

00844 /



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**BACTERIAS ANAEROBIAS DE MUESTRAS DE CAVIDAD ORAL
DE PACIENTES PEDIATRICOS ATENDIDOS EN EL
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGIA DEL HOSPITAL
INFANTIL DE MEXICO "DR. FEDERICO GOMEZ"**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE:
ESPECIALIZACION EN BIOQUIMICA CLINICA**

P R E S E N T A :

Q.F.B. BLANCA VERONICA ARMENTA CORTES

**DIRECTOR DE TESIS: DR. ADOLFO PEREZ MIRAVETE
ASESOR: PROFA. ELSA GARCIA-CANO RAMOS**



MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE QUÍMICA
DIRECCIÓN

BIOL. FRANCISCO J. INCERA UGALDE.

Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado.

Presente.

Me es grato informarle que la alumna **BLANCA VERÓNICA ARMENTA CORTÉS** presentará próximamente su examen para obtener el diploma de Especialización en Bioquímica Clínica (Clave 341) ante el siguiente jurado:

Presidente:	Dr. Rebecca Franco Bourland (INCMyn "SZ")
Primer Vocal:	QFB. Patricia Arzate Barbosa (IN Ped.)
Secretario:	QFB. Esp.B.C. Romelia Velasco Ortiz (IN Ped.)
Primer Suplente:	Dr. Fernando Montiel Aguirre (FQ)
Segundo Suplente:	Dr. Nahum Méndez Sánchez (Médica Sur)

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D. F., 14 de marzo de 2002.

El Director

M. en C. Santiago Capella Vizcaino

C.c.p. Integrantes del Jurado
C.c.p. Coordinador de Área
C.c.p. Departamento de Control Escolar
C.c.p. Interesado
*ggm.

AGRADEZCO

Al *Instituto Mexicano del Seguro Social* la oportunidad que me brindo por cursar el Diplomado con la Categoría de Becado Administrativo.

Muy especialmente expreso aquí mi más profunda gratitud a:

Dr. Silverio Alonso López

Director del Hospital General de Zona No. 8 IMSS

Dr. Raúl Vázquez Estrella

Jefe del Laboratorio Clínico del HGZ No. 8 IMSS

QBP Lucina González Dada

Subjefe del Laboratorio Clínico del HGZ No.8 IMSS

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar aquí mi gratitud al **Dr. Adolfo Pérez Miravete** por su gentileza y amable disposición para asesorarme, su trayectoria representa para mí un ejemplo de vida plena.

A la **Maestra Elsa García Cano Ramos** le agradezco sus consejos y recomendaciones, así como, el haberme invitado a participar en el XXXIII Congreso Nacional de Microbiología.

Me siento en deuda con todos y cada uno de los compañeros del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Infantil de México muy especialmente con la **QFB Yolanda Jiménez Tapia** por la paciencia y dedicación que desinteresadamente me brindaron.

DEDICATORIA

A mi entrañable amiga **QFB Carmen Mora Villalpando** por sus innumerables muestras de amistad y cariño.

A mi querida **VIOLE** por su gran responsabilidad, comprensión e invaluable cooperación para la terminación de este proyecto personal.

A mi querido **VICTOR** por ser un poderoso motivo para emprender este viaje hacia el conocimiento, tal como lo fue Viole en aquel vertiginoso 1994.

A mis **QUERIDOS PADRES** porque su cariño, perseverancia, honestidad y gran sabiduría son un faro en mi vida.

Por supuesto le dedico este trabajo a mi **Gran Amiga VERO** porque sin ella todo esfuerzo hubiera sido en infructuoso.

INDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	MARCO TEÓRICO	2
2.1	GENERALIDADES	2
2.2	IMPORTANCIA CLÍNICA DE LAS BACTERIAS ANAEROBIAS	5
2.3	MUESTREO Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA.....	15
2.4	MEDIOS DE CULTIVO.....	17
2.5	SISTEMAS GENERADORES PARA PRODUCIR AMBIENTES ANAERÓBICOS	18
2.6	IDENTIFICACIÓN DE ANAEROBIOS MEDIANTE PRUEBAS METABÓLICAS.....	20
3	FUNDAMENTO DEL TEMA.....	23
4	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
5	OBJETIVO.....	24
6	HIPOTESIS.....	24
7	DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.....	25
7.1	TIPO DE ESTUDIO.....	25
7.2	POBLACIÓN	25
7.3	VARIABLES	25
7.4	CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE NO INCLUSIÓN	26
7.5	METODOLOGÍA	27
7.6	MATERIAL Y EQUIPO	28
7.7	TÉCNICAS	31

7.8 DIAGRAMA DE FLUJO.....	33
8 RESULTADOS.....	34
9 DISCUSIÓN	39
10 CONCLUSIONES.....	41
11 BIBLIOGRAFÍA.....	43
12 ANEXO.....	46
1.- PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.....	46
2.- CAMBIOS TAXONÓMICOS Y ADICIONES DE BACILOS ANAEROBIOS GRAM NEGATIVOS.....	49
3.- ALGUNOS CRITERIOS CARDINALES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ANAEROBIOS.....	50
4.- MÉTODOS RÁPIDOS PARA LA IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE ANAEROBIOS.....	51
5.- TRABAJO LIBRE PRESENTADO EN XXXIII CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA.....	52

INDICE DE FIGURAS

1.- MORFOTIPOS.....	22
2.- CUADRO No. 1 FRECUENCIA DE LAS DIFERENTES ESPECIES EN CADA TIPO DE MUESTRA.....	35
3.- CUADRO No. 2 MICROORGANISMOS ANAEROBIOS OBLIGADOS AISLADOS DE DIFERENTES TIPOS DE MUESTRA	36
4.- CUADRO No. 3 GRAM Y MORFOTIPOS DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS EN TRES DIFERENTES TIPOS DE MUESTRA.....	37
5.- FIGURA No. 1 NÚMERO DE CULTIVOS POSITIVOS A AN AEROBIOS Y FIGURA No. 2 GRAM Y MORFOTIPOS DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS EN TRES DIFERENTES TIPOS DE MUESTRAS.....	38

RESUMEN

Se estudiaron 30 muestras que corresponden a 27 niños cuya edad oscila entre los 3 y 12 años, a los cuales la valoración odontológica determinó la extracción en una o más piezas dentarias por la presencia de un absceso, por caries avanzadas o bien por la extracción de dientes sanos por pérdida natural. Las muestras se obtuvieron de la base de la pieza extraída haciendo uso de una jeringa, el producto obtenido de esta operación se trabajó en condiciones de esterilidad para su siembra y aislamiento en medios apropiados, se incubó en jarras de anaerobiosis durante 48 horas a 37 °C. Las bacterias anaerobias aisladas se purificaron e identificaron mediante el sistema API-20 A (bioMérieux)

De las 30 muestras estudiadas, 18 correspondieron a extracción por absceso; 9 a extracción por caries y 3 a extracción fisiológica. Del total de muestras trabajadas se aislaron 14 diferentes especies, observándose predominio en los aislamientos de bacterias Gram negativas, entre los que destacan por su frecuencia: *Prevotella spp* 19 cepas, *Veillonella parvula* 12 cepas, *Bacteroides fragilis* 1 cepa y *Fusobacterium spp* 3 cepas. Entre los bacilos Gram positivos se identificaron los siguientes: *Bifidobacterium spp* 7 cepas, *Actinomyces naeslundii* 3 cepas, *Actinomyces israelii* 2 cepa; además *Lactobacillus fermentum* y *Eubacterium lentum*, una cepa de cada uno; también se obtuvieron aislamientos de los cocos Gram positivos: *Streptococcus intermedius* y *Gemella morbilorum*.

Se aislaron en total 51 cepas, cantidad que constituye más del 50 % del promedio de aislamientos realizados por otros autores. Lo anterior pone de manifiesto que la metodología aplicada en este trabajo es efectiva y susceptible de perfeccionar.

Sería recomendable trabajar con abscesos cerrados para evitar la contaminación con flora indígena.

1 INTRODUCCIÓN

Las bacterias anaerobias ocupan un papel muy importante dentro de la flora indígena y patógena oral y dental. Las poblaciones microbianas que tienen el poder de colonizar son la principal fuente de patógenos responsables de infecciones orales y dentales, incluidas: enfermedades periodontales, gingivitis, pericoronitis, endodontitis, periimplantitis e infecciones postextracción. Cada entidad tiene distintas características clínicas y microbianas.

Las especies bacterianas asociadas con infecciones orales incluyen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium spp*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eikenella corrodens*, *Peptostreptococcus micros*. *Treponema pallidum* ha sido asociado con gingivitis ulcerativa necrotizante. *Porphyromonas endodontalis* aparece específicamente relacionada con infecciones endodónticas (13,14). Otros autores mencionan a *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Selenomonas* y *Propionibacterium*. (16).

El aislamiento de especies causantes de infecciones orales requiere la colección apropiada de muestras y el uso de técnicas anaeróbicas.

En los laboratorios clínicos mexicanos muy frecuentemente la práctica bacteriológica se reduce a la búsqueda de microorganismos aerobios, la bacteriología anaerobia es muy escasa o, en el peor de los casos, nula; se aduce como causa la falta de material, el costo y en algunos casos se acepta la inexperiencia. Hoy en día es imperativo que se den a conocer procedimientos simples y asequibles que puedan aplicarse en cualquier laboratorio, a fin de lograr con mínimos recursos la información completa y fidedigna que requiere el médico para elaborar un diagnóstico oportuno, exacto y, consecuentemente, aplicar un tratamiento eficaz.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 GENERALIDADES

Existen evidencias basadas en estudios científicos, que indican que los anaerobios se originaron hace tres o cuatro mil millones de años, en diferentes tipos de aguas, donde el oxígeno no estaba libre, sino combinado con otros compuestos, formando agua, sulfatos, carbonatos, silicatos etc., ahí permanecieron estas bacterias protegidas de los rayos ultravioleta del sol, que son mortales para diferentes microorganismos. Se piensa que la vida en la tierra fue anaerobia por cientos de millones de años. Cuando tuvo lugar la fotosíntesis y se usó el agua como fuente de iones de hidrógeno, el oxígeno empezó a acumularse en la tierra y muchas formas de vida se adaptaron a usarlo como último aceptor de electrones y protones en forma de respiración aerobia (1, 2, 3).

El reconocimiento de la naturaleza anaerobia de ciertos microorganismos se debe a **Pasteur**, quien en 1863 observó que algunas bacterias perdían la viabilidad al ser expuestas al aire (1).

Antes de 1900 se aisló una variedad de bacterias que sólo crecían en medios gaseosos con tensión de oxígeno sustancialmente reducida. No obstante, en los últimos decenios, las infecciones anaerobias endógenas se han vuelto comunes, esto último debido a que hay mayor número de pacientes que reciben inmunosupresores por neoplasias y otros padecimientos, encontrándose alterada su resistencia; las infecciones anaerobias primarias se establecen fácilmente en áreas donde existe daño a los tejidos, tras lo cual puede sobrevenir una bacteremia o diseminación metastásica de bacterias con formación de abscesos distantes y deterioro que termina en muerte del paciente. (1).

Antes de 1965, hubo predominio de infecciones clostridiales; durante el decenio de los setentas, 85 por ciento de los anaerobios aislados a partir de muestras clínicas adecuadamente seleccionadas, correspondió a los géneros *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, y de algunas especies de *Peptococcus*. (1).

Se necesita conocer la identificación precisa de las especies, como principal marcador epidemiológico para estudios de epidemiología y de vigilancia de tratamientos.

Los métodos taxonómicos que se usan para la caracterización de una cepa incluyen, actualmente, desde el uso de pruebas bioquímicas convencionales hasta la caracterización molecular.

