



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
IZTACALA

FRECUENCIA DE AISLAMIENTO Y PRUEBAS DE
SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS DE
BACTERIAS ANAEROBIAS EN UN
HOSPITAL PEDIATRICO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
Rogelio Guerra Romero

Director de Tesis: Vilma Zúñiga Telleria

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

REPORTE FINAL DEL TRABAJO DE TESIS

TITULO: FRECUENCIA DE AISLAMIENTO Y PRUEBAS DE
SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS DE
BACTERIAS ANAEROBIAS EN UN HOSPITAL
PEDIATRICO.

NOMBRE: ROGELIO GUERRA ROMERO

No. de CTA. 7611846-7

LUGAR DE REALIZACION: LABORATORIO CLINICO
HOSPITAL DE PEDIATRIA C.M.N.

DIRECTOR DE TESIS: VILMA ZUÑIGA TELLERIA.

VO. Be.



Q.B.P. VILMA ZUÑIGA TELLERIA.

A MI MADRE Y HERMANOS

A MI ESPOSA

A LOS NIÑOS ENFERMOS

AGRADEZCO DE LA MANERA MAS ATENTA LA AYUDA
DE LA Sra. BLANCA E. LEAÑOS M. SIN LA
CUAL NO HUBIERA SIDO POSIBLE EL PRESENTE.

MI AGRABECIMIENTO POR SU APOYO Y CONFIANZA
A LAS SIGUIENTES PERSONAS:

Q.B.P. VILMA ZUÑIGA T.

DR. HECTOR GUISCAPRE G.

PERSONAL DE APOYO DEL LABORATORIO H.P. C.M.N.

C O N T E N I D O

	PAG.
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	3
III. ANTECEDENTES	5
-Objetivos	13
IV. MATERIAL Y METODOS	14
V. RESULTADOS	23
VI. DISCUSION	33
VII. CONCLUSIONES	37
VIII. RECOMENDACIONES	37
IX. APENDICES	38
X. BIBLIOGRAFIA	41

I. RESUMEN.

Con el objeto de conocer la frecuencia de aislamiento de las bacterias anaerobias y su susceptibilidad a los antimicrobianos, se procesaron 1509 muestras de sangre y 265 de material purulento, - obtenidas de niños con diversas enfermedades, internados en el - Hospital de Pediatría del I.M.S.S., durante el lapso de diciembre de 1984 a agosto de 1985.

Las muestras fueron transportadas en medio "Vacutainer" e incubadas a 37°C hasta que se evidenció desarrollo bacteriano. La identificación se realizó hasta género y especie por medio de pruebas bioquímicas. La determinación de la C.M.I. (Concentración Mínima Inhibitoria) se realizó por el método de dilución en placa para los siguientes antibióticos: penicilina, cefotaxima, moxalactam, ampicilina, carbenicilina, piperacilina, cefoxitin, cloranfenicol, clindamicina y metronidazol. Se realizó la prueba de beta - lactamasa con la finalidad de determinar la producción de ésta enzima a través del método iodométrico.

Se aislaron 115 cepas de bacterias anaerobias de las diferentes muestras con los siguientes porcentajes de positividad: 1.5% en hemocultivos, 91.7% en peritonitis, 25.0% en absceso cerebral, - 6.3% en derrame pleural, 18.5% en abscesos diversos y 33.3% en otras muestras. Predominaron Bacteroides sp (50.4%), Clostridium sp (21.7%) y Fusobacterium sp (8.7%). Se identificaron además 15 cepas de Propionibacterium acnes que probablemente correspondieron a contaminación. Se realizó la prueba de sensibilidad a antimicrobianos a las cepas, obteniéndose los siguientes resultados: - de los Gram negativos 4.5% presentaron resistencia a penicilina, 6.0% a metronidazol, 1.5% a cloranfenicol, 15.0% a clindamicina, 2.0% a cefotaxima, 3.9% a cefoxitin y 0.0% al resto de los betalactámicos. En el caso de Gram positivos; 8.8% para penicilina, 5.3% para metronidazol, 3.5% a cloranfenicol, 10.5% a moxalactam

1.8% para ampicilina, 36.9% para clindamicina, y 0.0% para el resto de los beta-lactámicos. Los resultados de la prueba de beta-lactamasa fueron los siguientes: 95.2% beta-lactamasa negativas con una C.M.I. $< 2 \mu\text{g/ml}$ de penicilina, 1.6% beta lactamasa-negativas con una C.M.I. = $4 \mu\text{g/ml}$ de penicilina y 3.2% beta-lactamasa positivas con una C.M.I. $> 2 \mu\text{g/ml}$ de penicilina.

Las conclusiones establecidas fueron las siguientes: la frecuencia de aislamiento de bacterias anaerobias en hemocultivos y material purulento fué elevada, el género más frecuentemente aislado fué -- Bacteroides sp y la especie B.fragilis. Los porcentajes de resistencia a los beta-lactámicos, cloranfenicol y metronidazol son menores del 10%, sin embargo en el caso de clindamicina los porcentajes de resistencia son superiores a los establecidos como confiables o efectivos.

II. INTRODUCCION.

Las bacterias anaerobias están directamente relacionadas con infecciones graves, sobre todo en donde forman parte de la flora normal(4,54) y cuando por variadas circunstancias se pierde el equilibrio ecológico éstas se convierten en agentes patógenos. - Estas bacterias se pueden establecer con facilidad en zonas donde las condiciones son más propicias, sobre todo en lugares de previa colonización por aerobios o en huéspedes inmunocomprometidos (18,45). Estos microorganismos poseen la capacidad de producir - ciertas enzimas que favorecen su implantación, metabolismo, factores de crecimiento, modificación del medio ambiente local y resistencia a los antibióticos: de ésta forma, compitiendo por el sustrato, rompen el equilibrio ecológico. Un factor más de virulen - cia está relacionado con las propiedades de la cápsula bacteriana (6,45).

El aislamiento de las bacterias anaerobias se ha incrementado de manera importante por el desarrollo de métodos de recolección y transporte de muestras (5,9,10), además del desarrollo de técnicas cada vez más confiables y de resultados rápidos. Actualmente las técnicas más utilizadas son las pruebas bioquímicas para evidenciar básicamente la fermentación de carbohidratos (18,28). Hay pruebas de identificación como la cromatografía de gases y patrones electroforéticos en geles que contienen la ventaja de su rapidez y confiabilidad (26,57).

[El incremento en el número de cepas resistentes a antibióticos e inclusive cepas multirresistentes, hace indispensable la evaluación periódica de los diferentes antimicrobianos disponibles](3, 17,25,46).

[Se ha demostrado que éstos microorganismos poseen el factor de resistencia por la presencia de plásmidos y además ésta capacidad - puede ser transferida de bacterias resistentes a sensibles (42,43 45). Estos plásmidos confieren el factor de resistencia dando la capacidad de producción de enzimas, una de ellas llamada beta-lactamasa, de la cual se ha demostrado que hay variantes que actúan contra diferentes antibióticos con anillo beta -lactámico (2,12, 56). Estas enzimas se han evaluado por diferentes procedimientos siendo uno de ellos el método iodométrico muy eficaz por su sen-sibilidad (30,41) y adecuado para éste tipo de bacterias porque - puede evidenciar la hidrolización del anillo beta -lactémico de los antimicrobianos en cantidades hasta de 1 μ mol de sustrato en- 30 minutos (50).]

III. ANTECEDENTES.

A pesar de que las bacterias anaerobias fueron descritas por --- Pasteur en el siglo XIX, recibieron poca atención durante los siguientes 100 años. Existen antecedentes de las discrepancias entre los autores para clasificar a las bacterias anaerobias. Algunas pretendían clasificarlas de acuerdo al tipo de enzimas que producen, pero ésto no fué posible ya que estudios posteriores demostraron que no todas producen el mismo tipo de enzimas o cuando menos algunas no lo manifiestan en ciertas condiciones (20).- Todos los autores coincidían en que son organismos que requieren nutrientes especiales en medios sólidos e incubarse con bajas concentraciones de CO_2 (5 al 10%) y con un potencial óxido-reducción bajo en el medio de cultivo (15,20).

Otros autores recomendaban la clasificación de éstos microorganismos de acuerdo a su tolerancia a la exposición de oxígeno y con éste criterio se clasificaron como anaerobios moderados y anaerobios estrictos, ambos asociados a infecciones humanas, y dentro de un grupo llamado bacterias anaerobias obligadas, denominándose en éste caso, bacterias anaerobias obligadas moderadas y bacterias anaerobias obligadas estrictas (15).

Las bacterias anaerobias obligadas moderadas son aquellas con capacidad de crecer en concentraciones promedio de 3% de CO_2 en el medio ambiente, mientras que las anaerobias obligadas estrictas son aquellas que no pueden crecer en concentraciones $\geq 0.5\%$ de CO_2 en el medio ambiente.

Otras características tomadas en cuenta para la clasificación son la morfología: cocos, bacilos, cocobacilos, bacilos pleomórficos, que de acuerdo a la clasificación de Gram serán positivos o negativos. Una característica de importancia taxonómica es la formación de esporas por algunos de éstos grupos (15,18,35).

Aunque en la 8a edición del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology se reconocían 20 diferentes géneros (15), actualmente - se han reconocido elevaciones de rango taxonómico e identificación de por lo menos 16 nuevas especies aisladas de muestras humanas - (27).

