

2ej
93



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

**TECNICAS RAPIDAS EN
LA IDENTIFICACION DE
ANAEROBIOS PATOGENOS.**

**TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
Químico Farmacéutico Biólogo
P R E S E N T A:
Elena Guadalupe Peláez Alonso**

1986



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

Introducción.....	1
I Generalidades	
Antecedentes.....	1
Microorganismos anaerobios	
a) Definición.....	6
b) Anaerobios como flora normal.....	6
c) Patogénesis.....	9
d) Factores de virulencia.....	10
e) Mecanismos sinérgicos.....	12
f) Alteración de las defensas del huésped.....	13
Incidencia de las infecciones anaeróbicas.....	14
a) <u>Bacteroides</u>	15
b) <u>Fusobacterium</u>	17
c) Cocos Gram positivos.....	18
d) <u>Clostridium</u>	19
e) <u>Veillonella</u>	21
Clasificación serológica	
a) <u>Bacteroides</u>	22
b) <u>Fusobacterium</u>	24
c) Cocos anaerobios Gram positivos.....	25
d) <u>Clostridium</u>	27
Diagnósticos de laboratorio.....	30
a) Examen directo.....	31
b) Técnicas de cultivo anaerobio.....	33
c) Medios de cultivo.....	33
d) Observación de cultivos y aislamiento.....	35
e) Identificación presuntiva.....	36
f) Identificación definitiva.....	36
II Identificación por inmunofluorescencia.....	39
Aplicación en el diagnóstico de anaerobios.....	43

III	Identificación por Contraimmunoelectroforesis.....	55
	Aplicación en el diagnóstico de anaerobios.....	59
IV	Identificación por ensayo inmunoenzimático.....	65
	a) Conjugación del anticuerpo con la enzima.....	69
	b) Enzimas.....	72
	c) Reacción antígeno-anticuerpo.....	74
	d) Fijación a la fase sólida.....	75
	Aplicación en el diagnóstico de anaerobios.....	77
V	Identificación por cromatografía.....	85
	a) Cromatografía en columna.....	87
	b) Cromatografía en capa fina.....	88
	c) Cromatografía en papel.....	89
	d) Cromatografía de gases.....	90
	e) Cromatografía de gases de espacio de cabeza (HSGC)...	100
	Aplicación en el diagnóstico de anaerobios.....	102
	a) Análisis directo sin extracción previa.....	103
	b) Análisis de muestras extraídas con disolventes.....	104
	c) Análisis por la técnica de HSGC.....	111
	d) Análisis por cromatografía en papel y capa fina.....	115
VI	Discusión.....	116
	Conclusiones.....	120
	Bibliografía.....	123

I N T R O D U C C I O N

El estudio sistemático de las bacterias anaerobias se inició alrededor de los años sesenta, gracias a los avances en los procedimientos de aislamiento e identificación de estos microorganismos.

El desarrollo de métodos simplificados como la jarra anaeróbica y reactivos generadores de gas, ha hecho accesible el cultivo de estas bacterias a un mayor número de laboratorios. Esto último ha hecho posible que actualmente exista un mayor conocimiento acerca del papel de los microorganismos anaerobios en las enfermedades humanas.

También ha contribuido a este progreso la simplificación de los esquemas taxonómicos de este grupo de bacterias y la introducción de agentes terapéuticos eficaces en el manejo de las enfermedades causadas por ellas.

Varias investigaciones retrospectivas recientes establecen la importancia y frecuencia de las bacterias anaerobias como patógenos en numerosas enfermedades en el hombre. Su identificación en estos casos es importante por la alta morbilidad y mortalidad asociada a estas infecciones y porque la terapia antibiótica empleada en algunas de ellas es diferente a la que se instala para aquéllas en las que están involucrados aerobios o facultativos.

Además, el tratamiento antibiótico específico solo es eficaz si se administra en etapas tempranas de la enfermedad, ya que un retardo en el inicio de éste se traduce en un curso prolongado y se ha asociado a un alto índice de mortalidad.

Se ha hecho esencial adaptar técnicas para un diagnóstico preliminar, de

bido a una necesidad mayor de guiar la selección del antibiótico para el tratamiento, puesto que la resistencia a diversos agentes antimicrobianos es cada vez más común, sobretodo en especies de Bacteroides y Clostridium.

Por ser microorganismos exigentes en los requerimientos para su desarrollo y de crecimiento lento en cultivo, las técnicas de aislamiento e identificación convencionales emplean mucho tiempo antes de que pueda darse un resultado definitivo.

Actualmente se han desarrollado técnicas rápidas de identificación, algunas de ellas se utilizan como pruebas presuntivas, teniendo una correlación aceptable con los procedimientos de referencia.

Los métodos utilizados para el análisis directo o a partir las muestras clínicas, detectan antígenos solubles o de superficie de las bacterias o productos de su metabolismo.

Las técnicas inmunológicas que se han aplicado son la inmunofluorescencia, el ensayo inmunoenzimático y la contraelectroforesis.

La cromatografía gas-líquido, principalmente, se ha empleado para la detección de ácidos grasos volátiles y no volátiles producidos por los anaerobios.

Los datos que se obtienen al analizar directamente una muestra clínica, son útiles sobre todo en los casos en que no pueden recuperarse las bacterias en cultivo debido a que ya se ha comenzado la antibioticoterapia o bien por una colección y transporte deficientes de la muestra.

Algunas de estas técnicas rápidas solo dan información acerca de la presencia de anaerobios; en cambio, otras llegan a la identificación a nivel de género o especie, con lo cual se puede instalar el tratamiento

adecuado. Lo anterior es importante debido a que generalmente los anaerobios están presentes en infecciones mixtas y un retraso en el tratamiento del componente anaeróbico incrementa las posibilidades de riesgo.

Sin embargo, hasta no disponer de un método 100% específico, se recomienda no prescindir del aislamiento e identificación definitiva por medios convencionales. La identificación a nivel de especie es importante para conocer la puerta de entrada de la infección y el pronóstico asociado a ésta.

El objetivo del presente trabajo es revisar los métodos de identificación rápida para la detección de bacterias anaerobias directamente en muestras clínicas y su aplicabilidad en el diagnóstico rápido de las enfermedades causadas por ellas.

I GENERALIDADES

Antecedentes

En 1680, Leeuwenhoek comunicó a Thomas Gale la observación de que ciertos microorganismos podían existir en ausencia de aire. Sin embargo, se atribuye a Pasteur el descubrimiento de los anaerobios cuando observó que la fermentación butírica ocurría en ausencia de oxígeno.

Dos desarrollos de importancia médica siguieron al descubrimiento de Pasteur: Lister revolucionó la cirugía al introducir métodos antisépticos y por otro lado, se apreció el potencial patogénico de estos microorganismos cuando en 1897, Veillon y Zuber aislaron bacterias anaerobias de pacientes con supuración fétida. (143)

Para fines del siglo XIX, se habían descubierto la mayor parte de especies de Clostridium y algunos de los anaerobios no formadores de esporas, incluyendo a Bacteroides y Fusobacterium.

Durante las dos guerras mundiales, se estudió de manera especial al género Clostridium por la alta frecuencia de enfermedades asociadas, que surgieron en esa época y que se consideran de origen exógeno generalmente.

A partir de los años sesenta se puso énfasis en el estudio de los anaerobios no esporulados, lo que ha llevado a revolucionar los criterios establecidos reconociendo la importancia de las enfermedades causadas por estos microorganismos, que son de origen endógeno principalmente. (236)

Las enfermedades producidas por bacterias anaerobias son bastante comunes y pueden comprometer virtualmente cualquier órgano del cuerpo si las condiciones son adecuadas; sin embargo, han sido las más frecuente

	Incidencia (%)
Bacteremia.....	20
Absceso cerebral.....	89
Empiema subdural o extradural.....	10
Sinusitis crónica.....	52
Otitis media crónica.....	56
Infección postquirúrgica en cabeza y cuello.....	95
Infecciones orofaciales de origen dental.....	94
Infecciones por mordeduras de animales o humanas....	47
Pneumonía por aspiración.....	93
Absceso pulmonar.....	93
Bronquiectasis.....	76
Empiema no quirúrgico.....	62
Infección intraabdominal postquirúrgica.....	93
Infección en heridas después de cirugía abdominal...45	
Apendicitis con peritonitis.....	96
Absceso hepático.....	52
Tracto biliar.....	41
Absceso pélvico.....	83
Absceso vulvovaginal.....	75
Aborto séptico.....	67
Enfermedad pélvica inflamatoria.....	25
Celulitis crepitante.....	75
Pie diabético.....	75
Abscesos en tejidos blandos.....	60
Abscesos cutáneos.....	63
Osteomielitis.....	40
Ulcera del decúbito con bacteremia.....	63

Tabla 1. Incidencia de anaerobios en infecciones
 Tomado de Citron, D.M., Finegold, S.M. and Sutter, V.L.,
 "WADSWORTH ANAEROBIC BACTERIOLOGY MANUAL" 3rd edition
 St. Louis C.V. Mosby 1980 (31)

mente pasadas por alto. (Tabla 1)

Lo anterior puede explicarse si se tiene en cuenta que los procedimientos para aislar e identificar a los microorganismos anaerobios consumen gran cantidad de tiempo y son difíciles de llevar a cabo. Otra dificultad reside en que generalmente se trata de infecciones mixtas, de las que pueden aislarse incluso hasta seis u ocho microorganismos. En este caso, los anaerobios pueden pasar desapercibidos, a no ser que la observación directa del espécimen se haga como control de las técnicas de aislamiento.

En los últimos años, ha habido un mayor reconocimiento de las infecciones endógenas. Existen dos explicaciones probables: una es el desarrollo y simplificación de las técnicas de laboratorio y otra es que actualmente existe una mayor proporción de pacientes que reciben drogas inmunosupresoras, y que tienen por lo tanto comprometida su resistencia a la infección. (49)

En un estudio realizado en adultos, que abarcó catorce años, se encontró que el 58% de cultivos positivos a partir de muestras clínicas contenían anaerobios. Las bacterias del género Bacteroides fueron las más comúnmente aisladas: el 70% de los cultivos positivos para anaerobios y el 42% del total de anaerobios aislados utilizando técnicas convencionales de identificación. (73)

Los cocos Gram positivos siguieron en frecuencia y se encontraron en el 66% de los cultivos representando el 40% del total de microorganismos aislados. El siguiente grupo prevalente fué el de los bacilos Gram positivos no esporulados, dentro de los cuales Propionibacterium suele ser contaminante. En otro grupo, Clostridium representa del 5 al 10% de los aislamientos y los cocos Gram negativos, el 2%. (73)

En niños, se encontró que en el 2.9% de los cultivos positivos de diversas fuentes había anaerobios, lo que se explica porque en los niños no se encuentran generalmente las condiciones que predisponen a este tipo de enfermedades. (215)

Aparte de la frecuencia con que pueden ocurrir estas enfermedades, son importantes porque pueden ser fulminantes y destructivas. Su curso es generalmente prolongado y existe mortalidad significativa en algunas de estas condiciones. Ocasionalmente se presentan infecciones recurrentes.

Un buen tratamiento depende de un diagnóstico temprano y adecuado, ya que la susceptibilidad de estas bacterias a los antibióticos es característica. Sin embargo, debe enfatizarse la importancia de la remoción de tejido necrótico y drenaje de los abscesos. Existen evidencias de que la omisión o fracaso en el tratamiento del componente anaeróbico en una infección mixta, está asociado a un alto índice de mortalidad. Una elección inapropiada del tratamiento antibiótico en la bacteremia debida a B. fragilis está asociada a un 60% de mortalidad, mientras que una terapia apropiada reduce la probabilidad de muerte a un 15%. (211)

La mayoría de los anaerobios patógenos son susceptibles a las penicilinas y cefalosporinas siendo la excepción B. fragilis. Agentes como clindamicina, cloramfenicol, cefoxitina y los nitroimidazoles tienen un amplio espectro de actividad contra las bacterias anaerobias incluyendo a B. fragilis. La vancomicina y la bencilpenicilina son las drogas de elección en el tratamiento de las enfermedades por Clostridium. (161,197,211)

Es importante realizar pruebas de susceptibilidad de los microorganismos aislados frente a los antibióticos, ya que han emergido cepas de Bacteroides, Clostridium y cocos anaerobios resistentes a las tetraciclinas, penicilinas, clindamicina y otros antibióticos. (26,188)

Varios estudios han mostrado que el 50 al 90% de las cepas de B. fragilis poseen enzimas asociadas a la membrana, con actividad de β -lactamasa. Bajo ciertas condiciones, algunas cepas producen β -lactamasa extracelular. Estas enzimas son primariamente activas frente a las cefalosporinas y solo moderadamente frente a la penicilina. Asimismo, se han descrito en B. fragilis enzimas que inactivan a las ureidopenicilinas y a la cefoxitina. (210)

Los mecanismos de transmisión de la resistencia se han documentado en algunos casos. Se ha descrito una transferencia inter e intragenérica por conjugación y transformación; también se han identificado plásmidos en los anaerobios y se ha reportado una transferencia por conjugación. (194)

Los mecanismos bioquímicos de resistencia a antibióticos son similares a los descritos para aerobios, aunque existen algunas diferencias en el transporte de drogas y acciones inhibitorias. (10) Los anaerobios son resistentes a los aminoglucósidos porque no poseen el sistema oxidativo de transporte necesario para que las drogas penetren en la célula. La resistencia a la cefoxitina se realiza también bloqueando su penetración en el espacio periplásmico. La resistencia al cloramfenicol se debe a una cloramfenicol-acetil transferasa o por nitro-reducción. (210)

Microorganismos anaerobios

Definición

Un microorganismo anaerobio se define de la manera más simple, como aquél que requiere una tensión de oxígeno reducida y que no puede desarrollarse en una atmósfera de 10% de bióxido de carbono en aire, es decir una atmósfera en la que puede encontrarse un 18% de oxígeno. Existen grados variables de tolerancia al oxígeno y peróxidos, como también límites variables de potencial de óxido-reducción que permiten el desarrollo de microorganismos anaerobios. (50)

Existe bastante confusión en la literatura en el aspecto de taxonomía y terminología para muchos de los anaerobios, esto es particularmente cierto entre los bacilos no formadores de esporas.

Ha contribuido a lo anterior la dificultad de aislar algunas especies en cultivo puro, ya que crecen en asociación con otros anaerobios o facultativos que los proveen de factores de crecimiento o condiciones ambientales favorables.

El área de mayor dificultad está en los cocos microaerofílicos y estreptococos anaerobios, que pueden aparecer como cocos facultativos, ya que se ha visto que algunos cocos anaerobios pueden llegar a clasificarse en grupos de Lancefield pues algunos comparten un antígeno común. (49)

Anaerobios como flora normal

Los anaerobios prevalecen dentro de la flora normal del cuerpo humano. Son numerosos en la superficie de las membranas mucosas, los sitios en

los que se encuentran en mayor número son la piel, la cavidad oral, el tracto gastrointestinal y el tracto genitourinario femenino. (Tabla 2)

Las concentraciones de anaerobios en saliva son de $10^8 - 10^9$ ufc/ml, sobrepasando a las bacterias aerobias en 10:1; en la superficie de los dientes, las concentraciones son de $10^{10} - 10^{11}$ ufc/ml con una predominancia de anaerobios. En los pliegues gingivales pueden encontrarse $10^{11} - 10^{12}$ ufc/ml, sobrepasando a los aerobios en 1,000:1. (46)

En la cavidad oral encontramos las siguientes especies: Bacteroides melaninogenicus, Veillonella spp, Fusobacterium nucleatum y cocos anaerobios, variando su distribución en las distintas superficies orales. Presente en pequeñas cantidades están Lactobacillus, Actinomyces, Propionibacterium, Leptotrichia buccalis, Arachnia, Bifidobacterium, Eubacterium y Treponema. (208)

En el intestino delgado prevalecen los microorganismos facultativos, en el ileon terminal encontramos un número casi igual de aerobios y anaerobios siendo Bacteroides y Bifidobacterium los géneros que predominan. Las concentraciones bacterianas en esta zona son de $10^2 - 10^5$ ufc/ml, sobrepasando los anaerobios a los aerobios en una proporción 1,000:1.

Los géneros presentes en el intestino grueso son Bacteroides, cocos anaerobios, Eubacterium, Clostridium, Bifidobacterium, Fusobacterium, Lactobacillus. Se encuentran en general, de 160 a 300 especies diferentes, dentro de los cuales B. fragilis es la predominante. (173)

En el tracto genital femenino se encuentran especies de Peptococcus,

	Boca y tracto respiratorio superior	Intestino delgado	Intestino grueso	Tracto genito- urinario femenino
<u>Peptostreptococcus</u>				
<u>Peptococcus</u>	++	++	++	++
<u>Veillonella</u>	++	++	+	+
<u>Actinomyces</u>				
<u>Arachnia</u>	++			
<u>Bifidobacterium</u>	+	+	++	+
<u>Eubacterium</u>	+	+	+	
<u>Lactobacillus</u>	+	+	+	+
<u>Propionibacterium</u>	+			
<u>Clostridium</u>			++	+
<u>Bacteroides fragilis</u>			++	
<u>Bacteroides spp</u>	++		++	++
<u>Fusobacterium</u>	++		+	+
<u>Espiroquetas</u>	+		+	+

Tabla 2 Microflora anaeróbica normal
 Ewaldson, G., Heimdahl, A., Kager, L. and Nord, C.E.
 "The normal human anaerobic microflora"
 Scand. J. Infect. Dis. 35:9-35 (1982) (46)

Bacteroides, Lactobacillus, Eubacterium y Peptostreptococcus; los anaerobios sobrepasan a los aerobios en 10:1. La composición de la microflora está influenciada por cambios en tensión de oxígeno y pH, así como alteraciones hormonales. (46,137)

El papel de los anaerobios como flora normal en la fisiología no se conoce con exactitud. Se sabe, sin embargo, que B. fragilis junto con E. coli producen vitamina K, lo que es importante para el huésped en algunas condiciones. La deconjugación de sales biliares es llevada a cabo por B. fragilis, especies de Fusobacterium, Bifidobacterium y S. faecalis. (187) En la deshidroxilación participan bacilos anaerobios Gram positivos y ciertas cepas de B. fragilis, Veillonella y algunos aerobios. La acción de las bacterias sobre los ácidos biliares es importante para su conservación mediante la circulación enteropática. (16)

Conocer la flora anaeróbica normal es útil, ya que la mayoría de las infecciones por estos microorganismos aparecen próximas a las mucosas donde residen y así puede predecirse cuáles serán los microorganismos involucrados en determinada infección, si los microorganismos aislados en cultivo son significativos o no, así como también conocerse la puerta de entrada de la infección.

Patogénesis

Bajo condiciones normales, los anaerobios se comportan como comensales inofensivos, pero cuando se introducen en los tejidos adyacentes del huésped, expresan su potencial patogénico basado en factores de virulencia individuales, que no son compartidos por todos los miembros de la microflora; de 400 especies de anaerobios en el colon y 200 en la

cavidad oral, solo 20 producen infecciones clínicas. (143)

Los anaerobios son invasores secundarios que se diseminan a partir de la flora normal más allá de los límites naturales de ésta; la flora infectante es compleja y refleja las bacterias presentes en las superficies mucosas adyacentes.

Entre las condiciones subyacentes que predisponen a este tipo de enfermedades está un aporte vascular comprometido y la destrucción tisular, que contribuyen a un ambiente depletado en oxígeno, con un bajo potencial de óxido-reducción favoreciéndose el crecimiento de los anaerobios. Por lo tanto, predisponen a la infección, la enfermedad vascular, inyección de epinefrina, frío, choque, edema, trauma, cirugía, cuerpos extraños, procesos malignos, infección primaria por bacterias aerobias o facultativas, tratamiento antimicrobiano previo con un agente hacia el cual los anaerobios son resistentes, radiaciones, drogas citotóxicas y corticosteroides. (49,143)

Factores de virulencia

La capacidad de tolerar pequeñas cantidades de oxígeno se ha sugerido como un pre-requisito para la virulencia de los anaerobios, y está relacionada a la actividad de la superóxido dismutasa (29); esto les permite sobrevivir en tejidos oxigenados hasta que se establecen condiciones reductoras. Esta capacidad puede relacionarse en otras muchas especies, a la presencia de catalasa. (233)

Una de las mejores defensas del organismo en contra de la infección por anaerobios es el potencial redox normal (+120 m.v.) Al bajar éste,

la multiplicación de los anaerobios se aumenta en los tejidos, incluso en aquéllos expuestos al aire como son el pulmón y los dientes. (189)

El papel de las enzimas como factores de virulencia en los anaerobios no está completamente definido, ya que son generalmente infecciones polimicrobianas, e involucran interacciones sinérgicas. Las características de muchas de las infecciones debidas a estos microorganismos, como invasión de tejidos con inflamación, necrosis y supuración, sugieren la participación de enzimas hidrolíticas.

In vitro, los anaerobios producen varias enzimas como las proteasas, que son comunes en B. melaninogenicus y las mucopolisacaridasas, que son prevalentes en B. fragilis. Sin embargo, B. fragilis *sps* fragilis no produce estas enzimas, por lo que la cápsula que presenta parece ser el factor de virulencia primario. (16,189)

En infecciones primarias, la producción de colagenasa aumenta la virulencia de B. melaninogenicus; además el amoníaco producido por este microorganismo causa la lisis de las células epiteliales en la mucosa. (16)

En el género Bacteroides se ha demostrado la presencia de enzimas tales como fibrinolisisina, lisozima, desoxirribonucleasa, fosfatasa, proteasas y lipasas (189) y otras asociadas a la membrana como B-lactamasa y superóxido dismutasa. (143)

En B. fragilis se ha demostrado además la presencia de hialuronidasa y condroitín sulfatasa. (189)

Algunas especies de Bacteroides producen fosfatasa, ribo y desoxirribonucleasa, lo que puede aumentar su invasividad. La fosfolipasa A de B. melaninogenicus causa daños en la membrana celular. Dos de los facto-

res de virulencia en Fusobacterium necrophorum son la leucocidina y la hemolisina. (16)

Las toxinas del género Clostridium son responsables de su virulencia: la alfa-toxina de C. perfringens es una potente lecitinasa, que es hemolítica y necrosante; la hemolisina de C. tetani causa lisis de las plaquetas. Algunas especies de Clostridium además, muestran actividad de gelatinasa, caseinasa, elastasa y desoxirribonucleasa. (20,189)

La elaboración de heparinasa por Bacteroides y la aceleración de la coagulación por Bacteroides y Fusobacterium debida a una activación del factor de Hageman por el lipopolisacárido de la membrana, se ha demostrado experimentalmente y se asocia a la tromboflebitis que se presenta en algunas enfermedades producidas por miembros de la familia Bacteroidaceae. (17)

Mecanismos sinérgicos

Generalmente las infecciones por anaerobios son mixtas y pueden estar involucradas especies que varían en sensibilidad al oxígeno. Los mecanismos sinérgicos son varios, entre ellos está la producción de un factor de crecimiento por una de las especies, que promueve el desarrollo de la otra.

Se ha sugerido que la tensión de oxígeno necesaria para el crecimiento anaeróbico se mantiene, en una infección mixta, por la presencia de coliformes. La formación efectiva de un absceso requiere la presencia de una especie facultativa y una anaerobia; se ha demostrado que las cepas encapsuladas de B. fragilis promueven la formación de abscesos,

mientras que las no capsuladas necesitan la presencia de un microorganismo aerobio o facultativo para producir los abscesos. (87) Las cepas encapsuladas son resistentes a la destrucción mediada por neutrófilos, comparadas con las cepas no capsuladas. La investigación de estos mecanismos se ha facilitado por el desarrollo de modelos animales; los resultados de estos estudios implican la sinergia que ocurre entre aerobios y anaerobios y enfatizan la importancia del papel de los anaerobios en la formación de abscesos. (23)

Alteración de las defensas del huésped

El ambiente de un absceso anaeróbico altera las defensas inmunológicas normales e inactiva los agentes antimicrobianos. La anaerobiosis tiene un efecto deletéreo sobre la función de los antibióticos aminoglucósidos, que requieren transporte dependiente de oxígeno a través de la pared bacteriana. Un pH bajo, y la presencia de cationes divalentes y ácidos orgánicos de cadena corta en la cavidad del absceso reducen la actividad de los agentes antimicrobianos. (143)

La cápsula de ciertas especies de Bacteroides interfiere con la fagocitosis de polimorfonucleares y el anticuerpo dirigido contra esta cápsula, parcialmente contribuye a que esta propiedad virulenta no ejerza todo su efecto. (87,166)

La presencia de Bacteroides puede inhibir también la fagocitosis y destrucción de bacterias Gram negativas aerobias compitiendo por opsoninas o haciendo decrecer la destrucción intracelular. (15)

La actividad bactericida de los polimorfonucleares en contra de los anaerobios parece proceder primariamente a través de mecanismos depen-

dientes de oxígeno. Por otro lado, algunos antibióticos penetran en los polimorfonucleares y el tratamiento previo contra B. fragilis con niveles por debajo de la concentración mínima inhibitoria, facilita la fagocitosis de estos microorganismos por polimorfonucleares. (91)

Incidencia de las infecciones anaeróbicas

Los anaerobios se dividen en grupos amplios en base a su capacidad de formar esporas y a la morfología característica en tinción de Gram. En general, los dos grupos más comunes de bacterias anaerobias en especímenes clínicos son los bacilos Gram negativos y los cocos Gram positivos. El siguiente grupo en frecuencia es el de los bacilos Gram positivos y por último los cocos Gram negativos que se aíslan con muy poca frecuencia y generalmente en cultivo mixto.

Sólo una especie de Bifidobacterium, B. ericksonii, se considera patógena; se ha aislado primariamente de infecciones pulmonares. Los lacto bacilos anaerobios con excepción de L. catenaforme son no patógenos.

La mayoría de las especies de Eubacterium son benignas; estas bacterias invariablemente se aíslan como flora mixta. Propionibacterium no se considera patógeno en general, aunque se puede asociar a infecciones en prótesis o endocarditis en válvulas previamente dañadas. Los cocos anaerobios Gram negativos no parecen tener gran importancia en las infecciones clínicas y se les considera oportunistas. Las bacterias anaerobias más frecuentemente aisladas a partir de muestras clínicas se muestran en la tabla 3.

Bacteroides

Es un grupo heterogéneo de bacilos Gram negativos no esporulados, que presentan gran pleomorfismo. Son anaerobios moderados que crecen en tensiones de oxígeno máximas de 3%.

De las 22 especies reconocidas, solo unas pocas se consideran patógenas para el hombre: B. fragilis, B. melaninogenicus y B. corrodens. Otras especies se han aislado a partir de muestras clínicas, pero siempre en conjunción con otros anaerobios o facultativos.

Las enfermedades graves más comunes causadas por anaerobios se deben a miembros de la familia Bacteroidaceae, especialmente B. fragilis; este microorganismo se ve implicado en la mayor parte de las lesiones supurativas de casi todas las partes del cuerpo humano y es la bacteria anaerobia más frecuentemente aislada en cultivo puro. También puede estar presente en infecciones mixtas con otros anaerobios o facultativos. (173)

Las infecciones en las que se ha involucrado a B. melaninogenicus, son generalmente mixtas, tal vez porque otros microorganismos deben satisfacer su necesidad de vitamina K.

B. fragilis se aísla en dos tercios de las infecciones intraabdominales. B. fragilis y B. melaninogenicus se aíslan del 25% de las infecciones del tracto genital femenino y del 25% de las infecciones pleuropulmonares. Del 5 al 10% de las bacteremias son causadas por B. fragilis. (20)

B. corrodens se ha involucrado en infecciones orales y del tracto respiratorio superior. Una proporción substancial de las infecciones por

Bacilos Gram negativos:

B. fragilis
B. melaninogenicus
F. nucleatum
F. necrophorum
F. varium
F. mortiferum

Cocos Gram positivos:

P. magnus
P. asaccharolyticus
P. prevottii
P. anaerobius
P. intermedius
P. micros

Bacilos Gram positivos esporulados:

C. perfringens
C. ramosum
C. septicum
C. novyi
C. histolyticum
C. sporogenes
C. sordellii

Bacilos Gram positivos esporulados:

Bifidobacterium ericksonii
Eubacterium lentum
E. limosum
E. alactolyticum
Actinomyces spp
Arachnia spp

Tabla 3 Bacterias anaerobias más frecuentemente aisladas a partir de muestras clínicas. Finegold, S.F. "ANAEROBIC BACTERIA IN HUMAN DISEASE" Academic Press, Inc. N. York, 1977 (49)

Bacteroides se asocia a cirugía; el uso de antibióticos hacia los cuales este género es resistente predispone a la infección.