En 1968, **Dowel y Hawkins** recopilaron tablas diferenciales a partir de datos tabulados obtenidos de la caracterización de cepas de referencia y de numerosos aislamientos recibidos en el laboratorio de anaerobios del CDC (Center for Disease Control) y de laboratorios estatales y federales de todo Estados Unidos, estas tablas se basaron en datos generados en baterías de pruebas bioquímicas y de cultivo llevadas a cabo con todos los aislamientos anaerobios recibidos.

Más tarde, **Moore y col.** del Instituto Politécnico de Virginia, comunicaron el uso de análisis por cromatografía en fase líquido-gaseosa y describieron varias pruebas diferenciales para la caracterización de anaerobios, basadas en reacciones de medios prerreducidos y aneróticamente esterilizados (1).

Es importante conocer la clasificación de las bacterias desde el punto de vista de los requerimientos de oxígeno:

BACTERIAS AEROBIAS OBLIGADAS.- Estos microorganismos generan energía oxidativa y son incapaces de obtener suficiente energía para crecer por reacciones de fermentación, además requieren de la síntesis de ácidos grasos insaturados y esteroides para su estructura y funciones, y estos compuestos requieren oxígeno molecular para su formación.

BACTERIAS MICROAEROFÍLICAS.- Estas bacterias requieren para crecer del oxígeno como aceptor terminal de electrones, pero no crecen en la superficie del medio sólido en condiciones aeróbicas. Bajo condiciones anaeróbicas no crecen porque no son capaces de generar suficiente energía en ausencia absoluta de oxígeno. Tenemos como ejemplo el género *Campylobacter*.

BACTERIAS ANAEROBIAS.- Son aquellas que no requieren oxígeno como aceptor final de electrones para crecer o realizar funciones metabólicas. Aunque pueden poseer ciertos citocromos, carecen de otros que requieren oxígeno molecular para transferir electrones y generar energía. Las bacterias anaerobias están subclasificadas en:

a) BACTERIAS ANAEROBIAS FACULTATIVAS.- Bacterias capaces de obtener energía y crecer oxidativamente utilizando el oxígeno como aceptor terminal de electrones (respiración aeróbica) o bien pueden crecer bajo condiciones de anaerobiosis obteniendo energía por vías fermentativas usando compuestos orgánicos como aceptores finales de electrones. En aislamientos clínicos, la mayoría de las bacterias que crecen en aire son capaces también de crecer en anaerobiosis.

Ejemplos de este subgrupo son todas las enterobacterias

b) BACTERIA AEROTOLERANTES.- Se agrupan aquí bacterias que crecen mejor en ausencia de oxígeno, ya que no lo utiliza, pero en presencia de pequeñas cantidades de oxígeno molecular y muy bajos potenciales de óxido reducción, pueden crecer sin problemas sobre todo en resiembras más que en aislamientos primarios.

Como ejemplo tenemos al *Clostridium tertium*, *P. acnes*

c) ANAEROBIOS OBLIGADOS.- En este grupo se incluyen bacterias definidas como no utilizadoras de oxígeno y cuyo crecimiento se ve inhibido por él. Los anaerobios obligados crecen solamente en un rango entre 3 y 4 % de oxígeno molecular como máximo.

Un ejemplo típico es el grupo *Bacteroides fragilis*.

d) ANAEROBIOS ESTRICTOS.- Se incluyen en esta clasificación microorganismos extremadamente sensibles al oxígeno y que no son capaces de crecer con más de 0.5 % de oxígeno, por lo que resulta muy difícil su aislamiento en el laboratorio, aunque los sistemas de anaerobiosis de que se dispone logran atmósferas hasta de menos de 0.4 % de oxígeno.

El ejemplo de este grupo son los microorganismos del género *Treponema*.

Aunque el término anaerobio se usa para las bacterias que no requieren oxígeno para multiplicarse, también existen algunos hongos y protozoarios que también son anaerobios.

Por otro lado, existen varias teorías que explican el efecto tóxico, bacteriostático y bactericida que tiene el oxígeno sobre los anaerobios obligados.

El oxígeno molecular por sí mismo es tóxico para algunos anaerobios, pero los compuestos que se producen cuando éste se reduce lo son aún más. Cuando se están llevando a cabo las reacciones de óxido-reducción el oxígeno molecular se reduce en anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo. Generalmente los organismos que usan oxígeno tienen enzimas como la superóxido dismutasa y la catalasa que los protegen de los efectos adversos de estos derivados. Si los anaerobios carecen de estas enzimas, sería lógico entender su susceptibilidad al oxígeno. Pero esto no es del todo concluyente debido a que algunos anaerobios producen en cantidades variables estas enzimas.

En cuanto al efecto bacteriostático, se observa por la inhibición del crecimiento o multiplicación de la bacteria debido a que al estar presente el oxígeno, los electrones que normalmente son aceptados por otros microorganismos para llevar a cabo sus funciones metabólicas; en las bacterias anaerobias la reducción del oxígeno provoca la disminución en la energía necesaria para sintetizar nuevo material celular; por lo que se da un retraso del desarrollo lo que se traduce en un efecto bacteriostático. Si el período de exposición es breve, el efecto puede ser reversible. Si la exposición se prolonga y los daños son letales el efecto se torna irreversible (bactericida).

2.2 IMPORTANCIA CLÍNICA DE LAS BACTERIAS ANAEROBIAS

Las bacterias anaerobias pueden ser encontradas en el suelo, en agua fresca, en sedimentos salinos y como componentes de la microbiota humana. En condiciones normales, la llegada de bacterias anaerobias al cuerpo humano puede ser a su paso por el conducto uterino. La proporción de ellas es mayor a los aerobios y anaerobios facultativos (colon 1000:1; cavidad vaginal y oral 10:1). Los factores de resistencia del hospedero limitan el desarrollo

de dicha biota, impidiendo el acceso a tejidos asépticos, sin embargo cuando esa resistencia disminuye o desaparece, las bacterias inocuas quedan en libertad de invadir tejidos y pueden producir infecciones como: abscesos, gangrena, etc. (2,4).

Las formas por las que se adquieren las infecciones endógenas, a partir de las cepas de la flora normal que llegan a sitios normalmente estériles son el resultado de uno o más factores predisponentes que comprometen las barreras anatómicas (cirugía o trauma accidental) o cuando hay alteraciones de los mecanismos de defensa, como es el caso de los procesos malignos, la diabetes, quemaduras, bacteriemia, infecciones de cabeza y cuello, problemas dentales y orofaciales, neumonía u otras enfermedades de las cavidades torácica, abdominopélvica, infecciones de tejidos blandos y gangrena (4,11) y particularmente cuando es afectado el riego sanguíneo.

El potencial de óxido reducción (Eh) en la mayoría de los tejidos del cuerpo se encuentra + 0.126 y 0.246 volts y esto depende de que la medición se efectúe en un sitio de alta (arterial) o baja (venosa) saturación de oxígeno. La mayoría de los gérmenes anaerobios crecen en Eh negativos, entre - 100 a - 250 volts, de esta forma se previene en los tejidos normales el crecimiento bacteriano. (1,3).

En sitios especiales como la luz del colon, cavidad oral y vaginal, la perfusión tisular se encuentra disminuida, además, las bacterias aerobias que colonizan mucosas, consumen oxígeno lo que influye directamente en la disminución del Eh dando lugar a la proliferación de bacterias anaerobias (3).

Entre los factores de patogenicidad y/o virulencia de las bacterias anaerobias obligadas se pueden incluir, la cápsula bacteriana, endotoxinas, exotoxinas y otros metabolitos.

Asimismo, la microbiota de la cavidad bucal comprende hasta el momento más de 300 especies e incluye microorganismos endógenos y exógenos que pueden colonizar y comportarse como oportunistas. El desarrollo de éstos se limita, de acuerdo con el número de nutrientes que llegan por vía exógena. La presencia de factores antibacterianos en la

saliva, el mecanismo de deglución y la continua exfoliación de las células epiteliales de la mucosa bucal son factores limitantes adicionales.

Los microorganismos que colonizan la cavidad bucal del recién nacido a partir de aproximadamente las 8 horas de alumbramiento constituyen la denominada comunidad pionera. Los primeros en instalarse son los estreptococos (*Streptococcus salivarius*) que colonizan la lengua, las mucosa y se encuentran libres en la saliva. También pueden identificarse otros géneros, como por ejemplo: estafilococos, lactobacilos, neumococos, coliformes, sarcinas, *Neisseria*, *Haemophilus* y *Cándida albicans*.

El medio bucal experimenta sus mayores cambios alrededor de los seis meses de vida, momento de la erupción de piezas dentarias temporarias, se establecen microorganismos capaces de adherirse a la superficie del esmalte y al margen dentogingival (*S. sanguis* y *Streptococci* del grupo *mutans*)

Con la pérdida de las piezas dentarias a través del tiempo los microorganismos cambian en tipo y composición, se asemejan a los que se hallaban presentes antes de la erupción dentaria y aparece una nueva comunidad clímax. Los factores microbianos son responsables de la sucesión autogénica, por ejemplo, el aumento en el número de anaerobios, después de la aparición de las piezas dentarias se asocia con los cambios en el medio, que se producen como resultado del metabolismo de las especies pioneras aerobias y anaerobias facultativas; disminuye el potencial redox de la placa y crea condiciones óptimas para la colonización por parte de los anaerobios estrictos. (5). Los anaerobios son patógenos importantes en las infecciones de cavidad oral tanto como en las infecciones sistémicas que se originan en la boca. (12).

Cada superficie dentaria, cada unión dentogingival, constituye un nicho ecológico diferente. En cada nicho ecológico se encuentran elementos del sistema inmune específico e inespecífico que modulan la acción de los microorganismos allí presentes. La composición microbiana de cada nicho ecológico depende de la capacidad de los microorganismos para cumplir con tres etapas: adherencia, desarrollo y supervivencia. Tal es el caso de la adhesión por unión lectina- carbohidrato, en donde las lectinas reconocen residuos de glúcidos y se fijan a ellos; una de las formas en que se observa este tipo de unión es en los casos de coagregación bacteriana en los que las fimbrias tipo 2 de

Actinomyces viscosus interactúan con residuos de galactosa de *S. sanguis*. Los análisis electroforéticos han demostrado que las proteínas salivales que primero promueven la adhesión son las ricas en prolina (PRP), seguidas por las que contienen proteína-estaterina. Así, las típicas imágenes de mazorca de maíz de la placa supragingival se deben a la interacción entre formas filamentosas Gram positivas y formas cocoides Gram positivos u otras Gram negativas. De esta forma, *Actinomyces viscosus* y *A. naestlundii* se le agregan *Veillonella*, *S. sanguis* y/o *S. mitis*.

Muchos microorganismos de la cavidad bucal no se adhieren directamente a los componentes epiteliales, bacterianos o salivales ni a los polisacáridos extracelulares o a las superficies dentales sino que quedan retenidos en fosas y fisuras dentarias, en el surco gingival o en bolsas periodontales e incluso dentro de la matriz de la placa. Así, los lactobacilos se acumulan en lesiones cariosas activas mientras que *Porphyromonas* se encuentran predominantemente en el surco gingival.

Por otro lado, la neuraminidasa remueve los residuos terminales del ácido siálico y expone residuos de galactosil que funcionan como un nuevo receptor, el que interactúa con la adhesina galactosil de *Actinomyces viscosus*. *A. naestlundii*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum* y *Prevotella intermedia*. Enzimas como la tripsina genera nuevos receptores que promueven la adhesión de *Porphyromonas gingivalis* a los tejidos del hospedero. (5).

