoros Postulante
 Carlos Andrés Espinoza Solís Postulante	

Resumen

Se procedió a determinar la presencia, la capacidad enterotoxigénica y la susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Clostridium perfringens* aisladas a partir de 104 muestras de heces de pacientes con diarreas nosocomiales del Hospital San Juan de Dios. A partir de la totalidad de las muestras, fue posible aislar y caracterizar bioquímicamente 29 cepas (27.8%) de *C. perfringens*, de las cuales dos cepas (6.9%) resultaron ser enterotoxigénicas.

Es decir, solamente el 1,9% del total de muestras analizadas resultaron positivas por *C. perfringens* enterotoxigénico. Estos resultados coinciden con los resultados de estudios similares realizados en otros países y reportados en la literatura.

Se llevó a cabo la estandarización de la prueba de dilución en agar (método de referencia para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias anaerobias) y se determinó la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *C. perfringens* previamente aisladas. Todas las cepas fueron sensibles a cloranfenicol, imipenem y cefotaxima; una cepa (3.5%) presentó resistencia hacia penicilina y tres (10.3%) a metronidazol.

También, se determinó la susceptibilidad antimicrobiana utilizando el antibiograma para bacterias anaerobias estrictas ATB ANA[®]. Los resultados obtenidos no fueron reproducibles, por lo que no fue posible su interpretación. Se recomienda la utilización de la prueba de dilución en agar para evaluar los resultados obtenidos mediante otros métodos en este y otros laboratorios.

Se confirmó que la incidencia de *C. perfringens* enterotoxigénico como agente etiológico de diarreas nosocomiales es baja, al igual que el porcentaje de cepas resistentes; sin embargo, no debe desestimarse como un problema potencial en los centros hospitalarios de nuestro país.

Índice

Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Acta de aprobación	iii
Resumen	v
I. Introducción	1
Generalidades	1
Las toxinas de <i>Clostridium perfringens</i>	2
Diarrea asociada a antibióticos (definición, causas y tratamiento)	4
Métodos de detección de la enterotoxina de <i>C. perfringens</i> (CPE)	8
Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana	9
II. Justificación	13
III. Objetivos	15
IV. Materiales y Métodos	16
V. Resultados	22
VI. Discusión	25
VII. Conclusiones	32
VIII. Cuadros	33
IX. Figuras	45
X. Referencias	47

I. Introducción

Generalidades

Las evidencias científicas indican que las bacterias anaerobias se originaron en aguas tibias y poco profundas hace unos 3 o 4 mil millones de años, donde se protegían de los letales rayos de luz ultravioleta provenientes del sol (Mahon y Manuselis, 2000).

Actualmente, este grupo de bacterias se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y en nichos ecológicos específicos, como la microbiota de los animales, incluyendo a los humanos. En este sentido, las bacterias anaerobias son importantes por una enorme variedad de razones. Una de ellas, consiste en ser responsables de muchas intoxicaciones e infecciones, a menudo mortales, que afectan a los seres humanos y a otros mamíferos. Debido a su versatilidad, estas bacterias pueden verse implicadas en procesos infecciosos en casi cualquier órgano o tejido de muchos animales (Mahon y Manuselis, 2000).

Las bacterias anaerobias pueden ser definidas como: (1) organismos que generan energía y sintetizan las sustancias necesarias para su metabolismo sin recurrir al oxígeno molecular y (2) organismos que demuestran una sensibilidad adversa por el oxígeno, lo que les impide crecer en su presencia (Hatheway, 1990).

El género *Clostridium* constituye un grupo de bacilos anaerobios Gram positivos y formadores de esporas. Una característica relevante en *Clostridium* es la ausencia de catalasa y peroxidasa, enzimas que protegen a los sistemas biológicos del efecto del oxígeno, y de citocromo oxidasa, la cual participa en el metabolismo aerobio (Hatheway, 1990).

Este grupo de microorganismos puede encontrarse en los suelos, sedimentos marinos, aguas residuales y en el tracto gastrointestinal de los humanos y otros animales (Petit *et al.*, 1999; Uzal *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 2002).

En conjunto con los demás microorganismos de la flora intestinal, el género *Clostridium* cumple funciones de recuperación de energía y mantenimiento de la homeostasis del colon debido a la generación de ácidos grasos de cadena corta, a la protección contra la invasión y colonización de patógenos y a la estimulación y modulación del sistema inmune (Wrigley, 2004).

Debido a su ubicuidad, pueden distribuirse en heridas y alimentos, y en ocasiones son causantes de severas enfermedades, casi siempre mediadas por acción de sus toxinas (Petit *et al.*, 1999; Mahon y Manuselis, 2000).

De las 83 especies de *Clostridium* listadas en el Manual Bergey de Bacteriología Sistemática, cerca de 20 son patógenas o encontradas en especímenes relacionados con enfermedades o infecciones en mamíferos (incluyendo a los humanos) (Hatheway, 1990).

Dentro de este género, *Clostridium perfringens* es una de las especies más frecuentemente aisladas. Es un bacilo anaerobio, Gram positivo, no móvil y esporulado, muy conocido por sus implicaciones en las intoxicaciones alimentarias a nivel mundial. Estas características, además de su morfología rectangular y la presencia de una zona de doble hemólisis en agar sangre, ayudan en la identificación presuntiva de esta bacteria (Allen *et al.*, 1999; Mahon y Manuselis., 2000).

El tiempo de generación de este bacilo anaerobio es muy corto en comparación con otras bacterias: de 7 a 8 minutos a 45°C, su temperatura óptima de crecimiento. Algunas cepas de *Clostridium perfringens* productoras de la enterotoxina (CPE), constituyen una causa importante de las intoxicaciones por alimentos, y enfermedades gastrointestinales tanto en el hombre como en otros animales (Smedley *et al.*, 2004).

En Costa Rica, los estudios en *C. perfringens* se han orientado en su mayoría hacia su determinación en muestras alimenticias para evaluar los servicios de alimentación pública y establecer el riesgo de contraer una toxicoinfección por la ingestión de carne contaminada con esta bacteria (Rodríguez *et al.*, 2002; Gutiérrez *et al.*, 1999; Morera *et al.*, 1999). Además, existen otros trabajos importantes en cuanto a la detección de *C. perfringens* en muestras de suelo (Monge y Rodríguez, 1999; Rodríguez, E., 1992).

Sin embargo, no se ha incursionado en el estudio de *C. perfringens* como agente causal de diarrea; mucho menos de la asociación de su enterotoxina en la producción de la diarrea asociada a antibióticos. Incrementar este conocimiento es el objetivo de nuestro trabajo.

Las toxinas de *Clostridium perfringens*

Una toxina es una proteína biológicamente activa que es antigénica en la naturaleza, y que por lo tanto es posible neutralizar su actividad con el antisuero correspondiente. Las toxinas pueden ser detectadas directamente en animales o en sus

tejidos, en cultivos celulares o por medio de reacciones en pruebas bioquímicas (Hatheway, 1990).

Específicamente, se ha observado que *C. perfringens* produce alrededor de 15 diferentes toxinas (Sparks *et al.*, 2001). Sin embargo, cada aislamiento de *C. perfringens* codifica solamente una parte de este repertorio de toxinas, provocando así una nueva clasificación, que utiliza las letras desde la A hasta la E, basados en la producción de una o más de las cuatro toxinas denominadas alfa, beta, épsilon e iota. Cerca del 2-5% de los aislamientos de *C. perfringens* (la mayoría pertenecientes al tipo A), son productores de la enterotoxina (CPE) (Uzal *et al.*, 1997).

Recientemente, las cepas del tipo A y productoras de enterotoxina se han asociado con casos de enfermedad de origen no-alimentario, como la diarrea asociada a antibióticos (McClane y Chakrabarti, 2004). A nivel experimental, se ha demostrado que esta bacteria se torna avirulenta en el intestino de conejos, cuando el gen de la enterotoxina (*cpe*) es inactivado (Sarker *et al.*, 1999).

La proteína CPE, la cual es expresada únicamente durante la esporulación, es un polipéptido de 35 kDa con un punto isoeléctrico (pI) de 4.3 y una actividad biológica lábil al calor y al pH. Se ha observado, *in vitro*, que la actividad biológica de la enterotoxina se afecta por la presencia de proteasas intestinales como la tripsina y quimiotripsina (McClane y Rood, 2001).

Krakauer *et al.* cita que la inducción de la toxiinfección por CPE involucra tres eventos: (1) La CPE es producida en el intestino delgado durante la esporulación de *C. perfringens* y luego inicia una serie de eventos bioquímicos que alteran la permeabilidad del borde en cepillo de las células epiteliales del intestino delgado; (2) estos cambios inducidos por la CPE llegan a ser citotóxicos y causan un daño localizado en el tejido; (3) esto lleva a una alteración en el fluido normal y en el transporte de electrolitos, lo que deviene en diarrea (Krakauer *et al.*, 1997).

Actualmente, se conoce que la CPE posee una potente actividad citotóxica, como resultado de su interacción con varias proteínas eucariotas, para formar un complejo en la membrana plasmática de los enterocitos (McClane, 2000). Este complejo aparentemente corresponde a un poro, cuya presencia altera la permeabilidad de la membrana para moléculas pequeñas, causando un colapso en el equilibrio coloido-osmótico y la muerte de las células en un lapso de 15-30 min, cuando las dosis son moderadas (Smedley *et al.*, 2004).

En conejos, la enterotoxina CPE induce rápidamente severos daños histopatológicos como la descamación epitelial en el intestino delgado, así como la pérdida de fluidos y electrolitos de todos los segmentos del intestino delgado, sobre todo del íleon (McClane y Chakrabarti, 2004).

Estudios recientes han demostrado que las dosis bajas de enterotoxina inducen un mecanismo apoptótico que involucra la despolarización de la membrana mitocondrial; mientras tanto, las dosis altas de CPE inducen un evento proinflamatorio llamado oncosis (McClane y Chakrabarti, 2004).

En cuanto al gen que codifica para la enterotoxina (*cpe*), se ha propuesto a manera de hipótesis que los aislamientos asociados a toxiinfecciones alimentarias poseen este gen de manera cromosomal, mientras que las enfermedades gastrointestinales no asociadas con alimentos, como la diarrea asociada a antibióticos, cargan el gen *cpe* en un plásmido (Smedley *et al.*, 2004; Sarker *et al.*, 2000).

Uno de los primeros trabajos donde se menciona la posibilidad de una diarrea asociada a antibióticos causada por *C. perfringens*, fue publicado por Borriello *et al.* en 1984. A partir de ese momento, muchas otras publicaciones reconocen a *C. perfringens* como causante de brotes de toxiinfecciones alimentarias y su enterotoxina (CPE) ha sido detectada en casos de diarrea asociada a antibióticos y diarrea esporádica (Larson y Borriello, 1988; Samuel *et al.*, 1991; Brett *et al.*, 1992; Mpamugo *et al.*, 1995; Wada *et al.*, 1996).

Diarrea Asociada a Antibióticos

Definición

La diarrea puede definirse como el aumento del volumen, fluidez o frecuencia de las deposiciones en relación con el patrón habitual de un individuo (Berkow y Fletcher, 1989). Se produce cuando la cantidad de líquido que ingresa o se segrega en el intestino excede la capacidad de absorción del mismo (Bernard, 1993).

La diarrea asociada a antibióticos (DAA) se describe como la diarrea producida desde unas pocas horas después de la administración de la terapia con antibióticos hasta 6-8 semanas después de discontinuar la terapia, sin otra causa aparente (Beaugerie y Petit, 2004). Es definida como clínicamente importante cuando se presentan tres o más deposiciones acuosas o blandas por día. La incidencia de DAA descrita en la literatura se encuentra entre un 5% y un 25% de los pacientes expuestos a la terapia

antimicrobiana, según el antibiótico implicado (Beaugerie *et al.*, 2003; Högenauer *et al.*, 1998).

Algunos antibióticos han sido asociados en forma consistente con un alto riesgo de producir DAA, entre los que se pueden citar cefalosporinas, clindamicina, penicilinas de amplio espectro y ampicilina/amoxicilina (Modi y Wilcox, 2001; Wiström *et al.*, 2001). Se ha descrito en la literatura que la diarrea ocurre en aproximadamente 5-10% de los pacientes que han recibido una terapia con ampicilina; 10-25% de los pacientes tratados con amoxicilina-clavulanato; 2-5% de los que recibieron cefalosporinas, fluoroquinolonas, azitromicina, claritromicina, eritromicina y tetraciclina (Bartlett, 2002).

Los pacientes pueden presentar otros síntomas además de la diarrea, como calambres abdominales, deshidratación, presencia de leucocitos en las heces, leucocitosis sanguínea, hipoalbuminemia o fiebre (Högenauer *et al.*, 1998).