Actualmente la clasificación de las bacterias anaerobias aisladas de muestras clínicas es la siguiente (35):

I. Cocos Gram positivos:

1. Peptococcus sp.

P. niger

P. asaccharolyticus

P. indolicus

P. magnus

P. prevotii

P. saccharolyticus

2. Peptostreptococcus sp.

P. anaerobius

P. micros

P. parvulus

P. productus

3. Streptococcus sp.

S. constellatus

S. intermedius

S. morbillorum

II. Cocos Gram negativos:

1. Veillonella sp.

V. parvula

V. alcalescens

V. CDC grupo 3

III. Bacilos Gram positivos esporulados:

1. Clostridium sp.

C. bifermentans

C. botulinum

C. butyricum

C. cadaveris

C. chauvoei

C. clostridiiforme

C. difficile

C. histolyticum

C. innocuum

C. limosum

C. tetani

C. novyi

C. paraputrificum

C. perfringens

C. ramosum

C. septicum

C. sordellii

C. sphenoides

C. sporogenes

C. subterminale

C. tertium

IV. Bacilos Gram negativos no esporulados:

1. Bacteroides sp.

B. asaccharolyticus

B. bivius

B. buccae

B. buccalis

B. capillosus

B. corporis

B. denticola

B. disiens

B. distasonis

B. eggerthii

B. fragilis

B. gingivalis

B. intermedius

B. loescheii

B. melaninogenicus

B. multiacidus

B. oralis

B. ovatus

B. pentasaceus

B. splanchnicus

B. thetaiotaomicrom

B. uniformis

B. ureolyticus

B. vulgatus

2. Fusobacterium sp.

F. nucleatum

F. necrophorum

F. varium

F. rusii

F. gonidiaformans

F. naviforme

F. mortiferum

V. Bacilos Gram positivos no esporulados:

1. Actinomyces sp.

A. israelii

A. odontolyticus

A. pyogenes

A. naeslundii

A. viscosus

A. meyeri

2. Arachnia sp.

A. propionica

3. Bifidobacterium sp.

B. denticum

B. infantis

B. longum

B. adolescentis

B. bifidum

B. globosum

B. catenulatum

4. Eubacterium sp.

E. alactolyticum

E. limosum

E. multiforme

E. moniliforme

E. nodatum

E. contortum

E. lentum

E. timidum

E. rectale

E. saburreum

E. cylindroides

E. comesii

E. tenue

E. aerofaciens

E. brachy

5. Propionibacterium sp.

P. acnes

P. avidum

P. granulosum

Hace apenas 15 años que las técnicas microbiológicas se han implementado de manera importante para favorecer el aislamiento e identificación de bacterias anaerobias (7,22) y se ha demostrado que hay infecciones provocadas exclusivamente por éstas bacterias (14), aunque en muchos casos forman asociaciones con bacterias aerobias (1,20) y también se han considerado como oportunistas (20,21,39).

Las bacterias anaerobias forman parte de la flora normal del humano, principalmente en senos paranasales, cavidad oral y tubo digestivo. Cuando existen las condiciones ambientales convenientes para su crecimiento como son: necrosis de tejido, isquemia e infecciones previas por aerobios, todos éstos factores provocan la disminución del potencial de óxido-reducción indispensable para su desarrollo e infectando los órganos vecinos a éstas localizaciones produciendo abscesos cerebrales, mastoiditis, sinusitis, neumonía, peritonitis o infecciones de la piel (4,10,15,54).

En hallazgos recientes a nivel pediátrico se ha demostrado el papel de las bacterias anaerobias en infecciones muy frecuentes en ésta edad, por ejemplo otitis media crónica y amigdalitis (7,29). En el caso de infecciones intraabdominales se complican gravemente por el gran número de bacterias que colonizan el tubo digestivo y que en la mayoría de los casos se pueden convertir en infecciones mixtas como reporta Gorbach y col. (20): en éste caso puede existir sinergismo de bacterias aerobias que provocan la toxicidad sistémica y las anaerobias que llevan a cabo la formación de abscesos (16), como ha sido observado por Ohm-Smith y col., en el caso de infecciones pélvicas(40). Otro padecimiento importante es el de colecistitis, en el cual el agente causal es ----- Clostridium perfringens (20,51). En el caso de abscesos hepáticos

los microorganismos aislados son Gram negativos de los géneros Bacteroides y Fusobacterium (20,47).

Un tipo de infecciones muy frecuentes y causadas por anaerobios son las de la cavidad oral, donde se han aislado Bacteroides sp. Fusobacterium sp. y Veillonella sp. (33) que además causan infecciones graves como neumonía y abscesos pulmonares, registrándose altas tasas de mortalidad por éstos padecimientos (21).

En el caso de infecciones en el sistema nervioso central están involucrados principalmente los géneros Bacteroides, Clostridium y Propionibacterium (21,36,48)

Con respecto a las septicemias, éstas se derivan de fuentes de infección endógenas y en éstos casos se reportan principalmente los géneros Bacteroides, Clostridium como los más importantes agentes causales (21).

Una causa elevada de mortalidad por infecciones de bacterias anaerobias son las de tipo exógeno ya que se ha demostrado invasividad del tejido, alcanzando poblaciones bacterianas de hasta 10^5 - bacterias por gramo de tejido (39), aislandose principalmente Clostridium y Peptostreptococcus (7,21,39).

El aislamiento e identificación de éstos microorganismos se ha incrementado con la aparición de sistemas de transporte y cultivo anaeróbico de fácil manejo (5,9,10). Es muy importante para poder realizar un buen aislamiento, que se efectúe una buena toma de muestra y un transporte adecuado al laboratorio, ya que éstas deben ser tomadas directamente del sitio activo de la infección y colocándolas inmediatamente en el medio de transporte evitando aerearlas o contaminarlas (15,22,29).

Las técnicas de muestreo para especímenes anaeróbicos siempre deben ser por punción o biopsia, sin introducir aire durante la toma de muestra (10,29). El transporte de las muestras se ha facilitado con el desarrollo de sistemas y medios de cultivo que en todos los casos poseen una baja concentración de oxígeno disuelto y un potencial óxido-reducción también bajo (28). Estos medios de transporte contienen sustancias como anticoagulantes inhibidores para otros microorganismos (generalmente aerobios de rápido crecimiento), así como una fuente de carbono (5,9,15), - este tipo de medios permiten el transporte de muestras líquidas o de tejidos (10,15).

El aislamiento de bacterias es por subcultivos, a partir de los medios de transporte, en medios sólidos y con factores de crecimiento específicos, además de ser incubados en ambientes anaeróbicos con una mezcla de gases de 80% de nitrógeno, 10% de hidrógeno, 10% de CO_2 y temperaturas adecuadas (9,15).

[La identificación de éstas bacterias se ha llevado a cabo por diferentes métodos, todos ellos separando previamente dos grandes grupos de acuerdo a su afinidad de tinción en Gram positivos y Gram negativos, además de sus características morfológicas (18, 26,35). Posteriormente se pueden realizar pruebas presuntivas (15) y confirmativas (15,26,35), todas ellas de relativo bajo costo.] Un tipo de identificación de éstos microorganismos es por medio de cromatografía de gases (26,57).

[La terapia antimicrobiana es una disciplina que se ha desarrollado enormemente desde la década de los 30's tomando un auge importante en la década de los 50's y en la actualidad se desarrollan antimicrobianos sintéticos cada vez más eficientes (31).] Actualmente los padecimientos causados por anaerobios se tratan con di

ferentes agentes antimicrobianos tanto antibióticos como quimioterápicos, de acuerdo al tipo de organismo de que se trate. Los antibióticos que con mayor frecuencia se utilizan son los beta-lactámicos como penicilinas y cefalosporinas (penicilina, ampicilina, carbenicilina, piperacilina, cefoxitín, moxalactam, cefotaxima), cloranfenicol, macrólidos como clindamicina e imidazoles como metronidazol (19). La actividad de éstos agentes es variada y de acuerdo a su composición actúan a diferentes niveles contra el microorganismo con efecto bactericida o bacteriostático. Cada uno de los antimicrobianos pueden tener efectos tóxicos en los pacientes provocando reacciones de hipersensibilidad o por la aplicación de dosis elevadas ocasionan intoxicaciones severas (19,38,37).

[Hace algunos años la mayoría de los géneros de bacterias anaerobias eran habitualmente sensibles a las penicilinas, sin embargo, en forma paulatina se ha incrementado la resistencia a éstos antibióticos, sobre todo de los gram negativos, siendo necesario otros antimicrobianos más efectivos (34,46). Esta resistencia también se ha incrementado para otro tipo de antibióticos (13,56).

Se ha demostrado que la capacidad de resistencia se puede transmitir de bacteria a bacteria como en el caso de las aerobias por fenómenos de conjugación, transformación y transducción (55). También se ha demostrado que éste factor de resistencia se debe a la presencia de plásmidos (43,44,55) y que la transferencia de resistencia puede ser intraespecífica además de que éstos plásmidos pueden codificar para una resistencia múltiple (38,42,56).

La resistencia a los beta-lactámicos es producida por varios factores, siendo el primero y quizá el más importante la producción de enzimas llamadas beta-lactamasas que son producidas por las -

bacterias al ponerse en contacto con el antibiótico. Estas enzimas hidrolizan el anillo beta - lactámico del antibiótico inactivándolo. Un hecho importante es que todas las bacterias Gram negativas son productoras de beta -lactamasas, las cuales tienen -dependencia cromosómica y dependen de la inducción y mutación - (38) sin embargo éste tipo de enzimas no son tan activas como - las que dependen de plásmidos (12,38,55).