La mortalidad y morbilidad es significativa en las infecciones por Bacteroides. La profilaxis requiere evitar las condiciones que reducen el potencial redox y la introducción de la flora normal en heridas, cavidades cerradas y otros sitios normalmente estériles. La terapia antimicrobiana profiláctica puede ser de valor en cirugía que involucre el colon y el tracto genitourinario femenino.

Fusobacterium

La mayoría son bacilos fusiformes, que presentan pleomorfismo y pueden aparecer en formas cocobacilares. Son Gram negativos y anaerobios obligados. Aunque no requieren un potencial de óxido-reducción extremadamente bajo, algunos son muy sensibles a los peróxidos. (49)

Fusobacterium es parte de la flora normal de la boca, intestino y tracto urogenital. Las especies de Fusobacterium que colonizan la boca y garganta frecuentemente producen infección en estas zonas y en las adyacentes como son cabeza, ojos, oídos, mastoides y sinusoides, diseminándose y causando meningitis e infecciones pleuropulmonares. Cuando coloniza el tracto gastrointestinal, especialmente F. necrophorum y F. varium pueden causar infecciones intraabdominales, perineales y septicemia. Representa el 3% de los anaerobios recuperados de muestras clínicas y es el tercer microorganismo que se aísla a partir de infecciones intraabdominales, después de Bacteroides y Pentostreptococcus. Representa el 20% de las bacterias aisladas en infecciones pélvicas serias y el 18% de las infecciones pleuropulmonares. (20)

Es un componente de la infección fusoespiroquetal sinérgica conocida como Angina de Vincent. El mecanismo de simbiosis con las espiroquetas no se conoce, pero se sabe que generalmente inducen lesiones necróticas.

Las cepas hemolíticas se aíslan con más frecuencia que las no hemolíticas a partir de infecciones. Se observan reacciones purulentas en el tejido cuando Fusobacterium se aísla en cultivo puro o en asociación con otras bacterias, en infecciones tales como abscesos periapicales, dentales, cerebrales y en mastoiditis.

Cocos Gram positivos

Los cocos Gram positivos anaerobios son un grupo controversial y difícil. Su patogenicidad es apoyada por algunos autores y negada por otros.

La clasificación de estas bacterias es confusa, pues algunas cepas son aerotolerantes y entonces se consideran microaerófilas. Pueden presentar pleomorfismo, algunas cepas tienen Gram variable, por lo que los diferentes géneros no pueden ser diferenciados entre sí por su morfología.

Los géneros que se incluyen en esta clasificación son Peptococcus y Peptostreptococcus, que son parte de la flora normal de la cavidad oral, tracto gastrointestinal, sistema genitourinario y piel. (49) No se sabe mucho de los mecanismos de patogenicidad de este grupo; se ha mencionado la capacidad hemolítica de algunas especies y la producción de amoníaco, que causa inflamación. La evidencia de la patogenicidad de estas bacterias proviene de reportes de cultivos puros a par-

tir de diversas infecciones; sin embargo, es más común encontrarlos asociados con otros aerobios o facultativos. (20)

Alrededor de un tercio de las infecciones intraabdominales tienen una flora mixta en que los cocos anaerobios se encuentran junto con Bacteroides o Clostridium o ambos. Los cocos anaerobios y Clostridium son los microorganismos aislados más frecuentemente a partir de infecciones del tracto biliar.

En el aborto séptico y en la endometritis postpartum los dos grupos de bacterias más comúnmente aislados son Bacteroides y cocos anaerobios. (73)

Se ha reportado que un 89% de los casos de absceso cerebral se deben a cocos anaerobios, siendo predominante el género Peptostreptococcus; especies de este género son las bacterias más comúnmente aisladas en la sinusitis crónica.

P. asaccharolyticus se encuentra en el 10% de las infecciones humanas y P. anaerobius en el 9%. P. prevotii y P. magnus se encuentran en el 4% de las infecciones.

Los cocos anaerobios se encuentran en el 1% de los hemocultivos; el foco de infección en las bacteremias son usualmente infecciones de tejidos blandos, orofaringe, tracto gastrointestinal, hígado y tracto genitourinario femenino. (20,73)

Clostridium

Son bacilos Gram positivos, formadores de esporas, anaerobios obligados, móviles, a excepción de C. perfringens. Algunas especies son

aerotolerantes. Son bioquímicamente activos y pueden ser sacarolíticos como C. perfringens, C. septicum, C. oedematiens, C. fallax y proteolíticos como C. sporogenes, C. histolyticum y C. botulinum.

Algunas especies son saprofiticas, otras existen como comensales en el intestino y otros son patógenos causando serias enfermedades como es el tétanos (C. tetani), la gangrena gaseosa (C. perfringens, C. oedematiens, C. septicum) y el botulismo (C. botulinum). (92)

C. perfringens causa también gastroenteritis, y enteritis necrosante, que puede ser fatal. Algunas especies de Clostridium se han involucrado en la colitis asociada a antibioticooterapia. Parece ser que Clostridium puede crecer y producir su toxina cuando las condiciones son favorables y en ausencia de flora normal. (55)

C. perfringens se divide en cinco tipos serológicos, de la A a la E, dependiendo de la proporción de exotoxinas o antígenos solubles producidos, de los cuales se han descrito doce diferentes. (35)

Estas toxinas presentan diversas actividades enzimáticas como colagenasa, gelatinasa, caseinasa, hialuronidasa, deoxirribonucleasa, neuraminidasa y fibrinolisisina y en general se demuestran por su acción hemolítica sobre eritrocitos de carnero o por sus efectos necróticos y letales en animales de experimentación. (49)

El tipo C se asocia a la enteritis necrosante y el tipo A es responsable de la gangrena gaseosa y el envenenamiento por alimentos, que puede ser fatal en pacientes debilitados. (20)

La patogenicidad de C. tetani se deriva de su neurotoxina, que en un principio causa espasmos de los músculos locales periféricos; más tarde se disemina por el torrente circulatorio y provoca convulsiones ge-

neralizadas. (42)

C. botulinum incluye siete tipos toxicológicos, de la A a la G, que producen neurotoxinas antigénicamente distintas. Los tipos A, B, E y F causan botulismo en el hombre. (42) En niños es causa de muerte súbita por elaboración de la toxina en el intestino. (3)

C. novyi, al que también se le conoce como C. oedematiens y C. haemolyticum se divide en cuatro tipos serológicos: A, B, C y D. Esta especie produce ocho diferentes toxinas. Está ampliamente distribuido y representa un número considerable de los casos de gangrena gaseosa.

(20)

C. histolyticum se asocia a otros anaerobios en la gangrena gaseosa.

C. septicum, al que también se le denomina C. chauvoei, es una especie patógena, asociada a gangrena gaseosa.

En infecciones mixtas, C. sporogenes incrementa la virulencia de las especies patógenas como C. perfringens y C. septicum y puede clasificarse como una cepa no toxigénica de C. botulinum. (40)

Veillonella

Son cocos Gram negativos, anaerobios obligados, que forman parte de la flora normal en el tracto respiratorio, intestino y vagina.

No están considerados como patógenos, pues no se han aislado en cultivo puro a partir de infecciones; sin embargo exhiben algunas propiedades patogénicas por lo que se les considera oportunistas.

Se reconocen dos especies dentro del género: V. parvula y V. alcalecens, que se han encontrado en bacteremias transitorias que siguen a

una extracción dental, sinusitis, abscesos tonsilares, otitis media, mastoiditis y abscesos cerebrales. Se encuentran en infecciones mixtas intraabdominales, genitourinarias y del tracto respiratorio, además se ha encontrado en bilis. Algunas cepas dehidroxilan ácidos biliares. (20,73)

Clasificación serológica

Bacteroides

Eggert y Gagnon (1933) fueron los primeros en estudiar a B. fragilis con la técnica de aglutinación, concluyendo que una clasificación serológica sería dudosa, ya que los sueros eran específicos de cepa. La limitación más grande en sus estudios fué el uso de sueros no adsorbidos. (103)

Lambe en 1976 estableció un esquema de clasificación serológica de B. fragilis spp fragilis y encontró 21 serogrupos dentro de esta especie. (100,103)

Estudios de inmunodifusión y aglutinación han mostrado también que dentro del grupo B. fragilis existen diversos serotipos. (1,2)

Los antígenos mejor estudiados son los lipopolisacáridos de la pared celular de B. fragilis y B. melaninogenicus, que muestran especificidad serológica en forma análoga a los antígenos somáticos de la familia Enterobacteriaceae. (20,65,122)

Los lipopolisacáridos de la pared celular son complejos de alto peso molecular, compuestos de polisacáridos, lípidos y pequeñas cantidades de proteína. (90,129) Los determinantes antigénicos están presentes

en la parte polisacárida de la molécula. (69) Cada cena de B. fragilis comparte varios antígenos O con otras cepas de la misma especie y ocasionalmente con otras especies de Bacteroides. (67,69)

Los lipopolisacáridos de B. fragilis y B. melaninogenicus no poseen los azúcares heptosa y 2-ceto-3-deoxioctanato y el ácido B-hidroximi-rístico que están presentes en la mayor parte de las endotoxinas bacte-rianas. En consecuencia, no presenta la actividad biológica clásica de una endotoxina; la reacción de Shwartzman es negativa en conejos a do-sis mayores de 1 mg, comparados con una prueba positiva al administrar 12.5 μ g de la endotoxina de S. typhi. La prueba de letalidad en embri-ones de pollo y la gelificación del lisado de Limulus ocurrieron en do-sis significativamente más altas que con la endotoxina de S. typhi.

(82,131,132)

Lo anterior tiene relación con una baja incidencia de coagulación in-travascular diseminada con sepsis debida a miembros del grupo Bacte-roides. (82)

B. fragilis sps fragilis presenta un antígeno capsular específico de grupo, con un peso molecular de 800,000 y compuesto de hexosa, hexosa-mina, metil pentosa y ácido siálico. (83)

La especie B. melaninogenicus sps asaccharolyticus presenta también un polisacárido capsular demostrado por microscopía electrónica con rojo de rutenio y anticuerpos marcados con ferritina; este antígeno mostró ser específico de subespecie por inmunofluorescencia indirecta.

(132)

La presencia de un lipopolisacárido relativamente no activo y un anti-geno capsular, explica en parte que este microorganismo raras veces

produce bacteremia y choque séptico; sin embargo, se le asocia frecuentemente con la formación de abscesos. (132)

Existen diferencias en la composición química del polisacárido capsular entre las cepas de B. fragilis, pero no en el lipopolisacárido.

Otras especies de Bacteroides poseen un material capsular, sin embargo no promueven la formación de abscesos. (86,122)

La membrana exterior de B. fragilis contiene un antígeno proteico termolábil que se muestra en reacciones de precipitación y es aparentemente específico de grupo. (20) Otros reportes indican que este antígeno termolábil puede producir reacciones cruzadas con algunas especies de Bacteroides estrechamente relacionadas. (105,196)

La proteína termolábil y el lipopolisacárido termoestable proporcionan una base para la clasificación serológica de B. fragilis; los diferentes serotipos se definen por grupos antigénicos individuales o combinaciones de ellos. (105,196)

Fusobacterium

Araujo y cols (1963) utilizando la técnica de inhibición de la hemaglutinación encontraron un alto grado de especificidad serológica en los lipopolisacáridos aislados de 21 cepas de F. nucleatum. (37) Estos resultados fueron corroborados por Kristoffersen y cols, y más tarde por Hofstad y cols, quienes detectaron cuatro especificidades serológicas en lipopolisacáridos aislados de cuatro cepas de F. nucleatum. (72,94) Los lipopolisacáridos de Fusobacterium son complejos de polisacáridos y lípidos conteniendo fósforo y cantidades variables de polipéptidos

en una pequeña proporción. (68)

Tienen en común los siguientes azúcares: glucosamina, glucosa, L-glicero-D-manoheptosa y 2-ceto-3-deoxioctanato, pero difieren respecto a la presencia de galactosa, ramnosa y D-glicero-D-manoheptosa. (70, 71)

La estructura general está relacionada con los lipopolisacáridos de la mayoría de los microorganismos facultativos Gram negativos y consiste de varias partes principales, el lípido A, un polisacárido interno y una cadena lateral oligosacárida, variable en su composición, que determina la especificidad serológica. (68,70,71)

Como podría esperarse a partir de su estructura, estos lipopolisacáridos son potentes endotoxinas y se han implicado en la enfermedad periodontal humana y en casos fatales de choque séptico. (27,52,68, 209)

Las cepas de Fusobacterium comparten un antígeno proteico asociado a la membrana que es responsable de la amplia reactividad cruzada de este grupo. (68,93)

Cocos anaerobios Gram positivos

Existen pocos reportes respecto a los antígenos en los géneros Peptococcus y Peptostreptococcus. Stone en 1940 realizó estudios bioquímicos e inmunológicos en 24 cepas de cocos anaerobios Gram positivos aislados de muestras clínicas y concluyó que la clasificación basada en características bioquímicas no podía correlacionarse con los resultados obtenidos en reacciones de precipitación y aglutinación, además

de obtener reacciones cruzadas en sistemas heterólogos. (20,239)

Estudios posteriores han mostrado que no existen antígenos comunes entre Peptococcus y Peptostreptococcus y que los antígenos de P. magnus son específicos de especie, distintos a los encontrados en otras especies de cocos anaerobios. Por contrainmunolectroforesis también se ha demostrado que P. magnus es una especie inmunológicamente distinta. (136)

Los sueros dirigidos contra P. asaccharolyticus, P. prevottii, P. anaerobius y P. intermedius mostraron especificidad de cepa, con reacciones cruzadas ocasionales con cepas homólogas, lo que sugiere la presencia de varios serotipos dentro de algunas especies. (174)

Estos resultados se han confirmado por estudios de inmunodifusión, inmunolectroforesis, inmunofluorescencia y hemaglutinación pasiva con sueros dirigidos contra extractos sonicados de cepas de Peptostreptococcus, excepto por una reacción cruzada entre P. parvulus y P. productus en la hemaglutinación pasiva. (58)

Graham y cols en 1979 reportaron la presencia de un antígeno asociado a la pared celular de P. anaerobius compuesto en forma mayoritaria de proteína y pequeñas cantidades de carbohidrato. (152)

Este antígeno no es compartido por otras especie de Peptostreptococcus, Peptococcus y Streptococcus; además, no da lugar a reacciones cruzadas con sueros dirigidos contra los grupos de Lancefield. (59)

En estudios posteriores del género Peptostreptococcus que se han realizado utilizando sueros dirigidos frente a células completas y posteriormente adsorbidas, las pruebas de inmunodifusión y coaglutinación con proteína A de S. aureus mostraron antígenos únicos y ninguno común dentro de este género, no encontrándose reactividad de los

sueros con especies de Streptococcus y Peptostreptococcus. (239)

Clostridium

C. perfringens

Datos químicos e inmunológicos han demostrado una relación directa entre el polisacárido capsular de varias cepas de C. perfringens tipo A y su clasificación serológica. (6,33,168) Cada cepa encapsulada investigada contiene un polisacárido de superficie específico de tipo. (6,33)

La complejidad de los antígenos capsulares se demuestra con los resultados del laboratorio de bacteriología anaeróbica del CDC que ha preparado 74 distintos sueros, además de los 13 serotipos clasificados por Hobbs; aproximadamente un 59-65% de las cepas aisladas de alimentos contaminados o de casos de gangrena gaseosa pueden clasificarse con estos sueros, lo que tiene aplicación solamente en estudios epidemiológicos. (20,112,168) En brotes de intoxicación alimentaria puede hacerse una comparación de los serotipos de C. perfringens tipo A aislados tanto del alimento incriminado como de las muestras de heces de los pacientes. (20,76)

C. tetani

Se han diferenciado 10 tipos serológicos en base a antígenos flagelares, (20,115) Sin embargo, todas las cepas comparten el mismo antígeno somá-

tico, lo que permite su identificación por técnicas serológicas.

(115, 235) La neurotoxina producida por todos los tipos es antigénicamente idéntica, lo que es de importancia práctica, ya que es neutralizada por una única antitoxina. (20,115) Se han aislado variantes no toxigénicas a partir de muestras clínicas.

C. botulinum

La clasificación de las cepas de C. botulinum en grupos toxigénicos designados con letras de la A a la G, se basa en la especificidad antigénica de la toxina que producen, mientras que su actividad bioquímica las separa en cepas proteolíticas y no proteolíticas. (20,192)

La composición antigénica de las células vegetativas de C. botulinum es muy compleja y no se ha podido definir completamente para muchos de los tipos. (115) Se han demostrado reacciones cruzadas entre las cepas A, B y F y entre las cepas C y D. (20,115, 192,235)

Existen diferentes antígenos aglutinantes termoestables y termorresistentes entre las cepas de tipo E, que no presentan reacción cruzada con cepas de otros tipos. (20,115,125,135) Algunos estudios sobre los tipos A y B han permitido su subdivisión en seis subgrupos sobre la base de sus antígenos termolábiles. Estas cepas de C. botulinum comparten un antígeno termoestable con C. tetani, C. histolyticum y C. sporogenes. (20,115,192)

C. novyi

Existen cuatro tipos: A, B, C y D. Todas las cepas comparten los antígenos somáticos en proporciones variables, (20,235) los intentos para producir anticuerpos específicos de tipo no han dado resultado. (235)

C. septicum y C. chauvoei

Todas las cepas de C. septicum pueden dividirse en dos grupos en base a su antígeno somático; ninguno de estos grupos da reacción cruzada con C. chauvoei, que posee un antígeno somático común. (20,152,235)

C. bifermentans y C. sordellii

Estas especies pueden diferenciarse en base a los antígenos de sus esporas con reacciones de precipitación o aglutinación, no se encuentra reactividad cruzada entre las esporas del grupo C. bifermentans - C. sordellii y aquellas de C. sporogenes, C. histolyticum, C. sphenoides y C. perfringens. (20,223)

Todas las cepas de C. sordellii y C. bifermentans producen una toxina antigénicamente relacionada, pero no idéntica a la lecitinasa (alfa-toxina) de C. perfringens. (20)

C. difficile

Produce dos toxinas diferentes, la A que es una enterotoxina y la B que es una citotoxina, con distintas propiedades físicas y biológicas y de especificidad antigénica. (7,213)

Presenta dos carbohidratos antigénicos, uno en la pared celular y otro que puede ser extraído de la membrana celular; estos dos determinantes son compartidos con la especie C. sordellii y pueden dar lugar a reacciones cruzadas. (177,180)

Diagnóstico de laboratorio

Los anaerobios pueden causar cualquier tipo de enfermedad en el organismo, existiendo ciertas condiciones que sugieren su presencia: descargas de olor fétido, necrosis tisular, formación de pseudomembranas, gas en tejidos y coloración negra de exudados que contienen sangre.

Las infecciones por anaerobios generalmente se presentan en la proximidad de las membranas mucosas. Es también una indicación, la infección asociada a procesos malignos u otra en la que se presente destrucción del tejido, así como la relacionada a la administración de aminoglucósidos. La endocarditis con un hemocultivo de rutina negativo sugiere también la presencia de anaerobios.

Las muestras que se procesan para cultivo de anaerobios no deben estar contaminadas con flora normal; generalmente se obtienen por aspiración con jeringa y aguja, las cuales se protegen de la exposición al aire después de la toma.

Los métodos de recolección de muestras para anaerobios que se recomiendan se muestran en la tabla 4.

El transporte de las muestras debe hacerse en un contenedor anaeróbico o utilizando las técnicas anaeróbicas con jeringa y enviándose al laboratorio en los siguientes 20 a 30 minutos.

Cuando se requieren períodos más largos para el transporte se utiliza un tubo en que se ha eliminado el oxígeno y que contiene un indicador de anaerobiosis; de este modo puede mantenerse durante dos horas o por 24 horas si se refrigera.

Las muestras deben ser procesadas lo más pronto posible, para prevenir la pérdida de anaerobios exigentes, muy sensibles al oxígeno y el sobrecrecimiento de las bacterias facultativas.

Examen directo

El examen macroscópico del espécimen incluye observación del color, olor, fluorescencia bajo luz ultravioleta, pus, presencia de tejido necrótico y gas.

El examen microscópico debe incluir una tinción de Gram, observación en campo oscuro o en contraste de fases, para demostrar espiroquetas, otras formas móviles y esporas.

Es importante este examen directo ya que da una idea de los diferentes microorganismos presentes; además, como control de calidad de las técnicas de aislamiento, ya que deben recuperarse en cultivo los diferentes tipos morfológicos vistos en la extensión del material original, asimismo proveen al médico de una información preliminar.

Procedencia	Procedimiento
Pulmonar	Aspiración percutánea transtraqueal o punción directa de pulmón. Muestras broncoscópicas obtenidas con un doble catéter o escobilla bronquial.
Pleural	Toracentesis
Tracto urinario	Aspiración suprapúbica percutánea de la vejiga
Abscesos	Aspiración con jeringa y aguja
Tracto genito-urinario femenino	Culdocentesis después de la descontaminación de la vagina con <u>potidona-ioduro</u> . Para muestras de la cavidad uterina puede utilizarse un doble catéter o escobilla bronquial, excepto en los casos de <u>endometritis postpartum</u> , en que no es útil.
Tracto sinusoidal o heridas que drenan	Aspiración con jeringa y un catéter pequeño de plástico introducido lo más profundo posible, después de descontaminación de la piel. Muestras obtenidas durante la cirugía de la profundidad de las heridas o lesiones de hueso. Las biopsias son un excelente material.

Tabla 4 Métodos de colección de muestras recomendados para cultivo anaerobio.

Citron, D.M., Finegold, S.M. and Sutter, V.L.

"WADSWORTH ANAEROBIC BACTERIOLOGY MANUAL" 3rd edition

St. Louis, C.V. Mosby 1980 (31)

Técnicas de cultivo anaerobio

Existen tres sistemas: 1) tubo con medio prerreducido y esterilizado anaeróbicamente; 2) cámaras de anaerobiosis; 3) jarras anaeróbicas.

Los dos primeros son métodos sofisticados y se utilizan en el aislamiento de microorganismos extremadamente sensibles al oxígeno, p. ej. en el estudio de la flora normal, pero no son necesarios para el aislamiento de anaerobios clínicamente importantes.

Se ha demostrado que la jarra anaeróbica da muy buenos resultados, siempre y cuando se haya colectado y transportado la muestra correctamente.

De la jarras anaeróbicas, existen varios tipos: unas utilizan un sobre generador de hidrógeno y bióxido de carbono y la formación de agua a partir del oxígeno presente y el hidrógeno generado, se realiza en presencia de un catalizador generalmente paladio.

Otro procedimiento alternativo es el de evacuación-reemplazo, en el que se elimina el aire presente y se introduce gas libre de oxígeno; la mezcla final contiene 80% de nitrógeno, 10% de hidrógeno y 10% de dióxido de carbono.

Medios de cultivo

Las placas de agar sangre se pueden preparar con las siguientes bases: Brucella, Columbia, Schaedler o infusión de cerebro-corazón-extracto de levadura, a las cuales se adiciona vitamina K (10 ug/ml) y hemina (5 ug/ml).

Deben inocularse también medios selectivos como son el de kanamicina-vancomicina en que desarrolla el género Bacteroides, y el de bilis-esou

lina, selectivo para el grupo B. fragilis.

Existen otros medios selectivos, como el que contiene ácido D-glucurónico y bilis, altamente selectivo para B. fragilis y el medio CVE, selectivo para el género Fusobacterium. (126,225)

También se inocula un medio de tioglicolato líquido suplementado con infusión de cerebro-corazón o un medio de carne picada, que es útil para recuperar las bacterias en caso de haberse iniciado la terapia con antibióticos.

Para hemocultivos, se recomienda tripticasa soya como medio base con 0.1% de agar, preparado en condiciones anaeróbicas, se utiliza amilosulfato de sodio como anticoagulante.

La recuperación de anaerobios en hemocultivos puede hacerse más rápida por métodos de concentración, que utilizan centrifugación en gradiente y filtración en condiciones anaeróbicas, seguida de incubación del filtro en un medio de Müller-Hinton; se recuperan bacterias anaerobias y facultativas en 30 horas. Este sistema es muy sensible y detecta de 3 a 28 ufc/ml, con un ahorro de 24 horas en la detección, comparándolo con la técnica habitual. (104)

Todos los medios para aislamiento de anaerobios deben utilizarse recién preparados; las placas en las que se realiza la siembra inicial deben guardarse en jarras anaeróbicas o en una cámara de anaerobiosis antes de su uso. No es necesario utilizar placas que se han mantenido en condiciones reducidas al hacer subcultivos de las colonias. (31)

Observación de cultivos y aislamiento

Las placas se incuban durante 48 horas antes de una observación inicial y deben incubarse una semana o más antes de desecharlas.

Si se quiere observar el cultivo antes de este tiempo, la muestra debe inocularse por duplicado, ya que los anaerobios son más sensibles al oxígeno durante la fase log de su crecimiento y los cultivos no deben exponerse al aire antes de 48 horas.

Se examinan las placas con una lupa o con un microscopio estereoscópico. De cada colonia diferente debe hacerse una tinción de Gram, una resiembra en agar sangre para determinar pureza del cultivo, una resiembra en agar chocolate para probar su capacidad de desarrollo en una atmósfera de 5 a 10% de bióxido de carbono en aire. Se puede resembrar en agar yema de huevo para determinar la producción de lecitinasa y lipasa.

En la placa de agar sangre en que se determina pureza, se colocan discos que contienen antibióticos: kanamicina (1000 ug), colistina (10 ug), vancomicina (5 ug). También puede colocarse un disco de polianetol-sulfato de sodio, para la identificación presuntiva de P. anaerobius y un disco de nitratos para determinar reducción de los mismos por algunas especies.

El subcultivo de rutina de los hemocultivos en condiciones anaeróbicas no se recomienda pues no contribuye significativamente a la posible identificación de anaerobios. (155,169) Aún cuando se realicen los hemocultivos aerobios, deben hacerse también para la presencia de anaerobios, ya que pueden aislarse algunas especies aerotolerante en cantidades significativas como C. perfringens, B. fragilis, B. distasonis, F.

nucleatum, P. saccharolyticus y Eubacterium spp.

Identificación presuntiva

Cuando se ha determinado la pureza del cultivo y su tolerancia al oxígeno, se hace la identificación preliminar, basada en características morfológicas coloniales y celulares, susceptibilidad a ciertos antibióticos, movilidad, licuefacción de la gelatina, producción de catalasa, in dol y reducción de nitratos. (79,114)

Identificación definitiva

Se basa en las características fisiológicas de los microorganismos, como fermentación de carbohidratos, actividad proteolítica, determinación de productos finales del metabolismo, características genéticas y producción de toxinas.

Las pruebas bioquímicas que se recomiendan para la identificación definitiva son numerosas y requieren varios días de incubación, pues generalmente los anaerobios son de crecimiento lento. (31)

Existen esquemas de simplificación de las pruebas para la identificación de anaerobios, en los que se han seleccionado aquéllas que tienen un mayor valor discriminativo. (43)

El método de referencia es el que utiliza medios prerreducidos y esterilizados anaeróbicamente; este método es caro y consume gran cantidad de tiempo, pues cada tubo requiere de observación del crecimiento y medición del pH.

Varios micrométodos de identificación están disponibles comercialmente,

como el API-20A y el Minitek. En el caso de los microorganismos sacarolíticos, estos métodos correlacionan bien con los datos de cultivo; sin embargo, los microorganismos débilmente sacarolíticos o asacarolíticos no pueden ser identificados, pues dan reacciones intermedias, difíciles de interpretar. (30)

La placa Anatek es otro método recientemente introducido, que tiene un 40% de correlación con los métodos de referencia. Este bajo porcentaje se debe a que muchas de las bacterias clínicamente importantes no logran tener un buen desarrollo en las placas, haciendo difícil la interpretación de las pruebas. (30)

Otro microsistema de identificación determina las enzimas preformadas por el microorganismo. Este método se basa en emplear un inóculo grande, pequeña cantidad de los sustratos cromogénicos e incubación en condiciones aerobias durante 4 horas, lo que reduce significativamente el tiempo necesario para la identificación, en comparación a los micrométodos anteriormente mencionados, que requieren 48 horas de incubación. Se ha obtenido una correlación de 89% entre este último método y los métodos de referencia. (195)

La identificación definitiva de muchos anaerobios requiere el uso de cromatografía gas-líquido para el análisis de productos finales del metabolismo. Es necesario para la identificación de los cocos Gram positivos y ciertas especies de Clostridium. (31)

Es deseable que se realice una identificación definitiva, ya que muchas veces los microorganismos Gram positivos pueden aparecer como Gram negativos. Algunos bacilos muy pequeños pueden aparecer como cocos, y en ocasiones las esporas son difíciles de demostrar. (30,49)

Cualquier laboratorio debe ser capaz de identificar, al menos presun-

tivamente, los siguientes microorganismos: E. fragilis, pues es el más comúnmente encontrado en muestras clínicas y el que es resistente a un mayor número de antibióticos y C. perfringens, que causa enfermedad devastadora. (43)

La identificación definitiva es básica para conocer la importancia relativa de los microorganismos aislados, ya que algunos representan solamente contaminación con la flora normal.