El estado de salud del paciente juega un papel importante en el establecimiento de la diarrea, así por ejemplo, la existencia de enfermedades concomitantes se asocia con un aumento en el riesgo de DAA. Sin embargo, la edad y el estado ambulatorio del paciente no se han asociado con un incremento del riesgo (Beaugerie y Petit, 2004). En pacientes hospitalizados la DAA ha sido relacionada con un incremento en la mortalidad, en la permanencia en el centro hospitalario y en el costo de los cuidados médicos (Wiström *et al.*, 2001).

Causas de la DAA

El tracto gastrointestinal del ser humano se encuentra colonizado por una compleja flora bacteriana, la cual le protege contra la colonización de enteropatógenos. Algunos de los géneros de microorganismos considerados comúnmente como flora normal son *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium* y *Fusobacterium* (Beaugerie y Petit, 2004).

La etiología de la DAA es amplia, puede ser provocada por: (1) efectos tóxicos de los antibióticos directamente en el epitelio intestinal, (2) efectos farmacológicos sobre la movilidad intestinal, (3) alteración de la función digestiva (especialmente en el metabolismo de carbohidratos) como producto de la disminución de la flora intestinal, (4) sobrecrecimiento de microorganismos patógenos debido a la reducción de la flora normal (Beaugerie y Petit, 2004; Bartlett, 2002; Wiström *et al.*, 2001; Högenauer *et al.*, 1998).

Virtualmente todos los antibióticos han sido implicados en la producción de la DAA. El espectro antimicrobiano de un antibiótico (particularmente su actividad contra bacterias anaerobias) y la concentración que alcanza en el intestino son factores importantes en el desarrollo de la diarrea (Wiström *et al.*, 2001).

Se han descrito gran variedad de antibióticos relacionados con provocar efectos tóxicos directos sobre el epitelio intestinal. Entre ellos se pueden citar la neomicina, la cual puede rápidamente causar síntomas intestinales y mala absorción cuando la dosis diaria excede 2 gramos, debido a que su administración oral causa cambios histológicos en la mucosa del intestino (Beaugerie y Petit, 2004).

Para otros antibióticos como la clindamicina y la gentamicina, se ha demostrado que inhiben la respuesta epitelial a la estimulación eléctrica de los nervios del colon, cuando se utilizaron modelos animales, sin embargo, este efecto aún no se ha demostrado en humanos (Beaugerie y Petit, 2004). La eritromicina por su parte actúa sobre algunos receptores acelerando de esta manera el vaciado gástrico, la amoxicilina-clavulanato estimula la movilidad intestinal y en casos raros se ha descrito a la penicilina como causante de colitis hemorrágica (Bartlett, 2002; Högenauer *et al.*, 1998).

La administración de la terapia antimicrobiana también puede causar una alteración en el ecosistema del intestino, cambios que crean un ambiente ideal para el sobrecrecimiento de otros microorganismos, previamente presentes como parte de la flora normal o adquiridos del ambiente. Algunos de los factores que intervienen en el grado de alteración provocado en el microambiente intestinal son el espectro de acción del agente utilizado, la dosis, la ruta de administración y sus propiedades farmacológicas (Beaugerie y Petit, 2004).

Clostridium difficile es el patógeno más comúnmente asociado con la producción de DAA (20% de los casos) y todos los casos de colitis pseudomembranosa son atribuidos a esta bacteria; es parte de la flora normal de al menos 3% de los adultos sanos (Beaugerie y Petit, 2004; Beaugerie *et al.*, 2003; Modi y Wilcox, 2001; Wiström *et al.*, 2001). Es considerado un problema creciente como enfermedad nosocomial, especialmente en ancianos y pacientes con serias enfermedades subyacentes (Wiström *et al.* 2001).

En aquellos casos en que *C. difficile* no es el responsable de la DAA, *Staphylococcus aureus* y *C. perfringens* tipo A son la causa más frecuente. Otros microorganismos que también han sido asociados son *Klebsiella oxytoca*, *Bacteroides*,

Salmonella y algunas especies de *Candida* (Modi y Wilcox, 2001; Bartlett, 2002; Wiström *et al.* 2001; Högenauer *et al.*, 1998). Sin embargo, en la mayoría de los casos el organismo responsable de la producción de la DAA no es diagnosticado (Högenauer *et al.*, 1998).

C. perfringens forma parte de la flora normal del intestino humano, encontrándose hasta 10^3 unidades formadoras de colonias en promedio por gramo. Existe evidencia que sugiere que *C. perfringens* enterotoxigénico juega un papel importante en la etiología de la DAA (Borriello *et al.*, 1984; Beaugerie y Petit, 2004; Bartlett, 2002).

Borriello *et al.* en 1984 aislaron cepas de *C. perfringens* productoras de enterotoxina en las heces de 11 pacientes con una prolongada diarrea asociada a antibióticos, negativa por *C. difficile*. Diez de estos pacientes habían recibido terapia con antibióticos, en las tres semanas previas a la diarrea. Todos los casos fueron esporádicos, autolimitados y la mayor parte de los serotipos de *C. perfringens* aislados fueron diferentes a los aislados en las diarreas por intoxicación alimentaria (Borriello *et al.*, 1984).

De acuerdo con este estudio se puede esperar un paciente con DAA positivo por *C. perfringens* por cada 10 pacientes positivos por DAA por *C. difficile*. Estas observaciones se confirmaron posteriormente con otros 39 pacientes cuando se continuó el estudio (Larson y Borriello, 1988).

Las infecciones intestinales nosocomiales con esta bacteria ocurren principalmente en ancianos después de recibir una terapia antimicrobiana. No obstante, también se han encontrado casos en pacientes que no han recibido la terapia previamente. Además, los datos epidemiológicos son escasos y las implicaciones terapéuticas de la infección (prevención y tratamiento) son aún desconocidas (Högenauer *et al.*, 1998; Beaugerie y Petit, 2004).

Tratamiento de la DAA

Una de las alternativas para el manejo de la DAA, es la interrupción de la terapia antimicrobiana aplicada al paciente; sin embargo, esta alternativa no es adecuada si el tratamiento era el recomendado para la enfermedad de fondo y ésta no ha cedido del todo. En estos casos una opción válida puede ser cambiar el antibiótico utilizado por uno que se encuentre en el grupo de bajo riesgo de producir DAA, como metronidazol, aminoglucósidos, tetraciclinas y otros (Högenauer *et al.*, 1998).

Los pacientes que sufren de DAA con pruebas positivas para la toxina de *C. difficile* y con hallazgos que evidencien desarrollo de colitis (fiebre, leucocitosis y observaciones características en la endoscopia), diarrea severa o persistente, son tratados con metronidazol o vancomicina (Bartlett, 2002; Högenauer *et al.*, 1998); también se ha utilizado bacitracina, teicoplanina o ácido fusídico como terapias alternativas. El tratamiento puede ser reforzado con la administración diaria de 1-2 g de *Lactobacillus* durante 4 semanas (Högenauer *et al.*, 1998).

Los pacientes con una diarrea moderada causada por agentes distintos de *C. difficile* no necesitan de un tratamiento específico, en la mayor parte de los casos. Se recomienda aplicar terapia de sustitución, por la pérdida de líquidos y electrolitos (Högenauer *et al.*, 1998).

No se ha definido aún un tratamiento específico para la DAA provocada por *C. perfringens*, principalmente por tratarse de una diarrea autolimitada y porque pocos laboratorios ofrecen las pruebas diagnósticas necesarias para su identificación (Bartlett, 2002).

Métodos de Detección de la Enterotoxina de *C. perfringens* (CPE)

Aún en países industrializados, son pocos los laboratorios que examinan las heces de sus pacientes en busca de la enterotoxina de *C. perfringens* (CPE) o la citotoxina de *C. difficile*, a menos que sea solicitada específicamente una investigación por diarrea asociada a antibióticos (Forward *et al.*, 2003).

No se ha establecido todavía el método óptimo para el diagnóstico de la diarrea asociada a antibióticos causada por *C. perfringens*. A pesar de la ausencia de este “estándar de oro”, es necesario detectar la CPE en las muestras de heces para confirmar que la bacteria y su toxina son las causantes de la diarrea (Modi y Wilcox, 2001).

Es posible detectar la enterotoxina o los anticuerpos anti-toxina en una gran variedad de muestras, incluyendo líquidos sobrenadantes de cultivos, suero, heces y alimentos. Los inmunoensayos existentes son: inmunoelectroforesis, inmunoensayos enzimáticos (ELISA) y aglutinación pasiva reversa en látex (RPLA), que consiste en la unión del antígeno soluble (la enterotoxina CPE) con anticuerpos acoplados a partículas de látex (Meer *et al.*, 1997).

Uno de los métodos inmunológicos más utilizados en la actualidad para el estudio de la CPE y su respectivo gen (*cpe*) es la técnica de inmunoblot (Sarker *et al.*, 2000; Collie *et al.*, 1998). Además, se utilizan otros métodos como el cultivo celular

con células Vero, pero esta metodología ha sido considerada como la menos sensible y la menos reproducible entre los métodos de detección de CPE (Modi y Wilcox, 2001).

Dentro de los métodos moleculares para la detección del gen *cpe*, se han utilizado la hibridación con sondas de ADN (Van Damme-Jongsten *et al.*, 1990), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Pituch *et al.*, 2002; Lukinmaa *et al.*, 2002), el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y la electroforesis de campo pulsado (PFGE) (Collie *et al.*, 1998; Sarker *et al.*, 2000; Schalch *et al.*, 2003). La mayoría de estos estudios están dirigidos a comparar los genotipos de cepas positivas para el gen *cpe*, y así facilitar el diagnóstico diferencial entre la toxoinfección alimentaria y la diarrea asociada a otras causas (Collie y McClane, 1998).

Estos métodos moleculares poseen la ventaja de no requerir la esporulación *in vitro* de las bacterias, lo que evita resultados falsos negativos. Sin embargo, las cepas de *C. perfringens* pueden perder el gen de la enterotoxina durante los subcultivos y la abundante cantidad de ADN bacteriano en las heces puede interferir (Meer *et al.*, 1997; Modi y Wilcox, 2001). Además, en muchas ocasiones estos métodos no logran caracterizar la totalidad de los aislamientos (Schalch *et al.*, 2003).

Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana

Para un tratamiento correcto de un proceso infeccioso es necesario determinar la eficacia antimicrobiana frente a los patógenos específicos. De esta forma, las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana pueden mostrar cuáles agentes son más eficaces contra un patógeno y dar una estimación de la dosis terapéutica adecuada (Prescott *et al.*, 2004).

La concentración mínima inhibitoria (MIC) proporciona una idea de la eficacia de un agente antimicrobiano. Se define como la concentración más baja de un fármaco que impide el crecimiento de un determinado patógeno (Prescott *et al.*, 2004).

El incremento de la resistencia contra agentes antimicrobianos observado en bacterias anaerobias plantea un problema importante y se ha determinado principalmente contra fármacos como la clindamicina, algunos beta lactámicos y especialmente para algunas especies de *Bacteroides* aislados de infecciones nosocomiales (NCCLS, 1997; Mahon y Manuselis, 2000).

Idealmente los laboratorios clínicos que trabajan con bacterias anaerobias deberían de efectuar la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de los

agentes patógenos con el fin de establecer el patrón de susceptibilidad de éstos hacia nuevos agentes antimicrobianos, monitorear los patrones de susceptibilidad periódicamente para obtener una guía local para el tratamiento empírico y manejar en forma individual ciertos procesos infecciosos (NCCLS, 1997; Mahon y Manuselis, 2000).

El “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS, 1997; Mahon y Manuselis, 2000) también recomienda realizar pruebas de susceptibilidad en las siguientes condiciones:

- Falla en el procedimiento terapéutico usual.
- Desconocimiento del patrón de resistencia del organismo o la especie implicada.
- Ausencia de un procedimiento establecido para la terapia empírica.
- Infecciones de gran severidad.
- Si se requiere de una terapia de larga duración.

El NCCLS sugiere además que agentes virulentos o comúnmente resistentes a fármacos antimicrobianos, deberían ser evaluados en la prueba de susceptibilidad antimicrobiana. Tal es el caso de algunos miembros del grupo *Bacteroides fragilis*, otras especies de *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *C. perfringens*, *C. ramosum*, *C. septicum*, ciertas especies de *Fusobacterium* y *Biophila wadsworthia* (NCCLS, 1997; Mahon y Manuselis, 2000).

Para la elección de la droga antimicrobiana adecuada se deben tomar en cuenta varios factores, entre los que podemos citar: la naturaleza y localización del proceso infeccioso, los patrones de susceptibilidad típicos, la tinción de Gram y la severidad de la infección (NCCLS, 1997; Mahon y Manuselis, 2000).