Hay evidencia de otro tipo de resistencia de los beta -lactámicos que es no hidrolizando la parte activa del antibiótico, sino poniendo una barrera en la membrana para que el antimicrobiano no actúe sobre los sitios específicos (12,55).

Para los otros tipos de antibióticos la resistencia se basa en la producción de otras enzimas, como la acetiltransferasa para el -cloranfenicol o mediante la disminución en la permeabilidad de la membrana para la clindamicina, además de la falta de proteínas -reductoras que activen al metronidazol (52).

Es evidente la importancia de las bacterias anaerobias como agentes causales de infecciones pediátricas por lo que en el presente estudio se pretende conocer la frecuencia de aislamiento de - bacterias anaerobias en cada uno de los padecimientos infecciosos más frecuentes y determinar los patrones de sensibilidad de éstas bacterias.

IV. MATERIAL Y METODOS.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio Clínico del Hospital de Pediatría del C.M.N. I.M.S.S.

Se colectaron 1774 muestras en el período de diciembre de 1984 a agosto de 1985 de pacientes hospitalizados con diagnóstico de septicemia, apendicitis perforada y abscesos diversos que clínicamente se hubiese sospechado que el agente causal era un organismo anaerobio. Se colectó sangre y material purulento según el caso; obteniéndose 1509 muestras de hemocultivos y 265 de material purulento provenientes de peritonitis (2.7%), abscesos (7.0%), derrame pleural (3.6%), absceso cerebral (0.4%) y muestras diversas (1.4%) (Tabla I).

Las muestras se colectaron siempre por punción y con rigurosas medidas de asepsia. En el caso de hemocultivos, después de lavar la zona con agua y jabón, se limpió con benzaldehído al 0.5% en solución acuosa, la persona que realizó la punción usó guantes estériles y cubreboca. Las punciones se realizaron utilizando una jeringa desechable de 3 cm³ con agujas de acuerdo a la zona a puncionar (pie., brazo, cuello, femoral, dedo); la cantidad de sangre extraída en ningún caso fué menor a 2 cm³, que es la mínima indispensable para que se puedan desarrollar las bacterias debido a los requerimientos nutricionales que contienen los tubos con el medio de cultivo, así mismo se evitó aerear la muestra durante la punción y colocación en el medio de "Vacutainer" (apendice 1). En el caso de material purulento se colectó durante el acto quirúrgico.

Una vez colocadas las muestras en el medio "Vacutainer" se trasladaron de inmediato al laboratorio para ser incubadas a 37°C hasta

TABLA I

CULTIVO PARA ANAEROBIOS FRECUENCIA DE ACUERDO A SU ORIGEN

ORIGEN DE LA MUESTRA	No. PROCESADO	PORCENTAJE RELATIVO	NUMERO (%) CON LA CONDICION SEÑALADA		
			POSITIVO ANAEROBIOS	POSITIVO AEROBIOS	NEGATIVOS
HEMOCULTIVOS	1509	66.1	22 (1.5)	463 (30.7)	1025 (67.9) *
PERITONITIS	48	2.7	44 (91.7)	48 (100.0)	0 (0.0)
ABSCESOS	124	7.0	23 (18.5)	108 (87.1)	19 (15.3)
DERRAME PLEURAL	64	3.6	4 (6.3)	51 (79.7)	12 (18.8)
ABSCESO CEREBRAL	8	0.4	2 (25.0)	5 (62.5)	1 (12.5)
OTROS **	21	1.2	7 (33.3)	16 (76.2)	2 (9.5)
TOTAL	1774	100	102 (5.7)	691 (38.9)	1059 (59.6)
<p>*16 (1.6) Contaminados **L. C. R (8), traqueal (7), dticos (3), chancroides (2), coprocultivos (1).</p>					

presentar señales de desarrollo tales como la producción de gas, turbidez o hemólisis. Los tubos que no presentaron signos de positividad después de 14 días de incubación se descartaron como negativos posteriormente a una resiembra confirmativa.

A los tubos que presentaron desarrollo se le efectuó una resiembra o cultivo primario en los siguientes medios y condiciones:

- Gelosa sangreCondiciones de Aerobiosis a 37°C.
- Agar MacConkey " " " "
- Gelosa Chocolate " " Microaerobiosis a37°C
- Gelosa Sangre hemina-menadiona ..Condiciones de anaerobiosis 37°C

Las condiciones de anaerobiosis se obtuvieron por una mezcla de gases de 80% de N₂, 10% de H₂ y 10% de CO₂ con catalizadores de - Paladio en una estufa con sellos especiales. El sembrado de los - tubos a las cajas de medio se efectuó con pipetas pasteur, evitando introducir aire a los tubos; en las cajas se realizó estriado de aislamiento por medio de una asa bacteriológica. Con la muestra extraída para el cultivo se realizó un frotis para tinción de Gram para observar tanto las afinidades tintoreales como la morfología de los microorganismos. Todos los cultivos se observaron a las 24 y 48 horas y se clasificaron de acuerdo con las condiciones donde se desarrollaron como se muestra en el siguiente cuadro:

Condiciones de incubación	No. de colonia	Crecimiento
Aerobiosis	1	+
	2	-
	3	-
Microaerobiosis	1	+
	2	+
	3	-
Anaerobiosis	1	+
	2	+
	3	+

Colonias No. 1 clasificadas como anaerobias facultativas.

Colonias No. 2 clasificadas como microaerófilas

Colonias No. 3 clasificadas como anaerobias estrictas.

La identificación de las colonias 1 y 2 se llevó a cabo de acuerdo con las tablas de identificación de Cowan (11).

A las cepas anaerobias estrictas se les realizó un cultivo secundario en gelosa sangre hemina-menadiona (apéndice No. 1) en condiciones de anaerobiosis durante 24 hrs. para confirmar su condición anaeróbica y la pureza del cultivo. Una vez confirmado lo anterior se preparó un frotis por duplicado para tinción de Gram y para tinción de esporas por la técnica de Sheaffer -Fulton -- (apéndice No. 2). Este segundo frotis nos proporciona información acerca de la posición de las esporas, característica taxonómica importante.

De la caja de cultivo secundario se tomó una asada de colonias y se inocularon en un tubo con caldo tioglicolato enriquecido (apéndice No. 1) y pre-reducido por ebullición, incubándose por 24 hrs. a 37°C en condiciones de anaerobiosis hasta obtener un buen desarrollo para ser utilizado posteriormente para efectuar las pruebas bioquímicas.

La identificación de las cepas se realizó por medio de las pruebas confirmativas de acuerdo con Giono (18), las que se prepararon de la siguiente forma:

Se preparó caldo tioglicolato sin dextrosa y sin indicador adicionando 2% de extracto de levadura y distribuido en volúmenes de 8 ml en tubos de tapón de rosca de 16 x 150, formando series de los diferentes azúcares al agregar 0.5 ml de las siguientes concentraciones : glucosa 0.6%, maltosa, manitol, sacarosa, lactosa y arabino-

sa al 1.0%, salicina 0.5%, gelatina y esculina según instrucciones (BBL 11712 y BBI 819 -01 respectivamente). Para realizar la prueba de reducción de nitratos y producción de indol, se preparó caldo indol -nitrito (según BBL 11299).

El inóculo para estas pruebas fué de 0.1 ml de una suspensión bacteriana de 1×10^9 U.F.C. (Unidades Formadoras de Colonias) - colocándolo en cada uno de los tubos por medio de pipetas pasteur sin introducir aire. Las lecturas se realizaron a las 72 hrs. después de haber sido incubadas a 37°C en condiciones de anaerobiosis y se llevaron a cabo de la siguiente forma:

1. Fermentación de carbohidratos: a cada tubo se le agregaron 2 - gotas de azul de bromotimol al 1% en solución acuosa. La prueba es positiva si el azul vira a amarillo o anaranjado.

2. Producción de indol: a 2ml del cultivo se agregaron 0.5 ml de xilol y 0.5 ml de reactivo de Ehrlich. La formación de un anillo de color rojo en la parte superior de la muestra indica que la prueba es positiva.

3. Reducción de nitratos: a 2 ml de cultivo se agregaron 0.5 ml - de ácido sulfanílico y 0.3 ml de alfa - dimetilnaftalina. En la prueba positiva se observó una coloración café rojiza en todo el medio.

5. Licuación de gelatina: esta prueba se determinó colocando los tubos inoculados a 4°C durante 2 hrs, si al cabo de éste tiempo - el medio permaneció líquido la prueba se consideró positiva.

[Una vez identificadas las cepas] hasta género y especie [se procedió a una resiembra] en caldo tioglicolato enriquecido [para conservar viables los cultivos y utilizarlos en la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos.] Estas pruebas se realizaron para determinar la

C.M.I. (concentración mínima inhibitoria) de los antibióticos más utilizados en las terapias.

Las C.M.I. se determinaron por el método de dilución en placa - (17) utilizando agar Hinton - Yuller hemina - menadiona (apéndice - No. 1) con diluciones de los antimicrobianos dobles y seriadas desde 256 $\mu\text{g/ml}$ a 0.25 $\mu\text{g/ml}$, para lo cual se prepararon soluciones de 1000 $\mu\text{g/ml}$ de penicilina, ampicilina, cloranfenicol, clindamicina, cefotaxima, cefoxitín, moxalactam, piperacilina, carbenicilina y metronidazol que se fueron diluyendo en el agar hasta obtener las 11 diluciones dentro del rango mencionado.