También nos da información adicional sobre la puerta de entrada de la infección, por ejemplo en el caso de una bacteremia; sobre el pronóstico de una enfermedad, como en el caso de la endocarditis, en que existe una mayor mortalidad asociada a E. fragilis, que a otros bacilos Gram negativos o cocos anaerobios.

La asociación entre C. septicum y los procesos malignos hace notar la importancia de la identificación definitiva, ya que también permitirá diferenciar entre una nueva enfermedad o una recurrente, la cual podría implicar tumor, cuerpo extraño o un absceso no drenado. (49)

Finalmente, puede contribuir a conocer mejor el papel de los anaerobios en diferentes procesos infecciosos, y la prognosis asociada a éstos.

(31)

Actualmente en los países desarrollados se han implementado métodos rápidos de identificación, utilizándose como pruebas presuntivas con una alta correlación con los métodos convencionales. Estas técnicas son la inmunofluorescencia, la contraelectroforesis, el ensayo inmunoenzimático y la cromatografía, que se describirán detalladamente en los capítulos siguientes.

II IDENTIFICACION POR INMUNOFLUORESCENCIA

La técnica de inmunofluorescencia desarrollada por Coons en 1942 es un procedimiento histoquímico para demostrar y localizar antígenos o anticuerpos en cortes de tejido o en suspensiones celulares. Las inmunoglobulinas se acoplan a colorantes fluorescentes sin pérdida alguna en su actividad de anticuerpo; para ciertos propósitos se marca el antígeno de forma similar. La formación de complejos inmunes estables se hace visible en un microscopio para fluorescencia. (147)

Los colorantes fluorescentes o fluorocromos son sustancias caracterizadas por su capacidad de alcanzar niveles elevados pero inestables de energía, absorbiendo la luz a una cierta longitud de onda y emitiéndola inmediatamente a otra longitud de onda dentro del rango de la luz visible. (148)

El fluorocromo de uso más amplio es el isotiocianato de fluoresceína, que tiene un máximo de absorción entre 490 y 495 nm y emite su característico color verde a 517 nm. El isotiocianato de tetrametilrodamina muestra una fluorescencia rojo-anaranjada, es un colorante de contraste útil cuando se demuestran dos antígenos o dos anticuerpos en la misma preparación; tiene un máximo de absorción a 550 nm y un máximo de emisión a 580 nm. (28,64)

El ácido dimetil-amino-naftalén-sulfónico (DANS) da una fluorescencia verde, pero se utiliza poco. (116)

Los microscopios utilizados para visualizar una preparación por inmunofluorescencia son modificaciones simples del microscopio de luz transmitida que involucran una fuente de luz de alta intensidad, filtros de excitación o primarios, filtros de barrera o secundarios y condensador

especial.

En 1967, Ploem introdujo un sistema epiiluminado que emplea un iluminador vertical y un espejo diótrico; en este sistema la luz de excitación se enfoca directamente a la preparación a través de la lente del objetivo, lo cual tiene varias ventajas ya que puede combinarse con luz transmitida para observación en contraste de fases. (28)

Virtualmente cualquier antígeno o anticuerpo puede detectarse por inmunofluorescencia. Los pasos involucrados son: preparación del suero inmune o gamma-globulina específicos, conjugación con el colorante fluorescente y finalmente el procedimiento de tinción.

Para la inmunofluorescencia son necesarios sueros heterólogos que contengan mg del anticuerpo por ml de suero, su potencia se valora por precipitación cuantitativa o por hemaglutinación pasiva. Debe asegurarse la especificidad a un nivel que excede el detectable en difusión doble o en técnicas inmunolectroforéticas. (13)

Es necesario obtener la fracción IgG del suero ya que la conjugación subsecuente debe limitarse al anticuerpo lo más posible, puesto que de este modo se incrementa la eficiencia del proceso de tinción y se evita la tinción no específica debida a proteínas conjugadas presentes en el suero.

En la conjugación con isotiocianato de fluoresceína o de tetrametilrodamina, el grupo isotiocianato se une a los grupos amino libres de la proteína en un pH alcalino, con la formación de una unión carbamido covalente. (148)

Los conjugados liofilizados pueden guardarse a 25°C sin una pérdida significativa del título; sin embargo, se recomienda la temperatura de 4°C.

Los conjugados en estado líquido deben guardarse entre 4 y 20° C. (60)

En la práctica, es importante caracterizar a un conjugado en cuanto a:

- 1) asegurar la especificidad, a un nivel que exceda el detectable en di fusión doble ordinaria o con técnicas inmunolectroforéticas.
- 2) expresar la sensibilidad, con la relación molar F/P.
- 3) establecer la dilución óptima para un conjugado en un sistema antígeno-anticuerpo específico.

Además, ya que existen muchas variables que determinan la obtención de un resultado positivo y negativo, al realizar la prueba deben incluirse controles adecuados. En la interpretación de la microscopía de fluorescencia se necesita cierta precaución, debe darse por positivas sólo aquellas muestras que presentan una fluorescencia definida y una morfología similar a la del control. (74,200)

Otro problema que se presenta en inmunofluorescencia, es la tinción no específica debida a ciertas cepas de S. aureus, que ocurre porque la porción Fc de las inmunoglobulinas se une inespecíficamente a la proteína A presente en estos microorganismos. Esto puede evitarse añadiendo suero normal al conjugado, haciendo una digestión de la inmunoglobulina con pepsina para remover el fragmento Fc o agregando el conjugado de rodamina de una inmunoglobulina dirigida contra S. aureus. (51)

La tinción por inmunofluorescencia puede realizarse de diversas formas, de las cuales las más comunes son la técnica directa, en la que el suero específico conjugado se agrega directamente a la preparación y la técnica indirecta, que fué utilizada por primera vez por Waller y Coons en la que se hace reaccionar el anticuerpo específico no marcado con el

antígeno y después se adiciona la anti-globulina específica marcada. Otras dos técnicas que son modificaciones del método, con el sistema complemento-anticomplemento descrito por Goldwasser y Shepard y la reacción de inmunofluorescencia mixta o de antígeno marcado descrita por Beutner, Holborow y Johnson. (51)

En la técnica del complemento se agrega un suero específico y suero fresco de cobayo como fuente de complemento; este complejo se visualiza agregando anticuerpo marcado dirigido al complemento. (143)

El método directo generalmente se utiliza en la identificación de bacterias y casi siempre es necesaria una serie de conjugados diferentes para cada serogrupo o serotipo de un microorganismo.

El método indirecto en general se utiliza para detectar anticuerpos dirigidos frente a microorganismos específicos.

Aplicación en el diagnóstico de anaerobios

Griffin en 1970 reportó la posibilidad de utilizar la inmunofluorescencia para la identificación rápida de especies de Bacteroides, Fusobacterium y Sphaerophorus. Los estudios de García, y Fales y Teresa, con inmunofluorescencia directa para detectar la especie Sphaerophorus necrophorus (Fusobacterium nucleatum) mostraron que los conjugados son específicos de especie y que los conjugados polivalentes pueden utilizarse para la identificación directa en muestras clínicas. (47,53)

Se obtuvieron datos que indican una heterogeneidad serológica en S. necrophorus, ya que unos determinantes antigénicos son compartidos por al

gunas cepas y otros son únicos, confirmando así los resultados obtenidos por Griffin. (47,53,74)

Stauffer y cols (1975) reportaron un método de inmunofluorescencia indirecta para la identificación de Bacteroides y Fusobacterium. Los sueros utilizados se obtuvieron por inmunización con suspensiones celulares de las diferentes cepas. En el caso de B. fragilis, los sueros resultan específicos de cepa o específicos para posibles grupos serológicos dentro de subespecies, excepto por reacciones cruzadas entre subespecies. Los sueros dirigidos contra Fusobacterium mostraron especificidad de cepa.

En este estudio se observó la necesidad de desarrollar sueros adicionales para cubrir los tipos antigénicos encontrados, ya que ocasionalmente se obtienen reacciones negativas en inmunofluorescencia con resultados positivos en cultivo; así como también la necesidad de preparar sueros polivalentes, dada la gran cantidad de éstos que deben utilizarse.

(205)

Para facilitar la preparación de los sueros polivalentes es necesario contar primero con sueros que tengan un título alto en inmunofluorescencia. Abshire (1977) demostró que pueden obtenerse altos títulos con el método que describe y que implica una inmunización con suspensiones celulares tratadas con formalina, la dosis de antígeno utilizada es sensiblemente mayor que en estudios anteriores. (1); además en este estudio se obtuvieron datos que indican que en el método indirecto de inmunofluorescencia con suero completo, los resultados son los mismos que cuando se utiliza la fracción gamma del mismo, por lo que no es necesario purificarlo, ya que no se tienen por ello reactivos más efectivos. En 1974, Lambe aplicó la inmunofluorescencia para la clasificación de

B. melaninogenicus en tres serogrupos; la asignación a un serogrupo específico se correlacionó con la caracterización bioquímica en el 98% de las cepas probadas. (99) Lambe y Jerris (1976) desarrollaron un conjugado polivalente para la detección por inmunofluorescencia de B. melaninogenicus en cultivo puro, pero mencionan que puede utilizarse para identificar colonias aisladas de cultivos mixtos. Más tarde, con los conjugados específicos de cada grupo, puede hacerse la identificación a nivel de especie. (102)

Kasper y cols (1977) demostraron que la especie B. fragilis ssp fragilis se puede identificar por inmunofluorescencia indirecta, utilizando un anticuerpo dirigido frente al polisacárido capsular que se encuentra uniformemente distribuido en esta especie. (85) La presencia de esta cápsula también se demostró por microscopía electrónica, tinción de tinta china y reacción de Quellung. El material capsular de B. fragilis causa abscesos experimentales aún cuando no se encuentran las células viables, fenómeno no observado con el polisacárido pneumocócico. (88, 165)

Otros autores han demostrado cápsula en especies del grupo B. fragilis como B. thetaiotaomicron y B. vulgatus; este material capsular tiene una composición química diferente al que se encuentra en B. fragilis. (14,206)

Estudios posteriores de Kasper muestran que otras especies de Bacteroides poseen un material capsular de composición química diferente, que no promueve la formación de abscesos. (86) Es importante considerar en estos resultados, que la cápsula se pierde en los subcultivos, al realizar estudios de la estructura o de la inmunidad de B. fragilis. (5,

89)

De forma similar, se ha encontrado en la especie B. melaninogenicus ssp asaccharolyticus una cápsula de polisacárido demostrable por microscopía electrónica, con rojo de rutenio y anticuerpos marcados con ferritina. (132,133) Este antígeno mostró ser específico de subespecie por inmunofluorescencia indirecta. (33)

Se ha demostrado que B. melaninogenicus es capaz de producir abscesos y es posible que un polisacárido sea responsable, al menos en parte, de la virulencia del microorganismo en forma análoga al antígeno capsular de B. fragilis. (131,133)

Se ha sugerido que el 90% de las cepas de B. fragilis comparten un antígeno capsular común. Kasper (1979) utilizando un suero dirigido contra el antígeno capsular, obtuvo una sensibilidad de 100% y una especificidad de 90.3% en la identificación de B. fragilis en una prueba de inmunofluorescencia indirecta. (84) Sin embargo, estudios recientes muestran que el antígeno común es el lipopolisacárido y la prueba de inmunofluorescencia, utilizando un suero dirigido contra el lipopolisacárido, detecta un 88% de las cepas de B. fragilis, en comparación con el dirigido contra el polisacárido capsular, con sólo el 50%.

Estos resultados sugieren la presencia de un determinante antigénico mayoritario entre las cepas de esta especie que es el lipopolisacárido, lo cual correlaciona con la caracterización química de estos antígenos, en los que se encontraron diferencias importantes por inhibición de ELISA. (122,229)

Los sueros dirigidos contra el lipopolisacárido son fuertemente específicos de tipo utilizando la técnica de inmunodifusión e inmunofluorescencia directa, ya que un 90-93% de las cepas probadas se identificaron

con estos conjugados, en los cuales no se observó reacción cruzada con B. thetaiotaomicron, B. vulgatus, B. distasonis y B. ovatus. (100,144) Se obtiene una correlación de 90% entre la inmunofluorescencia directamente en muestras clínicas y los métodos de cultivo. (61)

Recientemente se ha producido un equipo comercial, Fluoretec, de Pfizer Diagnostics, el que contiene un suero polivalente obtenido en conejo y dirigido contra B. fragilis, B. vulgatus, B. distasonis, B. ovatus y B. thetaiotaomicron (Fluoretec-F) y otro dirigido contra B. melaninogenicus, B. intermedius y B. asaccharolyticus (Fluoretec-M) Estos sueros están conjugados con isotiocianato de fluoresceína que permite la inmunofluorescencia directa de especímenes clínicos. (200)

El equipo contiene controles positivos de los dos grupos de Bacteroides fijados con formalina. Incluye también gamma-globulina humana y gamma-globulina de conejo conjugadas con rodamina B (prestaina), que reacciona con los microorganismos que contienen proteína A, principalmente S. aureus, y se bloquea la reacción no específica con la porción Fc del anticuerpo fluoresceinado. Los reactivos cubren las especies de Bacteroides de interés clínico con la excepción de B. corrodens.

La presencia de otras bacterias aerobias, facultativas y anaerobias no influyen el resultado de la prueba. (61,158) Varios autores han evaluado este método comercial comparándolo con los métodos convencionales de identificación. (Tabla 5)

Puede encontrarse una concordancia completa entre el método de inmunofluorescencia y la identificación convencional por frotis de colonias aisladas y frotis de hemocultivos positivos. Combinando la detección radiométrica de bacteremia con la técnica de inmunofluorescencia, es posible dar un resultado presuntivo de bacteremia por B. fragilis en 12 ho-

Fluoretec-F	sensibilidad	especificidad	correlación con cultivo
Slack y cols (200)	80.9%	98.0%	-
Nakou y cols (153)	96.0%	97.0%	-
De Girolami y cols (38)	92.5%	97.7%	-
Holland y cols (74)	98.0%	-	-
Wills y cols (236)	50.0%	98.0%	-
Labbé y cols (97)	-	-	87.39%
Weissfield y cols (230)	-	-	88.0%
Fluoretec-M			
Slack y cols. (200)	95.5%	97.9%	-
Nakou y cols (158)	87.5%	99.0%	-
Holland y cols (74)	100.0%	100.0%	-

Tabla 5 Evaluación del equipo Fluoretec

ras. (33) La frecuencia reportada para B. melaninogenicus en hemocultivos no es suficientemente alta para justificar un ensayo de rutina con este método. (74)

Los resultados obtenidos confirman lo encontrado en otros estudios en que se observa una baja sensibilidad de este equipo comercial para detectar B. ovatus, B. vulgatus y B. distasonis. (38,74) Estas especies no son aislamientos frecuentes en muestras clínicas y cuando llegan a observarse están junto con B. fragilis y B. thetaiotaomicron y su importancia como patógenos no está bien establecida. (38)

Este estudio reveló una aparente reactividad cruzada con dos cepas de B. eggerthi, lo que no es sorprendente en vista de la homología de DNA que se presenta entre esta especie, cepas de B. uniformis y B. fragilis eps (B5-21). B. eggerthi es parte de la flora normal y no se ha reportado como agente causal en infecciones.

Cuando se prueban cultivos puros, se observan reacciones falsas positivas con estafilococos y con esporas de C. ramosum; la morfología en estos casos permite la eliminación de cualquier error diagnóstico. (97)

B. bivius y B. disiens parecen estar relacionados con B. melaninogenicus y en ocasiones se presenta reactividad cruzada. (97,230)

El reactivo polivalente y monovalente de Fluoretect-M no detecta las cepas de B. asaccharolyticus de origen oral, por lo tanto se pueden generar falsos negativos en estudios de especímenes de la cavidad oral y de otros sitios en que la infección ha tenido su origen ahí. (153) Otros estudios han mostrado diferencias morfológicas e inmunológicas importantes entre estas dos cepas de B. asaccharolyticus puesto que las ce-

pas orales presentan un material capsular denso, demostrado por microscopía electrónica e inmunofluorescencia. (101,128,153,183)

Recientemente se ha propuesto que las cepas de origen oral se incluyan en una nueva especie, B. gingivalis, pues no comparten homología de DNA, ni composición de ácidos grasos celulares con B. asaccharolyticus.

Wills comparó un suero polivalente dirigido frente a especies del grupo B. fragilis (suero de Barts) con el suero comercial que se ha descrito. El suero de Barts fué más sensible, (80%) pero menos específico (88%) que el equipo Fluoretoc que mostró una sensibilidad de 50% y especificidad de 98%.

Esta baja sensibilidad puede deberse a que solo se emplea un paso de tinción, que acorta y simplifica mucho el método.

La probabilidad de que un valor negativo en inmunofluorescencia sea corroborado como tal por cultivo, para el suero de Barts es de 92% y de 75% para el equipo, indicando esto que una prueba negativa con el suero de Barts es un índice confiable de ausencia del grupo B. fragilis en muestras clínicas y así puede llegarse a una aproximación más racional.

(236) Este último posee una multiplicidad de antígenos, como se ha demostrado por la presencia de varios serotipos relacionados con el antígeno somático. Es posible entonces que la presencia de resultados falsos negativos se relacione a la ausencia de un antígeno al preparar el suero; pueden existir variaciones geográficas en la prevalencia de serotipos, por lo que debe seleccionarse una combinación adecuada de sueros en la elaboración de un reactivo polivalente de tal manera que las características cubran adecuadamente el rango de determinantes antigénicos encontrados en las cepas locales de Bacteroides. (11,103)

En lo referente al género Clostridium, Walker y Batty utilizando inmunofluorescencia directa encontraron que era posible por este método diferenciar tres grupos importantes dentro de la especie C. botulinum: las cepas proteolíticas de los tres tipos toxigénicos A, B y F; las no proteolíticas de los tipos C y D, y las cepas no proteolíticas del tipo B. Sin embargo, observaron reacciones cruzadas con el primer grupo y C. sporogenes. (224)

Más tarde Vidura y cols reportaron también la identificación de los tipos A, B y E de C. botulinum por inmunofluorescencia. Los sueros dirigidos contra las formas vegetativas de los microorganismos resultan ser específicos y sensibles y no se encuentran reacciones cruzadas con otras especies de Clostridium. (146)

Ya que existe la posibilidad de encontrar cepas no toxigénicas, la presencia de la toxina debe confirmarse por pruebas de protección en animales. Los autores proponen al método como una prueba presuntiva útil en estudios epidemiológicos donde hay que manejar gran cantidad de muestras. (146)

En un estudio reciente se prepararon sueros fluorescentes dirigidos contra cepas representativas de dos grupos toxigénicos de C. botulinum: Grupo I, cepas proteolíticas de los tipos A, B y F; Grupo II, cepas no proteolíticas de los tipos B, E y F. Se prepararon reactivos adicionales, uno dirigido frente a C. sporogenes y otro frente a C. botulinum tipo G, que se evaluaron con 200 cepas de C. botulinum y 64 cepas de otras especies de Clostridium.

Cada reactivo dió una prueba positiva con las cepas de su grupo homólogo, observándose algunas reacciones cruzadas entre diferentes tipos toxigénicos dentro de un mismo grupo fisiológico y con menos frecuencia entre

diferentes grupos fisiológicos.

La reactividad cruzada del tipo F con C. perfringens limita su utilidad, pues generalmente esta especie está presente en el tipo de muestras que se examinan. Algunos de los reactivos dan una reacción positiva con cepas no toxigénicas, por lo que se requieren pruebas en ratones para confirmar la presencia y el tipo específico de la toxina. (56)

Los reactivos que se describen, particularmente el dirigido al grupo I son útiles como una prueba presuntiva en la identificación de C. botulinum, especialmente en el botulismo infantil. (56)

Se ha reportado la diferenciación entre las dos especies relacionadas C. chauvoei y C. septicum por inmunofluorescencia y este método se aplica a su identificación en cultivos, secciones de tejido y frotis de lesiones, ya que los conjugados utilizados no dan una reacción positiva ni con otras especies de Clostridium, ni con bacterias aerobias y facultativas. (8)

La detección por inmunofluorescencia de C. difficile directamente en muestras fecales se ha comparado con los resultados obtenidos por cultivo y análisis toxigénicos. (237) El conjugado fluorescente presenta reactividad cruzada con C. sordellii, C. bifermentans, C. chauvoei y C. sporogenes. La adsorción del suero conlleva a una pérdida de reactividad frente a otras especies de Clostridium, pero también frente a C. difficile, lo que sugiere que se necesitan más estudios sobre la serología de esta especie para desarrollar un suero específico que cubra los diversos serotipos que pueden encontrarse, se ha reportado una sensibilidad de 86% y la probabilidad de un resultado positivo corroborado por cultivo de 97% para la detección de C. difficile por inmunofluorescencia. (237)

En los pacientes con diarrea asociada a antibióticos los resultados de cultivo e inmunofluorescencia correlacionaron en un 93%. Sin embargo en un 65% de las muestras de personas sanas en quienes no se pudo cultivar C. difficile, se obtuvo la prueba positiva por inmunofluorescencia.

No obstante, se considera que este método es útil como una prueba presuntiva en este padecimiento. (237)

Porschen y Spaulding obtuvieron conjugados fluorescentes dirigidos frente a cinco especies prevalentes de cocos anaerobios en muestras clínicas: P. prevottii, P. anaerobius, P. intermedius, P. asaccharolyticus y P. magnus. (174) Los conjugados dirigidos contra las cuatro primeras especies que se mencionan, mostraron un alto grado de especificidad de cepa.

El conjugado dirigido frente a P. magnus detectó un antígeno especie-específico y las reacciones cruzadas que se presentaron con P. anaerobius se eliminaron por adsorción de los sueros. También se detectaron ocasionalmente reacciones cruzadas con las cepas homólogas, lo que sugiere la presencia tanto de antígenos comunes como de diferentes serotipos en cada una de las especies. (174,239)

Estudios posteriores han demostrado también que los géneros Peptococcus, Peptostreptococcus y Streptococcus son serológicamente distintos y que no se observan reacciones cruzadas entre ellos cuando se utilizan sueros adsorbidos. (58,59,239)

No existen reportes de la utilización de estos conjugados directamente en muestras clínicas, sin embargo, los resultados de especificidad obtenidos de los sueros, sugieren que pueden utilizarse para la clasificación serológica como un medio rápido de identificación. (58,239)

El método de inmunofluorescencia puede adaptarse fácilmente en el laboratorio, es específico y con un margen de error limitado; los resultados pueden obtenerse en una a dos horas. Además, no está limitado por el tipo de muestra de que se disponga, contaminación por flora saprofitica o tiempo de procedimiento en el manejo de la muestra. (74,97)

III IDENTIFICACION POR CONTRAINMUNOELECTROFORESIS

La aplicación de la inmunoprecipitación al estudio de los antígenos bacterianos hizo que el campo de la serología se comenzara a desarrollar durante la primera parte del siglo XX. (23)

En 1946 Oudin describió un sistema de difusión aislada del antígeno y el anticuerpo en tubos llenos de agar. Este adelanto pronto fué seguido por la descripción clásica de Ouchterlony de la doble difusión en capas de agar sobre laminillas, método que todavía tiene amplio uso y se aplica en la identificación y análisis de sistemas precipitantes antígeno-anticuerpo. (28,148)

Las técnicas de inmunodifusión se basan en el principio de que las macromoléculas pueden difundir libremente a través de geles, estando dicha difusión limitada por la concentración del gel. (135) Empleando soportes adecuados, en especial aquéllos que tienen como base agar dicueto en electrolitos, es posible hacer migrar antígenos y anticuerpos, de modo que al encontrarse interaccionen. La reacción que se origina se visualiza como bandas de precipitación, que permanecerán estables mientras una afluencia mayor de los reactivos no provoque redisolución. (51, 135,148)

En la inmunodifusión simple, el antígeno o el anticuerpo permanece fijo y el otro reactivo se mueve y se acopla a él, mientras que en la inmunodifusión doble, ambos reactivos están libres para moverse uno hacia el otro. El movimiento en cualquier forma de inmunodifusión puede ser lineal o radial. (28,148)

Los métodos de precipitación en gel que dependen sólo de la difusión mo-

lecular para poner en contacto a los reactivos, tienen una baja sensibilidad, además de requerirse un tiempo prolongado, de 24 a 48 horas, para que pueda detectarse la precipitación. Esto se debe a que una proporción alta tanto del antígeno como del anticuerpo difunden en otras direcciones, de tal forma que las cantidades de los reactivos que finalmente participan en la reacción es pequeña. (51,148)

La formación de líneas de precipitación en cualquier sistema de inmunodifusión depende grandemente de las concentraciones de antígeno y anticuerpo; la precipitación máxima se forma en la zona de equivalencia con cantidades decrecientes de la misma en las zonas de exceso del antígeno o del anticuerpo. Otros factores que afectan la reacción son los electrolitos utilizados como amortiguador, el pH y la temperatura. (28,135,148)

La probabilidad de que el antígeno y el anticuerpo se encuentren, se puede aumentar si se impulsan ambos mediante corrientes eléctricas, y por lo tanto, también aumentará la velocidad de aparición de una línea de precipitación. (28,148)

Aunque se han descrito numerosas variaciones de los métodos que combinan la electroforesis con la difusión, solo dos han logrado, hasta la fecha, un grado apreciable de aplicabilidad clínica y son la contrainmunolectroforesis (CIE) o electroinmunodifusión doble y la electroinmunodifusión única dimensional o electroforesis en cohete de Laurell. (135)

La CIE también se conoce como electroforesis en contracorriente, electro precipitación, inmunoosmoforesis, electroforesis por sobrecruzamiento, electrosinéresis e inmunolectroosmoforesis. (148)

El principio básico del método implica la electroforesis en un gel con

con el antígeno y el anticuerpo corriendo en direcciones opuestas de manera simultánea a partir de pozos separados, con la precipitación resultante en un punto intermedio a sus orígenes. (28,51)

La migración electroforética de una partícula depende de varios factores como son: el voltaje aplicado, la fuerza iónica del amortiguador y el pH del medio, que influyen en la carga eléctrica de dicha partícula. (28,135) Debido a que el agar no es una sustancia absolutamente neutra, acompaña a la electroforesis un fenómeno secundario, llamado electroendosmosis, que consiste en un movimiento del líquido que está embebido en el gel en el sentido opuesto al de la corriente eléctrica. Este movimiento es regular y no interfiere en los desplazamientos por electroforesis.

Si estas dos migraciones son iguales tendremos la impresión de que la partícula no se ha movido; en cambio, su movilidad será la del sentido de la corriente, aunque más reducida, si sus moléculas están fuertemente cargadas. Las moléculas poco cargadas son desplazadas por electroendosmosis en sentido contrario al de su migración electroforética real. Las sustancias neutras solo son movilizadas por la corriente endosmótica y ocuparán después de la corrida electroforética, una posición que correspondería al punto cero de migración. (135)

Durante la electroforesis en un medio con pH alrededor de 8, las gammaglobulinas, no obstante estar cargadas negativamente, se desplazan hacia el cátodo como consecuencia del flujo endosmótico originado por el proceso. Las proteínas antigénicas en esas condiciones migrarán en dirección anódica. (135,148) Por lo tanto, la contrainmunolectroforesis sólo se aplica cuando el antígeno y el anticuerpo tienen un pH isoelectrónico.

trico con una diferencia significativa y utilizando un amortiguador con un pH intermedio entre estos dos valores. (28,135) Para favorecer el fenómeno electroendosmótico se utilizan soluciones amortiguadoras con diferente fuerza iónica para la cámara de electroforesis y para preparar el medio de sostén. (135)

El medio de difusión debe estar libre de impurezas, ya que si las mismas son de carácter antigénico pueden interferir con los resultados. Se ha comprobado que la agarosa es el soporte más adecuado para la CIE, ya que permite el desarrollo adecuado de la electroendosmosis. (135)

Generalmente se utilizan soluciones amortiguadoras con un pH comprendido entre 8.2 y 8.6, de los cuales los más comúnmente empleados son el barbital y el veronal. La fuerza iónica del amortiguador incide sobre la velocidad de migración de las partículas: si es baja, las moléculas migran más rápidamente por lo que se reduce el tiempo de corrimiento; sin embargo, una fuerza iónica alta permite una delimitación más clara de las zonas de precipitación. (135,148)

La CIE utiliza el voltaje más elevado posible para lograr la máxima separación de los componentes, reduciendo el tiempo de corrimiento. Lo anterior tiene la ventaja de reducir al mínimo la difusión libre de los reactivos, sin embargo, un voltaje excesivo produce una gran cantidad de calor que puede provocar la desecación del medio de soporte y por lo tanto la distorsión de las bandas de precipitación. Debe lograrse un balance entre la fuerza iónica del amortiguador y el voltaje aplicado para lograr una buena resolución, con la mínima producción de calor. (28,135,148)

La claridad de las bandas de precipitación obtenidas puede aumentarse agregando dextrano T-70 en una concentración final en el gel de 4%, lo

cual reduce la solubilidad de complejos inmunes e incrementa por lo tanto la resolución del método. (198)

Otro factor que debe ser controlado es el amperaje generado, que no debe exceder de los valores que se han determinado previamente, para evitar una producción excesiva de calor. (135) Los sueros inmunes deben probarse previamente en cuanto a sensibilidad y especificidad y es recomendable incluir controles positivos y negativos para comprobar que los resultados obtenidos no se deben a artefactos producidos por algunos de los componentes del sistema. (28,148)

Las placas inicialmente usadas por Grabar para los corrimientos electroforéticos eran muy grandes, lo que significaba el empleo de mucho tiempo y el consumo de apreciables cantidades de suero. Scheideger propuso más tarde el empleo de portaobjetos como soportes y desarrolló un método llamado microinmunolectroforesis, que es el que se emplea actualmente.