El papel de los anaerobios, como se observa, es muy significativo en la flora indígena y patógena de la cavidad oral y dental. Se ha estimado que el número de especies recuperadas de placa subgingival se encuentra en el rango de 250 a 400 en donde la mayor proporción corresponde a bacterias anaerobias. Entre los más comúnmente aislados incluyen: *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Actinomyces*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Selenomonas*, *Eubacterium*, *Propionibacterium* y *Treponema* (13), y las que se destacan por su asociación con infecciones orales son: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium spp*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eikenella corrodens* y

Peptostreptococcus micros (14) . Así como también se han propuesto nuevos géneros como la *Bulleidia* y en especial la *Bulleidia extracta*, bacilo Gram positivo no esporulado, que fue aislado de cavidad oral por Downes (18).

En infecciones orofaciales se han aislado con frecuencia bacilos Gram negativos y el *Fusobacterium nucleatum* está especialmente asociada con infecciones severas (15).

Además una variedad de procedimientos clínicos tales como extracción dental, tratamiento periodontal y endodóntico, pueden causar traslocación de microorganismo de la cavidad oral al torrente sanguíneo. Estos microorganismos que alcanzan el torrente circulatorio, usualmente son eliminados por el huésped a través del sistema reticuloendotelial en minutos; sin embargo, en pacientes con ineficientes válvulas cardíacas o enfermedad vascular, la bacteremia puede ser un peligro potencial (22) al colonizar en estas estructuras.

A continuación se mencionan aquellas bacterias anaerobias más comúnmente aisladas en cavidad oral.

GÉNEROS Y ESPECIES MICROBIANAS PRESENTES EN LA CAVIDAD ORAL

Bacilos anaerobios facultativos

Lactobacillus

Actualmente se aceptan 43 especies dentro de este género, nueve de las cuales pueden ser aisladas de cavidad bucal. Las células tienen forma de bacilos y suelen agruparse en cadenas. El tamaño de las cadenas y la cantidad de curvaturas dependen del medio de cultivo utilizado, del tiempo de incubación y de ciertos factores bioquímicos. Son microorganismos no esporulados e inmóviles; son Gram positivos pero pueden tornarse gran negativos en cultivos envejecidos.

Los lactobacilos pueden ser acidogénicos o acidúricos. Sobreviven y se reproducen en condiciones de acidez. Pueden ser homofermentativas, especies que sólo producen ácido láctico o heterofermentativas las que además de producir ácido láctico elaboran otros productos como ácido acético, etanol y bióxido de carbono.

En la cavidad bucal se hallan especies de ambos grupos pero los homofermentativos son los más importantes en relación con la caries dental. Las especies *L. fermentum* y *L. brevis* son heterofermentadoras (5).

Bacilos anaerobios obligados

Actinomyces

Estas bacterias filamentosas son microorganismos anaerobios obligados o facultativos, capnófilos y Gram positivos que se pueden fragmentar en cocobacilos, de 0.2 a 1.0 micrómetros de diámetro y de 10 a 50 de largo, no ácido alcohol resistentes (8).

Las especies *A. viscosus*, *A. naeslundii* y *odontolyticus* tienen menor patogenicidad. En cambio, *A. israelii* está más implicado en actinomicosis cervicofacial y tumores del maxilar.

La especie *A. naeslundii* ha sido hallada en el hombre y en ciertos animales. Produce microcolonias de centro denso y filamentos periférico. Se trata de un anaerobio facultativo. Dentro de la cavidad bucal se encuentra con preferencia en criptas amigdalinas, placa y cálculos. Las cepas humanas son muy similares, *A. naeslundii* y *A. viscosus* son muy especiales desde el punto de vista bioquímico. Las dos inducen caries dentales y enfermedad periodontal (5).

La especie *A. israelii* es miembro normal de la biota bucal. Se puede aislar de criptas amigdalinas y también de cálculos dentales.

Propionibacterium

Dentro de este género hay una sola especie, *Propionibacterium propionicus*, que ha sido aislada de pacientes con actinomicosis y del conducto lagrimal. No se puede separar morfológicamente de *Actinomyces israelii*. La diferenciación bioquímica se basa en el hecho de que forma ácido propiónico a partir de la glucosa por lo que se detecta por medio de cromatografía líquida (26)

Los microorganismos de género *Propionibacterium* han sido hallados en la placa dental, dentina cariada y tejidos pulpaes necróticos. En la piel se encuentra el *Propionibacterium*

acnes, que también ha sido aislado de la cavidad bucal en placa dental, caries de dentina y tejidos pulpares necróticos. (5).

Eubacterium

Este género incluye microorganismos Gram positivos, anaerobios, no esporulados y pleomórficos; se presentan como filamentos o bacilos cortos. (26) Existe un grupo relacionado con la cavidad bucal que incluye *Eubacterium alactolyticum*, *E. saburreum* y *E. ingrens*, todos los cuales pueden ser ubicados en la placa dental. Algunas de estas especies han sido identificadas a partir de caries de dentina y tejidos pulpares necróticos. (5).

Bifidobacterium

Son bacilos Gram positivos inmóviles y pleomórficos que en algunos casos poseen engrosamientos o abultamientos terminales y son bifurcados. Estos bacilos pueden presentarse aislados, en cadenas cortas, en empalizada o en formas que semejan letras V, Y o X (9).

Se han aislado dos especies a partir de la placa dental y caries de dentina, a saber *B eriksonii* y *B dentium*. Estos microorganismos son poco numerosos de la cavidad bucal.(5).

Cocos anaerobios obligados

Veillonella

Familia Veillonellaceae. Género *Veillonella*. Formas cocoides que miden 0.3 a 0.5 um pueden observarse en pares o como célula única, o masas o cadenas no esporuladas e inmóviles, crecen entre 30-37 °C a pH de 6.5-8.0. (3 ,4)

Este género consiste en cocos estrictamente anaerobios Gram negativos y comprende entre el 5 y el 10 % de los microorganismos recuperados a partir de la saliva y las superficies de la lengua y más del 28 % de los provenientes de la placa dental.

En la cavidad bucal se conocen dos especies. *Veillonella parvula* y *Veillonella alcalescens*.

Gran número de estos microorganismos ha sido encontrado en la placa dental y se reconoce que son incapaces de fermentar carbohidratos porque no poseen las enzimas esenciales para esos fines. Para su desarrollo utilizan ciertos metabolitos intermedios como el piruvato, el lactato, el fumarato y el oxaloacetato, junto con el bióxido de carbono. Los estudios epidemiológicos han demostrado que la presencia de altos niveles de *Veillonella* puede estar relacionada con un bajo índice de caries dental (5).

Bacilos anaerobios obligados

Bacteroides

El género *Bacteroides* comprende a bacilos Gram negativos anaerobios, no esporulado, inmóvil y con catalasa generalmente negativa. Crecen a pH de 7.0 y temperatura de 37 °C

Los bacteroides son bacilos anaerobios Gram negativos de los cuales hasta el presente se han identificado alrededor de 30 especies que aparecen permanentemente en el tracto intestinal y en las mucosas de algunos mamíferos. (6). Un patógeno importante es el *B. fragilis*, aparece en tracto intestinal y en las heces, no es considerado un miembro normal de la cavidad oral. Las especies de importancia odontológica debido a su relación con la enfermedad periodontal son: *B forsythus*, *B gracilis*, *B ureolyticus*.

Porphyromonas

Este género surge de una reclasificación del género *Bacteroides* y los microorganismos pertenecientes a él, son bacilos inmóviles que carecen de metabolismo fermentativo y de las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y de 6 -fosfogluconato deshidrogenasa.

Las porphyromonas son asacarolíticas y usan sustratos nitrogenados como fuente de energía. (6) Entre las especies de interés odontológico se encuentra *P gingivalis*. En condiciones de salud las distintas especies se pueden ubicar en la lengua, en las amígdalas e incluso en la saliva.

Prevotella

Al igual que el género *Porphyromonas*, *Prevotella* anteriormente estaba ubicada dentro del género *Bacteroides*.

Los microorganismos del género *Prevotella* son bacilos pleomórficos Gram negativos que carecen de las mismas enzimas que *Porphyromonas* y que de acuerdo con la producción de pigmento marrón o negro en cajas de agar sangre se dividen en especies pigmentadas y no pigmentadas. (6).

El hábitat primario de *Prevotella* es el surco gingival. Estos microorganismos aparecen asociados con casos de periodontitis e infección del conducto radicular y con abscesos de origen dentario y periodontal (5).

Fusobacterium

Las fusobacterias son microorganismos Gram negativos anaerobios no esporulados con una forma fusiforme característica que parecen como bacilos de pares con la apariencia de cigarro alargado (6). Estas bacterias fueron aisladas por primera vez junto con espiroquetas, en un caso de gingivitis ulcerosa asociado con la infección conocida como gingivitis ulceronecrotizante aguda. En la cavidad oral se han tipificado dos especies de

fusobacterias, a saber: *F nucleatum* y *F periodonticul*. En agar forman colonias pequeñas traslúcidas y de color blanco grisáceo.

El *Fusobacterium nucleatum* puede ser aislado de pacientes con infecciones del tracto respiratorio superior y de la cavidad oral en lesiones periodontales (5).

2.3 MUESTREO y MEDIOS DE TRANSPORTE

Es recomendable para la obtención y transporte de muestra vigilar lo siguiente:

No usar hisopos.- No es recomendable ya que puede haber reducción del número de bacterias, debido a la falta de humedad, exposición al oxígeno y adherencia de ellas a las fibras del algodón, pero puede utilizarse cuando se trate de una superficie mucocutánea infectada, descontaminando previamente la parte superficial de la lesión. Además en la actualidad existen en el mercado hisopos especiales que se encuentran dentro de un recipiente libre de oxígeno.

Obtener la muestra con jeringa y aguja

Después de la toma de muestra no debe transcurrir más de una hora para efectuar su procesamiento.

El laboratorio de ser posible debe proporcionar frascos con atmósfera anaeróbica , Stuart o Cary- Blair modificado.

En el caso de abscesos dentoalveolares cerrados se suele utilizar papel filtro estéril, introduciéndolo por 10 segundos (11).

PROCEDIMIENTOS Y TIPOS DE MUESTRAS

SITIOS DE LA TOMA	MUESTRA Y MÉTODO
Sistema nerviosos central	LCR Material de absceso o biopsia Biopsia de tejido
Área dental, oídos y garganta	Timpanocentesis Material de abscesos o biopsia Material quirúrgico
Área pulmonar	Aspiración transcricioidea Aspiración transtraqueal Punción pulmonar percutánea Líquido pleural por toracentesis
Área abdominal	Muestras quirúrgicas no contaminadas con flora normal. Aspirado de absceso con jeringa y aguja durante la cirugía Bilis
Tracto genital femenino	Muestras quirúrgicas Muestras tomadas con laparoscopia
Tracto urinario	Punción suprapúbica Cateterización uretral
Hueso y articulación	Aspirado de articulaciones Material obtenido durante la cirugía (Osteomielitis)
Tejido blando	Heridas abiertas solo después de riguroso aseo Material de abscesos Material obtenido por biopsia
Sangre	Punción venosa Punción arterial
Médula ósea	Punción esternal Punción de cresta iliaca

Tomado de Basualado y López (10)

2.4 MEDIOS DE CULTIVO

Se sugiere utilizar Gelosa sangre hemina menadiona o gelosa sangre anaeróbica(medios no selectivos), para el aislamiento primario de anaerobios obligados en muestras clínicas, también es conveniente utilizar medios selectivos y medios de enriquecimiento.

Los medios se preparan (ver anexos) se dejan solidificar, se les practica prueba de esterilidad y se guardan en refrigeración por un máximo de 4 semanas.

Es conveniente utilizar medios líquidos tales como tioglicolato con dextrosa sin indicador enriquecido con hemina menadiona (vitamina K) o el medio Glucosa carne molida.

También es recomendable usar medios selectivos como el Agar sangre con 0.25 % de alcohol feniletílico, que sirve para evitar el crecimiento de bacilos Gram negativos anaerobios facultativos como es el caso del *Proteus* sp que al formar "swarming " en la gelosa sangre impide el aislamiento de anaerobios.