La inoculación se llevó a cabo por medio del replicador de Steers (53) con una suspensión bacteriana de 1×10^8 U.F.C., en las cajas de medio con las diluciones mencionadas, inoculando simultáneamente una serie doble de cajas sin antibiótico que se utilizaron como controles de crecimiento y de contaminación por aerobios. Posteriormente se incubaron las cajas con antibiótico y una serie sin éste en condiciones de aerobiosis a 37°C. todas durante 48 hrs.

Las C.M.I. se determinaron como la mínima concentración de antimicrobiano a que fueron inhibidas las bacterias y se comparó este dato con el del valor de corte para considerarlas sensibles o resistentes a cada uno de los antibióticos (valor de corte es la máxima concentración de antibiótico que se alcanza en la sangre del paciente a dosis terapéuticas). Los valores de corte utilizados en éste trabajo fueron los siguientes:

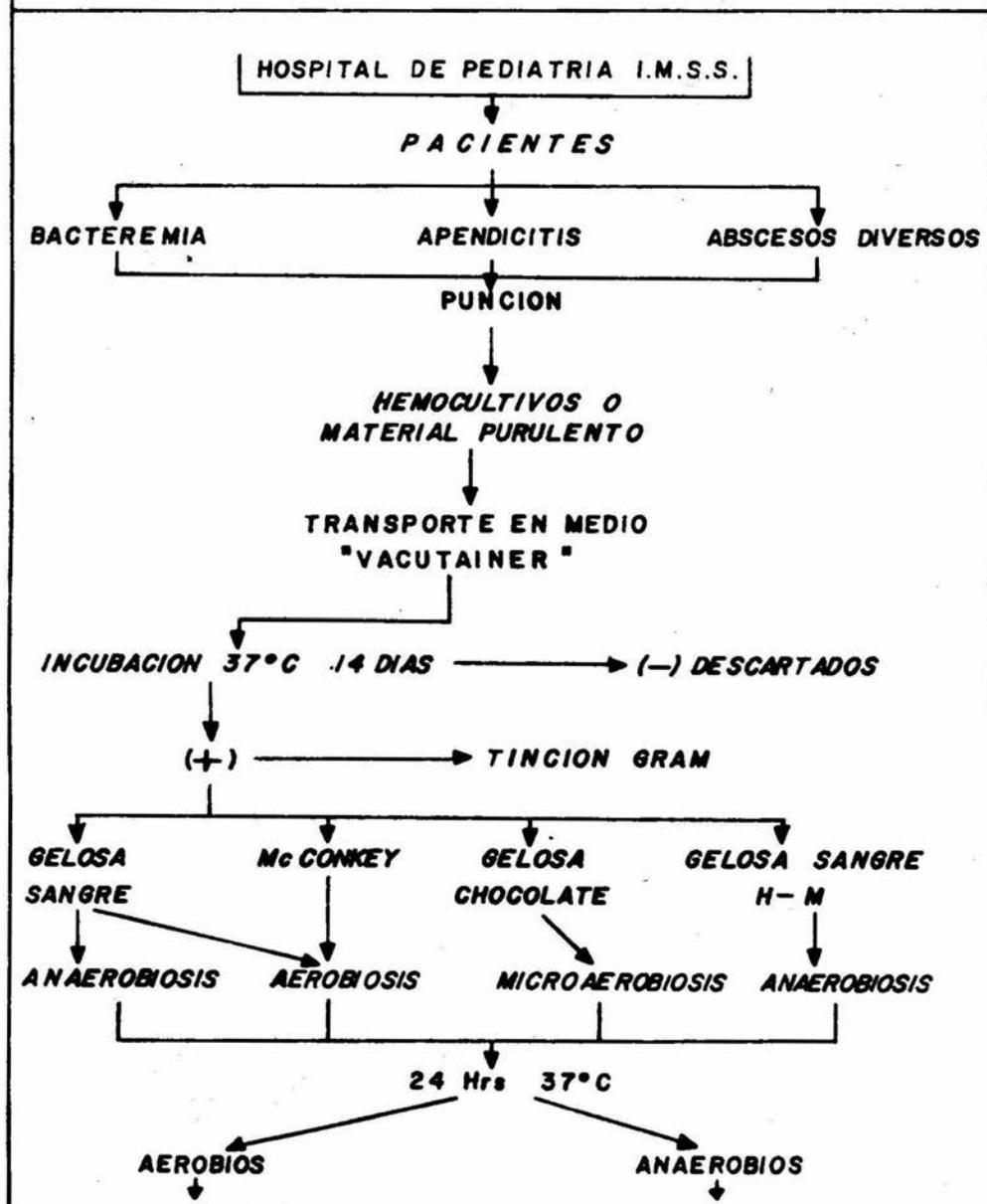
Antimicrobianos:	Valor de corte:
- penicilina	2 $\mu\text{g/ml}$
- ampicilina	32 $\mu\text{g/ml}$
- piperacilina	32 $\mu\text{g/ml}$
- carbenicilina	128 $\mu\text{g/ml}$
- cefotaxime	16 $\mu\text{g/ml}$

Antimicrobiano:	Valor de corte:
- moxalactam	16 g/ml
- cefoxitin	16 g/ml
- cloranfenicol	16 g/ml
- clindamicina	4 g/ml
- metronidazol	16 g/ml

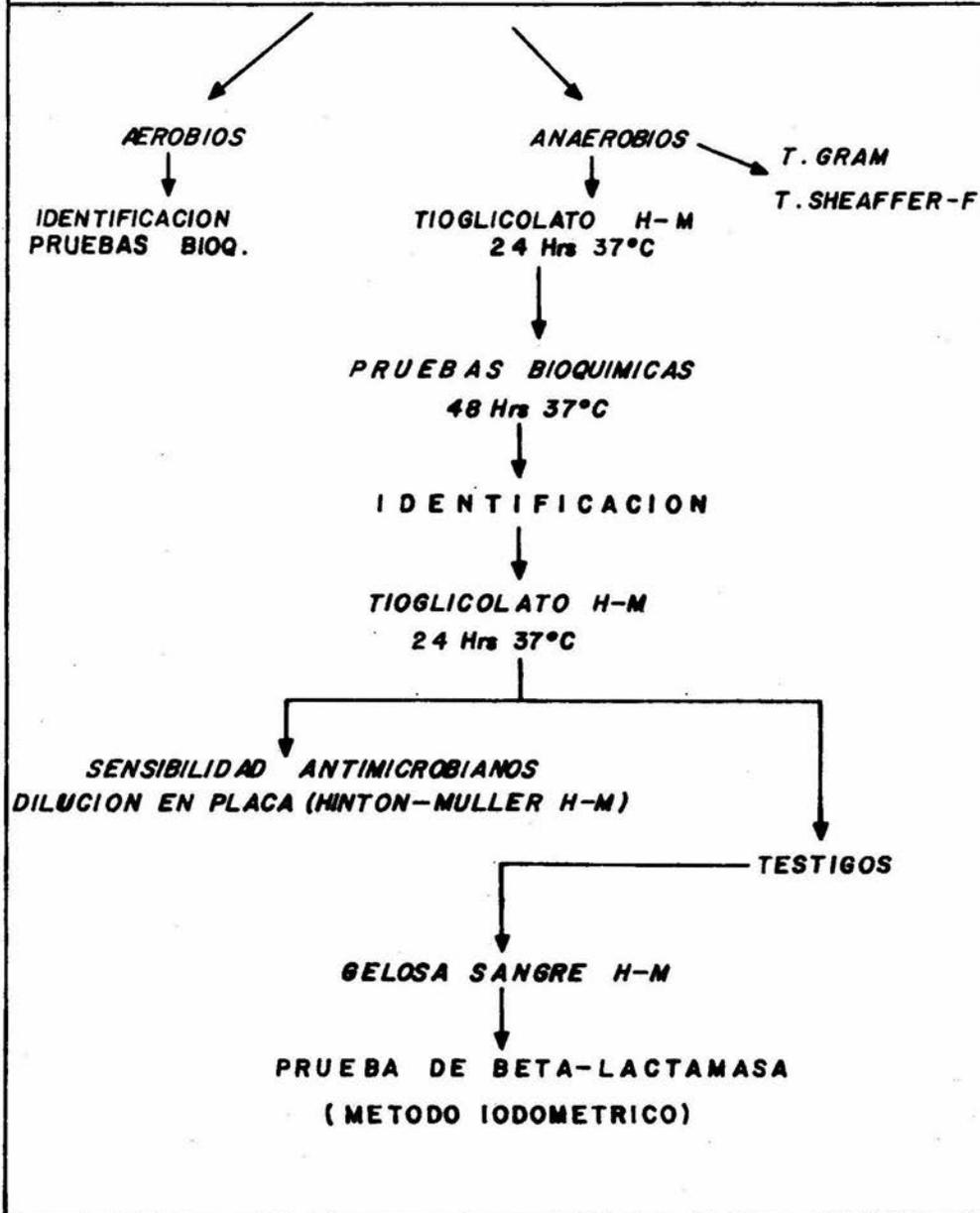
A todas las cepas que se les efectuó la prueba de sensibilidad, se les realizó también la prueba de beta - lactamasa por el método -- iodométrico (30). Esta prueba consistió en evidenciar la producción de dicha enzima de la siguiente forma: después de lograr un desa-- rrollo abundante en Agar Gelosa Sangre hemina-menadiona, se tomó - con una asa bacteriológica y se depositó en un tubo con 0.5 ml de una solución de penicilina con 10 000 UI/ml en solución amortigua-- dora de fosfatos 0.05 M pH 5.8 (apéndice No. 3). La suspensión bac-- teriana final fué aproximadamente 1×10^6 U.F.C., después de incu-- barla 1 hr a temperatura ambiente se añadieron 2 gotas de almidón indicador al 1% en solución acuosa e inmediatamente se agregó 1 -- gota de solución de yodo (apéndice No. 3). En la prueba negativa - la solución tomó una coloración azul pálido y en el caso de la prue-- ba positiva el color azul viró a blanco.