La CIE puede producir líneas visibles de precipitación en 20 a 45 minutos y es aproximadamente 10 a 100 veces más sensible que la inmunodifusión doble. Sin embargo, solo pueden obtenerse resultados semicuantitativos debido a la dificultad de precisar el punto final de la reacción.

Aplicaciones en el diagnóstico de anaerobios

Welch en 1980 reportó un método de CIE para detectar la toxina de C. difficile, con una sensibilidad comparable a la obtenida en el ensayo de citotoxicidad. Como fuente de antígeno se utiliza el filtrado de un cultivo de 48 horas en medio de carne picada-glucosa. (228)

Si la muestra se siembra primeramente en un medio selectivo para C. difficile, se incuba por 24 horas y más tarde se transfiere al medio carne picada-glucosa, después de otras 24 horas es posible detectar la toxina en el filtrado de cultivo. (54) De esta manera se evitan las reacciones cruzadas que se presentan con C. sordellii y C. bifermentans en la técnica original. Los resultados negativos deben confirmarse con pruebas para buscar la toxina a las 48 y 72 horas de incubación en este caso. (54,228)

Ryan en 1980 comparó los resultados obtenidos en la detección de la toxina de C. difficile en muestras fecales por CIE con los de aislamiento e identificación convencionales y citotoxicidad. Encontró una buena correlación entre los resultados obtenidos por CIE, la identificación con los métodos de referencia y los datos clínicos de enteritis asociada a antibióticos.

En algunas muestras positivas por CIE, pero negativas en la prueba de citotoxicidad, se demostró la toxina en el filtrado de cultivo del microorganismo aislado; ya que la sensibilidad de los dos métodos es equivalente, este resultado puede deberse a que la dilución adicional necesaria en la prueba de citotoxicidad es crítica cuando sólo están presentes pequeñas cantidades de toxina. (191)

No obstante, en la literatura se encuentran varios reportes que indican que la técnica de CIE para detectar la toxina de C. difficile en las condiciones en que Ryan y Welch han descrito, no es satisfactoria para la detección de cepas toxigénicas de esta bacteria. (81,96,119,178,193)

Poxton y Byrne indican que probablemente el antígeno que se está midiendo es un antígeno de superficie, ya que algunas cepas no toxigénicas de

C. difficile y las especies C. bifermentans y C. sordellii son positivas por CIE, pero dan una prueba de citotoxicidad negativa. (178)

Sin embargo, Jarvis y cols han encontrado que las especies C. bifermentans y C. sordellii no son responsables de las reacciones falsas positivas cuando se analizan muestras fecales. (80)

Varios autores han reportado estudios en que se compara el ensayo de citotoxicidad y la CIE en la detección de la toxina de C. difficile y han obtenido un alto porcentaje tanto de falsos positivos como de falsos negativos, lo que se atribuye a que el anticuerpo utilizado no es específico para la toxina, por lo que la prueba no es confiable. (81,119)

Estudios recientes de evaluación del método llegan a la conclusión de que no tiene la sensibilidad ni la especificidad requeridos para ser empleado con fines diagnósticos. (96,113)

West y Wilkins encontraron múltiples antígenos no toxigénicos haciendo reaccionar extractos crudos de C. difficile con la antitoxina del VPI (Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute) por el método de inmunoelectroforesis, de lo que se desprende que están presentes en esta preparación, varios anticuerpos además de la antitoxina, que es la que se ha empleado en los trabajos ya mencionados. (191,228,231)

Por otro lado, utilizando la toxina A purificada, se observa que la cantidad mínima detectable es de 30 $\mu\text{g/ml}$, lo que equivale a un título de citotoxicidad de 10^4 ; sin embargo, una preparación cruda de toxinas A y B podría tener un título de citotoxicidad de 10^7 o más. Generalmente las muestras que se analizan tienen títulos de citotoxicidad entre 10^3 y 10^4

por lo que la toxina A no puede ser detectada en este caso. Si se toma en cuenta que las preparaciones de la toxina B con títulos citotóxicos de 10^8 dan una reacción negativa por CIE, se llega a la conclusión que en realidad se están demostrando los antígenos de superficie de C. difficile y no sus toxinas. (231)

No obstante, varios de los trabajos mencionados coinciden en afirmar que la técnica de CIE en la detección de la toxina de C. difficile es potencialmente útil, siempre que se logre producir un anticuerpo específico y aumentar la sensibilidad del método en general. (81,96,193,231)

Por otro lado, Ryan y cols han argumentado que si estos autores no son capaces de obtener los resultados que él ha reportado es porque la técnica que él propone no ha sido seguida fielmente. (190,216)

En otro estudio en que se evalúa este método respecto al de referencia, que es el ensayo de citotoxicidad, en 471 muestras fecales, la sensibilidad y especificidad de la CIE fué baja, pero se indica que puede ser útil como una prueba presuntiva en la que un resultado negativo es un buen indicador de la ausencia de la toxina. (240)

La enterotoxina de C. perfringens puede detectarse por CIE. Se encuentra una relación lineal entre la concentración de enterotoxina y el título de la toxina obtenido por CIE y determinado por la más alta dilución de la misma que produce una banda de precipitación. Esto permite la cuantificación de la enterotoxina basándose en el título obtenido con una preparación estándar de concentración conocida. (156)

Utilizando CIE, el límite de detección es de $0.2 \mu\text{g/ml}$, siendo la sensibilidad mayor que en otros métodos que se emplean como la electroinmuno-difusión ($1.0 \mu\text{g/ml}$), la difusión simple ($3.0 \mu\text{g/ml}$) y la formación de

eritema en animales (3.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$). (156) Esta técnica se ha aplicado en la titulación de la antienterotoxina, la detección de la toxina en extractos de alimentos y en sobrenadantes de cultivo, con lo que se puede clasificar a las cepas como altas o bajas productoras de la toxina.

(156)

En un estudio posterior realizado en individuos involucrados en un brote comprobado de envenenamiento por C. perfringens y en un grupo control, se aplicó la CIE para la detección de la enterotoxina en muestras fecales y de la antienterotoxina en suero. La enterotoxina pudo demostrarse en muestras fecales colectadas un día después de aparecidos los síntomas en los pacientes. En contraste, la enterotoxina no fué demostrada en muestras de individuos aparentemente sanos con bajo y alto riesgo de exposición al microorganismo o a su toxina, como tampoco en muestras colectadas 4 o 5 días después del brote. Por lo anterior, la demostración de la toxina solo es posible si se realiza tan pronto como se manifiesta la enfermedad o en cultivos del microorganismo después de 24 horas. (157)

Se encontró un 100% de prevalencia de la antienterotoxina en el suero de voluntarios con alto y bajo riesgo de exposición, lo que sugiere que es común el contacto con esta bacteria o con la toxina preformada, o que C. perfringens de la flora normal produce suficiente toxina como para inducir una respuesta inmune sin que se presente la enfermedad. (157)

La CIE se ha utilizado para detectar anticuerpos dirigidos frente a B. fragilis como una ayuda en el diagnóstico de las enfermedades causadas por este microorganismo. Se ha encontrado que los anticuerpos puede detectarse siete a diez días después de que se manifiestan los síntomas.

Una prueba positiva por CIE indica infección actual, pero un resultado negativo no es concluyente. (167)

IV IDENTIFICACION POR ENSAYO INMUNOENZIMATICO

El ensayo inmunoenzimático (EIA) ha surgido como una técnica cuantitativa para la detección de antígenos y anticuerpos. Utiliza reactivos inmunológicos ligados a enzimas, unidos a una fase sólida por una serie de reacciones antígeno-anticuerpo y medidas por la reacción enzimática con el sustrato. (28) Ya que una sola molécula de enzima puede catalizar la conversión de una gran cantidad de moléculas de sustrato, el uso de una enzima en el sistema nos da un aumento en la sensibilidad del método. (148,212)

Las enzimas utilizadas catalizan reacciones que dan lugar a productos coloridos, que pueden medirse visualmente o utilizando un colorímetro. La disponibilidad de colorímetros para placas de microtitulación ha hecho posible que este método pueda adaptarse a trabajos con gran número de muestras. (28,242)

El ensayo inmunoenzimático ofrece las ventajas del radioinmunoensayo como son la sensibilidad (de ng/ml) y una medición objetiva del resultado, sin los problemas del manejo de agentes radioactivos y el peligro de radiación. (148,242)

Por estas razones el ensayo inmunoenzimático ha encontrado amplio uso en la cuantificación de antígenos bacterianos, virales, parasitarios y fúngicos, así como también de inmunoglobulinas, hormonas, fármacos, proteínas séricas y antígenos tumorales. (28,51,242)

Un factor limitante de este método es que requiere un mayor tiempo de procedimiento en comparación con otros métodos como la inmunofluorescencia, contraelectroforesis y aglutinación en látex. (242)

Las dos variantes más ampliamente empleadas del inmunoensayo son la competitiva y la no competitiva. (148,242)

El ensayo competitivo con antígeno marcado se ha utilizado para la medición de moléculas pequeñas como fármacos, hormonas y lípidos en fluidos corporales y generalmente no puede utilizarse en las enfermedades infecciosas, pues generalmente no se dispone de antígenos purificados en cantidad suficiente. (242)

Sin embargo, sí pueden obtenerse anticuerpos en cantidades considerables por inmunización con estos antígenos, utilizándolos en ensayos con anticuerpo marcado con enzimas.

El EIA con anticuerpos marcados se puede realizar de una forma competitiva o no competitiva, y en ambos casos es necesario separar el anticuerpo unido del no unido, lo que se logra inmovilizando uno de los reactivos en una fase sólida como una placa de microtitulación o papel filtro. (148,212)

La forma más simple de un ensayo no competitivo se lleva a cabo uniendo un anticuerpo a la fase sólida; después de la remoción del anticuerpo no unido, se agrega la muestra a analizar en un amortiguador de pH y fuerza iónica apropiados, además de una fuente de proteína, con el objetivo de saturar los sitios en que no se ha unido anticuerpo y disminuir así la adsorción no específica de los inmunorreactivos. (148,242)

El material que no ha reaccionado se elimina por lavados y se agrega entonces un anticuerpo marcado. Se elimina el anticuerpo no unido y se agrega el sustrato para la enzima, siendo la cantidad de antígeno proporcional a la actividad enzimática, que se determina por la comparación de

la reactividad de la muestra problema con la de controles positivos y negativos apropiados. (242) Una limitación de esta técnica es el uso de diferentes conjugados específicos para cada antígeno, si se toma en cuenta que la conjugación de los anticuerpos es difícil de llevar a cabo. (148,212)

El sistema indirecto evita este problema, ya que utiliza un segundo anticuerpo no marcado y una antiglobulina marcada dirigida frente a la especie en que se obtuvo el segundo anticuerpo. También puede utilizarse proteína A estafilocócica marcada, en el caso de que el segundo anticuerpo se prepare en una especie apropiada.

Usualmente el método indirecto es más sensible que el directo debido a que pueden reaccionar varias moléculas de antiglobulina con una sola molécula de anticuerpo. (148,242) Sin embargo, tiene la desventaja de requerir anticuerpos obtenidos en dos diferentes especies animales, lo que es necesario para prevenir interacciones no específicas entre las antiglobulinas marcadas y el anticuerpo unido a la fase sólida o con el primer anticuerpo. (242)

Otro método no competitivo, se basa en la reactividad de C_{1q} con complejos inmunes. C_{1q} se une a la fase sólida y se hace reaccionar con la muestra problema previamente tratada con el anticuerpo específico. Los complejos antígeno-anticuerpo se unirán a C_{1q} , no así el anticuerpo libre y pueden detectarse agregando un anticuerpo marcado específico, en una forma directa o una antiglobulina marcada dirigida contra la especie en que se obtuvo el anticuerpo. (212,242)

Este método tiene la ventaja de ser más rápido, sin embargo, puede ser inhibido por complejos antígeno-anticuerpo endógenos, lo que hace decre

cer la sensibilidad. Estos complejos pueden ser eliminados por centrifugación, cromatografía y absorción con C_{1q} . (242)

En los métodos competitivos, un antígeno purificado se une a la fase sólida y se hace reaccionar con la muestra previamente tratada con el anticuerpo específico marcado en una cantidad determinada, se mide la cantidad del anticuerpo que no reacciona por su unión al antígeno en la fase sólida.

Este sistema tiene la ventaja de que no requiere tantos pasos de incubación como los ensayos no competitivos y se emplea un solo anticuerpo marcado.

No obstante, la presencia de anticuerpos en la muestra puede interferir con la prueba dando un resultado falso positivo. El anticuerpo puede ser eliminado por varias técnicas fisicoquímicas, pero en ese caso, el método no puede utilizarse como un ensayo rápido. Pueden emplearse técnicas rápidas de desnaturalización de proteínas para eliminar los anticuerpos presentes sólo cuando el antígeno que se busca es un polisacárido estable. (212,242)

Los métodos no competitivos muestran ser los más sensibles de los ensayos inmunoenzimáticos; los métodos con C_{1q} y los no competitivos, son útiles en situaciones donde no se requiere una sensibilidad extrema y la forma no competitiva es muy lenta para ser clínicamente útil. El método competitivo sirve también en situaciones donde no puede obtenerse un anticuerpo altamente purificado pero si está disponible un antígeno purificado.

(242)

Conjugación del anticuerpo con la enzima

El marcado de anticuerpos con peroxidasa fue introducido por Nakane y Pierce desde 1967 utilizando 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrosulfona. También se han ensayado otros reactivos bifuncionales como carbodiimida, tolueno 2,4 diisocianato, o-dianisidina tetrazotizada, benzoquinona y m-maleido benzol-N-hidrosuccinimida. Avrameas en 1969 introdujo el glutaraldehído para el mismo propósito. (64,148)

El procedimiento de conjugación más simple en un solo paso, presenta la desventaja de que se forman simultáneamente polímeros de la inmunoglobulina y de la enzima y la proporción del conjugado enzima-inmunoglobulina que se obtiene es baja, por lo que se prefiere el método en dos pasos, en el que la enzima se expone primero al glutaraldehído y después de eliminar el exceso de éste, se tiene una enzima activada que reacciona con la inmunoglobulina. (28,64,148)

Si bien este método no parece que aumente la eficacia de la agregación anticuerpo-enzima, definitivamente reduce la posibilidad de polimerización de la inmunoglobulina. (28,64,148)

En 1974, Nakane y Kawaii introdujeron un método de conjugación más eficiente, con peryodato. (64) El procedimiento consiste en la oxidación parcial de grupos oligosacárido, que genera grupos aldehído, los cuales reaccionan en un segundo paso con los grupos amino alfa y epsilon de la inmunoglobulina para formar una base de Schiff, la cual se estabiliza por reducción con borohidruro de sodio. Los grupos amino libres de la peroxidasa pueden ser bloqueados durante ambos pasos de la conjugación con fluoronitrobenzeno. Este método permite obtener un 90 a 95% de la inmunog

globulina marcada con peroxidasa, lo cual es importante ya que la que no fué marcada compite con el conjugado por los sitios de unión con el antígeno; este bloqueo aumenta, además, por el alto peso molecular de los conjugados. (28,148)

Las enzimas utilizadas en estos sistemas tienen un peso molecular de 40,000 a 200,000 y al unirse con la inmunoglobulina se modifica el sitio de unión del antígeno con el anticuerpo y el sitio de unión de la enzima con el sustrato por impedimento estérico. (242)

Después de la conjugación, la actividad enzimática de los conjugados no disminuye significativamente si se le compara con la de las enzimas antes de la conjugación. Por el contrario, la capacidad del anticuerpo para reaccionar con el antígeno específico suele ser menor que en el caso de los conjugados fluorescentes, (64,148,212) por lo que solo es adecuado para la conjugación el anticuerpo altamente purificado, logrando la afinidad cromatográfica o la inmunoadsorción completa. (148)

Por otro lado, la reacción se amplifica por la actividad relativamente alta de la enzima, lo que da una sensibilidad total o comparable, o aún más alta, que la homóloga con anticuerpo conjugado a fluoresceína. (28, 64,148)

Otros métodos reducen significativamente la pérdida de actividad de anticuerpo y de enzima. Uno de ellos involucra la conjugación de una coenzima de bajo peso molecular al anticuerpo; después de la reacción antígeno-anticuerpo, la enzima se unirá a su coenzima, con lo que puede cuantificarse la reacción. La coenzima interfiere en menor grado con la reacción antígeno-anticuerpo, puede conjugarse al anticuerpo por métodos simples que no requieren agentes de unión potentes; además, puede

ser separada del conjugado por diálisis. (28,212,242)

El sistema con cofactores más utilizado es el de avidina-biotina. Esta última es una coenzima de peso molecular de 244 que puede unirse a anticuerpos por técnicas sencillas que utilizan biotinil-N-hidroxisuccinimida. Después de que el anticuerpo unido a biotina se adhiera a la fase sólida, se agrega la enzima marcada con avidina o un complejo que consiste de avidina marcada y enzima marcada con biotina. (28,212,242) Ya que la avidina tiene una alta afinidad por la biotina, el conjugado avidina-enzima se unirá eficientemente al complejo antígeno-anticuerpo biotina.

(212) Además, como la molécula de avidina puede unirse a cuatro moléculas de biotina, el sistema ofrece la posibilidad teórica de una sensibilidad aumentada debido a las interacciones múltiples avidina-biotina.

(212,242)

Otro método que se ha utilizado es la conjugación de la proteína A estafilocócica, que se une por simple agitación a pH neutro, a la fracción F_0 de la inmunoglobulina de varias especies animales, lo que interfiere poco con la unión del anticuerpo por la región Fab al antígeno.

La conjugación de la enzima a la proteína A conlleva a una pérdida relativa de sus actividades específicas, lo que puede superarse por la unión de la proteína A a un anticuerpo anti enzima. (28,212)

Esto último haría del sistema el más simple y rápido de los ensayos no competitivos, ya que involucra la mezcla de los reactivos bajo condiciones definidas de pH y temperatura, siempre que se tenga un anticuerpo de una especie y subclase, capaz de reaccionar con la proteína A del estafilococo. (212,242)

Los métodos que hacen uso de una vinculación por reacciones inmunes en-

tre el anticuerpo y la enzima fueron introducidos por Mason en 1969, y se basan en el uso de una molécula puente para acoplar el anticuerpo primario, específico para el antígeno, a la enzima. Ambos anticuerpos, el primario y el antienzima se obtienen en la misma especie; como puente entre estos dos anticuerpos se utiliza un anticuerpo específico para la inmunoglobulina de esta especie animal. (64,148)

Es esencial que el segundo anticuerpo esté presente en exceso, para permitir que uno de los sitios de combinación quede libre para la reacción con el anticuerpo antienzima. (64,148)

De esa forma los sitios de unión con el primero y el tercer anticuerpo son prácticamente iguales, de tal forma que si el segundo anticuerpo llega a unirse no específicamente a otro antígeno, no reaccionaría con el anticuerpo antienzima. (64)

Sterberger introdujo el uso de complejos enzima-antienzima, lo que aumenta la sensibilidad ya que disminuye la reversibilidad de la reacción.

(64)

Enzimas

Las enzimas utilizadas como marcadores deben cumplir con varios requisitos para ser empleadas como tales: ser estables en las condiciones del ensayo, tener una actividad específica alta, no estar presente en los líquidos biológicos en concentraciones que interfieran en el análisis y estar disponibles en un alto grado de pureza a un costo moderado. (28, 148)

Las enzimas de uso más común son la peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa y glucosa oxidasa. (28,51,242) Se han utilizado la β -D-galactosidasa y glucoamilasa en métodos espectrofluorométricos y la acetilcolinesterasa con ^3H -acetil colina. (148,242) La lizozima y deshidrogenasa glucosa-6-fosfato se utilizan en inmunoensayos enzimáticos homogéneos. (28,148)

En la detección de antígenos microbianos, las enzimas utilizadas son la peroxidasa y la fosfatasa alcalina. (242) La peroxidasa tiene un contenido de carbohidratos de 10-15%, lo que ofrece la posibilidad de llevar a cabo la conjugación con esta parte de la molécula, con lo que se logra una menor interferencia con la función enzimática. (64)

Los conjugados con peroxidasa se contaminan con facilidad y son sensibles a los agentes bacteriostáticos por lo que deben liofilizarse o almacenarse a temperaturas bajas. (238) Además, se ha encontrado que los sustratos que utiliza esta enzima, como la bencidina y la o-fenilendiamina son carcinogénicos, lo que restringe su uso. (51,238) Se han descrito sustratos fluorescentes para esta enzima, pero tienen la desventaja de ser inestables. (242)

La fosfatasa alcalina es estable y resistente a la acción de agentes bacteriostáticos; varios sustratos pueden utilizarse con esta enzima, que no tiene problemas para su manejo. Puede obtenerse con suficiente pureza, pero a un mayor costo que la peroxidasa, pues proviene de una fuente animal. (212,242)

La β -galactosidasa y glucosa oxidasa tienen actividades específicas menores, sin embargo, tienen la ventaja de estar ausentes de los fluidos corporales, por lo que se les utiliza en ensayos homogéneos. (242)

Una forma de incrementar la actividad específica efectiva de la reacción enzimática, involucra la unión de dos o más enzimas para producir una reacción amplificada; haciendo uso de la reacción antígeno-anticuerpo que da lugar a la conversión de aproximadamente 800 moléculas de C_3 a C_{3b} y utilizando un anticuerpo dirigido frente a C_{3b} marcado con una enzima diferente, se pueden detectar concentraciones diez a cien veces menores de antígeno. (242)

Reacción antígeno-anticuerpo

En los ensayos inmunoenzimáticos, la concentración del complejo antígeno-anticuerpo es proporcional a la concentración de antígeno, a la concentración del anticuerpo utilizado y a la constante de afinidad del anticuerpo. La sensibilidad depende en gran parte de la concentración del anticuerpo y de la avidéz de éste. (148,242)

En los ensayos no competitivos que involucran muchos pasos de lavado, la constante de afinidad del anticuerpo es particularmente importante. Se ha encontrado que anticuerpos que tienen una alta actividad en sistemas en fase líquida como fijación de complemento, no funcionan en un ensayo en fase sólida por su baja afinidad por los antígenos. (27,242)

El segundo factor importante es la concentración del anticuerpo específico; ya que muchos antígenos microbianos no pueden ser purificados en grandes cantidades, el anticuerpo obtenido, generalmente contiene cantidades muy pequeñas de inmunoglobulinas específicas, usualmente diez a treinta veces menores que la concentración total de inmunoglobulina. (238) Además, la concentración de anticuerpo disponible está limitada

por las propiedades de la fase sólida; esto es importante ya que el uso de anticuerpo a una concentración por debajo de la constante de afinidad, da por resultado el que solo una fracción del antígeno presente se una al anticuerpo. (27,148,242)

Debido a las posibles reacciones no específicas, en los inmunoensayos se deben incluir controles positivos y negativos apropiados, probando cada muestra problema con suero inmune y no inmune. El antígeno específico se manifestará por un incremento en la reactividad con el suero in mune, mientras que una actividad no específica estará dada por reactividad con ambos sueros, el inmune y el no inmune.

El procedimiento anterior permite calcular la actividad específica, basándose en la diferencia de reactividad con el control negativo, lo que expresa de forma exacta la cantidad de antígeno, más que la simple medición de la densidad óptica, además de aumentar la reproducibilidad y con fianza del método. (238)

En teoría, los anticuerpos monoclonales serían la solución para tener anticuerpos específicos en altas concentraciones, ya que incrementaría la sensibilidad y especificidad de los inmunoensayos. En la práctica, se ha visto que esto no se logra debido a las constantes de afinidad bajas de estos anticuerpos; además, la especificidad única con antígenos que tienen un solo sitio de unión no permitiría que un segundo anticuerpo se uniera en ensayos no competitivos. (28,242)

Fijación a la fase sólida

La unión del antígeno o del anticuerpo a la fase sólida se lleva a cabo

por adsorción hidrofóbica o por unión covalente. (51,148,242)

Para la adsorción física se han utilizado superficies de látex, poliestireno, polivinilo y celulosa en forma de tubos, discos, cuentas o placas de microtitulación. (148) El método consiste en incubar una solución del reactivo a una temperatura y por un tiempo adecuados; dependiendo del reactivo, se agrega como fijador acetona o glutaraldehído para hacer permanente la unión con el acarreador. (51,148)

Al tiempo de utilizarse, el exceso de antígeno se remueve por lavados con un amortiguador que contiene una cierta cantidad de proteína, como albúmina sérica bovina, con el objeto de saturar los sitios remanentes capaces de adsorber proteínas y un tensoactivo como Tween 20 que arrastra cualquier reactivo unido débilmente, con lo que previene la adsorción no específica de reactivos sucesivos. (51,148,242)

Uno de los problemas inherentes al uso de fases sólidas, es que la cantidad de anticuerpo que puede unirse está restringida por las propiedades físicas de éstas, entonces, la limitación en la concentración de anticuerpo restringe la sensibilidad del método, por lo que se ha buscado incrementar la capacidad de unión de los reactivos en varias formas.

(242)

Entre los métodos para unir químicamente los antígenos o anticuerpos a una fase sólida está la insolubilización de proteínas por polimerización por medio de agentes de unión cruzada como glutaraldehído y carbodiimidias y la conjugación química de proteínas a celulosa, con grupos funcionales p-aminobencil y bromoacetil que reaccionan con los residuos tiro-sil y los grupos amino de las proteínas, respectivamente. (148,212)

Un derivado de uso amplio es una matriz de carbohidrato activada con bro

muro de cianógeno, que a pH neutro se conjuga con facilidad a proteínas.
(148)

Sin embargo, una desventaja de este tipo de fases sólidas es que tienen una capacidad de adsorción no específica aumentada, con lo cual la especificidad del método se ve disminuida. (242)

Para ser útil en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas, el inmunoensayo enzimático requiere una mayor sensibilidad aunada a un menor tiempo de procedimiento, lo que puede hacerse aumentando la actividad del conjugado anticuerpo-enzima, la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo y la sensibilidad de la reacción enzima-sustrato. (148, 212,242)

Aplicación en el diagnóstico de anaerobios

Se ha demostrado que los complejos de la membrana externa de varias especies de Bacteroides contienen antígenos especie-específicos que pueden demostrarse por ELISA. (176)

Utilizando un ELISA indirecto, que emplea como antígenos, complejos de la membrana externa removidos con EDTA y sueros dirigidos frente a células viables de 21 especies de Bacteroides, se encontró que una alta proporción de las especies poseen antígenos específicos de especie, con reactividad cruzada poco significativa. (179)

Este sistema nos da una representación válida de todos los antígenos presentes en la superficie de células completas, que incluyen proteínas, lipopolisacáridos y material capsular. Ya que se utilizan diluciones

muy altas del suero, no se detectan moléculas que pueden dar reacción cruzada, como el lipopolisacárido, pues tienen una baja afinidad por los anticuerpos. (179)

En un estudio posterior de los antígenos de la superficie celular de B. fragilis, se demostró que los carbohidratos son los antígenos predominantes de la reacción cruzada y que la mayor parte de esta actividad está presente en el lipopolisacárido. Con el ELISA se detectan también antígenos termolábiles precipitables comunes a todas las cepas probadas. (32)

Los resultados indican que es posible identificar los antígenos de superficie especie-específicos para muchas especies de Bacteroides, especialmente dentro del grupo B. fragilis. Esto ya se ha logrado en el caso de B. vulgatus, en que el antígeno específico de especie es la proteína de la membrana externa y para B. fragilis, donde el polisacárido capsular aparece unido a la membrana y, por lo tanto, es susceptible de investigación por ELISA. (181)

Recientemente se ha descrito un método de ELISA para las especies orales de Bacteroides, que puede utilizarse después de tener los cultivos en placa. Consiste en aplicar una suspensión de células tratadas con formaldehído, a partir de placas de agar sangre o de medio de cultivo líquido, en placas de microtitulación, seguida de fijación con glutaraldehído; la identificación se realiza agregando suero específico conjugado a peroxidasa. (44) Se demostró que los sueros reaccionan solo con las cepas homólogas y que no se presentan reacciones cruzadas con otras especies de Bacteroides, Fusobacterium y Campylobacter. (44)

Yolken y cols (1981) reportaron un ensayo inmunoenzimático para la detec

ción de la toxina de C. difficile. Comparando este método con el cultivo anaerobio y las pruebas de citotoxicidad en 277 muestras de pacientes con colitis o gastroenteritis asociada a antibióticos, llegan a la conclusión de que este método es una alternativa útil a los métodos convencionales de identificación. (243) En este primer estudio no se mencionan las dos diferentes toxinas A y B de C. difficile. (213)

Utilizando anticuerpos purificados por cromatografía de afinidad, dirigidos contra la toxina A, es posible detectarla directamente en presencia de la toxina B, ya sea en sobrenadantes de cultivo o muestras fecales. (124) Se ha demostrado que la concentración de la toxina A determinada por ELISA, correlaciona muy cercanamente con los títulos citotóxicos de las toxinas A y B. (124)

En un estudio posterior en que se detectan específicamente las toxinas A y B, se llega a la conclusión que determinando la presencia de ambas se aumenta la sensibilidad del método hasta un 90%. (110) Se demostró que el ELISA para la toxina A es más sensible que el de la B, comparando ambos métodos con la prueba de citotoxicidad.