El Agar yema de huevo nos permite detectar la presencia de la enzima lecitinasa

Asimismo el Agar Livingston contiene sales biliares y es un medio obligado para la diferenciación de los bacilos Gram negativos anaerobios. Además existe el Agar Trypticasa soya-Tween 80 el que se usa para detectar la presencia de enzima lipasa.

Existen dos medios líquidos que son ampliamente utilizados para el desarrollo de los anaerobios a saber:

Caldo tioglicolato enriquecido con hemina y menadiona (1 %) o con extracto de levadura (0.5 %) o suero de caballo (6 %) y el Caldo glucosa con carne picada o caldo tioglicolato con carne molida. Si estos medios llevan un sello de aceite mineral no es necesario incubar en condiciones anaeróbicas. Se usan para sembrarlos con las secreciones patológicas, con el fin de recuperar las bacterias que a veces, por fallas en el sistema de anaerobiosis no crecen en las placas de primo aislamiento.

En la práctica clínica es recomendable, tener presente, que se debe usar un juego de cajas que se incubarán en atmósfera aeróbica o microaerofílica para recuperar microorganismos aerobios, facultativos y microaerofílicos.

2.5 SISTEMAS PARA PRODUCIR AMBIENTES ANAERÓBICOS

El cultivo de bacterias anaerobias estricta y obligadas requiere una rápida generación de atmósfera anaeróbica con niveles de oxígeno por debajo de 0.5 %.

Los sistemas más comunes son los siguientes:

1. - Sistema generador Gas Pak (BBL)

El cual contiene un sobre generador desechable que contiene pastilla de ácido cítrico y bicarbonato de sodio y otra de borohidruro de sodio. Al agregarle el agua se libera CO_2 e hidrógeno que atrapa el oxígeno de la jarra.

Es necesario colocar piedritas de catalizador de paladio nuevas o rejuvenecidas, lo cual se consigue calentándolas en la estufa a 160°C por más de 2 horas, y un indicador de anaerobiosis.

Hay que incubar y revisar a los 30 minutos, se debe observar agua de condensación en la jarra y no se observa vire del indicador, es necesario cambiar de sobre.

2. - Sistema generador ANAEROCULT A y P (MERCK)

Este sistema contiene polvo de hierro, tierra sílice, ácido cítrico y bicarbonato de sodio. Al adicionarse agua a la placa se forma óxido de hierro con lo que se reduce el oxígeno molecular de la atmósfera de la jarra. El bicarbonato reacciona con el ácido cítrico desprendiendo CO_2 .

Después de 60 y 90 minutos el oxígeno se reduce a 0.5 % mientras que el dióxido de carbono se incrementa, alcanzando niveles significativos.

3. - Sistema generador ANAEROGEN (OXOID)

En este sistema el ácido ascórbico absorbe oxígeno generando bióxido de carbono en concentraciones que van del 9 al 13 %. Después de un lapso de 26 y 41 minutos el oxígeno contenido en la jarra disminuye a menos de 0.5 %.

4. - Cámara anaeróbica con guantes (Globe box)

La manipulación en el interior de la cámara se efectúa por medio de guantes sellados a ella. La condición de anaerobiosis dentro de la cámara es generada por una mezcla de gases: CO₂ 5 %, H₂ 5% y N₂ 90 %. Este sistema utiliza el mismo principio que el sistema Gas Pak. Cuando se preparan los medios de cultivo fuera de ella, se pueden introducir en ésta, para que se reduzcan y estén listos al momento de la siembra.

5. - Bolsa de plástico desechable para hacer anaerobiosis (Bio-Bag Systemas Becton-Dickinson). Las bolsas son de plástico transparente e impermeable al oxígeno. Al sellar la bolsa con calor se producen las condiciones de anaerobiosis.

6.- Bolsa anaeróbica (Difco) (Anaerobic Pouch). En lugar de catalizar contiene polvo de fierro, para remover el oxígeno del aire del interior de la bolsa, formando óxido de fierro

Permite observar el crecimiento directamente a través de la bolsa, es muy útil para transportar diferentes tipos de muestras (10).

2.5 IDENTIFICACIÓN DE ANAEROBIOS MEDIANTE PRUEBAS METABÓLICAS

Las enfermedades causadas por bacterias anaerobias son complejas y generalmente la mortalidad es elevada , se menciona que en abscesos cerebrales llega a ser del 50 %, en abscesos hepáticos del 53 %, en infección pulmonar 15-20 %, gangrena gaseosa de

15-35 % . Dada la diversidad de muestras en las que podemos encontrar a las bacterias anaerobias, así como de su presencia en cuadros clínicos, es que se hace necesario tipificar o caracterizar las cepas obtenidas a partir de diferentes fuentes y así obtener información útil para estudios epidemiológico(4).

Los procedimientos que se emplean con el fin de identificar a los microorganismos anaerobios incluyen :

IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA.- Basada en la morfología colonial, tinción de Gram, prueba de la catalasa, prueba de nitratos, prueba de la urea, producción de lecitinasa, lipasa e indol.

IDENTIFICACIÓN DEFINITIVA.- Que se realiza sobre la base de las propiedades bioquímicas, usando los métodos convencionales, propuestos por Dowell y Lombard. También existen los sistemas comerciales miniaturizados como: ADINET, MicrScan, Rapid ANA II, Vitek ANI CARD, los cuales consisten en pocillos fáciles de inocular con sustratos cromogénicos, que detectan la actividad enzimática de los microorganismos. Además existe en el mercado API 20 A, Minitek y Sceptor que ponen de manifiesto la capacidad del organismo para metabolizar azúcares, principalmente.(2).

IDENTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA GAS-LÍQUIDO.- Está técnica permite la separación e identificación de compuestos volátiles con base en las características de solubilidad, ya que las bacterias anaerobias tienen la capacidad de producir metabolitos como los ácidos orgánicos y algunos alcoholes como resultado de la fermentación de la glucosa .(4,24).

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA HIBRIDACIÓN DE DNA

TIPIFICACIÓN DE CEPAS:

IDENTIFICACIÓN POR ELECTROFORESIS DE ENZIMAS MULTILOCUS

IDENTIFICACIÓN POR ROBOTIFICACIÓN

ANÁLISIS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN DEL DNA TOTAL

PERFILES DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA


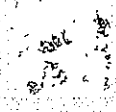



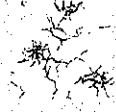

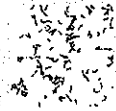
En la tabla que se presenta a continuación se puede observar una evaluación de equipos comerciales para la identificación de especies anaerobias:

EVALUACIÓN DE EQUIPOS COMERCIALES PARA IDENTIFICACIÓN DE ANAEROBIOS

SISTEMA	% Correcto s/pbas	% Correcto c/pbas	% Incorrecto/ no identi.
API 20 A	54-85	68-95	5-46
Minitek	66-76	86-93	5-14
AnIdent	90-91	88-98	2-12
RapID ANA	62-100	72-98	3-28
RapID ANA II	87	97	3
Vitek ANI	70	83	17
API 32 A	68-88	95-96	4-5
MicroScan			
Visual	70	80	20
Autoscan	66	77	23

Se asume que el estándar de oro para la identificación de anaerobios incluye la fermentación de carbohidratos y otras pruebas bioquímicas, como la producción de ciertos metabolitos (indol, ácido sulfhídrico, etc.), hidrólisis de algunos compuestos como la esclulina en combinación con el perfil de ácidos grasos producidos como producto terminal de la fermentación de la glucosa por medio de la Cromatografía gas-líquido (24).

Morfotipos

<i>Fusobacterium nucleatum</i>	
<i>Prevotella melaninogenica</i>	
<i>Bacteroides fragilis</i>	
<i>Veillonella parvula</i>	
<i>Actinomyces naeslundii</i>	
<i>Actinomyces israelii</i>	
<i>Bifidobacterium</i> ssp	
<i>Eubacterium lentum</i>	

3 FUNDAMENTO DEL TEMA

En México, son pocas las instituciones hospitalarias y de enseñanza que se dedican al estudio de las bacterias anaerobias, tanto de material clínico como de investigación.

La morbilidad y mortalidad causadas por estos microorganismos son elevadas, debido a que las enfermedades infecciosas cambian constantemente en relación directa con el desarrollo de los antimicrobianos y el uso de la quimioterapia. Actualmente, el abuso de la terapia con base en los corticosteroides y otras drogas citotóxicas alteran la flora normal del hospedero, de tal manera que estas infecciones pasan inadvertidas para el médico, o bien llega a considerar que el agente causal es cualquier otro menos un microorganismo anaerobio (4).

Con este trabajo se pretende demostrar que siguiendo una metodología apropiada, sencilla y accesible para la toma de muestra y cultivo de bacterias anaerobias, es posible recuperar estos microorganismos para su consiguiente identificación. Lo que nos permitirá incluir en la práctica bacteriológica la búsqueda intencionada en aquellos productos en los que el hallazgo de bacterias anaerobias definan el tratamiento de elección.

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿ En el aislamiento e identificación de bacterias anaerobias influyen significativamente el tipo de técnica de muestreo, los medios de cultivo seleccionados, la metodología de aislamiento, el sistema utilizado para su identificación y la experiencia del operador ?

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar las bacterias anaerobias de muestras odontológicas, obtenidas por extracción dentaria, mediante el uso de medios enriquecidos (gelosa sangre hemina menadiona y gelosa sangre hemolizada) para su recuperación y el sistema API 20 A para identificarlos .

5.2 OBJETIVO PARTICULAR

Con los resultados obtenidos comprobar si la metodología aplicada es eficaz para el aislamiento e identificación de bacterias anaerobias.

6 HIPÓTESIS

Considerando que las bacterias anaerobias son microorganismos muy exigentes y de lento crecimiento es posible que la técnica de muestreo, los medios de cultivo utilizados, así como, el sistema de identificación tengan una influencia significativa en el número de cultivos positivos, en el número y diversidad de cepas aisladas por muestra.

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿ En el aislamiento e identificación de bacterias anaerobias influyen significativamente el tipo de técnica de muestreo, los medios de cultivo seleccionados, la metodología de aislamiento, el sistema utilizado para su identificación y la experiencia del operador ?

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar las bacterias anaerobias de muestras odontológicas, obtenidas por extracción dentaria, mediante el uso de medios enriquecidos (gelosa sangre hemina menadiona y gelosa sangre hemolizada) para su recuperación y el sistema API 20 A para identificarlos .

5.2 OBJETIVO PARTICULAR

Con los resultados obtenidos comprobar si la metodología aplicada es eficaz para el aislamiento e identificación de bacterias anaerobias.

6 HIPÓTESIS

Considerando que las bacterias anaerobias son microorganismos muy exigentes y de lento crecimiento es posible que la técnica de muestreo, los medios de cultivo utilizados, así como, el sistema de identificación tengan una influencia significativa en el número de cultivos positivos, en el número y diversidad de cepas aisladas por muestra.

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿ En el aislamiento e identificación de bacterias anaerobias influyen significativamente el tipo de técnica de muestreo, los medios de cultivo seleccionados, la metodología de aislamiento, el sistema utilizado para su identificación y la experiencia del operador ?

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar las bacterias anaerobias de muestras odontológicas, obtenidas por extracción dentaria, mediante el uso de medios enriquecidos (gelosa sangre hemina menadiona y gelosa sangre hemolizada) para su recuperación y el sistema API 20 A para identificarlos .

5.2 OBJETIVO PARTICULAR

Con los resultados obtenidos comprobar si la metodología aplicada es eficaz para el aislamiento e identificación de bacterias anaerobias.