Los resultados fueron evaluados de la siguiente forma: Porcentaje de aislamiento de acuerdo a la procedencia del cultivo, porcentaj de aislamiento de los géneros y especies; porcentaje de sensibili-- dad o resistencia de los diferentes antibióticos y porcentaje acu-- mulado de la C.M.I. a las concentraciones probadas de cada antibió-- tico.

METODOLOGIA (I)



METODOLOGIA (2)



V. RESULTADOS.

Del total de muestras procesadas (1774) el 85.1% correspondió a hemocultivos y de éstos el 1.5% fué positivo al desarrollo de anaerobios. Las muestras procedentes de peritonitis representaron el 2.7% del total y de ésta cifra el 91.7% resultaron positivos al desarrollo de anaerobios, el 12.2 % restante del total de las muestras que corresponden a : derrame pleural, abscesos, absceso cerebral y otros no representó una positividad mayor al 34% a la presencia de anaerobios (Grafica I).

De las especies aisladas Bacteroides fragilis es la más frecuente (31 aislamientos), siendo el género en sí el más frecuentemente aislado ocupando el 50.4% del total de las cepas aisladas. Clostridium spp es el género que continúa en frecuencia con 21.7% representando a 11 especies. El género con menor número de aislamientos es Peptococcus spp. con 1.7%. Un dato adicional es el aislamiento de 15 cepas de Propionibacterium acnes (cuadro I).

De acuerdo a la procedencia de las cepas aisladas, en las muestras de peritonitis fué donde se aisló el mayor número tanto de Gram negativas como Gram positivas, aislandose en total 61 cepas. En el caso de hemocultivos de las 1509 muestras procesadas se aislaron 15 cepas de anaerobios. En las muestras restantes (217), se aislaron 39 cepas de anaerobios. Es clara la predominancia de Bacteroides sp en todos los tipos de muestras y en relación al resto de los Gram negativos y al grupo de los Gram positivos (Tabla I-A).

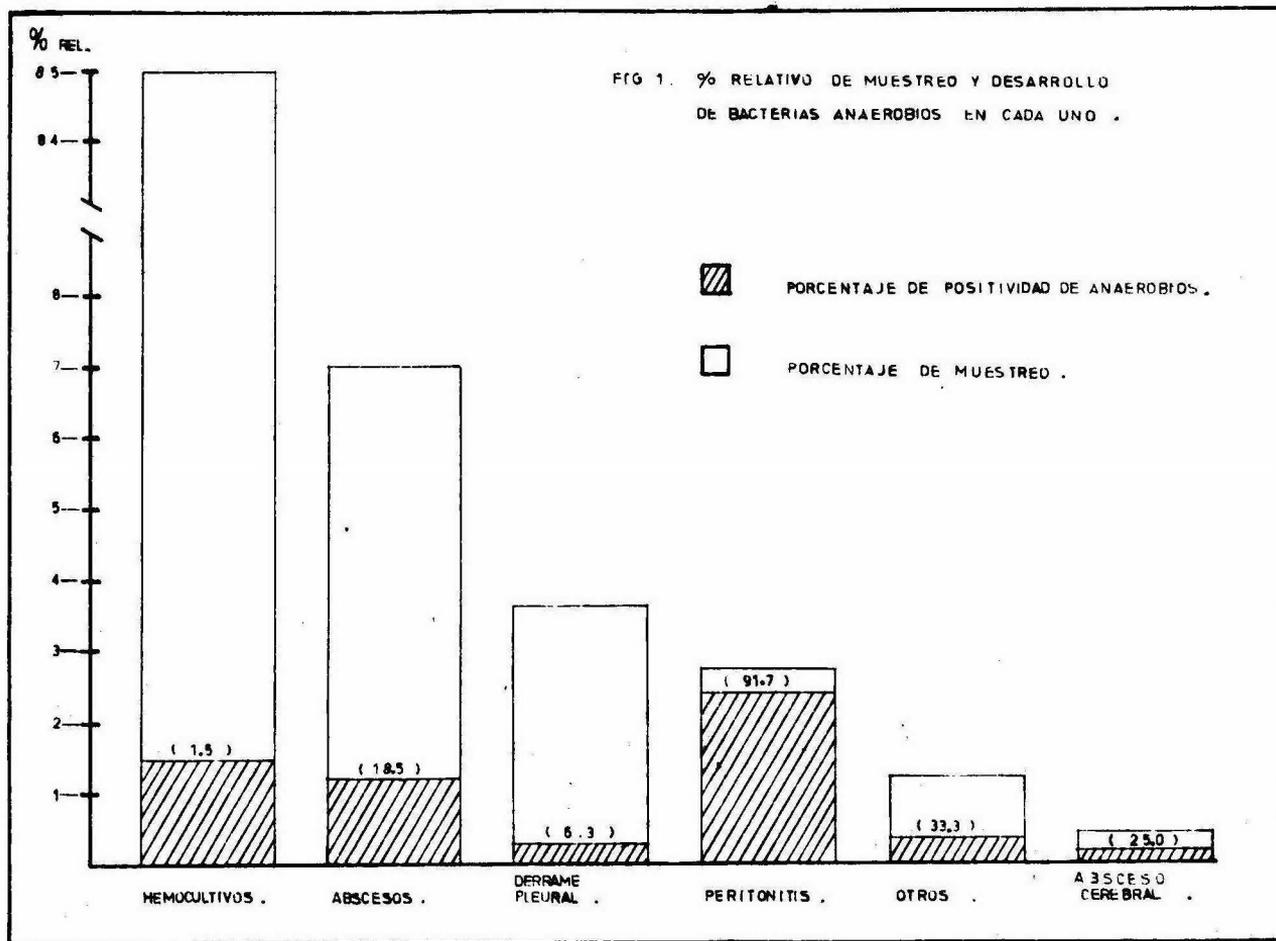
En los porcentajes acumulados de las C.M.I. para Gram negativos y Gram positivos de cada uno de los antibióticos probados se observó que para el grupo de los beta -lactámicos inhibieron a concentraciones $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$ a un 80% de las cepas, siendo más evidente éste -

comportamiento para las cepas Gram negativas. En el caso de carbenicilina y moxalactam se observó que la C.M.I. del 90% de las Gram negativas y Gram positivas se presentó entre $4 \mu\text{g/ml}$ y $8 \mu\text{g/ml}$ a pesar de que en concentraciones $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$ sólo se inhibieron un 50% de Gram positivos y el 70% de Gram negativos. En el caso de cloranfenicol se observó que los efectos de éste agente antimicrobiano a concentraciones $\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$ son poco eficientes puesto que sólo inhibió al 33.3% de Gram positivos y al 58.2% de Gram negativos, pero a concentraciones de $4 \mu\text{g/ml}$ tiene la capacidad de inhibir a más del 90% de las cepas de ambos grupos. Para el caso de metronidazol se muestra un efecto similar al anterior, puesto que a concentraciones de $\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$ solamente inhibió el 66.7% de Gram positivos y 70.1% de Gram negativos, pero con $4 \mu\text{g/ml}$ se inhibieron aproximadamente el 90% de todas las cepas probadas. En las pruebas con clindamicina se observó un fenómeno particular en virtud de que éste antimicrobiano tiene un valor de corte de $4 \mu\text{g/ml}$ y a ésta concentración sólo inhibió el 85% de Gram negativos y el 63.1 de Gram positivos, sin embargo la efectividad esperada de un 100% se alcanzó con concentraciones de $256 \mu\text{g/ml}$. En cuanto al resto de los antimicrobianos inhibieron al 90% ó más cepas en concentraciones inferiores al valor de corte (Tabla II y III).

Separando al género Bacteroides sp. se observó que es el único género de Gram negativos que presentó resistencia a penicilina y presenta una resistencia a clindamicina de 11.5% tomando como referencia el valor de corte, este comportamiento lo observamos también en otros Gram negativos y Gram positivos. Únicamente en el caso de moxalactam se presenta un porcentaje ligeramente superior al 10% de resistencia de Gram positivos, que en el caso de clinda

micina asciende a 36.9%. Es evidente que en ninguno de los antibióticos se presentaron porcentajes de resistencia superiores al 10%, excepto en clindamicina (Tabla IV).

Los resultados de la prueba de beta - lactamasa fueron los siguientes: el 95.2% de las cepas resultaron beta-lactamasa negativa con una C.M.I. de penicilina $\leq 2 \mu\text{g/ml}$, el 1.6% fueron negativas con una C.M.I. = $4 \mu\text{g/ml}$ del mismo antibiótico. Por otra parte el 3.2% fueron beta - lactamasa positiva con una C.M.I. $> 2 \mu\text{g/ml}$ de penicilina, destacando que de las cuatro cepas beta - lactamasa positiva tres de ellas pertenecen al género Bacteroides spp, así mismo podemos notar que las dos cepas resistentes a penicilina y beta-lactamasa negativa pertenecen al género Clostridium spp. -- (Cuadro II).