Las recomendaciones con respecto a la terapia antimicrobiana de enfermedades asociadas con bacterias anaerobias cambian frecuentemente debido a la introducción de nuevas drogas, la variabilidad de los patrones de resistencia entre los agentes patógenos y los resultados de las investigaciones locales y multicéntricas (Mahon y Manuselis, 2000).

La selección del antibiótico que se usa en las pruebas de susceptibilidad para anaerobios es altamente influenciada por su disponibilidad en la farmacia del hospital, y en general, deberían incluirse penicilina, clindamicina, metronidazole, imipenem y ampicilina/sulbactam (Mahon y Manuselis, 2000).

Una gran variedad de técnicas pueden ser utilizadas para determinar *in vitro* el nivel de actividad antimicrobiana, las cuales pueden separarse en dos grupos: el método

de dilución que puede ser en caldo (macrodilución o microdilución) o en agar y el método de difusión en agar (también conocido como el método de Kirby-Bauer) (Mahon y Manuselis, 2000), que no es aceptado para bacterias anaerobias (Dubreuil *et al.*, 1999).

Desafortunadamente no existe un acuerdo general sobre la técnica a emplear, porque las dificultades son encontradas en todos los métodos disponibles. Estas incluyen falta de reproducibilidad, fallo en el crecimiento de algunos organismos en un medio particular, dificultad en la lectura con ciertos métodos y una baja comparabilidad entre métodos. Además el costo y la complejidad del proceso son otros factores que impiden que estas pruebas se lleven a cabo en todos los laboratorios (Mahon y Manuselis, 2000).

La prueba de dilución en agar es el método de referencia descrito por el NCCLS para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias anaerobias y *N. gonorrhoeae* (NCCLS, 1997). Esta prueba es útil para la determinación de la MIC; para ello se preparan diluciones específicas del agente antimicrobiano a probar, se incorporan en un volumen determinado de agar fundido y luego se coloca en placas de Petri. Se recomienda la utilización de agar *Brucella*, el cual se puede suplementar con sangre de cordero u otros nutrientes para utilizarse con bacterias fastidiosas. Luego se coloca un inóculo estandarizado y se determina el crecimiento posterior a la incubación, para determinar la mínima concentración del agente que es capaz de inhibir visiblemente el crecimiento del microorganismo. Según este valor, el NCCLS ha definido criterios para clasificar el agente como sensible, intermedio o resistente (Mahon y Manuselis, 2000).

Esta prueba posee la desventaja de que la vida útil de los platos que contienen el agar con antibiótico es de sólo una semana, debido a que deben almacenarse a una temperatura de 2 a 8 °C y muchas de las drogas utilizadas son lábiles a esta temperatura. Además, esta técnica es solo utilizada en laboratorios de investigación debido a que es muy laboriosa y su procedimiento es práctico sólo si se usa para evaluar un gran número de aislamientos (NCCLS, 1997; Dubreuil *et al.*, 1999; Mahon y Manuselis, 2000).

Un procedimiento más sencillo para determinar la sensibilidad antimicrobiana de bacterias anaerobias es el empleo de sistemas comerciales denominados ATB ANA[®], de la casa bioMérieux. Este método emplea dos concentraciones de cada antibiótico, impregnados en pares de hoyos. A pesar de que este método no es la prueba estándar

para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana, los resultados obtenidos con este sistema correlacionan bien con los obtenidos por el método de referencia (Dubreuil *et al.*, 1999).

II. Justificación

La mayoría de los casos de diarrea asociada a antibióticos están dados directa o indirectamente por la alteración de la microflora intestinal debido al uso de antibióticos. *C. difficile* ha sido, tradicionalmente, la bacteria patógena más frecuentemente aislada en las diarreas adquiridas en los centros hospitalarios. Sin embargo, en aproximadamente el 80% de los casos, el organismo responsable permanece sin identificar.

Hace 20 años, Borriello *et al.* demostraron que algunos de los casos de diarreas asociadas a antibióticos donde no se encontraba *C. difficile*, estaban asociados con cepas enterotoxigénicas de *C. perfringens*. A partir de ese momento, otros investigadores han ido dilucidando esta asociación. Aun así, son pocas las investigaciones que se han realizado desde entonces.

Tradicionalmente la terapia antimicrobiana para controlar los procesos infecciosos asociados a bacterias anaerobias se ha realizado empíricamente. Sin embargo, los patrones de susceptibilidad para las bacterias anaerobias han cambiado con el tiempo, y la resistencia a diversos agentes antimicrobianos ha dejado de limitarse al grupo de *Bacteroides fragilis*, involucrando una gran variedad de microorganismos y de agentes antimicrobianos.

La determinación local de los patrones de susceptibilidad y resistencia de *C. perfringens*, que además son desconocidos en nuestro país, podrían ser utilizados como guía para la terapia empírica.

La prueba de dilución en agar es el estándar de oro para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias anaerobias, por lo cual la estandarización y puesta en práctica de esta técnica es de suma importancia, ya que en el país dicha prueba no se utiliza. Además su comparación con la prueba comúnmente utilizada en los laboratorios de anaerobios, el ATB ANA[®], proveerá información valiosa de la correlación que existe entre ambos métodos.

Aunque *C. perfringens* ha sido catalogado como un componente menor en las diarreas asociadas a antibióticos y no se han realizado investigaciones al respecto en Costa Rica, las implicaciones que podría tener esta bacteria en nuestro país en este tipo de diarreas no deben ser desestimadas.

El propósito de este trabajo es iniciar la investigación de *C. perfringens* y su relación con diarreas asociadas a antibióticos en Costa Rica; se pretende además

determinar su patrón de sensibilidad antimicrobiana mediante la implementación en nuestro medio de la técnica de referencia de dilución en agar, que se comparará con una técnica utilizada en Costa Rica para tal fin. Con ello se desea alentar a otros investigadores para conocer más acerca de la patogénesis, la epidemiología y el diagnóstico de esta bacteria en la diarrea nosocomial, con el fin de contribuir con el control y el tratamiento adecuado para los pacientes que la padecen.

III. Objetivo General

Determinar la presencia, la capacidad enterotoxigénica y la susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Clostridium perfringens* aisladas de diarreas nosocomiales de pacientes del Hospital San Juan de Dios.

Objetivos Específicos

1. Aislar e identificar *Clostridium perfringens*, a partir de muestras de heces de pacientes con diarreas nosocomiales del hospital San Juan de Dios.
2. Evaluar la capacidad enterotoxigénica de las cepas previamente aisladas.
3. Estandarizar la técnica de susceptibilidad antimicrobiana por el método de dilución en agar.
4. Determinar la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas enterotoxigénicas y de las cepas consideradas como parte de la flora normal.
5. Comparar la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas utilizando los métodos de dilución en agar y antibiograma para bacterias anaerobias estrictas.

IV. Materiales y Métodos

1. Ubicación

El aislamiento de las cepas, las pruebas para la determinación de la enterotoxigenicidad y los análisis de la susceptibilidad antimicrobiana se llevaron a cabo en el Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia de la Facultad de Microbiología, en la Sede Rodrigo Facio de la Universidad de Costa Rica.

2. Origen de las muestras y transporte

Se recolectaron 104 muestras de heces diarreicas de pacientes que habían recibido tratamiento antimicrobiano en el Hospital San Juan de Dios, cuya infección fue considerada como diarrea nosocomial. Las muestras fueron congeladas a -70 °C y transportadas en hielo seco hasta el laboratorio, donde se mantuvieron a -70 °C hasta el día de su procesamiento.

3. Aislamiento de las cepas de *Clostridium perfringens*

La metodología utilizada para el aislamiento de *C. perfringens* fue la descrita por Labbé y Harmon (1992) y modificada por Rodríguez *et al.* (2002). Utilizando un flujo de nitrógeno para mantener un ambiente anaerobio, se inoculó aproximadamente 1 g de heces de cada muestra en tubos con 5 ml de caldo infusión cerebro y corazón (CICC) prerreducido (Holdeman *et al.* 1977) y se incubaron los tubos a 44°C por 24 horas con el propósito de preenriquecer las muestras.

A partir de los tubos que presentaron turbiedad y producción de gas, se rayó una placa de agar oleandomicina polimixina sulfadiazina perfringens (OPSP) que se incubó en anaerobiosis a 44°C por 24 horas. Las colonias bacterianas aisladas, incluyendo negras y blancas, fueron inoculadas en tubos de CICC prerreducidos e incubados durante 4 horas en un baño de maría a 44°C. Se consideraron como positivos los tubos que presentaron turbiedad y producción de gas. Estos fueron inoculados en Agar Sangre (AS) e incubados a 44°C durante 24 horas.

Se verificó la pureza del cultivo y a las colonias aisladas se les realizaron pruebas de tolerancia al oxígeno y tinción de Gram. Se consideraron como posibles *C. perfringens* aquellos aislamientos que correspondieran a bacilos Gram positivos (con o sin esporas), cuyo crecimiento fuera exclusivo o mejor bajo condiciones de atmósfera anaerobia (Rodríguez *et al.*, 2002).

Cada aislamiento así seleccionado, se inoculó en leche estéril para conservarlo a -70 °C y en medio Chopped Meat (CM), el cual se incubó en anaerobiosis, con el fin de utilizarlo para las pruebas bioquímicas de identificación. Se utilizó la cepa de *C. perfringens* UCR A-89 como cepa control en todos los aislamientos.

4. Identificación de las cepas

Las pruebas bioquímicas para la confirmación de la bacteria se realizaron siguiendo los procedimientos recomendados por Holdeman *et al.* (1977) e incluyeron: producción de hemólisis en agar sangre y determinación de lecitinasa y lipasa en agar yema de huevo, ambos incubados en anaerobiosis; además, pruebas de movilidad, hidrólisis de la gelatina, producción de indol y reducción de nitratos, todas ellas en medios prerreducidos. La cepa control utilizada fue *C. perfringens* UCR A-89.

5. Detección de la enterotoxina de *Clostridium perfringens* (CPE)

Para realizar la prueba de detección de la enterotoxina de *C. perfringens* se utilizó una prueba de aglutinación reversa pasiva con látex (RPLA) de la casa comercial Oxoid®, la cual es capaz de detectar menos de 2 ng/ml de enterotoxina. Se siguieron las recomendaciones del Centro para el Control de Enfermedades (CDC) y las instrucciones de la casa fabricante, con las siguientes modificaciones:

- La inactivación por calor de las cepas cultivadas en Chopped Meat (CM) fue a 60 °C por 10 minutos.
- El medio de esporulación Duncan-Strong modificado se incubó en anaerobiosis a 37 °C por 72 horas como máximo (Gutiérrez *et al.*, 1999).
- El tiempo de centrifugación del medio Duncan-Strong modificado fue de 30 minutos.
- No se realizaron diluciones de la muestra.

Cada una de las cepas aisladas se cultivó en medio CM a 37 °C por 18-24 horas. A partir de este cultivo se inoculó el medio de esporulación Duncan-Strong modificado, que se incubó con las modificaciones citadas anteriormente. Luego de una centrifugación a 900 G por 30 minutos, el sobrenadante de este medio de esporulación fue empleado para la detección de la enterotoxina, utilizando placas de microtítulo con fondo cónico.

La prueba fue considerada como positiva cuando se observó una aglutinación mayor que la aglutinación dada por el látex control negativo, es decir, cuando se

produjo una malla visible macroscópicamente en el fondo de los pocillos debido a la interacción de la enterotoxina con los anticuerpos anti-enterotoxina unidos a las esferas de látex. En los casos en que se formó un punto denso en el fondo de los pocillos, la prueba de detección de enterotoxina se consideró negativa. Como cepa control positivo para la determinación de enterotoxina por RPLA se utilizó la cepa *C. perfringens* UCR A-89.

6. Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana

A. Prueba de dilución en agar

Se seleccionaron cinco agentes antimicrobianos o sus sales: cloranfenicol (Sigma Chemical Company), metronidazol (Sigma Chemical Company), penicilina (Sigma Chemical Company), imipenem (Tienam, Merck Sharp & Dohme) y cefotaxima (Dolanex, Rimsa). La concentración mínima inhibitoria (MIC) de los 5 agentes probados fue determinada por el método de dilución en agar siguiendo las indicaciones de el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1997).

1. Preparación de los medios de cultivo con antibiótico:

- a. Las concentraciones utilizadas de los antibióticos seleccionados fueron de 0.5 a 128 $\mu\text{g/ml}$, empleando como mínimo 5 concentraciones de cada droga, que incluían dos por encima y dos por debajo de los puntos de quiebra para cada antibiótico.
- b. Se prepararon soluciones “stock” para cada antibiótico, 10 veces más concentrada que la mayor concentración a emplear. A partir de esta solución se elaboraron las diluciones con las concentraciones de la droga a probar.
- c. Se preparó agar *Brucella* (BBL®) suplementado con vitamina K y hemina y se distribuyó en tubos conteniendo 18 ml de medio cada uno y 2 ml de la dilución del antibiótico. Se mezcló bien y se chorreó en placas de Petri.
- d. Las placas se almacenaron a 4 °C por un máximo de 7 días.