6 HIPÓTESIS

Considerando que las bacterias anaerobias son microorganismos muy exigentes y de lento crecimiento es posible que la técnica de muestreo, los medios de cultivo utilizados, así como, el sistema de identificación tengan una influencia significativa en el número de cultivos positivos, en el número y diversidad de cepas aisladas por muestra.

7 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

7.1 TIPO DE ESTUDIO

PROSPECTIVO, TRANSVERSAL, OBSERVACIONAL

7.2 POBLACIÓN

27 PACIENTES PEDIÁTRICOS, DE CONSULTA EXTERNA, ENTRE 3 Y 12 AÑOS

7.3 VARIABLES

VARIABLES INDEPENDIENTES

Medios de transporte

Medios de cultivo

Sistema generador de anaerobiosis

Sistema para la identificación de cepas

VARIABLES DEPENDIENTES

Número de cepas por muestra

Número total de géneros y especies aisladas

Número total de muestras sin aislamiento de bacterias anaerobias

7.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Niños entre 3 y 12 años de edad

Con derecho a servicio en el Departamento de Estomatología del Hospital Infantil de México “ Dr. Federico Gómez “

No hospitalizados

De ambos sexos

Cualquier nivel socioeconómico

Que acepten participar en el estudio

CRITERIOS DE NO-INCLUSIÓN

Niños menores de 3 años y mayores de 12 años

Sin derecho al servicio

Que no acepten participar en el estudio

Que asistan sábados y domingos a demandar consulta

7.5 METODOLOGÍA

Se estudiaron un total de 30 muestras que corresponden a 27 niños, cuya edad oscila entre los 3 y 12 años, a los cuales la valoración odontológica determinó la extracción de una o más piezas dentarias por la presencia de un absceso, por caries de lesión avanzada, o bien la extracción de dientes sanos por pérdida natural. Las muestras se obtuvieron de la base de la pieza extraída haciendo uso de una jeringa, depositándolas inmediatamente en cajas de Gelosa Sangre Hemina Menadiona (GSHM), Gelosa Sangre Hemolizada (GSH) y caldo Tioglicolato de Brewer; también se hizo un frotis directo. Después de estriar se procedió, sin pérdida de tiempo, a introducir las en una jarra de anaerobiosis, usando como sistema generador de anaerobiosis el Anaerocult (Merck) y una tira indicadora de disminución de oxígeno Anaerotest, dejando incubar a 37 °C de 48 a 72 hrs.

Después de la incubación se inspeccionaron los medios, se anotó la morfología colonial, evitando la exposición de las cajas al medio ambiente por mucho tiempo; una vez concluido lo anterior, se transfirieron las colonias aisladas a cajas de gelosa sangre (GS) y GSHM, previamente divididas en cuadros, identificando cada colonia con un número progresivo. Ambas cajas se incubaron a 37 °C por 48 hrs. , la primera en aerobiosis y la segunda en anaerobiosis. Los tubos de tioglicolato se sembraron en GSH y GSHM, se incubaron a 37 °C por 48 hrs., para después aplicar el procedimiento anterior. Las cajas divididas en cuadros se revisaron, se descartaron aquellas colonias que crecieron en ambos ambientes, seleccionando sólo aquellas que crecieron en anaerobiosis, se sembró estriando para aislar en medias cajas de GS y GSHM, con el fin de purificar la cepa de cualquier contaminante, verificando con un frotis. Se utilizó el sistema API- 20 A (bioMérieux) para identificar los anaerobios obligados, haciendo uso de cepas de Referencia, con la finalidad de verificar la calidad de las galerías.

7.6 MATERIAL

Cajas de Petri 9 cm de diámetro

Matraz aforado 100 ml

Tubos de vidrio con tapón de rosca

Portaobjetos

Pipetas Pasteur

Lupa

Frascos color ámbar

Jarra Gas-Pak

Espátula

Gradilla

Lámpara de alcohol

Asa de siembra bacteriológica

Guantes desechables

Jeringa desechable de 1ml Plastipack B-D

EQUIPO

Microscopio Zeiss

Refrigerador Ojeda

Congelador de - 70 C REVCO

Congelador de - 20 C American

Autoclave Interamericana de Equipos S.A. de C.V.

Agitador Vortex

Balanza Granataria Ohaus Uniomm J. USA

Balanza Analítica Libror AEX-200B

Mechero de Bunsen

Computadora Hewlett Packard

Estufa incubadora 36-37 °C

REACTIVOS

Tiras generadoras de anaerobiosis Anaerocult A (Merck)

Tiras indicadoras de anaerobiosis Anaerotest (Merck)

Sistema de identificación de bacterias anaerobias API 20 A (bioMérieux)

Peróxido de hidrógeno 3 %

Reactivo de Kovacs

Púrpura de bromocresol

Xilol

Aceite mineral

Hidróxido de Sodio

Hemina

Vitamina K (Konakion -Lab.. Roche)

Agar Soya Trypticaseína

Caldo tioglicolato

Cristal violeta

Safranina

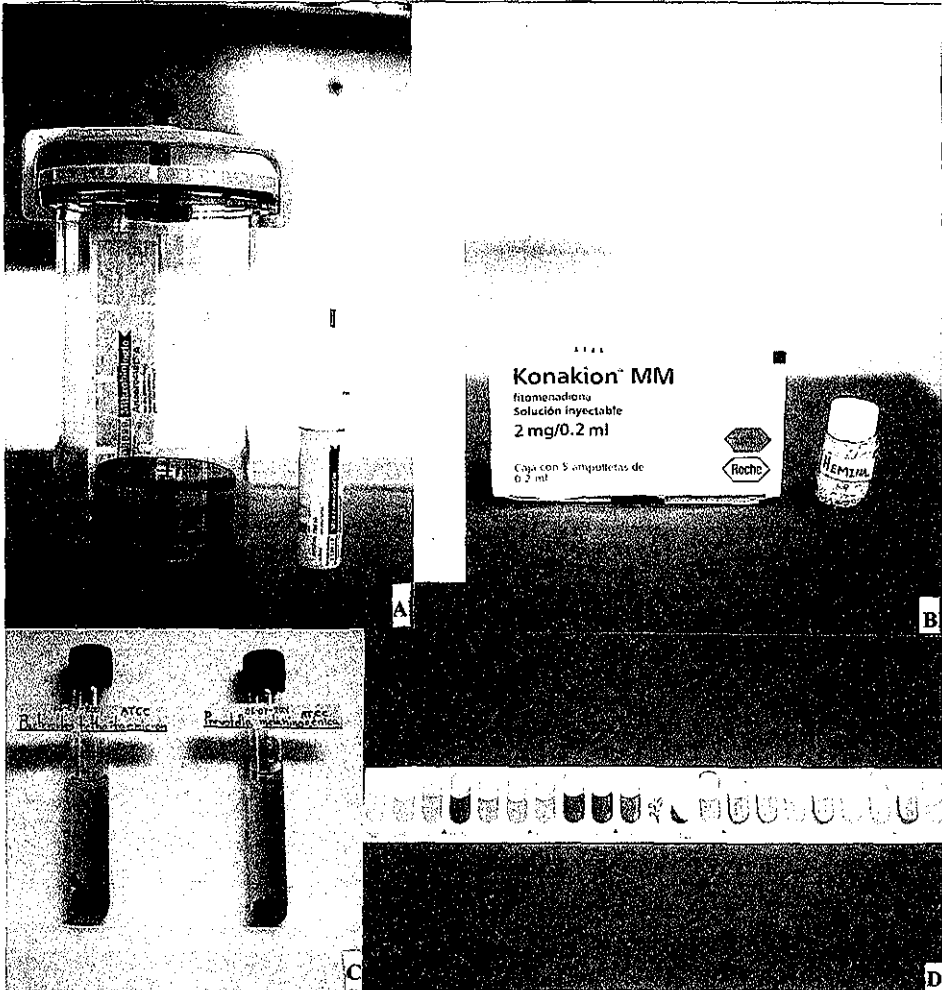
Alcohol acetona

Lugol

Cepa de Referencia *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 8483

Cepa *Prevotella melaninogenicus*

ATCC .- American Type Culture Collection



A) JARRA DE ANAEROBIOISIS CON ANAEROCULT Y ANAEROTEST, B) AMPOLLETAS DE KONAKION C) CEPAS DE REFERENCIA D) GALERIA DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE SISTEMA API 20 A.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

7.7 TÉCNICAS

EXAMEN MICROSCÓPICO DE LA MUESTRA

Se debe proporcionar un informe preliminar con el examen microscópico de un frotis directo teñido por Gram que puede tener algunas de las siguientes características.

- a) Bacilos Gram positivos grandes, gruesos, en un fondo necrótico con pocos o ningún leucocito en un paciente con sospecha de gangrena gaseosa. Muy probablemente se trate de *Clostridium perfringens* (Es muy raro observar esporas en cultivo primario o en frotis directo)
 - b) Bacilos Gram negativos pálido, irregularmente teñidos, pleomórficos o con tinción polar: Posiblemente se trate de algún microorganismo del género Bacteroides, una Enterobacteria o un no fermentador de glucosa.
 - c) Bacilos Gram negativos pálidos, filamentosos, muy delgados, con puntas finas: Probablemente estemos observando *Fusobacterium nucleatum*.
 - d) Grupos o cadenas de cocos Gram positivos en un exudado obtenido de una herida intrabdominal con presencia de numerosos neutrófilos: Posiblemente *Streptococcus*, *Staphylococcus* o *Peptostreptococcus*.
 - e) Bacilos filamentosos muy aglomerados obtenidos de un granulo de azufre en una lesión cervicofacial. Tal vez estemos observando un *Actinomyces*.
- En este informe preliminar sólo se reportara el morfotipo.

TÉCNICA DE IDENTIFICACIÓN POR MEDIO DEL SISTEMA API 20 A

Abrir la ampollita de medio API 20 A

Con un hisopo retirar todas las colonias contenidas en la caja de agar sangre en anaerobiosis. Verificar la pureza de la cepa (realizando un subcultivo)

Mantener la ampollita verticalmente y suspender los gérmenes frotando el hisopo mediante rotación contra la pared de la ampollita manteniéndose siempre en el medio

de suspensión. La turbidez final debe ser superior o igual a la del patrón 3 de McFarland. Las bacterias de crecimiento lento pueden requerir varias placas de subcultivo para obtener un inóculo de la densidad requerida.

Para mantener cierta anaerobiosis, conviene evitar la introducción de aire en el medio durante la homogenización

Con ayuda de una pipeta estéril, inocular la galería con medio sembrado API 20 A evitando la formación de burbujas e inclinando levemente la galería.