CUADRO I BACTERIAS ANAEROBIAS AISLADAS

ESPECIES	Nº DE CEPAS	PORCENTAJE GENEROS
<u>Bacteroides</u> spp	58	50.4
<i>B. fragilis</i>	31	
<i>B. vulgatus</i>	10	
<i>B. distasonis</i>	8	
<i>B. corrodens</i>	3	
<i>B. melaninogenicus</i>	3	
<i>B. clostridiforme</i>	2	
<i>B. thetaiotaomicron</i>	1	
<u>Clostridium</u> spp	25	21.7
<i>C. perfringens</i>	5	
<i>C. novyi</i>	4	
<i>C. histoliticum</i>	3	
<i>C. bifermentans</i>	3	
<i>C. ramosum</i>	2	
<i>C. sporogenes</i>	2	
<i>C. paraputrificum</i>	2	
<i>C. sphenoides</i>	1	
<i>C. sordellii</i>	1	
<i>C. tetani</i>	1	
<i>C. septicum</i>	1	
<u>Fusobacterium</u> spp	10	8.7
<i>F. mortiferum</i>	4	
<i>F. necroforum</i>	3	
<i>F. nucleatum</i>	2	
<i>F. sp</i>	1	
<u>Streptococcus intermedius</u>	5	4.4
<u>Veillonella parvula</u>	5	4.4
<u>Eubacterium lactoliticus</u>	3	
<i>E. lentum</i>	1	3.5
<u>Actinomyces naestundi</u>	2	
<i>A. odontolyticus</i>	1	2.5
<u>Pentostreptococcus</u> sp	3	2.6
<u>Peptococcus</u> sp	2	1.7
TOTAL	115	100%
<p>SE AISLARON 15 CEPAS DE <u>Propionibacterium</u> <u>aces</u> QUE SON CONSIDERAS SIN IMPORTANCIA CLINICA.</p>		

TABLA I-A

FRECUCENCIA DEL TIPO DE AISLAMIENTO DE BACTERIAS

ANAEROBIAS DE ACUERDO A SU ORIGEN

PROCEDECENCIA	NUMERO PROCESADO	NUMERO DE CEPAS AISLADAS	NUMERO (%) DE CADA GRUPO DE BACTERIAS		
			<u>Bacteroides sp</u>	OTROS GRAM NEGATIVOS	GRAM POSITIVOS
HEMOCULTIVOS	1509	15	10 (66.7)	1 (6.7)	4 (26.6)
PERITONITIS	48	61	29(47.5)	9(14.8)	23(37.7)
MATERIAL DIVERSO*	217	39	19(48.7)	5(12.8)	15(38.5)
TOTAL	1774	115	58(50.4)	15(13.0)	42(36.6)
* DERRAME PLEURAL, ABSCESO CEREBRAL, ABSCESOS DIVERSOS.					

TABLA II PORCENTAJE ACUMULADO DE LA C.M.I. ($\mu\text{g/ml}$) DE 67 CEPAS DE BACTERIAS ANAEROBIAS GRAM NEGATIVAS

ANTIMICROBIANO	≤ 0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	> 256
PENICILINA	94.0	94.0	94.0	95.5	95.5	95.5	97.0	97.7	100			
AMPICILINA	95.5	98.5	98.5	100								
CARBENICILINA	71.6	82.0	83.5	88.0	89.5	94.0	100					
PIPERACILINA	91.0	92.5	92.5	92.5	97.0	100						
CEFOTAXIMA	86.6	89.6	91.0	95.5	97.0	97.0	98.5	100				
MOXALACTAM	67.1	73.1	82.0	92.5	95.5	98.5	100					
CEFOXITIN	80.5	92.5	94.0	95.5	97.0	97.0	97.0	100				
CLORANFENICOL	58.2	67.2	79.2	89.5	94.0	98.5	98.5	98.5	100			
CLINDAMICINA	82.0	83.5	83.5	85.0	85.0	85.0	86.5	86.5	88.0	89.5	100	
METRONIDAZOL	70.1	82.0	86.5	89.5	89.5	89.5	94.0	94.0	95.5	97.0	100	

Valor de corte

TABLA III PORCENTAJE ACUMULADO DE LA C.M.I. (µg/ml) DE 57 CEPAS DE BACTERIAS ANAEROBIAS GRAM POSITIVAS											
ANTIMICROBIANO	≤ 0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256 > 256
PENICILINA	89.5	91.2	91.2	91.2	94.7	94.7	100				
AMPICILINA	91.2	94.7	94.7	94.7	94.7	98.2	98.2	98.2	98.2	100	
CARBENICILINA	52.6	71.9	75.4	78.9	86.9	98.2	100				
PIPERACILINA	84.2	87.7	91.2	93.0	98.2	100					
CEFOTAXIMA	82.4	82.4	87.7	94.7	98.2	100					
MOXALACTAM	45.6	49.1	66.7	80.7	86.0	89.5	89.5	91.2	100		
CEFOXITIN	64.9	82.5	87.7	89.5	94.7	96.5	100				
CLORANFENICOL	33.3	49.1	66.7	84.2	96.5	96.5	96.5	96.5	98.2	100	
CLINDAMICINA	56.1	59.6	59.6	59.6	63.1	63.1	63.1	63.1	82.5	94.7	100
METRONIDAZOL	66.7	71.9	89.5	93.0	93.0	93.0	94.7	94.7	96.5	100	
Valor de corte											

TABLA IV

RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE BACTERIAS ANAEROBIAS

ANTIMICROBIANO	VALOR DE CORTE (µg/ml)	PORCENTAJE DE RESISTENCIA		
		<u>Bacteroides sp.</u> (52)	Otros Gram negativos (15)	Gram positivos (57)
PENICILINA	2	5.7	0.0	8.8
AMPICILINA	32	0.0	0.0	1.8
CARBENICILINA	128	0.0	0.0	0.0
PIPERACILINA	32	0.0	0.0	0.0
CEFOTAXIMA	16	2.0	0.0	0.0
MOXALACTAM	16	0.0	0.0	10.5
CEFOXITIN	16	3.9	0.0	0.0
CLORANFENICOL	16	2.0	0.0	3.5
CLINDAMICINA	4	11.5	26.7	36.9
METRONIDAZOL	16	5.8	6.7	5.3

() Numero de cepas

CUADRO II RESULTADOS DE LA PRUEBA DE BETA-LACTAMASA
EN 124 CEPAS DE BACTERIAS ANAEROBIAS

Nº CEPAS	C. M. I. PENICILINA ($\mu\text{g/ml}$)	PRUEBA DE BETA-LACTAMASA	PORCENTAJE
118	≤ 2	NEGATIVA	95.2
4 *	> 2	POSITIVA	3.2
2 **	= 4	NEGATIVA	1.2

ESPECIES RESISTENTES	C. M. I. PENICILINA ($\mu\text{g/ml}$)
* <u>Bacteroides fragilis</u>	64
* <u>Bacteroides fragilis</u>	16
* <u>Bacteroides vulgatus</u>	64
* <u>Propionibacterium acnes</u>	32
** <u>Clostridium sphenoides</u>	4
** <u>Clostridium ramosum</u>	4

VI. DISCUSION.

Como podemos observar los porcentajes de aislamiento de bacterias anaerobias en cada uno de los tipos de muestras es variable puesto que en el caso de los hemocultivos a pesar de ser 150^o muestras procesadas solamente 22 presentaron desarrollo de anaerobios, mientras que en el caso de peritonitis de 48 muestras 44 presentaron desarrollo de anaerobios, en el resto de las muestras se observa que los porcentajes son variados como 33.3% para el grupo de ---- "otros", 25% de positividad en abscesos cerebrales, 18.5% en abscesos diversos y 6.3% en derrames pleurales. Aunque los porcentajes de aislamiento van disminuyendo se puede considerar en general que de acuerdo al número de muestras el porcentaje de aislamiento fué alto y algo importante el hecho de que en ninguna muestra de peritonitis fué negativa. Con éstos datos podemos inferir que las técnicas de recolección y aislamiento utilizadas en el presente trabajo son adecuadas puesto que permitieron un buen aislamiento e identificación que concuerda con los datos reportados en la bibliografía.

Las muestras procedieron de las infecciones en que generalmente se reportan a las bacterias anaerobias como los agentes causales (20, 21); y es notorio que de las especies aisladas Bacteroides fragilis es la más frecuente así como el género, ocupando el 50.4% del total de los aislamientos. Esto es factible por el porcentaje de positividad para muestras donde éste género es parte de la flora normal y que por algún transtorno fisiológico, traumático o quirúrgico se convierte en patógeno, como en el caso de peritonitis; de la misma manera el género Clostridium spp fué el segundo en porcentaje de aislamiento (21.7%) y coincide con Bacteroides en los padecimientos señalados (16,36,47,48).

Un dato importante es que aún para los porcentajes de aislamiento más bajos, como en los hemocultivos, se observó la presencia de infecciones mixtas con aerobios; en el caso de peritonitis esto es más evidente puesto que el porcentaje de positividad para anaerobios fué de 91.7% y de aerobios de 100%, ésto demuestra de alguna manera las teorías de sinergismo que proponen diversos autores (16,20). En cuanto al resto de las especies aisladas corresponden a lo reportado en estudios de casos clínicos (16,20,21).

El aislamiento e identificación de Propionibacterium acnes se realizó a pesar de ser considerado sin importancia clínica (35), por pertenecer a las bacterias anaerobias.