Además, en el ensayo para la toxina B, se encontró una baja reactividad con cepas no toxigénicas que la adsorción del suero no puede eliminar. (110)

En estudios anteriores, la incapacidad de detectar la toxina en muestras fecales se pudo deber a una desorción del anticuerpo de la fase sólida debida a enzimas proteolíticas, lo que puede evitarse con inhibidores de estas enzimas o agregando una fuente de proteína en el diluyente de la muestra. (110,124)

La determinación por ELISA de las toxinas A y B puede aplicarse en la

comparación de cantidades relativas de las mismas en diferentes poblaciones de pacientes, así como para el diagnóstico.

Para la detección de la toxina A de C. botulinum se ha reportado un ELISA que utiliza anticuerpos producidos en animales inmunológicamente tolerantes. De este modo se obtienen anticuerpos específicos para la toxina A sin necesidad de purificación subsecuente. El suero obtenido no presenta reactividad cruzada con filtrados de cultivos de variantes no toxigénicas de B, de los C, D, E, F y G, ni con otras especies de Clostridium incluyendo C. sporogenes.

Sin embargo, se encontró una considerable reactividad cruzada con cepas toxigénicas de tipo B. Se ha encontrado que C. botulinum tipo A produce tres toxinas progenitoras (12S, 16S, 19S) de las cuales solo dos están asociadas con el tipo B. Las toxinas derivadas al escindirse la toxina progenitora 16S, son la neurotoxina y una hemaglutinina no tóxica, que son específicas para cada tipo, pero los componentes no toxigénicos de los dos tipos están relacionados inmunológicamente. (39)

En este estudio el ELISA se comparó con el bioensayo en ratones: el más bajo nivel detectado por ELISA corresponde a menos de 10 DL₅₀. (39)

Más tarde, los mismos autores evaluaron la exactitud diagnóstica del método en casos de botulismo infantil. Esta prueba fué positiva en todas las muestras confirmadas convencionalmente, o sea por cultivo y ensayo de letalidad en el ratón. (41)

Los resultados positivos por ELISA en muestras que resultaron positivas por cultivo, pero en las que la toxicidad se evaluó como no específica, ya que no podía ser neutralizada por su respectiva antitoxina, sugieren que el ELISA puede ser más fidedigno en algunos casos que el ensayo en

animales. La especificidad del método fué de 96%, al probarse muestras fecales de infantes y de casos en que se sospechaba una intoxicación alimentaria, que fueron negativos en el bioensayo. (41)

Se propone el método de ELISA como una prueba presuntiva para la presencia de las toxinas de C. botulinum en muestras clínicas. (46)

A partir de un aislamiento selectivo de C. botulinum utilizando el medio CBI que contiene cicloserina, sulfametoxazol y trimetoprim, es posible hacer las pruebas de ELISA y el bioensayo en el ratón a partir de colonias lipasa positivas típicas que aparecen en 24 a 48 horas. El proceso completo puede hacerse en 2 a 3 días comparado con 7 a 14 días que tarda si se hace el cultivo convencional y posteriormente las pruebas de toxicidad. (40)

Notermans ha reportado la identificación de la toxina E de C. botulinum a partir de cultivos de enriquecimiento. Con esta técnica puede detectarse una cantidad de toxina equivalente a 80 EL_{50} .

El suero dirigido frente a la toxina derivada del tipo E utilizado para revestir las placas de microtitulación se obtuvo en conejos y, como segundo anticuerpo, un suero trivalente (A, B y E) obtenido en caballo, por lo que se observa en este ensayo una fuerte reactividad cruzada con C. botulinum tipo A y B. (162)

Se ha descrito también un ELISA para la detección de la toxina de C. botulinum tipo G, que en años recientes se ha involucrado en casos de muerte súbita. Este método puede detectar 1 DL_{50} y en él no se observan reacciones cruzadas con C. botulinum tipo B, C, D, E y F o con C. sporogenes, pero sí con preparaciones acidificadas de C. botulinum tipo A. También algunas cepas de C. subterminale presentan una reactividad no especifi-

ca, esto puede deberse a que tienen características metabólicas y fisiológicas muy cercanas a C. botulinum tipo G. (120)

La sensibilidad aumentada de esta técnica respecto a las otras técnicas de ELISA para las toxinas A, B y E de C. botulinum se debe a que se usan anticuerpos IgG purificados por cromatografía. (120)

La enterotoxina de C. perfringens puede detectarse por ELISA en una concentración de 0.01-10 $\mu\text{g/g}$ de heces. Al evaluar el método en varios brotes de intoxicación por alimentos, posiblemente asociados con C. perfringens, se encontró una correlación cercana entre la detección de la enterotoxina en las heces, y la prueba de producción de la toxina a partir de cepas aisladas de las heces y del alimento sospechoso.

El método de ELISA, en este caso, mostró ser más sensible que los ensayos biológicos utilizados para demostrar la enterotoxina, como son las pruebas de citotoxicidad en diversas líneas celulares. Por otro lado, los ensayos de letalidad en animales no son adecuados para probar muestras fecales o sobrenadantes de cultivo, ya que se presentan interferencias con otras sustancias presentes en estas muestras. (163)

Viscidi y cols reportaron un método de ELISA para cuantificar anticuerpos dirigidos contra las toxinas A y B de C. difficile. En pruebas de inhibición o bloqueo con ELISA, la toxina A solo puede ser neutralizada por la antitoxina A; sin embargo, con los anticuerpos anti-B, es parcialmente inhibida por proteínas derivadas de una cepa no toxigénica. (221)

Los anticuerpos dirigidos contra las toxinas A y B mostraron una correlación cercana en los títulos de anticuerpos obtenidos por ensayos de citotoxicidad. Se sugiere que el ELISA es un método sensible y específico para determinar la prevalencia de anticuerpos en la población y para es-

tudiar la respuesta inmune en pacientes con enfermedad inducida por C. difficile. (221)

En un estudio posterior, se encontró que pueden detectarse anticuerpos dirigidos contra la toxina A en el 64% de las personas mayores de 2 años y en el 19% de sujetos menores de esta edad; anticuerpos dirigidos contra la toxina B se detectan en el 66% de las personas mayores de 6 meses y en el 33% de las personas menores de esta edad. (220)

Estos datos coinciden con el hallazgo de que en la infancia ocurre una colonización con C. difficile y de que existen niveles altos de toxina en esta etapa de la vida. (121,222,218,75) Los individuos con enfermedad debida a C. difficile desarrollaron respuestas serológicas a una o a ambas toxinas, observándose incrementos significativos a una o a las dos toxinas, dependiendo de los diferentes pacientes. (220)

Utilizando un ELISA en el que las toxinas purificadas se adsorben a la fase sólida, se han reportado anticuerpos de la clase IgG pero no IgA o IgM, en el 58% de los pacientes con diarrea asociada a antibióticos y con colitis pseudomembranosa, encontrándose en el 7% del grupo control. (124) Se observó que una falta de respuesta inmunológica en el ELISA se correlaciona con una colitis más severa. (4)

Por una técnica de neutralización de la citotoxicidad, se encontraron anticuerpos neutralizantes para la toxina B pero no para la A en el 21% de los pacientes, en este caso no se encontraron en el grupo control.

Se vió que el ELISA es más sensible que la prueba de neutralización, además de que los anticuerpos pueden detectarse en la tercera semana de la enfermedad, mientras que los anticuerpos neutralizantes aparecen después de 5 semanas. (4)

Se ha descrito un ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos dirigidos frente a la enterotoxina de C. perfringens. Este método resulta más sensible que la inmunodifusión y la hemaglutinación pasiva para la medición de anticuerpos en estudios epidemiológicos de brotes por intoxicación alimentaria. (160)

Utilizando el lipopolisacárido purificado de B. fragilis en un método de ELISA, es posible detectar niveles de IgG específica en pacientes con una infección clínica evidente. (185) Esto puede interpretarse como una respuesta anamnésica si se toma en cuenta que se encuentran anticuerpos principalmente de la clase IgM en sujetos normales, e incluso en niños. (66)

Sin embargo, otro reporte indica que utilizando el lipopolisacárido en el ELISA, no se obtienen resultados satisfactorios debido a la gran cantidad de serotipos relacionados con el antígeno O y proponen que se utilice el complejo de la membrana externa como antígeno. En este caso las reacciones heterólogas se reducen y se cubren más serotipos de especies de Bacteroides; además, se encontró que los biotipos correspondían a los serotipos identificados. (176)

Mansheim y Kasper desarrollaron un ELISA para detectar anticuerpos dirigidos contra el polisacárido capsular de B. asaccharolyticus. Los resultados sugieren que se forman anticuerpos sistémicos dirigidos frente a este microorganismo después de infección periodontal y durante exposición prolongada al mismo en el laboratorio. Las ventajas de este ELISA son la simplicidad del método y la capacidad de detectar IgG específica en cantidades de nanogramos; además de que podría adaptarse a la medición de IgA secretoria, lo que podría ayudar a entender la patogénesis de esta bacteria en infecciones periodontales. (130)

V IDENTIFICACION POR CROMATOGRAFIA

La cromatografía la empleó por primera vez el botánico ruso M. Tswett en el año 1906, quién describió la separación de pigmentos extraídos de las plantas con acetona mediante columnas de adsorbentes inertes. Los pigmentos individuales pasan a través de la columna a diferentes velocidades y se separan unos de otros, distinguiéndose fácilmente como bandas coloridas, de donde viene el nombre de cromatografía, del griego chroma-color y graphia-descripción. (9)

Actualmente el término cromatografía se aplica a los métodos de separación física en los cuales los componentes de una mezcla se distribuyen entre dos fases: una estacionaria, que puede ser un sólido o un líquido adsorbido en un sólido y una fase móvil que puede ser tanto un gas como un líquido que fluye continuamente a través de la fase estacionaria, constituyendo un sistema dinámico en el que las fases se confunden en un proceso de interfase en cambio continuo. (9,199,203)

Los diferentes tipos de cromatografía se basan en uno o más de los cuatro principios fisicoquímicos de adsorción, fraccionamiento, intercambio iónico y exclusión molecular, que determinan el grado de partición entre la fase móvil y la estacionaria. (199,203)

La separación puede aplicarse al análisis químico detectando cualitativa y cuantitativamente los componentes una vez separados, como una forma de obtenerlos a partir de su mezcla, siendo éste el objetivo de la cromatografía preparativa. (9)

De acuerdo con las fases móvil y estacionaria existen en cromatografía cuatro posibilidades: líquido-líquido, gas-líquido, líquido-sólido y

gas-sólido.

En la cromatografía de adsorción la fase estacionaria es un sólido finamente dividido; el soluto compete por los sitios sobre la superficie del sólido con el eluyente. El grado de retención dependerá del tamaño, forma y carga eléctrica de la molécula. (9,199,203)

La cromatografía de fraccionamiento se basa en la distribución de los componentes entre dos fases no miscibles. Generalmente el medio que sirve de soporte está cubierto con un componente de la fase estacionaria, que es un líquido orgánico polar o bien, agua.

La fase móvil puede ser un disolvente puro o mezcla de disolventes, de polaridad diferente a la del líquido estacionario, de modo que ambos sean inmiscibles. Usualmente el más polar de los disolventes está incorporado sobre el soporte sólido y funciona como fase estacionaria; en la cromatografía en fase inversa, se utiliza una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar. (9,199,203)

Martin y Singe en 1941 desarrollaron la cromatografía líquido-líquido al utilizar una fase estacionaria líquida, adsorbida a un soporte inerte. (9,199) En aquel tiempo la identificación de pequeñas cantidades de sustancias separadas era difícil, por lo que se hizo más amplio el uso de la cromatografía bidimensional, ya fuera en papel o en capa fina.

Más tarde, al intentar promover la separación de compuestos iónicos aplicando un campo eléctrico, se desarrolló la electroforesis en papel o en capa fina. (9,48)

La técnica cromatográfica más recientemente desarrollada, la cromatografía de gases, fué descrita por Martin y James en 1952 y se ha convertido en uno de los métodos más ampliamente utilizados, particularmente para

mezclas de gases o para sólidos y líquidos volátiles, debido a su alta resolución y sensibilidad, así como a la rapidez del análisis. (9,199)

En los últimos años se ha renovado el interés en las técnicas de cromatografía líquida, debido a la nueva instrumentación, nuevo empacado de las columnas y un mejor entendimiento de la teoría cromatográfica. Un ejemplo de ello es la cromatografía líquida de alta resolución, que es el método de elección en la separación y análisis de muestras no volátiles o inestables térmicamente. (9)

Cromatografía en columna

La fase estacionaria está sostenida en un tubo de vidrio o metal, cubierto en un extremo y cerrado con una llave o cilindro de vidrio. La muestra se introduce en la columna y la fase móvil se obliga a pasar a través del sólido bajo presión, o bien se deja percolar a través de él por efecto de la gravedad. Se colectan las fracciones del eluyente en diferentes tubos para su análisis posterior.

Pueden utilizarse para este propósito recolectores automáticos de fracciones, cuyo uso se basa en diferentes criterios como tiempo de elución, recuento de gotas o medición del volumen.

En condiciones cromatográficas estandarizadas, las mismas sustancias tendrán siempre el mismo tiempo de elución, parámetro que puede emplearse para la identificación de los compuestos. (199,203)

Cromatografía en capa fina

La separación se produce sobre una capa de un sólido finamente dividido que se ha fijado sobre una superficie plana. En este caso, la fase móvil se desplaza a través del sólido, ya sea por acción capilar o bajo la influencia de la gravedad. Los adsorbentes oscilan de un grado máximo a mínimo de adsorción, con lo que su poder de fraccionamiento es más apreciable.

Como fases estacionarias pueden usarse la alúmina, gel de sílice, celita, celulosa y tierra de diatomeas.

La muestra se aplica con una pipeta capilar a la superficie seca o activada de la placa; después de evaporar el disolvente, se desarrolla el cromatograma por medio del flujo del eluyente en un medio cerrado para prevenir la evaporación. El revelado puede llevarse a cabo utilizando sustancias corrosivas como el ácido sulfúrico cuando se utiliza un adsorbente inorgánico, o puede intentarse la identificación presuntiva directamente en la placa por reacciones químicas específicas. Adicionando al adsorbente silicato de zinc y sulfato de cadmio, pueden demostrarse manchas de color negro no fluorescente al aplicar luz ultravioleta de onda corta (254 nm). La luz ultravioleta de onda larga (350-366 nm) puede aplicarse para provocar la fluorescencia en materiales que absorben la onda larga y emiten luz visible, cuando no se utiliza indicador en el adsorbente.

La trayectoria de un componente en el sistema cromatográfico se define como un factor de retardo o R_f , que es el cociente de la distancia que el soluto ha emigrado, entre la distancia que el disolvente ha recorri-

do. El R_f de un compuesto es una característica constante, si las condiciones no varían. Sin embargo, ya que frecuentemente es difícil reproducir las condiciones de la prueba, se utiliza un patrón interno, al que se refiere entonces la distancia recorrida por el soluto. Se puede hacer un análisis semicuantitativo, si se incluyen soluciones patrón de diferentes concentraciones y aplicando la densitometría de barrido directamente en la placa o del negativo de una fotografía de la placa. No obstante, la cuantificación es más exacta cuando se realiza el análisis químico de las manchas separadas y extraídas con algún disolvente. (48, 170, 199, 203)

Cromatografía en papel

El medio de separación es una hoja o tira de papel de filtro grueso. Por lo general se emplean papeles especiales de elevada pureza y con características reproducibles en cuanto a porosidad y grosor. La muestra se deposita a pocos centímetros del extremo de la hoja de papel y se deja secar; se permite entonces que el sistema de disolventes fluya a partir de un reservorio situado por encima en la cromatografía descendente, o por debajo en la cromatografía ascendente. La fase móvil se mueve por capilaridad sobre la muestra causando la separación de los componentes de ésta en manchas individuales en el papel. A menos que las sustancias sean coloridas por sí mismas, las manchas deberán descubrirse por una reacción química, que generalmente sugiere la naturaleza de las sustancias separadas. Se utilizan indicadores ácido-base para los ácidos orgánicos, nitrato de plata en medio alcalino para los azúcares reductores

y ninhidrina para los aminoácidos. La unidad de medición es el R_f o la comparación directa con sustancias conocidas. La cuantificación puede realizarse por densitometría o por elución seguida de análisis químico. En la cromatografía en papel intervienen, tanto el principio de adsorción como el de fraccionamiento, ya que el medio es una matriz de celulosa rodeada de una capa de agua. Sin embargo, es posible hacer que otros líquidos desplacen el agua, proporcionando un tipo diferente de fase estacionaria; el papel tratado con silicón o vaselina permite realizar la cromatografía en papel de fase inversa, en la cual la fase móvil es un disolvente polar. (48,199,201,203)

Cromatografía de gases

Es similar en varios aspectos a la cromatografía en columna, diferenciándose de ella en que utiliza un gas inerte como fase móvil. La separación se basa en repetidos estados de equilibrio entre un gas en movimiento y una fase estacionaria contenida en una columna de pequeño diámetro. En la cromatografía gas-sólido (CGS), la fase estacionaria es un sólido con una gran área de superficie, mientras en la cromatografía gas-líquido (CGL) está constituida por un líquido no volátil sobre un sólido inerte. (9,145,199)

Los gases y solutos no polares de gran volatilidad se analizan comúnmente por CGS, mientras que la CGL puede aplicarse a un número mayor de compuestos, siempre que éstos alcancen la temperatura de ebullición sin descomponerse. (199)

Un cromatógrafo de gases consta principalmente de un dispositivo inyec-

tor, la columna, controles de temperatura y de flujo del gas y un registrador-detector. Una pequeña cantidad de la muestra se inyecta en la columna, mantenida a una cierta temperatura. En el dispositivo inyector, un calentador vaporiza las moléculas que son entonces transportadas por el gas, a través de la columna, para su fraccionamiento. Los componentes volátiles pasan a través de la columna a diferentes velocidades, por lo que son eluidas a diferentes tiempos. Un detector puede determinar la presencia y cantidad de las sustancias que emergen de la columna. La amplificación de esta señal se registra en una tira de papel como una serie de picos; la localización de cada pico caracteriza a un componente específico y su altura y su área están en relación directa con su concentración relativa. (9,199,203)

Uno de los factores más importantes a considerar en la cromatografía de gases es el grado de separación que puede lograrse entre diferentes componentes en una columna dada y depende de varios parámetros: dimensiones de la columna, temperatura, velocidad de flujo del gas acarreador, volumen de la muestra y caída de presión en la columna. (145)

Las columnas ordinarias tienen aproximadamente 0.6 cm de diámetro, aún cuando pueden ser de mayor o menor diámetro, con una variación de 4 a 10 mm. Las columnas con diámetro mayor tienen menor eficiencia y generalmente se utilizan en trabajos de preparación. La longitud de la columna varía desde 90 a 120 cm hasta cerca de 15 m en columnas ordinarias empacadas. En el caso de las columnas capilares, la longitud es mucho mayor. En términos generales, cuanto más larga es la columna, mayor es el grado de separación, aún cuando esta relación no es directamente proporcional. Las columnas más utilizadas son las de acero inoxidable o vidrio

con 1 a 4 m de longitud y un diámetro de 2 a 4 mm, que se empacan con material granular de soporte. También pueden usarse tubos de otros materiales como níquel, cobre o aluminio. Las columnas de vidrio son frágiles, pero tienen la ventaja de ser inertes y son esenciales en el análisis de compuestos que se descomponen al contacto con metales calientes debido a acción catalítica. Esta tendencia es más pronunciada con columnas capilares que con columnas empacada, esto puede evitarse desactivando la superficie interior del tubo de vidrio por tratamiento con sílice, en que son removidos los grupos polares que reducen la eficiencia de la columna. (109,145)

Se pueden emplear muy diversos soportes sólidos y fases líquidas estacionarias. La elección depende básicamente de la naturaleza de los compuestos que se desea separar. Generalmente se emplean fases estacionarias sólidas para el estudio de compuestos volátiles de peso molecular relativamente bajo, mientras que las fases líquidas se usan para separar moléculas un poco mayores. Se pueden emplear varias fases sólidas para separar gases de origen microbiano, incluyendo aquéllos que contienen azufre o nitrógeno. Entre las fases están alúmina, carbono, gel de sílice y polímeros sintéticos orgánicos porosos como Porapak (Q, P, QS, PS) y Chromosorb 101. (109,145,203)

Quando se utiliza una fase líquida, debe ponerse cuidado en que el soporte sólido se haya tratado debidamente para dar picos simétricos, incorporando pequeñas cantidades de ácido tereftálico o ácido fosfórico en la fase líquida. (109)

Se emplean frecuentemente Carbowax 20 N, que es un polietilenglicol, y versiones modificadas de él como SP-1000 y AT-1000, que pueden ofrecer

una mejor estabilidad térmica. FFAP, fase libre de ácidos grasos, que es un polietilenglicol modificado con ácido tereftálico y AT-1200 y SP-1200, son adecuados para la separación de ácidos grasos hasta de seis carbonos. Frecuentemente se emplean como soportes, tierra de diatomeas o carbón grafitizado (Carbopak, Graphtak), que ofrecen tanto estabilidad térmica como separación óptimas de los componentes cuando se emplean con un 0.2 a 0.4% de las fases líquidas ya mencionadas. (109)

Los metabolitos volátiles neutros como los alcoholes, aldehídos y cetonas se separan fácilmente en polímeros porosos con las diversas resinas Porapak y Chromosorb 101-103. Como alternativas a éstos están SP-1000, AT-1000, Carbowax 20 M y Carbowax 1500; este último es muy empleado en el estudio de alcoholes. Los hidrocarburos pueden ser cromatografiados en una variedad de fases sólidas, un ejemplo de éstas es Carbopak o Graphtak suplementada con ácido pícrico. Para separar aminas de bajo peso molecular, Chromosorb 103 es una de las fases más útiles, como también Tenax GC. Carbowax 20 M o Deumvalt, unidos a tierras de diatomeas o carbón grafitizado, dan una separación excelente de la mayoría de las aminas. En este caso para evitar la formación de colas en los picos obtenidos se incorpora potasa a la fase líquida. (109)

El uso de columnas capilares, especialmente la del tipo de sílice fundido, se espera que tenga gran uso en los próximos años, debido a su eficiencia más alta y a su revestimiento externo de polimida que la hace flexible y casi irrompible, lo que la hace adecuada para su uso en trabajo de rutina. (109,153,151)

La temperatura a la cual se efectúa la separación de los componentes de una mezcla, está determinada generalmente por dos factores: el grado de

separación que se considere suficiente y un tiempo razonable de análisis. Por lo general, cuanto más baja es la temperatura, mayor es la separación de los diferentes componentes; pero en cambio, el tiempo de retención de los componentes en la columna aumenta también con la disminución de la temperatura. (63,149) A menudo se ha encontrado satisfactorio trabajar a una temperatura cercana al punto de ebullición de los componentes, pero en realidad debe determinarse una temperatura óptima para cada ensayo en particular. (145)

Las temperaturas de las columnas superan a la del ambiente, pero no suelen exceder los 300°C . En un principio se usaron columnas que tenían una temperatura fija, pero se han reemplazado con columnas a las que se puede regular la temperatura, lo que permite el análisis de mezclas complejas de solutos, en los que los constituyentes con un alto grado de ebullición pueden ser fraccionados, al mismo tiempo que también lo pueden ser los constituyentes de punto bajo de ebullición y más fácil fraccionamiento. (63,149,186) Se debe considerar que la temperatura de la columna no sea tan alta que la fase estacionaria se volatilice de la superficie del soporte inerte. Además, se observará en muchos casos, que si la temperatura de la columna sigue aumentando, disminuye la eficacia y la columna resulta menos útil que a cierta temperatura óptima, más baja. (145)

El tipo de detector que se utilice depende del tipo de compuestos que se investigan. Los detectores de conductividad térmica miden la conducción calórica del gas que fluye y la comparan con la del portador puro, considerando que mientras más grande es la diferencia entre estas dos mediciones, mayor será la señal que se genere; generalmente se emplea en el

análisis de gases y líquidos que tienen un bajo punto de ebullición.

(145,199,203)

Con pocas excepciones, como en el caso del ácido fórmico y el formaldehído, los detectores ionizantes tienen una mayor sensibilidad que los de conductividad térmica en el análisis de compuestos orgánicos. En ellos, los componentes que salen de la columna son ionizados bien por rayos β de una fuente radioactiva, o por oxidación en una llama de hidrógeno. Los detectores de captura de electrones dependen de la afinidad electrónica de átomos específicos y grupos moleculares, y se lleva a cabo después de la formación de derivados con reactivos que contienen halógenos. (25,109) Con este tipo de detector, es posible analizar metabolitos presentes en cantidades de picogramos.

El tipo de gas portador a emplear, permite también alguna selección. Los gases que se utilizan con más frecuencia son nitrógeno, hidrógeno, helio, argón y dióxido de carbono. Al menos en parte, la selección se basa en el factor económico, pero un factor muy importante en ella es el tipo de detector empleado. En el caso del detector de conductividad térmica se utilizan el hidrógeno y el helio, ya que presentan una mayor diferencia con los componentes a analizar. El hidrógeno podría ser una mejor elección, pero suele presentar riesgos en cuanto a seguridad en el laboratorio. El helio es casi tan satisfactorio como el hidrógeno y además no es combustible, aunque por otro lado es difícil de conseguir.

(145,207)

El detector de ionización de llama, que requiere nitrógeno, aire e hidrógeno, tiene un intervalo de linealidad y una sensibilidad superior al detector de conductividad térmica. Sin embargo, su uso requiere de un

generador de hidrógeno, ya que el uso y almacenamiento de hidrógeno en tanques está muy regulado en laboratorios y hospitales. (207)

El detector de argón requiere solo un gas inerte, el argón, y es sensible a cantidades de picogramos, aunque tiene la desventaja por otro lado, de tener un intervalo de linealidad más limitado que otros detectores, además de que su sensibilidad puede reducirse en gran medida por contaminación con aire o vapor de agua. (207)

La diferencia de presión en la columna es importante, ya que impone un factor de corrección sobre el volumen de retención. La velocidad del gas se logra aplicando una diferencia de presión, lo que puede hacerse a la entrada o a la salida de la columna. No obstante, es mejor no tener una presión de salida demasiado baja, casi siempre es la atmosférica y la de entrada es algo mayor que ésta, empleándose relaciones de presión de 2 y comúnmente se evita que pasen de 3. Para la selección de la relación de presiones han de tomarse en cuenta las dimensiones de la columna; en las celdas de conductividad térmica, además, debe tomarse en cuenta que una presión de salida reducida puede aumentar realmente la sensibilidad del detector. (145)

El tamaño de la muestra para la mayoría de los cromatógrafos es más bien pequeño, del orden de 1 a 100 μ l para una muestra líquida y del orden de mililitros para una muestra gaseosa. A medida que aumenta el tamaño de la muestra, disminuye la eficiencia de la separación. Por otro lado, si se desea la detección de una cantidad muy pequeña de sustancia en una mezcla, puede utilizarse una muestra de mayor tamaño, aún cuando la separación no sea del todo satisfactoria. La introducción de la muestra ha de ser rápida y se utilizan generalmente microjeringas, que dan

volúmenes reproducibles. (9,145,199)

Un cromatograma proporciona solo una información cualitativa acerca de cada especie en una muestra, es decir su tiempo de retención o su posición en la fase estacionaria después de la elución. Bajo un conjunto de condiciones dadas y con una determinada columna cromatográfica, el tiempo o el volumen de retención son característicos de un componente en particular. En ciertos casos, dos o más sustancias pueden presentar el mismo volumen de retención. Casi siempre se tiene una idea de los componentes de la mezcla, con lo cual el tiempo de retención resulta suficiente para caracterizar a un compuesto en una mezcla. Una relación útil en cromatografía de gases, es el hecho de que el logaritmo del tiempo de retención con frecuencia es función lineal del número de átomos de carbono de los grupos metileno o de otros grupos funcionales análogos. (9, 145,199)

Cuando es necesaria la identificación de las sustancias separadas, se recogen en trampas frías a la salida de la columna y se analizan por cualquier técnica física o química. La espectrometría de masas se utiliza comúnmente en este caso, ya que es suficiente con una pequeñísima cantidad de muestra para el análisis. En el espectrógrafo de masas la muestra se ioniza con un rayo electrónico o con un gas reactivo cargado; el exceso de energía impartido al compuesto provoca su fragmentación y los pesos de los fragmentos se miden en el instrumento y se registran. Cada compuesto individual tiene un cuadro de fragmentación diferente, aunque grupos químicos similares dan fragmentaciones similares. De esta forma puede determinarse la estructura, incluso la posición de un isótopo dentro de una molécula presente, en una mezcla compleja puede deter-

minarse en niveles de nanogramos. (145,203)

El análisis cuantitativo se basa en una comparación, ya sea de la altura de los picos o del área bajo los mismos producidos por los compuestos analizados, en comparación con uno o más patrones. Si las condiciones están controladas, ambos parámetros varían linealmente con la concentración, siempre que variaciones en la columna no alteren el ancho de los picos durante el tiempo necesario para obtener los cromatogramas de la muestra y los patrones.