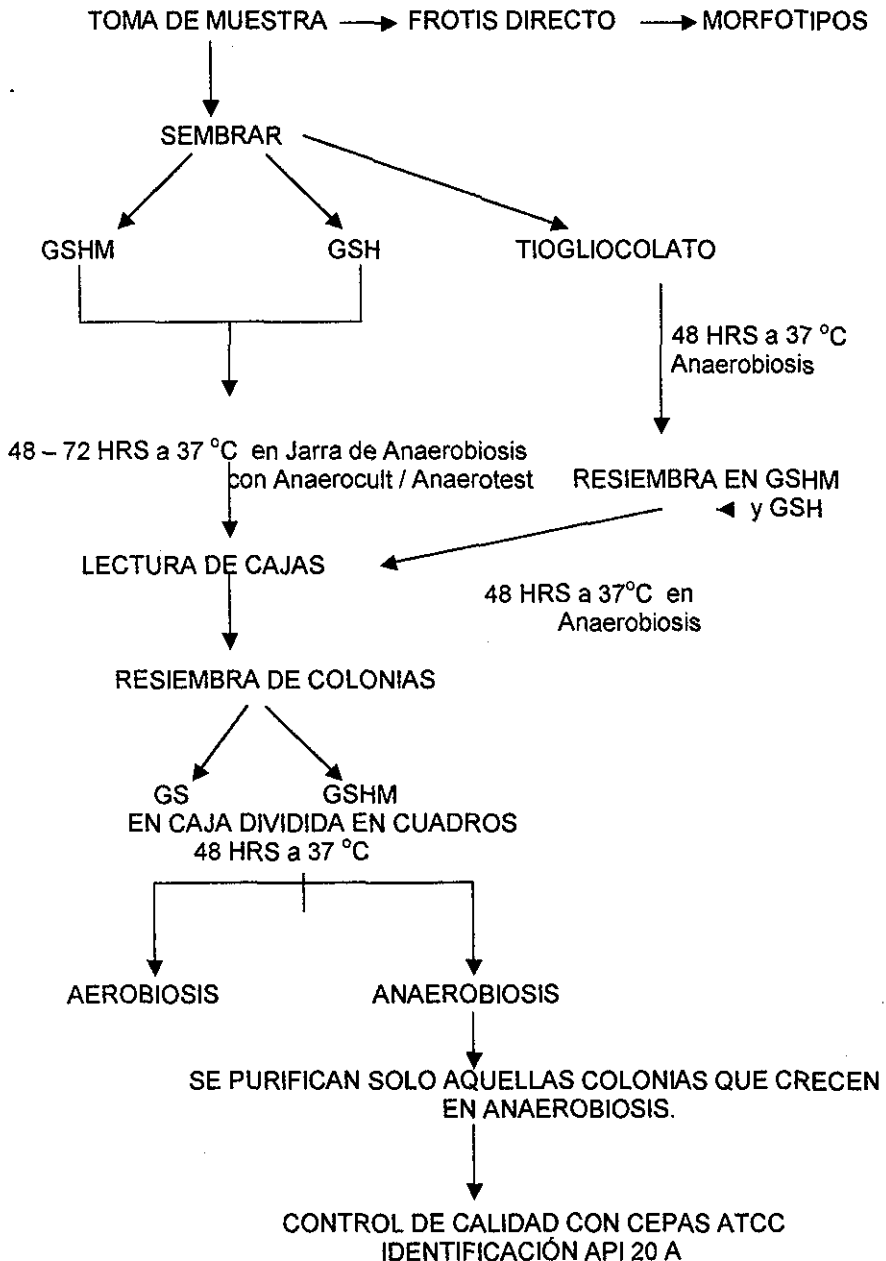
Para la prueba de gelatina (licuación de la gelatina) llenar tubo y cúpula.

Para la prueba del indol llenar sólo el tubo de medio API 20 A y llenar la cúpula con aceite mineral para evitar la evaporación del indol.

Cerrar la cámara de incubación e incubar 24 horas a 37 C.

Hacer la lectura de las bioquímicas como indica el instructivo

7.8 DIAGRAMA DE FLUJO



8 RESULTADOS

De las 30 muestras estudiadas, 18 correspondieron a extracción por absceso, 9 a extracción por caries y 3 a extracción fisiológica. Del total de muestras trabajadas se aislaron 14 diferentes bacterias, observándose predominio en los aislamientos de las bacterias Gram negativas, entre los que destacan por su frecuencia: *Prevotella spp*, 19 cepas; *Veillonella parvula*, 12 cepas; *Bacteroides fragilis*, 1 cepa; *Fusobacterium spp*, 3 cepas. Entre los bacilos Gram positivos se identificaron los siguientes: *Bifidobacterium spp*, 7 cepas; *Actinomyces naeslundii*, 3 cepas; *Actinomyces israelii*, 2 cepa; además *Lactobacillus fermentum* y *Eubacterium lentum*, 1 cepa de cada uno; también se obtuvieron aislamientos de los cocos-Gram positivos: *Streptococcus intermedius* y *Gemella morbillorum*.

Cabe mencionar, que el número total de cepas que se aislaron e identificaron fueron 51, lo que representa 1.9 cepas de bacterias anaerobias por muestra. Además, dado que de una sola muestra no se pudieron aislar anaerobios, el porcentaje de muestras con crecimiento positivo a anaerobios fue de 96.6 %.

De los 29 cultivos positivos a bacterias anaerobias, de 12 se aisló una cepa solamente, mientras que los 17 restantes se aislaron 2 y 3 cepas diferentes.

BACTERIAS ANAEROBIAS AISLADAS	EXTRACCIÓN DENTAL POR ABSCESO	EXTRACCIÓN DENTAL POR CARIES	EXTRACCIÓN DENTAL FISIOLÓGICA
<i>Prevotella oris / buccae</i>	2	2	0
<i>Bifidobacterium spp</i>	4	3	0
<i>Bacteroides fragilis</i>	1	0	0
<i>Prevotella intermedia / disiens</i>	5	0	1
<i>Actinomyces naeslundii</i>	1	2	0
<i>Lactobacillus fermentum</i>	1	0	0
<i>Fusobacterium varium</i>	1	1	0
<i>Eubacterium lentum</i>	1	0	0
<i>Veillonella parvula</i>	6	4	2
<i>Actinomyces israelii</i>	1	1	0
<i>Prevotella melaninogenicus / oralis</i>	2	5	2
<i>Fusobacterium necrophorum / nucleatum</i>	1	0	0
<i>Gemella morbillorum</i>	0	0	1
<i>Streptococcus intermedius</i>	0	0	1
No se aislaron bacterias	1	0	0
Total	26	18	7

Cuadro N. 1 Frecuencia de las diferentes especies en cada tipo de muestra

**CUADRO No. 2
MICROORGANISMOS ANAEROBIOS OBLIGADOS
AISLADOS DE DIFERENTES TIPOS DE MUESTRAS**

TIPO DE MUESTRA	NÚMERO DE CULTIVOS POSITIVOS A ANAEROBIOS	NÚMERO DE CULTIVOS SIN AISLAMIENTO DE ANEROBIOS	PROMEDIO DE CEPAS DE ANAEROBIOS POR MUESTRAS POSITIVAS	NÚMERO DE DIFERENTES ESPECIES POR MUESTRA POSITIVA
EXTRACCIÓN DENTARIA POR ABSCESO	17	1	1.38	12
EXTRACCIÓN DENTARIA POR CARIES	9	0	2.25	7
EXTRACCIÓN DENTARIA FISIOLÓGICA	3	0	2.30	5

CUADRO No. 3
GRAM Y MORFOTIPOS DE LOS
MICROORGANISMOS AISLADOS EN TRES
DIFERENTES TIPOS DE MUESTRAS

TIPO DE MUESTRA	COCO GRAM (+)	COCO GRAM (-)	BACILO GRAM (+)	BACILO GRAM (-)
EXTRACCIÓN DENTARIA POR ABSCESO	0	6	8	12
EXTRACCIÓN DENTARIA POR CARIES	0	4	6	8
EXTRACCIÓN DENTARIA FISIOLÓGICA	2	2	0	3
TOTAL	2 (4%)	12(23%)	14(27%)	23(45%)

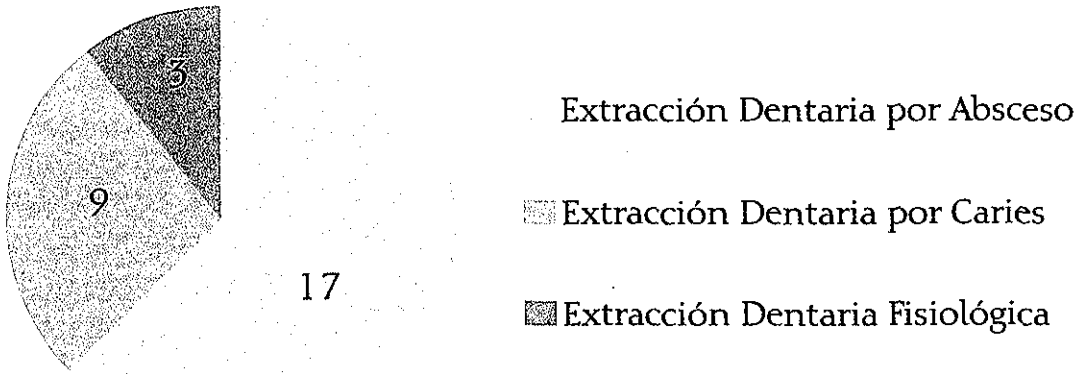


Fig. N.1 Número de cultivos positivos a anaerobios

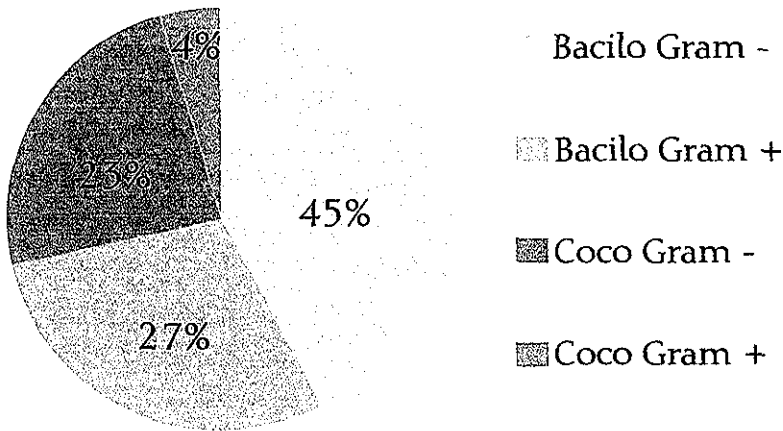


Fig. N.2 Gram y morfotipos de los microorganismos aislados en tres diferentes tipos de muestras

9 DISCUSIÓN

Como señala Jansen *et al*, los bacilos Gram negativos son los principales patógenos aislados en abscesos dentoalveolares agudos. (20,25) En este trabajo destaca la prevalencia de *Prevotella sp*, a diferencia de lo reportado por Chaudry *et al* quienes aislaron predominantemente especies de *Bacteroides* en un estudio de flora anaeróbica en infecciones endodónticas (18), lo anterior coincide con lo reportado por Tabaqchali (21) quién precisa haber aislado *Bacteroides endontalis* de abscesos periapicales de origen endodóntal.

De la cuadro No. 1 llama la atención el hecho de que de las 30 muestras investigadas en ninguna se aislaron *Peptoestreptococcus*, *Peptococcus*, *Propionibacterium* ni *Porphyromona*, no obstante que algunos reportes señalan, a estos géneros, como bacterias anaerobias presentes en el caso de abscesos orales. No descartamos la posibilidad de que estos pacientes hayan sido tratados con antibióticos antes de tomar la muestra, o bien al lento crecimiento de estas bacterias.

Como se observa en la cuadro 2 el promedio de cepas aisladas por muestra, 1.9, lo cual no coincide con lo reportado por Kolokotronis, probablemente debido a que él trabajó con absceso dentoalveolares cerrados, obteniendo por tal motivo una muestra más purificada.

En cuanto a la muestra de la cual no se aislaron bacterias anaerobias se justifica en virtud de que al paciente se le administró una dosis de antimicrobianos de protección debido a su diagnóstico, Leucemia linfocítica aguda.

El aislamiento e identificación de 51 cepas constituye más del 50 % del promedio de aislamientos realizados por Kolokotronis (19), ya que él trabajó con el mismo número de muestras, aislando un total de 83 microorganismos anaerobios, cabe reiterar que esta investigación se realizó en abscesos dentoalveolares cerrados.

Por otro lado, el rendimiento de cultivos positivos, 96.6 % supera lo reportado por Chaudry R (17) quien trabajó con pulpas necróticas y de un total de 56 muestras, 49

resultaron positivas; aislando 21 bacterias anaerobias. Mientras que en el presente trabajo de un total de 29 muestras positivas se aislaron 51 cepas de bacterias anaerobias.