Las pruebas de susceptibilidad muestran un comportamiento similar al que reportan diversos autores (23,33,40) sin embargo en dos antibióticos se demuestran discrepancias considerables, puesto que en el caso de clindamicina, antibiótico que comunmente se utiliza para prescribirse en caso de infecciones graves y reportado como eficiente en estudios realizados como el de Laatch y col. y Ohm-Smith (33,40), reportan que la C.M.I. del 90% de las bacterias anaerobias Gram negativas se presentó en valores $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ y en el presente trabajo la C.M.I. para el 90% de las cepas Gram negativas se presentó en valores superiores a $128 \mu\text{g/ml}$; éste mismo comportamiento se presentó en el grupo de los Gram positivos puesto que la C.M.I. para el 90% de las cepas se logró a una concentración $> 64 \mu\text{g/ml}$ y se habían reportado C.M.I. para éstos porcentajes en concentraciones $\leq 25 \mu\text{g/ml}$ (46). La otra discrepancia es con respecto al comportamiento de la penicilina puesto que estos mismos autores reportan C.M.I. del 90% de las cepas a concentraciones $> 100 \mu\text{g/ml}$ para Gram positivos y $> 64 \mu\text{g/ml}$ para Gram negativos (24,40) y en el presente trabajo el 90% de las cepas, la C.M.I. se obtuvo a -

concentraciones $\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$; éstos resultados se corroboraron con una segunda prueba de susceptibilidad y con la realización de la prueba de beta -lactamasa. Por lo anterior se considera a los beta -lactámicos como antibióticos eficientes en pruebas "in vitro", demostrando que pueden inhibir a más del 90% de las cepas en concentraciones iguales o menores al valor de corte.

Los resultados de la prueba de beta -lactamasa demuestran que el 95.2% de las cepas resultaron negativas y sensibles a penicilina lo que respalda de manera importante los resultados de sensibilidad.

En cuanto a las cepas que resultaron beta -lactamasa positivas - todas fueron resistentes a penicilina (4 cepas) y de ellas 3 pertenecen al género Bacteroides sp., lo que correlaciona con el conocimiento de que éste género con gran frecuencia resulta productor de beta -lactamasa, [ya sea por información ligada al cromosoma o a plásmidos.]

Las cepas que resultaron beta -lactamasa negativas resistentes a penicilina pertenecen al género Clostridium sp., en éste caso no fué factible determinar el mecanismo de resistencia, puesto que - por un lado se ha demostrado la producción de un tipo de beta-lactamasa para éste género (23) que es posible no sea detectado por el método utilizado o bien que las cepas estén utilizando un mecanismo diferente a la actividad enzimática como la reportan Tally y col. y Sanders y col. (49,55).

En el caso de cloranfenicol es evidente su efectividad puesto que se observó un porcentaje de resistencia de 1.5% para Gram negativos y de 3.5% para Gram positivos.

El metronidazol es un antimicrobiano que mostró gran efectividad antimicrobiana con porcentajes de resistencia del 6% quedando como alternativa terapéutica como sugiere Mc. Allister (38).

Con los resultados de las pruebas de sensibilidad en estas bacterias de aislamientos clínicos podemos considerar que los antibióticos beta-lactámicos son los antibióticos de elección, sin embargo no podemos olvidar la consideración de que éstos antibióticos difunden mal y son inactivados en grandes colecciones purulentas, por lo que en estos casos es conveniente el uso de cloranfenicol o metronidazol; que a diferencia de los primeros, tienen muy buena difusión y se mantienen activos aún en el interior de los abscesos (8).

[Un punto importante es el hecho de que los diversos autores confirman que el uso indiscriminado de antibióticos es una de las principales causas de las manifestaciones de resistencia cada vez más frecuentes (32).]

VII. CONCLUSIONES.

1. La Frecuencia de aislamiento de bacterias anaerobias en hemo cultivos y en secreciones purulentas fué elevada.
2. Los microorganismos anaerobios más frecuentemente aislados - corresponden al género Bacteroides sp y a la especie B.fragilis
3. En nuestro medio los antibióticos betalactámicos mostraron bajos porcentajes de resistencia para todo tipo de bacterias + anaerobias y se consideran de elección, excepto en el caso de que existan grandes colecciones purulentas en cuyo caso debe seleccionarse cloranfenicol o metronidazol.
4. La resistencia a clindamicina es muy alta por lo que se sugiere no debe considerarse como antibiótico de primera elección.

VIII. RECOMENDACIONES.

1. Las técnicas para aislamiento e identificación de bacterias anaerobias son posibles de realizarse en cualquier laboratorio clínico de manera rutinaria.
2. Es conveniente la realización periódica de pruebas de sensibilidad antimicrobiana para las bacterias anaerobias, con el fin de poder ofrecer al clínico recomendaciones adecuadas de tratamiento y evitar que sea influido por la presión comercial.

IX. APENDICES.

Apéndice No. 1

Medios Especiales Utilizados:

1. Vacutainer Bacter Johnston Laboratories INC (medio de transporte).
2. Caldo tioglicolato sin dextrosa y sin indicador (Bioxon 280 -1).
3. Caldo Tioglicolato (BBL -0135 -C) enriquecido con 1 ml. de sol. madre de hemina -menadiona por cada 100 ml de medio.
4. Gelosa sangre hemina -menadiona (gelosa tripticasa soya BBL -11043; extracto de levadura Merck 3753; sangre de carnero desfibrinada a una concentración de 5% más 1 ml de sol. de hemina-menadiona por cada 100 ml de medio).
5. Agar Hinton -Müller (Merck 5437) más 1 ml de sol. de hemina-menadiona por cada 100 ml de medio.
6. Gelosa chocolate (Bioxon 213 -1) más globulina (Bioxon 175-2).

Apéndice No. 2

Técnica de Sheaffer - fulton. Tinción de esporas.

1. Fijar a la flama.
2. Cubrir con verde malaquita al 5% en sol acuosa.
3. Calentar a emisión de vapores durante 1 min.
4. Lavar con agua corriente.
5. Cubrir con safranina 15 min.
6. Lavar con agua corriente.
7. Secar al aire.
8. Observación al microscopio

Reactivos Especiales:

1. Indicador de anaerobiosis (BBL 70501)
2. Solución madre de hemina -menadiona (Sigma E 8250): Disolver 50 mg de hemina en 1 ml de NaOH 1N, agregar 100 ml de agua destilada y esterilizar a 121°C durante 15 min.
3. Solución madre de menadiona (Sigma M5629): disolver 100 mg de menadiona en 20 ml de alcohol etílico de 95°. Esterilizar por filtración.
4. Solución hemina -menadiona: a 100 ml de hemina agregar 1 ml de menadiona, envasar en frascos ambar a 4°C.

Apendice No. 3

Solución Amortiguadora de Fosfatos 0.05 M pH 5.8

KH_2PO_4	6.25 g
K_2HPO_4	0.6969g
Agua destilada	1000 ml

Reactivo de Yodo:

Yodo	2.03 g
Yoduro de Potasio	53.2 g
Agua destilada	100 ml

(guardar en frasco ámbar)

X BIBLIOGRAFIA.

1. Adhami, Z. The β - Lactamase activity of the Vaginal Flora - Asymptomatic pregnant women. J. Antimicrob. Chemother. 1982. 10: 303 -309.
2. Anderson, J.D., Sykes, R.B. Characterization of a β -Lactamase obtained from a strain of Bacteroides fragilis resistant to β -Lactam Antibiotics. J. Med. Microbiol. 1973.6:201 -206.
3. Baron, E.J., Bruckner, D.A. Comparison of susceptibilities of - Anaerobic Bacteria Determined by Agar Dilution and by a Micro broth -Method. Rev. Infect Dis. 1984. 6 (suppl.1): 249-253.
4. Bartlett, J.G., Polk, F.B. Bacterial Flora of the vagina: Quantitative Study. Rev. Infect. Dis. 1984.6 (suppl. 1): s67 -72.
5. Beauge, C.M., Onderdonk, A.B. Evaluation of a Prereduced Anaerobically Sterilized Medium (PRAS II) System for identification of Anaerobic Microorganisms. J. Clin. Microbiol. 1982.16(3):570-572.
6. Bjornson, H.S. Enzymes Associates with the survival and virulencia of Gram -negative Anaerobes. Rev. Infect. Dis. 1984.6(suppl. 1): s21 -24.
7. Brook, J. Anaerobic Infections in Childhoos. Rev. Infect. Dis. 1984. 6 (suppl.1): s187 -192.
8. Bryant, R.E., Rashad, A.L., Mazza, J.A., Hammond, D. β -Lactamase Activity in Human pus. J. Infect. Dis. 1980. 142(4): 594 -601.
9. Carlson, L.G., Florde, J.J. Influence of a Blood Culture Inoculation Technique on Detection of Bacteremia by the BACTEM System. J. Clin. Microbiol. 1982.16(3):590 -592.
10. Citrón, D.M. Specimen Collection and Transport Anaerobic Culture Techniques, and Identification of Anaerobes. Rev. Infect. Dis. 1984. 6 (suppl.1): s51 -58.