2. Preparación del inóculo:

Cada una de las cepas a probar se descongeló, se rayó en placas de agar sangre y se verificó su pureza. Se tomaron 4 o más colonias, crecidas anaeróbicamente por 48-72 horas en agar *Brucella* suplementado con vitamina K y hemina y se inocularon tubos con 5 ml de tioglicolato también suplementado con vitamina K y hemina, hasta alcanzar una turbiedad equivalente al patrón 0,5 de la escala de McFarland (aproximadamente 1.5×10^8 UFC/ml).

3. Inoculación e incubación:

Se utilizaron como máximo 14 inóculos por placa; se depositó 3 μ l (aproximadamente 10^5 UFC) de cada suspensión en los espacios predibujados en la placa de Petri. Cada placa se rotuló de manera que la distribución de los mismos fuera uniforme, de acuerdo con el esquema de la figura 1.

4. Controles:

- a. Cepas control: Se utilizaron como cepas control *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 y *Eggerthella lenta* ATCC 43055. Las MIC esperadas para cada cepa se muestran en el cuadro 1.
- b. Control positivo de crecimiento: Se colocaron 3 μ l de cada uno de los cultivos a probar en platos de agar *Brucella* suplementado, sin antibiótico. Esto con el fin de demostrar crecimiento confluyente y homogéneo en la gota y que sirviera como patrón de comparación de crecimiento con los platos que contenían antibiótico.
- c. Control de inóculo: Después de inocular todas las placas con y sin antibiótico, se tomó 1 μ l del inóculo estandarizado y se mezcló con 1 ml de tioglicolato suplementado. Se depositó 1 μ l de la suspensión en una placa de agar *Brucella* suplementado sin antibiótico y se distribuyó en toda la superficie. Después de 48 horas de incubación en anaerobiosis se debían aislar de 100 a 200 colonias. Esto se hizo con el propósito de asegurar que las bacterias anaerobias no fueron afectadas por el oxígeno durante el procedimiento.

5. Incubación:

Todas las placas se incubaron en jarras de anaerobiosis a 37°C, durante 48 horas.

6. Interpretación:

Se verificó que cada uno de los controles se comportara de acuerdo con lo esperado. Esto es:

- a. Que la MIC de cada cepa control estuviera dentro de los rangos descritos, según el cuadro 1.
- b. Que hubiera crecimiento confluyente en cada una de las gotas inoculadas en el agar *Brucella*.
- c. Que el control de inóculo de cada cepa presentara un recuento entre 100 y 200 UFC/ μ l.

Se determinó la MIC de cada aislamiento, que correspondió a la menor concentración de droga que logró inhibir el crecimiento y se interpretó si es sensible, intermedio o resistente, de acuerdo con los puntos de quiebra para cada droga, según el cuadro 1.

B. Antibiograma para bacterias anaerobias estrictas ATB ANA[®]

Se utilizó la prueba ATB ANA de la casa bioMérieux[®], que permite determinar la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias anaerobias, de acuerdo con el crecimiento en concentraciones predeterminadas de cada droga, usualmente dos concentraciones en dos cúpulas distintas. Se siguieron todas las recomendaciones de la casa fabricante.

Procedimiento

1. Se descongelaron las cepas de *C. perfringens* y se cultivaron en agar sangre durante 24-48 horas, en jarras de anaerobiosis a 37 °C. A partir de este cultivo se preparó una suspensión bacteriana en solución salina estéril 0.85% con una turbiedad equivalente al patrón 3 de la escala de McFarland (aproximadamente 9×10^8 UFC/ml).
2. A partir de esta suspensión se tomaron 200 μ l y se colocaron en una ampolla de ATB S Medium (suministrada por el kit).
3. Se inoculó la galería con pipeta automática, distribuyendo 135 μ l, , en cada cúpula (aproximadamente entre 3×10^6 bacterias/cúpula y 2×10^7 bacterias/ml)
4. La galería inoculada se incubó 48 horas a 37 °C en condiciones de anaerobiosis.
5. Luego del período de incubación se realizó la lectura de cada cúpula evaluando la presencia de turbiedad (+). Siguiendo las indicaciones de la casa comercial se clasificó cada cepa como sensible (ausencia de crecimiento en ambas cúpulas), resistente (crecimiento en ambas cúpulas) o intermedia (crecimiento sólo en la

cúpula de menor concentración). Esto, para cada uno de los antibióticos incorporados en la galería.

6. Se utilizó la cepa *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 como control de calidad, según lo recomendado por la casa fabricante (los resultados esperados para ésta cepa se muestran en el cuadro 2).

V. Resultados

1. Aislamiento y caracterización de las cepas de *Clostridium perfringens*

Se procedió a realizar el aislamiento de *Clostridium perfringens* en 104 muestras de heces diarreicas provenientes de pacientes del Hospital San Juan de Dios. Del total de muestras, fue posible realizar 33 aislamientos considerados presuntivamente como *C. perfringens*, tomando en cuenta su crecimiento en el medio OPSP, la turbidez y producción de gas en Caldo Infusión Cerebro y Corazón (CICC), la prueba de tolerancia al oxígeno y la tinción de Gram.

Sin embargo, durante el procedimiento de identificación bioquímica de confirmación de las cepas presuntivas, se descartaron dos, debido a su movilidad, a la posición de sus esporas y a sus características bioquímicas, que diferían considerablemente de las de *C. perfringens*. Una de ellas fue posteriormente identificada como *C. sporogenes* en el sistema de identificación rápida API ®.

Adicionalmente, otros dos aislamientos sufrieron contaminación por un cocobacilo aerobio facultativo (*Aerococcus viridans*), y no fue posible recuperar el bacilo anaerobio.

En resumen, fue posible aislar 29 cepas de *C. perfringens*, lo que corresponde a un 27.8% del total de muestras diarreicas evaluadas. Estas cepas fueron identificadas según el procedimiento bacteriológico recomendado por Holdeman *et al.* (1977) y descrito previamente, donde las reacciones bioquímicas durante la incubación de la bacteria permiten la determinación de un perfil metabólico que se comparó con el control respectivo (*C. perfringens* UCR A-89).

2. Frecuencia de la enterotoxina de *Clostridium perfringens* (CPE)

En las 29 cepas identificadas como *C. perfringens* se evaluó su capacidad enterotoxigénica siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Dos de las cepas, designadas como CP-21 y CP-35, resultaron positivas por enterotoxina. Es decir, un 6.9% de las cepas de *C. perfringens* previamente aisladas resultaron productoras de la enterotoxina (CPE). Por lo tanto, un 1.9% del total de muestras analizadas en este estudio resultaron positivas en la detección de CPE.

3. Determinación de la Susceptibilidad Antimicrobiana

Se determinó la susceptibilidad antimicrobiana de las 29 cepas aisladas e identificadas como *Clostridium perfringens*, utilizando la prueba de dilución en agar y el ATB ANA[®].

Las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (MICs) obtenidas, por el método de dilución en agar, para los cinco antibióticos probados (cloranfenicol, metronidazol, imipenem, penicilina y cefotaxima) se muestran en los cuadros 3-7. Las tres cepas control y los recuentos obtenidos en las placas de control de inóculo para las cepas utilizadas se comportaron dentro de lo esperado en todos los casos. En la placa de control de crecimiento se obtuvo crecimiento confluyente para todas las cepas.

Todas las cepas aisladas fueron sensibles a cloranfenicol, imipenem y cefotaxima. La cepa designada como CP-76 presentó resistencia hacia penicilina, obteniéndose una MIC de 16 µg/ml. Tres cepas mostraron resistencia a metronidazol; para las cepas CP-44 y CP-54 se obtuvo una MIC de 512 µg/ml y para la cepa CP-28 la MIC obtenida fue mayor a 512 µg/ml. Ninguna de las cepas presentó resistencia múltiple hacia los antibióticos utilizados.

De esta forma un 100% de las cepas fue sensible a cloranfenicol, imipenem y cefotaxima; un 96.5% mostró susceptibilidad hacia penicilina y un 89.7% hacia metronidazol (cuadro 9 y figura 2).

Los resultados obtenidos utilizando el ATB ANA[®] se muestran en los cuadros 8a-8d. Debido a la pobre correlación que se obtuvo entre la prueba de dilución en agar y el ATB ANA[®], este antibiograma se repitió siguiendo las mismas recomendaciones de la casa comercial; en los cuadros se muestran los resultados para las dos repeticiones.

Como se puede observar, todas las cepas analizadas mostraron susceptibilidad hacia imipenem (4-8 mg/l) y piperacilina + tazobactam (32/4- 64/4 mg/l) en las dos repeticiones.

De las 29 cepas analizadas, 14 presentaron resistencia hacia metronidazol (8-16 mg/l) la primera vez y sólo 10 en la segunda; para la concentración de 4 mg/l, 17 cepas fueron resistentes y luego sólo 10 de las cepas.

La primera vez que se montó la prueba se obtuvieron 12 cepas resistentes para penicilina (0.5- 2 mg/l) y la segunda vez sólo 5 fueron resistentes. Lo mismo se observó para cefoxitina (16-32 mg/l): dos cepas resistentes la primera vez y cuatro la segunda.

Respecto a ticarcilina-ácido clavulánico (32/2-64/2 mg/l), en los primeros resultados obtenidos todas las cepas mostraron sensibilidad hacia este antibiótico; en los segundos, dos presentaron resistencia y una cepa se comportó como intermedia. Para ticarcilina (64 mg/l) se repitió esta situación donde la primera vez todas las cepas fueron sensibles y en la segunda prueba dos de las cepas presentaron resistencia.

Una de las cepas presentó resistencia hacia cefotetán (16-32 mg/l) en la primera prueba y en la segunda el número de cepas resistentes ascendió a 3. Para clindamicina (2-4 mg/l) se obtuvieron 17 cepas resistentes y al repetir la prueba sólo 6 presentaron resistencia.

Para amoxicilina también se obtuvieron resultados discordantes, en la concentración de 2-4 mg/l, primero 11 cepas fueron resistentes y luego sólo 3; para la concentración 16 mg/l en la primera prueba 7 fueron resistentes y en la segunda sólo 1 de las cepas mostró resistencia; todas las cepas fueron sensibles para amoxicilina-ácido clavulánico al inicio y posteriormente 2 cepas presentaron resistencia para las dos concentraciones utilizadas.

La primera vez que se montó la prueba 7 cepas fueron resistentes a cloranfenicol (8-16 mg/l) y en la segunda prueba todas las cepas fueron susceptibles. Este caso se repitió para piperacilina (32-64 mg/l) donde al inicio una de las cepas mostró resistencia y posteriormente todas las cepas fueron susceptibles.

Como se observa, los resultados obtenidos en estas repeticiones no son reproducibles; a pesar de que los resultados obtenidos con la cepa control (*Bacteroides fragilis* ATCC 25285) concuerdan con lo esperado: resistente a penicilina y a amoxicilina únicamente.

Tomando en cuenta las discrepancias observadas en los resultados obtenidos con el ATB ANA[®], se decidió volver a determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de las cepas por el método de dilución en agar; los resultados fueron idénticos a los obtenidos la primera vez. De esta forma, se consideraron como verdaderos, únicamente los resultados obtenidos por este procedimiento, por cuanto los resultados fueron reproducibles y esta técnica es considerada el estándar de oro para las pruebas de sensibilidad antimicrobiana en bacterias anaerobias.

VI. Discusión

1. Aislamiento y caracterización de las cepas de *Clostridium perfringens*

C. perfringens es un anaerobio Gram positivo ampliamente distribuido en el ambiente (suelo y aguas residuales). Además, se encuentra comúnmente en los alimentos y en el tracto gastrointestinal de los humanos y otros animales (Petit *et al.*, 1999; Uzal *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 2002).

En este estudio se encontró *C. perfringens* en sólo 27.8% del total de muestras analizadas, quizás debido a las alteraciones de la microflora intestinal por causa de la diarrea. Estas alteraciones incluyen el impacto de los antibióticos sobre la flora normal, la disminución en el metabolismo de los ácidos biliares, el metabolismo alterado de los carbohidratos en el colon y el transporte alterado de agua y electrolitos en los epitelios intestinales (Beaugerie y Petit, 2004; Wrigley, 2004).

Todas las cepas de *C. perfringens* aisladas produjeron colonias negras (típicas) en el medio OPSP. Se ha informado previamente que es posible aislar *C. perfringens* a partir de colonias blancas (atípicas) en este medio de cultivo (Morera *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2002), pero en el presente estudio no se presentó esta situación. Sin embargo, de un total de 31 colonias negras analizadas, 2 colonias (6.5%) no correspondieron con la identificación bioquímica de *C. perfringens*, lo que confirma la necesidad de realizar una identificación bioquímica de las colonias aisladas.