Las variables que deben controlarse cuidadosamente son la temperatura de la columna, la velocidad del gas acarreador y la velocidad de inyección de la muestra, además de evitar la sobrecarga de la columna. El efecto de la velocidad de inyección de la muestra es particularmente crítica para los picos iniciales de un cromatograma. La inyección manual con una jeringa en ocasiones puede dar lugar a errores del 5 al 10%.

Muchos instrumentos cromatográficos modernos están equipados con integradores de esfera y disco o integradores electrónicos que permiten una estimación precisa del área bajo los picos. Cuando no se dispone de un equipo de este tipo, debe hacerse una estimación manual. Un método simple que funciona bien para picos simétricos con un ancho razonable, es la multiplicación de la altura del pico por su ancho a la mitad de la altura. Otro método consiste en usar un planímetro, o recortar el pico y establecer el peso en relación con el de una superficie conocida de papel de registro. (145,199)

La calibración con patrones consiste en la introducción de una serie de soluciones de concentración conocida, de composición aproximada a la del problema. Se realizan los cromatogramas para los patrones y se gra-

fican las alturas de los picos o sus áreas en función de la concentración, con lo cual debe obtenerse una línea recta que pasa por el origen. Para lograr precisión es necesario repetir con frecuencia las calibraciones, ya que este método se ve afectado en gran proporción por el volumen de la muestra y la velocidad de inyección de la misma. (199)

El método de normalización del área evita las incertidumbres relativas a la inyección de la muestra. Es necesario eluir todos los componentes de la muestra, después de lo cual se calcula el área de todos los picos, corregida por un factor de respuesta del detector a diferentes tipos de compuestos. La concentración está dada por el área de un pico en particular, dividida entre el área total de todos los picos. (199,203)

El error producido por la inyección de la muestra puede corregirse utilizando un patrón interno. El método consiste en introducir una cantidad cuidadosamente medida de una sustancia que actúa como patrón interno, tanto en las muestras patrón como en las muestras problema, utilizándose como parámetro analítico el cociente del área de los picos del analito sobre la del patrón interno. Para que pueda llevarse a cabo, el pico del patrón interno debe estar bien separado de los demás picos y al mismo tiempo cerca de los picos del componente que se analiza. (199,139)

La mayoría de los instrumentos cromatográficos modernos están equipados con microprocesadores para el control de parámetros de operación tales como temperatura de la columna y del inyector, velocidad de flujo del eluyente, tiempo de inyección de la muestra. Por tanto, los cromatogramas pueden realizarse con poca o ninguna intervención humana. Los instrumentos más completos son totalmente automáticos y pueden admitir un cierto número de muestras. Después de cada análisis la columna regresa

a sus condiciones iniciales automáticamente, el portamuestras gira y se toma una nueva muestra que se inyecta a la columna, el cromatograma que se obtiene se registra en la memoria de una computadora. Los datos se presentan bajo la forma de una tabla en la que se indican los tiempos de retención y las áreas relativas de los picos.

Cromatografía de gases de espacio de cabeza

En la cromatografía de gases de espacio de cabeza, HSGC, por sus siglas en inglés (head-space gas chromatography) se analiza la fase de vapor arriba de un medio sólido o líquido. Una parte de la muestra se transfiere a un vial de vidrio que se sella con una membrana de caucho. Después de alcanzar cierta temperatura la fase de vapor del medio se colecciona manualmente con una jeringa o por técnicas automatizadas, inyectándose en la columna cromatográfica. (109,134)

En el estado de equilibrio entre el líquido y su fase gaseosa, el área del pico cromatográfico de un componente obtenido por HSGC es proporcional a su presión parcial de vapor. Esta puede incrementarse, aumentando la temperatura de la muestra antes del análisis. Sin embargo, cualquier cambio en este parámetro está limitado por consideraciones prácticas, como el que no debe exceder el punto de ebullición de la fase líquida y debe mantenerse constante, de otra forma se obtienen variaciones en los picos. (107,108,109,134)

Para incrementar la sensibilidad de la técnica se agregan usualmente electrolitos como sulfato de sodio anhidro que incrementa la concentración de los compuestos orgánicos en la fase de vapor, disminuyendo su

solubilidad en la fase líquida. (109,134)

La HSGC es aplicable al estudio de compuestos ácidos, neutros y básicos, como son ácidos grasos y alcoholes hasta de ocho carbonos y aminas hasta de diez carbonos, que pueden detectarse a una temperatura de 75°C.

(106,108,134)

Es particularmente útil para estudiar compuestos con tiempos de retención muy cortos y que en otras técnicas cromatográficas pueden quedar enmascarados por el pico del solvente. (106,107,134) De especial interés es el hecho de que la HSGC también puede aplicarse al estudio de aminas sin pasos previos de formación de derivados y extracción. (108,134)

Se utilizan columnas de acero inoxidable o de vidrio y más recientemente columnas capilares de sílice fundido. Entre las fases estacionarias, la PFAP es la más utilizada; también se ha empleado SP-1200 y Porapak Q. Esta última es adecuada para el análisis de alcoholes y ácidos mientras Chromosorb 103 se emplea preferentemente en el análisis de compuestos básicos. En las columnas capilares se utiliza en ocasiones el ácido 1,15 pentadecanodicarboxílico. El detector puede ser de conductividad térmica, aunque se prefiere el detector de ionización de llama por su más alta sensibilidad. La identidad de los compuestos eluidos se establece por comparación de los tiempos de retención con patrones adecuados. La cuantificación exacta no es posible ya que los picos cromatográficos no representan la concentración real de los componentes en la mezcla. (109, 134)

La cromatografía de gases es una de las técnicas analíticas más específicas y sensibles para estudiar los metabolitos volátiles microbianos. La identificación cuantitativa de tales productos puede dar información

que es útil tanto en la identificación para propósitos diagnósticos, como para estudios taxonómicos. (109,111)

Aplicación en el diagnóstico de anaerobios

La producción de compuestos volátiles por los microorganismos, depende de las condiciones del medio de crecimiento y del tipo de metabolismo que lleve a cabo, ya sea fermentativo u oxidativo; incluyen diversas clases de compuestos como ácidos grasos, alcoholes, aldehídos, ésteres, cetonas, aminas y compuestos conteniendo azufre. También pueden encontrarse diacetilo, acetofina, hidrocarburos de cadena corta, gases permanentes como hidrógeno, oxígeno, monóxido y dióxido de carbono.

Bajo condiciones controladas de crecimiento, determinados géneros y, en ocasiones determinadas especies, forman frecuentemente combinaciones características de metabolitos volátiles. La mayoría de los anaerobios producen cantidades considerables de ácidos grasos de cadena corta, mientras que los aerobios y facultativos producen relativamente pequeñas cantidades de estas sustancias, por lo que se estudian otros de sus metabolitos como diacetilo, acetofina, aminas y alcoholes, generalmente por métodos que requieren pasos previos de formación de derivados y extracción. (31,109,235)

El análisis cromatográfico se ha aplicado al estudio de cultivos y de productos asociados a cambios inducidos por la infección, directamente en fluidos corporales. (109) Los procedimientos incluyen inyección directa de la muestra, extracción con disolventes y atrapamiento de los componentes volátiles, seguida de desorción química o térmica en la técnica

de HSGC. También se llevan a cabo reacciones de formación de derivados seguidas de extracción con disolventes en el caso de compuestos menos volátiles o cuando la detección se realiza por una técnica de captura de electrones.

Análisis directo sin extracción previa

La inyección directa del medio de cultivo dentro de la columna cromatográfica para el análisis de metabolitos volátiles fué descrita por Rogosa y Love en 1968, quienes utilizaron un polímero sólido poroso como fase estacionaria, estable en presencia de agua. El análisis se realiza en medios acidificados en los que las células se eliminan por centrifugación o filtración. Los autores reportaron que se mantenía una aceptable estabilidad de la columna a pesar de que cantidades relativamente grandes de material no volátil presente en el medio se inyectaban simultáneamente. Sin embargo, recomendaban empacar la entrada de la columna con material nuevo para quitar los compuestos no volátiles que se acumulan después de inyecciones repetidas. (21,109)

Bricknell y Finegold reportaron resultados satisfactorios de los análisis que realizaron utilizando una columna con Porapak Q recubierta de una fase líquida, FFAP al 6% que reduce los tiempos de retención individuales y, por tanto, el tiempo total requerido para el análisis. Concluyen que para la identificación de anaerobios se prefiere la inyección directa de los sobrenadantes de cultivo, al análisis de extractos, puesto que pueden detectarse los alcoholes y ácidos grasos de bajo peso molecular. En este tipo de análisis es necesario utilizar un detector de ioni-

zación de llama, que es más sensible, ya que no hay una concentración previa de la muestra. (21) Para evitar el deterioro de la columna, las muestras pueden ser prepurificadas aplicando los sobrenadantes a una resina de intercambio iónico o por ultrafiltración. (109)

Phillips en 1980 analizó muestras en que se sospechaba la presencia de anaerobios, por inyección directa en una columna de Chromosorb. A pesar de un pequeño número de falsos positivos y falsos negativos, los autores concluyen que esta técnica es útil en el diagnóstico presuntivo rápido de infección por anaerobios. (109)

Análisis de muestras extraídas con disolventes

La inyección directa de la muestra sin previa extracción, no se ha utilizado extensamente por los problemas que presenta y la técnica más comúnmente empleada es el análisis de los ácidos grasos volátiles después de su extracción con disolventes orgánicos.

Los microorganismos se cultivan de 2 a 4 días, usualmente en un medio de peptona extracto de levadura con glucosa al 1% p/p. Después de la acidificación del medio a pH 2 con ácido sulfúrico diluido, se extraen los ácidos grasos volátiles con un disolvente orgánico como el éter. Para incrementar la eficiencia de la extracción, puede agregarse una sal inorgánica como sulfato de sodio.

En las muestras en que no pueden demostrarse ácidos grasos volátiles o que solamente contienen acético o fórmico, es necesario investigar la presencia de ácidos grasos no volátiles como pirúvico, láctico, fumárico y succínico, lo cual se hace preparando los derivados metilados co-

respondientes, que son volátiles. (31,235) La metilación se lleva a cabo en medio ácido, agregando metanol y llevando a una temperatura de 55°C de veinte a treinta minutos; si se utiliza trifluoruro de boro como catalizador, el tiempo de reacción se reduce a cinco minutos, después de lo cual se extrae con cloroformo. (18,31,235)

En los procedimientos de extracción, debe considerarse que las sustancias polares de bajo peso molecular no son eficientemente extraídas por la fase orgánica. Generalmente una parte de los compuestos de dos o tres átomos de carbono permanece en la fase acuosa y esta discriminación debe tomarse en cuenta en la estimación cuantitativa. (31)

La elección del disolvente debe hacerse de acuerdo al tipo de detector, de tal forma que tenga una respuesta baja para el mismo, lo que asegura el registro de metabolitos que eluyen rápidamente y que pueden ser ocultados por un pico del solvente en el cromatograma. (31,235)

Las soluciones estándar de ácidos grasos volátiles y alcoholes, así como las de ácidos grasos no volátiles, se tratan en las mismas condiciones que las muestras. El medio de cultivo en ocasiones puede contener pequeñas cantidades de ácido acético, láctico y succínico, por lo que es conveniente incluir una muestra de medio no inoculado con cada nuevo lote que se utiliza. (235) Otra forma de evitar errores por esta razón es incubar cultivos lavados con solución salina en un amortiguador con 2% de glucosa, después de lo cual se hace la extracción para el análisis.

(109)

El análisis cromatográfico de metabolitos volátiles a partir de cultivos, es parte de los esquemas de identificación de los anaerobios, sobretodo de aquéllos que se han definido en base a la producción de ácidos grasos

como productos finales. (31,36,95,175,235)

Generalmente esto se hace en cultivos de 24 a 48 horas en medio líquido, a partir de un cultivo puro en placa. Recientemente se ha intentado hacer el análisis en extractos de agar del cultivo puro en placa a las 48 horas de incubación, obteniéndose resultados similares en los patrones de ácidos grasos, tanto en medio de agar sangre como en medio de carne cocida con carbohidratos. De esta forma pueden identificarse las bacterias aisladas con un considerable ahorro de tiempo y medios de cultivo, ya que se encuentran patrones diferenciales de ácidos grasos entre los diversos géneros de anaerobios. (77,232)

Se ha intentado la identificación de C. difficile por cromatografía de gases en cultivos o directamente en muestras, poniendo de manifiesto la producción de ácido isocaproico y p-cresol como marcadores. (164, 175)

El ácido isocaproico es producido por C. difficile pero también por C. bifermentans, C. sordellii y C. sporogenes, componentes de la flora normal y por C. oroticum, especie que se aísla de personas sanas bajo tratamiento antibiótico. (19,175)

Los métodos que se han utilizado no tienen la especificidad ni la resolución suficiente para aplicarse con fines diagnósticos. (19,24,127)

Se ha descrito un método que utiliza formación de derivados y detección de ácido isocaproico; sin embargo, es muy elaborado y consume una gran cantidad de tiempo, por lo que no puede aplicarse al trabajo de rutina. (24)

El aislamiento de C. difficile en un medio selectivo, CCFA (cicloclerina-cefoxitina-fructosa), al que se le adiciona DL-norleucina y ácido p-hi

droxifenilacético como precursores, permite la identificación a partir de placas de primoaislamiento para la detección de ácido caproico y p-cresol en extractos del agar alrededor de las colonias. (12,77,118, 171) La detección de estos productos no ha sido totalmente satisfactoria en la identificación de C. difficile. La incorporación de yema de huevo a este medio permite diferenciar a C. difficile de otras especies de Clostridium que tienen un metabolismo similar. Con la excepción de esta especie, ninguna otra que sea lecitinasa o lipasa negativa produce ácidos isocaproico, caproico o p-cresol, por lo que este medio facilita la identificación de C. difficile en 24 a 48 horas. (118)

Es posible hacer un diagnóstico presuntivo de septicemia por anaerobios si se analizan los cultivos de las muestras por cromatografía de gases, en cuanto se presentan los primeros signos macroscópicos de crecimiento: turbidez, presencia de colonias, hemólisis o producción de gas. (45,184, 202,241)

Varios autores que han comparado los resultados de los cromatogramas de hemocultivos con los obtenidos por cultivo e identificación convencionales, coinciden en afirmar que la presencia de ácido butírico, isovalérico o ambos, se relaciona a la presencia de anaerobios obligados en un 88 a 90% de las muestras analizadas. (45,184)

Must relaciona la presencia de los ácidos isovalérico y succínico con el género Bacteroides y el ácido propiónico con Propionibacterium spp. (241) Sondag en cambio, llega a una identificación presuntiva basándose en morfología celular y perfiles de ácidos grasos volátiles: a B. fragilis lo asocia con la producción de ácidos acético y propiónico; Fusobacterium spp con ácidos acético, propiónico y butírico; Veillonella spp con ácidos

acético y propiónico; Clostridium spp con ácidos acético y butírico y el grupo de los cocos Gram positivos con ácidos acético y butírico. No fue capaz de detectar los ácidos valérico e isovalérico, que consistentemente se encontraron en estudios similares, tal vez debido a que las condiciones cromatográficas del análisis no permitieron la resolución de esos ácidos. (202)

La composición de los medios de cultivo no da lugar a diferencias cualitativas en el patrón de ácidos grasos que se obtiene, pero sí cuantitativas, (45,57,123,241) por lo que las cantidades de ácidos grasos tienen que evaluarse para cada medio y los valores para un diagnóstico presuntivo deben estandarizarse, ya que en los diferentes medios usados (tripticosa de soya, tioglicolato e infusión de cerebro-corazón), están presentes cantidades diferentes de glucosa. (45,241)

La glucosa favorece el crecimiento de muchas bacterias anaerobias, así como la producción de cantidades mayores de ácidos grasos a una velocidad mayor que los medios libres de glucosa. (123,241) La velocidad máxima de conversión de la glucosa, producción de ácidos grasos de cadena corta y crecimiento, ocurre en las primeras 24 horas de incubación, por lo que se asume que las cantidades de estos productos finales en las siguientes 24 horas serán las mismas, siendo posible dar un resultado presuntivo de la presencia de anaerobios, 18 a 36 horas antes de que un cultivo de aerotolerancia esté disponible. (45,184,241)

Se presentan algunos problemas con algunas cepas de B. thetaiotaomicron y con Eubacterium lentum en que la producción de ácidos grasos es apenas perceptible y en ocasiones no detectable en un período de incubación corto. (202,241) Por otro lado, la identificación del grupo de cocos Gram

positivos es difícil, ya que presentan patrones de ácidos grasos volátiles variables. (202,241)

A pesar de que los anaerobios producen cantidades significativas de ácido succínico, éste pueden producirlo también aerobios y facultativos en cantidades equiparables. (45,184,202,241) Esto mismo se aplica a los ácidos láctico y propiónico que generalmente se detectan junto con el ácido acético en cultivos de aerobios y facultativos. (45,184)

Reig propone entonces suprimir el análisis de ácidos grasos no volátiles, con una subsecuente simplificación de la técnica cromatográfica. (184)

Ya que solo un 12% de las septicemias pueden ser producidas por anaerobios, el análisis por cromatografía de gases debe utilizarse selectivamente para ser confiable. El método se llevará a cabo más eficientemente en hemocultivos con subcultivos aerobios negativos o en los que se encuentren bacilos Gram negativos fusiformes o pleomórficos o bacilos Gram positivos asociados a hemólisis y gas. (45,202)

La cromatografía de gases aplicada a los hemocultivos y una tinción de Gram de la muestra pueden dar un diagnóstico presuntivo a nivel de género, que es útil para instalar la terapia, lo cual es de importancia en bacterias del grupo *E. fragilis*. Además, puede servir de guía en el procesamiento subsiguiente de la muestra, ya que no es posible prescindir de la identificación definitiva por cultivo y pruebas bioquímicas. (184, 241)

Existen estudios en que se evalúa la utilidad de la cromatografía de gases aplicada directamente a las muestras clínicas en que se sospecha la presencia de anaerobios, comparando sus resultados con los obtenidos por cultivo e identificación convencionales. Algunos autores relacionan la

presencia de ciertos ácidos grasos específicos en la muestra con el aislamiento de determinados géneros (57,62,113,204); sin embargo, otros reportes indican que solo se puede obtener información sobre la presencia de anaerobios. (77,98,175,182,226,227)

Gorbach relacionó la recuperación de bacilos Gram negativos anaerobios con la presencia de ácidos isobutírico, butírico y succínico. (57) Años más tarde, Gupta y Murugesan obtienen los mismos resultados, y confirman el valor de la cromatografía de gases para diferenciar entre una enfermedad por aerobios y otra por anaerobios. (62)

Legakis relaciona la presencia de cantidades apreciables de ácido succínico (más de 1 $\mu\text{g/ml}$), propiónico e isovalérico a concentraciones que no exceden de 3 $\mu\text{g/ml}$, con el aislamiento de B. fragilis. Cuando se detecta también ácido butírico, puede sospecharse infección por B. melanogenicus. Sin embargo, no puede excluirse la presencia de otros anaerobios o aerobios.

La detección de ácido butírico a una concentración mayor de 4 $\mu\text{g/ml}$ y de ácidos acético, propiónico e isobutírico a concentraciones relativamente altas sugiere infección por Clostridium spp. Los resultados de cromatografía en los casos de infección por Peptococcus y Peptostreptococcus no dan una información concluyente, ya que solo se detectan ácidos acético y láctico, mismos que están presentes en las infecciones por aerobios.

(113)

Spiegel al estudiar casos de infección intraabdominal encuentra una asociación entre especies de Clostridium y la presencia de butirato y la de especies de Bacteroides y la presencia de ácidos isobutírico y propiónico. A pesar de que los miembros de la familia Enterobacteriaceae produ-

cen succinato, la presencia de este ácido también se asoció con infección anaeróbica, ya que estuvo presente en el 89% de los cultivos en los que se aislaron anaerobios. Por análisis de los datos encontró que el incremento en la concentración de succinato se debe principalmente a miembros del género Bacteroides. (204)

En el estudio de la infección pleuropulmonar, la cromatografía fue útil para diferenciar la etiología de la infección aerobia o anaerobia. No se necesitó la aspiración transtraqueal, ya que la muestra que se analizó fue el fluido pleural o la expectoración. En el caso de infección por anaerobios, se encontró un patrón de ácidos grasos volátiles múltiple, como en el empiema anaeróbico y en el absceso pulmonar; el cromatograma fue negativo o débilmente positivo donde los anaerobios no eran significativos como por ejemplo en el caso de contaminación de la muestra. (77, 214)

Los hisopos no se recomiendan para la toma de muestra en el caso que se sospeche una infección por anaerobios; sin embargo, en ocasiones no se dispone de otra forma de tomar la muestra. El análisis de ácidos grasos volátiles en extractos de hisopos, da resultados comparables a los obtenidos en el análisis de muestras de pus o exudados. (182,226)

Análisis por la técnica de HSGC

En estudios de los cultivos bacterianos por la HSGC, se analizan los compuestos volátiles presentes en la atmósfera que se encuentra en un cultivo líquido contenido en un vial cerrado, inyectando la fase de vapor en la columna cromatográfica. Este método también puede utilizarse para es-

tudiar compuestos volátiles producidos por bacterias incubadas en un amortiguador conteniendo compuestos definidos como carbohidratos. (134)

La primera descripción de la aplicación de la HSGC al estudio de las bacterias anaerobias fue la de Drasar en 1976, quién analizó los ácidos grasos producidos por cepas de Clostridium aisladas de personas sometidas a dietas diferentes. Anteriormente, la HSGC se aplicó a la evaluación de la contaminación microbiana de alimentos y al estudio de algunos hongos. (109,134,149)

El análisis se lleva a cabo generalmente en cultivos de 24 a 48 horas. Las muestras se llevan hasta un pH ácido si se investiga la presencia de ácidos o hasta un pH alcalino si lo que se busca es la presencia de aminas. Medios de cultivo estériles y medio conteniendo soluciones patrón de los ácidos y aminas se tratan en las mismas condiciones. (106, 107,108)

En 1978, Lärsson comparó el método de la HSGC con el análisis de cromatografía de gases en extractos etéreos y en sobrenadantes de cultivo directamente de cepas cultivadas en medio de peptona-extracto de levadura-glucosa. Encontró que la técnica de la HSGC es más simple y rápida de realizar y es la única que permite la detección de alcoholes. A pesar de que las concentraciones relativas de los compuestos no están representadas por los diferentes picos obtenidos en el cromatograma, esto no es crítico en la identificación. (107)

En un estudio posterior, Lärsson y Mårdh analizan componentes ácidos, neutros y básicos en un cromatógrafo de dos canales, con dos diferentes columnas, una empacada con Porapak Q que facilita la detección de productos ácidos y neutros en el medio acidificado y otra con Chromosorb 103,

que permite la detección de compuestos alcalinos y neutros. (108)

La HSGC puede dar una mayor información diagnóstica, al detectar compuestos que eluyen rápidamente dentro del cromatograma; esto se ejemplifica en la diferenciación de las especies C. difficile y C. sporogenes ya que esta última produce alcoholes. Tal diferenciación no pudo hacerse en extractos etéreos utilizando una columna empacada.

Además, en este estudio se demostró la conveniencia de utilizar una columna capilar que permite una mejor resolución de los picos en el cromatograma, debido a que presenta una mayor superficie de intercambio. (106, 109)

En un estudio en que analizaron tanto cepas de colección como muestras de pus a partir de abscesos intraabdominales por HSGC y por cromatografía de gases de los extractos etéreos, se encontró que los cromatogramas obtenidos son comparables. Por HSGC se detectan además, compuestos de elución rápida que no se encuentran por extracción. También es posible detectar la presencia de anaerobios directamente en las muestras, siendo los marcadores los ácidos isovalérico y butírico, mismos que no se encuentran en muestras que contienen aerobios o facultativos. (109,134)

Entre las ventajas de la técnica de HSGC están un menor tiempo en la preparación de la muestra, y un aumento de la vida media de la columna, ya que no se introducen en ella materiales no volátiles, como no aparecen picos del solvente en el cromatograma, aumenta la capacidad diagnóstica diferencial. Por otro lado, es posible la automatización de la técnica y los análisis pueden hacerse sin un monitoreo continuo y con más alta precisión que en el caso de la inyección manual. Además, el cromatógrafo puede conectarse a una computadora que hace posible evaluar los cromato-

gramas de referencia en la memoria y relacionarlos con los obtenidos para las muestras problema. (107,109)

A pesar de que la cromatografía de gases es útil para identificar grupos específicos o especies de microorganismos, en ciertos géneros es de valor limitado ya que muchas especies producen el mismo patrón de metabolitos. La detección de compuestos como ácido fenilacético, ácidos hidrocínámico, indolacético, p-hidroxifenilacético, 2-cetobutírico y otros ácidos conteniendo azufre puede hacerse en columnas capilares, que tienen una mayor resolución, lo cual puede ayudar en la identificación diferencial de algunos géneros. (141,142,150,151,219)

Por otro lado, no se encuentra correlación entre el patrón de ácidos grasos obtenido en la muestra original y el género o especie del microorganismo aislado, así como tampoco existe entre el perfil de ácidos grasos volátiles de la muestra y el producido por los microorganismos aislados de la misma en un medio de cultivo in vitro. Lo anterior se observó tanto en muestras de las que se recuperaron solo anaerobios como de las que se obtuvo un cultivo mixto. Las razones para esta falta de correlación no están claras; pudiera ser que no se producen los mismos metabolitos in vivo que in vitro o que a pesar de que se produzcan permanezcan unidos a componentes de los tejidos y no se detecten. (227)

Sin embargo, los datos del cromatograma junto con los de la morfología microscópica, pueden dar un diagnóstico presuntivo a nivel de género, treinta minutos a una hora después de recibir el espécimen.

Análisis por cromatografía en papel y en capa fina

La cromatografía en papel y en capa fina no se han utilizado ampliamente en la identificación de los metabolitos volátiles producidos por bacterias anaerobias. Estas técnicas podrían ser una alternativa al análisis por cromatografía de gases ya que se ha demostrado que se obtienen resultados comparables, respecto al perfil de ácidos grasos.

La identificación de géneros y especies de todas las cepas de anaerobios de referencia y las aisladas de muestras clínicas, puede hacerse en base a características morfológicas y bioquímicas y a la aplicación de la cromatografía en papel y capa fina.

Estas técnicas requieren de cinco a seis horas para su realización, pero tienen varias ventajas como su simplicidad y bajo costo, por lo que pueden realizarse en casi cualquier laboratorio. (170,201)

D I S C U S I O N

Generalmente las bacterias anaerobias se ven involucradas en enfermedades graves, asociadas a una alta morbilidad y mortalidad.

Las técnicas bacteriológicas que convencionalmente se llevan a cabo para el diagnóstico requieren un tiempo prolongado para su realización, de 7 a 14 días, antes de dar un resultado definitivo.

Las técnicas de identificación rápida aplicadas directamente a las muestras clínicas se han enfocado a la detección de productos solubles o componentes celulares de las bacterias, logrando obtener los resultados del análisis pocas horas después de haber recibido la muestra.

La inmunofluorescencia se ha aplicado en el estudio de los géneros Bacteroides, Fusobacterium y Clostridium; los resultados obtenidos respecto a la especificidad de la prueba indican que pueden utilizarse para la clasificación serológica como un medio rápido de identificación. Es necesario el desarrollo de sueros que cubran los tipos antigénicos de las cepas locales, debido a las variaciones geográficas que se han observado dentro de una misma especie.

Desde hace algunos años la inmunofluorescencia se ha aplicado en la detección de diversos antígenos y tiene actualmente una gran difusión. Es una técnica simple en su realización y puede lograrse un alto grado de especificidad y sensibilidad. Los resultados pueden tenerse en 1 a 2 horas y no está limitado por el tipo de muestra de que se disponga. La identificación es posible en muestras no viables o contaminadas por flora saprofitica.

Requiero, sin embargo, equipo especial y personal capacitado y con expe-

riencia. Es necesario llevar un control del almacenamiento de los conjugados para evitar su deterioro y analizar su efectividad dentro de períodos determinados.

La conveniencia de su uso y su gran aplicabilidad compensan el costo del método, que por otro lado, es relativamente fácil de adaptar en el laboratorio.

Utilizando la contraelectroforesis se han detectado las toxinas de C. difficile y C. perfringens y anticuerpos dirigidos contra las mismas y frente a componentes celulares de B. fragilis.

Es un método con una sensibilidad aceptable y que se lleva a cabo en 20 a 45 minutos. El equipo que utiliza generalmente está disponible en cualquier laboratorio, sin embargo, requiere de una estandarización previa y de un control estricto de las variables. Por otro lado, está limitado a la detección de antígenos cargados negativamente y sus resultados son semicuantitativos cuando se analizan componentes solubles.

El ensayo inmunoenzimático ha mostrado ser útil en la identificación de anaerobios en fluidos corporales y para la determinación en suero de anticuerpos dirigidos a éstos.

Una de las mayores ventajas de este método es su sensibilidad (ng/ml), además de que se tiene una medición objetiva e incluso cuantitativa del antígeno o el anticuerpo que se está determinando.

Con ELISA pueden detectarse los anticuerpos de las diferentes clases: IgA, IgG e IgM, como se ha hecho para anticuerpos dirigidos frente a C. difficile y algunas especies de Bacteroides, lo que puede ayudar a entender la patogénesis y los mecanismos de la respuesta inmune que se presentan en estas enfermedades.

La obtención de los conjugados es laboriosa y requiere anticuerpos altamente purificados, lo que incrementa el costo de la prueba. Se requieren cinco a seis horas de procedimiento, teniendo la placa de microtitulación preparada previamente para dar un resultado. No obstante, los datos que se pueden obtener por ELISA son valiosos y justificarían la utilización de este método más elaborado.

Los resultados de la cromatografía no tienen una especificidad alta; sin embargo, el dato obtenido acerca de que si una infección se debe a anaerobios o a aerobios treinta minutos después de analizar la muestra, es útil en muchos aspectos, así como el hecho de que no interfiera en la prueba la presencia de flora saprófita, por lo que no es necesario tomar una muestra con jeringa y aguja u otros instrumentos quirúrgicos. Incluso pueden analizarse hisopos, si no se dispone de otro tipo de muestra.

En el análisis de hemocultivos es útil para dar un diagnóstico presuntivo, junto con los datos de la morfología con la tinción de Gram y para guiar el aislamiento e identificación definitivas. Debido a que el equipo necesario es costoso y requiere una instalación especial, este método está fuera del alcance de muchos laboratorios. Sin embargo, en instituciones en que sí lo tienen para otros fines, sería útil la estandarización del método para el análisis de muestras para estudio bacteriológico. La cromatografía en papel y capa fina es una alternativa que da resultados similares en cinco a seis horas con un bajo costo y simplicidad en su realización.

Actualmente en México son pocos los laboratorios que llevan a cabo cultivo e identificación de anaerobios; debido por una parte a que es laborio

so y difícil y, por otro, al costo que implica en equipo y reactivos una identificación final.

Las técnicas de identificación rápida como las que se han descrito serían útiles en este sentido también, dirigiendo las técnicas de aislamiento, con un ahorro de material y reactivos.

La implementación de este tipo de pruebas sería posible en hospitales de tercer nivel, que tuvieran la función de laboratorios de referencia, ya que de esta manera se llevarían a cabo con mayor costeabilidad y eficiencia.

La elección de alguno de estos métodos rápidos de identificación dependería de varios factores como disponibilidad de equipo y reactivos, experiencia previa en la realización de las técnicas y alcance de la información que se desea obtener mediante la prueba.

C O N C L U S I O N E S

- Es necesario un diagnóstico presuntivo a nivel de género y si es posible de especie en las enfermedades por anaerobios, debido a que presentan una susceptibilidad característica frente a los antibióticos.
- Los métodos rápidos de identificación detectan componentes celulares o productos solubles de las bacterias directamente en las muestras clínicas, logrando obtener los resultados pocas horas después de haber recibido la muestra.
- Con el método de inmunofluorescencia es posible lograr una alta sensibilidad y especificidad en la identificación de los principales géneros de anaerobios.
- La identificación por inmunofluorescencia podría adaptarse en laboratorios en los que se cuenta con el equipo necesario y que tienen experiencia en la realización de esta técnica.
- El equipo empleado en la contraelectroforesis generalmente está disponible en casi cualquier laboratorio y tiene una sensibilidad y especificidad aceptables; sin embargo, está limitada a la determinación de componentes solubles en forma semicuantitativa.

- La contraelectroforesis se aplica principalmente en la detección de toxinas producidas por algunos anaerobios y de anticuerpos dirigidos frente a éstos.
- La información que puede obtenerse al realizar un ensayo inmunoenzimático es valiosa y compensaría el costo y el tiempo necesarios para su realización.
- La determinación de anticuerpos de diferentes clases dirigidos frente a componentes celulares y productos solubles de los anaerobios por ELISA, apoyaría el estudio de la patogénesis y la respuesta inmune en las enfermedades causadas por estas bacterias.
- La cromatografía de gases proporciona datos útiles en la identificación presuntiva de los anaerobios directamente en muestras clínicas y para dirigir el aislamiento e identificación definitivas. Este método podría adaptarse en laboratorios que cuentan ya con el equipo necesario, debido a su alto costo.
- La cromatografía en papel o en capa fina proporciona datos similares, en cinco a seis horas y es una alternativa económica y de fácil realización.
- Estas técnicas se pueden aplicar en muestras no viables o contaminadas por flora normal.

- La implementación de alguna de estas técnicas sería factible en laboratorios de investigación, que funcionaran como centros de referencia en bacteriología de anaerobios.
- La inversión realizada al utilizar estos métodos rápidos de diagnóstico está justificada porque se logra dar en unas cuantas horas el resultado de laboratorio, e igualmente rápido al tratamiento adecuado.

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

- 1.- Abshire, R.L., Lombard, G.L. and Dowell, V.R.Jr., "Fluorescent antibody studies on selected strains of B. fragilis ss fragilis", J. Clin. Microbiol., 6(4):425-32 (1977)
- 2.- Abshire, R.L., Dowell, V.R.Jr. and Lombard, G.I., "Serological study of trichloroacetic acid extracts of B. fragilis", J. Clin. Microbiol., 2(2):274-9 (1979)
- 3.- Arnon, S.S., "Breast feeding and toxigenic intestinal infections: missing links in crib death?", Rev. Infect. Dis., 6 Suppl 1:193-201 (1984)
- 4.- Aronsson, B., Gronstrom, M., Mollby, R. and Nord, C.E., "Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to C. difficile toxins in patients with pseudomembranous colitis and antibiotic-associated diarrhoea", J. Immunological Methods, 60:341-50 (1983)
- 5.- Babb, J.L. and Cummins, C.S., "Relationships between serological groups and desoxyribonucleic acid homology groups in B. fragilis and related species", J. Clin. Microbiol., 11 (2):369-79 (1981)
- 6.- Baine, H. and Cherniak, R., "Capsular polysaccharides of C. perfringens Hobbs 5", Biochem. 10:2948-52 (1971)
- 7.- Banno, Y., Kobayashi, T., Kono, H., Watanabe, K., Ueno, K. and Nozasa, Y., "Biochemical characterization and biologic actions of two toxins (D-1) and (D-2) from C. difficile", Rev. Infect. Dis. 6 Suppl 1:11-20 (1984)
- 8.- Batty, I. and Walker, P.D., "Differentiation of C. septicum and C. chauvoei by the use of fluorescent labelled antibodies", J. Pathol. Bacteriol., 85:517-21 (1963)
- 9.- Bauer, H.H., Cristian, G.D. and O'Reilly, J.E. (eds) "INSTRUMENTAL ANALYSIS" Allyn and Bacon, Inc. Boston 1978
- 10.- Bawdon, R.E., Crane, L.R. and Palchaudhuri, S., "Antibiotic resistance in anaerobic bacteria: Molecular biology and clinical aspects", Rev. Infect. Dis. 4(6):1075-95 (1982)
- 11.- Beerens, H., Wattres, P., Shinjo, T., Romond, C., "Premiers resultats d'un essai de classification serologique de 131 souches de Bacteroides du groupe fragilis (Eggerthella)", Ann. Inst. Pasteur (Paris) 121:187-98 (1971)

- 12.- Berg, J.D., Mills, R.G., Coleman, D.J., "Improved g-l-c method for the identification of C. difficile",
J. Clin. Path., 38(1):108-10 (1985)
- 13.- Beutner, E.H., "Defined immunofluorescent staining: past progress, present status and future prospects for defined conjugates",
Ann. N. Y. Acad. Sci., 177:506-26 (1971)
- 14.- Bideberry, D., Lesage, D., Petit, J.C. and Daguet, G.L., "Detection of the B. fragilis group in clinical specimens by indirect immunofluorescence",
Nouv. Pres. Med., 9(30):2080-1 (1980)
- 15.- Bjornson, A.B., "Role of complement in host resistance against members of the Bacteroidaceae",
Rev. Infect. Dis., 6 Suppl 1:34-9 (1984)
- 16.- Bjornson, H.S., "Enzymes associated with the survival and virulence of Gram-negative anaerobes",
Rev. Infect. Dis., 6 Suppl 1:21-24 (1984)
- 17.- Bjornson, H.S., "Activation of Hageman factor by lipopolysaccharides of B. fragilis, B. vulgatus, and F. mortiferum",
Rev. Infect. Dis., 6 Suppl 1:30-3 (1984)
- 18.- Bohannon, T.E., Manius, G., Mamaril, F. and LanFun Li Wen, "Quantitative method for the gas chromatographic characterization of acidic fermentation by-products of anaerobic bacteria",
J. Chromatogr. Science, 16:28-35 (1978)
- 19.- Borriello, S.P., "Gas-liquid chromatography and C. difficile",
Lancet, ii:1283 (1981)
- 20.- Braude, A.J., "MEDICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES"
International Textbook of Medicine Sany-Smith-Wyngaarden N. York 1980
- 21.- Bricknell, K.S. and Finegold, S.M., "A simple, rapid method to process and assay fatty acid and alcohols by gas chromatography",
Anal. Biochem. 51:23-31 (1973)
- 22.- Bricknell, K.S. and Finegold, S.M., "Improved method for assay of formic acid by gas-liquid chromatography",
J. Chromatogr. 151:374-8 (1978)
- 23.- Brook, I. and Walker, R.J., "Significance of encapsulated B. melanogenicus and B. fragilis in mixed infections",
Infect. Immun. 44(1):12-15 (1984)

- 24.- Brook, J.B., Nuñez-Montiel, Q.L., Basta, M.T. and Hierholzer, J.C., "Studies of stools from pseudomembranous colitis, rotaviral and other diarrhoeal syndromes by frequency-pulsed electron capture gas-liquid chromatography", *J. Clin. Microbiol.*, 20(3):549-69 (1984)
- 25.- Brooks, J.B., Selin, M.J. and Alley, C.C. "Electron capture gas-liquid chromatography study of the acid and alcohols products of *C. santicum* and *C. chauvoei*", *J. Clin. Microbiol.*, 3(2):180-5 (1976)
- 26.- Butler, M., Jainer, K.A., Malamy, M., Bartlett, J.C. and Tally, F.P. "Transfer of tetracycline or clindamycin resistance among strains of *B. fragilis* in experimental abscesses", *J. Infect. Dis.* 150(1):20-4 (1984)
- 27.- Butler, J.E., Ferbusch, T.L., McGivern, P.L. and Stewart, N., "The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): a measure of antibody concentration or affinity?", *Immunochem.*, 15:131-6 (1978)
- 28.- Caldwell, J.L., Fudenberg, H.H., Stites, D.P. and Wills, J.V., "INMUNOLOGIA BASICA Y CLINICA" 5a. ed. Ed. El Manual Moderno, México, 1985
- 29.- Carlsson, J., Wrethe, J. and Beckman, G., "Superoxide dismutase in *B. fragilis* and related *Bacteroides* species", *J. Clin. Microbiol.*, 6 (3):280-4 (1977)
- 30.- Citron, D.M., "Specimen collection and transport, anaerobic culture technique and identification of anaerobes", *Rev. Infect. Dis.*, 6 Suppl 1:51-8 (1984)
- 31.- Citron, D.M., Finegold, S.M. and Sutter, V.L., "WADSWORTH ANAEROBIC BACTERIOLOGY MANUAL" 3rd edition, St.Louis C.V. Mosby 1980
- 32.- Cousland, G., Poxton, I.A., "Crossed immunoelectrophoresis and ELISA of the cell surface antigens of *B. fragilis*", *J. Gen. Microbiol.* 130:645-9 (1984)
- 33.- Cherniak, R. and Henderson, B.G., "Immunochemistry of the capsular polysaccharides from *C. perfringens* selected Hobbs strains 1, 5, 9 and 10", *Infect. Immun.* 6:32-7 (1974)
- 34.- Cherniak, R., Lombard, G.L. and Dowell, V.R.Jr., "Immunochemical evidence for multiple serotypes of *B. fragilis*", *J. Clin. Microbiol.*, 9(6):699-704 (1979)
- 35.- Dayalu, K.I., Cherniak, R. and Hatheway, C.I., "Common polysaccharides antigens from the cell envelope of *C. perfringens* type A", *Infect. Immun.* 31(2):678-14 (1981)

- 36.- Deacon, A.G., Duerden, B.I. and Holbrook, W.P., "Gas-liquid chromatographic analysis of metabolic products in the identification of Bacteroidaceae of clinical interest",
J. Med. Microbiol., 11(2):81-99 (1978)
- 37.- DeAraujo, W.C., Vorak, E. and Mergenhausen, S.E., "Immunochemical analysis of human oral strains of Fusobacterium and Leptotrichia"
J. Bacteriol., 86:837-44 (1963)
- 38.- De Girolami, P.C. and Mepani, C.P., "Evaluation of a direct fluorescent antibody staining method for rapid identification of members of the B. fragilis group",
Am. J. Clin. Pathol. 76:78-82 (1981)
- 39.- Dezfulian, M. and Bartlett, J.G., "Detection of C. botulinum type A toxin by ELISA with antibodies produced in immunologically tolerant animals",
J. Clin. Microbiol., 19(5):645-8 (1984)
- 40.- Dezfulian, M. and Bartlett, J.G., "Selective isolation and rapid identification of C. botulinum types A and B by toxin detection",
J. Clin. Microbiol., 21(2):231-3 (1985)
- 41.- Dezfulian, M., Hatheway, C.L., Yolken, R.H. and Bartlett, J.G., "ELISA for detection of C. botulinum type A and type B toxins in stool samples of infants with botulism",
J. Clin. Microbiol., 20(3):379-83 (1984)
- 42.- Dowell, V.R.Jr., "Botulism and Tetanus: selected epidemiologic and microbiologic aspects",
Rev. Infect. Dis., 6 Suppl 1:202-7 (1984)
- 43.- Duerden, B.I., Collee, J.G., Brown, R., Deacon, A.G. and Holbrook, W.P., "A scheme for the identification of clinical isolates of Gram-negative anaerobic bacilli by conventional bacteriological tests",
J. Med. Microbiol., 13:231-45 (1980)
- 44.- Ebersale, J.L., Frey, D.E., Taubman, K.A., Smith, D.J., Socransky, S.S. and Tanner, A.C.P., "Serological identification of oral Bacteroides spp by ELISA",
J. Clin. Microbiol., 19(5):639-44 (1984)
- 45.- Edson, R.S., Rosenblatt, J.E., Washington, J.A. and Stewart, J.B., "Gas-liquid chromatography of positive blood cultures for rapid presumptive diagnosis of anaerobic bacteremia",
J. Clin. Microbiol., 15(6):1059-61 (1982)

- 46.- Evaldson, G., Heimdahl, A., Kager, L. and Nord, C.E., "The normal human anaerobic microflora",
Scand. J. Infect. Dis. Suppl., 15:9-15 (1982)
- 47.- Pales, W.H. and Teresi, G.W., "Fluorescent antibody technique for identifying isolates of Sphaerophorus necrophorus of bovine hepatic abscesses origin"
Am. J. Vet. Res. 33:2323-29 (1972)
- 48.- Feinberg, J.G. and Smith, J. "CROMATOGRAFIA SOBRE PAPEL Y CAPA FINA. ELECTROFORISIS" Ed. Alhambra, España 1979
- 49.- Finegold, S.M., "ANAEROBIC BACTERIA IN HUMAN DISEASE",
Academic Press, Inc. New York, 1977
- 50.- Finegold, S.M., Rosenblatt, J.E., Sutter, V.L. and Attebery, H.R., "SCOPE MONOGRAPH ON ANAEROBIC INFECTIONS"
UpJohn Company, Kalamazoo, Michigan
- 51.- Friedman, H., Linn, J. and Prier, J.H., "IMMUNOSEROLOGY IN THE DIAGNOSIS OF INFECTIOUS DISEASES",
University Park Press, Baltimore, 1979
- 52.- García, M.M., Charlton, K.M. and McKay, K.A., "Characterization of endotoxin from F. necrophorum"
Infect. Immun. 11:371-9 (1975)
- 53.- García, M.M., Neil, D.H. and McKay, K.A., "Application of immunofluorescence to studies on the ecology of Sphaerophorus necrophorus",
Appl. Microbiol., 21(5):809-14 (1971)
- 54.- George, W.L., Sutter, V.L., Citron, D. and Finegold, S.M., "Selective and differential medium for isolation of C. difficile",
J. Clin. Microbiol., 2:214-9 (1979)
- 55.- George, R.H., Symonds, J.M., Dismack, F., Brown, J.D., Arabi, Y., Shinagawa, N., Keighley, M.R., Alexander-Williams, J. and Burdon, D.W., "Identification of C. difficile as a cause of pseudomembranous colitis",
Br. Med. J., 1:695 (1978)
- 56.- Glasby, C. and Hatheway, C.L., "Fluorescent-antibody reagents for the identification of C. botulinum",
J. Clin. Microbiol., 18(6):1378-83 (1983)
- 57.- Gorbach, S.L., Mayhew, J.W., Bartlett, J.G., Thadephalli, H. and Onderdonk, A.B., "Rapid diagnosis of anaerobic infections by direct gas-liquid chromatography of clinical specimens",
J. Clin. Invest., 57:478-84 (1976)

- 58.- Graham, M.B. and Falkler, W.A.Jr., "Serological reactions of the Genus Peptostreptococcus",
J. Clin. Microbiol., 1(4):385-8 (1978)
- 59.- Graham, M.B. and Falkler, W.A.Jr., "Extractable antigen shared by Peptostreptococcus anaerobius strains",
J. Clin. Microbiol., 2(4):507-10 (1979)
- 60.- Green, J.H., Gray, S.B. and Harrell, W.K., "Stability of fluorescent antibody conjugates stored under various conditions",
J. Clin. Microbiol., 3(1):1-4 (1976)
- 61.- Grzelak-Puczynska, I. and Meisel-Mikolajczyk, E., "Rapid identification and serotyping of B. fragilis in clinical material by direct immunofluorescence",
J. Appl. Bact., 51:217-22 (1981)
- 62.- Gupta, U. and Murugesan, K., "Direct gas-liquid chromatography of clinical specimens for rapid diagnosis of anaerobic infections",
Indian J. Med. Res. 77:19-23 (1983)
- 63.- Hauser, K.J. and Zabransky, R.J., "Modification of the gas-liquid chromatography procedure and evaluation of a new column packing material for the identification of anaerobic bacteria",
J. Clin. Microbiol., 2(1):1-7 (1975)
- 64.- Heitz, U., "Immunochemistry- Theory and Application",
Acta Histochemica Suppl. 25:17-35 (1982)
- 65.- Hofstad, T., "O-antigenic specificity of LPS from B. fragilis ss fragilis",
Acta Pathol. Microbiol. Scand. (B) 83:477-81 (1975)
- 66.- Hofstad, T., "Antibodies reacting with LPS from B. melaninogenicus, B. fragilis, and F. nucleatum in serum from normal human subjects",
J. Infect. Dis., 129:349-52 (1974)
- 67.- Hofstad, T., "Cross-reactivity of B. fragilis O antigens",
Acta Path. Microbiol. Scand. (B) 85:9-13 (1977)
- 68.- Hofstad, T., "Serological responses to antigens of Bacteroidaceae",
Microbiol. Reviews, 43(1):103-15 (1979)
- 69.- Hofstad, T., "Immunochemical studies of LPS and partially degraded LPS from B. fragilis IPL #323",
Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. (B) 90:281-7 (1982)
- 70.- Hofstad, T., "Immunochemical studies of partially hydrolyzed LPS from Fusobacterium nucleatum ATCC 10953",
Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. (B) 90:289-93 (1982)

- 71.- Hofstad, T. and Skaug, N., "Fatty acid and neutral sugars present in LPS isolated from Fusobacterium species",
Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. (B) 88:115-20 (1980)
- 72.- Hofstad, T., Skaug, N. and Bjorland, T., "O-antigenic cross-reactivity in F. nucleatum",
Acta Path. Microbiol. Scand. (B) 87:371-4 (1979)
- 73.- Holland, J.W., Hill, E.O. and Altemeier, W.A., "Numbers and types of anaerobic bacteria isolated from clinical specimens since 1960",
J. Clin. Microbiol., 5 (1):20-5 (1977)
- 74.- Holland, J.W., Stauffer, L.R. and Altemeier, W.A., "Fluorescent antibody test kit for rapid detection and identification of members of the B. fragilis and B. melaninogenicus groups in clinical specimens"
J. Clin. Microbiol., 10(2):121-7 (1979)
- 75.- Holst, E., Helin, I., Mårdh, P.A., "Recovery of C. difficile from children",
Scand. J. Infect. Dis., 13:41-5 (1981)
- 76.- Hughes, J.A., Turnbull, P.C.B. and Stringer, M.M., "A serotyping system for C. welchii (C. perfringens) type A and studies on the type specific antigens",
J. Med. Microbiol., 9:475-9 (1976)
- 77.- Hunter, J.V., Chadwich, M., Hutchinson, G. and Hudson, M.E., "Use of GLC in the clinical diagnosis of anaerobic pleuropulmonary infection",
Br. J. Dis. Chest, 79(1):1-8 (1985)
- 78.- Hymans, W. and Schaeffer, M., "Fifth International Conference on Immunofluorescence and related staining techniques",
Ann. N. Y. Acad. Sci. 254:1-628 (1975)
- 79.- Ingham, H.R., Dutton, J., Sisson, P.R., Sprot, M.S. and Selkon, J.B., "An aid to the preliminary identification of non-sporing anaerobes",
J. Clin. Path. 31(8):806-7 (1978)
- 80.- Jarvis, M., "False-positive CIE tests for C. difficile: the role of C. bifermentans and C. sordellii?",
J. Infect. Dis. 148(6):1168-9 (1983)
- 81.- Jarvis, W., Nuñez-Montiel, O., Thompson, F. and Dowell, V.R., "Comparison of bacterial isolation, cytotoxicity assay, and CIE for the detection of C. difficile and its toxin",
J. Infect. Dis., 147(4):778 (1983)
- 82.- Kasper, D.L., "Chemical and biological characterization of the LPS of B. fragilis ss fragilis",
J. Infect. Dis. 134(1):59-66 (1976)

- 83.- Kasper, D.L., "The polysaccharide capsule of Bacteroides fragilis ss fragilis: immunochemical and morphologic definition",
J. Infect. Dis. 133(1):79-87 (1976)
- 84.- Kasper, D.L., Fiddian, A.P. and Tabaqhali, S., "Rapid diagnosis of Bacteroides infections by indirect immunofluorescence assay of clinical specimens",
Lancet, i:239-42 (1979)
- 85.- Kasper, D.L., Hayes, M.E., Reinap, B.G., Craft, F.O., Onderdonk, A. B. and Polk, B.F., "Isolation and identification of encapsulated strains of B. fragilis",
J. Infect. Dis. 136(1):75-9 (1977)
- 86.- Kasper, D.L., Lindberg, A.A., Weintraub, A., Onderdonk, A.B. and Lönngren, J., "Capsular polysaccharides and lipopolysaccharides from two strains of B. fragilis",
Rev. Infect. Dis. 6 Suppl 1:25-9 (1984)
- 87.- Kasper, D.L., Onderdonk, A.B., Crabb, J. and Bartlett, J.G. "Protective efficacy of immunization with capsular antigen against experimental infection with B. fragilis",
J. Infect. Dis. 140(5):724-31 (1979)
- 88.- Kasper, D.L., Onderdonk, A.B., Polk, B.F., Bartlett, J.G., "Surface antigens as virulence factors in infection with B. fragilis",
Rev. Infect. Dis. 1:278-88 (1979)
- 89.- Kasper, D.L., Onderdonk, A.B., Reinap, B.G. and Lindberg, A.F., "Variations of B. fragilis with in vitro passage: presence of an outer membrane-associated glycan and loss of capsular antigen",
J. Infect. Dis. 142(5):750-5 (1980)
- 90.- Kasper, D.L. and Seiler, M.W., "Immunochemical characterization of the outer membrane complex of B. fragilis sps fragilis",
J. Infect. Dis. 132(4):440-50 (1975)
- 91.- Klempner, M.S., "Interactions of polymorphonuclear leukocytes with anaerobic bacteria",
Rev. Infect. Dis. 6 Suppl 1:40-4 (1984)
- 92.- Koneman, E.W., Allen, S.D., Dowell, V.R.Jr. and Sommers, H.N., "DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO",
Ed. Medica Panamericana, México, 1983.
- 93.- Kristoffersen, T., McLund, J.A. and Hofstad, T., "Serologic properties of LPS endotoxins from human oral fusobacteria",
Scand. J. Dent. Res. 79:105-12 (1971)
- 94.- Kristoffersen, T., "Immunochemical studies of oral fusobacteria. III Purification of a group reactiv precipitinogen",
Acta Path. Microbiol. Scand. 77:447-55 (1969)

- 95.- Kudav, P., Krishnan, K., Deodhar, L. and Jhala, M.I., "Gas-liquid chromatographic patterns in clinical infections with B. melaninogenicus", Indian J. Med. Res. 77:24-8 (1983)
- 96.- Kurzynski, T.A., Cembronski, J.S. and Kimball, J.L., "The use of GIE for the detection of C. difficile toxin in stool filtrates: laboratory and clinical correlation" Am. J. Clin. Pathol. 79:370-4 (1983)
- 97.- Labbé, M., Delamare, N., Peperack, F., Crokaert, F. and Yourassowky, E., "Detection of B. fragilis and B. melaninogenicus by direct immunofluorescence", J. Clin. Path. 33:1189-92 (1980)
- 98.- Ladas, S., Arapakis, G., Malamou-Ladas, H., Palikaris, G. and Arseni, A., "Rapid diagnosis of anaerobic infections by gas-liquid chromatography", J. Clin. Path. 32:1162-7 (1979)
- 99.- Lambe, D.W.Jr., "Determination of B. melaninogenicus serogroups by fluorescent antibody staining", Am. J. Clin. Path. 71:97-101 (1979)
- 100.- Lambe, D.W., "Characterization of a polyvalent conjugate of B. fragilis by fluorescent antibody staining", Appl. Microbiol., 28(4):561-7 (1974)
- 101.- Lambe, D.W., Ferguson, K.P. and Mayberry, W.R., "Characterization of B. gingivalis by direct fluorescent antibody staining and cellular fatty acid profiles", Can. J. Microbiol., 28:367-74 (1982)
- 102.- Lambe, D.W.Jr. and Jerris, R.C., "Description of a polyvalent conjugate and a new serogroup of B. melaninogenicus by fluorescent antibody staining", J. Clin. Microbiol., 3(5):506-12 (1976)
- 103.- Lambe, D.W.Jr. and Muroz, D.A., "Serogrouping of B. fragilis ss fragilis by the agglutination test", J. Clin. Microbiol., 3(6):586-92 (1976)
- 104.- Lamberg, R.E., Schell, R.F. and LeFrook, J.L., "Detection and quantitation of simulated anaerobic bacteremia by centrifugation and filtration", J. Clin. Microbiol., 17(5):856-9 (1983)
- 105.- Landay, M.E. and Baldwin, W., "Comparative serology of two clinical isolates of B. fragilis and B. thetaiotaomicron", J. Clin. Microbiol., 9(5):643-4 (1979)

- 106.- Lärsson, L. and Holst, E., "Feasibility of automated head-space gas chromatography in identification of anaerobic bacteria", *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. (B)* 90:125-30 (1982)
- 107.- Lärsson, L., Mårdh, P.A. and Odham, G., "Detection of alcohols and volatile fatty acid by head-space gas chromatography in identification of anaerobic bacteria", *J. Clin. Microbiol.*, 7(1):23-7 (1978)
- 108.- Lärsson, L., Mårdh, P.A. and Odham, G., "Analysis of amines and other bacterial products by head-space gas chromatography", *Acta Path. Microbiol. Scand. (B)* 86:207-13 (1978)
- 109.- Larsson, L., Mårdh, P.A. and Odham, G. (eds.) "GAS CHROMATOGRAPHY/ MASS SPECTROMETRY. APPLICATIONS IN MICROBIOLOGY" Plenum Press, New York 1984
- 110.- Laughon, B.E., "Enzyme immunoassay for detection of C. difficile toxins A and B in fecal specimens", *J. Infect. Dis.*, 149(5):781-9 (1984)
- 111.- Leading article: "Gas chromatographic diagnosis of infection", *Lancet*, vi:513-4 (1980)
- 112.- Lee, L. and Cherniak, R., "Capsular polysaccharides of C. perfringens Hobbs 10" *Infect. Immun.* 9:318-22 (1974)
- 113.- Legakis, N.J., Xanthopoulou, K., Ioannidou, H. and Papavassiliou, J., "Direct quantitative determination of acidic end products in clinical specimens for presumptive diagnosis of anaerobic infections", *Ann. Microbiol.*, 133B:281-90 (1982)
- 114.- Leigh, D.A. and Simmons, K., "Identification of non-sporing anaerobic bacteria", *J. Clin. Path.* 30(10):991-2 (1977)
- 115.- Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, W.J. and Truant, J.P. "MICROBIOLOGIA CLINICA" 3a. ed. Ed. Medica Panamericana, Buenos Aires Argentina 1982
- 116.- Letonturier, Ph. "MANUAL DE INMUNOLOGIA GENERAL" Kason- Editores México, 1981
- 117.- Levett, P.N., "Detection of C. difficile in faeces by direct gas-liquid chromatography", *J. Clin. Path.* 37:117-9 (1984)
- 118.- Levett, P.N. and Phillips, K.D., "Gas chromatographic definition of C. difficile and detection of cytotoxin from a modified selective medium" *J. Clin. Path.* 38:82-5 (1985)

- 119.- Levine, H.H., Kennedy, M. and La Mont, J.T., "CIE vs. cytotoxicity assay for the detection of C. difficile toxin"
J. Infect. Dis. 145(3):358 (1982)
- 120.- Lewis, G.E.Jr., Kulinsk, S.S., Reichard, D.V. and Metzger, J.F., "Detection of C. botulinum type G toxin by ELISA",
Appl. Environ. Microbiol., 42(6):1018-22 (1981)
- 121.- Libby, J.M., "C. difficile toxin A in infants",
J. Infect. Dis. 148(3):606 (1983)
- 122.- Lindberg, A.A., Weintraub, A., Kasper, D.L. and Löngren, J., "Virulence factors in infections with B. fragilis: Isolation and characterization of capsular polysaccharide and lipopolysaccharide",
Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 35:45-52 (1982)
- 123.- Lindner, J.G.E.M. and Marcellis, J.H., "Quantitative gas chromatography of Bacteroides species under different growth conditions",
Antonie Van Leeuwenhoek 44(1):1-14 (1978)
- 124.- Lysterly, D.M., Sullivan, N.M. and Wilkins, T.D., "Enzyme-linked immunosorbent assay for C. difficile toxin A",
J. Clin. Microbiol. 17(1):72-8 (1983)
- 125.- Lynt, R.K.Jr., Salomon, H.M., Kautter, D.O. and Lilly, T.Jr. "Serological studies of C. botulinum type E and related organisms",
J. Bacteriol. 93(1):27-35 (1967)
- 126.- Lyznicki, J.M., Busch, E.L. and Blazevic, D.J., "Medium for selective isolation and presumptive identification of the B. fragilis group",
J. Clin. Microbiol. 15(1):123-9 (1982)
- 127.- Makin, T., "Rapid identification of C. difficile by direct detection of volatile organic acids from primary isolation media"
J. Clin. Path. 37(6):711-2 (1984)
- 128.- Mansheim, B.J. and Coleman, S.E., "Immunochemical differences between oral and nonoral strains of B. asaccharolyticus",
Infect. Immun. 27(2):589-96 (1980)
- 129.- Mansheim, B.J. and Kasper, D.L., "Purification and immunochemical characterization of the outer membrane complex of B. melaninogenicus ss asaccharolyticus.",
J. Infect. Dis. 135(5):787-98 (1977)
- 130.- Mansheim, B.J. and Kasper, D.L., "Detection of anticapsular antibodies to B. asaccharolyticus in serum from rabbits and humans by use of an ELISA",
J. Infect. Dis. 140(6):945-51 (1979)
- 131.- Mansheim, B.J., Onderdonk, A.B. and Kasper, D.L., "Immunochemical

- and biologic studies of the LPS of B. melaninogenicus ss asaccharolyticus",
J. Immunol., 120(1):72-8 (1978)
- 132.- Mansheim, B.J., Onderdonk, A.B. and Kasper, D.L., "Immunochemical characterization of surface antigens of B. melaninogenicus",
Rev. Infect. Dis., 1(2):263-75 (1979)
- 133.- Mansheim, B.J., Solstad, C.A. and Kasper, D.L., "Identification of a subspecies-specific capsular antigen from B. melaninogenicus ss asaccharolyticus by immunofluorescence and electron microscopy",
J. Infect. Dis., 138:736-41 (1978)
- 134.- Mårdh, P.A., Lärsson, L. and Odham, G., "Head space gas chromatography as a tool in the identification of anaerobic bacteria and diagnosis of anaerobic infections",
Scand. J. Infect. Dis. Suppl., 26:14-18 (1981)
- 135.- Margni, R.A., "INMUNOLOGIA E INMUNOQUIMICA"
 3a. ed. Ed. Médica Panamericana 1982
- 136.- Markowitz, A. and Lerner, M., "Differentiation of several isolates of P. magnus by CIE",
Infect. Immun., 16(1):152-4 (1977)
- 137.- Marrie, T.J., Harding, G.K.M. and Ronald, A.N., "Anaerobic and aerobic urethral flora in healthy females",
J. Clin. Microbiol., 8(1):67-72 (1978)
- 138.- Martin, W.J., Wilhelm, P.A. and Bruckner, D., "Recovery of anaerobic bacteria from vented blood-culture bottles",
Rev. Infect. Dis. 6 Suppl 1:59-61 (1984)
- 139.- Mayhew, J.W. and Gorbach, S.L., "Internal standards for gas chromatographic analysis of metabolic end products from anaerobic bacteria",
Appl. Environ. Microbiol. 33(4):1002-3 (1977)
- 140.- Mayhew, J.W., Onderdonk, A.B. and Gorbach, S.L., "Effects of time and growth media on short chain fatty acid production by B. fragilis",
Appl. Microbiol., 29(4):472-5 (1975)
- 141.- Mayrand, D. and Bourgeau, G., "Production of phenylacetic acid by anaerobes",
J. Clin. Microbiol., 16(4):747-50 (1982)
- 142.- Mayrand, D., "Identification of clinical isolates of selected species of Bacteroides: production of phenylacetic acid",
Can. J. Microbiol. 25:927-8 (1979)

- 143.- McGowan, K. and Gorbach, S.L., "Anaerobes in mixed infections",
J. Infect. Dis. 144(2):181-6 (1981)
- 144.- Meisel-Mikolajczyk, F. and Grzelak-Puczynska, I., "Rapid serotyping of bacteria of the B. fragilis group by direct immunofluorescence, serotype specific conjugates",
J. App. Bacteriol., 51:17-26 (1981)
- 145.- Meloan, C.E. and Kiser, R.W., "PROBLEMAS Y EXPERIMENTOS EN ANALISIS INSTRUMENTAL" Ed. Reverté Mexicana, México 1973
- 146.- Midura, J.J., Yoshihiko Inaue, B.S., Bodily, L.H., "Use of immunofluorescence to identify C. botulinum types A, B and E",
Public. Health. Rep. 82:275-9 (1987)
- 147.- Miescher, P.A. and Müller-Eberhard, H.J., "TEXTBOOK OF IMMUNOPATHOLOGY" 2nd edition Vol III Grune and Stratton, Inc. 1976
- 148.- Milgrom, P., Rose, N.R. and van Oss, C.J., "PRINCIPIOS DE INMUNOLOGIA" 1a. ed. Cía Ed. Continental, México 1983
- 149.- Morin, A. and Paquette, G., "Rapid temperature programmed gas-liquid chromatography of bacterial fatty acids (C₁-C₇) for the identification of anaerobic bacteria",
Experientia 36:1380-1 (1980)
- 150.- Moss, C.W., Dees, S.B. and Guerrant, G.O., "Gas-liquid chromatography of bacterial fatty acids with a fused-silica capillary column",
J. Clin. Microbiol., 12(1):127-30 (1980)
- 151.- Moss, C.W. and Nuñez-Montiel, O.L., "Analysis of short chain acids from bacteria by gas-liquid chromatography with a fused silica capillary column",
J. Clin. Microbiol., 15(2):308-11(1982)
- 152.- Moussa, R.S., "Antigenic formulae of the genus Clostridium",
Nature 181:123-4 (1958)
- 153.- Mouton, C., Hammond, P., Slots, J. and Genco, R.J., "Evaluation of Fluoretec-M for detection of oral strains of B. asaccharolyticus and B. melaninogenicus",
J. Clin. Microbiol., 11(6):682-6 (1980)
- 154.- Mouton, C., Hammond, P., Slots, J., Reed, M.J. and Genco, R.J., "Identification of B. gingivalis by fluorescent antibody staining"
Ann. Microbiol. 132B:69-83 (1981)
- 155.- Murray, P.R. and Sondag, J.E., "Evaluation of routine subcultures of macroscopically negative blood cultures for detection of anaerobes",
J. Clin. Microbiol., 8(4):427-30 (1978)

- 156.- Naik, H.S. and Duncan, C.L., "Rapid detection and quantitation of C. perfringens enterotoxin by CIE",
Appl. Environ. Microbiol., 34(2):125-8 (1977)
- 157.- Naik, H.S. and Duncan, C.L., "Detection of C. perfringens enterotoxin in human fecal samples and anti-enterotoxin in sera",
J. Clin. Microbiol., 7(4):337-40 (1978)
- 158.- Nakou, M., Papvassiliou, J. and Legakis, N.J., "Die direkte immuno fluorescence bei presumptive identifizierung von Bacteroides spezie",
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt., Orig. A 252:101-7 (1982)
- 159.- Nash, J.Q., Chattopadhyay, C., Honwyaombe, J. and Tabaqchali, S., "C. difficile and cytotoxin in routine fecal specimens",
J. Clin. Path. 35:561-5 (1982)
- 160.- Niilo, L. and Cho, H.J., "An ELISA for the detection of C. perfringens enterotoxin antibody",
Can. J. Comp. Med. 48(1):111-2 (1984)
- 161.- Nordbring, F. and Nord, C.E., "Aspects on antibacterial treatment of anaerobic infections",
Scand. J. Infect. Dis. Suppl., 35:59-62 (1982)
- 162.- Notermans, S., Dufrenne, J. and Kozaki, S., "ELISA for detection of C. botulinum type E toxin",
Appl. Environ. Microbiol. 37(6):1173-5 (1979)
- 163.- Notermans, S., Heuvelman, C., Becker, H. and Uemura, T., "Evaluation of the ELISA as tool in diagnosing C. perfringens enterotoxin",
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig B, 179:225-34 (1984)
- 164.- Nuñez-Montiel, O.L., Thompson, F.S. and Dowell, V.R.Jr., "Norleucine-tyrosine broth for rapid identification of C. difficile by GLC",
J. Clin. Microbiol. 17(2):382-5 (1983)
- 165.- Onderdonk, A.B., Kasper, D.L., Cisneros, R.L. and Bartlett, J.G., "The capsular polysaccharide of B. fragilis as a virulence factor: comparison of the pathogenic potential of encapsulated and unencapsulated strains",
J. Infect. Dis. 136(1):82-9 (1977)
- 166.- Onderdonk, A.B., Shapiro, M.E., Finberg, R.W., Zaleznick, D.F. and Kasper, D.L., "Use of a model of intraabdominal sepsis for studies of the pathogenicity of B. fragilis",
Rev. Infect. Dis. 6 Suppl 1:91-5 (1984)
- 167.- Okubadejo, O.A., Lightfoot, N.F. and Hewitt, W.G., "Diagnosis of B. fragilis infection with CIE",
J. Clin. Path. 31:1978-82 (1978)

- 168.- Paine, C.M. and Cherniak, R., "Composition of the capsular polysaccharide of C. perfringens as a basis for their classification by chemotypes",
Can. J. Microbiol., 21:181-5 (1975)
- 169.- Paisley, J.W., Rosenblatt, J.E., Hall, K. and Washinton, J.A., "Evaluation of a routine subculture of blood cultures for detection of anaerobic bacteremia",
J. Clin. Microbiol., 8(6):764-6 (1978)
- 170.- Palosuntheran, C., Drucker, D.B. and Tuxford, A.F., "Feasibility of thin-layer chromatography as an inexpensive alternative to gas-liquid chromatography for the identification of some Gram positive non-sporing rods",
J. Appl. Bact. 42:451-3 (1977)
- 171.- Phillips, M.D. and Rogers, P.A., "Rapid detection and presumptive identification of C. difficile by p-cresol production on a selective medium",
J. Clin. Path. 34:642-4 (1981)
- 172.- Phillips, K.D., Tearle, P.V. and Willis, A.T., "Rapid diagnosis of anaerobic infections by gas-liquid chromatography of clinical material",
J. Clin. Path. 29:428-32 (1976)
- 173.- Polk, B.F. and Kasper, D.L., "B. fragilis subspecies in clinical isolates",
Ann. Intern. Med. 86:569-71 (1977)
- 174.- Porschen, R.K. and Spaulding, E.H., "Fluorescent antibody study of the Gram positive anaerobic cocci",
Appl. Microbiol. 28(5):851-5 (1974)
- 175.- Potvliege, C., Labbé, M. and Yourassowsky, E., "Gas-liquid chromatography as screening test for C. difficile",
Lancet, iv:1105 (1981)
- 176.- Poxton, I.R., "Serological identification of Bacteroides by an ELISA",
J. Clin. Path. 32:294-8 (1979)
- 177.- Poxton, I.R. and Byrne, M.D., "Immunological analysis of the EDTA-soluble antigens of C. difficile and related species",
J. Gen. Microbiol., 122:41-6 (1981)
- 178.- Poxton, I.R. and Byrne, M.D., "Detection of C. difficile toxin by CIE: a note of caution",
J. Clin. Microbiol. 14(3):349 (1981)
- 179.- Poxton, I.R., Brown, R. and Collee, J.G., "Detection of species-specific and cross reactive cell-surface antigens of Bacteroides species by and indirect ELISA",
J. Med. Microbiol., 15:223-31(1982)

- 180.- Poxton, I.R., and Cartmill, T.D.I., "Immunochemistry of the cell-surface carbohydrate antigens of C. difficile",
J. Gen. Microbiol., 128:1365-70 (1982)
- 181.- Poxton, I.R. and Ip, M.K.Y., "The cell surface antigens of B. vulgatus",
J. Gen. Microbiol. 126:103-111 (1981)
- 182.- Reed, P.J. and Sanderson, P.J., "Detection of anaerobic wound infection by analysis of pus swabs for volatile fatty acids by gas-liquid chromatography",
J. Clin. Path. 32:1203-5 (1979)
- 183.- Reed, M.J., Slots, J., Mouton, C. and Genco, R.J., "Antigenic studies of oral and nonoral black-pigmented Bacteroides strains",
Infect. Immun. 29(2):564-74 (1980)
- 184.- Reig, F., Molin, D., Loza, E., Ledesma, M.A. and Meseguer, M.A., "Gas-liquid chromatography in routine processing of blood cultures for detecting anaerobic bacteremia",
J. Clin. Path. 34:189-93 (1981)
- 185.- Rissing, J.P., Buxton, T.B. and Edmondson, H.T., "Detection of specific IgG antibody in sera from patients infected with B. fragilis by ELISA",
J. Infect. Dis. 140(6):994-8 (1979)
- 186.- Rizzo, A.F., "Rapid gas-chromatographic method for identification of metabolic products of anaerobic bacteria",
J. Clin. Microbiol., 11:418-21 (1980)
- 187.- Rolfe, R.D., "Interactions among microorganisms of the indigenous flora and their influence on the host",
Rev. Infect. Dis., 6 Suppl 1:73-9 (1984)
- 188.- Rosenblatt, J.E., "Antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria",
Rev. Infect. Dis., 6 Suppl 1:242-5 (1984)
- 189.- Rudek, W. and Haque, R.U., "Extracellular enzymes of the genus Bacteroides",
J. Clin. Microbiol. 4 (5):458-60 (1976)
- 190.- Ryan, R.W., "Usefulness of CIE for detecting toxin of C. difficile",
Am. J. Clin. Path. 80:274-6 (1983)
- 191.- Ryan, R.W., Kwasnik, I. and Tilton, R.C., "Rapid detection of C. difficile toxin in human feces",
J. Clin. Microbiol., 12(6):776-9 (1980)

- 192.- Salomon, H.K., Lynt, R.K.Jr., Kautter, D.O. and Lilly, T.Jr., "Antigenic relationships among the proteolytic and non-proteolytic strains of *C. botulinum*", *Appl. Microbiol.*, 21(2):295-9 (1971)
- 193.- Sands, M., "The non-value of CIE for the direct rapid detection of *C. difficile* in stool filtrates", *Am. J. Clin. Path.* 79:375-7 (1983)
- 194.- Saunders, J.R., "Anaerobes and transferable drug resistance", *Nature* 274:113-4 (1978)
- 195.- Schreckenberger, P.C. and Blazevic, D.J., "Rapid fermentation testing of anaerobic bacteria", *J. Clin. Microbiol.*, 3(3):313-17 (1976)
- 196.- Schwan, A., Danielson, D. and Forsum, U., "Demonstration of heat-labile antigen(s) of *B. fragilis* associated with non-homogeneous immunofluorescent staining", *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. (B)* 90:13-9 (1982)
- 197.- Selkon, J.B., "The need for and choice of chemotherapy for anaerobic infections", *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 26:19-23 (1981)
- 198.- Siber, G.R. and Skapirinsky, P., "CIE for detection of microbial antigens: increase sensitivity with dextran-containing gels", *J. Clin. Microbiol.* 7(4):392-3 (1978)
- 199.- Skoog, D.A. and West, D.M., "ANALISIS INSTRUMENTAL" 2a. edición Nueva Ed. Interamericana, México 1984
- 200.- Slack, M.F.E., Griffiths, D.T., Johnston, H.H., "The fluoretec system for rapid diagnosis of *Bacteroides* infections by direct immunofluorescence of clinical specimens", *J. Clin. Path.* 34:1381-4 (1981)
- 201.- Slifkin, M. and Hercher, H.J., "Paper chromatography as an adjunct in the identification of anaerobic bacteria", *Appl. Microbiol.*, 27 (4):500-5 (1974)
- 202.- Sondag, J.E., Ali, M. and Murray, P.R., "Rapid presumptive identification of anaerobes in blood cultures by gas-liquid chromatography", *J. Clin. Microbiol.*, 11(3):274-7 (1980)
- 203.- Sonnenwirth, A.C. and Jarett, L., "GRADWOHL. METODOS Y DIAGNOSTICOS DEL LABORATORIO CLINICO" 8a. edición Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires Argentina 1983
- 204.- Spiegel, C.A., "Gas-liquid chromatography for rapid diagnosis of intraabdominal infections", *Arch. Surg.* 119:28-32 (1984)

- 205.- Stauffer, L.R., Hill, E.O., Holland, J.W. and Altemeier, W.A., "Indirect fluorescent antibody procedure for the rapid detection and identification of Bacteroides and Fusobacterium in clinical specimens",
J. Clin. Microbiol. 2(4):337-44 (1975)
- 206.- Strohm, H., Payne, C.M., Ryan, K.J., "Demonstration of Bacteroides capsules by light microscopy and ultrastructural cytochemistry",
Am. J. Clin. Path. 79:591-7 (1983)
- 207.- Sullivan, N.M., Mayhew, J., D'Tullio, D. and Tally, F.P., "Argon detector: alternative detection system for gas-liquid chromatographic analysis of short chain organic acids",
J. Clin. Microbiol., 8(4):369-73 (1978)
- 208.- Sutter, V.L., "Anaerobes as normal oral flora",
Rev. Infect. Dis. 6 Suppl 1:62-6 (1984)
- 209.- Sveen, K., Hofstad, T., Milner, K.C., "Lethality for mice and chick embryos, pyrogenicity in rabbits and ability to gelate lysate from amoebocytes of Limulus polyphomus by LPS from Bacteroides, Fusobacterium and Veillonella",
Acta Path. Microbiol. Scand (B) 85: 388-96 (1977)
- 210.- Tally, F.P., Cuchural, G.J. and Malamy, M.H., "Mechanisms of resistance and resistance transfer in anaerobic bacteria: factors influencing antimicrobial therapy",
Rev. Infect. Dis., 6 Suppl 1:260-9 (1984)
- 211.- Tally, F.P. and Malamy, M.H., "Mechanisms of antimicrobial resistance and resistance transfer in anaerobic bacteria",
Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 35:37-44 (1982)
- 212.- Taylor, C.R., "Immunoenzyme technique and their application to diagnostic studies",
Ann. N. Y. Acad. Sci. 254:115-26 (1975)
- 213.- Taylor, N.S., Thorne, G.M. and Bartlett, J.G., "Comparison of two toxins produced by C. difficile",
Infect. Immun. 34(3):1036-43 (1981)
- 214.- Thadepalli, H. and Gangopadyay, P.K., "Rapid diagnosis of anaerobic empyema by direct gas-liquid chromatography of pleural fluid",
Chest 77(4):507-13 (1980)
- 215.- Thirumoorthi, M.C., Keen, B.N. and Dajani, A.S., "Anaerobic infections in children: a prospective survey",
J. Clin. Microbiol., 1(3):318-23 (1976)
- 216.- Tilton, R.C., and Ryan, R.W., "Varying results of CIW for the detection of C. difficile toxins",
J. Infect. Dis. 146(3):449-50 (1982)

- 217.- Torres-Anjel, M.J., Auger, J.J. and Riemann, H.P., "The use of a double gel (G-25/DEAE Sephadex for one step separation of fluorescein tagged gamma-globulins",
Rev. Lat. Am. Microbiol., 18:37-41 (1976)
- 218.- Torres, J.F., Cedillo, R., Sánchez, J., Dillman, C., Giono, S. and Muñoz, O., "Prevalence of C. difficile and its cytotoxin in infants in México",
J. Clin. Microbiol., 20(2):274-5 (1984)
- 219.- Van Assche, P.F.D., "Differentiation of E. fragilis species by gas chromatographic detection of phenylacetic acid",
J. Clin. Microbiol., 8(5):614-5 (1978)
- 220.- Viscidi, R., Laughon, B.C., Yolken, R., Bo-Linn, P., Moench, T., Ryder, R.W. and Bartlett, J.G., "Serum antibody response to toxins A and B of C. difficile",
J. Infect. Dis. 148(1):93-9 (1983)
- 221.- Viscidi, R.P., Yolken, R.H., Laughon, B.E., Bartlett, J.G., "Enzyme immunoassay for detection of antibody to toxins A and B of C. difficile",
J. Clin. Microbiol., 18(2):242-7 (1983)
- 222.- Viscidi, R., Willey, S. and Bartlett, J.G., "Isolation rates and toxigenic potential of C. difficile isolates from various patient populations",
Gastroenterology, 81:5-9 (1981)
- 223.- Walker, P.D., "The spore antigens of C. sporogenes, C. bifermentans and C. sordellii",
J. Pathol. Bacteriol., 85:41-6 (1963)
- 224.- Walker, P.D. and Batty, I., "Fluorescent studies in the genus Clostridium. II A rapid method for differentiating C. botulinum types A, B and F; types C and D; type E",
J. Appl. Bacteriol., 27:140-2 (1964)
- 225.- Walker, C.B., Ratliff, D., Muller, D., Wandell, R. and Socransky, S.S., "Medium for selective isolation of F. nucleatum from human periodontal pockets",
J. Clin. Microbiol., 10(6):844-9 (1979)
- 226.- Watt, B., Geddes, P.A., Greenan, O.A., Napier, S.K. and Mitchell, A., "Gas-liquid chromatography in the diagnosis of anaerobic infections: a three year experience",
J. Clin. Path. 35:709-14 (1982)
- 227.- Watt, B., Geddes, P.A., Greenan, O.A., Napier, S.K. and Mitchell, A., "Can direct gas-liquid chromatography of clinical samples detect specific organisms?",
J. Clin. Path. 35:706-8 (1982)

- 228.- Welch, D.F., Menge, S.K., and Matsen, J.K., "Identification of toxigenic C. difficile by CIE",
J. Clin. Microbiol. 11(5):470-3 (1980)
- 229.- Weintraub, A., Lindeberg, A.A. and Kasper, D.L., "Characterization of B. fragilis strains based on antigen-specific immunofluorescence",
J. Infect. Dis., 147(4):780-7 (1983)
- 230.- Weissfeld, A.S. and Sonnenwirth, A.C., "Rapid detection and identification of B. fragilis and B. melaninogenicus by immunofluorescence",
J. Clin. Microbiol., 13:798-800 (1981)
- 231.- West, S.E.H. and Wilkins, T.D., "Problems associated with CIE assay for detecting C. difficile toxin",
J. Clin. Microbiol., 15(2):347-9 (1982)
- 232.- Wiggins, R.J., Wilks, M. and Tabaqchali, S., "Analysis by gas-liquid chromatography of production of volatile fatty acids by anaerobic bacteria grown on solid medium",
J. Clin. Path. 38(8):933-6 (1985)
- 233.- Wilkins, T.D., Warner, D.L., Veltri, B.J.Jr., Gregory, E.M., "Factors affecting production of catalase by Bacteroides",
J. Clin. Microbiol., 8(5):553-7 (1978)
- 234.- Willis, A.T., "Anaerobic bacterial diseases now and then: where do we go from here?",
Rev. Infect. Dis. 6 Suppl 1:293-9 (1984)
- 235.- Willis, A.T., "ANAEROBIC BACTERIOLOGY: CLINICAL AND LABORATORY PRACTICE" 3a. edición Butterworths, London, 1977
- 236.- Willis, A., Taylor, E., Pantosti, A., Phillips, I. and Tabaqchali, S., "Comparison of antisera in the fluorescent antibody test for detection of Bacteroides spp in clinical specimens",
J. Clin. Path. 35:304-8 (1982)
- 237.- Wilson, K.H., Silva, J. and Fekety, F.R., "Fluorescent antibody test for detection of C. difficile in stool specimens",
J. Clin. Microbiol., 16(3):464-8 (1982)
- 238.- Wisdom, G.B., "Enzyme immunoassay",
Clin. Chem., 22:1243-55 (1976)
- 239.- Wong, M., Catena, A. and Hadley, W.K., "Antigenic relationships and rapid identification of Peptostreptococcus species",
J. Clin. Microbiol., 11(5):515-21 (1980)

- 240.- Wu, T.C. and Fung, J.C. "Evaluation of the usefulness of CIE for diagnosis of C. difficile associated colitis in clinical specimens",
J. Clin. Microbiol., 17(4):610-3 (1983)
- 241.- Wüst, J., "Presumptive diagnosis of anaerobic bacteremia by gas-liquid chromatography of blood cultures",
J. Clin. Microbiol., 6(6):586-90 (1977)
- 242.- Yolken, R.H., "Enzyme immunoassays for the detection of infectious agents in body fluids: current limitations and future prospects",
Rev. Infect. Dis., 4(1):35-68 (1982)
- 243.- Yolken, R.H., Whitcomb, L.S., Marien, G. and Bartlett, J.D., "Enzyme immunoassay for the detection of C. difficile antigen",
J. Infect. Dis., 144(4):378 (1981)