11. Cowan, S.T. Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge University Press. Great Britain. 1974. Pp. 77 - 122.
12. Crosby, M.A., Cump, D.W. Activity of cefoperazone and two β -Lactamase inhibitors, sulbactam and clavulamic, against Bacteroides spp. correlated with β -Lactamase Production. Antimicrob. Agents. Chemother. 1982. 22(3):398 - 405.
13. Cuchural, G.J.Jr., Tally, J.F., Jacobus, N.V., Gorbach, S.L., - Aldridge, K., T.C., F.M.S., H.G., I.P., O.J.P., P.C. Antimicrobial Susceptibilities of 1,292 isolates of the Bacteroides fragilis Group in the United States: Comparison of 1981 with 1982. Antimicrob. Agents. Chemother. 1984. 26(2):145-148.
14. Dowell, V.R.Jr. Botulism and tetanus: selected Epidemiologic - and Microbiologic Aspects. Rev. Infect. Dis. 1984. 6(suppl.1): s202 - 207.
15. Dowell, V.R.Jr., Allen, S.D. Diagnostic Procedures for Bacterial Mycotic and Parasitic Infections. Sixth Edition. Reprinted by the U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service. 1981. Pp. 171 - 214.
16. Dunn, D.L., Simmons, R.L. The Role of Anaerobic Bacteria in Intra abdominal Infections. Rev. Infect. Dis. 1984. 6(suppl.1): s139-146.
17. Ericsson, H.M., Sherris, J.C. Antibiotic Sensitivity Testing. Report of an International collaborative Study. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B. 1971.(suppl. 217): 1-90.
18. Giono, C.S., García, R.E. La identificación de las bacterias anaerobias en especímenes clínicos. Congreso Latinoamericano de - Patología Clínica. Guanajuato. México. 1982.
19. Goodman, G.A., Gilman, A. The Pharmacological Basis of Therapeutics. Ed. MacMillan. Pub. Co. N.Y. 1980. Pp. 1126 - 1150, 1181 - 1198, 1222 - 1248.

20. Gorbach, S.L., Bartlett, J.G. Anaerobic Infections. N.Engl. J. Med. 1974. 290(21):1177 -1184.
21. Gorbach, S.L., Bartlett, J.G. Anaerobic Infections. N.Engl. J. Med. 1974. 290(""): 1237-1245.
22. Gorbach, S.L., Bartlett, J.G. Anaerobic Infections. N.Engl. J. Med. 1974. 290(23): 1289 -1294.
23. Hart, C.S., Makin, T., Brown, P., Cooke, R.W. Characteristics of a β -Lactamase produced by Clostridium butyricum. J. Antimicrob. Chemother. 1982. 10:31 -35.
24. Heseltine, P.N.R., Apleman, M.D., Leedon, J.M. Epidemiology and susceptibility of resistant Bacteroides fragilis Group Organisms To New β - Lactam Antibiotics. Rev. Infect. Dis. 1984. 6(suppl. 1): s254 -259.
25. Helstad, A.G., Hutchinson, M.A., Amos, W.P., Kurzynsky, T.A. Evaluation of Two Broth Disk Methods for Antibiotic Susceptibility Testing of Anaerobes. Antimicrob. Agents. Chemother. 1984. 26(4): 601-603.
26. Holdeman, L.V., Cato, E.P., Moore, W.E.C. Ed. Anaerobe Laboratory Manual 4Th. ed. Blacksberg, Va: Anaerobe Laboratory, Virginia - Polytechnic Institute Am. State University. 1977.
27. Holdeman, L.V., Cato, E.P., Moore, W.E.C. Taxonomy of Anaerobe: - Present Tate of the Art. Rev. Infect. Dis. 1984.6(suppl.1):s3-10.
28. Hussain, Z., Burger, H., Lannigan, R., Groves, D.J. Development and Evaluation of a Coculture Technique for Identification of Anaerobic Organisms. J. Clin. Microbiol. 1984.19(2):215 -217.
29. Jousinmies -Somerm, H.R., Finegold, S.M. Problems Encountred in Clinical Anaerobis Bacteriology. Rev. Infect. Dis. 1984.6(suppl. 1): s45-49.

30. Koneman, E.W., Allen, S.D. Diagnóstico Microbiológico. Ed. Panamericana. 1983. Pp. 265 -268.
31. Kunin, C.M. The Responsibility of the Infectious Disease Community for the optimal use of Antimicrobial Agents. J. Infect. Dis. 1985. 151(3):388 -398.
32. Kupersztoch -Portnoy, Y.M. Antibiotic resistance of Gram negative bacteria in México: relationship to drug consumption. In: Levy, S.B., Clowes, R.C., Koenig, E.L. (eds.) Molecular Biology Pathogenicity and ecology of bacterial plasmids. Plenum Press. N.Y. 1981. Pp. 529 -537.
33. Laatsch, E.J., Hohenfeldt, P.R., Kos, W.L. Antibiotic Susceptibility of Black -Pigmented Bacteroides. Isolates from the Human Oral Cavity. Antimicrob. Agents. Chemother. 1982. 22(4):698-700.
34. Lacroix, J.M., Lamothe, F., Maouin, F. Role of Bacteroides bivius β -Lactamase in β -Lactam Susceptibility. Antimicrob. Agents. - Chemother. 1984. 26(5): 694-698.
35. Lennette, E.H., Spaulding, E.H., Truant, J.P. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. Washington, D. C. 1985. Pp. 403 -470.
36. Mathisen, G.E., Meyer, R.D., George, W.L., Citron, D.M. Brain - Abscess and Cerebritis. Rev. Infect. Dis. 1984. 6(suppl.1): s128 -131.
37. Maugh, T.H. A New Wave of Antibiotics Builds. Science. 1981. 214 (11): 1225 -1228.
38. Mac Allister, T.A. Progresos recientes en Antibióticos. Scot. Med. J. 1976. 21(210): 2-9.
39. Murray, P.M., Finegold, S.M. Anaerobes in Burn -Wound Infections. Rev. Infect. Dis. 1984. 6(Suppl.1):s184 -186.
40. Ohm-Smith, M.J., Hadley, K.W., Sweet, R.I. In vitro Activity of

New β -Lactam Antibiotics and other Antimicrobial Drugs against Anaerobic isolates from obstetric and Gynecological Infections. Antimicrobial. Agents. Chemother. 1982. 22(4): 711 -714.

41. Perret, C.J. Iodometric Assay of Penicillinase. Lancet. 1954. 174(4439): 1012 -1013.
42. Privitera, G., Dublanchet, A., Sebald, M. Transfer of multiple - Antibiotic Resistance between subspecies of Bacteroides fragilis. J. Infect. Dis. 139(1): 97 -101.
43. Privitera, G., Sebald, M., Payolle, F. Common regulatory mechanism of expression and conjugative ability of a tetracycline resistance of plasmid in Bacteroides fragilis. Nature. 1979. 278:657-659.
44. Rashtchian, A., Dubes, G., Booth, J, Tetracycline -Inducible transfer of tetracycline resistance in Bacteroides fragilis in the - absence of detectable plasmid DNA. J. Bacteriol. 1982. 150(1): 141 -147.
45. Rolfe, R.D. Interactions Among Microorganisms of the indigenous intestinal Flora their Influence on the Host. Rev. Infect. Dis. 1984. 6(Suppl. 1): s73 -79.
46. Rosenblatt, J.E. Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. Rev Infect. Dis. 1984. 6(Suppl.1): s242 -248.
47. Sabbaj, S. Anaerobes in liver abscess. Rev. Infect. Dis. 1984. 6(Suppl.1): s152 -156.
48. Saito, A., Hara, K., Yamaguchi, K., Usui, T. Pulmonary infection due to anaerobes in a Hospital Survey. Rev. Infect. Dis. 1984. 6(Suppl. 1): s128 -131.
49. Sanders, C.C., Sanders, E.W. Microbial Resistance to Newer Generation β -Lactam Antibiotics: Clinical and Laboratory Implications. J. Infect. Dis. 1985. 151(3): 399 -406.

50. Sato, K., Matsuura, Y., Inque, M., Mitsushashi, S. Proprieties of a new Penicillinase Type produced by Bacteroides fragilis. - Antimicrob. Agents. Chemother. 1982. 22(4):579-584.
51. Shimada, K., Urayama, K., Noro, T., Inamatsu, T. Biliary Tract Infection with Anaerobes and the Presence of Free bile Acid in Bile. Rev. Infect. Dis. 1984.6.(suppl.1): S 147-151
52. Sisson, P.R., Ing ham, H.R. Action of metronidazole on facultative Anaerobes. J. Infect. Dis. 1985. 151(3): 569-570.
53. Steers, E., Foltz, E.L., Graves, B.S., Riden, J. An inocula replicating apparatus for routine testing of Bacterial susceptibility to antibiotics. Antibiot. Chemother. 1959. 9:307 -311.
54. Sutter, V.L. Anaerobes as Normal Oral Flora. Rev. Infect. Dis. 1984.6 (Suppl.1): s62 -66.
55. Tally, F.P., Cuchural, G.J., Malamy, M.H. Mechanisms of resistance and transfer in Anaerobic Bacteria: Factors Influencing. Antimicrobial Therapy. Rev Infect. Dis. 1984. 6(Suppl.1):s260-269.
56. Tally, F.P., Snyderman, D.R., Gorbach, S.L. Malamy, M.H. Plasmid mediated transferable resistance to Clindamycin and Erythromycin in Bacteroides fragilis. J. Infect. Dis. 1979. 139(1):83 -88.
57. Wexler, H., Mulligan, M.E., Finegold, S.M. Polyacrylamide Gel Electroforesis Patterns Produced by Clostridium difficile. Rev Infect. Dis. 1984. 6(Suppl.1): s 299 -234.