2. Enterotoxigenicidad de las cepas de *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens ha sido implicado en la diarrea asociada a antibióticos desde el año 1984, cuando se detectó su enterotoxina en 11 pacientes con diarrea, luego de la administración de antibióticos (Borriello *et al.*, 1984). Aún hoy, la diarrea asociada a antibióticos continúa siendo un problema de índole nosocomial tanto en los países desarrollados como en los países del tercer mundo (Abraham *et al.*, 2001).

Los estudios previos donde se evidencia esta bacteria como agente causal de la diarrea asociada a antibióticos estiman que su relevancia ha ido en aumento y que consiste en un 2-15% de todos los casos (Asha y Wilcox, 2002). Sin embargo, la literatura carece de estudios suficientes acerca de la prevalencia de la enterotoxina de *C. perfringens* (CPE) en los casos de diarrea asociada a antibióticos.

A pesar de que la cantidad de cepas enterotoxigénicas encontradas en este estudio es baja (6,9% de las cepas, lo que corresponde a 1,9% del total de muestras analizadas), este dato coincide con investigaciones similares realizadas en otros países. Por ejemplo, el trabajo de Tompkins *et al.* revela que 114 muestras de 2871 pacientes dieron un resultado positivo en la determinación de la enterotoxina (CPE) de *C. perfringens* utilizando el método de RPLA, lo que corresponde a un 4% de positividad (Tompkins *et al.*, 1999). Otros estudios informan de porcentajes de positividad de enterotoxina en muestras fecales que varían entre 3.5 y 18% (Samuel *et al.*, 1991; Brett *et al.*, 1992; Mpamugo *et al.*, 1995; Fach y Popoff, 1997).

En nuestro país, los estudios en alimentos informan de un 15% de positividad por cepas enterotoxigénicas, a partir de 81 muestras de carne analizadas (Gutiérrez *et al.*, 1999). Sin embargo, en la literatura nacional no hay antecedentes que informen sobre el porcentaje de positividad asociado a diarreas nosocomiales.

Abrahamo *et al.* informan de un 6.4% de positividad en cuanto a la enterotoxina de *C. perfringens* utilizando un inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) con anticuerpos policlonales específicos para CPE (Abrahamo *et al.*, 2001).

Más recientemente, en el trabajo realizado por Asha *et al.* en Inglaterra se concluye que un 8% de las muestras fecales analizadas eran positivas por la enterotoxina (CPE), utilizando un método de ELISA (Asha *et al.*, 2002). Todos estos resultados son muy similares a los obtenidos en el presente estudio (6.9%), lo que confirma el hallazgo de *C. perfringens* como agente etiológico de diarrea nosocomial en el 1.9% de las muestras.

En la literatura, es posible encontrar diferentes resultados en la detección de CPE, diferencias que podrían deberse a la modificación estructural de la toxina o a ciertos factores del hospedero, lo que provocaría que la toxina no sea capturada en el inmunoensayo (Asha *et al.*, 2002). Uno de estos casos discordantes es el estudio de Samuel *et al.*, donde solamente un 3.5% de las muestras dieron positivas para la enterotoxina (Samuel *et al.*, 1991).

En contraposición a esto se encuentra el estudio de Mpamugo *et al.*, donde la positividad en la detección de la enterotoxina alcanza un 18%. Sin embargo, muchos de estos casos positivos no tenían ninguna asociación con un tratamiento con antibióticos y además en muchos de los casos la diarrea no era de origen nosocomial (Mpamugo *et al.*, 1995).

En el presente estudio, cabe rescatar que un número bajo de cepas enterotoxigénicas (2 de 29) puede deberse a que en los aislamientos realizados hayan tanto colonias bacterianas enterotoxigénicas como colonias no enterotoxigénicas, y por azar se hayan tomado colonias no enterotoxigénicas para realizar esta investigación. Por esta razón y debido a que *C. perfringens* es un habitante normal del intestino, algunos autores recomiendan evaluar varias colonias de un mismo aislamiento, para aumentar así la posibilidad de detectar una cepa productora de la enterotoxina (Asha *et al.*, 2002).

Además, hay que considerar que muchos de los aislamientos negativos por enterotoxina podrían contener el gen respectivo (*cpe*), dando lugar a pacientes que son portadores de *C. perfringens* enterotoxigénico pero en los cuales la enterotoxina no es producida (Asha *et al.*, 2002; Modi y Wilcox, 2001; Vela *et al.* 1999). En estudios posteriores, se podría evaluar la presencia de este gen en las cepas aisladas para confirmar los resultados obtenidos en este estudio.

Dado que la sintomatología de una diarrea causada por *C. difficile* es indistinguible de la causada por *C. perfringens* enterotoxigénico (dolor abdominal, fiebre, heces sanguinolentas, deshidratación, leucocitosis e hipoalbuminemia), algunos autores informan de la necesidad de evaluar primero la presencia de toxinas de *C. difficile*, dada su mayor prevalencia, y luego continuar con el estudio de patógenos entéricos como *C. perfringens* (Abrahamo, 2001; Högenauer, 1998; Beaugerie y Petit, 2004).

En un estudio previo con estas mismas muestras, se determinó una frecuencia de *C. difficile* en 33.6% de las muestras (Alvarado y Ramírez, 2003). Luego de una comparación de ambos estudios, se determinó que en 9 muestras (8.7%) estaban presentes tanto *C. difficile* como *C. perfringens*, mientras que en 20 muestras (19,2%) sólo se aisló *C. perfringens*.

Según se informa en la literatura, una cepa enterotoxigénica de *C. perfringens* sólo puede considerarse como causante de la diarrea cuando la muestra ha resultado negativa para las pruebas de ELISA o cultivo celular para *C. difficile* (Högenauer, 1998; Fekety, 1997). En el presente estudio, las dos muestras de heces que contenían cepas de *C. perfringens* enterotoxigénicas (1,9%) no poseían *C. difficile*, por lo que puede suponerse que en estos dos casos la diarrea fue causada por una cepa de *C. perfringens* enterotoxigénica.

Este estudio evidencia, al igual que algunas investigaciones realizadas en otros países, que la incidencia de la diarrea asociada a antibióticos debida a *C. perfringens* enterotoxigénico es bastante baja, pero es un problema potencial en los centros hospitalarios de nuestro país, sobretodo en los que atienden a pacientes de edades avanzadas que han sufrido una diarrea luego de un tratamiento prolongado con antibióticos (cefalosporinas, clindamicinas o penicilinas de amplio espectro), ya que la edad y la duración del tratamiento son los mayores factores de riesgo en esta patología (Bignardi, 1998; Spencer, 1998; Wiström *et al.*, 2001).

También, fue posible demostrar que el tiempo de incubación del medio Duncan-Strong modificado (3 días como máximo) es crítico en la prueba de detección de la enterotoxina de *C. perfringens*. Esto debido a que las 2 cepas que fueron positivas a los tres días dieron resultados negativos a los cinco días de incubación. Probablemente la enterotoxina (CPE) sea proteolizada por otros productos del metabolismo de la bacteria cuando se realizan incubaciones de más de 3 días, obteniendo falsos negativos.

A pesar que el método de aglutinación pasiva reversa en látex (RPLA) ha sido utilizado en la investigación de casos de diarrea esporádica, pues es una técnica sensible, reproducible y de diagnóstico rápido (Fach y Popoff, 1997; Modi y Wilcox, 2001), algunos autores han informado ciertos problemas con la especificidad de esta prueba. Por ejemplo, la utilización de métodos inmunológicos requiere de la esporulación *in vitro* para obtener niveles detectables de CPE, y debido a la pobre esporulación de *C. perfringens* en medios de cultivo, consideran que los resultados pueden ser insatisfactorios (Fach y Popoff, 1997; Forward *et al.*, 2003).

Además, se ha informado de la posibilidad de reacciones no específicas con materia fecal, a pesar de la sensibilidad y especificidad del método (Modi y Wilcox, 2001; Asha y Wilcox, 2002).

En cuanto a esta metodología de trabajo, se ha observado que la detección de la enterotoxina CPE por el método de inmunoensayo enzimático es menos confiable en la detección de la enfermedad asociada a la enterotoxina, en comparación con otros métodos como el de hibridización (Olsvik *et al.*, 1982). Sin embargo, la sensibilidad del inmunoensayo enzimático (aproximadamente 2 ng/ml) supera a la de otros métodos como el ensayo con células Vero (1 µg/ml) (Forward *et al.*, 2003).

3. Determinación de la Susceptibilidad Antimicrobiana

En el pasado *Clostridium perfringens* tipo A fue descrito como susceptible a penicilina G y otros β -lactámicos así como también a vancomicina, cloranfenicol y clindamicina. Sin embargo, a través del tiempo algunos investigadores han demostrado la existencia de cepas de *C. perfringens* resistentes *in vitro* a penicilina (Marrie *et al.*, 1981; Williamson, 1983), algunos macrólidos y lincosamidas (Kordel y Schallehn, 1984), cloranfenicol y tetraciclinas (Margot, 1984). En el caso de la penicilina, esta información apoya los resultados obtenidos, pues una de las cepas del presente estudio fue resistente.

En el estudio realizado en 1985 por Traub *et al.* se analizaron 106 cepas de *C. perfringens* aisladas de muestras fecales y se determinaron sus concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) contra 23 drogas antimicrobianas; se encontró que todos los aislamientos fueron sensibles a cefotaxima, imipenem, metronidazol y penicilina, entre otros. Además, una de las cepas mostró resistencia a cloranfenicol (Traub *et al.*, 1986). Estos datos coinciden con los hallados en este estudio en lo que a imipenem y cefotaxima se refiere, pues el 100% de las cepas fueron sensibles. Sin embargo, difiere ligeramente en cuanto a los resultados obtenidos para cloranfenicol y metronidazol, pues todas las cepas fueron sensibles para el primero, y se encontraron algunas cepas resistentes para el segundo.

Stevens *et al.* en 1987 encontraron que antibióticos como clindamicina, metronidazol, rifampicina y tetraciclina fueron más efectivos *in vivo* contra diversas cepas de *C. perfringens* que la penicilina; droga que por muchos años fue considerada como el tratamiento de elección. Además en estudios posteriores se demostró que de 24 drogas antimicrobianas probadas contra esta bacteria, imipenem y teicoplanina fueron las drogas que poseen mayor actividad *in vitro* (Traub, 1990).

En estudios más recientes, Wexler *et al.* (2001) encontraron que todas las cepas de *Clostridium* analizadas fueron sensibles a imipenem y metronidazol; además un 9% de las cepas mostraron resistencia hacia clindamicina lo que concuerda con lo obtenido en otros estudios realizados (Hecht *et al.*, 1999). Otros investigadores han determinado la concentración mínima inhibitoria 90 (MIC 90) de diversas cepas de *C. perfringens* y han demostrado su sensibilidad hacia vancomicina, clindamicina, metronidazol, imipenem, penicilina y ampicilina (Goldstein *et al.*, 2003; Finegold *et al.*, 2004; Citron *et al.*, 2005).

Los resultados de susceptibilidad a antibióticos obtenidos en este estudio concuerdan con los datos obtenidos por estos investigadores en el pasado, debido a que un 100% de las cepas analizadas (figura 2) mostraron susceptibilidad hacia imipenem, cefotaxima y cloranfenicol. Además se encontró una cepa resistente a penicilina, lo que representa un 3.5% de resistencia hacia este antibiótico (cuadro 9).

Sin embargo, a diferencia de lo descrito en la literatura, en esta investigación se logró encontrar un 10.3 % de resistencia a metronidazol (cuadro 9), lo cual puede explicarse debido al amplio uso que se da a este antibiótico en nuestro país, pues tradicionalmente ha sido empleado como uno de los tratamientos de elección para infecciones por bacterias anaerobias.

No se encontraron cepas con multiresistencia a drogas y no se observó diferencia en la susceptibilidad antimicrobiana entre las dos cepas enterotoxigénicas y las demás cepas no enterotoxigénicas.

Aunque en términos generales la resistencia antimicrobiana de las cepas analizadas puede considerarse baja, su determinación ha permitido evidenciar que este fenómeno tan manifiesto en otros grupos bacterianos, también abarca al grupo *Clostridium* y específicamente a *C. perfringens*.

La estandarización de la prueba de dilución en agar en este laboratorio fue exitosa, lo cual se refleja en los datos obtenidos mediante la prueba, incluyendo los alcanzados con las cepas control, los cuales fueron satisfactorios además de reproducibles. Sin embargo, se debe de tomar en cuenta que esta prueba no es conveniente para evaluar aislamientos individuales, por lo que no es recomendada como prueba de rutina en un laboratorio clínico (NCCLS, 1997; Dubreuil L *et al.*, 1999; Mahon *et al.*, 2000).