Para aquellos investigadores dedicados a la búsqueda de anaerobios es muy importante obtener el promedio de especies por cultivo positivo, tal es el caso de Ito et al quienes en un estudio realizado en casos de otitis media crónica, sinusitis crónica y mucopiocele paranasal encontraron un promedio de 3.1, 3.8 y 4.2 especies por cultivo positivo, respectivamente, incluidos en este promedio bacterias aerobias y anaerobias. (16).

Se puede afirmar que la mayoría de los géneros recuperados forman parte de la flora indígena de cavidad oral, sin embargo resalta el caso de *Bacteroides fragilis* un anaerobio obligado que posee atributos patogénicos especiales, probablemente debido a su cápsula antifagocítica, este microorganismo está involucrado de manera importante en las infecciones de tejidos profundos. Pacientes con enfermedades como la diabetes o padecimientos malignos que son tratados con corticosteroides o con antibióticos no eficaces para tratar anaerobios, tienden a desarrollar bacteremia. Otro caso sobresaliente es el del género *Fusobacterium sp* especialmente *F.nucleatum* que se ha encontrado comúnmente asociado con infecciones severas.

Además de estos, el género *Actinomyces*, preponderantemente la especie *A. israelii* está implicada en la actinomicosis cervicofacial y tumores del maxilar. *A. naeslundii* tiene un papel muy importante en las caries de raíces dentales y en enfermedad periodontal junto con *A. viscosus* se recupera generalmente de infecciones mixtas.

10 CONCLUSIONES

El aislamiento e identificación de 51 cepas, así como la diversidad de especies y géneros, evidente en el cuadro No. 1, pone de manifiesto que la metodología aplicada en este trabajo es eficaz y susceptible de perfeccionar.

De haber trabajado con abscesos cerrados los morfotipos hallados en el frotis de la muestra comparados con los morfotipos de los anaerobios aislados reflejaría, si la metodología utilizada nos esta permitiendo aislar a todos los microorganismos involucrados.

Sería recomendable trabajar con abscesos dentoalveolares cerrados para evitar la contaminación con flora indígena, que muy probablemente pudiera haber enmascarado los hallazgos de otros géneros y especies de microorganismos anaerobios, tal es como los cocos Gram positivos que únicamente pudimos aislar de extracción dentaria fisiológica.

La recuperación de bacterias anaerobias en el 96.6 5 de las muestras nos permite decir que el uso de medios enriquecidos como la GSHM (gelosa sangre hemina menadiona) y la GSH (gelosa sangre hemolizada) usados en condiciones óptimas (frescos y prerreducidos) favorecería la recuperación de estos microorganismos de muestras clínicas. En algunos laboratorios dada la poca frecuencia con la que el médico solicita la búsqueda de anaerobios, es común observar que se utiliza el medio de Gelosa sangre sin hemina y menadiona en condiciones poco óptimas, probablemente está sea la causa de mínimos hallazgos en muestras sospechosas.

Es primordial tener presente que en la práctica clínica todos los microorganismos tanto aerobios como anaerobios, así como, hongos y micobacterias deben investigarse en muestras donde se solicite la búsqueda de anaerobios. En este trabajo no se realizó la investigación completa ya que el objetivo que nos propusimos alcanzar fue el proponer un método accesible de investigación clínica de anaerobios, más que hacer un estudio estadístico de carácter etiológico.

Tomando en cuenta que la patogenicidad de los anaerobios obligados se ve aumentada (sinergismo) en presencia de bacterias aerobias sería conveniente en la continuidad de este trabajo se investigue qué bacterias aerobias se encuentran presentes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

11 BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Koneman EW, SD Allen, WM Janda, PC Schreckenberger & WC Winn Jr. 1992. *Dianostic Microbiology Color Atlas* 4 th ed . JB Lippincott Co Philadelphia.
- 2.- Engelkirk PG & JD Engelkirl. 1992. *Principles and Practice of Clinical Anaerobic Bacteriology*. Star Publishing Company California.
- 3.- García Ramos E. 2001. *Diagnóstico de infecciones por anaerobios* E.N.C.B. I.P.N. México D.F.
- 4.- Castro -Escarpulli G & Giono Cerezo. 1999. *Infecciones por bacterias anaerobias no esporuladas* p. 501-512 en Lugo De La Fuente. *Bacteriología Médica*. Ediciones Cuellar. México D.F.
- 5.- Marcantoni M. 1999. *Ecología de la cavidad bucal* p 189-217 en Negroni Marta . *Microbiología Estomatológica*. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires Argentina.
- 6.- Hannele RJS, PH Summanen & SM Finegold. 1999. *Bacteroides, Porphyromonas, Prevotella, Fusobacterium, and other noaerobic Gram- Negative Rods and Cocc*. P 670-709. In: Murray, EJO Baron, MA Pfaller, FC Tenover & RH Yorcken (Eds) *Manual of Clinical Microbiology*, 7th. ASM press, Washington.
- 7.- Holdeman LV, JH Johnson & WEC Moore. 1984. *Anaerobic Gram-negative Straight, Curved and Helical Rods*, p602-639. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacterily*. Vol. 1. Krieg, R.N. (ed). The Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA.
- 8.- Schaal KP. 1986. Genus *Actinomyces*. p 1383- 1410. In: *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology*. Vol. 2. P.H. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe & J.H. Holt (ed).The Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA.

- 12.- Botta GA, A. Arzese, R. Minisini & G. Trani. 1994. Role of structural and extracellular virulence factors in Gram-negative anaerobic bacteria. *Clin. Infect Dis.* 18: S 260 – S 264.
- 13.- Newman MG. 1984. Anaerobic oral & dental infection. *Rev- Infect. Dis.* 6: S107-S114.
- 14.- Tanner A & N. Stillman. 1993. Oral and dental infections with anaerobic bacteria: clinical features, predominant pathogens, and treatment. *Clin.Infect. Dis.* 16: S 304- S 309.
- 15.- Heimdahl A., L. von Konow, T. Satoh & CE Nord. 1985. Clinical appearance of orofacial infections of odontogenic origin in relation to microbiological findings. *J.Clin. Microbiol.* 22: 299-302.
- 16.- Ito, K., K. Mizuta, H. Ogawa, T. Suzuki, H. Miyata, N. Kato, K. Watanabe & K. Ueno.1995. Bacteriology of chronic otitis media, chronic sinusitis, and paranasal mucopyocele in Japan. *Clin. Infect. Dis.* 20: S214-S219.
- 17.- Chaudhry R., N. Kalra, V. Talwar & R. Thakur. 1997. Anaerobic flora in endodontic infections. *Indian J. Med. Res.* 105: 262-265.
- 18.- Downes J., B. Olsvik, SJ. Hiom , DA. Spratt, SL. Cheeseman, I. Olsen & AJ. Guy's.2000. *Bulleidia extracta* gen. Nov., sp. Nov., isolated from the oral cavity. *Int. J. Sist.. Evol. Microbiol.* 50PT; 979-983.
- 19.- Kolokotronis A. 1999. Beta- lactamases producing anaerobic bacteria in dentoalveolar abscesses. *J. Oral. Sci.* 41: 187-190.

- 20.- Jansen HJ., JS. Von der Hoeven, S. Walji, JH. Goertz & JA. Bakkeren. 1996. The importance of immunoglobulin – breakdown supporting the growth of bacteria in oral abscesses. *J. Clin. Periodontol.* 23; 717-723.
- 21.- Phillips, I. 1990. New methods for identification of obligate anaerobes . *Rev. Inf. Dis.* 12; S127-S132.
- 22.- Tabaqchali S. 1988. Anaerobic infections in the head and neck region. *Scand. J. Infect. Dis* ; 57 ; 24-34.
- 23.- Debelian GJ., I. Olsen & L. Tronstad. 1994. Systemic diseases caused by oral microorganisms. *Endod. Dent. Traumatol.* 10; 57-65.
- 24.- Rodloff AC, PC. Appelbaum, & Zabransky RJ.1991. *Practical Anaerobic Bacteriology*. 5 th . Ed. American Society for Microbiology. Washington D.C.
- 25.- Lewis A, TW. MacFarlane, DA. McGowan & DG. McDonald.1988. Assesment of the pathogenicity of bacterial species isolated from acute dentoalveolar abscesses. *J. Med. Microbiol* 27; 109-116.
- 26.- Hiller SL & BJ Monclab.1995. *Peptostreptococcus, Propionibacterium, Eubacterium* and other nonsporeforming anaerobic Gram positive bacteria. P587-640 in. Murray, EJO Baron, MA Pfaller, FC Tenover & RH Yorken (Eds) *Manual of Clinical Microbiology*, 6 th ASM press, Washington.

ANEXO

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

GELOSA SANGRE HEMINA MENADIONA (GSHM) (3)

1.- Base. Preparar en la forma usual según marbete 100 mL de gelosa de soya tripticaseína, o gelosa brucella, o gelosa cerebro corazón, o gelosa Schaedler o gelosa Anaeróbico.

2.- Añadir 0.5 g de extracto de levadura

3.- Ajustar el pH a 7.3 – 7.5

4.- Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos

5.- Enfriar a 50 °C

6.- Agregar sangre de carnero o conejo desfibrinada a una concentración final de 5 %

7.- Añadir 1 mL de solución de trabajo de hemina menadiona

8.- Mezclar

9.- Vaciar en cajas.

Solución de trabajo hemina menadiona

Solución madre de hemina

- Disolver 50 mg de hemina en 1 ml de Na OH 1 N
- Añadir 100 ml de agua destilada
- Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos

Solución madre de Vitamina K*

- Disolver 100 mg de Vitamina K en 20 ml de alcohol etílico 96°
- Esterilizar por filtración

Solución de trabajo

- Añadir 1 ml de solución madre de Vitamina K a 100 ml de la solución madre de hemina
- Guardar en frasco oscuro durante 6 meses como máximo

* Se puede utilizar 3 fitomenadiona en este caso se debe preparar una solución alcohólica que consiste en:

3 fitilmenadiona	1 g
Alcohol etílico absoluto	99 ml

La ventaja de utilizar la 3 fitilmenadiona, es que ésta y la hemina se pueden agregar al medio de cultivo base antes de ajustar el pH, y de esterilizar, sin necesidad de preparar la solución de trabajo, las cantidades que se deben agregar por cada litro de medio son:

Hemina 5.0 mg, ésta se debe disolver en 5 ml de NaOH 1 N y de 3 fitilmenadiona 10 mg, Esta cantidad se obtiene agregando 1 ml de la solución alcohólica de la menadiona al medio base.

GELOSA SANGRE HEMOLISADA (3)

- 1) Utilizar la base de la gelosa sangre, preparar según marbete
- 2) Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos
- 3) Enfriar a 50 °C

4) Agregar sangre de carnero hemolisada.

Para hemolizar la sangre se hace lo siguiente :

Congelar la sangre durante 18 hrs.

Descongelar bruscamante

Agregar la cantidad requerida al medio base gelosa sangre para obtener una concentración final de 5%

Mezclar

Vaciar en cajas

MEDIO DE TIOGLICOLATO (10)

Se prepara según indicaciones del fabricante.

Por cada 1000 ml de medio añadir 2 g. De extracto de levadura y distribuir 12 ml en tubos de 16 x 125 mm con tapón de rosca.

Esterilizar 121 °C por 15 minutos . Dejar enfriar

Añadir a cada tubo 0.12 ml de solución de trabajo hemina-menadiona por cada 12 ml de medio.

Incubar 24 horas para control de esterilidad antes de usar .