Según el NCCLS la prueba de dilución en agar es el estándar de oro para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana. Aunque existen otras pruebas que pueden ser utilizadas, se debe tomar en cuenta que según se ha descrito existe una baja comparabilidad entre los distintos métodos que se pueden emplear (NCCLS, 1997).

La baja comparabilidad obtenida entre diferentes métodos puede deberse a que los efectos bactericidas de los agentes antimicrobianos pueden variar notablemente según las concentraciones de los antibióticos, la densidad del inóculo y la disponibilidad de nutrientes. Además existe evidencia que apoya la hipótesis de que el crecimiento bacteriano sobre una superficie es significativamente diferente al crecimiento bacteriano en un medio líquido, diferencias que incluyen, la tasa de crecimiento, la adherencia, la

susceptibilidad antimicrobiana y diferencias en las características bioquímicas y de producción de metabolitos de las bacterias (Benning y Mathers, 1999).

Se ha descrito en la literatura que el ATB ANA[®] es un método muy conveniente para determinar la susceptibilidad a antibióticos de bacterias anaerobias. Se ha informado que los resultados obtenidos utilizando el ATB ANA[®] poseen una buena correlación con los obtenidos mediante el método de referencia. La literatura informa de un estudio donde se analizó la susceptibilidad antimicrobiana de 200 anaerobios aislados de muestras clínicas, comparando los resultados obtenidos mediante el método de dilución en agar y el ATB ANA[®]; ellos encontraron un 98.7% de correlación entre ambos métodos y un 94.9% de analogía en las categorías clínicas (resistente, sensible o intermedio) reportadas para las cepas analizadas. Además los niveles de errores significativos y muy significativos obtenidos con el ATB ANA[®] son del 0.5% y el 0.8% y el nivel de reproducibilidad global es de 99% (Dubreuil *et al.*, 1999).

Sin embargo, los datos obtenidos con la prueba ATB ANA[®] en este estudio difieren con lo descrito anteriormente en la literatura debido a que no fueron reproducibles, como puede observarse en los cuadros 8a-8d, por lo tanto la interpretación de la susceptibilidad antimicrobiana obtenida para estas cepas utilizando esta prueba no pudo realizarse.

Las razones por las cuales se obtuvieron resultados discrepantes no son muy claras, podría deberse al transporte y almacenamiento (el cual debe ser a 2-8°C en oscuridad) de los dispositivos antes de llegar al laboratorio, defectos en su fabricación o inestabilidad de sus componentes. Se recomienda realizar estudios ulteriores, para evaluar de una forma más detallada esta prueba, controlando todas las variables, desde su fabricación hasta su llegada al laboratorio. Además la casa comercial debería incluir más cepas control, quizá con mayor resistencia, pues el perfil de *Bacteroides fragilis* es muy susceptible.

Debido al éxito obtenido en la estandarización de la prueba de dilución en agar se recomienda realizar dicha prueba en los laboratorios de investigación en los cuales se trabaje con susceptibilidad a antibióticos para bacterias anaerobias, para garantizar que los datos que brinden sean confiables. Su realización es de suma importancia para controlar las pruebas rápidas que utilicen para dicha determinación ya que, como se demostró en este estudio, los resultados obtenidos mediante estos métodos no siempre son del todo adecuados ni reproducibles.

VII. Conclusiones

1. En el presente estudio fue posible aislar e identificar 29 cepas de *Clostridium perfringens* a partir de 104 muestras diarreicas provenientes del Hospital San Juan de Dios, lo que corresponde a una frecuencia de 27,8%.
2. Del total de aislamientos, solamente 2 cepas resultaron positivas en la detección de la enterotoxina CPE (6.9%).
3. *C. perfringens* puede ser considerado como agente etiológico de la diarrea nosocomial en el 1,9% de las muestras; en el resto, debe ser considerado como parte de la flora normal.
4. La estandarización de la prueba de dilución en agar, técnica de referencia para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana, fue satisfactoria, por lo que se recomienda su utilización para evaluar los resultados obtenidos mediante otros métodos en este laboratorio y otros laboratorios especializados del país.
5. Los resultados obtenidos para los agentes antimicrobianos probados utilizando el método de dilución en agar fueron similares a los publicados por otros investigadores. Se demostró la sensibilidad de *C. perfringens* a imipenem, cefotaxima y cloranfenicol. Además se obtuvo un 96.5% de susceptibilidad a penicilina y un 89.7% de susceptibilidad a metronidazol.
6. Los resultados obtenidos mediante el ATB ANA[®] no fueron reproducibles y por lo tanto no interpretables por lo que la comparación con el método de dilución en agar no pudo ser realizada.

VIII. Cuadros

Cuadro 1. Puntos de quiebra para interpretar la MIC y ámbitos aceptados para las cepas control^a.

Agente antimicrobiano	Punto de quiebra ^c	MIC (µg/ml)		
		<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC 29741	<i>Eubacterium lentum</i> ATCC 43055
Amoxicilina-clavulanato	8/4	0.25-1	0.5-2	NR ^b
Ampicilina	4	16-64	16-64	
Ampicilina-sulbactam	16/8	0.5-2	0.5-2	0.25-2
Cefamandol	16	32-128	32-128	
Cefmetazol	32	8-32	32-128	4-16
Cefoperazona	32	32-128	32-128	32-128
Cefotaxima	32	8-32	16-64	64-256
Cefotetán	32	4-16	32-128	32-128
Cefoxitina	32	4-16	8-32	4-16
Ceftriaxona	32	32-128	64-256	NR
Cloranfenicol	16	2-8	4-16	
Clindamicina	4	0.5-2	2-8	0.06-0.25
Imipenem	8	0.03-0.125	0.06-0.25	0.25-1
Meropenem	8	0.06-0.25	0.125-0.5	0.125-0.5
Metronidazol	16	0.25-1	0.5-2	
Mezlocilina	64	16-64	8-32	8-32
Moxalactam	32	0.25-1	4-16	64-256
Penicilina	4	8-32	8-32	
Piperacilina	64	2-8	8-32	8-32
Piperacilina-tazobactam	64/4	0.125/4-0.5/4	4/4-16/4	4/4-16/4
Tetraciclina	8	0.125-0.5	8-32	
Ticarcilina	64	16-64	16-64	16-64
Ticarcilina-clavulanato	64/2	NR	0.5-2	16-64

^aTomado del NCCLS, 1997. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria, cuarta edición. Approved Standard M11-A4.

^bNR: indica que no hay MIC recomendada para esta combinación microorganismo/antibiótico.

^cLos microorganismos que presentan MIC's menores al punto de quiebra son considerados susceptibles, si la MIC es mayor al punto de quiebra son considerados resistentes y los organismos que muestran MIC's iguales al puntos de quiebra son considerados como intermedios para el agente antimicrobiano que se está probando.

Cuadro 2. Resultados esperados después de 24 horas de incubación para la cepa control* de la prueba ATB ANA®.**

Antibiótico	Concentración (mg/l)	Resultado
Penicilina	0.5-2	R
Amoxicilina-ácido clavulánico	4/2-8/4	S
Piperacilina	32-64	S
Piperacilina + tazobactam	32/4-64/4	S
Ticarcilina-ácido clavulánico	32/2-64/2	S
Cefoxitina	16-32	S
Cefotetan	16-32	S
Imipenem	4-8	S
Clindamicina	2-4	S
Cloranfenicol	8-16	S
Metronidazol	8-16	S
Amoxicilina	2-4	R
Amoxicilina	16	S/R
Amoxicilina-ácido clavulánico	16/2	S
Ticarcilina	64	S
Metronidazol	4	S

* Control de calidad: *Bacteroides fragilis* ATCC 25285.

** Fuente: manual de procedimientos de la prueba ATB ANA, de la casa comercial bioMérieux®

Cuadro 3. Susceptibilidad a Cloranfenicol utilizando la prueba de dilución en agar para las cepas de *Clostridium perfringens* aisladas de diarreas nosocomiales del HSJD.

Cepa	MIC (µg/ml)	Interpretación
25285	4	S
29741	4	S
CP-2	≤2	S
CP-9	≤2	S
CP-11	≤2	S
CP-17	≤2	S
CP-19	≤2	S
CP-21	≤2	S
CP-24	≤2	S
CP-26	≤2	S
CP-28	≤2	S
CP-29	4	S
CP-31	≤2	S
CP-32	≤2	S
CP-34	≤2	S
CP-35	≤2	S
CP-39	4	S
CP-40	4	S
CP-42	4	S
CP-44	4	S
CP-49	≤2	S
CP-51	≤2	S
CP-52	≤2	S
CP-53	≤2	S
CP-54	8	S
CP-63	4	S
CP-64	≤2	S
CP-73	≤2	S
CP-76	≤2	S
CP-78	4	S
CP-93	4	S

Cuadro 4. Susceptibilidad a Metronidazol utilizando la prueba de dilución en agar para las cepas de *Clostridium perfringens* aisladas de diarreas nosocomiales del HSJD.

Cepa	MIC (µg/ml)	Interpretación
25285	≤2	S
29741	≤2	S
CP-2	≤2	S
CP-9	≤2	S
CP-11	≤2	S
CP-17	≤2	S
CP-19	≤2	S
CP-21	≤2	S
CP-24	4	S
CP-26	≤2	S
CP-28	>512	R
CP-29	≤2	S
CP-31	≤2	S
CP-32	≤2	S
CP-34	≤2	S
CP-35	≤2	S
CP-39	≤2	S
CP-40	≤2	S
CP-42	4	S
CP-44	512	R
CP-49	≤2	S
CP-51	≤2	S
CP-52	≤2	S
CP-53	≤2	S
CP-54	512	R
CP-63	≤2	S
CP-64	≤2	S
CP-73	≤2	S
CP-76	≤2	S
CP-78	≤2	S
CP-93	4	S

Cuadro 5. Susceptibilidad a Imipenem utilizando la prueba de dilución en agar para las cepas de *Clostridium perfringens* aisladas de diarreas nosocomiales del HSJD.

Cepa	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Interpretación
25285	≤ 2	S
29741	≤ 2	S
CP-2	≤ 2	S
CP-9	≤ 2	S
CP-11	≤ 2	S
CP-17	≤ 2	S
CP-19	≤ 2	S
CP-21	≤ 2	S
CP-24	≤ 2	S
CP-26	≤ 2	S
CP-28	≤ 2	S
CP-29	≤ 2	S
CP-31	≤ 2	S
CP-32	≤ 2	S
CP-34	≤ 2	S
CP-35	≤ 2	S
CP-39	≤ 2	S
CP-40	≤ 2	S
CP-42	≤ 2	S
CP-44	≤ 2	S
CP-49	≤ 2	S
CP-51	≤ 2	S
CP-52	≤ 2	S
CP-53	≤ 2	S
CP-54	≤ 2	S
CP-63	≤ 2	S
CP-64	≤ 2	S
CP-73	≤ 2	S
CP-76	≤ 2	S
CP-78	≤ 2	S
CP-93	≤ 2	S

Cuadro 6. Susceptibilidad a Penicilina utilizando la prueba de dilución en agar para las cepas de *Clostridium perfringens* aisladas de diarreas nosocomiales del HSJD.

Cepa	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Interpretación
25285	32	R
29741	16	R
CP-2	≤ 1	S
CP-9	≤ 1	S
CP-11	≤ 1	S
CP-17	≤ 1	S
CP-19	≤ 1	S
CP-21	≤ 1	S
CP-24	≤ 1	S
CP-26	≤ 1	S
CP-28	≤ 1	S
CP-29	≤ 1	S
CP-31	≤ 1	S
CP-32	≤ 1	S
CP-34	≤ 1	S
CP-35	≤ 1	S
CP-39	≤ 1	S
CP-40	≤ 1	S
CP-42	≤ 1	S
CP-44	≤ 1	S
CP-49	≤ 1	S
CP-51	≤ 1	S
CP-52	≤ 1	S
CP-53	≤ 1	S
CP-54	≤ 1	S
CP-63	≤ 1	S
CP-64	≤ 1	S
CP-73	≤ 1	S
CP-76	16	R
CP-78	≤ 1	S
CP-93	≤ 1	S

Cuadro 7. Susceptibilidad a Cefotaxima utilizando la prueba de dilución en agar para las cepas de *Clostridium perfringens* aisladas de diarreas nosocomiales del HSJD.

Cepa	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Interpretación
25285	32	I
29741	32	I
43055	64	R
CP-2	≤ 8	S
CP-9	≤ 8	S
CP-11	≤ 8	S
CP-17	≤ 8	S
CP-19	≤ 8	S
CP-21	≤ 8	S
CP-24	≤ 8	S
CP-26	≤ 8	S
CP-28	≤ 8	S
CP-29	≤ 8	S
CP-31	≤ 8	S
CP-32	≤ 8	S
CP-34	≤ 8	S
CP-35	≤ 8	S
CP-39	≤ 8	S
CP-40	≤ 8	S
CP-42	≤ 8	S
CP-44	≤ 8	S
CP-49	≤ 8	S
CP-51	≤ 8	S
CP-52	≤ 8	S
CP-53	≤ 8	S
CP-54	≤ 8	S
CP-63	≤ 8	S
CP-64	≤ 8	S
CP-73	≤ 8	S
CP-76	≤ 8	S
CP-78	≤ 8	S
CP-93	≤ 8	S

Cuadro 8a. Susceptibilidad antimicrobiana obtenida utilizando ATB ANA® para las cepas de *Clostridium perfringens* aisladas de diarreas nosocomiales del HSJD.

Número de cepa	Antibiótico (mg/l)							
	Metronidazol 8-16		Metronidazol 4		Piperacilina 32-64		Piperacilina+ Tazobactam 32/4-64/4	
	1*	2**	1	2	1	2	1	2
Control***	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-2	S	S	R	S	S	S	S	S
CP-9	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-11	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-17	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-19	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-21	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-24	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-26	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-28	R	R	R	R	R	S	S	S
CP-29	S	S	R	S	S	S	S	S
CP-31	R	S	R	S	S	S	S	S
CP-32	S	R	S	R	S	S	S	S
CP-34	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-35	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-39	S	S	R	S	S	S	S	S
CP-40	R	S	R	S	S	S	S	S
CP-42	R	S	R	S	S	S	S	S
CP-44	R	R	R	R	S	S	S	S
CP-49	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-51	R	R	R	R	S	S	S	S
CP-52	R	R	R	R	S	S	S	S
CP-53	R	S	R	S	S	S	S	S
CP-54	R	R	R	R	S	S	S	S
CP-63	S	R	S	R	S	S	S	S
CP-64	R	R	R	R	S	S	S	S
CP-73	R	S	R	S	S	S	S	S
CP-76	R	S	R	S	S	S	S	S
CP-78	R	R	R	R	S	S	S	S
CP-93	R	R	R	R	S	S	S	S

* 1: Primera determinación.

** 2: Segunda determinación.

*** Control de calidad: cepa *Bacteroides fragilis* ATCC 25285.

Cuadro 8b. Susceptibilidad antimicrobiana obtenida utilizando ATB ANA® para las cepas de *Clostridium perfringens* aisladas de diarreas nosocomiales del HSJD.

Número de cepa	Antibiótico (mg/l)							
	Penicilina 0.5-2		Ticarcilina-Ac.clavulánico 32/2-64/2		Ticarcilina 64		Cefoxitina 16-32	
	1*	2**	1	2	1	2	1	2
Control***	R	R	S	S	S	S	S	S
CP-2	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-9	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-11	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-17	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-19	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-21	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-24	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-26	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-28	R	R	S	S	S	S	S	S
CP-29	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-31	R	S	S	S	S	S	I	S
CP-32	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-34	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-35	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-39	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-40	R	S	S	S	S	S	S	S
CP-42	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-44	R	R	S	S	S	S	S	S
CP-49	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-51	R	S	S	S	S	S	S	S
CP-52	R	R	S	R	S	R	S	R
CP-53	R	S	S	S	S	S	S	S
CP-54	R	R	S	R	S	R	R	R
CP-63	S	R	S	I	S	S	S	S
CP-64	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-73	R	S	S	S	S	S	S	S
CP-76	R	S	S	S	S	S	S	S
CP-78	R	I	S	S	S	S	S	R
CP-93	R	S	S	S	S	S	S	R

* 1: Primera determinación.

** 2: Segunda determinación.

*** Control de calidad: cepa *Bacteroides fragilis* ATCC 25285.

Cuadro 8c. Susceptibilidad antimicrobiana obtenida utilizando ATB ANA® para las cepas de *Clostridium perfringens* aisladas de diarreas nosocomiales del HSJD.

Número de cepa	Antibiótico (mg/l)							
	Cefotetan 16-32		Imipenem 4-8		Clindamicina 2-4		Cloranfenicol 8-16	
	1*	2**	1	2	1	2	1	2
Control***	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-2	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-9	S	S	S	S	R	I	S	S
CP-11	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-17	S	S	S	S	R	S	S	S
CP-19	S	S	S	S	R	S	S	S
CP-21	S	S	S	S	I	S	S	S
CP-24	S	S	S	S	I	S	S	S
CP-26	S	S	S	S	R	S	S	S
CP-28	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-29	S	S	S	S	I	I	S	S
CP-31	S	S	S	S	R	S	S	S
CP-32	S	S	S	S	R	S	S	S
CP-34	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-35	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-39	S	S	S	S	R	R	I	S
CP-40	S	S	S	S	R	R	S	S
CP-42	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-44	S	S	S	S	R	S	S	S
CP-49	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-51	S	S	S	S	R	I	R	S
CP-52	S	R	S	S	R	R	R	S
CP-53	S	S	S	S	R	I	R	S
CP-54	R	S	S	S	R	R	R	I
CP-63	S	S	S	S	I	S	S	S
CP-64	S	S	S	S	I	I	S	S
CP-73	S	S	S	S	R	S	I	S
CP-76	S	S	S	S	R	S	R	S
CP-78	S	R	S	S	R	R	R	S
CP-93	S	R	S	S	R	R	R	S

* 1: Primera determinación.

** 2: Segunda determinación.

*** Control de calidad: cepa *Bacteroides fragilis* ATCC 25285.

Cuadro 8d. Susceptibilidad antimicrobiana obtenida utilizando ATB ANA® para las cepas de *Clostridium perfringens* aisladas de diarreas nosocomiales del HSJD.

Número de cepa	Antibiótico (mg/l)							
	Amoxicilina 2-4		Amoxicilina 16		Amoxicilina – Ac. Clavulánico 4/2-8/4		Amoxicilina– Ac. Clavulánico 16/2	
	1*	2**	1	2	1	2	1	2
Control***	R	R	R	R	S	S	S	S
CP-2	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-9	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-11	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-17	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-19	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-21	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-24	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-26	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-28	R	I	R	S	S	S	S	S
CP-29	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-31	I	S	S	S	S	S	S	S
CP-32	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-34	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-35	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-39	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-40	R	S	S	S	S	S	S	S
CP-42	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-44	R	S	S	S	S	S	S	S
CP-49	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-51	R	S	R	S	S	S	S	S
CP-52	R	R	S	R	S	R	S	R
CP-53	R	S	R	S	S	S	S	S
CP-54	R	R	S	S	S	R	S	R
CP-63	S	R	S	S	S	S	S	S
CP-64	S	S	S	S	S	S	S	S
CP-73	R	S	R	S	S	S	S	S
CP-76	R	S	R	S	S	S	S	S
CP-78	R	S	R	S	S	S	S	S
CP-93	R	S	R	S	S	S	S	S

* 1: Primera determinación.

** 2: Segunda determinación.

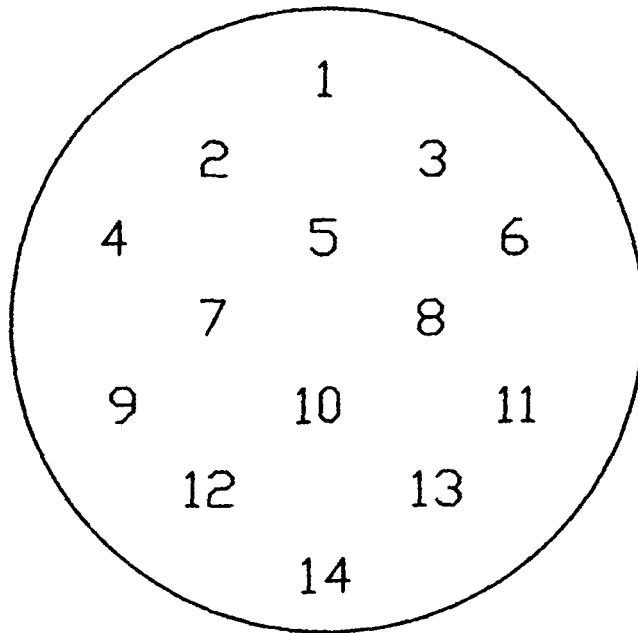
*** Control de calidad: cepa *Bacteroides fragilis* ATCC 25285.

Cuadro 9. Porcentajes de susceptibilidad y resistencia obtenidos utilizando la prueba de dilución en agar para las cepas de *Clostridium perfringens* aisladas de diarreas nosocomiales del HSJD.

Antibiótico	Cepas resistentes (%)	Cepas sensibles (%)
Cefotaxima	0	100
Cloranfenicol	0	100
Imipenem	0	100
Penicilina	3.5	96.5
Metronidazol	10.3	89.7

IX. Figuras

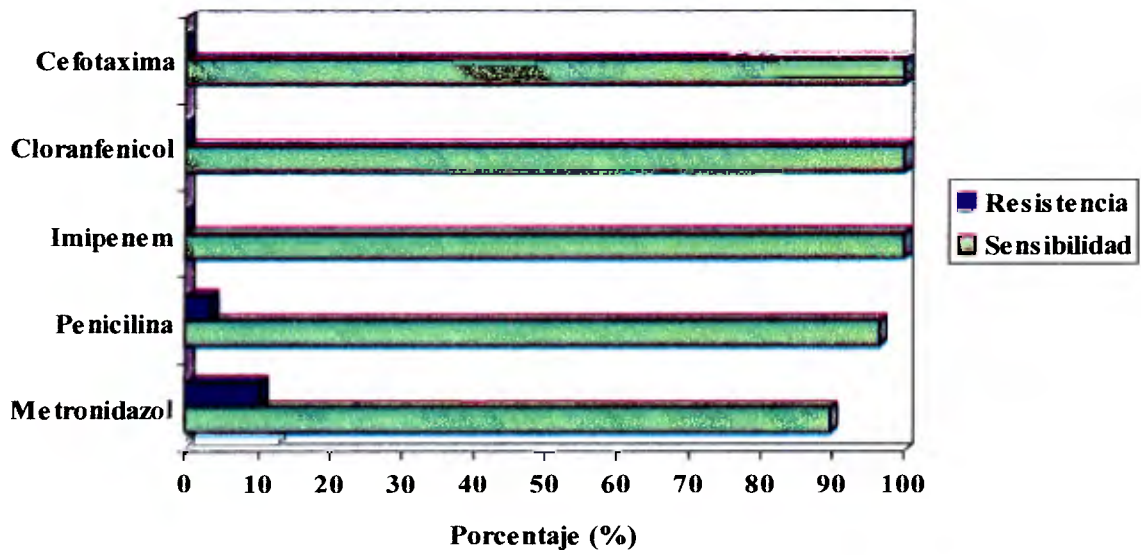
Figura 1



Esquema de la distribución de los inóculos en la placa de Petri.

Figura 2

Porcentajes de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana obtenidos utilizando la prueba de dilución en agar para las cepas de *C. perfringens* aisladas de diarreas nosocomiales del HSJD.



Referencias

- Abraham C., Carman R.J., Hahn H., Liesenfeld O. 2001. *Similar frequency of detection of Clostridium perfringens enterotoxin and Clostridium difficile toxins in patients with Antibiotic-Associated Diarrhea*. European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases. 20: 676-677.
- Allen S., Emery C., Siders J. 1999. *Clostridium*. En *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press. Washington, D.C. 7ª Edición. pp. 654-671.
- Alvarado Y., Ramírez A. 2003. *Importancia de Clostridium difficile en diarreas nosocomiales en el Hospital San Juan de Dios*. Tesis, San José, U.C.R.
- Asha N.J., Wilcox M.H. 2002. *Laboratory diagnosis of Clostridium perfringens antibiotic-associated diarrhoea*. Journal of Medical Microbiology. 51: 891-894.
- Bartlett J. 2002. *Antibiotic-associated diarrhea*. The New England Journal of Medicine. 346: 334-339.
- Beaugerie L., Flahault A., Barbut F., Atlan P., Lalande V., Cousin P., Cadilhac M., Petit J. 2003. *Antibiotic-associated diarrhoea and Clostridium difficile in the community*. Alimentary Pharmacology & Therapeutics. 17: 905-912.
- Beaugerie L., Petit J. 2004. *Antibiotic-associated diarrhoea*. Clinical Gastroenterology. 18: 337-352.
- Benning V., Mathers J. 1999. *Comparasion of agar dilution and broth microdilution methods of anaerobic antimicrobial susceptibility testing using several veterinary antibiotics against Clostridium perfringens strains originating from porcine and avian sources*. Anaerobe. 5: 561-569.
- Berkow R., Fletcher A. 1989. *El manual Merck de diagnóstico y terapéutica*. Merck & Co., Inc. Barcelona. 8ª Edición. pp 864-865.

- Bernard J. 1993. *Diagnóstico y tratamientos clínicos por el laboratorio*. Masson. Barcelona. 9ª Edición. pp 554.
- Bignardi G.E. 1998. *Risk factors for Clostridium difficile infection*. Journal of Hospital Infection. 40: 1-15.
- Borriello S.P., Larson H.E., Welch A.R., Barclay F., Stringer M.F., Bartholomew B.A. 1984. *Enterotoxigenic Clostridium perfringens: a possible cause of antibiotic-associated diarrhoea*. Lancet. i: 305-307.
- Brett M.M., Rodhouse J.C., Donovan T.J., Tebbutt G.M., Hutchinson D.N. 1992. *Detection of Clostridium perfringens and its enterotoxin in cases of sporadic diarrhoea*. Journal of Clinical Pathology. 45:609-611.
- Citron D., Kwok Y., Appleman M. 2005. *In vitro activity of oritavancin (LY333328), vancomycin, clindamycin, and metronidazole against Clostridium perfringens, Propionibacterium acnes, and anaerobic Gram-positive cocci*. Anaerobe. 11:93-95.
- Collie R., Kokai-Kun J., McClane B. 1998. *Phenotypic characterization of enterotoxigenic Clostridium perfringens isolates from non-foodborne human gastrointestinal diseases*. Anaerobe. 4: 69-79.
- Collie R., McClane B. 1998. *Evidence that enterotoxin gene can be episomal in Clostridium perfringens isolates associated with non-food-borne human gastrointestinal diseases*. Journal of Clinical Microbiology. 36: 30-36.
- Dubreuil L., Houcke I., Singer E. 1999. *Susceptibility testing of anaerobic bacteria: evaluation of the redesigned (version 96) bioMérieux ATB ANA device*. Journal of clinical microbiology. 37: 1824-1828.
- Fach P., Popoff M. 1997. *Detection of Enterotoxigenic Clostridium perfringens in food and fecal samples with a duplex PCR and the slide latex agglutination test*. Applied and Environmental Microbiology. 63: 4232-4236.

Fekety R. 1997. *Guidelines for the diagnosis and management of Clostridium difficile-associated diarrhea and colitis*. American Journal of Gastroenterology. 92: 739-750.

Finegold S., John S., Vu A., Li C., Molitoris D., Song Y., Liu C., Wexler H. 2004. *In vitro activity of ramoplanin and comparator drugs against anaerobic intestinal bacteria from the perspective of potential utility in pathology involving bowel flora*. Anaerobe. 10: 205-211.

Forward L.J., Tompkins D.S., Brett M.M. 2003. *Detection of Clostridium difficile cytotoxin and Clostridium perfringens enterotoxin in cases of diarrhoea in the community*. Journal of Medical Microbiology. 52: 753-757.

Goldstein E., Citron D., Merriam C., Warren Y., Tyrrell K., Fernandez H. 2003. *In vitro activities of daptomycin, vancomycin, quinupristin-dalfopristin, linezolid, and five other antimicrobials against 307 gram-positive anaerobic and 31 Corynebacterium clinical isolates*. Antimicrobials agents and chemotherapy. 47: 337-341.

Gutiérrez A., Gamboa M., Rodríguez E., Arias M.L. 1999. *Presencia de Clostridium perfringens en preparaciones a base de carne en servicios de alimentación pública del cantón central de San José, Costa Rica*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 49: 275-278.

Hatheway C. 1990. *Toxigenic clostridia*. Clinical Microbiology Reviews. 3: 66-98.

Hecht D., Vedantam G., Osmolski J. 1999. *Antibiotic resistance among anaerobes: What does it mean?*. Anaerobe. 5: 421-429.

Högenauer C., Hammer H., Krejs G., Reisinger E. 1998. *Mechanism and management of Antibiotic-Associated Diarrhoea*. Clinical Infectious Diseases. 27:702-710.

Holdeman L., Cato E., Moore W. 1977. *Anaerobe Laboratory Manual*. Virginia Polytechnic Institute and State University Blacksburg.

Kordel M., Schallehn G. 1984. *Plasmid detection in a macrolide-lincosamide-resistant strain of Clostridium perfringens*. FEMS Microbiology Letters. 24: 153-157.

Krakauer T., Fleischer B., Stevens D., McClane B., Stiles B. 1997. *Clostridium perfringens enterotoxin lacks superantigenic activity but induces an interleukin-6 response from human peripheral blood mononuclear cells*. Infection and Immunity. 65: 3485-3488.

Labbé R., Harmon S. 1992. *Clostridium perfringens*. En: Vanderzant M., Splittstoesser V. 1992. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 3rd edition. American Public Health Association.

Larson H., Borriello S. 1988. *Infectious diarrhea due to Clostridium perfringens*. Journal of Infectious Diseases. 157:390-391.

Lukinmaa S., Takkunen E., Siitonen A. 2002. *Molecular epidemiology of Clostridium perfringens related to food-borne outbreaks of disease in Finland from 1984 to 1999*. Applied and Environmental Microbiology. 68: 3744-3749.

Magot M. 1984. *Physical characterization of the Clostridium perfringens tetracycline-chloramphenicol resistance plasmid pIP401*. Annals of Microbiology. 135B: 269-282.

Mahon C., Manuselis G. 2000. *Textbook of diagnostic microbiology*. W.B Saunders Co. Philadelphia. 2^{da} Edición. pp 565-573.

Marrie T., Haldane E., Swantee C., Kerr E. 1981. *Susceptibility of anaerobic bacteria to nine antimicrobial agents and demonstration of decreased susceptibility of Clostridium perfringens to penicillin*. Antimicrobial agents chemotherapy. 19: 51-55.

McClane B. 2000. *Clostridium perfringens enterotoxin and intestinal tight junctions*. Trends in Microbiology. 8: 145-146.

McClane B., Chakrabarti G. 2004. *New insights into the cytotoxic mechanisms of Clostridium perfringens enterotoxin*. Anaerobe. 10: 107-114.

- McClane B., Rood JI. 2001. *Clostridial toxins involved in human enteric and histotoxic infections*. Clostridia: biotechnology and medical applications. Wiley-VCH. Weinheim. pp 169-209.
- Meer R., Songer G., Park D. 1997. *Human disease associated with Clostridium perfringens enterotoxin*. Reviews Environmental Contamination Toxicology. 150: 75-94.
- Modi N., Wilcox M. 2001. *Evidence for antibiotic induced Clostridium perfringens diarrhoea*. Journal of Clinical Pathology. 54:748-751.
- Monge M., Rodríguez E. 1999. *Efecto inhibitorio de Clostridium perfringens sobre C. botulinum en muestras de suelo*. Revista Biomédica. 10: 209-215.
- Morera J., Rodríguez E., Gamboa M.M. 1999. *Determinación de Clostridium perfringens en embutidos de carne de cerdo del Area Metropolitana de Costa Rica*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 49: 279-282.
- Mpamugo O., Donovan T., Brett M.M. 1995. *Enterotoxigenic Clostridium perfringens as a cause of sporadic cases of diarrhoea*. Journal of Medical Microbiology. 43: 442-445.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 1997. *Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; Approved standard, 4ta ed, M11-A3*. Vol.13 No. 26. Wayne , Pennsylvania, USA.
- Olsvik O., Granum P.E., Berdal B.P. 1982. *Detection of Clostridium perfringens type A enterotoxin by ELISA*. Acta of Pathology and Microbiology Scandinavian Section B 90: 445-447.
- Petit L., Gibert M., Popoff M. 1999. *Clostridium perfringens: toxinotype and genotype*. Trends in Microbiology. 7(3): 104-110.

Pituch H., Van den Braak N., Van Belkum A., Van Leeuwen W., Obuch P., Luczak M., Verbrugh H., Meisel F., Martirosian G. 2002. *Characterization of Clostridium perfringens strains isolated from Polish patients with suspected antibiotic-associated diarrhea*. Medical Science Monitoring. 8(3): BR85-BR88.

Prescott L., Klein D., Harley J. 2004. *Microbiología*. McGraw Hill. Madrid. 5ª Edición. pp 873-874.

Rodríguez, E. 1992. *Clostridios mesófilos en tierras de la Meseta Central de Costa Rica*. Tesis, San José, U.C.R.

Rodríguez E., Gamboa M.M., Vargas P. 2002. *Clostridium perfringens en carnes crudas y cocidas y su relación con el ambiente en Costa Rica*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 52: 155-159.

Samuel S.C., Hancock P., Leigh D.A. 1991. *An investigation into Clostridium perfringens enterotoxin-associated diarrhoea*. Journal of Hospital Infection. 18: 219-230.

Sarker M., Carman R., McClane B. 1999. *Inactivation of the gene (cpe) encoding Clostridium perfringens enterotoxin eliminate the ability of two cpe-positive C. perfringens type A human gastrointestinal disease isolates to affect rabbit ileal loops*. Molecular Microbiology. 33: 946-958.

Sarker M., Shivers R., Sparks S., Juneja V., McClane B. 2000. *Comparative experiments to examine the effects of heating on vegetative cells and spores of Clostridium perfringens isolates carrying plasmid genes versus chromosomal enterotoxin genes*. Applied and Environmental Microbiology. 66: 3234-3240.

Schalch B., Bader L., Schau H., Bergmann R., Rometsch A., Maydl G., Kebler S. 2003. *Molecular typing of Clostridium perfringens from a food-borne disease outbreak in a nursing home: ribotyping versus pulsed-field gel electrophoresis*. Journal of Clinical Microbiology. 41: 892-895.

Smedley J.G., Fisher D.J., Sayeed S., Chakrabarti G., McClane B. 2004. *The enteric toxins of Clostridium perfringens*. Reviews in Physiological and Biochemical Pharmacology. 152: 183-204.

Sparks S.G., Carman R., Sarker M., McClane B. 2001. *Genotyping of enterotoxigenic Clostridium perfringens fecal isolates associated with antibiotic-associated diarrhea and food poisoning in North America*. Journal of Clinical Microbiology. 39: 883-888.

Spencer R.C. 1998. *The role of antimicrobial agents in the aetiology of Clostridium difficile-associated disease*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 41: Supplement C, 21-7.

Stevens D., Maier K., Laine B., Mitten J. 1987. *Comparison of clindamycin, rifampicin, tetracycline, metronidazole, and penicillin for efficacy in prevention of experimental gas gangrene due to Clostridium perfringens*. Journal of infection disease. 155: 220-228.

Tompkins D.S., Hudson M.J., Smith H.R. 1999. *A study of infectious intestinal disease in England: microbiological findings in cases and controls*. Community Diseases and Public Health. 2: 108-113.

Traub W., Karthein J., Spohr M. 1986. *Susceptibility of Clostridium perfringens Type A to 23 antimicrobial drugs*. Chemotherapy. 32: 439-455.

Traub W. 1990. *Comparative in vitro bacterial activity of 24 antimicrobial drugs against Clostridium perfringens*. Chemotherapy. 36:127-135.

Uzal F.A., Plumb J.J., Blackall L.L., Kelly W.R. 1997. *PCR detection of Clostridium perfringens producing different toxins in faeces of goats*. Letters in Applied Microbiology. 25: 339-344.

Van Damme-Jongsten M., Rodhouse J., Gilbert R., Notermans S. 1990. *Synthetic DNA probes for detection of enterotoxigenic Clostridium perfringens strains isolated from outbreaks of food poisoning*. Journal of Clinical Microbiology. 28: 131-133.

Vela M., Heredia N., Feng P., García-Alvarado S. 1999. *DNA probe analysis for the carriage of enterotoxigenic Clostridium perfringens in feces of a Mexican subpopulation*. Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases. 35: 101-104.

Wada A., Masuda Y., Fukayama M., Hatakeyama T., Yanagawa Y., Watanabe H., Inamatsu T. 1996. *Nosocomial diarrhoea in the elderly due to enterotoxigenic Clostridium perfringens*. Microbiology and Immunology. 40: 767-771.

Wexler H., Molitoris D., Finegold S. 2001. *In vitro activity of gatifloxacin against 238 strains of anaerobic bacteria*. Anaerobe. 7, 285-289.

Williamson R. 1983. *Resistance of Clostridium perfringens to B-lactam antibiotics mediated by a decreased affinity of a single essential penicillin-binding protein*. Journal gen. Microbiology. 129: 2339-2342.

Wiström J., Norrby S.R., Myhre E., Eriksson S., Granström G., Lagergren L., Englund G., Nord C., Svenungsson B. 2001. *Frequency of antibiotic-associated diarrhoea in 2462 antibiotic-treated hospitalized patients: a prospective study*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 47: 43-50.

Wrigley D. 2004. *Inhibition of Clostridium perfringens sporulation by Bacteroides fragilis and short-chain fatty acids*. Anaerobe. 10: 295-300.