Antes de inocular hervir los tubos en baño María por 10 minutos y usar en un lapso de 4 horas. Si no se emplean descarta

CAMBIOS TAXONÓMICOS Y ADICIONES DE BACILOS ANAEROBIOS GRAM NEGATIVO

Designación anterior	Nueva taxonomía
<i>B. fragilis</i> grupo	<i>B fragilis</i> , <i>B distasonis</i> , <i>B eggerthii</i> , <i>B ovatus</i> , <i>B thetaiotaomicron</i> , <i>B uniformis</i> , <i>B vulgatus</i> , Nueva adición : <i>B caccae</i> , <i>B merdae</i> , <i>B stercoris</i> .
Otros <i>Bacteroides</i> spp	<i>B capillosus</i> , <i>B coagulans</i> , <i>B gracilis</i> , <i>B levii</i> , <i>B macacae</i> , <i>B pneumosintes</i> , <i>B putredinis</i> , <i>B salivosus</i> , <i>B splanchnicus</i> , <i>B ureolyticus</i> .
Grupos <i>B melaninogenicus</i> - <i>B asaccharolyticus</i> - <i>B oralis</i>	<i>Prevotella melaninogénica</i> , <i>P vivía</i> , <i>P buccae</i> , <i>P buccalis</i> , <i>P corporis</i> , <i>P denticola</i> , <i>P disiens</i> , <i>P heparinolytica</i> , <i>P intermedia</i> , <i>P loescheii</i> , <i>P oralis</i> , <i>P oris</i> , <i>P oulora</i> , <i>P ruminicola</i> , <i>P veroralis</i> , <i>P zoogloformans</i> . <i>Porphyromonas asaccharolytica</i> , <i>P endodontalis</i> , <i>P gingivalis</i> .
<i>Bacteroides</i> 3452A <i>B amylophilus</i>	<i>Bacteroides caccae</i> <i>Ruminobacter amylophilus</i>
<i>B furcosus</i>	<i>Anaerorhabdus furcosus</i>
<i>B hypermegas</i>	<i>Megamonas hypermegas</i>
<i>B microfusis</i>	<i>Rikinella microfosus</i>
<i>B multiacidus</i>	<i>Mitsuokella multiacida</i>
<i>B praeacutus</i>	<i>Tissierella praeacuta</i>
<i>B succinogenes</i>	<i>Fibrobacter succinogenes</i>
<i>B termitidis</i>	<i>Sebaldella termitidis</i>
Nuevos <i>Bacteroides</i> spp	<i>B forsythus</i> , <i>B galacturonicus</i> , <i>B pectinophilus</i> , <i>B salivosus</i> , <i>B stercoris</i> , <i>B tectum</i>
Nuevos <i>Fusobacterium</i> spp	<i>Fusobacterium aloicis</i> , <i>F sulci</i> , <i>F ulcerans</i>

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

ALGUNOS CRITERIOS CARDINALES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ANAEROBIOS

SENSIBILIDAD AL OXÍGENO

CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS

SWARMING

PRODUCCIÓN DE PIGMENTO

HEMOLISIS

MARCAS EN EL MEDIO

MOVILIDAD

TINCIÓN DE GRAM

MORFOLOGÍA

FLAGELOS

MISCELANEA:

Crecimiento en caldo tioglicolato

Producción de catalasa

Reacciones en medio de leche líquido y sólido

Producción de indol

Hidrólisis de almidón, esculina y gelatina

Reducción de nitratos

Fermentación de carbohidratos claves: glucosa, manitol, lactosa y ramnosa

Crecimiento en presencia de: bilis, penicilina, rifampicina y kanamicina

Inhibición por polienetosulfonato de sodio

Productos metabólicos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MÉTODOS RÁPIDOS PARA LA IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE ANAEROBIOS

MÉTODO	PROPÓSITO
Susceptibilidad a los antimicrobianos de potencia especial (kanamicina, 1mg,; vancomicina, 5 ug,; colisistina, 10 ug,; rifampicina, 15 ug,; penicilina, 2 U)	Preliminar diferenciación entre bacilos gram negativos y Gram positivos no formadores de espora; diferenciación entre <i>Bacteroides spp</i> y Fusobacterias
Susceptibilidad a fosfomicina (200 – 500 ug/ml)	Diferenciación entre <i>Bacteroides spp</i> (sensible) y Fusobacteria (resistente)
Fermentación de glucosa –1-fosfato	Examen para especies de Bacteroides fermentativas
Discos de bilis y kanamicina	Preliminar identificación del grupo <i>B fragilis</i>
Fluorescencia con luz ultravioleta	Preliminar diferenciación entre <i>Prevotella pigmentada</i> y <i>Porphyromonas spp</i>
Carencia de b-glucosidasa constitutiva (esculinasa)	Típico de <i>Fusobacteria</i> , <i>Bacteroides</i> y <i>Prevotella spp</i> poseen la enzima
Crecimiento en medio que contiene bilis; catalasa y ureasa positivas	Identificación presuntiva de <i>Bilophila wadsworthia</i>
Fluorescencia roja bajo luz ultravioleta	Identificación preliminar de <i>Veillonella spp.</i>
Prueba de disco con polienetolsulfonato	Identificación preliminar de <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> (resistente)
Crecimiento típico en agar yema de huevo	Clostridia
Prueba rápida de lipasa	Clostridia
Hemólisis sinérgica en agar sangre	Diferenciación entre <i>C perfringes</i> , <i>C bifermentans</i> , <i>sordellii</i> , <i>paraperfringens</i> .
Prueba rápida de descarboxilación de ác. Glutámico	Identificación preliminar del grupo <i>B. fragilis</i> , <i>Clostridia</i> y <i>E. lentum</i>

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BACTERIAS ANAEROBIAS DE CAVIDAD ORAL DE PACIENTES PEDIÁTRICOS trabajo preliminar

Arreola Cortés Blasco V., Adán Pérez Gómez*, Valdez Tapia Juárez**, Edo García Camacho*** Hospital Infantil de México Dr. Federico Gómez****, Escuela Nacional de Estudios Superiores, I.P.S. Ciro de Huerfano*****, Dirección de COEIA

INTRODUCCIÓN:

Las bacterias anaerobias ocupan un papel muy importante dentro de la flora indígena y patógena oral y dental. Las poblaciones microbianas que tienen el poder de colonizar son la principal fuente de patógenos responsables de infecciones, incluidas enfermedades periodontales, gingivitis, pericoronaritis, endodontitis, etc. En México la práctica microbiológica se reduce a la búsqueda de microorganismos aerobios. La bacteriología anaerobia es muy escasa o nula; se aduce como causa la falta de material, el costo y en algunos casos se acepta la inexperiencia. Hoy en día es imperativo que se den a conocer procedimientos simples y asequibles que puedan aplicarse en cualquier laboratorio a fin de lograr con mínimos recursos la información completa y fidedigna que requiere el médico para elaborar un diagnóstico oportuno y aplicar un tratamiento eficaz.

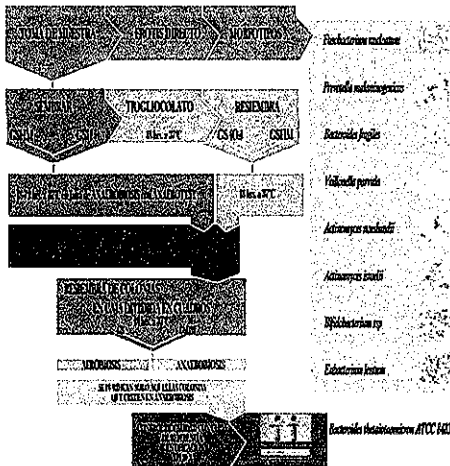
OBJETIVO:

Aislar e identificar las bacterias anaerobias recuperadas de muestras odontológicas, obtenidas por extracción dentaria y comprobar con esto la eficacia de la metodología aplicada.

METODOLOGÍA:

Se estudiaron un total de 50 muestras que corresponden a 27 niños, cuya edad oscila entre los 3 y 12 años, a las cuales la valoración odontológica determinó la extracción de una o más piezas dentarias por la presencia de un absceso, por caries avanzadas o bien la extracción de dientes sanos por pérdida natural (extracción fisiológica).

DIAGRAMA DE FLUJO:



RESULTADOS:

De las 50 muestras estudiadas, 18 correspondieron a extracción por absceso, 7 a extracción por caries y 5 a extracción fisiológica. En total se aislaron e identificaron 31 cepas, lo que representa 1.9 cepas de bacterias anaerobias por muestra. Además, dado que de una sola muestra no se aislaron anaerobios, el porcentaje de muestras con crecimiento positivo a anaerobios fue de 76.0%.

REFERENCIAS: Holcombom A. Beta-Lactamases producing bacteria in dental root canal abscesses. J. Oral Sci 1999 Dec; 41 (4): 187-90. García Ramos E. 2000 Diagnóstico de infecciones por anaerobios. ENCB. I.P.S. México D.F. Castro-Escarpilli G. & Gómez-García. 1999. Infecciones por bacterias anaerobias no esporuladas p. 501-512 en Rogo De La Fuente. Bacteriología Médica Ed. Cárter. México D.F.

BACTERIAS ANAEROBIAS AISLADAS	EXTRACCIÓN DENTAL POR ABSCESO	EXTRACCIÓN DENTAL POR CARIES	EXTRACCIÓN DENTAL FISIOLÓGICA
<i>Prevotella oris/buccae</i>	2	2	0
<i>Bifidobacterium spp</i>	4	5	0
<i>Bacteroides fragilis</i>	1	0	0
<i>Prevotella intermedia/distans</i>	5	0	1
<i>Actinomyces israelii</i>	1	2	0
<i>Lactococcus fermentum</i>	1	0	0
<i>Eubacterium ventriosum</i>	1	1	0
<i>Eubacterium lentum</i>	1	0	0
<i>Veillonella parvula</i>	6	4	2
<i>Actinomyces israelii</i>	1	1	0
<i>Prevotella melanogena/oralis</i>	2	5	2
<i>Eubacterium necrophorum/nucleatum</i>	1	0	0
<i>Gemella morbillorum</i>	0	0	1
<i>Streptococcus intermedius</i>	0	0	1
No se aislaron bacterias	1	0	0
Total	26	18	7

Cuadro N. 1. Frecuencia de las diferentes especies en cada tipo de muestra

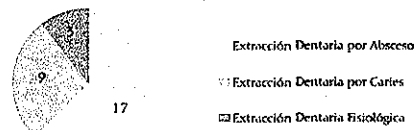


Fig. N.1 Número de cultivos positivos a anaerobios

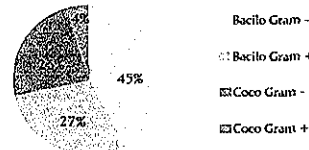


Fig. N.2 Gram y morfotipos de los microorganismos aislados en tres diferentes tipos de muestras

DISCUSIÓN:

El rendimiento de cultivos positivos a anaerobios, que se aprecia en la figura No. 1, supera lo reportado Choudhry, quien de 56 pulpas necróticas aisló 26 bacterias anaerobias. Como se observa en la figura No. 2 y tal como señala Kusen et al, los bacilos Gram negativos son los principales patógenos en abscesos dentofaríngeos agudos. De las 50 muestras trabajadas, de ninguna se aislaron ni *Peptostreptococcus*, *Propionium*, *Peptostreptococcus ni Propionium*, no obstante que algunos reportes los señalan como bacterias anaerobias presentes en el caso de abscesos orales; por lo que no descartamos la posibilidad de que estos pacientes hayan sido tratados con antimicrobianos.

CONCLUSIONES:

El aislamiento e identificación de 31 cepas constituye más de 50% del promedio de aislamientos realizados por otros autores. Lo anterior así como la diversidad de especies, evidente en el cuadro No. 1, pone de manifiesto que la metodología aplicada en este trabajo es eficaz y susceptible de perfeccionar. Es primordial tener presente que en la práctica clínica todos los microorganismos tanto aerobios como anaerobios obligados, así como, hongos y micobacterias deben investigarse. Sería recomendable trabajar con abscesos dentofaríngeos cerrados para evitar la contaminación con flora indígena.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN