



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

MANUAL DE BACTERIAS ANAEROBIAS DE IMPORTANCIA CLÍNICA

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

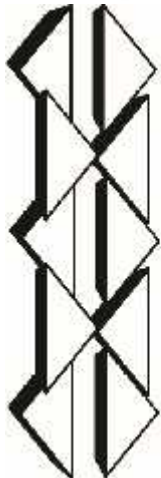
ROGELIO EMANUEL JUÁREZ VELÁZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS:

Q.F.B. JOSE OSCAR GONZALEZ MORENO

ASESORA DE TESIS:

Q.F.B. BEATRIZ ELENA ARELLANO PIMENTEL



FES ZARAGOZA-MÉXICO 2015



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.

DEDICATORIAS

Antes que nada quiero dar las gracias a dios por permitirme llegar al final de este camino, el cual fue uno de los más largos e importantes de mi vida en los cuales he tenido el gusto de conocer amigos profesores y compañeros con quienes he compartido momentos que los llevo en mi mente y corazón.

Dedico esta tesis a mi madre, esposa, familia, amigos y profesores.

A ti madre por tus palabras, amor, sacrificio y apoyo incondicional el cual me has brindado siempre. Por ser mi compañera y amiga, escucharme cuando mas lo necesitaba y ayudarme en esos momentos que quise desistir. Por esto y muchas cosas más quiero que sepas que te amo.

Adriana tu que siempre has estado a mi lado desde el día que te conocí quiero darte las gracias por soportarme y hacerme ver mis errores y compartir esos momentos tan lindos que hemos estado juntos, por las palabras de aliento cuando mas lo necesite y quería abandonar todo. Gracias por la dicha de hacerme padre, y ser parte de tu vida quiero que sepas que te amo y que sin ti no seria igual nada.

Amigos Karina, Lorena, David, a los cuales conozco desde que entre a esta facultad, quiero que sepan lo mucho que los quiero y también darles las gracias porque a lo largo de esta carrera han sido mis mas sinceros y mejores amigos pues me han apoyado y enseñado que lo que se quiere se puede realizar a base de esfuerzo y dedicación. Gracias por esos momentos que hemos compartido y vivido juntos, jamás los olvidare pues siempre los llevare en mi mente y corazón.

A ustedes profesores darles las gracias por su dedicación, apoyo y tiempo cuando tenia dudas por enseñarme y permitirme aprender de ustedes, por ser los mejores profesores que un alumno puede tener porque mas que profesores se vuelven amigos y parte de la vida de un estudiante. Muchas gracias por todo.

ÍNDICE

Contenido	Página
Resumen	1
Marco teórico	2
Generalidades	2
Clasificación de anaerobios	3
Patologías	10
Patogenia	10
Respiración anaerobia	11
Bioseguridad	14
Tinciones	20
Planteamiento del problema	21
Objetivo general	23
Objetivo particular	23
Metodología	24
Diagrama de flujo	25
Resultados	26
Discusión de resultados	27
Conclusiones	29
Referencias	30

RESUMEN

La experiencia propia nos ha permitido apreciar que el estudio de las bacterias es tan complejo, que es importante aprovechar el uso de materiales gráficos para la comprensión de este tema. Debido a esto se seleccionaron imágenes con calidad y una detallada descripción, para que comparativamente quien las consulte pueda relacionarlas, examinarlas y diferenciarlas. Las imágenes fueron obtenidas de libros como de redes electrónicas.

Por este motivo se realizó este Manual de bacterias anaerobias de importancia clínica de manera tal que sea útil para la aplicación de los conocimientos adquiridos durante la formación académica, para que los docentes lo utilicen en su cátedra y también a los alumnos que están tomando los cursos de Microbiología.

La información de este manual de Bacterias Anaerobias de importancia clínica se realizó consultando libros, artículos en medios impresos y electrónicos de las bibliotecas de la FES Zaragoza y otras instituciones; y se espera que este sea de utilidad para los alumnos que cursan el modulo de Microbiología General I, como también a las personas que tengan interés en el tema o requieran dicha información.

MARCO TEÓRICO

Los microorganismos descritos aquí por lo común no se desarrollan en presencia de oxígeno. Desde un punto de vista simplista pero muy útil, se puede definir a las bacterias anaerobias como aquellas que para crecer necesitan una atmósfera sin oxígeno, ya que este elemento es tóxico para ellas con este concepto se puede inferir que existe un amplio abanico de microorganismos, desde los muy tolerantes y resistentes hasta los extremadamente lábiles a este gas.

GENERALIDADES

Aunque las bacterias anaerobias fueron descubiertas a finales del siglo XIX, en la época dorada de la microbiología, no fue hasta los años 70 cuando se sentaron las bases del conocimiento actual. El grupo del Instituto Politécnico de Virginia en los Estados Unidos estableció los principios de la moderna taxonomía y clasificación y desarrolló un sistema que permitía el aislamiento de las especies más sensibles al oxígeno. Los investigadores del Laboratorio Wadsworth de la UCLA pusieron en marcha una metodología más sencilla, al alcance de muchos laboratorios de microbiología, e investigaron el papel de estos microorganismos en diversas infecciones humanas. Otros equipos, americanos y de otros países, contribuyeron a ampliar su conocimiento.¹

En el momento actual el interés por las bacterias anaerobias ha disminuido, sin duda porque en el pasado se sobredimensionó su importancia clínica, porque su conocimiento ha permitido el establecimiento de pautas de quimioprofilaxis eficaces para las infecciones con un origen quirúrgico, porque se estudia sistemáticamente la sensibilidad a los antimicrobianos de las especies más resistentes y esto permite tener datos para establecer terapias empíricas con altos porcentajes de éxito y porque el trabajo con anaerobios sigue siendo lento e incluso desesperante cuando se intenta llegar a un diagnóstico de especie.¹

El hábitat de las bacterias anaerobias está limitado a zonas corporales del hombre y de los animales donde la tensión de oxígeno es baja. Forman parte de la microbiota normal como comensales y mutualistas, jugando un importante papel en la resistencia inespecífica a la infección. Son particularmente frecuentes en la boca (especialmente en la placa dental sobre todo en su porción subgingival) y en las vías respiratorias altas, vagina e intestino (en especial en colon, recto y en las heces, donde superan a los aerobios y a los microorganismos facultativos). A partir de aquí pueden contaminar de forma pasajera la piel, sobre todo la del periné. La piel es pobre en anaerobios permanentes, el más significativo es *Propionibacterium acnes* que vive en las glándulas sebáceas. Desde estas

localizaciones, particularmente del tubo digestivo, son eliminados muriendo en el ambiente, con la excepción de los clostridios que sobreviven gracias a la formación de esporas y que por ellas forman parte de la biota telúrica y ambiental. La colonización inicial se realiza por transmisión por anaerobias, aunque no necesariamente en el caso de los clostridios. Las infecciones las producen a partir de estos hábitats.³

Las bacterias anaerobias juegan un papel importante en la patogenicidad de una amplia variedad de infecciones mixtas, donde se ven involucrados gérmenes aerobios y anaerobios, tales como neumonía por aspiración, infecciones intraabdominales, infecciones ginecológicas, de piel y partes blandas. Sin embargo, hay otros procesos en los que raramente se hallan implicadas estas bacterias y que debemos también considerar, como meningitis, endocarditis y artritis séptica². Estos microorganismos forman parte de la biota normal en diversas partes del cuerpo humano, siendo especialmente abundantes en el tracto gastrointestinal, la cavidad oral, piel y mucosas, convirtiéndose en patógenos oportunistas cuando se ven favorecidos por factores predisponentes, tales como la disrupción de mucosas, lo cual les permite acceder a tejidos normalmente estériles, y el uso de antibióticos con bajo o ningún espectro de acción sobre anaerobios, lo cual les facilita la proliferación por eliminación de la biota asociada.^{3,4} Estos factores, sumados a otros como la baja tensión de oxígeno, hacen que la mayoría de las infecciones anaeróbicas se originen a partir de miembros de la biota endógena del organismo.⁵

Los avances en los medios diagnósticos conseguidos en los últimos años, especialmente de las técnicas microbiológicas y la utilización de los métodos fenotípicos clásicos nos permite, en muchas ocasiones, llegar a una correcta identificación bacteriana a nivel de especie. Los métodos moleculares desarrollados a lo largo de la última década nos han proporcionado un mejor conocimiento de la composición bacteriana y como consecuencia, la posibilidad de realizar una identificación correcta a nivel de especie de determinadas bacterias anaerobias, así como de caracterizar nuevos géneros y especies implicadas en la patología infecciosa humana.⁵

CLASIFICACIÓN DE ANAEROBIOS

Los géneros de bacterias anaerobias se pueden clasificar como aparece en el cuadro 1.

Cuadro 1. Bacterias grampositivas y gramnegativas anaerobias⁵

<p>cocos grampositivos</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Anaerococcus sp.</i> • <i>Finegoldia sp.</i> • <i>Micromonas sp.</i> • <i>Peptostreptococcus sp.</i> • <i>Schleiferella sp.</i> • <i>Peptococcus sp.</i> 	<p>bacilos grampositivos</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Actinomyces sp.</i> • <i>Bifidobacterium sp.</i> • <i>Clostridium sp.</i> • <i>Eubacterium sp.</i> • <i>Lactobacillus sp.</i> • <i>Mobiluncus sp.</i> • <i>Propionibacterium sp.</i>
<p>Cocos gramnegativos</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Veillonella sp.</i> 	<p>bacilos gramnegativos</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Bacteroides sp.</i> • <i>Fusobacterium sp.</i> • <i>Porphyromonas sp.</i> • <i>Prevotella sp.</i> • <i>Bilophila sp.</i>

Características de algunas bacterias anaerobias de importancia clínica

Las bacterias anaerobias estrictas sólo crecen en ausencia de oxígeno, que es letal para ellas. Dentro de las bacterias anaerobias, existen numerosas especies de cocos y bacilos grampositivos y gramnegativos.³

Peptostreptococcus sp.

A pesar del nombre del género la morfología de estos gérmenes incluye formas en pares, tétradas, racimos, y cadenas. Un estudio microscópico cuidadoso muestra a estos cocos con tamaño irregular y alguna decoloración parcial, lo que permite diferenciarlos de sus similares aerobios. Forman parte de la biota de la boca, intestino y genitales. Se encuentran involucrados en infecciones pleuropulmonares, abscesos, infecciones ginecológicas, sinusitis. Casi constantemente son sensibles a los betalactámicos.⁵

Clostridium sp.

Los clostridios son bacilos anaerobios formadores de esporas y en general grampositivos. Casi todas las especies son anaerobias obligadas pero unas pocas especies son aerotolerantes.⁵

Las especies patógenas producen toxinas solubles, algunas de las cuales son extremadamente potentes. Los clostridios están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se encuentran en los suelos y en el tracto gastrointestinal de los seres humanos y los animales.⁵

Los clostridios patógenos pueden dividirse para su estudio en cuatro grandes grupos de acuerdo al tipo de enfermedad que producen:

1. Los clostridios histotóxicos típicamente causan una variedad de infecciones tisulares, en general luego de heridas abiertas y otras lesiones traumáticas.
2. Los clostridios enterotoxigénicos producen intoxicación alimentaria y formas más severas de enfermedad gastrointestinal.
3. *Clostridium tetani*, agente causal del tétanos, produce la enfermedad por medio de una potente exotoxina que es elaborada durante la proliferación limitada en los tejidos.
4. *Clostridium botulinum* es el agente etiológico del botulismo, enfermedad que resulta de la ingestión de una poderosa exotoxina formada previamente por los microorganismos en alimentos contaminados.⁵

CLOSTRIDIOS HISTOTÓXICOS

Pueden ocasionar una severa infección a nivel muscular denominada mionecrosis por clostridios (antes conocida como gangrena gaseosa o miositis por clostridios).

***Clostridium perfringens*.**⁵

Es la especie más importante responsable del 80-90% de los casos de mionecrosis. *C. novyi*, *C. septicum*, *C. histolyticum*, *C. sordellii*, *C. fallas* también ocasionan estas infecciones. Todos ellos producen una variedad de toxinas con potencias diferentes; para cada especie las toxinas se designan con letras griegas.⁵

Ninguno de ellos se comporta como un patógeno altamente invasivo, sino que cada uno juega un papel oportunista que requiere un conjunto de condiciones en los tejidos para que se inicie la infección. Determinan un espectro de compromiso clínico en infecciones de heridas que va desde la simple contaminación hasta la mionecrosis. Dada su amplia distribución en la naturaleza, la contaminación de heridas es muy común (39%). Sin embargo una pequeña proporción de heridas contaminadas evoluciona a la verdadera mionecrosis.

Por lo tanto el aislamiento de clostridios histotóxicos a partir de heridas o material de drenaje no indica por sí mismo la presencia de mionecrosis el diagnóstico de dicha afección es clínico.⁵

Existen cinco tipos diferentes: A, B, C, D y E, que se diferencian por la producción de cuatro toxinas letales principales: alfa, beta, épsilon y theta.

C. perfringens tipo A es el principal responsable de enfermedad humana; produce alfa toxina y otras de menor poder (omega, kappa, micrón); habita suelos e integra la biota normal del tracto gastrointestinal de hombre y animales.

Los tipos B, C, D y E existen en el tracto gastrointestinal de animales y sólo de forma ocasional en el hombre. Producen una variedad de enfermedades en animales domésticos; no habitan de forma permanente los suelos como lo hace el tipo A.⁵

Actinomyces sp.

Se trata de bacilos grampositivos largos y ramificados, delgados y delicados, bajo ciertas circunstancias, frotis o cultivos pueden fragmentarse simulando bacilos del tipo difteroides. En general son facultativos, aunque crecen mejor en anaerobiosis. *A. meyeri* es el único anaerobio estricto. Son capnófilos, crecen lentamente y en el hospedero suelen producir infecciones crónicas.¹¹

Forman parte de la biota normal de las mucosas del tracto respiratorio superior, tracto digestivo y aparato genital femenino, pero normalmente no están presentes en la superficie cutánea. La cavidad oral es su hábitat principal. Los microorganismos tienen un bajo potencial de virulencia, por lo tanto producen enfermedad sólo cuando las barreras mucosas normales se alteran por traumatismos, cirugía o infección.¹¹

La enfermedad producida por *Actinomyces* se llama actinomicosis y se caracteriza por el desarrollo de lesiones granulomatosas crónicas que se hacen supurativas y forman abscesos conectados mediante fístulas.

En los abscesos y los tractos fistulosos se pueden observar colonias macroscópicas que recuerdan a los granos de arena, llamadas gránulos de azufre por su aspecto amarillo o naranja y están formadas por masas de microorganismos unidos entre sí por fosfato cálcico. Las zonas de supuración están rodeadas por un tejido fibroso de granulación lo que da a la superficie que cubre a los tejidos afectados una consistencia dura o de madera.¹¹

Actinomyces israelii es el patógeno humano más importante.

La actinomicosis es entonces una enfermedad endógena y se clasifica según los órganos que afecta en:

- **actinomicosis cervicofacial** constituye aproximadamente el 50% de los casos de actinomicosis. Ocurre en personas con mala higiene bucal o que han sido sometidas a un procedimiento dental invasivo o a un traumatismo oral. De esta manera los microorganismos presentes en la boca invaden los tejidos enfermos y producen una enfermedad piógena aguda o, más frecuentemente, un proceso inflamatorio de evolución lenta, relativamente indoloro, con fibrosis y cicatrización, así como con fístulas de drenaje a lo largo del ángulo de la mandíbula y del cuello. Producen también enfermedad periodontal.¹¹
- **actinomicosis torácica** se produce por aspiración del agente desde el tracto respiratorio superior y la boca o por extensión de lesiones cervicofaciales. Al inicio de la enfermedad se produce un absceso pulmonar. Conforme la enfermedad progresa ocurre fistulización al exterior a través de la pared torácica pudiendo interesar costillas y vértebras.¹¹
- **actinomicosis abdominal** ocurre en pacientes sometidos a cirugía digestiva o que han sufrido un traumatismo en el intestino. Puede extenderse por todo el abdomen y afectar a cualquier órgano. Es posible la extensión vertebral y la fistulización al exterior.¹¹
- **actinomicosis pélvica** puede presentarse como una vaginitis o más frecuentemente puede haber una gran destrucción de tejidos con formación de abscesos tubo-ováricos. Se ha descrito infección en mujeres que utilizan dispositivos intrauterinos con sintomatología escasa y sin presencia de gránulos.¹¹
- **actinomicosis del sistema nervioso central** se produce generalmente por diseminación hematógena desde otros tejidos infectados, como los pulmones. La manifestación más frecuente es un absceso cerebral solitario, pero también puede ocasionar meningitis, empiema subdural y abscesos epidurales.¹¹

La confirmación en el laboratorio de la actinomicosis es difícil. Si se detectan gránulos de azufre en una fístula o en un tejido, el gránulo se debe aplastar entre dos láminas, teñirse y mirarse al microscopio óptico. Se pueden ver en la periferia de los gránulos bacilos grampositivos delgados y ramificados.¹¹

Actinomyces sp., son exigentes y crecen lentamente en condiciones anaerobias, se pueden tardar 2 semanas o más en aislar los microorganismos. Las colonias son blancas y tienen una superficie en forma de cúpula que se puede volver irregular luego de una incubación de una semana o más, lo que recuerda a la parte

superior de una muela. Las especies individuales de *Actinomyces* se pueden diferenciar mediante pruebas bioquímicas.¹¹

El tratamiento de la actinomicosis implica la asociación del corte quirúrgico de los tejidos afectados y la administración prolongada de antibióticos. La penicilina es el antibiótico de elección. El mantenimiento de una buena higiene bucal y el uso de profilaxis antibiótica adecuada cuando se realizan maniobras invasivas en la boca o el tubo digestivo disminuyen el riesgo de estas infecciones.¹¹

Veillonella parvula

Pequeños cocos gramnegativos en diplococos o cadenas cortas y racimos, miembros de biota bucal, intestinal y genital, se aísla de materiales clínicos, pero es dudoso y desconocido su poder patógeno.⁵

Prevotella* y *Porphyromonas

Todos los bacilos productores de un pigmento negro en agar sangre de carnero que previamente se clasificaban como subespecies de *Bacteroides melaninogenicus* se han reclasificado en estos dos nuevos géneros *Porphyromonas* y *Prevotella*. Este último también incluye algunas especies no pigmentadas.⁵

Forman parte de la biota normal de boca, tracto genital e intestinal, y son patógenos importantes en boca, cabeza, cuello e infecciones pleuropulmonares. *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella denticola*, *Prevotella loescheii*, *Prevotella intermedia* y *Prevotella corporis* son miembros de la biota normal de la boca, vías respiratorias superiores y partes blandas subyacentes. *Prevotella bivia* prevalece en la biota vaginal y produce vaginosis e infecciones de origen obstétrico. *Porphyromonas endodontalis* y *Porphyromonas gingivalis* forman parte de la biota normal de la boca y las encías, mientras que *Porphyromonas asaccharolytica* se halla en la biota intestinal.⁵

La morfología celular depende del origen de los microorganismos: a partir de medio sólido son cocobacilos pequeños, pero a partir de caldo son bacilos más largos y con marcado pleomorfismo. Las colonias en agar sangre por lo común son convexas, lisas, circulares, algunas veces beta-hemolíticas y habitualmente pigmentadas, adquieren un color tostado a negro en 2 a 21 días.

La vitamina K y la hemina son necesarias para la proliferación de la mayor parte de las cepas, o la estimulan mucho.⁵

Se ha visto que producen polisacárido capsular que es inmunogénico y específico de especie. El lipopolisacárido de estos microorganismos al igual que en *Bacteroides* es diferente de aquel de los microorganismos gram negativos anaerobios facultativos, y su potencia biológica es variable. La producción de enzimas como la colagenasa y otras enzimas proteolíticas, así como el polisacárido capsular son los principales factores de virulencia en las cepas que los producen. Los aislamientos clínicos pueden producir betalactamasa y algunas cepas son resistentes a las penicilinas y a ciertas cefalosporinas.⁵

Estos m.o. son agentes causales importantes de infecciones orales, pulmonares, pelvianas, intra abdominales y de partes blandas.⁵

Fusobacterium sp.

Existen seis especies causantes de infecciones en humanos. El más frecuentemente aislado es *Fusobacterium nucleatum*, biota normal de la boca, tracto respiratorio superior, tracto genital y gastrointestinal. Es un agente causal de infecciones orales, abscesos de pulmón, otras infecciones pleuropulmonares e infecciones del líquido amniótico.⁵

Fusobacterium necrophorum es un anaerobio muy virulento que puede causar infección ampliamente diseminadas. Es el agente etiológico principal de la Angina de Vincent (asociado a *Borrelia*), infección necrótica de amígdalas y faringe, que presenta un exudado purulento membranoso, acompañada de mal olor. Además se halla en una variedad de infecciones subdiafragmáticas. Su hábitat normal es el tracto gastrointestinal.⁵

Típicamente son bacilos largos con extremos acintados o filamentos delgados. Algunos como *F. necrophorum* son más abultados en su sector medio. Producen alfa y beta hemólisis en los cultivos en agar sangre, y las colonias son translúcidas, de formas varias y a veces irregulares.⁵

La mayor parte de las fusobacterias son susceptibles a la penicilina G y las cefalosporinas más antiguas, además de los agentes anaerobios más activos (clindamicina, metronidazol).⁵

PATOLOGÍAS

La mayoría de las bacterias anaerobias que producen infecciones en los seres humanos también son parte de nuestra biota normal. Debido a la ecología de estos microorganismos, las diversas especies y géneros manifiestan preferencias por los sitios corporales que habitan. Otros anaerobios patógenos (p. ej., *Clostridium botulinum* y *Clostridium tetani*) son habitantes del suelo y del ambiente, y no se consideran parte de la biota de los seres humanos.

La forma de adquisición de las infecciones anaerobias se estudiara en este manual. Si bien la diseminación interpersonal de *Clostridium difficile* entre los pacientes hospitalizados presenta un enorme dilema clínico y de control de la infección, la mayoría de las infecciones anaerobias se produce cuando la biota normal del paciente invade sitios estériles como resultado de la alteración de alguna barrera anatómica.¹

PATOGENIA

Los tipos de infecciones y enfermedades en seres humanos causadas por las bacterias anaerobias varían en un amplio espectro. Ciertas especies, como *C. botulinum* y *C. tetani*, producen algunas de las toxinas más potentes que se conocen. Por el contrario, no se conocen bien los factores de virulencia específicos de los microorganismos encontrados con mayor frecuencia en las infecciones (p. ej., grupo *B. fragilis*, *C. difficile*).¹

La mayoría de las infecciones anaerobias está causada por una mezcla de microorganismos anaerobios y anaerobios facultativos (p. ej., *Enterobacteriaceae*), de modo que es problemático establecer la magnitud con la que una determinada especie anaerobia contribuye con la infección. Además, como miembros ubicuos de nuestra biota normal, los microorganismos anaerobios suelen contaminar los materiales clínicos. Por estas razones es importante reconocer la importancia clínica de las bacterias anaerobias aisladas en el laboratorio, si bien en ocasiones resulta difícil.¹

RESPIRACIÓN ANAEROBIA.

La realizan exclusivamente algunos grupos de bacterias, estas van a obtener su energía mediante reacciones que no implican la utilización de oxígeno molecular y para los cuales esta forma química del elemento no actúa como aceptor de electrones. Para muchos de estos grupos fisiológicos el oxígeno actúa como tóxico celular o como inhibidor del crecimiento.⁴

Probablemente sean múltiples las razones por las cuales los anaerobios varían su tolerancia al oxígeno.⁴

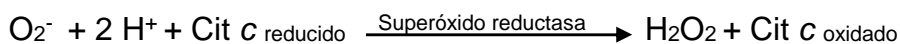
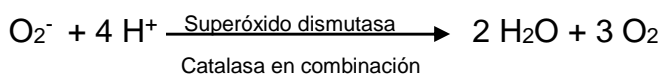
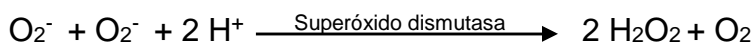
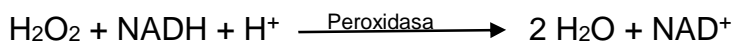
Una de las razones es que la tolerancia al oxígeno de muchos anaerobios obligados depende de su producción de enzimas superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa, que son protectoras contra la toxicidad de los productos de oxidación-reducción.⁴

Una teoría muy difundida es que la exposición al oxígeno produce una serie de reacciones, mediada por flavoproteínas que llevan a la producción del radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y otros productos de oxidación-reducción tóxicos:



- $O_2 + e^- + 2 H^+ \longrightarrow H_2O_2$ Peróxido de hidrógeno
- $H_2O_2 + e^- + H^+ \longrightarrow H_2O + OH^\bullet$ Radical hidroxilo
- $OH^\bullet + e^- + H^+ \longrightarrow H_2O$ Agua

Sin embargo las bacterias aerobias y facultativas desarrollaron mecanismos para inactivar estas formas tóxicas las cuales son las siguientes:



Las bacterias anaerobias estrictas no disponen de estos mecanismos de inactivación de formas tóxicas derivadas, o disponen solo de algunas de estas enzimas. Razón por la cual el oxígeno les hace daño y por ello se denominan anaerobias.

Cuando ocurre una lesión intervienen varios elementos dichos procesos ocurrirán dependiendo de la bacteria que intervenga en la lesión, entre ellos la muerte celular. Por ejemplo en el caso de *Clostridium sp* ocurre el siguiente proceso:

El calcio intracelular y pérdida de la homeostasis del calcio producirá isquemia y ciertas toxinas ocasionan un aumento precoz de calcio citosólico, debido a la afluencia neta de calcio²⁺ a través de la membrana plasmática y la liberación de calcio desde la mitocondria y el retículo endotelial. Estos, a su vez, activan enzimas con efectos celulares potencialmente nocivos: fosfolipasas, que fomentan la lesión celular; las proteasas, que inhiben la acción de las proteínas; las adenosintrifosfatasas (ATPasas), que aceleran la depleción de adenosintrifosfato (ATP); y las endonucleasas, que fragmentan la cromatina.²²

La depleción de ATP, la isquemia y las toxinas producen disminución de la síntesis de ATP y pérdida de nucleótidos mitocondriales de piridina con depleción de ATP. Este es necesario para los procesos de síntesis y degradación de las células que comprenden.²²

- a) Transporte de membrana
- b) Síntesis de proteínas
- c) Lipogénesis
- d) Pérdida de integridad de la membrana
- e) Otras

También es importante mencionar que en este tipo de proceso intervienen diferentes factores, como en el caso de *Clostridium sp* que para producir una sepsis por obligada es necesario la asociación de dos elementos esenciales:

- a) Clostridios o sus esporas
- b) Tejidos anóxicos, producidos ya sea por isquemia o por traumatismos.

Los clostridios o sus esporas se localizan en todas las muestras y se reproducen abundantemente en dependencia de las siguientes condiciones favorecedoras:

- a) Tipos de microorganismos
- b) Desnutrición, guerra, desastres naturales, inadecuados regímenes higienicodietéticos
- c) Características propias de cada individuo

Entre los factores que determinan el desarrollo de necrosis por isquemia figuran:

- a) Naturaleza del aporte vascular
- b) Velocidad en el desarrollo de la oclusión
- c) Vulnerabilidad del tejido a la hipoxia (tejido nervioso, cardíaco, esquelético).

La asociación del microorganismo y la isquemia puede encontrarse en diversas situaciones, tales como: en la atrición de tejido muscular y conectivo, en la existencia de cuerpos extraños, en heridas contaminadas con tierra, en heridas anfractuosas y profundas que inducen a la falta de O₂, en fracturas múltiples por accidentes del tránsito, en las heridas de guerra (potencialmente contaminadas por la pólvora, tierra, cuerpos extraños y otras), así como en la isquemia crónica de las extremidades, la fatiga, el hambre, la anemia, la hipoproteïnemia, el alcoholismo, la inmunodeficiencia congénita, o adquirida por el virus de la inmunodeficiencia humana o medicamentos como la azatioprina, ciclosporina y los esteroides. La diabetes mellitus, las enfermedades neoplásicas (en particular del tubo digestivo y colon), la neutropenia, la aplasia medular y la leucosis, pueden desencadenar espontáneamente, sin traumatismos o cirugía previa, las sepsis por clostridios en tejidos blandos en cualquier localización.²²

La incidencia de bacterias anaerobias que se pueden localizar en los diferentes órganos y tejidos se observa en el siguiente cuadro:

Cuadro2. Incidencia de bacterias anaerobias en biota normal.²²

	Piel	Tracto respiratorio superior	Boca	Intestino	Genitales externos	Uretra	Vagina
Bacilos Gram positivos esporulados							
Clostridium	0	0	1	3-4	0	1	1
Bacilos Gram positivos no esporulados							
Actinomyces	0	2	2	1	0	0	0
Bifidobacterium	0	0	2	1	0	0	2
Eubacterium	1	1	2	3-4	d	d	1
Lactobacillus*	0	0	2	2	0	1	3-4
Propionibacterium	3-4	2	1	1	d	0	2
Bacilos Gram negativos							
Bacteroides	0	2	3-4	2	2	2	2
Fusobacterium	0	2	3-4	2	2	2	1
Cocos Gram negativos	0	2	3-4	2	0	d	2
Cocos Gram positivos	2	2	3-4	3-4	2	1	2

Tracto respiratorio superior incluye vías nasales, nasofaringe, orofaringe y amígdalas. (*)
 Incluye anaerobios, facultativos y microaerófilos
 d = desconocido
 0= no encontrados o raros
 1= hallazgo irregular
 2= habitualmente presentes
 3-4= presentes en gran número.

Cuando se sospecha de bacterias anaerobias las siguientes características pueden ser:

- Infecciones que aparecen en la continuidad con superficies mucosas.
- Infecciones asociadas a necrosis tisular, y formación de abscesos.
- Olor pútrido.
- Presencia de gas.
- Infecciones polimicrobianas.¹⁹

BIOSEGURIDAD

Todo el personal debe utilizar siempre bata larga hasta la altura de la rodilla y de manga larga, la bata deberá utilizarla abotonada, esta debe ser considerada como material contaminado, lavarse las manos periódicamente; cada vez que entren en contacto con material infeccioso y siempre que se haga abandono del área del laboratorio. Se debe evitar tocarse, frotarse o rascarse mientras se permanezca en el laboratorio.²²

Esta rotundamente prohibido pipetear con la boca y comer, beber, maquillarse o fumar en el área de laboratorio, así como almacenar o preparar alimentos para consumo humano. Igualmente, todos los artículos personales deben permanecer fuera del área de laboratorio.²²

Los accidentes en el laboratorio deben ser abordados con calma y ser debidamente reportados, en caso de ocurrir un derrame de material infeccioso, se debe despejar la zona y usando guantes, se debe colocar un papel absorbente impregnado con un desinfectante (alcohol 70^o-yodado) sobre el material. Si cae material contaminado sobre su piel, se debe proceder a desinfectar utilizando alcohol 70^o-yodado, para luego lavar abundantemente con agua y jabón y aplicar nuevamente la desinfección. Si se presenta una contaminación de los ojos, proceda a enjuagar abundantemente con agua en la ducha facial respectiva.²²

La idoneidad de las muestras enviadas depende del cumplimiento de una serie de medidas referentes a: procedimiento de obtención, cantidad enviada y transporte rápido y adecuado al laboratorio. Como reglas generales cabe indicar las siguientes¹⁹:

1. Antes de recoger la muestra, considerar el riesgo/beneficio de la recogida de la muestra para el paciente. (Vease cuadro 3)

2. Cada muestra deberá ir acompañada de un volante de petición, que deberá estar correctamente legible y completamente complementado con los siguientes datos.²⁰

A) Apellido 1^o, Apellido 2^o , Nombre

B) N^o de historia y/o folio

C) Fecha de nacimiento

D) sexo

E) Diagnóstico permanente

F) Teléfono/dirección

G) Datos clínicos: diagnóstico clínico de presunción, estado inmunitario del paciente, tratamiento (principio activo administrado y tiempo transcurrido desde la última toma)

H) Profesional que toma la muestra

Solicitar la investigación de patógenos especiales expresamente (Cryptosporidium, Mycoplasma, Micobacteria)²⁰

3. Es necesario que la toma se efectúe en el sitio exacto de la lesión y lo más pronto posible. La recogida de la muestra deberá realizarse en condiciones de máxima asepsia, evitando contaminaciones ambientales del personal y del propio enfermo a la muestra y viceversa.
4. Son preferibles siempre productos purulentos frescos líquidos o tejidos sospechosos a las muestras tomadas con torundas.
5. Se debe recoger una cantidad de muestra adecuada a la petición. En ocasiones una escasa cantidad de muestra puede ser la causa de falsos negativos.
6. El material destinado a cultivo no debe estar en contacto con sustancias desinfectantes o anestésicas, siempre que sea posible.
7. La muestra se debe recoger, siempre que sea posible, antes de iniciar cualquier terapia antimicrobiana. Cuando esto no es posible, se obtendrán justo antes de la administración de la dosis del antimicrobiano, o tras 48 horas de la retirada del mismo, indicándolo en el vale de petición.
8. La muestra debe transportarse en envases adecuados, con cierres a prueba de fugas.
9. La muestra debe etiquetarse con el nombre del paciente, el servicio solicitante y el tipo de muestra.
10. Se recomienda que cada muestra se introduzca en una bolsa de plástico que a su vez se introducirá en otra donde se incluya el volante. Así se evita que los posibles derrames de la muestra invaliden el volante de petición.
11. El envío al laboratorio de microbiología debe ser lo más rápido posible con objeto de asegurar la supervivencia de microorganismos de difícil crecimiento y de evitar el sobrecrecimiento de la flora normal, acortar el tiempo de contacto con anestésicos locales o con otras sustancias con acción antimicrobiana utilizadas en la recogida de la muestra.²⁰

Es preciso hacer énfasis en la recolección y el transporte adecuados de las muestras para el cultivo anaerobio. Dado que los anaerobios residentes a menudo están presentes en grandes cantidades como biota normal en las superficies de las mucosas, incluso la contaminación mínima de una muestra puede dar resultados erróneos. En general, el material para el cultivo anaerobio se obtiene mejor por biopsia de tejidos o por punción y aspiración. El empleo de hisopos no es una alternativa adecuada debido a la exposición excesiva de la muestra a los efectos de la desecación, la posibilidad de contaminación durante la recolección y a que los microorganismos pueden quedar retenidos dentro de las fibras del hisopo. Si debe utilizarse un hisopo, debe provenir de un sistema de transporte exento de oxígeno.¹

Cuadro 3. Riesgo-Beneficio.

RIESGO	ACTIVIDAD	BENEFICIO
Desconocer procedimientos	Cada laboratorio debe contar con un manual donde se identifiquen los riesgos conocidos y potenciales	Que se cumplan los procedimientos dentro del laboratorio encaminados para eliminar o reducir al mínimo de riesgos
Contagio por derrames	Uso de bata ,guantes ,gafas de seguridad, calzado cerrado	Evitar contacto directo o accidental con sangre, líquidos corporales u otros materiales potencialmente infecciosos
Contagio/contaminación	Almacenar alimentos en las zonas de trabajo	Evitar la ingestión de alimentos contaminados y evitar la contaminación alimento-muestra.
Superficies sucias	Descontaminar las superficies de trabajo después de algún derrame de material potencialmente peligroso	Evitar contagios con el mismo personal u otros pacientes.
Derrames de material biológico	El embalaje y transporte de material debe ser transportado con la precaución necesaria utilizando frascos y tubos con tapón de rosca	Transportar de forma segura y correcta para evitar derrames, así como en las condiciones necesarias de preservación de la muestra

Para algunas enfermedades por clostridios hay instrucciones especiales de recolección, como es el caso de *C. perfringens* y *C. botulinum* transmitidos por alimentos, entero colitis pseudomembranosa por *C. difficile* y entero colitis neutropénica por *C. septicum* . Las muestras de alimentos y de materia fecal deben remitirse a un laboratorio de salud pública para la confirmación de intoxicación alimentaria por *C. perfringens*; éstas deben transportarse a 4°C. El diagnóstico clínico de botulismo se confirma por la presencia de toxina botulínica en suero, heces, vómitos o contenido gástrico, así como por la recuperación del microorganismo a partir de la materia fecal de los pacientes. La toxina botulínica es una posible arma de guerra, de modo que los microbiólogos clínicos deben estar alertas acerca de la cantidad de casos de botulismo. En el caso de botulismo infantil las muestras deben ser suero y materia fecal; para el botulismo a partir de heridas se debe incluir suero, materia fecal y tejidos de biopsia. Las heces para el cultivo y la determinación de toxina de *C. difficile* .¹

Los residuos generados en los laboratorios microbiológicos y clínicos presentan riesgos y dificultades especiales en su manejo debido, fundamentalmente, al carácter infeccioso de algunos de sus constituyentes. La heterogeneidad de su composición contribuye a acrecentar los riesgos, especialmente en el caso de desechos del laboratorio bacteriológico, donde existen cultivos con bacterias patógenas, objetos punzocortantes como agujas de jeringas, trozos de vidrio o plástico, sangre humana y sus derivados, residuos de muestras para cultivo y otros.

Los desechos deben ser manejados en una forma racional, dependiendo del nivel de bioseguridad del laboratorio, el tipo de material que constituye el desecho, el tipo de tratamiento aplicado al desecho y la forma en que los desechos tratados son eliminados de la institución. Por convenio se utiliza el color amarillo para designar el desecho infeccioso de residuos patológicos (órganos, vísceras o partes de tejido), mientras que el color rojo se usa para designar el desecho biológico infeccioso (guantes, torundas de algodón, etc.).

A continuación se enlistan algunos de los medios de cultivos más utilizados para microorganismos anaerobios (Vease cuadro 3).

Medios De Cultivo Utilizados Para Microorganismos Anaerobios

Cuadro 3. Medios de cultivo para anaerobios¹

MEDIO	COMPONENTES COMENTARIOS	Y	OBJETIVO PRINCIPAL
Agar sangre para anaerobios	Puede prepararse sobre una base de Columbia, Schaedler, CDC, <i>Brucella</i> o infusión cerebro-Corazón suplementada con sangre de carnero al 5%, extracto de levadura al 0,5%, hemina, L-cistina y vitamina K1.		Medio no selectivo para el aislamiento de anaerobios y anaerobios facultativos
MEDIO	COMPONENTES	Y	OBJETIVO PRINCIPAL
Agar con bilis y esculina Para Bacteroides (BBE)	Base de agar con tripticasa y soja más el agregado de citrato de amonio y hemina: las sales biliares y la gentamicina actúan como inhibidores		Selectivo y diferencial para el grupo <i>Bacteroides fragilis</i> ; útil para la identificación presuntiva
Agar' sangre hemolizada con kanamicina y vancomicina (LKV)	Base de agar para <i>Brucella</i> con kanamicina (75 ~g/mL), vancomicina (7,5 ~g/mL), vitamina K1, (10 ~g/mL) y sangre hemolizada al 5%		Selectivo para el aislamiento de <i>Prevotella</i> y especies de <i>Bacteroides</i>
Agar con alcohol feniletílico para anaerobios (Anaerobic phenylethyl alcohol agar-PEA-)	Base de agar nutritivo, sangre al 5%, alcohol feniletílico		Selectivo por la inhibición de los bacilos gramnegativos entéricos y el crecimiento confluyente de algunos clostridios
Agar con yema de huevo (Egg-yolk agar; ELLA)	Base de yema de huevo		No selectivo para determinar la producción de lecitinasa y lipasa por los clostridios y las fusobacterias
Agar con cicloserina, cefoxitina y fructosa (CCFA)	Base de yema de huevo con fructosa, cicloserina (500 mg/L) y cefoxitina (16 mg/L); indicador rojo neutro		Selectivo para <i>Clostridium difficile</i>
Caldo con carne cocida (también denominado carne picada)	Las partículas de carne sólida inician el crecimiento bacteriano; las sustancias reductoras disminuyen el potencial de oxidorreducción (Eh)		No selectivo para el cultivo de microorganismos anaerobios; con el agregado de glucosa puede utilizarse para la cromatografía en fase líquida y gaseosa
Caldo con peptona, extracto de levadura y glucosa (peptoneyeast extract-glucose -PYG)	Base de peptona, extracto de levadura, glucosa, cisteína (agente reductor), resazurina (indicador de la tensión de oxígeno), sales		No selectivo para el cultivo de bacterias anaerobias por cromatografía en fase líquida y gaseosa.
Caldo tioglicolato	Digerido pancreático de caseína, Caldo de soja y glucosa que enriquece el crecimiento de la mayoría de las bacterias. El tioglicolato y el agar reducen el Eh. Puede suplementarse con hemina y vitamina K1		No selectivo para el cultivo de anaerobios así como de anaerobios facultativos y aerobios

Figura 1. Agar Schaedler + 5% sangre de cordero⁵



Aislamiento de bacterias anaerobias. El agar Schaedler + 5 % sangre de cordero es un medio de aislamiento particularmente útil para la detección de bacterias anaerobias estrictas y facultativas. La presencia de factores de crecimiento como el extracto de levadura, la hemina y la vitamina K₃ y la adición de sangre de Cordero permite el crecimiento incluso de las especies más exigentes. El agente reductor (L-cistina) y la elevada concentración de dextrosa en el medio favorecen el crecimiento de especies anaerobias.¹ Véase figura 1.

TINCIONES

Una de las herramientas que se utiliza son las técnicas de tinción, para lo cual primero deben de observarse células conocidas, para distinguir o para revelar la presencia de determinados constituyentes celulares, tales como flagelos, esporas, cápsulas, paredes celulares, centros de actividad respiratoria, etc.¹

También es importante conocer los componentes de los colorantes, ya que mayoría de los colorantes son compuestos orgánicos que tienen alguna afinidad específica por los materiales celulares. Muchos colorantes utilizados con frecuencia son moléculas cargadas positivamente (cationes) y se combinan con intensidad con los constituyentes celulares cargados negativamente, tales como los ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos. Otros colorantes son moléculas cargadas negativamente (aniones) y se combinan con los constituyentes celulares cargados positivamente, tales como muchas proteínas. Otro grupo de colorantes son sustancias liposolubles; los colorantes de este grupo se combinan con los materiales lipídicos de la célula, usándose a menudo para revelar la localización de depósitos de grasa.²

Algunos colorantes teñirán mejor sólo después de que la célula haya sido tratada con otra sustancia química, que no es un colorante por sí mismo. Esta sustancia se denomina mordente; un mordente habitual es el ácido tánico. El mordente se combina con un constituyente celular y lo altera de tal modo que ahora sí podrá atacar el colorante.²

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los módulos de microbiología en la carrera de Química Farmacéutico Biológica (QFB), se imparten en los siguientes semestres: En sexto semestre: Microbiología General I, Séptimo semestre: Microbiología General II, Octavo semestre: Microbiología médica (orientación Farmacia Clínica), noveno semestre: Microbiología médica (orientación Bioquímica Clínica), y Microbiología Farmacéutica (orientación Farmacia Industrial).

En estos módulos se les enseña a los alumnos, las bases y conocimientos fundamentales sobre los microorganismos, y las herramientas para su estudio, abarcando aspectos como son:

- Las generalidades sobre las bacterias (morfológicas, taxonómicas, propiedades y efecto nocivo).
- Importancia médica, industrial e incluso su efecto sobre alimentos y cosméticos.

En este trabajo se estudiará la importancia que tienen las bacterias anaerobias. Aunque durante los módulos de microbiología, se le dan al alumno las herramientas para que comprenda temas que por falta de tiempo no es posible revisar, por lo cual es importante redactar manuales de este tipo, para que sirva como material de apoyo al estudiante y personas del área de la salud.

Sin embargo son tan extensos los programas y tan corto el tiempo para estudiarlos que no se logra abarcar los temas con detenimiento y profundidad; al igual que la Facultad y el laboratorio de análisis clínicos no cuentan con la infraestructura y el presupuesto necesario para poder trabajar con este tipo de microorganismos más sin embargo es importante que el alumno conozca que existen diferentes sistemas para generar el ambiente anaeróbico y así poder transportar y cultivar a este tipo de bacterias, por ejemplo:

Dry Anaerobic Ind. Strip 100u, Gaspak EZ Anaerobiosis, Gaspak EZ Anaerobe Pouch System, BD Gaspak EZ Campi container System Sachets. Incubation Container Rack Large, los cuales sirven para crear un ambiente de anaerobiosis.

Este manual no pretende sustituir ni a la bibliografía especializada sobre el tema, ni a los profesores que imparten los módulos de Microbiología, sino más bien ser de ayuda para que el estudiante disponga de información reciente y actualizada, de manera organizada para su fácil comprensión, con la finalidad de que sea un material de consulta que contemple las generalidades de las bacterias anaerobias.

OBJETIVO GENERAL

- Realizar el material de apoyo didáctico: Manual de Bacterias Anaerobias de Importancia Clínica

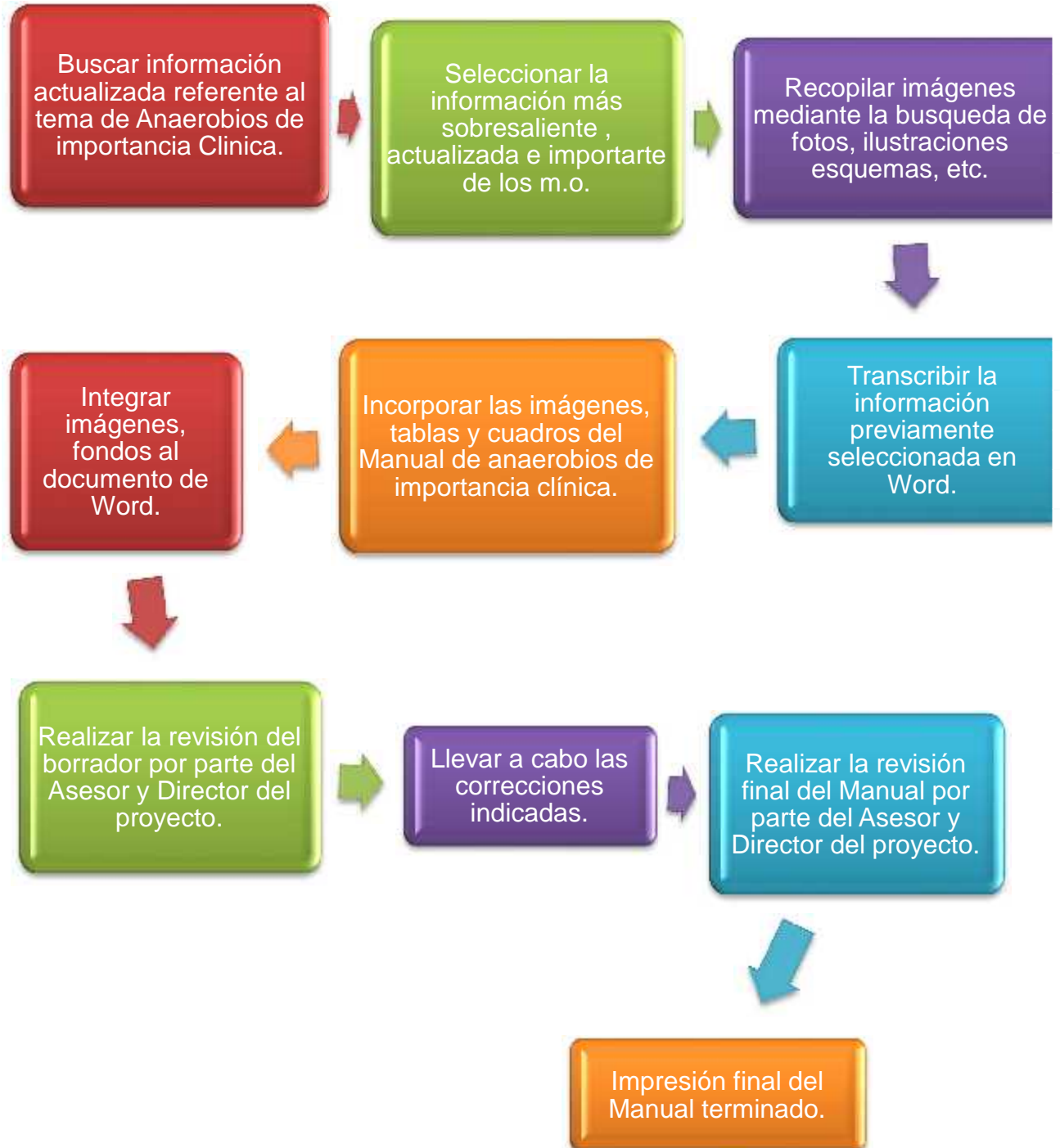
OBJETIVOS PARTICULARES

- Recopilar la información bibliográfica actualizada y completa acerca de las Bacterias anaerobias de importancia clínica.
- Seleccionar las imágenes más representativas acerca de las bacterias anaerobias de importancia clínica para ilustrar el manual.
- Estructurar el manual de bacterias anaerobias de importancia clínica de una manera lógica, intercalando la información con sus respectivas imágenes, para que resulte de manera sencilla su consulta.

METODOLOGÍA.

1. Buscar información actualizada referente al tema de anaerobios de importancia clínica en artículos, libros, publicaciones científicas en medios impresos y electrónicos.
2. Seleccionar la información más sobresaliente, actualizada e importante de los m.o.
3. Recopilar imágenes mediante la búsqueda de fotos, ilustraciones, esquemas, diagramas, etc.
4. Transcribir la información previamente seleccionada en Word.
5. Incorporar las imágenes, tablas y cuadros del manual de anaerobios de importancia clínica.
6. Integrar imágenes, fondos al documento en Word.
7. Realizar la revisión del borrador por parte del asesor y director del proyecto.
8. Llevar a cabo las correcciones indicadas.
9. Realizar la revisión final del manual por parte del asesor y director del proyecto.
10. Impresión final del Manual terminado.

DIAGRAMA DE FLUJO



RESULTADOS

Se elaboró el Manual de Bacterias Anaerobias de Importancia Clínica de manera impresa, el cual contiene información actualizada sobre las bacterias anaerobias más importantes del área de microbiología así como de los métodos de toma de muestra y equipos automatizados más utilizados. Este consta de cinco capítulos estructurados de la siguiente manera:

Capitulo 1. Generalidades de las bacterias anaerobias.

Capitulo 2. Consideraciones clínicas

Capitulo 3. Bacterias anaerobias Gram positivas

Capitulo 4. Bacterias anaerobias Gram negativas

Capitulo 5. Toma de muestras

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La microbiología es una ciencia que se dedica al estudio de seres microscópicos (microorganismos); estos tienen características morfológicas, taxonómicas y dan un equilibrio a la biosfera; estos pueden ser de vida libre o de requerir un hospedero. Aunque también tiene ciertas acciones nocivas como la de producir enfermedades en animales, plantas y al hombre que es estudiado por la microbiología médica, también por la industria alimenticia como la descomposición de alimentos, y por la cosmetología (levaduras, toxinas).

La microbiología médica moderna se ha convertido en una disciplina muy extensa pues se han estructurado manuales de diferentes tipos como son: Manual de Virología (Ciencia que estudia a los virus) Manual de Micología (estudio de los hongos patógenos para el ser humano), Bacteriología (ciencia de las bacterias que estudia a los agentes etiológicos de muchas enfermedades infecciosas). Manual para Inmunología (Ciencia de los mecanismos de defensa del organismo contra agentes patógenos como para los no patógenos). Protozoología (Se encarga de investigar a los animales mononucleares patógenos). Cada uno de ellos aportan gran cantidad de información especializada que ayudan a tener esas herramientas para poder ser llevadas a la práctica, ninguno de estos manuales pretende sustituir información existente de libros, artículos de revistas, u otros manuales.

Siendo un alumno de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FESZ) de la carrera de Química Farmacéutico Biológico (Q.F.B) y pasar por los módulos de Microbiología General I, Microbiología General II, y en las orientaciones de octavo semestre: Microbiología Médica (Orientación farmacia clínica), noveno semestre: Microbiología Médica (Orientación bioquímica clínica) y Microbiología Farmacéutica (Orientación farmacia industrial) que no abordan mucho el tema de fascinante de las bacterias anaerobias se crea este manual con la intención de que sea de utilidad no solo para alumnos de esta Facultad si no para todo tipo de persona que se dedique al área de la salud, ya que los temas impartidos en esta carrera son muy extensos y es poco el tiempo para estudiarlos con detenimiento y profundidad.

Este manual de bacterias anaerobias de importancia clínica tiene la intención de dar a conocer características morfológicas y taxonómicas, así como su manejo, transporte etc. Se estructuro de una manera fácil de comprender para alumnos que al preguntar sobre el tema solo saben de unos cuantos microorganismos y la intención es dar un apoyo más al docente como al alumno en aspectos teóricos y que pueden ser llevados al aula ya que como esta descrito en el manual estas bacterias requieren de cuidados especiales desde la toma,

transporte, sembrado y desarrollo para poder implementar una practica sobre ellos. Este manual da un apoyo al profesional recién egresado que puede llegar a trabajar con este tipo de bacterias ya que en el capitulo 5 de este manual se encuentran algunos métodos y sistemas comerciales que existen actualmente así como los estándares de calidad.

El Manual de Bacterias Anaerobias de Importancia Clínica se elaboro recopilando información actual, haciendo mención de las bacterias anaerobias más importantes del ámbito clínico; la información se obtuvo mediante libros, revistas, artículos y fuentes electrónicas especializadas en el tema.

Este manual se encuentra ilustrado con multiples imágenes representativas de las especies habladas esto para hacer más atractivo el tema y poder contribuir al proceso enseñanza-aprendizaje.

Dicho manual habla de las generalidades de las bacterias anaerobias pues es importante tener un conocimiento básico de estas bacterias ya que su morfología, metabolismo, factores de virulencia, cambios taxonómicos, son diferentes a las bacterias aerobias.

Este Manual aporta información para que el alumno o persona del área de la salud amplie sus conocimientos utilizando las herramientas y la información aprendida por parte de los docentes a seguir buscando más, para que este tema sea profundizado y no solo quedarse con la información teórica si no buscar alternativas para poder llevar estos conocimientos a lo práctico pues no todas las Facultades cuentan con esa infraestructura y el presupuesto para poder trabajar con este tipo de bacterias y tener el ambiente anaeróbico.

CONCLUSIÓN

Debido al poco conocimiento que existe sobre microorganismos anaerobios así como al poco tiempo que tienen los alumnos de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (fesz) de la carrera de Q.F.B. y derivado de la gran importancia que este tipo de microorganismos tiene en nuestro entorno, vida cotidiana y actividades es que se logro elaborar el Manual de Bacterias Anaerobias de Importancia Clínica estructurándolo de una manera sencilla y de fácil comprensión para los alumnos y persona del área de la salud interesada en el tema. Este manual es de gran utilidad y apoyo ya que contiene la información necesaria, actual y más importante acerca de los microorganismos de importancia clínica como también las imágenes más representativas que ayudan a asociar la información para facilitar su comprensión.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- 1.- Jawetz M, Adelberg J. Microbiología médica. 25ª ed. México: McGraw Hill; 2005.
- 2.- Molina J, Manjarrez ME. Microbiología bacteriología y virología. México: Méndez; 2010.
- 3.- Sahn D, Forbes BA. Bailey & Scott Diagnóstico Microbiológico. 12ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009.
- 4.- Gamazo C., López-Goñi I., Díaz R. Manual Práctico de Microbiología. 3er ed. España: ELSEVIER; 2005.
- 5.- Murray P., Rosenthal, Pfaller M., Microbiología Médica. 5ª ed. Madrid: Elsevier, 2006
- 6.- Pratts G., Microbiología Clínica. 1º ed. México: Editorial Médica Panamericana, 2005: 69-74.
- 7.- Krasner R. The Microbial Challenge. Washington: ASM Press; 2006.
- 8.- Kumate J, Gutiérrez G, Muñoz JL. Manual de infectología Clínica. 17ª ed. México: Méndez; 2008.
- 9.- Hernández A., Alfaro I., Arrieta R. Microbiología Industrial. [On line] 206 [fecha de acceso Marzo 2012]: 251. URL disponible en: http://books.google.com.mx/books?id=KFq4oEQQjdEC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- 10.- Tortora G., Funke B., Case C., Introducción a la Microbiología. 6ª ed. México: Editorial Médica Panamericana, 2005.
- 11.- Murray P., Rosenthal, Pfaller M., Microbiología Médica. 6ª ed. Madrid: Elsevier, 2009

12.- Tortora G., Funke B., Case C., Introducción a la Microbiología. 9ª ed. México: Editorial Médica Panamericana, 2007

13.- García – Sánchez JE, Fresnadillo MJ, García Sánchez E. Nuevas bacterias Anaerobias implicadas en infecciones humanas. Enferm infecc. Microbiología clínica. 2009

14.- Madigan. M.T, Martingo J.M. y Jack Parker; biología de los microorganismos. 10ª ed. México: editorial prentice hall, 2004.

15.- Manual de Control de Calidad Merck. Microbiología Clínica. Universidad de Panamá

16.- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS Ed. Bailey&Scott's Diagnostic Microbiology. Sección 12. Anaerobic Bacteriology. Pp 511-537. Mosby, 11a. ed. 2007.

17.- Koneman, EW, Allen SD, Janda WM, et al: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 4th ed. Philadelphia, JB Lippincott, 2004.

18.- Weltman G., Fossati M.S., Correa C., Regueira, M., Mollerach, M., Tipificación capsular mediante PCR de aislamientos de Haemophilus influenzae no tipificables por aglutinación. Rev. Argent. Microbiol. 2005.

19.- Aznar Martín J; Calbo Torrecilla L; Casal Román M; De la Rosa Fraile M; Palop Borrás B; Pérez Ramos S; Pinedo Sánchez A; Plata Rosales C; 2001.Recomendaciones para el diagnóstico en microbiología clínica. Consejería de Salud.

20.- Guerrero Gómez C; Sánchez Carrillo C; 2003. Procedimientos en microbiología clínica. Recogida, transporte y procesamientos general de las muestras en el laboratorio de microbiología.

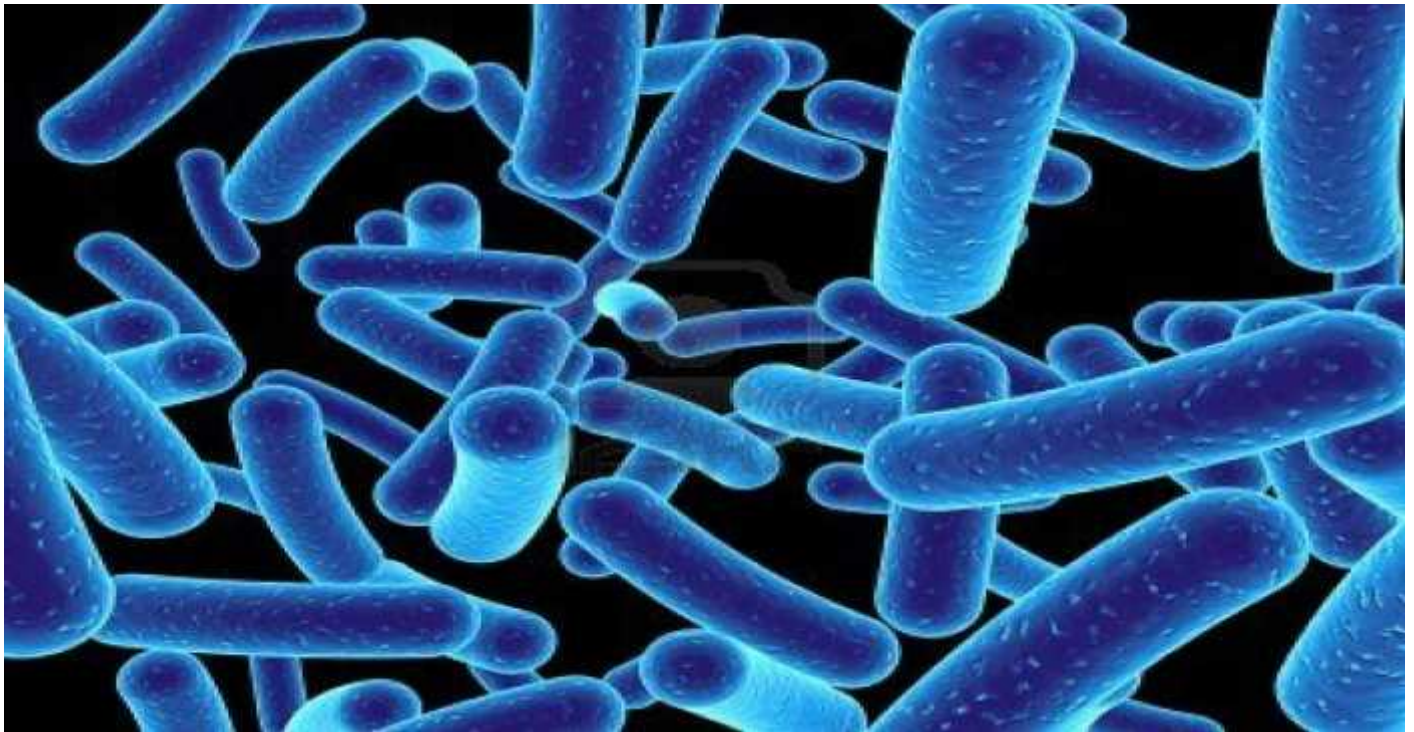
21.- Aguilera Gámiz C; Aznar Martín J; Durán Serantes M; Gascón Luna F; De Haro Muñoz T; Hortas Nieto ML; López Rubio F; Martí Muñón FJ; Pérez ValeroV; Ramírez Ramírez G; Ruiz Ruda E; 2004. Laboratorios Clínicos: procesos de soporte. Consejería de Salud.

22.- Mionecrosis por clostridios. Microsoft Encarta, 2009.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



**MANUAL DE BACTERIAS ANAEROBIAS DE
IMPORTANCIA CLINICA**

ROGELIO EMANUEL JUÁREZ VELÁZQUEZ

2015



*UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO*

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

MANUAL DE BACTERIAS ANAEROBIAS
DE IMPORTANCIA CLÍNICA

ROGELIO EMANUEL JUÁREZ VELÁZQUEZ



FES ZARAGOZA-MÉXICO 2015

ÍNDICE

Contenido	Pág
Prologo	1
Capítulo 1. Generalidades de las Bacterias Anaerobias	3
1.1. Metabolismo microbiano	5
1.2. Factores de virulencia	6
1.3. Producción de precursores de metabolitos	7
1.4. Producción de energía	9
1.5. Biosíntesis	10
1.6. Polimerización y ensamblaje	10
1.7. Células eucariontes y procariontes	11
1.8. Morfología bacteriana	13
1.9. Componentes Bacterianos	13
1.10. Cambios taxonómicos	19
1.11. Relación de las bacterias con el oxígeno	20
Capítulo 2. Consideraciones clínicas	24
2.1. Bacterias anaerobias localizadas en el cuerpo humano	27
2.2. Cambios taxonómicos recientes en los bacilos Gram negativos anaerobios	28
2.3. Cambios taxonómicos recientes en los cocos Gram positivos anaerobios	29
2.4. Cambios taxonómicos recientes en los bacilos Gram positivos anaerobios	30

2.5. Patogenia y espectro de enfermedades por bacterias anaerobias 31

Capítulo 3. Bacterias anaerobias Gram positivas 34

3.1. Cocos Gram positivos anaerobios 35

3.2. Bacilos Gram positivos no esporulados 36

3.3. Bacilos Gram positivos esporulados 41

Capítulo 4. Bacterias anaerobias Gram negativas 60

4.1. Cocos Gram negativos anaerobios 61

4.2. Bacilos Gram negativos anaerobios 63

4.3. Características metabólicas de bacilos Gram negativos anaerobios 69

Capítulo 5. Toma de muestras 70

5.1. Hemocultivo 71

5.2. Transporte en el laboratorio 73

5.3. Recepción y procesamiento de las muestras 77

5.4. Medios de cultivo 80

5.5. Sistemas de incubación en anaerobios 82

5.6. Tiempo de incubación 84

5.7. Otros procedimientos 84

5.8. Examen de los cultivos y aislamiento 85

5.9. Identificación preliminar 87

5.10. Identificación final 88

5.11. Interpretación de los resultados	91
5.12. Interpretación de los resultados de las pruebas individuales complementarias realizadas en casos concretos	92
5.13. Pruebas de determinación de la sensibilidad	96
5.14. Métodos	96
5.15. Sistemas comerciales	99
5.16. Controles de calidad	99
Referencias	101


PROLOGO

Este Manual de Bacterias Anaerobias de Importancia Clínica habla sobre generalidades de bacterias anaerobias (morfológicas, taxonómicas, propiedades, efectos nocivos, importancia médica, industrial e incluso efectos sobre alimentos y cosméticos).

Está dirigido principalmente a los alumnos que cursan el sexto semestre de la carrera de Química Farmacéutico Biológica (Q.F.B.) en el módulo de Microbiología General I, ya que en este módulo tiene su primer contacto con este tipo de microorganismos, así como a las personas que tengan interés en el tema o requieran de dicha información, esperando también sea de gran utilidad en los módulos subsecuentes como lo son Microbiología Médica (Orientación Farmacia Clínica), Microbiología Médica (Orientación Bioquímica Clínica) y Microbiología Farmaceutica (Orientación Farmacia Industrial) impartidos en el octavo y noveno semestre de la carrera de Q.F.B.

De ninguna manera este Manual pretende sustituir a la bibliografía especializada, ni es un Manual de diagnóstico es un apoyo para los estudiantes y personas interesadas en el tema.

ROGELIO EMANUEL JUÁREZ VELÁZQUEZ

A person wearing a blue lab coat and gloves is holding a petri dish containing several bacterial cultures. The cultures are visible as white, fuzzy growths on the agar surface. The background is a blurred laboratory setting with another person in a white lab coat.

CAPITULO 1
GENERALIDADES DE LAS BACTERIAS ANAEROBIAS

CAPÍTULO I

GENERALIDADES DE LAS BACTERIAS ANAEROBIAS.

Aunque las bacterias anaerobias fueron descubiertas a finales del siglo XIX, en la época dorada de la microbiología, no fue hasta los años 70 cuando se sentaron las bases del conocimiento actual. El grupo del Instituto Politécnico de Virginia en los Estados Unidos estableció los principios de la moderna taxonomía y clasificación y desarrolló un sistema que permitía el aislamiento de las especies más sensibles al oxígeno. Los investigadores del Laboratorio Wadsworth de la UCLA pusieron en marcha una metodología más sencilla, al alcance de muchos laboratorios de microbiología, e investigaron el papel de estos microorganismos en diversas infecciones humanas. Otros equipos, americanos y de otros países, contribuyeron a ampliar su conocimiento. En el momento actual el interés por las bacterias anaerobias ha disminuido, sin duda porque en el pasado se sobredimensionó su importancia clínica, porque su conocimiento ha permitido el establecimiento de pautas de quimioprofilaxis eficaces para las infecciones con un origen quirúrgico, porque se estudia sistemáticamente la sensibilidad a los antimicrobianos de las especies más resistentes y esto permite tener datos para establecer terapias empíricas con altos porcentajes de éxito y porque el trabajo con anaerobios sigue siendo lento e incluso desesperante cuando se intenta llegar a un diagnóstico de especie.¹

Se puede definir a las bacterias anaerobias como aquellas que para crecer en la superficie de un medio de cultivo necesitan una atmósfera sin oxígeno, ya que este elemento es tóxico para ellas. Con estos dos conceptos se puede inferir que existe un amplio abanico de microorganismos, desde los muy tolerantes y resistentes hasta los extremadamente lábiles a este gas.

El hábitat de las bacterias anaerobias está limitado a zonas corporales del hombre y de los animales donde la tensión de oxígeno es baja. Forman parte de la microbiota normal como comensales y mutualistas, jugando un importante papel en la resistencia inespecífica a la infección. Son particularmente frecuentes en la boca (especialmente en la placa dental sobre todo en su porción subgingival) y en las vías respiratorias altas, vagina e intestino (en especial en colon, recto y en las heces, donde superan a los aerobios y a los microorganismos facultativos). A partir de aquí pueden contaminar de forma pasajera la piel, sobre todo la del periné. La piel es pobre en anaerobios permanentes, el más significativo es *Propionibacterium acnes* que vive en las glándulas sebáceas. Desde estas localizaciones, particularmente del tubo digestivo, son eliminados muriendo en el ambiente, con la excepción de los clostridios que sobreviven gracias a la formación de esporas y que por ellas forman parte de la biota telúrica y ambiental. La colonización inicial se realiza por transmisión directa, aunque no necesariamente en el caso de los clostridios. Las infecciones las producen a partir de estos hábitats.¹

Las bacterias anaerobias juegan un papel importante en la Patogenicidad de una amplia variedad de infecciones mixtas, donde se ven involucradas bacterias aerobias y anaerobias, tales como neumonía por aspiración, infecciones intra abdominales, infecciones ginecológicas, de piel y partes blandas. Sin embargo, hay otros procesos en los que raramente se hallan implicadas estas bacterias y que debemos también considerar, como meningitis, endocarditis y artritis séptica². Estos microorganismos forman parte de la biota normal en diversas partes del cuerpo humano, siendo especialmente abundantes en el tracto gastrointestinal, la cavidad oral, piel y mucosas, convirtiéndose en patógenos oportunistas cuando se ven favorecidos por factores predisponentes, tales como la disrupción de mucosas, lo cual les permite acceder a tejidos normalmente estériles, y el uso de antibióticos con bajo o ningún espectro de acción sobre anaerobios, lo cual les facilita la proliferación por eliminación de la biota asociada^{3,4}. Estos factores, sumados a otros como la baja tensión de oxígeno, hacen que la mayoría de las infecciones anaeróbicas se originen a partir de miembros de la biota endógena del organismo.¹



Figura 1.1 *Clostridium novyi* en agar yema de huevo.¹

Dado que las bacterias anaerobias son oportunistas, es difícil muchas veces demostrar su Patogenicidad, ya que forman parte de la biota habitual del cuerpo humano y se aíslan generalmente junto con otras bacterias. Los avances en los medios diagnósticos conseguidos en los últimos años, especialmente de las técnicas microbiológicas y la utilización de los métodos fenotípicos clásicos nos permite, en muchas ocasiones, llegar a una correcta identificación bacteriana a nivel de especie. Los métodos moleculares desarrollados a lo largo de la última década nos han proporcionado un mejor conocimiento de la composición bacteriana y como consecuencia, la posibilidad de realizar una identificación correcta a nivel de especie de determinadas bacterias anaerobias, así como de caracterizar nuevos géneros y especies implicadas en la patología infecciosa.¹

1.1. METABOLISMO MICROBIANO

En esencia, el metabolismo bacteriano abarca todos los procesos celulares requeridos para la supervivencia y replicación del microorganismo. La familiaridad con el metabolismo bacteriano es esencial para comprender las interacciones de las bacterias con las células del hospedero, los mecanismos que usan para causar la enfermedad, y para comprender las bases de las pruebas del diagnóstico microbiológico y las estrategias utilizadas para la identificación de las etiologías infecciosas en el laboratorio. Con el propósito de simplificar, el metabolismo se trata en términos de cuatro procesos principales, si bien interdependientes: nutrición, biosíntesis, polimerización y ensamblaje.¹ (Vease fig. 1.2)

Los anaerobios en general poseen un metabolismo de tipo fermentativo, en el cual sustancias orgánicas son los aceptores finales de electrones, aunque también pueden obtener energía a partir de la respiración anaerobia. Otras características comunes a los microorganismos anaerobios son sus requerimientos nutricionales complejos, su lento crecimiento y su labilidad, lo cual, sumado a sus requerimientos atmosféricos estrictos (de O₂ y CO₂) hace que su aislamiento sea difícil; además, al ser la mayoría de las infecciones mixtas (aerobios y anaerobios) otros microorganismos menos exigentes y de crecimiento más rápido pueden crecer e inhibirlos si no se toman las precauciones necesarias.^{3,5}

Los plásmidos están ampliamente difundidos entre los anaerobios especialmente a nivel de especies de *Clostridium sp* y *Bacteroides sp*.

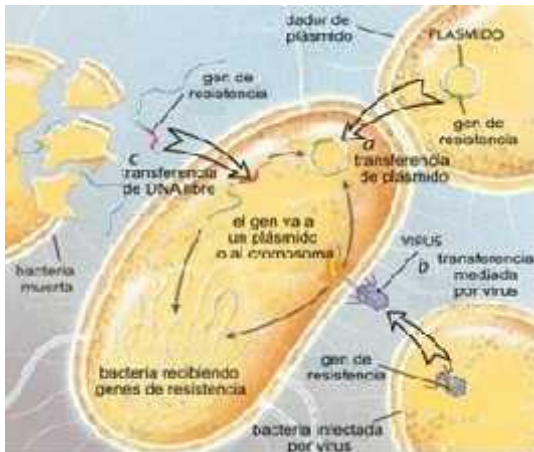


Figura 1.2 Mecanismos de transferencia de plásmidos.²

Un muy buen porcentaje de estos elementos no han demostrado funciones específicas. Entre los plásmidos funcionalmente conocidos encontramos:

- Plásmidos que codifican la producción de bacteriocinas. Similares a las colicinas, son producidas por especies de *Clostridium sp* y *Bacteroides sp*.
- Plásmidos toxigénicos, ampliamente distribuidos entre las especies de *Clostridium sp* productoras de exotoxinas (toxigénicas). La correlación fehaciente entre plásmido y producción de toxina no se ha podido establecer en muchos casos. El caso con más evidencia de la relación plásmido-toxina es el de *Clostridium tetani* donde puede afirmarse que la toxina tetánica está codificada en un plásmido.
- Plásmidos que codifican la resistencia a los antibióticos. Existen evidencias de que entre diferentes especies de *Clostridium sp*, *Bacteroides sp* y cocos

anaerobios existen plásmidos de diferente tamaño que codifican la resistencia a macrólidos, tetraciclinas y cloramfenicol.¹

1.2. FACTORES DE VIRULENCIA

Se pueden separar en dos categorías según su importancia. Por un lado existen las poderosas toxinas producidas por los clostridios; por otro, una serie de estructuras y sustancias de mucho menor poder patógeno que se observan en varias especies de microorganismos no esporulados.¹

Se conocen los lipopolisacáridos de superficie de varias especies de *Fusobacterium sp*, *Veillonella sp* y *Bacteroides sp*. Estas sustancias tienen una actividad “endotoxina” similar a las de los bacilos gramnegativos facultativos. Su actividad es algo menos potente pero se ha demostrado su capacidad (en *Bacteroides sp*) de participar en la producción de abscesos y de causar hipercoagulabilidad.¹

El polisacárido capsular de *Bacteroides* del grupo *fragilis* (Vease fig. 1.3) es otro factor de virulencia importante, ya que se comporta en forma similar a las cápsulas de otras bacterias, es decir, le confiere al germen “la lanza y el escudo” en cuanto favorece su poder invasivo y dificulta la acción defensiva de los leucocitos polimorfonucleares. Aun más, está claramente demostrada su participación en la formación de abscesos.⁶

Diversas enzimas producidas por los microorganismos anaerobios deben considerarse como factores de virulencia: colagenasas, hialuronidasas, DNAsas, elastasas, heparinasas son las principales. También deben incluirse aquellas enzimas que protegen contra la acción letal del O₂ tales como catalasa y superóxido-dismutasa, en cuanto permiten la sobrevivencia del germen en un ambiente adverso hasta que se presenten las condiciones favorables. Estos factores de virulencia no deben considerarse como “toxinas”.¹



Figura 1.3 *Bacteroides fragilis*³

Las vías metabólicas en esta categoría son las que involucran la adquisición de nutrientes desde el medio ambiente, la producción de metabolitos precursores y la producción de energía.^{8,9}

Las bacterias utilizan varias estrategias para obtener los nutrientes esenciales desde el medioambiente, pero el objetivo común es transportar estas sustancias desde el ambiente externo hacia el interior de la célula. Para que los nutrientes sean internalizados deben atravesar las envolturas de la célula bacteriana, una estructura compleja que protege la célula de las agresiones medioambientales, mantiene el equilibrio intracelular y transporta las sustancias hacia el interior o el exterior de la célula. Aunque algunos nutrientes claves, como el agua, el oxígeno y el dióxido de carbono entran en la célula por difusión simple a través de las capas de envoltura, la captación de otras sustancias requiere energía y selectividad por las envolturas de la célula.^{1,2,11}

El transporte activo figura entre los métodos más comunes para captar nutrientes, como algunos azúcares, la mayoría de los aminoácidos, ácidos orgánicos y muchos iones inorgánicos. (Vease fig. 1.4)

El mecanismo, que es manejado por una bomba dependiente de energía, involucra moléculas transportadoras incluidas en la porción de la membrana de la envoltura celular. Estos transportadores se combinan con los nutrientes, los transportan a través de la membrana y los liberan dentro de la célula. La translocación del grupo es otro mecanismo de transporte que requiere energía, pero difiere del transporte activo en que el nutriente a transportar sufre una modificación química. Muchos azúcares, purinas y pirimidinas, y ácidos grasos, son transportados por este mecanismo⁷.

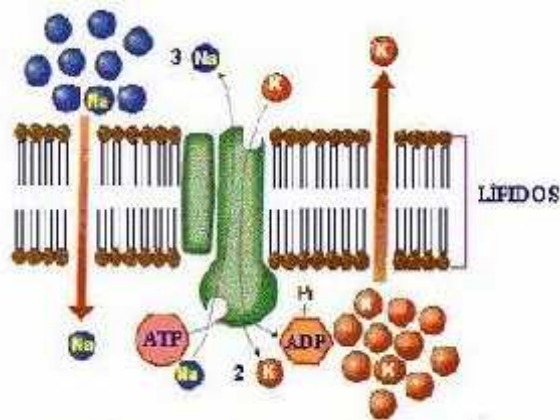


Figura 1.4. Transporte activo⁴

1.3. PRODUCCIÓN DE PRECURSORES DE METABOLITOS

Una vez dentro de la célula muchos nutrientes pasan a ser materias primas a partir de las cuales se producen precursores de metabolitos para los procesos biosintéticos posteriores. Estos metabolitos, enumerados en la figura 1.5, son producidos por tres vías metabólicas centrales: la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y la vía de la pentosa fosfato. Estas vías metabólicas y su relación entre sí se muestran en la figura 1.5; no figuran las diversas vías metabólicas alternativas (p. ej., la vía de Entner-Doudoroff) que desempeña papeles claves en el direccionamiento y el reabastecimiento de los precursores a medida que son utilizados en procesos posteriores. La eficacia de la producción de una célula bacteriana, como resultado de estas vías metabólicas productoras de precursores, puede variar de manera sustancial, lo que depende de las condiciones de crecimiento y disponibilidad de nutrimentos. Ésta es una consideración importante, debido a que la identificación

exacta de las bacterias de interés en medicina a menudo depende en gran parte de los métodos que miden la presencia de productos y subproductos de estas vías metabólicas.^{1,9,13}

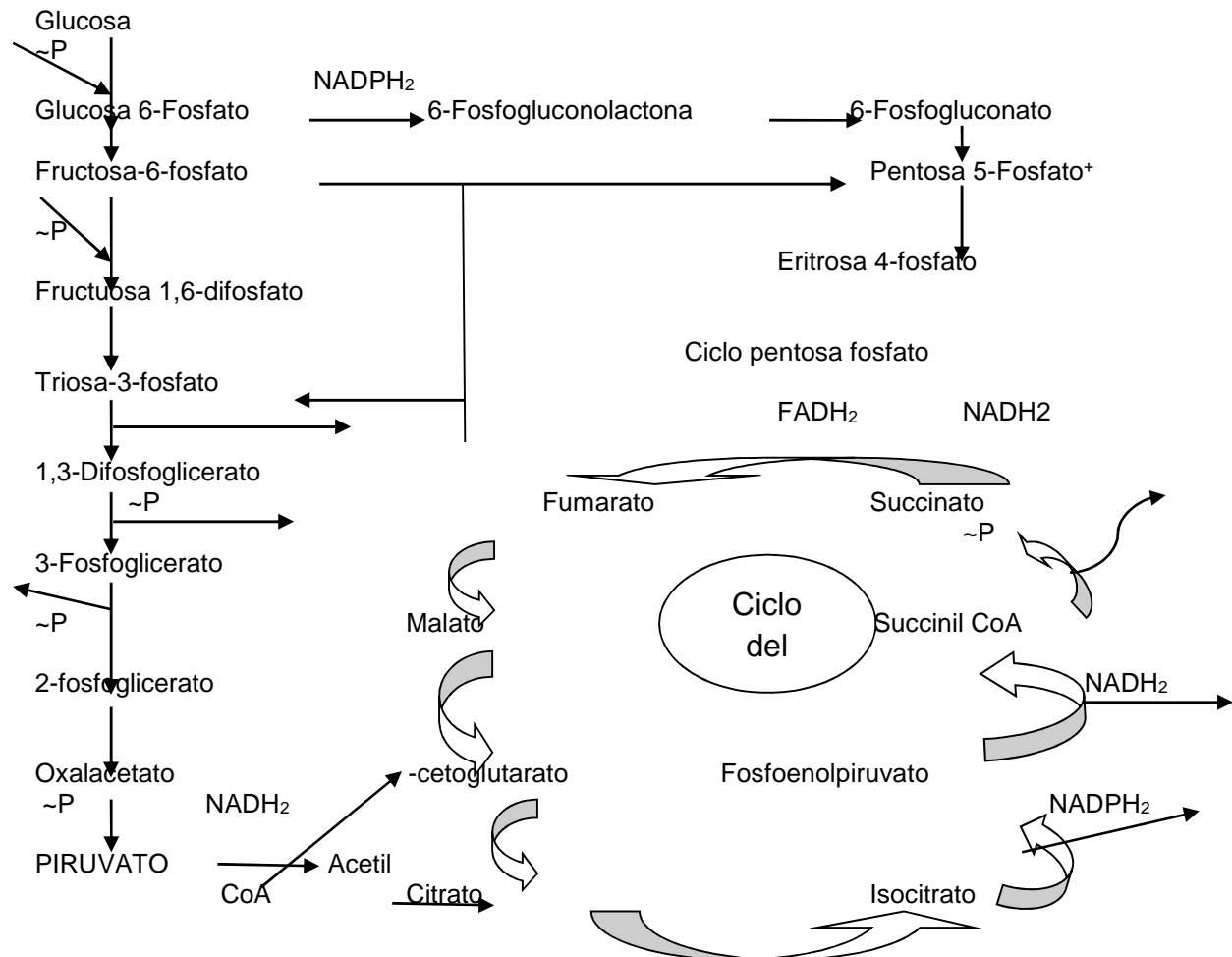


Fig. 1.5 Ciclo de las vías Embden-Meyerhof- Parnas (EMP), el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y la vía de la pentosa fosfato.⁵

1.4. PRODUCCIÓN DE ENERGÍA

El tercer tipo de las vías metabólicas es el que produce energía, necesaria para casi todos los procesos celulares, que incluye los otros dos tipos de vías metabólicas recién descritos, o sea la captación de nutrimentos y la producción de precursores. La producción de energía se lleva a cabo por la degradación de sustratos químicos (energía química) por medio de los procesos de degradación del catabolismo junto con las reacciones de oxidación-reducción. En este proceso la molécula fuente de energía (sustrato) es oxidada (dona electrones) a otra molécula que los acepta y entonces es reducida. La transferencia de electrones está mediada por moléculas transportadoras, como el nicotinamida-adenina dinucleótido (NAD⁺) y el nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (NADP⁺). La energía liberada por la reacción de oxidación-reducción es transferida a los compuestos que contienen fosfato, donde se forman uniones de fosfato de alta energía. El trifosfato de adenosina (ATP) es la más común de estas moléculas; por último, la energía contenida en este compuesto es liberada por hidrólisis en condiciones controladas. La liberación de esta energía química y las actividades enzimáticas catalizan de manera específica cada reacción bioquímica dentro de la célula y regula casi todas las reacciones celulares. En las células bacterianas los dos mecanismos generales para la producción de ATP son la fosforilación a nivel del sustrato y el transporte de electrones, también denominada fosforilación oxidativa. En la fosforilación a nivel del sustrato las uniones fosfato de alta energía producidas por las vías metabólicas centrales son donadas al difosfato de adenosina (ADP) para formar ATP. Además, el piruvato, un intermediario fundamental en las vías metabólicas centrales, sirve como sustrato inicial para varias otras vías que también pueden generar ATP por la fosforilación a nivel del sustrato.^{1,4,15}

Estas otras vías metabólicas constituyen el metabolismo fermentativo, que no requiere oxígeno y genera diversos productos finales, como alcoholes, ácidos, dióxido de carbono e hidrógeno.^{7,9,15}

Las vías metabólicas fermentativas específicas utilizadas y por ende los productos terminales generados, varían con las diferentes especies bacterianas. Detectar estos productos es una base importante para la identificación de las bacterias en el laboratorio. La fosforilación oxidativa comprende un sistema de transporte de electrones que dirige una serie de transferencias de electrones, desde las moléculas transportadoras reducidas como NADH₂ y NADPH₂, producidas en las vías metabólicas centrales (véase fig. 1.5), hasta un aceptor terminal de electrones. La energía producida por la serie de reacciones de oxidación-reducción se utiliza para generar ATP a partir del ADP. Cuando la fosforilación oxidativa utiliza oxígeno como aceptor terminal de electrones, el proceso se conoce como respiración aerobia. La respiración anaerobia abarca los procesos que utilizan aceptores terminales de electrones distintos del oxígeno. Es importante conocer los mecanismos que las bacterias utilizan para generar ATP para el diseño de los protocolos del laboratorio para el cultivo y la identificación de estos microorganismos. Por ejemplo, algunas bacterias dependen solo de la

respiración aerobia y no pueden crecer en ausencia de oxígeno (bacterias aerobias estrictas). Otras pueden utilizar la respiración aerobia o la fermentación, lo que depende de la disponibilidad de oxígeno (bacterias anaerobias facultativas). Aun para otras el oxígeno es completamente tóxico (bacterias anaerobias estrictas).^{1,15}

1.5. BIOSÍNTESIS

Las reacciones de nutrición reúnen en esencia todas las materias primas necesarias para comenzar y mantener todos los otros procesos celulares. La producción de precursores y energía se lleva a cabo sobre todo por Procesos catabólicos que involucran la degradación de moléculas sustrato. Las tres vías metabólicas principales remanentes, biosíntesis, polimerización y ensamblaje, dependen del metabolismo anabólico, en el que los compuestos precursores se reúnen para la creación de moléculas más grandes (polímeros) necesarias para el ensamblaje de las estructuras celulares. Los procesos biosintéticos utilizan los 12 productos precursores en docenas de vías metabólicas para producir casi 100 ladrillos diferentes, como aminoácidos, ácidos grasos, azúcares y nucleótidos.^{1,3,12}

Muchas de estas vías metabólicas son muy complejas e interdependientes, otras son casi por completo independientes. En muchos casos las enzimas que dirigen las vías metabólicas individuales son codificadas en una sola molécula del mRNA, que ha sido cotranscripta a partir de los genes contiguos en el cromosoma bacteriano (un operón). Como se mencionó en las vías metabólicas de la nutrición, los géneros y especies bacterianos tienen amplias variaciones en sus capacidades biosintéticas. Es necesario conocer estas variaciones para garantizar el diseño de condiciones óptimas para el crecimiento de microorganismos en el laboratorio. Por ejemplo, es probable que algunos microorganismos no sean capaces de sintetizar un aminoácido en particular, que es un ladrillo necesario para varias proteínas esenciales. Sin la capacidad de sintetizar el aminoácido, la bacteria debe obtener ese ladrillo del ambiente. De manera similar, si se pretende que este microorganismo se desarrolle en el laboratorio de microbiología, debe agregar el aminoácido en los medios de cultivo.^{7,9,15}



Figura 1.6 Cámara para el cultivo de anaerobios⁶

1.6. POLIMERIZACIÓN Y ENSAMBLAJE

Diversas reacciones anabólicas ensamblan (polimerizan) los ladrillos en macromoléculas que incluyen lípidos, lipopolisacáridos, polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos. Esta síntesis de macromoléculas está dirigida por la energía y la actividad enzimática dentro de la célula. De manera similar, la energía y las actividades también conducen el ensamblaje de estas diversas macromoléculas

hacia el interior de las estructuras que componen la célula bacteriana. O sea que las estructuras celulares son el producto de todos los procesos genéticos y metabólicos mencionados.^{2,5,7}

Antes de analizar la estructura celular bacteriana es útil realizar una descripción general de las células. Sobre la base de las características más importantes, todas las células se clasifican en dos tipos básicos: procariontes y eucariontes. Aunque estos dos tipos celulares comparten muchas características comunes, también hay muchas diferencias importantes en lo que se refiere a la estructura, el metabolismo y la genética.^{6,8,10}

1.7. CÉLULAS EUKARIONTES y PROCARIONTES

Entre los microorganismos que revisten importancia clínica, las células bacterianas son procariontes, mientras que las células de los parásitos y de los hongos son eucariontes, como las de las plantas y los animales superiores. Los virus son acelulares y para su supervivencia dependen de las células huésped. Aunque no se detallarán las diferencias entre las células eucariontes y las procariontes, ellas influyen de manera sustancial en la capacidad de los microorganismos para causar enfermedad, para diagnosticar, tratar y controlar estas enfermedades.

Una característica notable de las células eucariontes, como la de los parásitos y hongos, es la presencia de orgánulos encerrados en membranas que tienen funciones celulares específicas.¹ (Vease cuadro. 1.1)

Cuadro 1.1 Comparación de las características de células eucariotas y procariontes

Característica	Procariontes	Eucariotas
Núcleo	-	✓
Nucleolo	-	✓
DNA	Un solo cromosoma circular, bicatenario unido a la membrana celular posibles plásmidos circulares adicionales	Varios cromosomas lineares en el núcleo
Proteínas de unión al DNA	No histonas	Histonas
Pared celular	Peptidoglicano	Composición variable
Membrana celular		
Fosfolípidos	✓	✓
Proteínas	✓	✓
Esteroles	-	✓
Endo- y exocitosis	-	✓
Membrana citoplasmática		
Retículo endoplasmático	-	✓
Aparato de Golgi	-	✓
Mitocondrias	-	✓
Cloroplastos	-	✓
Ribosomas	70s	80s (en citosol)
Intrones	-	✓
Citoesqueleto interno		
Microtúbulos	-	✓
Microfilamentos	-	✓
Propagación	Asexual, parasexual, sin meiosis	Sexual, meiosis
Intercambio genérico	Unidireccional o bidirecciones	Zigoto
Organización	Células unicelulares (o en cadenas cortas)	Multicelular (en complejos altamente diferenciados)
Tamaño (diámetro x longitud)	1 μm – 2 μm	20 μm – 20 o hasta 200 μm

Los ejemplos de estos orgánulos y sus funciones respectivas son:

Retículo endoplasmático: procesa y transporta las proteínas.

Aparato de Golgi: procesa las sustancias para el transporte fuera de la célula

Mitocondria: genera energía (ATP).

Lisosomas: proporcionan el ambiente para la degradación enzimática controlada de las sustancias intracelulares.

Núcleo: proporciona el cercamiento de la membrana para los cromosomas.

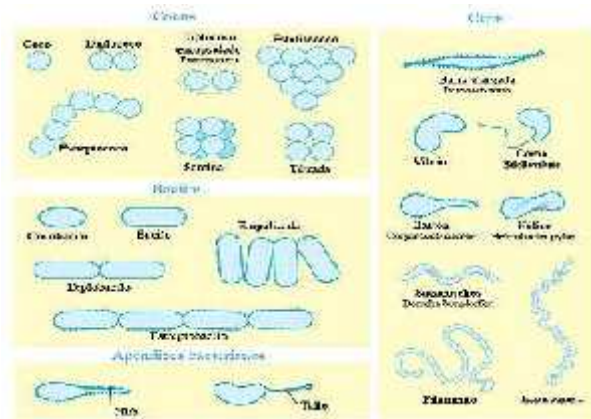
Además las células eucariontes tienen una infraestructura o cito esqueleto que proporciona el soporte para los diferentes orgánulos. Las células procariontes, como las de las bacterias, no contienen orgánulos. Todas las funciones tienen lugar en el citoplasma o membrana citoplasmática de la célula. Los tipos celulares procariontes y eucariontes difieren de manera considerable a nivel macromolecular, de la maquinaria para la síntesis proteica, organización cromosómica y expresión génica. Así mismo, una estructura importante presente

sólo en las células bacterianas pero ausente entre los eucariontes es una pared celular compuesta por peptidoglucanos. Como se verá muchas veces, esta estructura sola tiene un impacto inconmensurable en la práctica de la bacteriología diagnóstica y en el tratamiento de las enfermedades bacterianas.^{8,11,15}

1.8. MORFOLOGÍA BACTERIANA

La mayoría de las especies bacterianas clínicamente importantes tiene un tamaño que varía de 0,25 a 1 μm de ancho, y 1 a 3 μm de longitud, razón por la cual se requiere de la microscopía para su visualización. Así como las especies y géneros bacterianos tienen diferentes procesos metabólicos, sus células también varían en tamaño, morfología, disposición intercelular y en la composición de una de las estructuras celulares más importantes: la pared celular. De hecho, las diferencias de la pared celular proporcionan la base de la tinción de Gram, la prueba más importante utilizada en los esquemas de identificación bacteriana.

Este procedimiento de tinción separa casi todas las bacterias importantes desde el punto de vista médico en dos tipos generales: bacterias Gram positivas, que se tiñen de un color azul oscuro, y bacterias Gram negativas, que se tiñen de un color rosa a rojo.^{1,5,9}



Este procedimiento de tinción separa casi todas las bacterias importantes desde el punto de vista médico en dos tipos generales: bacterias Gram positivas, que se tiñen de un color azul oscuro, y bacterias Gram negativas, que se tiñen de un color rosa a rojo.^{1,5,9}

Figura 1.8 Agrupaciones de las bacterias.⁷

Esta simple pero importante distinción de color se debe a las diferencias en los componentes de las paredes celulares bacterianas que influyen en la capacidad de la célula para retener ciertos colorantes, aun después de la decoloración con el alcohol. Las morfologías celulares bacterianas comunes son los cocos (redondos), los cocobacilos (ovoides) y los bacilos (con forma alargada), además de formas fusiformes (extremos puntiagudos), curvas o espiraladas.^{10,14} (Vease fig. 1.8)

Las disposiciones celulares también son dignas de mención, debido a que las células pueden aparecer con patrones característicos: en forma individual, en pares, en tétradas, en racimos o en cadenas. La determinación de la reacción de Gram junto con el tamaño celular, la morfología y la disposición son los aspectos esenciales de la identificación bacteriana.^{1,6,9,14} (Vease fig. 1.8)

1.9. COMPONENTES CELULARES BACTERIANOS

Los componentes celulares bacterianos pueden dividirse entre los que constituyen la envoltura celular y sus apéndices, y los asociados con el interior de

la célula. Es importante destacar que las estructuras celulares actúan en conjunto para funcionar como una unidad compleja e integrada.¹⁵

ENVOLTURA CELULAR

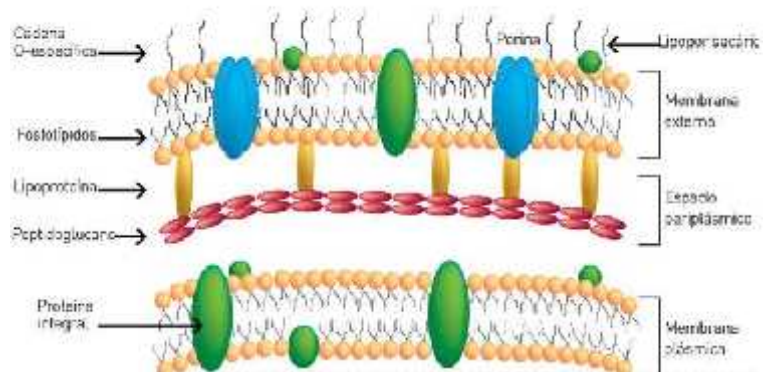
La estructura más externa, la envoltura celular, comprende:

- Una membrana externa (sólo en las bacterias Gram negativas)
- Una pared celular compuesta por la macromolécula peptidoglucano (también conocida como *capa de mureína*)
- Periplasma (solo en las bacterias Gram negativas) (Vease fig. 1.9)

Figura 1.9 Representación de la membrana bacteriana⁸

Las membranas externas solo se encuentran en las bacterias Gram negativas, actúan como barrera inicial de la célula contra el ambiente. Estas membranas sirven como barreras de permeabilidad primarias contra los compuestos hidrófilos e hidrófobos, y también retienen las enzimas esenciales y otras proteínas localizadas en el espacio peri plasmático. La membrana es una estructura en bicapa, compuesta por lipopolisacáridos, que otorga a la superficie de las bacterias Gram negativas una carga neta negativa y también desempeña un papel significativo en la capacidad de ciertas bacterias para causar enfermedad.^{1,7,9,15}

MEMBRANA EXTERNA DE LAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS



Esparcidas a lo largo de las macromoléculas de lipopolisacáridos están las estructuras de proteínas de controlan el pasaje de nutrientes y otros solutos, incluso los antibióticos, a través de la membrana externa. La cantidad y tipos de porinas varían con las especies bacterianas; estas diferencias pueden influir de manera sustancial sobre hasta qué punto las diversas sustancias atraviesan las membranas externas de las diferentes bacterias. Además de las porinas, otras proteínas (las lipoproteínas mureína) facilitan la adherencia de la membrana externa a la próxima capa más profunda en la envoltura celular, la pared celular.¹⁵

PARED CELULAR

La pared celular, también denominada peptidoglucano o capa de mureína, es una estructura esencial presente en casi todas las bacterias clínicamente importantes. Esta estructura otorga forma y rigidez a la célula bacteriana para resistir los cambios en las presiones osmóticas medioambientales que de otro modo producirían la lisis celular. La capa de mureína también protege contra la

ruptura mecánica de la célula y ofrece una barrera parcial al pasaje de sustancias más grandes.^{1,3,5}

Dado que esta estructura es esencial para la supervivencia de las bacterias, su síntesis y estructura han sido el blanco principal para el desarrollo y diseño de diversos agentes antimicrobianos. La estructura de la pared celular tiene características singulares en lo que respecta a su naturaleza y está compuesta por subunidades de disacáridos-pentapéptidos. Los disacáridos *N-acetilglucosamina* y ácido *N-acetilmurámico* son componentes (moléculas) de azúcares alternados, con la cadena de aminoácidos unida sólo al ácido *N-acetilmurámico*. Los polímeros de estas subunidades se entrelazan entre sí por medio de puentes peptídicos para formar las hojas de peptidoglucano.⁷

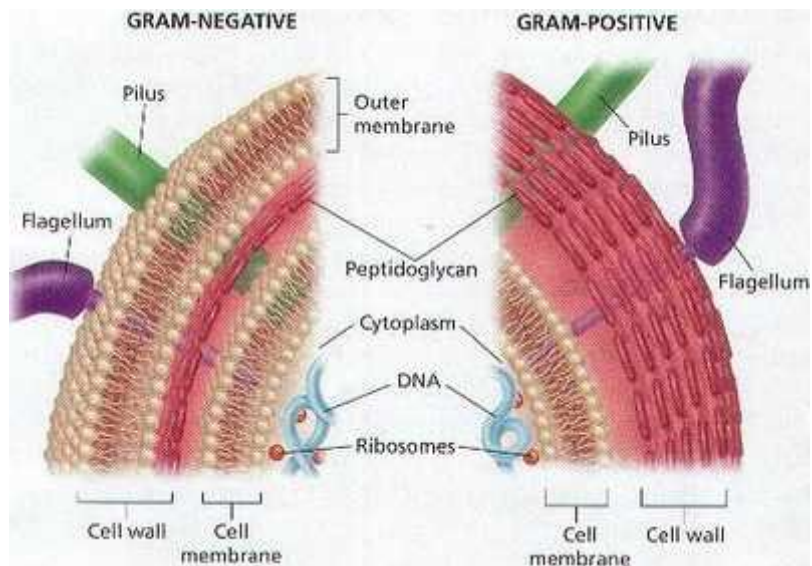


Figura 1.10 Diferencias entre Gram negativa y Gram positiva⁹

Las capas de estas hojas a su vez están entrelazadas entre sí para dar una estructura entretejida en multicapa bastante rígida. Esta estructura de peptidoglucano rodea la célula en su totalidad. Una diferencia notable entre las paredes celulares de las bacterias Gram positivas y Gram negativas es que la capa de peptidoglucano en las bacterias Gram positivas es mucho más gruesa. Además, la pared celular de las bacterias Gram positivas contiene los ácidos teicoicos (polímeros de fosfato de glicerol o ribitol combinados con diversos azúcares, aminoácidos y amino azúcares).^{1,5,9,10} (Vease fig. 1.10)

Algunos ácidos teicoicos están unidos al ácido *N-acetilmurámico* y otros (p. ej., ácidos lipoteicoicos) están unidos a la próxima capa subyacente, la membrana celular. Otras bacterias Gram positivas (p. ej., micobacterias) refuerzan su capa de mureína con sustancias ceras, como los ácidos micólicos, que hacen que estas células sean aun más refractarias a las sustancias tóxicas, incluso los ácidos.^{1,8}

ESPACIO PERIPLASMÁTICO

El espacio periplasmático solo se encuentra en las bacterias Gram negativas; está limitado por la superficie interna de la membrana externa y la superficie interna de la membrana celular. Esta región, que contiene la capa de mureína, no es exactamente un espacio vacío sino que está constituido por

sustancias similares a un gel, que ayudan a captar nutrientes desde el medioambiente. Este espacio también contiene varias enzimas que degradan macromoléculas y desintoxican solutos del medio ambiente, incluso los antibióticos que atraviesan la membrana externa.^{1,9,15}

MEMBRANA CITOPLASMÁTICA

La membrana citoplasmática está presente tanto en las bacterias Gram positivas como en las Gram negativas y es la capa más profunda de la envoltura celular. En ambos tipos bacterianos la estructura de la membrana celular es en esencia la misma. Esta bicapa lipídica se liga con firmeza con varias proteínas, incluso con una serie de enzimas vitales para el metabolismo celular.^{1,7,9}

Además de constituir una barrera osmótica adicional, la membrana citoplasmática es similar, desde el punto de vista funcional, a varios orgánulos de las células eucariontes (p. ej., mitocondrias, complejo de Golgi, lisosomas). Las funciones de la membrana citoplasmática incluyen:

- Transporte de solutos hacia el interior y exterior de la célula
- Alberga enzimas involucradas en la síntesis de la membrana externa, la síntesis de la pared celular y en el ensamblaje y secreción de sustancias extra citoplasmáticas y extracelulares.
- Genera energía química (ATP)
- Participa en la movilidad celular.
- Mediación de la segregación cromosómica durante la replicación
- Alberga sensores moleculares que controlan los cambios químicos y físicos en el medioambiente.

APÉNDICE CELULAR

Además de los componentes de la envoltura en sí, también hay apéndices celulares (cápsulas, fimbrias y flagelos) que están asociados con esta porción de la célula o muy próximos a ella. La presencia de estos apéndices accesorios, que pueden participar en la producción de infecciones y en la identificación en el laboratorio, varía entre las especies bacterianas e incluso entre las cepas dentro de las mismas especies.^{1,5,8,9} (Vease fig. 1.11)

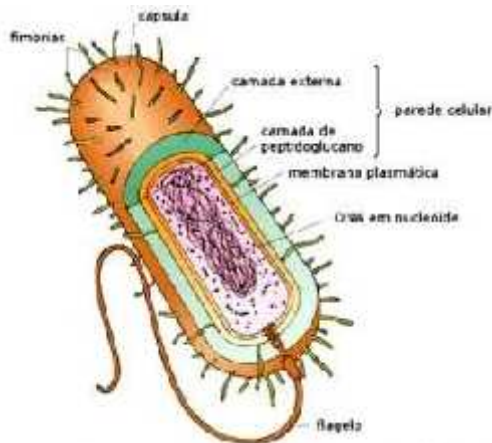


Figura 1.11 Fimbrias¹⁰

La cápsula se ubica inmediatamente por fuera de la capa de mureína de las bacterias Gram positivas y de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Esta capa a menudo se denomina slime (fango) y está compuesta por polisacáridos de alto peso molecular cuya producción

puede depender del medioambiente y las condiciones de crecimiento que rodean la célula bacteriana. La cápsula no funciona como una barrera de permeabilidad efectiva ni agrega rigidez a la envoltura celular, pero protege a la bacteria del ataque por las células del sistema inmune; también facilita y mantiene la colonización bacteriana de las superficies biológicas (dientes) y las superficies de objetos inanimados como dispositivos médicos implantados (p. ej., prótesis de válvulas cardíacas mediante la formación de películas biológicas).^{1,3,6}

Las fimbrias o Pili son estructuras proteináceas, similares a pelos, que se extienden desde la membrana celular al ambiente externo; algunos pueden tener hasta 2 μ de longitud. Se conocen dos tipos generales:

Pili comunes y Pili sexuales. Los comunes son adhesinas que permiten que las bacterias se adhieran a las superficies de las células huésped de origen animal, a menudo el primer paso para establecer la infección. El pili sexual, típico en el bacilo gramnegativo *Escherichia coli*, sirve como canal para el pasaje del DNA del donante al receptor durante la conjugación.^{1,9,15}

Los flagelos son estructuras complejas, compuestos sobre todo por la proteína flagelina, anclados de manera intrincada en la envoltura celular. De estas

estructuras depende la movilidad bacteriana. Si bien no todas las bacterias son móviles, la movilidad desempeña un papel importante en la supervivencia y la capacidad de ciertas bacterias para causar enfermedad.^{1,6,9}

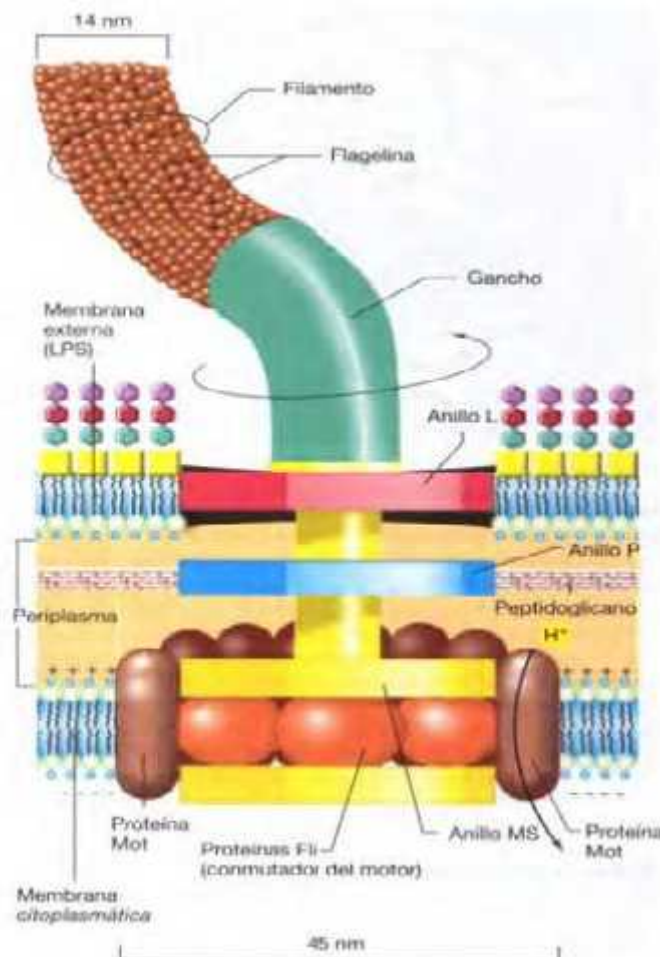


Figura 1.12 Flagelo bacteriano¹¹

De acuerdo con las especies bacterianas, los flagelos pueden localizarse en un extremo de la célula (flagelos monotricos) o en ambos extremos de la célula (flagelos lofotricos), o cubren toda la superficie celular (flagelo peritricos).^{1,5,7,9} (Vease fig. 1.12)

ESPACIO INTRACELULAR

Las estructuras y sustancias limitadas por la membrana citoplasmática componen el interior de la célula e incluyen el citosol, los polisomas, las inclusiones, el nucleoide, los plásmidos y las endosporas. El citosol, donde se producen casi todas las otras funciones que no se realizan en la membrana celular, contiene miles de enzimas y es el sitio de la síntesis proteica. Tiene un aspecto granular, causado por la presencia de muchos polisomas (complejos de mRNA con diversos ribosomas durante la traducción y síntesis proteica) e inclusiones (gránulos de depósito de reservas). La cantidad y naturaleza de las inclusiones varían, lo que depende de las especies bacterianas y del estado nutricional del ambiente del microorganismo.¹⁵ (Vease fig. 1.13)

Dos tipos comunes de gránulos son los de glucógeno, una forma de almacenamiento de glucosa y los gránulos de polifosfato, una forma de almacenamiento de los fosfatos inorgánicos, visibles en ciertas bacterias por microscopia con colorantes específicos. A diferencia de los cromosomas de los eucariontes, el cromosoma bacteriano no está encerrado dentro de un núcleo limitado por una membrana. En cambio existe como un nucleoide en el cual el DNA muy enrollado está entremezclado con RNA, poliaminas y diversas proteínas que proporcionan sostén estructural. A veces, dependiendo de la fase de división celular, puede haber más de un cromosoma por célula bacteriana. Los plásmidos son los otros elementos genéticos que existen en forma independiente en el citosol y sus cantidades pueden variar de ninguno a varios por célula bacteriana.¹²

La estructura bacteriana final a considerar es la endospora. En condiciones físicas y químicas adversas, o cuando los nutrientes son escasos, algunos géneros bacterianos pueden formar esporas. La esporulación implica cambios metabólicos y estructurales sustanciales en la célula bacteriana.^{1,3,9,14}

En esencia, la célula pasa de un estado de crecimiento con metabolismo activo a un estado inactivo, con una disminución en el citosol y un aumento simultáneo en el espesor y rigidez de la envoltura celular. El estado de la spora se mantiene hasta que aparezcan de nuevo las condiciones favorables para el crecimiento. Esta táctica de supervivencia está demostrada en una cantidad de bacterias clínicamente importantes y con frecuencia desafía nuestra capacidad de esterilizar de manera cuidadosa los materiales y alimentos utilizados en seres humanos.^{1,7,9}

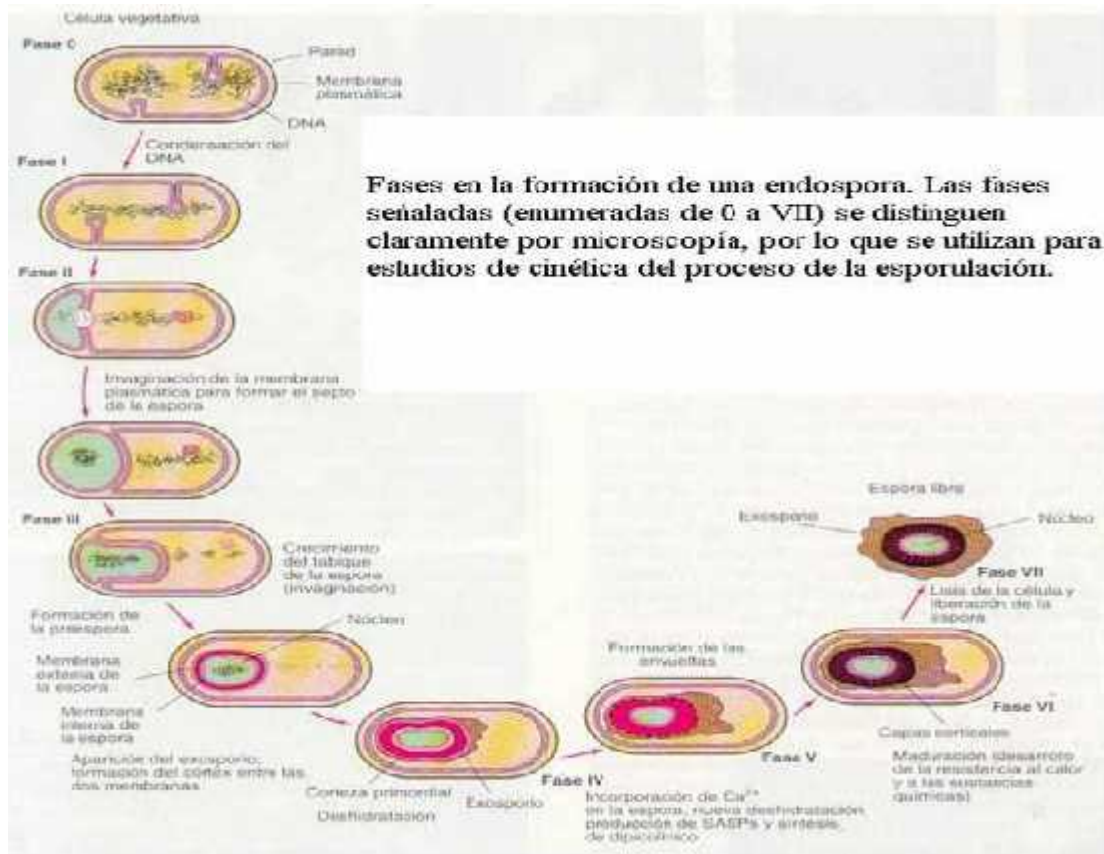


Figura 1.13 Formación de una endospora bacteriana.¹²

1.13. CAMBIOS TAXONOMICOS

El desarrollo de la genética ha determinado importantes cambios en la clasificación y taxonomía bacteriana que, en caso de los anaerobios, han sido enormes. Se han descrito nuevos géneros y especies y algunas, al conocerse sus relaciones filogenéticas, se han transferido a otros géneros, quedando por situar, todavía, varias que están incorrectamente posicionadas, particularmente dentro de los microorganismos gramnegativos.²

En clínica y dentro de los bacilos gramnegativos son importantes los géneros:

- *Bacteroides sp*, que ha quedado restringido a las especies sacarolíticas resistentes a la bilis incluidas en el grupo de *Bacteroides fragilis* que, además de frecuentes, son las más virulentas y resistentes a los antibióticos. Otras



especies han sido transferidas a otros géneros o están pendientes de que se realice.² (Vease fig. 1.14)

Figura 1.14 *Bacteroides fragilis*¹³

- *Porphyromonas sp*, cuyos miembros producen colonias pigmentadas de negro tras varios días de incubación, son asacarolíticos y no tolerantes a la bilis.
- *Prevotella sp*, con especies pigmentadas o no pigmentadas, sacarolíticas y no tolerantes a la bilis.
- *Fusobacterium sp*, caracterizado por incluir bacterias que producen ácido butírico sin isobutírico e isovalérico. (Vease fig. 1.15)

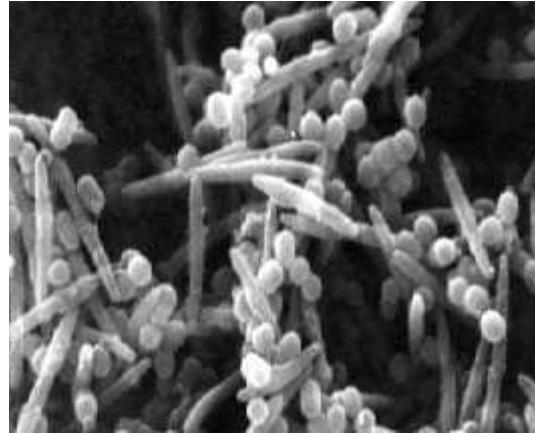


Figura 1.15 *Fusobacterium nucleatum*¹⁴

Bilophila sp y algunos géneros microaerófilos que necesitan para su crecimiento formato y fumarato². (Vease fig. 1.16)

Entre los cocos gramnegativos destaca *Veillonella* y entre los grampositivos

Peptostreptococcus incluyendo *Anaerococcus*, *Finegoldia*, *Micromonas*, *Peptoniphilus*, *Schleiferella* y el propio *Peptostreptococcus*. *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Eggertella* y *Eubacterium* son importantes entre los bacilos grampositivos no esporulados y *Clostridium* entre los esporulados.^{2,3}

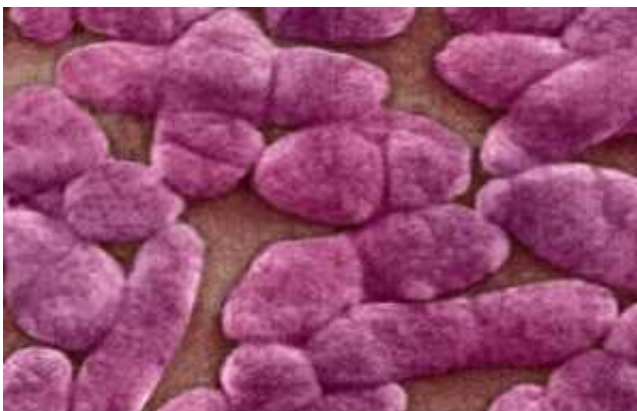


Figura 1.16 *Bilophila wadsworthia*¹⁵

1.14 RELACIÓN DE LAS BACTERIAS CON EL OXÍGENO

Aunque fueron definidas de varias maneras por diferentes autores, una definición práctica de trabajo es que las bacterias anaerobias obligadas son aquellas que se desarrollan en ausencia de oxígeno libre pero no pueden multiplicarse en presencia de oxígeno en la superficie de un medio sólido nutricionalmente adecuado, incubado en presencia de aire ambiental o en una estufa de CO₂ (que contiene el 5 al 10% de CO₂ en aire).^{2,3}

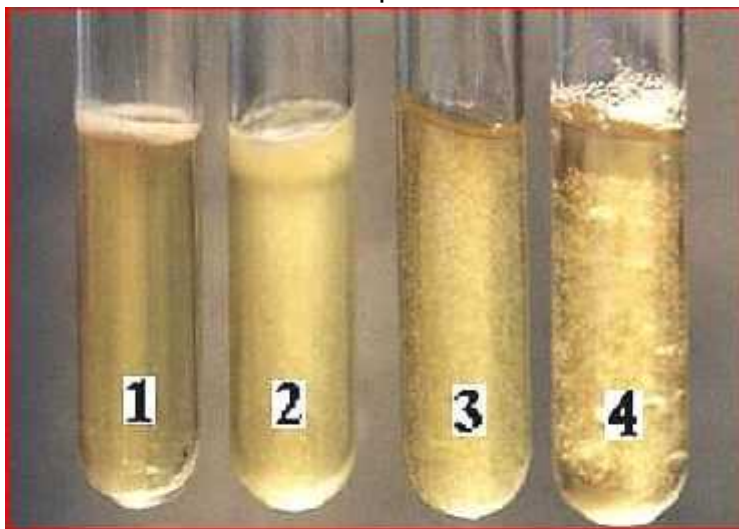
La cantidad de O₂ en la estufa de CO₂ o en una jarra anaeróbica es considerable (alrededor del 18 al 19%). En la práctica, las bacterias anaerobias son reconocidas con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos por las pruebas de aerotolerancia de las colonias que se desarrollaron en las placas de aislamiento primario incubadas en forma anaeróbica.^{2,8} (Vease fig. 1.17)



Figura 1.17 Jarra de anaerobiosis¹⁶

Por lo tanto, en los laboratorios clínicos la mayoría de los anaerobios se desarrollan inicialmente en Agar sangre para anaerobiosis, o en uno de los medios selectivos, o en un caldo enriquecido incubado de manera anaeróbica, pero no sobre placas de Agar sangre o Agar chocolate incubado en forma aeróbica o en estufa de CO₂.^{2,9}

Es una ultra simplificación hablar de los anaerobios como si tuviesen características que constituyeran un gran grupo uniforme, como también lo es (además de ser incorrecto) llamar aerobios a la totalidad de las bacterias que crecen en el aire ambiental. Por lo tanto, se utilizaron varios términos, como *aerobios obligados*, *anaerobios facultativos*, *microaerófilos*, *anaerobios aerotolerantes* y *anaerobios obligados* (estrictos y moderados), para subdividir las bacterias sobre la base de su relación con el oxígeno.^{3,6,9,15} (Vease fig. 1.18)



1. Aerobio estricto
2. Anaerobio facultativo
3. Anaerobio aerotolerante (Microaerófilo)
4. Anaerobio estricto

Figura 1.18 Requerimientos de oxígeno¹⁷

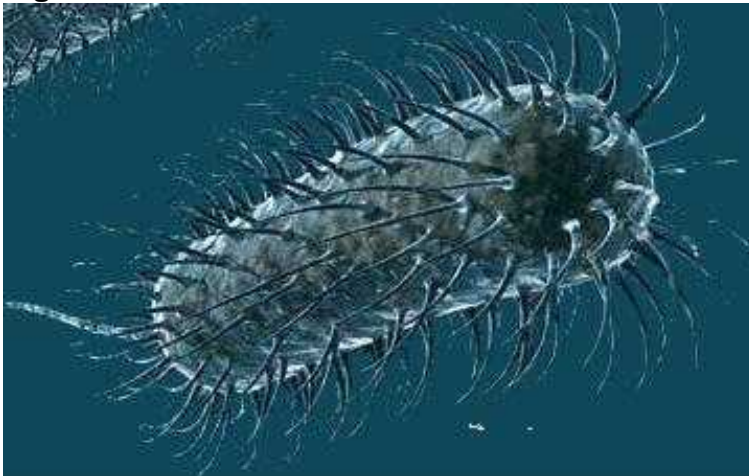
Estos términos reflejan un espectro continuo de bacterias, desde las que no pueden tolerar el oxígeno hasta aquéllas que lo requieren para su desarrollo. Los aerobios obligados, que abarcan especies de *Micrococcus* y *Pseudomonas*, requieren oxígeno molecular como aceptor terminal de electrones, con la consiguiente formación de agua, y no obtienen energía por mecanismos fermentativos. Sin embargo, no es infrecuente hallar un desarrollo escaso de *P. aeruginosa* en medios incubados anaeróbicamente en los laboratorios clínicos,

debido a que estas bacterias pueden utilizar el nitrato del medio como aceptar terminal de electrones (por medio de la respiración anaerobia) en lugar de O_2 .^{2,8}

En contraposición, la toxicidad del oxígeno molecular varía para las diferentes bacterias anaerobias, y no es un aceptar terminal de electrones para éstas. En general, los anaerobios importantes en la clínica obtienen su energía por mecanismos fermentativos, en los que los compuestos orgánicos, como los ácidos orgánicos, los alcoholes y otros productos, sirven como aceptores finales de electrones. Los anaerobios, por otra parte, se dividen en dos grupos principales: anaerobios obligados y anaerobios aerotolerantes. Los anaerobios obligados, además, fueron subdivididos en dos grupos según su capacidad de desarrollarse en presencia de oxígeno o de tolerarlo. Los anaerobios obligados estrictos no son capaces de crecer en la superficie del Agar expuesto a nitrógeno.^{5,8,9}

Si bien el oxígeno es potencialmente tóxico para cualquier forma de vida, los anaerobios son intolerantes al mismo aunque en diferentes grados. Existe un espectro que va desde los extremadamente intolerantes (aerointolerantes) hasta los aerotolerantes moderados los cuales pueden sobrevivir a la presencia de O_2 durante breves períodos. Esta diferente relación con el oxígeno parece deberse a varios factores. En primer lugar, el oxígeno es un poderoso agente oxidante, es decir, un ávido receptor de electrones, por lo tanto su presencia en solución es incompatible con potenciales redox bajos.^{5,10}

Figura 1.19 *Clostridium botulinum*¹⁸



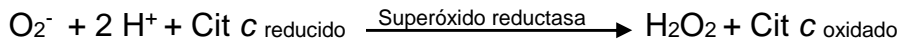
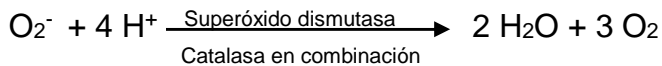
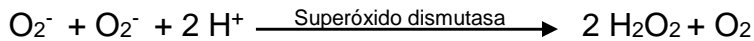
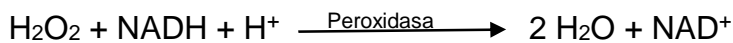
En esta situación el flujo de electrones se ve interferido por un receptor extraño al usual de las bacterias provocando derivaciones letales. En segundo lugar, el oxígeno puede interactuar directamente con enzimas o cofactores, a través de la oxidación de grupos químicos sensibles (por ej.: sulfhidrilos), causando inactivaciones irreversibles. En tercer lugar y aparentemente, la causa más importante de la oxígeno-toxicidad, se atribuye a la producción de sustancias tóxicas derivadas de la reducción parcial de la molécula de O_2 .^{5,9}

Estos productos son el radical superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo:



- $\text{O}_2 + \text{e}^- + 2 \text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2$ Peróxido de hidrógeno
- $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{e}^- + \text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{OH}$ Radical hidroxilo
- $\text{OH}\cdot + \text{e}^- + \text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O}$ Agua

Sin embargo las bacterias aerobias y facultativas desarrollaron mecanismos para inactivar estas formas tóxicas las cuales son las siguientes:



Las bacterias anaerobias estrictas no disponen de estos mecanismos de inactivación de formas tóxicas derivadas, o solo de algunas de estas enzimas.

Razón por la cual el oxígeno les hace daño y por ello se denominan anaerobias.

Los microorganismos aerotolerantes pueden carecer de catalasa pero la mayoría tiene SOD; más aún, las SOD han sido postuladas como factores de virulencia en los anaerobios, ya que estas enzimas permitirían la supervivencia de las bacterias en tejidos oxigenados hasta que el consumo de oxígeno determina el ambiente adecuado para la multiplicación y desarrollo.^{5,9,10}

Los anaerobios estrictos carecen de ambas enzimas o las tienen en bajas concentraciones y por eso no toleran el oxígeno.^{5,9,13}

A microscopic view of numerous purple, rod-shaped bacteria, likely Bacillus anthracis spores, against a black background. The bacteria are shown in various orientations, some in sharp focus and others blurred in the background. The overall color palette is dominated by shades of purple and magenta.

CAPITULO 2

CONSIDERACIONES CLINICAS.

CAPITULO 2

CONSIDERACIONES CLINICAS

Las bacterias anaerobias producen infecciones con al menos dos patrones en cuanto a su fisiopatología o patogenia.

El primero es el de los cuadros ocasionados por la acción de diferentes toxinas producidas por diversas especies del género *Clostridium*. Son infecciones específicas, de origen habitualmente exógeno -del ambiente- con frecuencia a partir de esporas, y en ocasiones oportunistas, pues pueden requerir una puerta de entrada traumática¹.

Incluyen el tétanos, las diversas formas del botulismo -intoxicación, de heridas, del lactante (por colonización intestinal), indeterminado (por colonización intestinal del adulto consecuencia de alteraciones digestivas, producidas por cirugía gastrointestinal o por el consumo de antimicrobianos) e inhalatorio (accidentes de laboratorio o por posible bioterrorismo)- gangrena gaseosa (Vease fig. 2.1) (producida por diversas especies, especialmente por *C. perfringens*, y las relacionadas con *C. septicum* que suelen aparecer en pacientes con cáncer colorectal, leucemias, linfomas y otras inmunodeficiencias), celulitis anaerobias, enteritis necrotizante producida por *C. perfringens* tipo C (en pacientes con dietas hipoproteicas que condicionan un déficit de tripsina de forma que no se destruye la toxina beta), intoxicación alimentaria (por ingestión de alimentos cárnicos con elevado número de formas vegetativas de *C. perfringens* tipo A que al esporular en el intestino delgado producen una enterotoxina) y las diversas formas clínicas de diarrea asociada a antimicrobianos producida por las toxinas de *C. difficile*, con un importante impacto nosocomial y con posible transmisión cruzada; o en algunos casos por cepas de *C. perfringens* tipo A productoras de enterotoxina.^{12,13}



Figura 2.1 Herida gangrenosa¹⁹

El segundo patrón es el resultado de la actuación de mecanismos patogénicos no exotóxicos, diferentes según las bacterias implicadas y a menudo aún no caracterizados.

El resultado es la aparición de diferentes infecciones inespecíficas, en las que los síntomas y signos no permiten identificar a los agentes etiológicos. Su origen es endógeno a partir de componentes de la propia biota, excepto las derivadas de mordeduras (exógeno a partir de biota endógena por transmisión

directa). Sólo un limitado número de géneros y especies son capaces de producir infecciones, incluidos los clostridios cuando no actúan con exotoxinas¹.

En cualquier caso, requieren circunstancias favorecedoras por parte del hospedador (oportunistas): roturas traumáticas de las barreras cutáneomucosas de las localizaciones que las albergan, llegada a zonas lejanas de sus hábitats, junto con situaciones favorecedoras específicas (circunstancias que bajan el potencial de óxido-reducción) o generales^{5,6,8}.

Como su origen está en la propia biota del hospedero es habitual que sean de etiología polimicrobiana y mixta. La presencia de bacterias aerobias y facultativas además favorece a las anaerobias pues consumen el oxígeno existente.^{1,3}

Muchas de estas infecciones son piogénicas y la presencia de abscesos es característica. Numerosas infecciones, como bacteriemias -con una moderada implicación-, abscesos cerebrales, empiemas subdurales y abscesos epidurales, endoftalmítis, sinusitis y otitis crónicas, abscesos periamigdalares, diversos procesos relacionados con las caries dentales y periodontitis del adulto, neumonías por aspiración, abscesos de pulmón, bronquiectasias y empiemas pleurales, peritonitis secundarias y abscesos intraabdominales, infecciones de la pared abdominal y otras intraabdominales, de vías biliares y abscesos hepáticos, numerosos procesos infecciosos obstetro-ginecológicos, artritis y osteomielitis, y multitud de infecciones de piel y tejidos blandos como el acné, celulitis, infecciones tras mordeduras, del diabético (pie diabético y gangrena), de úlceras por presión, etc., pueden estar causadas por estas bacterias.^{1,5,9,15}

Existe un tercer patrón, que se puede definir como de desequilibrio o sobrecrecimiento de bacterias anaerobias cuyo mejor exponente es la vaginosis bacteriana (no vaginitis), que es un cuadro caracterizado por un aumento de flujo vaginal, de pH más elevado (pH >4,5) y con aminas volátiles pero sin leucocitos polimorfonucleares^{1,3,8,13,15}. (Vease fig. 2.2)



Figura 2.2 Vaginosis²⁰

Por microscopía es característica la presencia de células de descamación en las que hay adheridas bacterias con morfotipos de *Gardnerella vaginalis* y de otras especies ("células clue"). Algunos de estos microorganismos, como *C. difficile*, son eminentemente nosocomiales y emergentes.^{9,15} (Vease fig. 2.3)

La búsqueda de bacterias anaerobias sólo se debe hacer cuando se pueda discernir su papel y tenga interés etiológico y terapéutico. Estos microorganismos son resistentes a aminoglicósidos (carecen de los sistemas necesarios para su penetración) y monobactámicos y pueden desarrollar resistencia a otros antimicrobianos habitualmente eficaces, particularmente el grupo de *Bacteroides fragilis*.

Suelen presentar alta actividad las asociaciones de beta lactámico/inhibidor de beta-lactamasa (amoxicilina/ácido clavulánico y piperacilina/tazobactam), las carbapenemas (imipenem, meropenem y ertapenem), el metronidazol y el cloranfenicol. La resistencia del grupo de *Bacteroides fragilis* a la cefoxitina y a la clindamicina es elevada, como lo es aún más a la penicilina, situación compartida por otros bacilos gramnegativos.^{9,14,15,16} (Vease cuadro 2.1 a cuadro 2.5)

Cuadro 2.1 Bacterias anaerobias localizadas en el cuerpo humano²

GENERO	PIEL	TRACTO RESPIRATORIO SUPERIOR*	INTESTINO	GENITALES EXTERNOS	URETRA	VAGINA
BACTERIAS GRAMNEGATIVAS						
<i>Bacteroides</i>	0	±	2	±	±	±
<i>Prevotella</i>	0	2	2	1	±	1
<i>Porphyromonas</i>	0	1	1	D	D	±
<i>Fusobacterium</i>	0	2	1	D	D	±
<i>Veillonella</i>	0	2	1	0	D	1
BACTERIAS GRAMPOSITIVAS						
<i>Fingoldia Magna</i>	1	2	2	1	±	1
<i>Micromonas micros</i>	1	2	2	1	±	1
<i>Clostridium</i>	±	±	2	±	±	±
<i>Actinomyces</i>	0	1	1	0	0	±
<i>Bifidobacterium</i>	0	1	2	0	0	±
<i>Eubacterium</i>	0	1	2	D	D	1
<i>Lactobacillus</i>	0	1	1	0	±	2
<i>Propiobacterium</i>	2	1	±	±	±	1

* Incluye fosas nasales, nasofarínge, orofarínge y amígdalas.

D desconocido; 0 no se encuentra o raros; ± irregular, 1 por lo común presente, 2 presente en grandes cantidades.



Figura 2.3 *Clostridium difficile*²¹

Cuadro 2.2 Cambios taxonómicos recientes en los Gram negativos anaerobios³

Actuales	Antiguos y/o posición taxonómica
<i>Bacilos gramnegativos - Anaerobiospirillum thomasi</i>	Nueva especie
<i>Bacteroides distasonis</i>	Relacionado con el grupo <i>Porphyromonas</i>
<i>Bacteroides forsythus</i> *	Relacionado con el grupo <i>Porphyromonas</i>
<i>Bacteroides furiosus</i>	Relacionado con el grupo <i>Porphyromonas</i>
<i>Bacteroides putredinis</i>	Posiblemente relacionado con <i>Rikenella</i>
<i>Bacteroides pyogenes</i> *	Grupo II de <i>Bacteroides tectum</i> (algunas especies)
<i>Bacteroides splanchnicus</i>	Posiblemente pertenece a un nuevo género
<i>Bacteroides tectus</i>	<i>Bacteroides tectum</i> . Relacionado con <i>B. fragilis</i>
<i>Butyrivibrio species</i>	Relacionado con <i>Clostridium</i>
<i>Campylobacter gracilis</i>	<i>Bacteroides gracilis</i> (algunas especies)
<i>Campylobacter hominis</i>	Nueva especie
<i>Campylobacter showae</i>	Nueva especie
<i>Capnocytophaga granulosa</i>	Nueva especie
<i>Capnocytophaga haemolytica</i>	Nueva especie
<i>Catonella morbi</i>	Relacionado con <i>Clostridium</i>
<i>Centipeda periodontii</i>	Relacionado con <i>Selenomonas</i>
<i>Dialister pneumosintes</i>	Relacionado con <i>Sporomusa</i> , rama de <i>Clostridium</i>
<i>Fusobacterium variium</i>	<i>Fusobacterium pseudonecrophorum</i>
<i>Johnsonella imava</i>	Relacionado con <i>Clostridium</i>
<i>Leptotrichia sanguinegens</i>	Nueva especie
<i>Mitsuokella multiacida</i>	Relacionado con <i>Sporomusa</i> , rama de <i>Clostridium</i> ,
<i>Porphyromonas cangingivalis</i> *	Nueva especie
<i>Porphyromonas canoris</i> *	Nueva especie
<i>Porphyromonas cansulci</i> *	Nueva especie
<i>Porphyromonas catoniae</i>	<i>Oribaculum catoniae</i>
<i>Porphyromonas crevioricanis</i> *	Nueva especie
<i>Porphyromonas gingivicanis</i> *	Nueva especie
<i>Porphyromonas gulae</i> *	Nueva especie
<i>Porphyromonas levii</i> *	<i>Bacteroides levii</i>
<i>Porphyromonas macacae</i> *	<i>Bacteroides macacae</i> , <i>Porphyromonas salivosa</i>
<i>Prevotella albensis</i> *	<i>Bacteroides ruminicola</i> subesp. <i>ruminicola</i> biovar, 7 <i>Prevotella ruminicola</i> (algunas especie)
<i>Prevotella brevis</i> *	<i>Bacteroides ruminicola</i> subesp. <i>brevis</i> biovars
<i>Prevotella bryantii</i> *	<i>Prevotella ruminicola</i> (algunas especies) <i>B. ruminicola</i> suespec. <i>brevis</i> biovar
<i>Prevotella dentalis</i>	<i>Prevotella ruminicola</i> (algunas especies)
<i>Prevotella enoeca</i>	<i>Mitsuokella dentalis</i> , <i>Hanella seregens</i>
<i>Prevotella heparinolytica</i>	Nueva especie
<i>Prevotella nigrescens</i>	Relacionado con el grupo de <i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Prevotella pallens</i>	Nueva especie; <i>P. intermedia</i> (algunas especies)
<i>Prevotella ruminicola</i> *	Nueva especie
<i>Prevotella tannerae</i>	<i>B. ruminicola</i> subesp. <i>ruminicola</i> biovar
<i>Prevotella zoogloeiformans</i>	Nueva especie
<i>Selenomonas spp.</i>	Relacionado con el grupo de <i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Sutterella wadsworthensis</i>	Relacionado con <i>Sporomusa</i> rama de <i>Costridium</i>
<i>Tissierella praeacuta</i>	Nuevo género y especie, , <i>Campylobacter (Bacteroides)gracilis</i> (algunas especies) Relacionado con <i>Clostridium</i>
Cocos gramnegativos	
<i>Acidaminococcus fermentans</i>	Relacionado con <i>Sporomusa</i> rama de <i>Clostridium</i>
<i>Megasphaera elsdenii</i>	Relacionado con <i>Sporomusa</i> rama de <i>Clostridium</i>
<i>Veillonella spp.</i>	Relacionado con <i>Sporomusa</i> rama de <i>Clostridium</i>

*De origen animal +

Tomado de Jousimies-Somer HR, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler y HM, Finegold SM. Wadsworth –KTL Anaerobic Bacteriology Manual. Star Publishing Company. Belmont, C.A. 2002.

Cuadro 2.3 Cambios taxonómicos recientes en los cocos Gram positivos anaerobios⁴

Actuales	Antiguos
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Schleiferella asaccharolytica</i> * o <i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>
<i>Gallicola barnesae</i>	<i>Peptostreptococcus barnesae</i>
<i>Schleiferella harei</i> * o <i>Peptoniphilus harei</i>	<i>Peptostreptococcus harei</i>
<i>Slackia heliotrinireducens</i>	<i>Peptostreptococcus heliotrinireducens</i>
<i>Anaerococcus hydrogenalis</i>	<i>Peptostreptococcus hydrogenalis</i>
<i>Schleiferella indolica</i> * o <i>Peptoniphilus indolicus</i>	<i>Peptostreptococcus indolicus</i>
<i>Peptoniphilus ivorii</i>	<i>Peptostreptococcus ivorii</i>
<i>Schleiferella lacrimalis</i> * o <i>Peptoniphilus lacrimalis</i>	<i>Peptostreptococcus lacrimalis</i>
<i>Anaerococcus lactolyticus</i>	<i>Peptostreptococcus lactolyticus</i>
<i>Finegoldia magna</i>	<i>Peptostreptococcus magnus</i>
<i>Micromonas micros</i>	<i>Peptostreptococcus micros</i>
<i>Anaerococcus octavius</i>	<i>Peptostreptococcus octavius</i>
<i>Anaerococcus prevotii</i>	<i>Peptostreptococcus prevotii</i>
<i>Peptostreptococcus productus</i>	<i>Peptostreptococcus productus</i>
<i>Anaerococcus tetradius</i>	<i>Peptostreptococcus tetradius</i>
<i>Anaerococcus vaginalis</i>	<i>Peptostreptococcus vaginalis</i>
<i>Peptococcus Níger</i>	

*Taxonómicamente *Schleiferella* tiene prioridad ⁸

Tomado de Moncla BJ, Hillier.

SL. *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, and other non-spore-forming anaerobic gram-positive bacteria. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC editores. Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition. American Society for Microbiology, Washington, D.C.; 2003. p. 857-879.

Cuadro 2.4 Cambios taxonómicos recientes en los bacilos Gram positivos anaerobios⁵

Actuales	Antiguos
<i>Actinobaculum schaalii</i> *	
<i>Actinobaculum suis</i>	<i>Actinomyces suis</i>
<i>Arcanobacterium bernardiae</i>	<i>Actinomyces bernardiae</i>
<i>Actinomyces bowdenii</i> *	
<i>Actinomyces canis</i> *	
<i>Actinomyces catuli</i> *	
<i>Actinomyces funkei</i> *	
<i>Actinomyces pyogenes</i>	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>
<i>Actinomyces radidentis</i> *	
<i>Actinomyces urogenitales</i> *	
<i>Atopobium fossor</i>	<i>Eubacterium fossor</i>
<i>Atopobium minutum</i>	<i>Lactobacillus minutum</i>
<i>Atopobium parvulum</i>	<i>Streptococcus parvulum</i>
<i>Atopobium rimae</i>	<i>Lactobacillus rimae</i> , <i>Lactobacillus D02</i>
<i>Atopobium vaginae</i> *	
<i>Bulleidia extracta</i> *	
<i>Catenibacterium mitsuokai</i> *	
<i>Cellulomonas humilata</i>	<i>Actinomyces humiferus</i>
<i>Collinsella aerofaciens</i>	<i>Eubacterium aerofaciens</i>
<i>Collinsella intestinales</i> *	
<i>Collinsella stercoris</i> *	
<i>Cryptobacterium curtum</i> *	
<i>Eggerthella lenta</i>	<i>Eubacterium lentum</i>
<i>Eggerthella minutum</i>	<i>Eubacterium tardum</i>
<i>Eubacterium sulci</i>	<i>Fusobacterium sulci</i>
<i>Mogibacterium timidum</i>	<i>Eubacterium timidum</i>
<i>Holdemanía filiformis</i> *	
<i>Lactobacillus uli</i> *	
<i>Mogibacterium pumilum</i> *	
<i>Mogibacterium vescum</i> *	
<i>Slackia exigua</i>	<i>Eubacterium exiguum</i> (<i>Eubacterium D-6</i>)

*Especies nuevas⁸. Tomado de Moncla BJ, Hillier

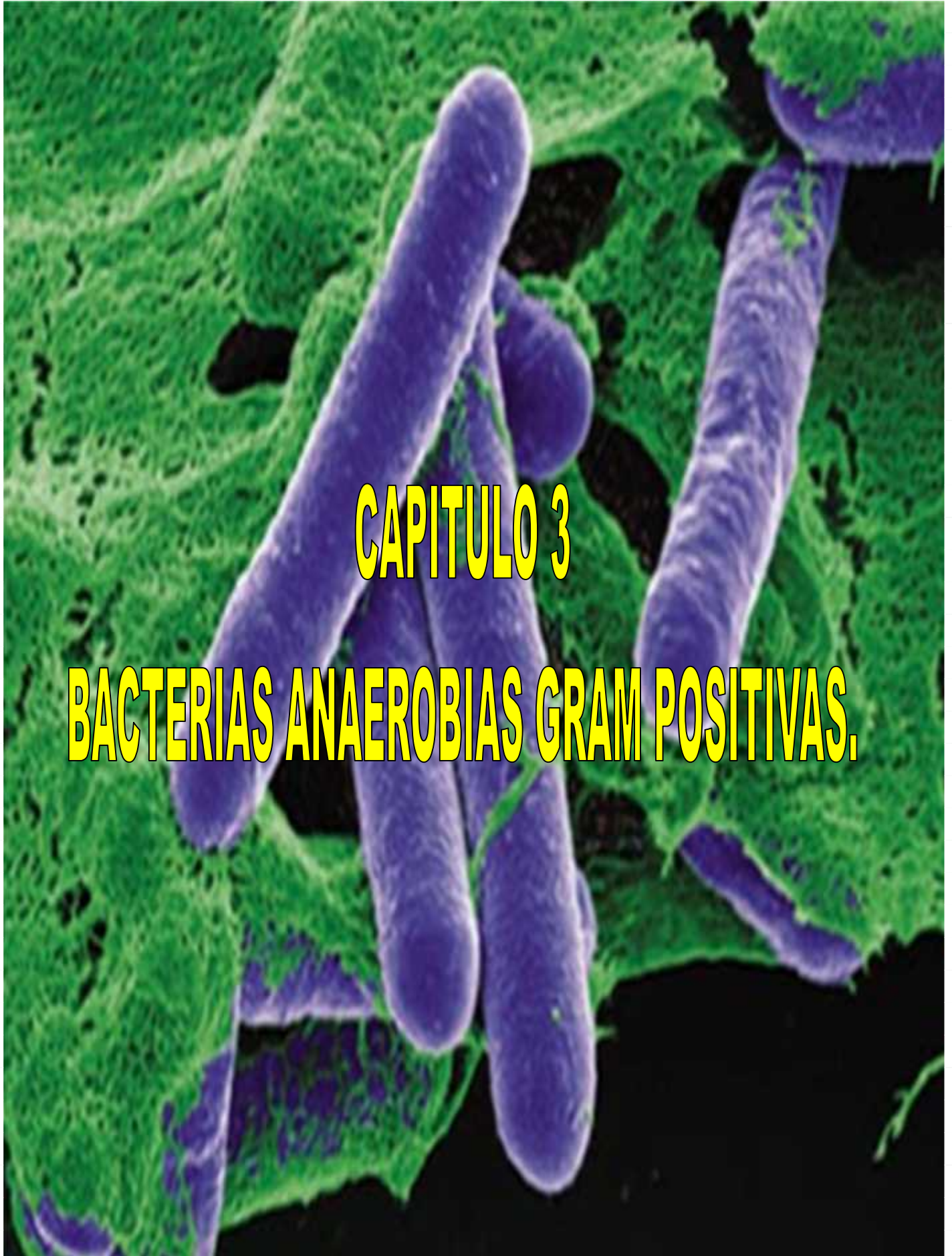
SL. *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, and other non-spore-forming anaerobic gram-positive bacteria. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC editores. Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition. American Society for Microbiology, Washington, D.C.; 2003. p. 857-879.

Cuadro 2.5 PATOGENIA Y ESPECTRO DE ENFERMEDADES POR BACTERIAS ANAEROBIAS⁵

MICROORGANISMO	FACTORES DE VIRULENCIA	ESPECTRO DE ENFERMEDADES E INFECCIONES
<i>Clostridium perfringens</i>	Produce diversas exotoxinas; la -toxina es la más importante y media la destrucción de las membranas celulares del huésped; la enterotoxina ingresa y rompe las membranas celulares de las mucosas.	Gangrena gaseosa, destrucción del músculo y otros tejidos mediada por una toxina, potencialmente fatal, secundaria a la introducción traumática del microorganismo. Intoxicación por alimentos causada por la liberación de la toxina después de la ingestión de grandes cantidades de microorganismo. La enfermedad por lo común es autolimitada y benigna, y se manifiesta con cólicos abdominales, diarrea y vómitos
<i>Clostridium tetani</i>	Produce tetanoespasmina, una exotoxina neurotóxica que afecta los impulsos nerviosos a los músculos	Tétanos (también conocido como trismo). El microorganismo infecta la herida y elabora la toxina potente que produce espasmos musculares generalizados. Si no se trata, los espasmos continúan para desencadenarse incluso por estímulos menores, lo que conduce a agotamiento y, por último, insuficiencia respiratoria.
<i>Clostridium botulinum</i>	Produce neurotoxinas en extremo potentes	El botulismo es resultado de la ingestión de toxina preformada en comestibles no ácidos elaborados con vegetales u hongos. La absorción de la toxina provoca una parálisis casi completa de los músculos respiratorios y otros grupos musculares importantes. Pueden producirse otras formas de botulismo cuando el microorganismo elabora la toxina después de que colonizó el tracto gastrointestinal de los lactantes (es decir, botulismo infantil). El botulismo de heridas es más raro que las otras formas, y se observa cuando <i>C. botulinum</i> produce la toxina a partir de una herida infectada

<i>Clostridium difficile</i>	Produce toxina A, que es la enterotoxina que provoca la enfermedad gastrointestinal causada por este microorganismo. La toxina B, una citotoxina, tiene un papel menos claro en las infecciones por <i>C. difficile</i>	El microorganismo requiere la disminución de la flora intestinal normal por la actividad de otros agentes antimicrobianos para establecerse en el intestino de los pacientes hospitalizados. Una vez establecido, elabora las toxinas que producen diarrea (diarrea asociada con antibióticos) o una inflamación del colon que puede ser potencialmente fatal. Cuando la superficie del intestino inflamado se recubre con una "seudomembrana" compuesta por detritos necróticos, leucocitos y fibrina, la enfermedad se denomina colitis pseudomembranosa
Especies de <i>Actinomyces</i> , incluyen <i>A. israelii</i> <i>A. meyeri</i> <i>A. naeslundii</i> <i>A. odontolyticus</i>	Los factores de virulencia no están bien caracterizados. Las infecciones por lo común requieren la ruptura de la superficie protectora de las mucosas de la cavidad oral, tracto respiratorio, tracto gastrointestinal, aparato genitourinario cualquier combinación entre ellas.	Por lo común involucrado en infecciones mixtas orales o cervicofaciales, torácicas, pelvianas y abdominales causadas por una cepa endógena del paciente; ciertas especies (<i>A. viscosus</i> y <i>A. naeslundii</i>) también se hallan en la enfermedad periodontal y caries dentales
Especies de <i>Propionibacterium</i>	No se conocen factores de virulencia definitivos	Asociados con procesos inflamatorios en acné, pero raras veces implicados en infecciones. Ubicadas en otros sitios corporales. Como parte de la flora normal de la piel, son los contaminantes anaerobios más comunes de los hemocultivos
Especies de <i>Bifidobacterium</i>	No se conocen factores de virulencia definitivos.	No se los encuentra con frecuencia en las muestras clínicas. Por lo común se hallan en infecciones mixtas de pelvis o abdomen
Especies de <i>Eubacterium</i>	No se conocen factores de virulencia definitivos	Por lo común asociados con infecciones mixtas de abdomen, pelvis o aparato genitourinario
Especies de <i>Mobiluncus</i>	No se conocen factores de virulencia definitivos	Los microorganismos se encuentran en la vagina y se los asoció con vaginosis bacteriana, pero su papel preciso en las infecciones ginecológicas no es

		claro. Raras veces se los encuentra en infecciones fuera del aparato genital femenino
Grupo <i>Bacteroides fragilis</i> , otras especies de <i>Bacteroides</i> , <i>Bacteroides gracilis</i> , <i>Bacteroides ureolyticus</i> especies de <i>Prevotella</i> , especies de <i>Porphyromonas</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> y otras especies de <i>Fusobacterium</i>	Estos bacilos gramnegativos anaerobios producen cápsulas, endotoxina y ácido succínico que inhiben la fagocitosis y varias enzimas que median el daño tisular. La mayoría de las infecciones requieren una solución de continuidad de la mucosa para permitir que los microorganismos invadan los tejidos más profundos	Son los microorganismos más comunes encontrados en infecciones anaerobias. Las infecciones a menudo son mixtas con otros microorganismos anaerobios y anaerobios facultativos. Las infecciones aparecen en cualquier parte del cuerpo, por lo común como lesiones localizadas o en abscesos cerrados, y pueden afectar cráneo, periodoncio, tórax, peritoneo, hígado y aparato genital femenino. Pueden producir bacteriemia, neumonía aspirativa, artritis séptica, sinusitis crónica, úlcera por decúbito, e infecciones de tejidos blandos. La característica distintiva de la mayoría, si bien no de todas las infecciones, es la producción de un olor fétido. En general, las infecciones causadas por el grupo B. fragilis se producen por debajo del diafragma; las especies pigmentadas de Prevotella, las especies de Porphyromonas y E. nucleatum están involucradas en las infecciones de cabeza y cuello y pleuropulmonares
<i>Finegoldia magna</i> , <i>Micromonas micros</i>	No se conocen factores de virulencia definitivos.	Con mayor frecuencia halladas por bacterias anaerobias y anaerobias facultativas en infecciones cutáneas, respiratorias, orales o pelvianas de mujeres
Especies de <i>Veillonella</i>	Especies de <i>Veillonella</i>	Pueden estar involucradas en infecciones mixtas pero raras veces desempeñan un papel importante



CAPITULO 3

BACTERIAS ANAEROBIAS GRAM POSITIVAS.

CAPITULO 3

BACTERIAS ANAEROBIAS GRAM POSITIVAS.

3.1. COCOS GRAM POSITIVOS ANAEROBIOS.

Peptostreptococcus

A pesar del nombre del género la morfología de estas bacterias incluye formas en pares, tétradas, racimos, y cadenas. Un estudio microscópico cuidadoso muestra a estos cocos con tamaño irregular y alguna decoloración parcial, lo que permite diferenciarlos de sus similares aerobios. Forman parte de la biota de la boca, intestino y genitales. Se encuentran involucrados en infecciones pleuropulmonares, abscesos, infecciones ginecológicas, sinusitis. Casi constantemente son sensibles a los betalactámicos.⁴ (Vease cuadro 3.1)

Cuadro 3.1 COCOS GRAM POSITIVOS ANAEROBIOS

Producto metabolismo	Prueba del indol	Géneros y especies ¹
Ácido acético		<i>Fingoldia magna</i> <i>Micromonas micros</i>
Ácido butírico	Negativa	<i>Anaerococcus (Peptostreptococcus) prevotii</i> <i>Anaerococcus (Peptostreptococcus) tetradius</i> <i>Anaerococcus (Peptostreptococcus) lactolyticus</i> <i>Anaerococcus (Peptostreptococcus) vaginalis</i> <i>Peptoniphilus (Peptostreptococcus) lacrimalis</i> ² <i>Peptoniphilus (Peptostreptococcus) ivorii</i>
Ácido butírico	Positiva	<i>Peptoniphilus (Peptostreptococcus) indolicus</i> ² <i>Peptoniphilus (Peptostreptococcus) asaccharolyticus</i> ² <i>Peptoniphilus (Peptostreptococcus) harei</i> ² <i>Anaerococcus (Peptostreptococcus) vaginalis</i> <i>Anaerococcus (Peptostreptococcus) hydrogenalis</i>
Ácido isocaproico y otros ácidos orgánicos		<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
Ácido caproico y otros ácidos orgánicos		<i>Anaerococcus (Peptostreptococcus) octavius</i>

¹En general, la diferenciación entre especies dentro de cada grupo metabólico puede dilucidarse mediante la realización de pruebas bioquímicas manuales o mediante sistemas de identificación²

3.2. BACILOS GRAM POSITIVOS NO ESPORULADOS

Este grupo diverso de microorganismos incluye bacterias anaerobias estrictas y aerotolerantes que forman parte de la biota normal de piel y mucosas. Todos comparten la característica de ser poco virulentos o de escaso poder patógeno, produciendo infecciones oportunistas en el caso de *Actinomyces*, *Mobiluncus*, *Propionibacterium*. *Lactobacillus*, *Eubacterium* y *Bifidobacterium* muy rara vez causan enfermedad.^{1,6,10}

Actinomyces

Se trata de bacilos Gram positivos largos y ramificados, delgados y delicados, bajo ciertas circunstancias, frotis o cultivos pueden fragmentarse simulando bacilos del tipo difteroides. (Vease fig. 3.3) En general son facultativos, aunque crecen mejor en anaerobiosis. *A. meyeri* es el único anaerobio estricto. Son capnófilos. Crecen lentamente y en el hospedero suelen producir infecciones crónicas.¹¹ (Vease fig. 3.1)

Forman parte de la biota normal de las mucosas del tracto respiratorio superior, tracto digestivo y aparato genital femenino, pero normalmente no están presentes en la superficie cutánea. La cavidad oral es su hábitat principal. Los microorganismos tienen un bajo potencial de virulencia, por lo tanto producen enfermedad sólo cuando las barreras mucosas normales se alteran por traumatismos, cirugía o infección.^{10,13}



Figura 3.1 Colonias de *Actinomyces*²²

La enfermedad producida por *Actinomyces* se llama actinomicosis y se caracteriza por el desarrollo de lesiones granulomatosas crónicas que se hacen supurativas y forman abscesos conectados mediante fístulas. En los abscesos y los tractos fistulosos se pueden observar colonias macroscópicas que recuerdan a los granos de arena, llamadas gránulos de azufre por su aspecto amarillo o naranja y están formadas por masas de microorganismos unidos entre sí por fosfato cálcico. Las zonas de supuración están rodeadas por un tejido fibroso de granulación lo que da a la superficie que cubre a los tejidos afectados una consistencia dura o de madera.^{5,7,9}

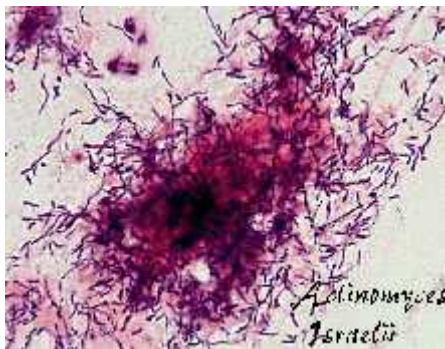


Figura 3.2 *Actinomyces israelii* es el patógeno humano más importante.²³

La actinomicosis es entonces una enfermedad endógena y se clasifica según los órganos que afecta en:

- actinomicosis cervicofacial constituye aproximadamente el 50% de los casos de actinomicosis. Ocurre en personas con mala higiene bucal o que han sido sometidas a un procedimiento dental invasivo o a un traumatismo oral. De esta manera los microorganismos presentes en la boca invaden los tejidos enfermos y producen una enfermedad piógena aguda o, más frecuentemente, un proceso inflamatorio de evolución lenta, relativamente indoloro, con fibrosis y cicatrización, así como con fístulas de drenaje a lo largo del ángulo de la mandíbula y del cuello. Producen también enfermedad periodontal.^{10, 11,12}
- actinomicosis torácica se produce por aspiración del agente desde el tracto respiratorio superior y la boca o por extensión de lesiones faciales. Al inicio de la enfermedad se produce un absceso pulmonar. Conforme la enfermedad progresa ocurre fistulización al exterior a través de la pared torácica pudiendo interesar costillas y vértebras.
- actinomicosis abdominal ocurre en pacientes sometidos a cirugía digestiva o que han sufrido un traumatismo en el intestino. Puede extenderse por todo el abdomen y afectar a cualquier órgano. Es posible la extensión vertebral y la fistulización al exterior.^{10,11,12}
- actinomicosis pélvica puede presentarse como una vaginitis o más frecuentemente puede haber una gran destrucción de tejidos con formación de abscesos tubo-ováricos. Se ha descrito infección en mujeres que utilizan dispositivos intrauterinos con sintomatología escasa y sin presencia de gránulos.^{1,10,14.}
- actinomicosis del sistema nervioso central se produce generalmente por diseminación hematógena desde otros tejidos infectados, como los pulmones. La manifestación más frecuente es un absceso cerebral solitario, pero también puede ocasionar meningitis, empiema subdural y abscesos epidurales.^{1, 3,4}

La confirmación en el laboratorio de la actinomicosis es difícil. Si se detectan gránulos de azufre en una fístula o en un tejido, el gránulo se debe aplastar entre dos láminas, teñirse y mirarse al microscopio óptico. Se pueden ver en la periferia de los gránulos bacilos Gram positivos delgados y ramificados.^{3,5,8}

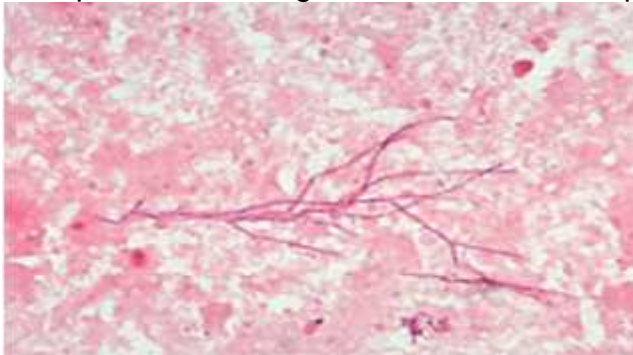


Figura 3.3. *Actinomyces* spp²⁴

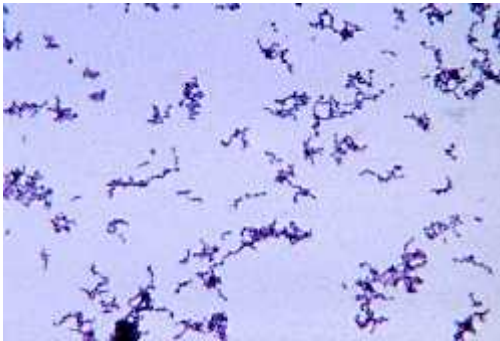
Actinomyces spp. son exigentes y crecen lentamente en condiciones anaerobias, se pueden tardar 2 semanas o más en aislar los microorganismos. Las colonias son blancas y tienen una superficie en forma de cúpula que se puede

volver irregular luego de una incubación de una semana o más, lo que recuerda a la parte superior de una muela. Las especies individuales de *Actinomyces* se pueden diferenciar mediante pruebas bioquímicas.^{3,7} (Vease fig. 3.3)

El tratamiento de la actinomicosis implica la asociación del desbridamiento quirúrgico de los tejidos afectados y la administración prolongada de antibióticos. La penicilina es el antibiótico de elección. El mantenimiento de una buena higiene bucal y el uso de profilaxis antibiótica adecuada cuando se realizan maniobras invasivas en la boca o el tubo digestivo disminuyen el riesgo de estas infecciones.³

Propionibacterium

Son bacilos Gram positivos pequeños que se disponen en cadenas cortas o en agregados. Integrantes de la biota normal de piel (en contraposición a *Actinomyces*), conjuntiva, oído externo, orofaringe y aparato genital femenino. Son anaerobios estrictos o aerotolerantes, inmóviles, catalasa positivos y capaces de fermentar hidratos de carbono produciendo como principal residuo ácido propiónico (de ahí su nombre). Las especies que se aíslan con mayor frecuencia son *Propionibacterium acnes*, *P. granulosum* y *P. propionicus*.³



P. acnes es responsable del acné en adolescentes y adultos jóvenes así como de infecciones oportunistas en pacientes con prótesis (valvulares o articulares) o dispositivos intravasculares.³

Figura 3.4. *Propionibacterium acnes*²⁵

Las propionibacterias se aíslan también a partir de hemocultivos, pero suele deberse a contaminación con bacterias de la piel en el sitio de venopunción. El papel principal de *P. acnes* (Vease fig. 3.4) en el acné es estimular la respuesta inflamatoria. La producción de péptidos de bajo peso molécula por parte de los bacilos que habitan en los folículos sebáceos atrae a los leucocitos. Luego de fagocitar a los bacilos los fagocitos liberan enzimas hidrolíticas que junto a una variedad de toxinas bacterianas como lipasas, proteasas, neuraminidasa e hialuronidasa estimulan la respuesta inflamatoria lo que lleva a la destrucción del folículo.^{3,9,15}

Las propionibacterias crecen en la mayoría de los medios de cultivo pero puede tardarse entre 2 y 5 días en evidenciar el crecimiento.³

Lactobacillus

Se trata de bacilos Gram positivos largos, de bordes paralelos y extremos rectangulares, facultativos, microaerófilos o anaerobios estrictos. No producen la enzima catalasa ni citocromos.^{3,7} (Vease fig. 3.5)

Producen ácido láctico como principal producto de fermentación y tienen requerimientos nutricionales complejos. Llevan a cabo la fermentación homoláctica a través de la vía de Embden-Meyerhof o la fermentación heteroláctica a través de la vía de las pentosas fosfato.³

Su crecimiento es óptimo en condiciones ácidas (pH entre 4.5 a 6.4). Se encuentran en la superficie de las plantas así como en la carne, el agua, frutas y otros productos alimenticios. Son indispensables para la industria del alimento donde se utilizan para la fermentación de alimentos y bebidas, como pickles, cerveza, vino, jugos, quesos y yogurt.¹



Figura 3.5 *Lactobacillus*²⁶

En el hombre se encuentran formando parte de la biota normal de la boca, estómago, intestino y tracto genitourinario (constituyen la biota vaginal predominante en mujeres en edad reproductiva). Son los microorganismos más frecuentes en la uretra, por lo tanto su recuperación en los urocultivos procede invariablemente de la contaminación de la muestra.¹

La razón por la cual los lactobacilos rara vez producen infecciones del tracto urinario es su incapacidad para crecer en la orina.¹

Generalmente no son patógenos. Por el contrario, su efecto beneficioso ha sido demostrado cuando se administran en forma de probióticos (suplemento alimentario que contiene microorganismos vivos con efectos beneficiosos en el hospedero al mejorar el balance microbiano intestinal) en la prevención y el tratamiento de algunas enfermedades como la diarrea aguda infantil, diarrea asociada a antibióticos, diarrea del viajero, colitis alérgicas y probablemente otras como la candidiasis vaginal, etc. De todas maneras pueden invadir el torrente circulatorio ocasionando bacteriemias transitorias de origen genitourinario (por ej: después del parto o de un procedimiento ginecológico), endocarditis y sepsis en pacientes inmunodeprimidos.²

Son uniformemente resistentes a la vancomicina. Se obtiene actividad antimicrobianas sinérgica mediante la combinación de penicilina más un aminoglucósido.²

Mobiluncus

Los miembros de este género bacteriano son bacilos Gram variables o Gram negativos, a pesar de tener una pared celular Gram positiva, carente de lipopolisacárido, y sensibles a vancomicina, clindamicina, eritromicina y ampicilina, pero resistentes a colistina. Bacilos curvos con extremos en forma de punta, son anaerobios estrictos. (Vease fig. 3.6) Son exigentes desde el punto de vista nutricional y crecen lentamente incluso en medios enriquecidos.²

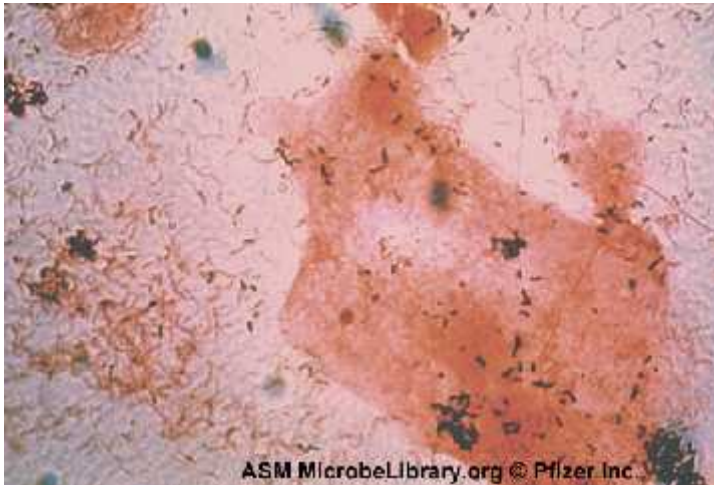


Figura 3.6 *Mobiluncus mulieris*²⁷

En humanos se han identificado dos especies, *Mobiluncus mulieris* y *M. curtisii*. Los microorganismos colonizan el tracto genital femenino en un número bajo, pero son abundantes en las

mujeres con vaginosis bacteriana. Su aspecto microscópico es un marcador útil para esta enfermedad, pero no está claro el papel preciso de estos microorganismos en la patogénesis de la vaginosis bacteriana.²

Bifidobacterium y *Eubacterium*

Los microorganismos pertenecientes a estos dos géneros se encuentran con frecuencia en la orofaringe, intestino grueso y vagina. (Vease fig. 3.7) Estas bacterias se pueden aislar en las muestras clínicas pero tienen un potencial de virulencia muy bajo y generalmente se aíslan como contaminantes sin significación clínica. La confirmación de su papel etiológico en una infección requiere el aislamiento repetido del microorganismo a partir de múltiples muestras y la ausencia de otros microorganismos patógenos.^{1,5}



Figura 3.7 *Bifidobacterium*²⁸

3.3. BACILOS GRAM POSITIVOS ESPORULADOS

Clostridium

Los clostridios son bacilos anaerobios formadores de esporas y en general Gram positivos. Casi todas las especies son anaerobias obligadas pero unas pocas especies son aerotolerantes.^{1,6,9}

Las especies patógenas producen toxinas solubles, algunas de las cuales son extremadamente potentes. Los clostridios están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se encuentran en los suelos y en el tracto gastrointestinal de los seres humanos y los animales.^{1,6,9}

Los clostridios patógenos pueden dividirse para su estudio en cuatro grandes grupos de acuerdo al tipo de enfermedad que producen:

- 1.-Los clostridios histotóxicos típicamente causan una variedad de infecciones tisulares, en general luego de heridas abiertas y otras lesiones traumáticas^{1,13,14}
- 2.-Los clostridios enterotoxigénicos producen intoxicación alimentaria y formas más severas de enfermedad gastrointestinal.^{1,13,14}
- 3.-*Clostridium tetani*, agente causal del tétanos, produce la enfermedad por medio de una potente exotoxina que es elaborada durante la proliferación limitada en los tejidos.^{1,13,14}
- 4.-*Clostridium botulinum* es el agente etiológico del botulismo, enfermedad que resulta de la ingestión de una poderosa exotoxina formada previamente por los microorganismos en alimentos contaminados.^{1,13,14}

CLOSTRIDIOS HISTOTÓXICOS

Pueden ocasionar una severa infección a nivel muscular denominada mionecrosis por clostridios (antes conocida como gangrena gaseosa o miositis por clostridios).^{1,13,14}

Clostridium perfringens.

Es la especie más importante responsable del 80-90% de los casos de mionecrosis. *C. novyi*, *C. septicum*, *C. histolyticum*, *C. sordellii*, *C. fallas* también ocasionan estas infecciones. Todos ellos producen una variedad de toxinas con potencias diferentes; para cada especie las toxinas se designan con letras griegas.^{1,8,13,14}

Ninguno de ellos se comporta como un patógeno altamente invasivo, sino que cada uno juega un papel oportunista que requiere un conjunto de condiciones en los tejidos para que se inicie la infección. Determinan un espectro de compromiso clínico en infecciones de heridas que va desde la simple contaminación hasta la

mionecrosis. Dada su amplia distribución en la naturaleza, la contaminación de heridas es muy común (39%). Sin embargo una pequeña proporción de heridas contaminadas evoluciona a la verdadera mionecrosis. Por lo tanto el aislamiento de clostridios histotóxicos a partir de heridas o material de drenaje no indica por sí mismo la presencia de mionecrosis: el diagnóstico de dicha afección es clínico.^{1,13,14}



Figura 3.8 *Clostridium perfringens*²⁹

Existen cinco tipos diferentes: A, B, C, D y E, que se diferencian por la producción de cuatro toxinas letales principales: alfa, beta, epsilon y theta.

Clostridium. perfringens tipo A es el principal responsable de enfermedad humana; produce alfa toxina y otras de menor poder (omega, kappa, micrón); habita suelos e integra biota normal del tracto gastrointestinal de hombre y animales. (Vease fig. 3.8)

Los tipos B, C, D y E existen en el tracto gastrointestinal de animales y sólo de forma ocasional en el hombre. Producen una variedad de enfermedades en animales domésticos; no habitan de forma permanente los suelos como lo hace el tipo A.^{1,13,14}

BIOLOGÍA DEL MICROORGANISMO

Es un bacilo netamente Gram positivo, corto y grueso, de bordes redondeados, con formas hasta cocoides. En los frotis directos de muestras clínicas no se observan esporas y es característica la ausencia de células eucariotas debido a la intensa citólisis tóxica; pueden observarse cápsulas. En los frotis realizados a partir de cultivos pueden observarse esporos medianos o subterminales que no deforman el soma vegetativo.^{1,6,13}

Es anaerobio aerotolerante, algunas cepas producen la enzima superóxido dismutasa. Desarrolla a un pH variable (5.5 a 8) y en un rango de temperatura que va de 20 °C a 50 °C. Es el único inmóvil de los clostridios patógenos. Crece rápido en agar sangre, pudiendo observarse colonias a las 24-48 hs de incubación.^{1,14}

ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

C. perfringens produce por lo menos 12 exotoxinas diferentes, de naturaleza proteica y antigénica. De los cuatro antígenos letales principales, alfa es la más importante y es producida por los cinco tipos de *C. perfringens*. Los antígenos menores son enzimas y no son letales: antígeno *K* es una colagenasa, antígeno *V* es una desoxirribonucleasa, antígeno *u* tiene actividad hialuronidasa.^{1,14}

La serotipificación de acuerdo a antígenos somáticos ha tenido aplicación en estudios epidemiológicos de brotes de intoxicación alimentaria, donde existe una

correlación entre los serotipos de *C. perfringens* de tipo A aislado en heces de pacientes y los serotipos recuperados de alimentos contaminados.^{1,13,14}

FACTORES DE PATOGENICIDAD

La toxina alfa posee actividad letal, dermonecrotica y hemolítica; es una lecitinasa C o fosfolipasa C (degrada la lecitina en fosforilcolina y un diglicérido), también hidroliza la esfingomielina; es activada por Ca^{++} y Mg^{++} . Es un antígeno excelente, tanto que la protección o el tratamiento *in vivo* dependen totalmente del título antitoxina alfa.^{1,13,14}

In vivo actúa sobre complejos lipoprotéicos que contienen lecitina en la membrana celular y probablemente sobre la membrana mitocondrial; produce además alteración de las membranas de eritrocitos, plaquetas, leucocitos y células endoteliales ocasionando lisis de estas células; (Vease fig. 3.9) aumenta la permeabilidad vascular con hemólisis masiva y hemorragia, así como destrucción tisular y edema observados durante la enfermedad. Recientemente se ha descrito su comportamiento como superantígeno (es decir que es capaz de estimular la proliferación policlonal de linfocitos T).^{13,14}



Figura 3.9 Lisis eritrocitaria³⁰

La toxina beta tiene actividad necrotizante (enteritis necrotizante) e induce hipertensión por liberación de catecolaminas. La toxina epsilon aumenta la permeabilidad vascular de la pared gastrointestinal. La toxina theta posee actividad necrotizante e induce un aumento de la permeabilidad vascular.^{13,14}

La enterotoxina producida por cepas de *C. perfringens* principalmente tipo A, pero también de los tipos C y D, es una proteína termolábil producida en el colon y liberada durante la esporulación. Posee estructura y función similar a las toxinas LT y CT de *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae* respectivamente. También tiene cierta actividad citotóxica. Produce enteritis, la dosis infectante es elevada.^{13,14}

Los antígenos omega, kappa y mu tienen un papel auxiliar en la diseminación local de la infección a través de los tejidos y en la provisión de nutrientes para la proliferación de los microorganismos; en bajas concentraciones la toxina omega es tóxica para los leucocitos humanos y puede ser responsable de la ausencia inusual de células polimorfonucleares en el tejido muscular infectado.^{13,14}

EPIDEMIOLOGÍA

C. perfringens es un microorganismo ubicuo: el tipo A (principal responsable de enfermedad en humanos) se encuentra en el tracto gastrointestinal de hombre y animales, y son numerosos en suelos, tanto las formas vegetativas como las esporuladas; también están en aguas contaminadas con heces.^{4,14}

La infección por estos microorganismos puede tener un origen endógeno o exógeno. En lesiones traumáticas la fuente de clostridios en general es la tierra presente en las heridas (la incidencia de contaminación e infección de heridas depende de la concentración de *C. perfringens* en los suelos, lo que varía según la localización geográfica).^{4,14}

En las infecciones endógenas la fuente de clostridios es la materia fecal presente en la piel o las vestimentas introducidas en las heridas, o clostridios que escapan del intestino cuando este es perforado, ya sea por enfermedad, lesiones traumáticas o intervenciones quirúrgicas.^{4,14} (Vease fig. 3.10)



Herida limpia

Herida gangrenosa



Figura 3.10 Herida gangrenosa³¹

PATOGENIA

Los clostridios son incapaces de iniciar una infección en tejidos sanos. Factores primordiales que predisponen a la mionecrosis son la isquemia y necrosis muscular, que proporcionan una tensión de O₂ y un potencial de oxidoreducción disminuidos, condiciones necesarias para la proliferación de estos microorganismos. Esto explica que aún con alta incidencia de contaminación de heridas, la incidencia de mionecrosis continúe siendo baja. En áreas con menor tensión de O₂ en el músculo, se acumula ácido láctico y el pH desciende. La combinación de la disminución del potencial redóx (Eh) y la caída del pH, puede activar enzimas proteolíticas endógenas y dar como resultado autólisis tisular. Esta liberación de nutrientes y la disminución del potencial de óxido-reducción proporcionan condiciones adecuadas para el desarrollo de los microorganismos anaerobios.^{4,14}

La proliferación de los microorganismos se acompaña de producción de toxinas solubles. En la mionecrosis estas toxinas difunden desde el sitio inicial, proliferan y atacan músculo y tejidos circundantes sanos. Estos tejidos son destruidos por las toxinas permitiendo la diseminación de la infección hacia nuevas áreas necróticas. El líquido de edema (producido por acción de la toxina y enzimas de clostridios sobre los tejidos) y el gas del metabolismo bacteriano, aumentan la presión del compartimiento muscular agravando la isquemia, disminuyendo aún más el potencial de óxido-reducción y el pH, proporcionando nuevas áreas adecuadas para la proliferación de clostridios.^{4,10,14}

ESPECTRO DE MANIFESTACIONES CLÍNICAS

- Contaminación simple de heridas.
- Celulitis, fascitis y otras infecciones de partes blandas.
- Mionecrosis por clostridios.
- Infecciones uterinas.
- Septicemia por clostridios.
- Intoxicación alimentaria.
- Enteritis necrotizante.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN

Tinción de Gram: el examen directo muestra bacilos Gram positivos rectos sin esporas ni leucocitos.⁴

Cultivo: en agar sangre incubado en anaerobiosis a 37 °C durante 24-48 h, colonias planas extendidas, 2-4 mm diámetro

- **Patrón característico cuando crece en agar sangre:** hemólisis doble, compuesta por una estrecha zona de hemólisis completa producida por la toxina alfa y una zona más amplia de hemólisis incompleta producida por la toxina omega.
- **B-hemólisis sinérgica al sembrarlo junto a *Streptococcus agalactiae*:** prueba CAMP inversa
- **Precipitación:** (opalescencia) en medios que contienen lecitina, causada por la toxina alfa e inhibida de forma específica por la antitoxina.
- **Fermentación “tormentosa” en medios con leche:** la fermentación de la lactosa produce gran cantidad de ácido, lo que provoca la coagulación de las proteínas (caseína); luego el coágulo es alterado y roto por el gran volumen de gas formado a partir de la fermentación de la lactosa (esta reacción también es producida por otras especies como *C. septicum* y otras)
- Producción de gas a partir de glucosa, fermentan lactosa, producción de ácido a partir de glucosa y lactosa, etc.^{4,13,14}

SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA

Todos los microorganismos del género *Clostridium* son uniformemente sensibles a penicilina.⁴

INTOXICACIÓN ALIMENTARIA

C. perfringens es la tercera causa de toxiinfección alimentaria bacteriana después de *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus*. Es causada por *C. perfringens*, usualmente cepas tipo A, productoras de enterotoxina. Dicha toxina es una proteína que se comporta como un superantígeno promoviendo la liberación de mediadores de la inflamación en forma masiva.^{4,5,13,14}

EPIDEMIOLOGÍA

La enfermedad se produce cuando el individuo ingiere alimento contaminado con un elevado número de microorganismos productores de enterotoxina (100 millones). Los alimentos que pueden estar contaminados son carne vacuna, suina, pollo, salsas cocinadas y no refrigeradas.^{4,8,13}

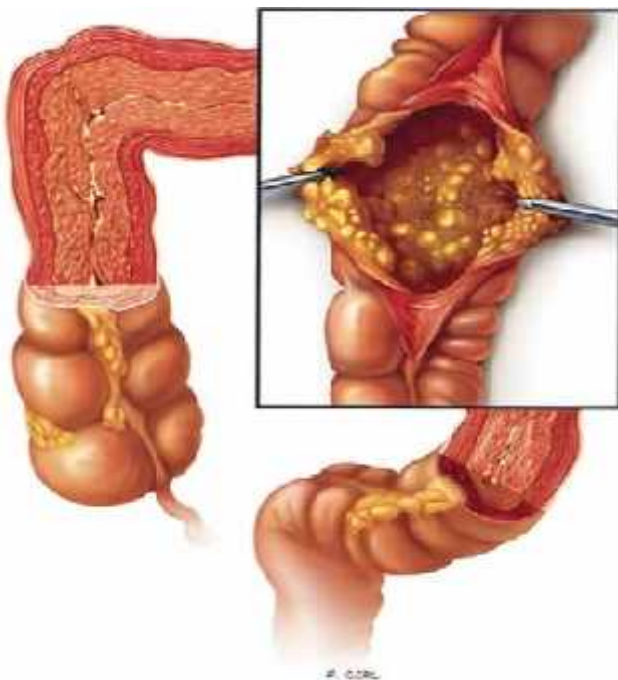


Figura 3.11 Intestino perforado por *C. difficile*.³²

Cuando los alimentos llegan al intestino delgado se produce la esporulación y la liberación de enterotoxinas. No son comunes los brotes familiares pero sí los producidos a través de alimentos preparados comercialmente destinados a restaurantes o instituciones.^{4,8} (Vease fig. 3.11)

En Uruguay según datos recogidos por el Sistema de Información Regional para la Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) se han declarado 3 brotes en el período 1993-2001, con 37 individuos afectados, no registrándose muertes. Los alimentos implicados fueron carnes rojas y carnes de aves. Dos ocurrieron en comedores y uno en una vivienda.^{4,8}

PATOGENIA

Todos los síntomas son atribuibles a la enterotoxina, que en general se sintetiza durante la esporulación de los microorganismos en el intestino delgado. La enterotoxina se une a un receptor de membrana del ribete en cepillo e induce una alteración de la permeabilidad calcio dependiente resultando en una pérdida de iones y metabolitos. Esta pérdida electrolítica altera la función metabólica intracelular provocando daño morfológico y eventual lisis.^{4,8,14}

CLÍNICA

Entre 7 y 15 horas luego de la ingestión de alimento contaminado los pacientes experimentan dolor abdominal agudo y diarrea; estos síntomas duran 12-18 horas y la recuperación suele ser completa, salvo raros casos de muerte en pacientes de edad avanzada y personas debilitadas.^{4,8,14}

DIAGNÓSTICO

Para confirmar el diagnóstico debe recuperarse el agente del alimento y del paciente. El diagnóstico se establece mediante el recuento de más de 100.000 UFC (unidades formadoras de colonias) por gramo de alimento o 1.000.000 UFC por gramo de materia fecal en el primer día de enfermedad. También puede buscarse la presencia de enterotoxina en las heces utilizando ELISA o hemaglutinación pasiva reversa; se han desarrollado además técnicas moleculares para la detección de estos agentes.^{4,8,14}

TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN

En general no requiere tratamiento antimicrobiano, sólo medidas de sostén. Como acción preventiva debe ser mantenida una refrigeración adecuada de los alimentos cocidos de no ser consumidos de inmediato.^{4,8,14}

ENTERITIS NECROTIZANTE

Es causada por *C. perfringens* tipo C y es más severa que la intoxicación alimentaria causada por el tipo A. Tiene un período de incubación de menos de 24h luego del cual aparecen dolor abdominal intenso y diarrea; en algunos pacientes ocurre pérdida de la mucosa intestinal con enterorragia. Puede ser letal con shock u oclusión intestinal y peritonitis. La toxina beta producida por *C. perfringens* tipo C es responsable de los síntomas; la administración de antitoxina reduce la mortalidad.^{4,8,13}

ENTEROCOLITIS SEUDOMEMBRANOSA

Clostridium difficile es el microorganismo responsable de esta entidad. Se trata de una gastroenteritis asociada a antibiotioterapia de severidad variable

desde diarrea autolimitada a colitis pseudomembranosa grave, potencialmente mortal.

C. difficile es un microorganismo anaerobio obligado, sacarolítico y débilmente proteolítico, a través de la fermentación ácida produce un conjunto de productos detectables por medio de cromatografía gas-líquida. Es parte de la biota normal del intestino del hombre y los animales.^{4,13,14} (Vease fig. 3.12)

FACTORES DE VIRULENCIA

C. difficile produce dos toxinas proteicas principales, antigénicamente diferentes, ambas implicadas en la patogenia: la toxina A, una enterotoxina potente y la toxina B citotóxica. La toxina A o enterotoxina es quimiotáctica para neutrófilos, produce infiltración de leucocitos polimorfonucleares en la lámina propia del íleon e induce la liberación de citoquinas por parte de macrófagos y polimorfonucleares, potenciando la respuesta inflamatoria a nivel local, con la resultante hipersecreción de líquidos y necrosis hemorrágica. La citotoxina o toxina B despolimeriza la actina ocasionando destrucción del citoesqueleto celular.^{1,6,13,14}

Otros factores de virulencia: factor de adherencia o adhesina (*in vitro* se une específicamente a células del colon humano), una hialuronidasa que hidroliza el ácido hialurónico del tejido conjuntivo, favoreciendo la diseminación; la formación de endosporas permite la supervivencia de estos microorganismos en el medio ambiente hospitalario durante meses.^{1,13,14}



Figura 3.12 *Clostridium difficile*³³

PATOGENIA

El tratamiento antibiótico extenso altera la biota entérica normal, permitiendo la proliferación de *C. difficile* relativamente resistentes o la colonización exógena (las cepas infecciosas de *C. difficile* pueden ser endógenas o exógenas); los antibióticos más a menudo vinculados a colitis pseudomembranosa son ampicilina, clindamicina y cefalosporinas.^{1,5,13}

TRATAMIENTO

La interrupción del antibiótico usado suele alcanzar para el caso de enfermedad leve. Los cuadros graves pueden tratarse con metronidazol o vancomicina vía oral. Puede haber recidivas por esporas resistentes al tratamiento antibiótico.^{4,5,8,14}

PREVENCIÓN

Es importante conocer el potencial para generar enfermedad gastrointestinal de la administración de antibióticos. Ante la presencia de diarrea sin otra causa evidente en pacientes que están recibiendo antibióticos es aconsejable suspender el tratamiento antibiótico o sustituirlo por otro que se asocie menos con diarrea y colitis.^{4,5,8,14}

Clostridium tetani.

Agente causal del tétanos, una enfermedad rara hoy en día en países desarrollados. Sin embargo, en países pobres, el tétanos neonatal tiene un impacto significativo sobre la mortalidad global. En el adulto la enfermedad ocurre clásicamente luego de una herida punzante y se caracteriza por espasmos musculares, el más típico de los cuales es el del maxilar inferior, de ahí el término de *trismus*.^{1,13,14}

La naturaleza anaerobia de *C. tetani* fue responsable en parte de la demora en su descubrimiento y aislamiento, que fue logrado en 1889 por Kitasato. Así se llegó al descubrimiento de la toxina tetánica y a la detección poco tiempo después de la antitoxina específica. Ver figura 3.11.^{1,13,14}

BIOLOGÍA DEL MICROORGANISMO

C. tetani es un bacilo largo y delgado en comparación con otros clostridios patógenos. (Vease fig. 3.13) Son Gram positivos, aunque como todas las bacterias anaerobias tienden a tornarse Gram variables, sobre todo en los cultivos más viejos. Producen esporas terminales de mayor diámetro que la célula vegetativa, dando la característica imagen de palillo de tambor. Tienen flagelos peritricos que le confieren activa motilidad.¹



Figura 3.13 *C. tetani*³⁴

Es anaerobio estricto, difícil de cultivar por su extremada sensibilidad al oxígeno. Posee requerimientos nutricionales complejos (entre ellos ciertos aminoácidos y vitaminas); es capaz de crecer en agar sangre y en caldo con carne cocida. No fermenta ningún hidrato de carbono, tiene escasa actividad metabólica.^{1,5,8,13} (Vease fig. 3.14)

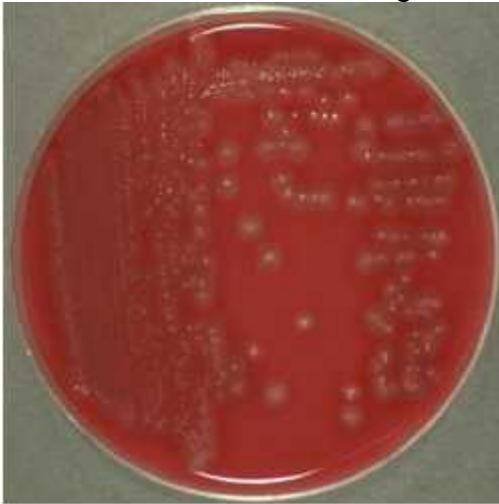


Figura 3.14 *C. tetani* en agar sangre³⁵

ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

Poseen antígenos flagelares o antígenos H (10 serotipos) y antígeno somático o antígeno O (un solo serogrupo). Todas las cepas de *C. tetani* producen un solo tipo antigénico de toxina y su efecto es neutralizado por una sola antitoxina lo que tiene una enorme importancia práctica en

cuanto a la profilaxis de esta enfermedad.^{1,13,1,4}

FACTORES DE VIRULENCIA

Toxina tetánica: todos los síntomas del tétanos son atribuibles a una neurotoxina sumamente tóxica, la tetanospasmina, toxina intracelular liberada por autólisis celular. El gen estructural de la toxina se localiza en un plásmido. Es una proteína termolábil (inactivada por calentamiento a 60°C durante 20 min). Se trata de una toxina tipo A-B. Por analogía con estas toxinas, se cree que la toxina tetánica es captada por endocitosis mediada por receptores y que el bajo pH presente en la luz endosómica hace que la toxina se inserte en la bicapa lipídica y atraviese la membrana endosómica para llegar al citoplasma. La toxicidad de la toxina tetánica intacta se asocia con la cadena liviana A. El fragmento B purificado de la cadena pesada forma canales en las membranas lipídicas y posee el sitio de unión a los receptores celulares (sitio fijador de gangliósidos).^{1,5,13,14}

La toxina tetánica es una de las sustancias más tóxicas que se conocen (sólo la toxina botulínica y la toxina Shiga tienen una toxicidad comparable). El toxoide producido a partir del tratamiento de la toxina con formaldehído es útil para la inmunización contra la enfermedad. El toxoide no es tóxico pero conserva los determinantes antigénicos de la toxina tetánica que dan origen a los anticuerpos antitoxina. La molécula de la toxina tetánica contiene 20 determinantes antigénicos diferentes como mínimo, y los anticuerpos contra por lo menos 9 de ellos son capaces de neutralizar la toxicidad de la toxina.^{1,6,8,9}

La tetanolisina es una hemolisina oxígeno lábil relacionada serológicamente con hemolisinas de otros clostridios y con la estreptolisina O de *Streptococcus*

pyogenes. Las esporas de *C. tetani* son capaces de persistir en el medio ambiente (suelo, tracto gastrointestinal de humanos y animales) durante meses o años.

EPIDEMIOLOGÍA

Si bien la incidencia del tétanos ha disminuido en las regiones del mundo donde se alcanza un alto porcentaje de inmunización de la población, continúa siendo una enfermedad común y no controlada en algunos países en desarrollo.

PATOGENIA

Las esporas de *C. tetani* son ubicuas: se recuperan en 20-64% de muestras de suelos recolectadas para cultivos así como del tracto gastrointestinal de humanos y otros animales. Si se efectúan cuidadosos cultivos de material de heridas traumáticas la presencia de *C. tetani* también puede demostrarse con mucha frecuencia. Sin embargo es bastante raro que se desarrolle tétanos a partir de estas heridas. El aspecto más significativo de la patogenia del tétanos es el contexto de la herida donde el potencial de oxido-reducción debe tener el equilibrio apropiado para permitir la multiplicación del microorganismo y la toxigenesis.^{1,3,4,10} (Vease fig. 3.16)



Figura 3.15 *C. tetani* en un bebe³⁶

Clásicamente las heridas halladas en la práctica son las heridas punzantes producidas por clavos, astillas o espinas, pero también en otros contextos como las fracturas expuestas, el uso drogas intravenosas, las úlceras de decúbito y las varicosas, las otitis externas y las extracciones dentales, se dan las condiciones adecuadas. La forma más temida de tétanos, el tétanos neonatal es una causa importante de morbimortalidad en países en desarrollo y es producida por el corte del cordón umbilical con instrumentos no estériles o por el cuidado inapropiado del muñón umbilical.^{1,5} (Vease fig. 3.15)



Figura 3.16 Contracciones por *Clostridium tetani*³⁷

Un factor contribuyente importante es la presencia de bacterias aerobias que pueden proliferar hasta el punto de eliminar el O₂ y luego continuar proliferando de forma facultativa en anaerobiosis. Esta proliferación puede reducir el Eh hasta el punto en el cual las esporas tetánicas

pueden germinar. Después de la germinación de las esporas se elabora la toxina,

que ingresa en el sistema nervioso central. La infección por *C. tetani* permanece localizada con reacciones mínimas a menos que se encuentren otros microorganismos.^{1,8,13,14}

La forma de acción de la toxina involucra la unión a gangliósidos GT1 en las membranas de las terminaciones nerviosas periféricas a través la subunidad B, seguida de la internalización de la subunidad A y su desplazamiento hacia el sistema nervioso central por transporte axonal retrógrado. Cuando llega a la región del núcleo es transportada hacia las interneuronas inhibitoras, donde inhibe la liberación de neurotransmisores inhibitorios (GABA, glicina) conduciendo a una actividad sináptica excitadora descontrolada dando lugar a una parálisis espástica.^{1,8,13,14}

Esta inhibición de la liberación de sustancias inhibitorias permite que prevalezcan los músculos más poderosos: espasmos musculares de los maseteros con trismus, flexión de las extremidades superiores y extensión de las inferiores con arqueamiento de la espalda (opistótonos).^{13,14}

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Tétanos generalizado: afectación maseteros o trismo, dando lugar a la risa sardónica, salivación, sudoración, irritabilidad y espasmos persistentes de los músculos de la espalda (opistótonos).^{2,7}

Además puede haber afectación del sistema nervioso autónomo dando lugar a arritmias cardíacas, fluctuaciones de la presión arterial, sudoración intensa y deshidratación. Tétanos localizado: afecta la musculatura sólo de la zona de infección primaria.^{2,7}

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN

Para su aislamiento debe sembrarse de inmediato en medios sólidos pre reducidos y medios de cultivo líquidos para anaerobios. Las colonias son translúcidas con borde que avanza filamentosos y delicado, betahemolíticas. La prueba final para la identificación de *C. tetani* es la demostración de la producción de toxina tetánica *in vivo* cuando se inyecta en ratones, y la neutralización de su toxicidad en ratones previamente inoculados con antitoxina.^{3,11}

TRATAMIENTO

Se basa en el debridamiento de la herida y la administración de penicilina (en pacientes alérgicos se puede administrar tetraciclinas o metronidazol), la inmunización pasiva con inmunoglobulina antitetánica humana (que neutraliza la tetanoespasmina libre) y la inmunización activa con toxoide tetánico.^{3,11}

Para los espasmos musculares se utilizan drogas como curare o, en tetanoespasmos leves, barbitúricos y diazepam, además del soporte de las funciones vitales.^{3,11}

PREVENCIÓN

Se realiza a través de la vacunación con toxoide tetánico (toxina tratada con formalina); se administran 3 dosis al principio y luego dosis de refuerzo cada 10 años. (Vease fig. 3.17) La inmunización de embarazadas en el tercer trimestre del embarazo asegura la inmunización pasiva del neonato (mediante el pasaje de anticuerpos maternos a través de la placenta), disminuyendo el riesgo de tétanos neonatal. La enfermedad natural no confiere inmunidad contra infecciones posteriores, por lo tanto los pacientes que se recuperan de la enfermedad deben ser inmunizados activamente para prevenir la reinfección exógena o la recurrencia a partir de esporas retenidas dentro del organismo.^{3,11}



Figura 3.17 Vacuna antitetánica³⁸

Clostridium botulinum

C. botulinum produce la exotoxina más potente que se conoce, que es una neurotoxina causante del botulismo, una severa enfermedad neuromuscular caracterizada por comienzo súbito y evolución rápida que culmina en un parálisis marcada y un paro respiratorio. La enfermedad es rara en el ser humano, muy común en los animales. A diferencia de la toxina tetánica, hay siete toxinas botulínicas serológicamente diferentes, denominadas A, B, C1, D, E, F, G.¹

La forma más común de botulismo es el transmitido por los alimentos, una intoxicación causada por la ingestión de la toxina botulínica preformada en los alimentos contaminados. (Vease fig. 3.18) El empleo del autoclave con temperaturas lo bastante elevadas como para destruir las esporas en la industria del enlatado ha reducido la importancia relativa de los alimentos comercialmente enlatados como fuente de la enfermedad, excepto cuando se producen errores en el procedimiento. Dado que la toxina es destruida por el calor, la cocción de rutina de los alimentos enlatados en el hogar limita la frecuencia de éste tipo de intoxicación.^{1,2,9}



Figura 3.18 Lata inflada por toxinas³⁹

Además del botulismo transmitido por los alimentos la enfermedad también ocurre cuando la toxina es producida por miembros de la especie *C. botulinum* que contaminan heridas traumáticas (botulismo de las heridas) y cuando se elabora la toxina en el tracto gastrointestinal de los lactantes (botulismo infantil o de los lactantes).^{1,6,7}

BIOLOGÍA DEL MICROORGANISMO

Son bacilos Gram positivos largos, rectos a levemente curvos, con extremos redondeados. Forman esporas ovoides y subterminales que distienden los bacilos. Poseen flagelos peritricos que le confieren movilidad. Son anaerobios estrictos, con requerimientos nutricionales complejos.^{1,6,7} (Vease fig. 3.19)



Figura 3.19 *C. botulinum*⁴⁰

Existen siete tipos de toxina botulínica (A a G). Es posible dividir a los microorganismos en cuatro tipos (I a IV) según la toxina que producen y su actividad proteolítica. La enfermedad humana está vinculada a los tipos I y II y a la toxina A principalmente.¹

La resistencia al calor de la spora es mayor que la de cualquier otro microorganismo anaerobio (sobreviven varias horas a 100 °C y hasta 10min a 110 °C). Las esporas son también resistentes a las radiaciones y pueden sobrevivir a -190 °C.¹

ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

C. botulinum ha sido dividido en ocho tipos serológicamente diferentes sobre la base del tipo de toxina producida.

FACTORES DE VIRULENCIA

La toxina botulínica (Vease fig. 3.20) es una proteína tipo A-B con una subunidad A o cadena ligera A que posee actividad neurotóxica y una o más subunidades B o cadenas pesadas B no tóxicas, responsables de la unión al receptor celular y posterior internalización de A; además protege a la subunidad A de la inactivación por el pH gástrico.^{1,4,15}

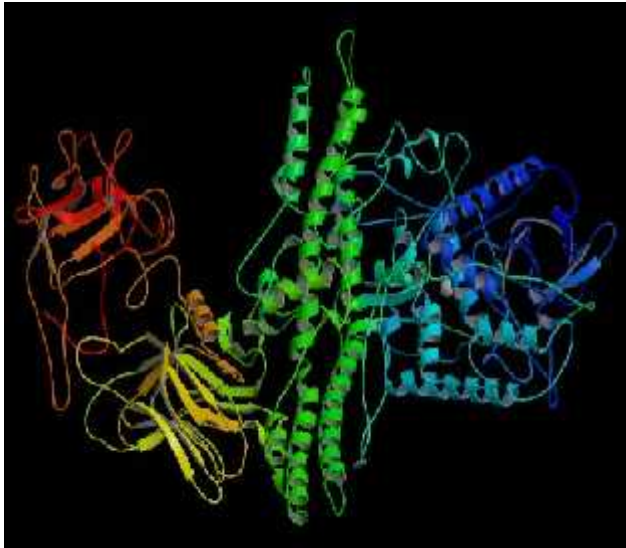


Figura 3.20 Toxina botulínica⁴¹

Se clasifica como una exotoxina debido a su potencia y antigenicidad elevadas, sin embargo se diferencia de una exotoxina clásica por cuanto no es liberada durante la vida del microorganismo sino que aparece en el medio solo después de la muerte y la autólisis de éste.^{1,4,15}

La toxina es sintetizada como un polipéptido de cadena única; el clivaje o la formación de muescas en la molécula por medio de proteasas bacterianas en el curso de su liberación de la célula dan como resultado una molécula compuesta por una cadena pesada y una cadena liviana unida por enlaces no covalente y un puente disulfuro. La producción de la toxina botulínica está dirigida por bacteriófagos específicos.^{1,13,14}

PATOGENIA

Los casos de botulismo se clasifican en cuatro categorías:

- 1.-El botulismo transmitido por los alimentos es un intoxicación alimentara letal que es resultado de la ingestión de la neurotoxina en alimentos procesados de manera incompleta y contaminados por los microorganismos.¹
- 2.-El botulismo infantil relacionado con la ingestión por los lactantes de esporas de *C. botulinum*, la multiplicación de los microorganismos en el tracto gastrointestinal y la posterior absorción de la toxina.
- 3.-El botulismo de las heridas, el menos común, enfermedad neurológica asociada con las heridas, las cuales muestran pocas evidencias clínicas de infección activa.
- 4.-El botulismo no clasificado se produce en las personas de más de un año de vida que tiene síntomas de botulismo clínico, sin un vehículo de transmisión identificable.¹

Las manifestaciones clínicas del botulismo son atribuibles a la toxina de *C. botulinum* presente en los alimentos ingeridos en el tracto gastrointestinal de los lactantes o en las heridas. Es una de las toxinas más potentes que se conocen.

El botulismo humano en general es resultado de la ingestión de toxina botulínica preformada en los alimentos contaminados. Luego de la ingestión, la toxina es absorbida en el estómago y el intestino delgado, también en el colon.^{1,3}

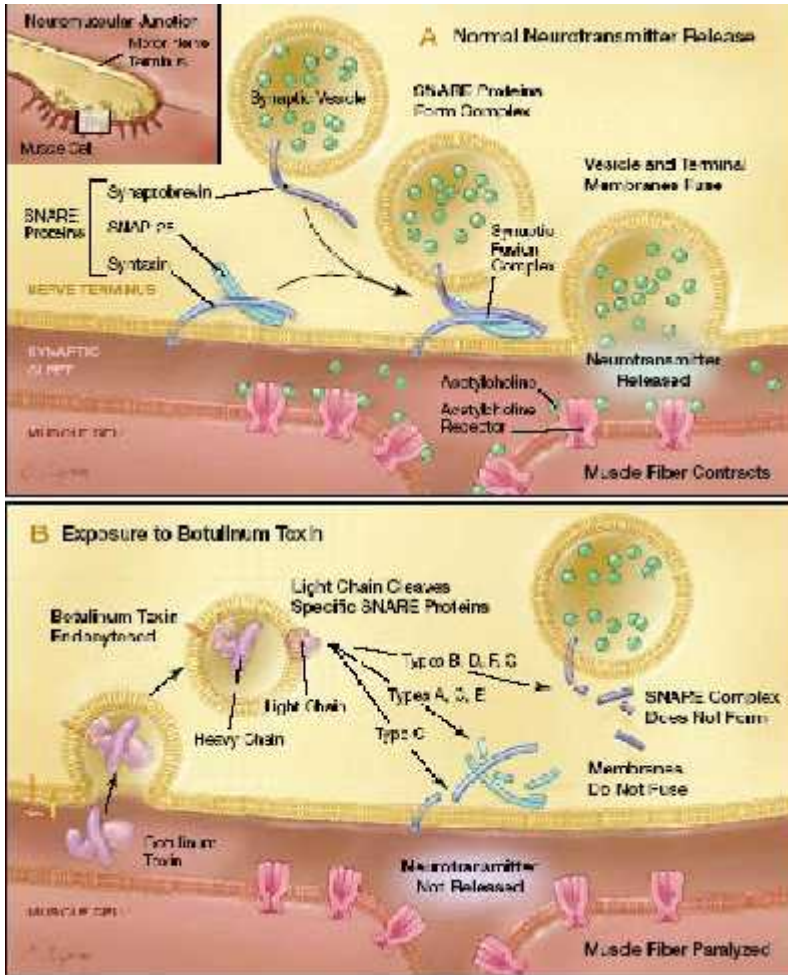


Figura 3.22 Mecanismo de la toxina⁴²

Después de un periodo de incubación que se relaciona de forma inversa con la dosis, la intoxicación conduce a una alteración funcional del sistema nervioso periférico que resulta de la inhibición de la liberación de acetilcolina desde las terminaciones nerviosas colinérgicas en la unión neuromuscular producida por la toxina botulínica. La toxina actúa en tres pasos:

- 1) unión a un receptor en la superficie en la membrana plasmática.
- 2) translocación o internalización de la toxina
- 3) suceso intracelular cuyo resultado final es el bloqueo de la liberación de acetilcolina inducida por el estímulo nervioso.^{1,6} (Vease fig. 3.22)

Además la toxina botulínica afecta la transmisión colinérgica en el sistema autónomo, tanto en los ganglios simpáticos como en las placas terminales motoras parasimpáticas ubicadas de forma periférica.^{1,6}

En el botulismo de las heridas, *C. botulinum* contamina una lesión traumática. Es probable que la rareza de ésta forma de botulismo se deba a la incapacidad de las esporas para germinar con rapidez en los tejidos.^{1,6}

El papel de la infección del tracto gastrointestinal como fuente de botulismo es menos claro. Los lactantes son especialmente susceptibles a la colonización del tracto intestinal por *C. botulinum* y a la producción de la toxina *in vivo*. La resistencia relativa del adulto a la colonización intestinal se adjudica a los cambios evolutivos de la dieta y a la biota bacteriana del intestino. Sin embargo en la actualidad se están observando casos de botulismo infantil en los adultos en especial en aquellos con anomalías del tracto gastrointestinal como consecuencia de una enfermedad inflamatoria intestinal o de un procedimiento quirúrgico. Las alteraciones de la biota intestinal normal como resultado de aclorhidria o de la administración de antibióticos de amplio espectro, son factores de riesgo adicionales para el desarrollo por infección de *C. botulinum* y la producción de la toxina *in vivo*.^{1,8,13,14}

EPIDEMIOLOGÍA

Se encuentran esporas de *C. botulinum* en suelos y agua de todo el mundo. Existen tres formas de botulismo: botulismo clásico o transmitido por alimentos, botulismo infantil y de las heridas.

La toxiinfección alimentaria se manifiesta en brotes relacionados con alimentos comercialmente preparados como enlatados mal conservados, pero más frecuentemente por vegetales, frutas y pescados en preparaciones caseras de tipo mermeladas, pimientos, condimentos para carnes, etc. En Uruguay en el período 1993-2001 se ha declarado un brote de botulismo con un total de 4 individuos afectados, con 1 fallecimiento.^{1,8,13,14}

El botulismo del lactante afecta a niños dentro del primer año de vida (Vease fig. 3.23) y es causado por la ingestión de esporas de *C. botulinum* que germinan en el intestino delgado con producción de la toxina *in vivo*. El alimento involucrado fundamentalmente es la miel.^{1,13,14}

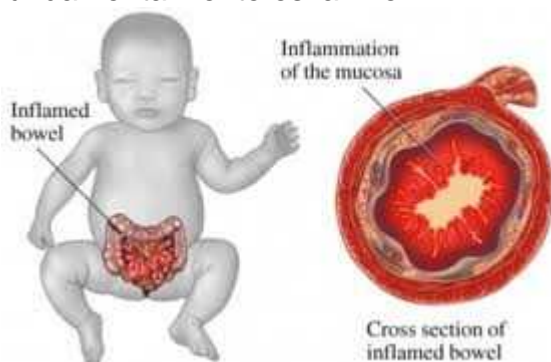


Figura 3.23 Botulismo en lactante⁴³

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Después de 12 a 36 horas de la ingestión del alimento contaminado (para el caso del botulismo transmitido por alimentos) el paciente presenta náuseas, sequedad de boca, y diarrea. La enfermedad progresa a debilidad y parálisis flácida descendente y bilateral de los músculos periféricos, llegando luego a la parálisis respiratoria. Si el paciente no muere la recuperación es lenta, pudiendo llevar varios años el restablecimiento de las terminaciones nerviosas afectadas.^{1,5,8}

La tasa de mortalidad depende del tipo de toxina, la distribución de la toxina en el alimento y del diagnóstico y tratamiento precoz con antitoxina (32% para el tipo A, 17% para el B y 40% para el E).^{1,5,8}

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de laboratorio se realiza preferentemente en laboratorio de referencia por aislamiento y pruebas bioquímicas convencionales. La enfermedad es confirmada por la presencia de toxina en suero, heces o contenido gástrico del paciente y la presencia de toxinas en el alimento confirma su participación como origen del brote.^{4,7} (Vease cuadro 3.2)

TRATAMIENTO.

El paciente requiere asistencia respiratoria, eliminación de la bacteria del tracto gastrointestinal por lavado gástrico, tratamiento con penicilina y antitoxina botulínica trivalente (antitoxina A, B y E para neutralizar la toxina en sangre). Este tratamiento logra una considerable disminución de la mortalidad.^{4,7}

PREVENCIÓN

La profilaxis consiste en evitar la germinación de esporas en los alimentos manteniéndolos a pH ácido o a 4 °C o menos. El calentamiento de los alimentos a 80 °C durante 20 minutos puede destruir la toxina preformada. En el caso del botulismo del lactante la prevención está orientada al no consumo de miel antes del primer año de vida.^{4,7} (Vease fig. 3.24)

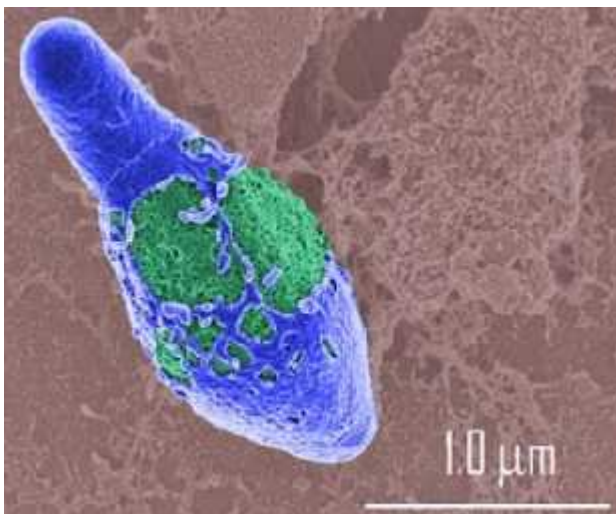


Figura 3.24 Espora del *Clostridium botulinum*⁴⁴

Cuadro 3.2 BACILOS GRAM POSITIVOS ANAEROBIOS:

- *Clostridium* spp.:

Lecitinasa	Lipasa	Indol	Ureasa	Productos metabolismo	Especies
Positiva	Positiva	Negativo			<i>C. novyi A</i>
Positiva	Negativa	Negativo			<i>C. perfringens</i>
Positiva		Positivo	Negativa		<i>C. bifermentans</i>
Positiva		Positivo	Positiva		<i>C. sordellii</i>
Negativa	Positiva				<i>C. botulinum</i> <i>C. sporogenes</i>
Negativa	Negativa			Ácido acético	<i>C. ramosum</i> <i>C. clostridioforme</i>
Negativa	Negativa			Ácido butírico	<i>C. tetani</i> <i>C. septicum</i> <i>C. butyricum</i>
Negativa	Negativa			Ácido isocaproico	<i>C. difficile</i>

- *Propionibacterium* spp.: confirmación mediante la detección de ácido propiónico como producto final del metabolismo. *P. acnes*: catalasa (+), indol (+) y nitratos (+)

- *Eggerthella lenta* (*Eubacterium lentum*): nitratos (+), estimulación del crecimiento con arginina y producción de SH₂ en TSI.



**CAPITULO 4
BACTERIAS
ANAEROBIAS GRAM
NEGATIVAS.**

CAPITULO 4 BACTERIAS ANAEROBIAS GRAM NEGATIVAS.

4.1. COCOS GRAM NEGATIVOS ANAEROBIOS

Veillonella

Son cocos Gram negativos anaerobios, de crecimiento lento, que a veces requieren prolongar la incubación de sus exámenes bioquímicos; las reacciones bioquímicas no deben ser leídas hasta que no se observe un crecimiento suficiente.^{1,2}

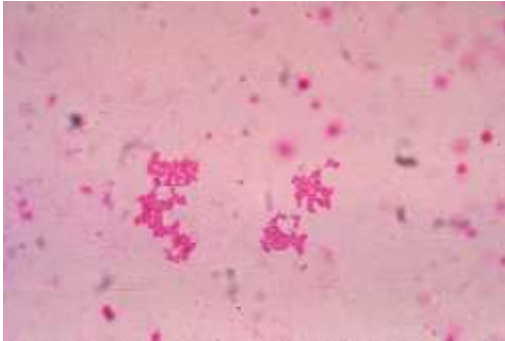


Figura 4.1 *Veillonella sp.*⁴⁵

Las colonias de *Veillonella* son muy pequeñas, blanco – grisáceas, translúcidas y reducen nitratos a nitritos ($\text{NO}_3 - \text{NO}_2$). Las colonias de *Veillonella* semejan a los pigmentos de *Porphyromonas* y *Prevotella sp*; y pueden fluorescer rojo bajo los rayos ultravioleta. *Veillonella sp* no es fermentativo y produce ácido propionico.^{1,2} (Véase fig. 4.1)

MORFOLÓGIA E IDENTIFICACIÓN (Véase cuadro 4.1)

Cocos Gram negativos agrupados en pares, en masas o cadenas, aunque pueden observarse células simples, no móviles, no esporulados, no capsulados y no flagelados, con un diámetro de 0.3 a 0.5 μm y un largo de 0.5 μm .^{4,7}

Cultivo: se cultivan en agar – sangre con vancomicina en condiciones de anaerobiosis, con un pH de 6.5 a 8, a temperatura de 30 y 37 °C crecen probablemente a 40 °C y de forma lenta a 24 °C. Las colonias tienen un diámetro de 1-3 mm, son lisas, cristalinas, opacas y de color blanco – grisáceo.^{4,7}

Pruebas fisiológicas: No fermenta los carbohidratos (glucosa, lactosa, maltosa, sacarosa) y producen ácido propionico.^{4,7}

Pruebas serológicas: Están basadas en la endotoxina que permiten especificidad serológica.^{4,7}

TRATAMIENTO

Son sensibles al cloranfenicol, imipenem, metronidazol, clindamicina, cefoxitina, ticarcilina, penicilina G, kanamicina y colistina.^{4,7}

COCOS GRAM NEGATIVOS ANAEROBIOS

- *Veillonella* spp.: nitratos (+)
- *Acidaminococcus* spp.: nitratos (-) y producción de ácido butírico (Vease fig. 4.3)
- *Megasphaera* spp.: nitratos (-) y producción de ácido caproico. (Vease fig. 4.2)

Figura 4.2 *Megasphaera* spp⁴⁶

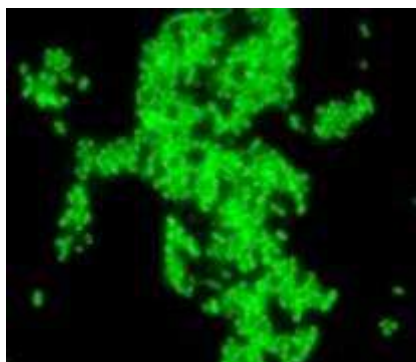
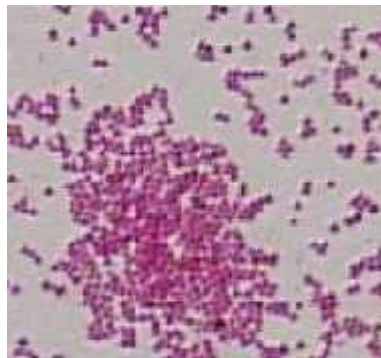


Figura 4.3 *Acidaminococcus* spp⁴⁷



Cuadro 4.1 IDENTIFICACIÓN ABREVIADA DE LOS ANAEROBIOS GRAM NEGATIVOS

	forma celular	células delgadas con extremos en punta	kanamicina (1 mg)	Vancomicina (5 µg)	Colistina (10 µg)	Crecimiento en bilis	indol
Gramnegativos							
Grupo							
<i>Bacteroides Fragilis</i>	B	-	S	R	S	+	V
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	B	-	S	R	S	-	-
Especies pigmentadas							
<i>Prevotella intermedia</i>	B, CB	-	R	R	V	-	V
<i>Prevotella loescheii</i>	B, CB	-	R	R	S	-	+
Otras especies de <i>Prevotella</i>	B, CB	-	R	R	R ^c	-	-
Especies de Porphyromonas							
	B, CB	-	R	R	V	-	V
	B, CB	-	R	S ⁺	R	-	+
Especie de Bilophila	B	V	S	R	S	+	-
Especies de Fusobacterium							
<i>F. nucleatum subesp. Nucleatum</i>	B	+	S	R	S	-	+
<i>F. necrophorum subesp. Necrophorum</i>	B ⁺	-	S	R	S	-♦	+
<i>F. mortiferum-varium</i>	B	-	S	R	S	+	V
Cocos gramnegativos							
<i>Veillonella</i>	C	-	S	R	S	-	-

*El grupo *P. melanogenica* a menudo requiere incubación prolongada antes de que se observe el pigmento.

✦ *P. bivia* produce pigmento con la incubación prolongada.

☾ *P. gingivalis* no fluoresce.

▲ Células fusiformes, delgadas, con extremos en punta.

Las reacciones en negrita son pruebas importantes; B, bacilos; C, cocos; CB, coco bacilos; R, resistente; S, sensible; V, variable; +, positiva; -, negativa; el superíndice indica reacciones de cepas aisladas.

Fuente: modificado del National Committee for Clinical Laboratory Standards: Abbreviated identification of bacteria and yeast; Proposed guideline, M35-P, Wagner, Pa, 2000, NCCLS; Summanen P, Baron EJ, Citron DM, et al Wadsworth anaerobic bacteriology manual, ed 5, Belmont, Calif, 1993, Star.

4.2. BACILOS GRAM NEGATIVOS ANAEROBIOS

Bacteroides

Los bacteroides son bacilos Gram negativos anaerobios obligados que están presentes en gran cantidad en el intestino grueso del ser humano y otros vertebrados. (Véase fig. 4.4) Llegan a 10^{11} o más por gramo de materia fecal y son los microorganismos predominantes, junto con los estreptococos anaerobios (*E. coli* está presente en una proporción 10^8). El género incluye muchas especies de las cuales *Bacillus fragilis* y *B. thetaiotamicron* son los patógenos más prominentes (otras especies: *B. vulgatus*, *B. ovatus*, *B. distasonis*, *B. ureolyticus* y *B. gracilis*). Entre los bacteroides intestinales *B. fragilis* es un componente menor, que en general se halla en concentraciones de 10^8 o 10^9 por gramo de materia fecal, sin embargo es por lejos el microorganismo aislado con más frecuencia de las infecciones.¹

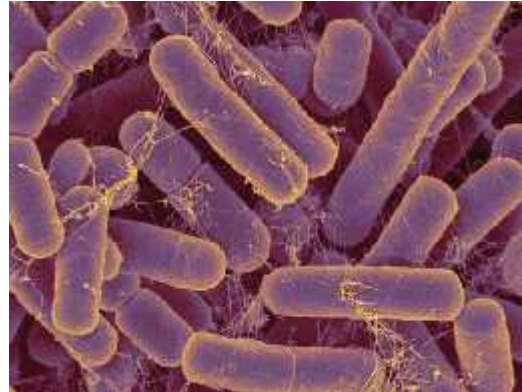


Figura 4.4 *Bacteroides*⁴⁸

Esto puede explicarse por algunos factores de virulencia adicionales que posee esta especie. Los bacteroides se asocian a infecciones anaerobias subdiafragmáticas y genitales (por su vecindad con la porción final del aparato digestivo y región perineal) y sepsis a punto de partida de estas infecciones.¹

Todos los miembros del género son resistentes a penicilinas (por producción de betalactamasas) y cefalosporinas, con alguna excepción.^{5,9}

Bacteroides fragilis

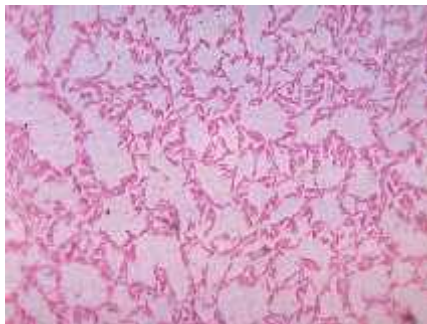


Figura 4.5 *Bacteroides fragilis*⁴⁹

Cocobacilos pequeños Gram negativos, pleomórficos con vacuolas evidentes. Las colonias son pequeñas, bajas, convexas, de color blanco a gris, semiopacas y brillantes, y algunas pueden ser hemolíticas. (Véase fig.

4.5) *B. fragilis* aislado de muestras clínicas posee una cápsula polisacárida que puede perderse o disminuir con los cultivos sucesivos en el laboratorio. *B. fragilis* es un microorganismo anaerobio moderado que prolifera de forma máxima con una presión de oxígeno de menos del 3% pero que es capaz de sobrevivir a exposiciones prolongadas al O₂. El microorganismo produce superóxido dismutasa y catalasa (en presencia de hemina). Proliferan más rápidamente que la mayor parte de las bacterias anaerobias no formadoras de esporas, y la proliferación es estimulada por bilis.^{1,5,9}

ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

Dos antígenos, el proteico termolábil y el lipopolisacárido termoestable han proporcionado la base para la clasificación serológica de los *Bacteroides*. Se ha demostrado un antígeno polisacárido capsular específico de especie en las cepas de *B. fragilis*.^{1,5,8}

FACTORES DE VIRULENCIA

La cápsula polisacárida de *B. fragilis* confiere mayor virulencia a esta especie por iguales mecanismos que en otras bacterias: interferencia en la quimiotaxis, en la fagocitosis y la destrucción opsonofagocítica por los neutrófilos y posiblemente también en la depuración de los microorganismos por la mayor adherencia de los microorganismos encapsulados al mesotelio peritoneal.^{1,5,8}

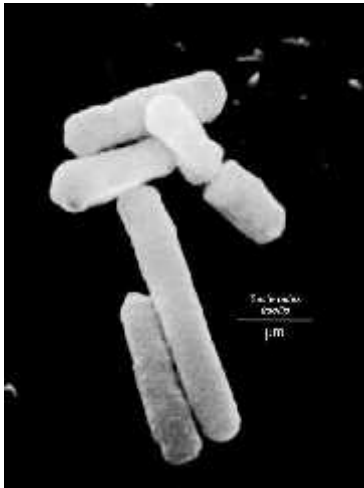


Figura 4.6 *B. fragilis*⁵⁰

Otras especies del género *Bacteroides* también presentan cápsula.^{1,11}

El lipopolisacárido de la membrana externa de los bacteroides tiene una estructura química alterada en comparación con las endotoxinas clásicas de las bacterias Gram negativas aerobias y facultativas, y tiene menos actividad biológica. Aún así el lipopolisacárido del *B. fragilis* parece promover la formación de abscesos en animales de experimentación (aunque la cápsula es más activa en este aspecto que el lipopolisacárido). Además, se ha demostrado el aumento de la coagulación (disminución del tiempo de coagulación) en los ratones inyectados con lipopolisacárido.^{1,11,13} (Vease fig. 4.6)

Estos microorganismos producen muchas enzimas periplasmáticas, como las lipasas, las proteasas y una neuraminidasa, aunque su papel en la patogenia todavía no ha sido bien documentado. Las enzimas protectoras contra el oxígeno como la superóxido dismutasa, la peroxidasa y la catalasa pueden considerarse

factores de virulencia porque aumentan la supervivencia de los anaerobios en los tejidos ante el establecimiento de una tensión de oxígeno y un potencial de oxidorreducción bajos.^{1,11,13}

El succinato, un ácido graso de cadena corta elaborado como producto final metabólico, es producido por todas las especies del género *Bacteroides*. El ácido succínico en las concentraciones que corresponden a las medidas en los abscesos reduce de manera significativa la destrucción fagocítica de *E. coli* por los leucocitos polimorfonucleares humanos y disminuye su migración quimiotáctica. Se han descrito cepas de *B. fragilis* que producen una enterotoxina. Estas cepas enterotoxigénicas se asocian de manera significativa con enfermedades diarreicas en el ser humano y en el ganado que no presentan otros patógenos entéricos conocidos.^{1,13,14}

PATOGENIA

La pared del colon puede romperse como resultado de un traumatismo penetrante o no penetrante, la ruptura del intestino o cirugía abdominal. (Vease fig. 4.7). Cualquiera que sea el mecanismo, el número de microorganismos que contaminan la cavidad peritoneal es enorme. Los fagocitos son movilizados rápidamente en gran cantidad hacia el sitio infectado y pueden eliminar un gran número de bacterias. Los microorganismos que ingresan en la cavidad peritoneal se hallan primero en una fase líquida que podría, en principio, llevar a su diseminación en toda la cavidad. Sin embargo, el epiplón mayor y las asas intestinales delgadas se envuelven alrededor de las áreas de inflamación y sirven para contener la infección. Esto lleva tiempo pero los abscesos que se desarrollan finalmente, en general, están muy bien localizados. El drenaje linfático y el esfuerzo de la fuerza de gravedad también influyen en la localización de los abscesos.^{1,12,13}



Figura 4.7 Cirugía abdominal⁵¹

Dada la diversidad del inoculo bacteriano, un gran número de factores deben estar involucrados en la determinación de qué especie resulta dominante en la infección. Muchas bacterias intestinales pueden crecer en el líquido peritoneal. Es muy probable que la primera línea de defensa sea la movilización de las células fagocíticas que ocurre con rapidez. Por ende, las bacterias que finalmente sobreviven y crecen deben ser bastante resistentes a la fagocitosis. De hecho, muchas son encapsuladas. Este puede ser uno de los motivos principales de la mayor frecuencia de aislamiento del *B. fragilis*, dado que este microorganismo se encuentra entre los miembros del género *Bacteroides* que tiene la cápsula más grande.^{1,4,6}

Cuando el contenido del colon se derrama la cavidad peritoneal está bien oxigenada y los microorganismos anaerobios altamente sensibles al oxígeno son destruidos. Los primeros microorganismos que resultan numéricamente dominantes son los anaerobios facultativos, en especial *Escherichia coli*. Sin embargo, muchos de los anaerobios estrictos menos sensibles al oxígeno sobreviven y pueden ser aislados del líquido y de la superficie de las células mesoteliales. Por último el sitio de la infección se vuelve cada vez más anaerobio, en parte porque los microorganismos anaerobios facultativos metabolizan el oxígeno presente y en parte porque el sitio se torna cada vez más avascular. Entonces comienzan a predominar los microorganismos anaerobios estrictos sobrevivientes. Esta sinergia entre los diversos microorganismos necesaria para la formación de abscesos se demuestra claramente en el estudio con animales. La inoculación de una sola especie de bacterias intestinales rara vez provoca infección, mientras que la infección con una mezcla de microorganismos anaerobios facultativos y estrictos lleva a la inflamación aguda y la formación de abscesos.^{1,4,6}

Si las defensas peritoneales no son capaces de erradicar el contenido intestinal derramado, en general se desarrolla un absceso. Las áreas de inflamación se tabican y son rodeadas por una gruesa capa fibrosa que contiene colágeno. En su interior hay leucocitos, bacterias vivas y muertas, y restos celulares.^{1,3,12,15}

En los abscesos peritoneales *B. fragilis*, predominante, a menudo está acompañado no solo por microorganismos anaerobios facultativos, sino también por otros microorganismos anaerobios estrictos, como los miembros del género *Clostridium* o los estreptococos anaerobios (*Peptococcus*, *Peptostreptococcus*).^{3,7} (Vease fig. 4.8)

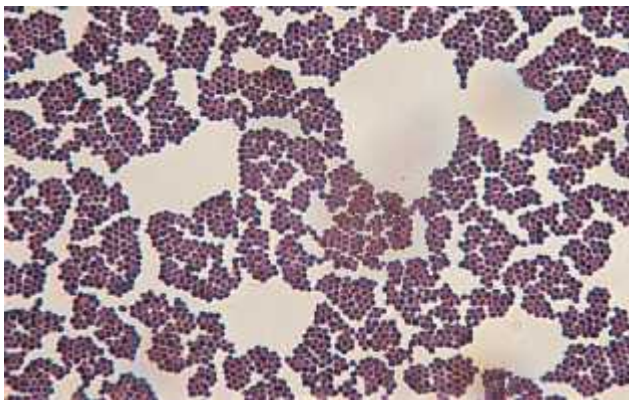


Figura 4.8 *Peptococcus*⁵²

Los abscesos intraabdominales imponen un alto riesgo al hospedero porque pueden extenderse hacia sitios cercanos y además constituyen reservorios a partir de los cuales los microorganismos pueden ingresar en el torrente circulatorio. La bacteriemia resultante puede producir un shock séptico o causar infecciones metastáticas en sitios alejados.³

Además de *B. fragilis* también se encuentran otras especies de este género en abscesos del tracto genital femenino, en general debido a contaminación con la biota vaginal. Aquí los microorganismos infecciosos ascienden a través del cuello

uterino, el útero y las trompas de Falopio hasta llegar a la vecindad de los ovarios. La infección resultante se conoce como enfermedad inflamatoria pélvica (EIP). La causa predisponente es la cicatrización de las trompas de Falopio debida a infecciones previas por *Chlamydia* o gonococos, lo que altera la acción normal de los cilios de las células epiteliales de las trompas. Los abscesos tubo ováricos, que de forma ocasional complican la EIP, a menudo conducen a la infertilidad. El agente causal más común de esta enfermedad no es *B. fragilis* sino *B. bivius*, un habitante común de la vagina humana.^{3,8,9}

SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

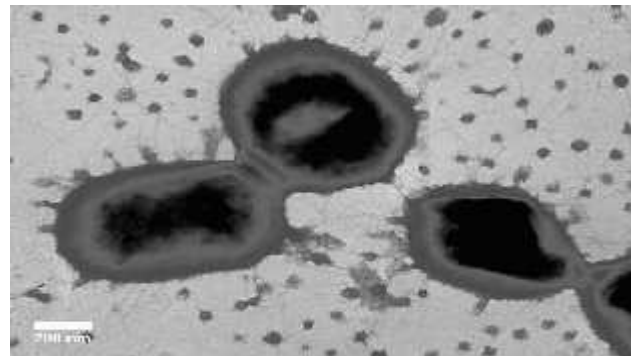
Son sensibles a clindamicina, metronidazol, imipenem, carbapenems y las penicilinas de espectro ampliado combinadas con inhibidores de betalactamasas. Sin embargo hay que tener presente que rara vez es una sola especie bacteriana la causa de estas infecciones. Por este motivo se emplea una combinación de antibióticos o un antibiótico efectivo tanto contra microorganismos aerobios, como anaerobios (clindamicina + gentamicina; ampi-sulbactam)^{3,8,9}

Prevotella y *Porphyromonas*

Todos los bacilos productores de un pigmento negro en las colonias en la sangre que previamente se clasificaban como subespecies de *Bacteroides melaninogenicus* se han reclasificado en estos dos nuevos géneros *Porphyromonas* y *Prevotella*. Este último también incluye algunas especies no pigmentadas.³

Forman parte de la biota normal de boca, tracto genital e intestinal, y son patógenos importantes en boca, cabeza, cuello e infecciones pleuropulmonares. *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella denticola*, *Prevotella loescheii*, *Prevotella intermedia* y *Prevotella corporis* son miembros de la flora normal de la boca, vías respiratorias superiores y partes blandas subyacentes. *Prevotella bivia* prevalece en la biota vaginal y produce vaginosis e infecciones de origen obstétrico. *Porphyromonas endodontalis* (Vease fig. 4.9) y *Porphyromonas gingivalis* forman parte de la flora normal de la boca y las encías, mientras que *Porphyromonas asaccharolytica* se halla en la biota intestinal.^{3,7,9}

Figura 4.9 *Porphyromonas endodontalis*⁵³



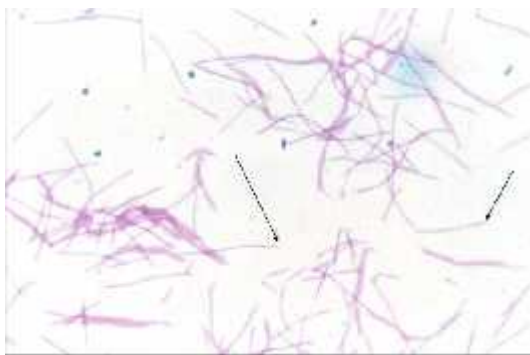
La morfología celular depende del origen de los microorganismos: a partir de medio sólido son cocobacilos pequeños, pero a partir de caldo son bacilos más largos y con marcado pleomorfismo. Las colonias en agar sangre por lo común son convexas, lisas, circulares, algunas veces beta hemolíticas y habitualmente pigmentadas, adquieren un color tostado a negro en 2 a 21 días. La

vitamina K y la hemina son necesarias para la proliferación de la mayor parte de las cepas, o la estimulan mucho.^{6,13}

Se ha visto que producen polisacárido capsular que es inmunogénico y específico de especie. El lipopolisacárido de estos microorganismos al igual que en *Bacteroides* es diferente de aquel de los microorganismos Gram negativos anaerobios facultativos, y su potencia biológica es variable. La producción de enzimas como la colagenasa y otras enzimas proteolíticas, así como el polisacárido capsular son los principales factores de virulencia en las cepas que los producen. Los aislamientos clínicos pueden producir beta lactamasa y algunas cepas son resistentes a las penicilinas y a ciertas cefalosporinas.^{6,13}

Estos microorganismos. son agentes causales importantes de infecciones orales, pulmonares, pelvianas, intraabdominales y de partes blandas.^{6,13}

Fusobacterium



Existen seis especies causantes de infecciones en humanos. El más frecuentemente aislado es *Fusobacterium nucleatum*, biota normal de la boca, tracto respiratorio superior, tracto genital y gastrointestinal. Es un agente causal de infecciones orales, abscesos de pulmón, otras infecciones pleuropulmonares e infecciones del líquido amniótico.³ (Vease fig. 4.10)

Figura 4.10 *Fusobacterium nucleatum*⁵⁴

Fusobacterium necrophorum es un anaerobio muy virulento que puede causar infección ampliamente diseminadas. Es el agente etiológico principal de la Angina de Vincent (asociado a *Borrelia*), infección necrótica de amígdalas y faringe, que presenta un exudado purulento membranoso, acompañada de mal olor. Además se halla en una variedad de infecciones subdiafragmáticas. Su hábitat normal es el tracto gastrointestinal.^{3,8}



Figura 4.11 *F. necrophorum*⁵⁵

Típicamente son bacilos largos con extremos acintados o filamentos delgados. Algunos como *F. necrophorum* son más abultados en su sector medio. Producen alfa y beta hemólisis en los cultivos en agar sangre, y las colonias son translúcidas, de formas varias y a veces irregulares.^{3,8} (Vease fig. 4.11)

La mayor parte de las fusobacterias son susceptibles a la penicilina G y las cefalosporinas más antiguas, además de los agentes anaerobios más activos (clindamicina, metronidazol).³

4.3. CARACTERISTICAS METABOLICAS DE BACILOS GRAM NEGATIVOS ANAEROBIOS

- *Bacteroides* grupo *fragilis*: diferenciación entre especies mediante pruebas bioquímicas manuales o mediante sistemas comerciales¹
- BGNA (Bacilos Gram negativos Anaerobios) grupo *Prevotella/Porphyromonas*: diferenciación entre géneros por la sensibilidad a la vancomicina (*Prevotella* spp.: resistente; *Porphyromonas* spp.: sensible) y entre especies mediante pruebas bioquímicas manuales o mediante sistemas comerciales
- *Fusobacterium* spp.: producción de ácido butírico como producto final del metabolismo
- BGNA grupo *Bacteroides ureolyticus/Campylobacter*: nitratos (+)
- *B. ureolyticus*: ureasa (+)
- *Campylobacter (Bacteroides) gracilis*: ureasa (-), inmóvil
- *Campylobacter (Wolinella) rectus*: ureasa (-), móvil
- BGNA grupo *Bilophila/Sutterella*:
- *Bilophila wadsworthia*: catalasa (+)
- *Sutterella wadsworthensis*: catalasa (-)

A hand is shown holding a metal needle, likely used for inoculating bacterial cultures. The needle is positioned over a petri dish containing a red agar medium. In the background, there are several other petri dishes, some with white agar and others with red agar. To the left, there is a foil-wrapped object, possibly a sterile instrument or a sample container. The entire scene is set against a dark background.

CAPITULO 5
TOMA DE MUESTRAS

CAPITULO 5

TOMA DE MUESTRAS

Como las especies encontradas en las diferentes infecciones son, con la excepción de algunos clostridios, las mismas que se hallan en la microbiota habitual, para que los estudios microbiológicos tengan valor es necesario que las muestras sean tomadas de forma que la biota normal no las contamine. Por ello que no se deben estudiar muestras nasales, orales, de vías respiratorias bajas recogidas por procedimientos que no impidan su contacto con bacterias de otras localizaciones, cutáneas, vaginales, urinarias tomadas por micción o sondaje o digestivas, salvo para procesos muy concretos, como botulismo, diarrea asociada a antimicrobianos y toxiinfección por *C. perfringes*^{1,3,5} (Vease cuadro 5.1)

En los abscesos cerrados, empiemas, infecciones de cavidades cerradas y líquidos habitualmente estériles las muestras se deben tomar, si es posible, por punción percutánea-aspiración, empleando las medidas de desinfección utilizadas para los hemocultivos, o en el transcurso de prácticas quirúrgicas. En estas y en otras situaciones se desaconseja el uso de torundas.^{1,3}



Las muestras de sangre se deben sembrar en frascos de hemocultivos (Vease fig. 5.1) para anaerobios siguiendo las directrices marcadas en el procedimiento correspondiente para este análisis microbiológico.

Fig. 5.1 Hemocultivos adultos:⁵⁶
Para: sangre y líquidos estériles.
Estudia: aerobios, anaerobios y hongos levaduriformes. Precisa 10

mL por frasco.¹

5.1. HEMOCULTIVO²

A. Obtención de la muestra

- 1) Retirar los tapones externos de los frascos.
- 2) Desinfectar los tapones de goma con alcohol etílico al 70%, dejándolo secar al menos un minuto (no utilizar antiséptico yodado)
- 3) Eliminar cualquier gota de desinfectante residual con una gasa estéril antes de la inoculación de la sangre.
- 4) Localizar por palpación la vena que se va a puncionar. Debe utilizarse una vena distinta para cada extracción. Cuando no haya venas accesibles puede realizarse la extracción de sangre arterial.

- 5) Desinfectar con alcohol etílico o isopropílico al 70% una zona de piel de unos 10 cm de diámetro. Se comenzará por el centro y se irán haciendo círculos concéntricos hacia el exterior. Dejar que se seque durante un mínimo de 30 segundos.
- 6) Repetir el paso anterior aplicando una solución yodada, dejándolo secar durante 30 segundos si se trata de tintura de yodo al 1-2% y durante 60 segundos si se utiliza povidona yodada al 10%
- 7) En pacientes alérgicos al yodo, repetir la operación utilizando alcohol al 70% y dejándolo secar durante 60 segundos.
- 8) Extraer la sangre sin tocar en ningún momento el campo desinfectado. Si fuera necesario palpar nuevamente la vena se utilizarán guantes de goma estériles o se desinfectarán los dedos de la misma manera que la piel del paciente. Si se requiere una segunda venopunción deberá cambiarse la aguja.
- 9) Introducir la sangre en los frascos, primero en el frasco de anaerobios evitando que entre aire en dicho frasco. Mover los frascos para que la sangre y el medio de cultivo se mezclen. Introducir los frascos a 37°C.^{1,3,12,14}

B. Volumen de la muestra

- Como norma general lo más adecuado es que la sangre mantenga una proporción 1:10 con el medio de cultivo.
- La cantidad de sangre a introducir en cada frasco viene determinada por el modelo utilizado en el hospital:
 - Adultos y niños mayores: obtener de 10-20ml por toma para inocular ambos frasco (frasco para cultivo de aerobios + frasco para cultivo de anaerobios).
 - En prematuros y niños pequeños: obtener de 0.2 a 5ml de sangre a repartir entre ambos frascos especiales para Pediatría^{2,13,14}

C. Número de muestras y momento de la extracción

En general se recomienda extraer tres hemocultivos por paciente, previos al tratamiento antimicrobiano. En caso de sepsis y endocarditis subaguda las extracciones se reparten en 24 horas y en caso de que los hemocultivos sean negativos, obtener tres muestras más al día siguiente.

El comienzo de obtención de hemocultivos debe demorarse el menor tiempo posible desde el inicio de la fiebre o de los escalofríos.

El intervalo entre las extracciones en general debe ser de unos 30 minutos, si bien recientemente la American Society for Microbiology ha recomendado la conveniencia de extracciones simultaneas en diferentes puntos anatómicos^{2,13,14}

Las muestras quirúrgicas y las biopsias también son idóneas para la investigación de bacterias anaerobias. (Vease fig. 5.2)



Fig. 5.2 Material para toma de muestras.⁵⁷

En las infecciones abiertas es necesario recurrir a muestras representativas, que deben ser de la parte profunda, tomadas quirúrgicamente por aspiración percutánea o tras la eliminación de los tejidos necróticos superficiales por aspiración. En su defecto, se puede tomar la muestra con un hisopo de la base de la lesión.



El uso del broncofibroscopio (Vease fig. 5.3) ha mejorado la toma en neumonías (catéter telescópico protegido o lavado broncoalveolar) y la punción transtraqueal ha caído en desuso. Otras muestras respiratorias válidas son la punción pulmonar directa y la toracocentesis.

Fig. 5.3 Broncofibroscopio⁵⁸

5.2. TRANSPORTE AL LABORATORIO

En el transporte de una muestra para la búsqueda de bacterias anaerobias



se debe evitar la presencia de oxígeno, aunque estas pueden sobrevivir varias horas, incluso días, en un medio de transporte adecuado, dependiendo de su naturaleza. En general, en las muestras purulentas pueden sobrevivir más tiempo que en los líquidos claros.¹Para el transporte en anaerobiosis se encuentran disponibles en el mercado tubos, frascos y viales con una atmósfera anaerobia que contienen un medio de transporte reducido y resazurina como indicador de la presencia de oxígeno. (Vease fig. 5.4)

Fig. 5.4 Envase estéril de boca ancha² Para: biopsias, tejidos, orinas, escamas, líquidos, esputos, secreciones bronquiales.⁵⁹

Las jeringas utilizadas en la aspiración de pus no deben utilizarse como transporte debido al riesgo de pinchazos y la posible expulsión accidental de su contenido; además, el oxígeno difunde a través de la estructura de plástico de sus paredes. Una vez realizada la aspiración se debe expulsar el posible contenido gaseoso, tapando la aguja con una gasa estéril impregnada en alcohol para eliminar el riesgo de aerosoles. A continuación, se cambia la aguja por otra estéril y se inocula el contenido, previa desinfección del tapón de goma, en la superficie del agar de un vial de transporte para anaerobios.^{1,5,6}



Las muestras de tejidos y biopsias quirúrgicas se remitirán en un frasco estéril que se puede introducir en una bolsa de anaerobiosis de plástico transparente y flexible. Además, existen frascos de transporte para muestras de tejido y biopsias que contienen una base de agar y un indicador de anaerobiosis. El tejido se introduce aproximadamente a 5 mm de la base e inmediatamente después se enrosca el tapón.¹ (Vease fig. 5.5)

Fig. 5.5 Port-A-Cul vial (medio de Cary Blair):^{2,7} Para: líquidos y exudados obtenidos por aspiración. Estudia: aerobios, anaerobios, hongos y micobacterias.⁶⁰



En los casos en que solamente sea posible obtener la muestra mediante torunda, Se utilizarán para su envío tubos adecuados, con un medio de transporte para anaerobios, donde se introduce la torunda hasta aproximadamente 5 mm del fondo, se rompe el palillo a la altura de la tapa del tubo y se cierra rápidamente.¹. (Vease fig. 5.6)

Fig. 5.6 Port-A-Cul tubo (medio de Cary Blair)^{2,7}

Para: raspados de heridas, escaras, abscesos, úlceras, pequeñas biopsias y tejidos. Estudia: aerobios, anaerobios y hongos.⁶¹

Existen tubos de plástico de escaso calibre con un estrechamiento en la parte inferior a la superficie del agar con el fin de dificultar la difusión del oxígeno hacia la base de la torunda. El envío de las muestras al laboratorio de microbiología debe ser inmediato. Se deben transportar manteniéndolas a temperatura ambiente. Las temperaturas de incubación pueden ocasionar el sobre crecimiento de especies poco exigentes, fundamentalmente facultativas, y la pérdida de algunas más sensibles, mientras que las temperaturas bajas permiten un aumento de la difusión del oxígeno.¹. (Vease fig. 5.7)



Fig. 5.7 **Contenedor especial Para-Pak²**. Para: heces. Aerobios y hongos. Nota: Para el estudio de *Clostridium difficile* y *Cryptosporidium*, RECIPIENTE ESTÉRIL DE BOCA ANCHA. ⁶²

Cuadro 5.1. Infecciones por anaerobios y tomas adecuadas¹

Infecciones	Muestras
SNC (abscesos y empiemas)	Aspiración Biopsias
Cabeza y cuello	Aspirados Biopsias
Oculares - Endoftalmitis	Aspiración intraocular
ORL -Sinusitis - Otitis media crónica	Aspiración percutánea o por rinoscopia y material quirúrgico de los senos. Torunda
Tracto respiratorio inferior -Neumonías - Empiema pleural	Catéter telescopado protegido Lavado broncoalveolar Punción pulmonar percutanea Toracocentesis
-Aparato circulatorio -Bacteriemia -Endocarditis -Pericarditis	Hemocultivo Válvula, verruga Líquido pericárdico
Intraabdominales	Aspiración y cirugía

-Peritonitis y abscesos -Colecistitis -Heridas laparotómicas	Bilis tomada quirúrgicamente Tomas en profundidad
Tubo digestivo -Diarrea asociada a antimicrobianos -Intoxicación por <i>C. perfringens</i>	Heces Heces para toxina y recuento
Genitales femeninas	Cirugía Culdocentesis Aspiración (absceso Bartholino) Aspiración endometrial protegida DIUs (actinomicosis)
Urinarias	Punción suprapúbica
Osteoarticulares -Artritis -Osteomielitis	Aspiración Aspiración, cirugía, biopsia.
Tejidos blandos	Aspiración percutánea Cirugía Tomas en profundidad
Relacionadas con alimentos -Intoxicación por <i>C. perfringens</i> - Botulismo	Alimento sospechoso (recuento) Alimento sospechoso (toxina, bacteria)
Botulismo	Alimento sospechoso (toxinas, cultivo) Suero (detección de las toxinas, no suele ser positiva en el lactante) Contenido gástrico y vómitos (toxinas) Heces (toxinas y cultivo) Material de heridas (cultivo) Muestras ambientales (bioterrorismo) Torundas nasales (bioterrorismo)
Tétanos	Material de la presunta puerta de entrada

5.3. RECEPCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

RECEPCIÓN.

Una vez recibida la muestra en el laboratorio se anota la fecha y hora de recepción y se comprueba que cumple los requisitos para su aceptación (correcta identificación, muestra adecuada, condiciones de transporte, etc^{1,3,6}

PROCESAMIENTO.

El procesamiento inicial incluye su preparación, examen directo e inoculación en los medios de cultivo apropiados^{1,5,6}

PREPARACIÓN.

Tras el exámen inicial, la muestra se procesa con las máximas precauciones y lo antes posible, siendo aconsejable que no transcurran más de 15 minutos desde su recepción. Si es posible, la preparación se deberá hacer en una cámara de anaerobiosis para minimizar su oxigenación. El material purulento se mezcla bien con la ayuda del agitador Vortex. Las muestras de tejido o de biopsia se homogenizan, ya sea con un bisturí, cortando trozos muy finos hasta obtener una consistencia homogénea, o en un mortero estéril añadiendo 1 mililitro de caldo. En el caso de que la muestra se haya obtenido con torunda, se exprime en un pequeño volumen de caldo mediante movimientos rotatorios sobre las paredes del tubo y este caldo se procesa como una muestra líquida. Cuando se investiga la presencia de *Clostridium* se puede realizar un enriquecimiento, que consiste en eliminar todas las formas vegetativas y conservar las esporas tratando la muestra con calor o alcohol.^{1,3,6}

INOCULACIÓN DE LA MUESTRA.

Una vez homogeneizada con la ayuda de una pipeta Pasteur se deposita una gota, si la muestra es purulenta, o 2-3 gotas, si no lo es, en cada uno de los medios de cultivo utilizados, una gota en un portaobjetos para la tinción de Gram y el resto en un medio líquido de enriquecimiento^{1,5,6}

EXÁMEN DIRECTO.

Proporciona de forma inmediata información semicuantitativa acerca de los microorganismos presentes y un diagnóstico presuntivo de la existencia de bacterias anaerobias, lo cual es importante para establecer una terapia inicial, ya que el proceso de aislamiento e identificación puede demorarse varios días.^{1,5,6}

EXÁMEN MACROSCÓPICO.

Consiste en la observación de los siguientes datos: mal olor (productos finales del metabolismo de bacterias anaerobias), fluorescencia roja a la luz

ultravioleta (producción de protoporfirina por las especies pigmentadas de *Prevotella* y *Porphyromonas* Fig. 5.8), exudados sanguinolentos, exudados de color negruzco (presencia de bacilos gramnegativos pigmentados), existencia de tejidos necróticos, gas en los tejidos, existencia de gránulos de "azufre" en el exudado (presencia de *Actinomyces* spp. y *Propionibacterium propionicus*), exudados purulentos, etc.^{1,3,7,12}



Fig. 5.8 *Porphyromonas*⁶³

EXÁMEN MICROSCÓPICO.

La tinción de Gram es de una gran utilidad en el diagnóstico microbiológico presuntivo, ya que proporciona información acerca de los tipos de bacterias existentes, cantidad relativa de las mismas, presencia de leucocitos, etc. Por otra parte, es un elemento importante para el control de calidad del laboratorio. Si no se consigue aislar todos los morfo tipos observados esto puede ser debido, probablemente, a algún fallo en los distintos pasos del diagnóstico de los anaerobios (recolección de la muestra, transporte o procesamiento), o bien se trata, aunque es menos común, de una inhibición del microorganismo por un antibiótico residual.^{1,5,6,7}

La morfología y afinidad tintorial de los bacilos anaerobios Gram negativos varía según las diferentes especies.^{1,5,7}

Las de *Bacteroides*, por lo general, aparecen como bacilos pleomórficos que se tiñen débilmente con la tinción de Gram¹. (Vease fig. 5.9)

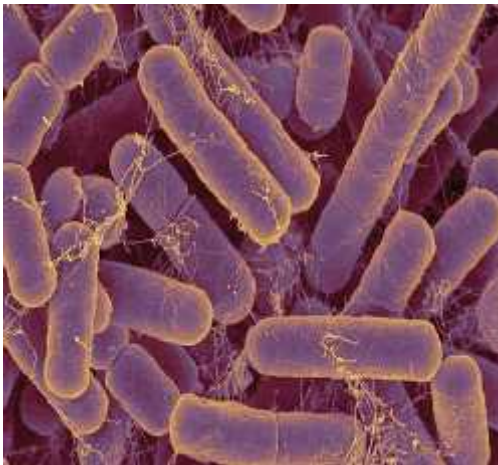


Fig. 5.9 *Bacteroides*⁶⁴

Las formas cocobacilares son sugestivas de especies pigmentadas de *Prevotella* o *Porphyromonas* (Vease fig. 5.8, 5.10), *Fusobacterium nucleatum* suele presentarse como un bacilo Gram negativo fino y fusiforme y a menudo dispuesto en parejas, unidos por un extremo. Hay que señalar que también *Fusobacterium periodonticum*, y las especies microaerófilas de *Capnocytophaga* muestran estas características. *Fusobacterium mortiferum* se presenta como un bacilo muy pleomórfico, con filamentos que contienen zonas hinchadas, o formas redondas y de tinción irregular. Este tipo de morfología se puede observar asimismo en *Fusobacterium ulcerans* y, ocasionalmente, en *Fusobacterium necrophorum*. La presencia de pequeños cocos Gram negativos son indicativos de *Veillonella*.^{1,5,7,9}



Fig. 5.10 *Porphyromonas*⁶⁵

Los bacilos Gram positivos anaerobios adoptan múltiples formas y pueden aparecer Gram positivos o "Gram variables". Las esporas de *Clostridium* se ven raramente en las tinciones de los exudados. Un bacilo Gram positivo grueso, de forma rectangular y sin esporas es sugestivo de *Clostridium perfringens*. Un bacilo Gram positivo ramificado es sugestivo de *Actinomyces* o *Propionibacterium*. Para establecer un diagnóstico presuntivo de una infección por anaerobios es importante que el microbiólogo correlacione el origen de la muestra con los morfotipos observados en la tinción de Gram. Además, la presencia de tipos morfológicos múltiples en la tinción de Gram sugiere específicamente este diagnóstico puesto que la mayoría de las infecciones en las que están implicados los anaerobios son polimicrobianas.^{1, 5,7,12}

En el cuadro 5.2 se resumen los diferentes sistemas utilizables para el transporte de muestras para la búsqueda de anaerobios, así como los tiempos óptimos para su recepción en el laboratorio. Después de su procesamiento se recomienda conservar las muestras a temperatura ambiente hasta 24 horas, en caso de que hubiera algún problema y fuera necesario recuperarlas para un nuevo procesamiento^{1,6}.

Cuadro 5.2 SISTEMAS DE TRANSPORTE DE MUESTRAS PARA ANAEROBIOS

Muestra	Sistema de transporte	Tiempo óptimo de transporte al Laboratorio
Material obtenido por aspiración	Viales con atmósfera anaerobia	2 – 3 h (hasta 8-24 h)
Tejido o biopsia	Contenedores estériles	30 min..
	Frascos con atmósfera anaerobia	2-3 h
	Contenedores en bolsas de anaerobiosis	2 – 3 h
Torundas	Tubos con atmósfera anaerobia	2 – 3 h

5.4. MEDIOS DE CULTIVO.

Para conseguir una recuperación óptima de bacterias anaerobias es fundamental elegir correctamente los medios de cultivo primarios. La mayoría de estas bacterias requieren para su crecimiento vitamina K₁ y hemina. Para su aislamiento e identificación presuntiva se aconseja utilizar una combinación de medios enriquecidos no selectivos, selectivos y diferenciales, entre los que se incluyen:

Un medio de agar sangre para anaerobios como agar *Brucella* o agar Schaedler con un 5% de sangre de carnero, a los que se añaden vitamina K₁ (1 µg/ml) y hemina (5 µg/ml). En estos medios crecen tanto las bacterias anaerobias facultativas como las anaerobias obligadas^{1,5,6}. (Vease fig. 5.11)



Fig. 5.11 Agar para anaerobios. *Bacteroides*⁶⁶

Agar *Bacteroides bilis* esculina con amikacina (BBE). Es un medio selectivo para *Bacteroides* del grupo *fragilis* y *Bilophila* spp. Contiene amikacina (100 µg/ml) que inhibe la mayoría de facultativos, bilis (20%) que con casi exclusividad sólo permite el crecimiento de las especies citadas y esculina que al ser hidrolizada en presencia de un indicador (citrato férrico) vira el medio a color negro. Permite una fácil detección de las especies de *Bacteroides* del grupo *fragilis* al ser esculina positivas.^{1,3,10}

A veces, pueden crecer otras especies, como *Fusobacterium mortiferum*, *Fusobacterium varium*, algunas enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, enterococos, levaduras, etc., aunque se distinguen de los *Bacteroides* del grupo *fragilis* por el tamaño de sus colonias, que normalmente es inferior a 1 mm de diámetro.^{1,6}

Agar con alcohol fenil-etílico (PEA) con un 5% de sangre de carnero. El alcohol inhibe el crecimiento de bacilos Gram negativos facultativos, principalmente el crecimiento en velo de las especies de *Proteus*. También evita el crecimiento en velo de algunas especies de *Clostridium* como *Clostridium septicum*, facilitando de este modo su aislamiento. Se aconseja sembrar en este medio las muestras purulentas o cuando sea previsible una infección mixta.¹

Un agar sangre selectivo, como agar Schaedler con neomicina (75 µg/ml) y vancomicina (7,5 µg/ml) (SNV) o con kanamicina (75 µg/ml) y vancomicina (7,5 µg/ml) (SKV) o el clásico agar *Brucella* con kanamicina, vancomicina y en este caso sangre lacada (ASLKV). Son medios selectivos para bacilos gramnegativos como el grupo de *Bacteroides fragilis* y especies de *Prevotella*. La presencia de neomicina o de kanamicina inhibe a la mayor parte de los aerobios facultativos y la

presencia de vancomicina inhibe la mayoría de los Gram positivos y especies de *Porphyromonas*.^{1, 6,12}

A veces pueden crecer en estos medios levaduras y anaerobios facultativos resistentes a estos aminoglicósidos por lo que siempre debe realizarse una tinción de Gram y un ensayo de aerotolerancia a todos los aislados.^{1,12}

Agar con yema de huevo (AYE). Cuando se sospecha la presencia de clostridios, para detectar la producción de lipasa y/o lecitinasa.^{1,7}

Un agar selectivo para *Clostridium difficile*, cuando se investigue la presencia de esta especie, como agar fructosa-cicloserina-cefoxitina (CCFA) o agar yema de huevo-cicloserina-cefoxitina (CCEY).^{1,5}

Como medio líquido de enriquecimiento o de mantenimiento se recomienda usar caldo de tioglicolato sin indicador, suplementado con vitamina K₁ (200 µl) y hemina (20 µl). Este medio se utiliza para recuperar las bacterias anaerobias en caso de que falle la anaerobiosis en la incubación de los cultivos primarios, haya una inhibición del crecimiento debido a antibióticos o a otros factores, o bien cuando las bacterias se encuentran en cantidades muy pequeñas.^{1,5,7,15,16} (Véase cuadro 5.3)

Cuadro 5.3 MEDIOS COMUNES PARA ANAEROBIOSIS²

MEDIO	COMPONENTES Y COMENTARIOS	OBJETIVO PRINCIPAL
Agar sangre para anaerobios	Puede prepararse sobre una base de Columbia, Schaedler, CDC. <i>Brucella</i> o infusión cerebro-corazón suplementada con sangre de carnero al 5%, extracto de levadura al 0.5%, hemina, L-cistina y vitamina K ₁	Medio no selectivo para el aislamiento de anaerobios y anaerobios facultativos.
Agar con bilis y esculina para <i>Bacteroides</i> (BBE)	Base de agar con tripticasa y soja más el agregado de citrato de amonio y hemina; las sales biliares y la gentamicina actúan como inhibidores.	Selectivo y diferencial para el grupo de <i>Bacteroides fragilis</i> ; útil para la identificación presuntiva.
Agar sangre hemolizada con	Base de agar para <i>Brucella</i>	Selectivo para el aislamiento

kanamicina y vancomicina (LKV)	con kanamicina (75 µg/mL), vitamina K ₁ (10 µg/mL) y sangre hemolizada al 5%	de <i>Prevotella</i> y especies de <i>Bacteroides</i> .
Agar con alcohol feniletílico para anaerobios (Anaerobic phenylethy alcohol agar – PEA-)	Base de agar nutritivo, sangre al 5%, alcohol feniletílico	Selectivo para la inhibición de los bacilos gramnegativos entéricos y el crecimiento confluyente de algunos clostridios
Agar con yema de huevo (Egg-yolk agar; EYA)	Base de yema de huevo	No selectivo para determinar la producción de lecitinasa y lipasa por los clostridios y las fusobacterias.
Agar con cicloserina, cefoxitina y fructosa (CCFA)	Base de yema de huevo con fructosa, cicloserina (500 mg/L) y cefoxitina (16 mg/L); indicador rojo neutro	Selectivo para <i>Clostridium difficile</i>
Caldo con carne cocida (también denominado carne picada)	Las partículas de carne sólida inician el crecimiento bacteriano; las sustancias reductoras disminuyen el potencial de oxidorreducción (Eh)	No selectivo para el cultivo de microorganismos anaerobios; con el agregado de glucosa puede utilizarse para la cromatografía en fase líquida y gaseosa.
Caldo con peptona, extracto de levadura y glucosa (peptoneyeast extract-glucose –PYG-)	Base de peptona, extracto de levadura, glucosa, cisteína (agente reductor), resarzurina (indicador de la tensión de oxígeno), sales.	No selectivo para el cultivo de bacterias anaerobias por cromatografía en fase líquida y gaseosa.
Tioglicolato	Digerido pancreático de caseína, caldo de soja y glucosa que enriquece el crecimiento de la mayoría de las bacterias. El tioglicolato y el agar reducen el Eh. Puede suplementarse con hemina y vitamina K ₁	No selectivo para el cultivo de anaerobios así como de anaerobios facultativos y aerobios.

5.5. SISTEMAS DE INCUBACIÓN EN ANAEROBIOSIS.

Su elección viene determinada por el costo, número de cultivos y limitaciones de espacio. Los más comunes son las cámaras, jarras o cajas y bolsas de anaerobiosis.^{1,5} (Vease fig. 5.12)

Con independencia del sistema utilizado es importante monitorizar el ambiente anaerobio con una tira indicadora de azul de metileno o de resarzurina, y la temperatura de incubación.^{1,5}



Fig. 5.12 Jarra de anaerobiosis⁶⁷

Existen diferentes modelos de cámaras para anaerobios (fig. 3.12), en las que se consigue una atmósfera anaerobia mediante una mezcla de gases que contiene 5% de H₂, 5-10% de CO₂ y 85-90% de N₂. Poseen un sistema de intercambio que consiste en un compartimento rígido con una puerta interior y otra exterior. Las jarras son

recipientes cilíndricos, de metal o de plástico rígido, que deben cerrarse herméticamente y en los que la atmósfera anaerobia se obtiene entre 1 y 2 horas después de introducir unos sobres (GasPak[®], Becton Dickinson) en los que, al añadir H₂O se libera H₂ y CO₂. El H₂ se combina con el oxígeno existente formando agua gracias a la presencia de un catalizador. Actualmente existen sistemas en los que no hace falta añadir H₂O o introducir el catalizador (Anaerogen[®], Oxoid). Mediante una técnica automatizada, Anoxomat[®], también se puede lograr una atmósfera anaerobia en las jarras. Como ya se ha señalado debe introducirse un indicador de oxígeno, que suelen ser tiras de papel con azul de metileno, que se decoloran al desaparecer la presencia del oxígeno.^{1,7,12}



También se encuentran disponibles en el mercado diferentes sistemas de bolsas de anaerobiosis de plástico transparente y flexible como GasPack Pouch[®] (Becton Dickinson) o Anaerogen Compact[®](Oxoid) (Vease fig. 5.13) con generadores e indicadores adecuados. Se pueden utilizar tanto para el transporte de muestras al laboratorio como para la incubación de cultivos.^{1,12}

Fig. 5.13 Bolsa de plástico transparente⁶⁸

El Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia y Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales. Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica propone un estudio donde evalúan el método para preparar tubos con medio de cultivo libres de oxígeno al alcance de cualquier laboratorio.

Para lograr la atmosfera anaerobia se logra por esterilización por calor húmedo, este estudio evalúa efectividad del medio caldo infusión cerebro y corazón (BHI) donde crecieron 45 especies de *Clostridium* y 12 especies de los géneros *Bifidobacterium*, *bacteroides*, *Lactobacillus*, *Propionibacterirum* y *Actinomyces*.

Los tubos inoculados fueron incubados a 35° C y se hicieron lecturas evaluando turbiedad (por cruces de crecimiento) a las 24 y a las 48 horas⁴. Los resultados fueron que algunos tubos presentaron turbidez pero no por el nuevo método del estudio si no por el medio que contiene carne, por lo tanto es eficaz utilizarlo en un laboratorio pequeño.

5.6. TIEMPO DE INCUBACIÓN.

Inmediatamente después de su siembra las placas de cultivo se incuban a 35-37°C en el sistema de anaerobiosis disponible. Si se utiliza una cámara se pueden examinar a las 24 h, puesto que no es necesario sacarlas, mientras que si se emplean jarras o bolsas hay que esperar 48 h, a no ser que se busquen microorganismos de crecimiento rápido y se empleen medios selectivos como el BBE para el grupo de *Bacteroides fragilis* o el EYA para *Clostridios*, en cuyo caso se pueden examinar a las 24 h.^{1,3,6}

Si en las placas no se observa ningún crecimiento se deben reincubar hasta completar 7 días, al menos las de agar sangre no selectivo, ya que algunos anaerobios requieren este tiempo para formar colonias visibles (*Actinomyces*, *Porphyromonas*, *Propionibacterium*, *Bilophila*). Se aconseja mantener la incubación del medio líquido de enriquecimiento entre 7 y 10 días y se deben realizar subcultivos, si se aprecia turbidez u otro signo de crecimiento, en agar sangre y agar chocolate que se incubarán en una atmósfera con 10% de CO₂, y en agar sangre para anaerobios incubado en anaerobiosis. Este mismo proceder se realiza al final del periodo de incubación si no se ha detectado crecimiento para considerarlo definitivamente estéril.^{1,5,7}

En el diagnóstico de la actinomicosis el tiempo de incubación debe ser mayor, generalmente entre 2 y 4 semanas.^{1,5,7}

5.7. OTROS PROCEDIMIENTOS

PROCESAMIENTO DE LOS LÍQUIDOS ORGÁNICOS.

Los líquidos corporales habitualmente estériles, como ascítico, de diálisis peritoneal, articular, pericárdico, amniótico, pleural, sinovial, intraocular, etc. se inoculan en frascos de hemocultivo para aerobios y anaerobios, reservando un pequeño volumen para hacer una tinción de Gram. A diferencia de otros líquidos, el amniótico y los líquidos obtenidos por culdocentesis no necesitan centrifugarse antes de realizar esta tinción. La lectura se realiza diariamente durante 7 días. En el caso de que haya crecimiento, se extrae una muestra del frasco aerobio mediante jeringa y aguja para realizar subcultivos en medios sólidos para aerobios y facultativos (agar sangre, agar chocolate, agar sangre con colistina y ácido nalidíxico y agar MacConkey, por ejemplo). Del frasco anaerobio se hacen subcultivos en agar sangre, agar chocolate y agar sangre para anaerobios^{1,3,12}.

Las bacterias anaerobias raramente causan meningitis, por lo que el cultivo de rutina del líquido cefalorraquídeo no es necesario. Los anaerobios pueden estar

implicados en la formación de abscesos cerebrales, empiema subdural y absceso epidural y en estos casos no es útil el examen del líquido cefalorraquídeo.^{1,6}

Las muestras de sangre se procesan tal como se indica en el Procedimiento de la SEIMC (Hemocultivos).^{1,3,12,15}

PROCESAMIENTO DEL CATÉTER TELESCOPADO (CT).

Se corta el cepillo y se coloca en un tubo que contenga 1 mL de solución estéril de Ringer lactato. Se agita en el Vortex durante 30 segundos y se preparan dos diluciones seriadas al 1/100 a partir de la inicial en Ringer lactato; se siembran partes alícuotas de 0,1 mL de cada una de las diluciones en medios para aerobios y facultativos (agar sangre, agar chocolate y agar MacConkey) que se incuban en 10% de CO₂ durante 24-48 horas y para anaerobios (agar sangre y agar sangre selectivo) que se incuban en anaerobiosis hasta 5 días.^{1,11,12} (Vease fig. 5.14)



Fig. 5.14 Preparación del catéter.⁶⁹

Procesamiento del lavado broncoalveolar (LBA). Se preparan dos diluciones seriadas al 1/100 de la muestra inicial y se siembran en los mismos medios que el catéter telescópado.^{1,6} (Vease fig. 5.15)

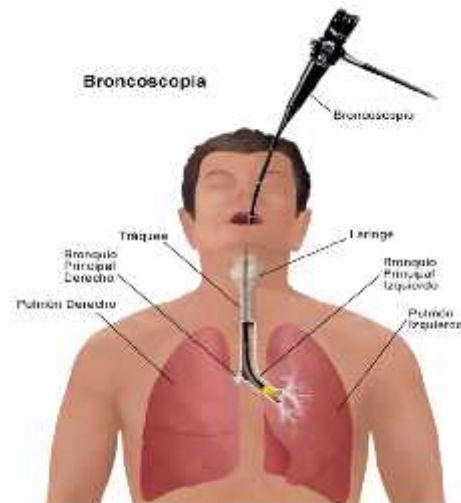


Fig. 5.15 Lavado broncoalveolar⁷⁰

5.8. EXÁMEN DE LOS CULTIVOS Y AISLAMIENTO

En el análisis microbiológico de una muestra clínica se pueden distinguir, al menos teóricamente, dos etapas. La primera está dedicada a "buscar" los anaerobios que pueda contener, obtenerlos en cultivo puro, identificarlos de forma preliminar (a nivel de género o "grupo"), e informar al clínico lo antes posible. En una segunda etapa se debe intentar conseguir una identificación más precisa y

estudiar la sensibilidad a los antibióticos que habitualmente tienen actividad sobre estas bacterias. Sería deseable que la primera etapa se realizara en todos los laboratorios de microbiología, mientras que la segunda puede quedar restringida a unos pocos, cuya experiencia debe servir de base para el conocimiento general de las bacterias anaerobias que se pueden encontrar en muestras clínicas correctamente obtenidas y su sensibilidad/ resistencia a los antibióticos habitualmente utilizados para su tratamiento.^{1,3,7,12} (Vease fig. 5.16)



Fig. 5.16 *Prevotella* sp. con antibiograma⁷¹

Los medios con crecimiento deben observarse cuidadosamente para detectar todas las colonias diferentes, independientemente de su tamaño, y proceder a su subcultivo. Algunos anaerobios pueden formar colonias morfológicamente semejantes a las de los facultativos. Los subcultivos se realizan siempre a partir de una única colonia. Esta se inocula en una placa de agar sangre no selectivo para anaerobios, y en una de agar chocolate que se incuban en una atmósfera anaerobia y aerobia con 10% de CO₂, respectivamente. Deben realizarse los reaislamientos necesarios para poder subcultivar colonias únicas de todos los tipos morfológicos. Las colonias subcultivadas que no crezcan en agar chocolate incubado en CO₂ se consideraran en principio anaerobios estrictos y se procede a su estudio. Hay que tener en cuenta que algunos bacilos Gram positivos (*Actinomyces* spp., *Propionibacterium* spp., *Bifidobacterium* spp., e incluso algunas especies de *Clostridium*) pueden ser lo bastante aerotolerantes como para crecer en CO₂ y sin embargo se deben considerar como anaerobias. Por el contrario algunos estreptococos pueden aparecer como anaerobios estrictos en el primer subcultivo y mostrarse como perfectamente facultativos tras un periodo más o menos largo de adaptación. Confirmado el carácter de anaerobio estricto de la bacteria aislada se comunica el hallazgo lo antes posible al clínico, aunque sólo sea información muy general e inespecífica.^{1,3,7,12} (Vease fig. 5.17)



Fig. 5.17 sembrado por aislamiento⁷²

5.9. IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR

El primer paso, el más básico pero imprescindible, es la observación detallada de las características de la colonia y de la tinción de Gram. Dado que entre los anaerobios hay especies que retienen de forma variable el colorante principal (cristal violeta), en ocasiones puede ser de gran ayuda un subcultivo con un disco de vancomicina de 5 µg para determinar el carácter de Gram positividad o Gram negatividad. Con los datos obtenidos de estas observaciones ya se puede informar sobre: cocos Gram positivos anaerobios, *Clostridium* spp. (visión adicional de esporas o morfología típica de *C. perfringens*) o bacilos Gram positivos anaerobios, (en este último caso si la morfología es de *Propionibacterium* se puede notificar como tal si se detecta la producción de catalasa). Los cocos Gram negativos anaerobios se informan como tales o como *Veillonella* spp., puesto que este es el género más frecuentemente hallado en muestras clínicas.^{1,3,7,13}

En el caso de los bacilos Gram negativos anaerobios es aconsejable informar de ellos una vez encuadrados en ciertos "grupos": grupo *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides* (*Prevotella*, *Prevotella/Porphyromonas*, *Bacteroides: ureolyticus/Campylobacter*, *Fusobacterium*, o *Bilophila/Sutterella*).^{1,5}

Este encuadre preliminar se puede lograr con algunas pruebas adicionales como: capacidad para crecer en presencia de un 20% de bilis (resistencia a la bilis u *oxgall*), y su sensibilidad (S) o resistencia (R) (halos de inhibición) por el método de difusión con discos a vancomicina (con carga de 5 µg), kanamicina (de 1000 µg), y colistina (de 10 µg). La interpretación de estas observaciones es la siguiente:

1. Crecimiento en bilis (+), vancomicina R, kanamicina R, colistina R = grupo *Bacteroides fragilis*.
6. Crecimiento en bilis (+), vancomicina R, kanamicina S, colistina S = grupo *Bilophila/Sutterella*.
7. Crecimiento en bilis (-), vancomicina variable (V), kanamicina R, colistina V = grupo *Prevotella/Porphyromonas*.
8. Crecimiento en bilis (-/+), vancomicina R, kanamicina S, colistina S = *Fusobacterium* spp. (dos especies bilis+).
9. Crecimiento en bilis (-), vancomicina R, kanamicina S, colistina S = grupo *Bacteroides ureolyticus/Campylobacter* (la diferenciación presuntiva entre este grupo y *Fusobacterium* tendría que basarse en las características morfológicas de la cepa). También estaría en este grupo el género *Leptotrichia*.¹

Aunque la sensibilidad a la vancomicina puede diferenciar los géneros *Prevotella* (vancomicina R) y *Porphyromonas* (vancomicina S), se sugiere la agrupación imprecisa de "grupo *Prevotella/Porphyromonas*" para los bacilos Gram

negativos anaerobios que dan colonias negras, dada la dificultad que puede existir para conseguirlos en cultivo puro a pesar de su fácil detección por la pigmentación de sus colonias.¹ (Vease fig. 5.18)



Fig. 5.18 Crecimiento bacteriano⁷³

5.10. IDENTIFICACIÓN FINAL

Hasta donde debería llegar la identificación de los aislamientos anaerobios en un laboratorio de microbiología clínica. Probablemente es deseable una identificación lo más precisa posible. La identificación a nivel de género y especie de todos los aislamientos clínicos ayudaría a conocer con precisión su implicación en diferentes enfermedades infecciosas, su sensibilidad a los antibióticos y los posibles mecanismos de resistencia existentes. Sin embargo conseguir identificar la especie (e incluso en ocasiones el género) de todos los aislamientos es una tarea prácticamente imposible y seguramente ni siquiera necesaria. No obstante sería conveniente que al menos en algunos laboratorios con mayor capacidad se intentara su identificación con la mayor precisión posible.^{1,7,13,14}

La dificultad en la identificación de la totalidad de las bacterias anaerobias aisladas tiene un doble origen. En primer lugar taxonómico, ya que las clasificaciones utilizadas cambian constantemente debido a la introducción de estudios geonómicos. Los análisis del RNA 16S han demostrado que muchos de los géneros definidos por caracteres fenotípicos eran muy heterogéneos y contenían géneros diversos, y que muchas especies, definidas igualmente sobre bases fenotípicas, estaban mal encuadradas en el esquema taxonómico. En segundo lugar la gran dificultad de los laboratorios de microbiología clínica estriba en el alto costo y tiempo requeridos para asignar sus aislamientos, por medio de caracteres fenotípicos, a géneros y especies definidos sobre bases genéticas, ya que es imposible recurrir de forma ordinaria a estudios del RNA 16S y a técnicas de amplificación geonómica con cebadores específicos.^{1,5}

Cada laboratorio debe intentar estudiar tantos caracteres fenotípicos como le sea posible y que le permitan llegar a una identificación adecuada. Los caracteres fenotípicos habitualmente estudiados, aparte de los morfológicos y de

sensibilidad citados, son los derivados de la actividad metabólica: producción de indol, descomposición del H_2O_2 (catalasa), capacidad sacarolítica y/o proteolítica, (Vease fig. 5.19) detección de determinados enzimas y caracterización de productos finales de su metabolismo.^{1,3,6,7,12}



Fig. 5.19 Prueba de Catalasa⁷⁴

- El estudio de la capacidad de producir indol y de descomponer el H_2O_2 están al alcance de cualquier laboratorio de microbiología, por lo que deberían incluirse en todo esquema de identificación.
- El estudio de la capacidad sacarolítica y/o proteolítica ha constituido la base de la identificación bacteriana desde los tiempos más remotos y aún hoy es el que se ofrece en todas las descripciones y/o redefiniciones de géneros y especies.^{1,5}

La puesta en práctica de este estudio analizando un gran número de substratos con métodos clásicos es larga, y costosa. Una buena alternativa es la utilización de sistemas comerciales, en los que se ofrecen, en pequeñas cúpulas o pocillos de plástico, un gran número de substratos liofilizados que se rehidratan con el propio inóculo. En estos sistemas (por ejemplo, el api 20 A[®]) la bacteria tiene que crecer y ejercer su actividad metabólica, por lo que tienen que incubarse en anaerobiosis durante 24 a 48 horas.^{1,2,4} (Vease fig. 5.20)

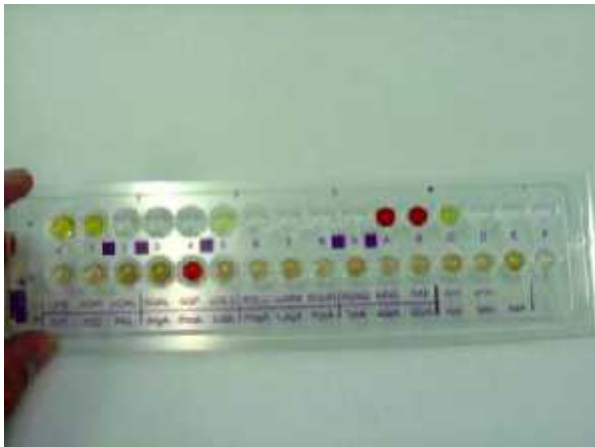


Fig. 5.20 Sistema Api Zim^{®75}

La detección de la dotación enzimática de una bacteria puede, igualmente, hacerse por métodos clásicos o utilizando sistemas comerciales (api ZIM[®], ID 32A[®]...) similares a los anteriormente descritos, pero con los substratos adecuados. Estos micrométodos detectan solamente enzimas preformados, por ello no es necesario que crezca la bacteria, se rehidratan con un inóculo bacteriano muy denso y se incuban en aerobiosis durante 4 horas. También se dispone de preparados individuales de algunos substratos. La detección de la lecitinasa y la lipasa se hace fácilmente observando el crecimiento de las bacterias en medios sólidos que contengan yema de huevo.^{1,2,4}

La detección de los productos finales del metabolismo bacteriano mediante cromatografía gas-líquido (Vease fig. 5.21) sólo es asequible para los laboratorios

que dispongan del cromatógrafo adecuado. En estos casos es una técnica de fácil realización y escaso costo, aunque exige cultivar y obtener un buen crecimiento en un medio líquido, preferentemente rico en glucosa. Este estudio, incluso después de los cambios taxonómicos mencionados, asociado a las características microscópicas (morfología cocoide o bacilar, Gram positividad o Gram negatividad) continúa definiendo, en algunos casos, el género (*Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Veillonella*, *Acidaminococcus*, *Megasphaera*, *Propionibacterium*), en otros casos presta una gran ayuda para establecer diferencias entre determinados géneros (*Actinomyces* y *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Eubacterium*...) y en otros muchos permite "separar" géneros recientemente definidos (cocos Gram positivos) y especies dentro de géneros muy amplios y heterogéneos (*Clostridium*). Su utilización facilita la identificación con los resultados de las otras pruebas bioquímicas.^{1,3,12}

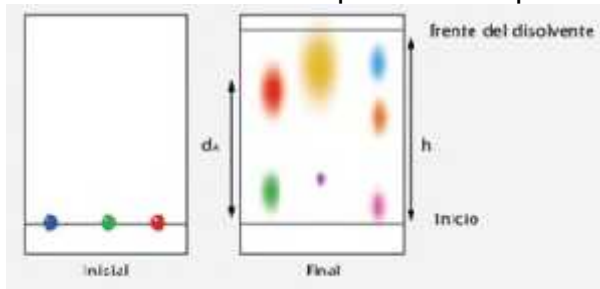


Fig. 5.21 Cromatografía de bacterias⁷⁶

Teniendo en cuenta todas estas técnicas que pueden estar al alcance de muchos laboratorios de microbiología clínica, una buena práctica podría ser:

1. Realizar en todo aislamiento anaerobio estricto la identificación preliminar tal y como se ha descrito.
2. Añadir en todos los casos el estudio de la capacidad de descomponer el H₂O₂ o de producir indol (aunque esto último suele estar incluido en las galerías de micrométodos, puede ser más rápido y más fiable comprobarlo individualmente mediante el paradimetilaminocinamaldeído o en cualquier caldo rico en triptófano).
3. Estudiar la actividad metabólica con alguna de las galerías de micrométodos disponibles, bien las que detectan enzimas preformados o las que nos muestran la actividad sacarolítica o proteolítica, teniendo en cuenta que estas últimas sólo serán útiles en el caso de bacterias que posean una cierta actividad sacarolítica y que sean capaces de crecer bien en las condiciones proporcionadas por el micrométodo.^{1,4,5,7}

Si se considera necesario y es posible completar, se debe comprobar o confirmar la información obtenida realizando individualmente las siguientes pruebas, indicadas en cada caso:

- Reducción de nitratos en un caldo que los posea (*Veillonella*, grupo *B. ureolyticus/Campylobacter*, *Propionibacterium*, *Eggerthella*).

- Detección de lecitinasa y/o lipasa (*Clostridium*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, pigmentadas).
- Detección de ureasa (grupos *B. ureolyticus*/ *Campylobacter*, *Bilophila*/ *Sutterella*, *Clostridium*).
- Estímulo del crecimiento por determinados suplementos: (formato/ fumarato en el grupo *B. ureolyticus*/ *Campylobacter*, arginina en *Eggerthella*)
- Detección de los productos finales del metabolismo (*Fusobacterium*, cocos Gram negativos y Gram positivos, bacilos Gram positivos no esporulados y *Clostridium*^{1,5,6,7,12})

5.11. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La interpretación de los resultados obtenidos en las pruebas practicadas conduce a una identificación más o menos específica de la bacteria en estudio. Al describir las observaciones y pruebas necesarias para una identificación preliminar ya se han dado unas orientaciones para su interpretación. (Vease fig. 5.22) Respecto a todas las demás que se pueden realizar no se detalla aquí el resultado a obtener en cada una de ellas para llegar a la identificación de cada uno de los posibles anaerobios, pudiéndose encontrar esta interpretación detallada en las publicaciones originales en las que se describen o redefinen géneros y especies y en manuales de referencia (Wadsworth-KTL Anaerobic Bacteriology Manual o Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition).^{1,5,6,7,12,15}

La realización e interpretación se hará siguiendo las instrucciones del fabricante. Todos vienen acompañados de tablas de identificación y de una base de datos que proporcionan la identificación de la cepa estudiada, señalando, además, la precisión y fiabilidad de esta. Son de gran ayuda, aunque estos métodos también presentan ciertos problemas a tener en cuenta:



Fig. 5.22 Pruebas de identificación de bacterias⁷⁷

- La lectura de las galerías, tanto si se hace manualmente como si se realiza un lector automático no es siempre clara y definida, con lo que con determinadas cepas se obtienen, para algunas pruebas, resultados dudosos o difíciles de interpretar.
- La inercia de estos sistemas suele ser grande por lo que sus bases de datos no se actualizan con facilidad y no se adaptan a los frecuentes cambios taxonómicos. Cuando alguno de esos cambios

consiste en que una determinada especie es transferida a otro género y/o recalificada el problema se limita a utilizar la denominación correcta cada vez que se de esa identificación (por ejemplo, *Peptostreptococcus magnus* ® *Finegoldia magna*, *Peptostreptococcus micros*® *Micromonas micros*, *Eubacterium lentum*® *Eggerthella lenta*). El problema es mayor cuando el cambio supone la creación de nuevas especies, muchas veces a partir de una anteriormente descrita (por ejemplo, *Peptostreptococcus prevotii*® *P. prevotii*, *P. vaginalis*, *P. lacrimalis*, *P. lactolyticus*).

- Las bases de datos suelen ser amplias y fiables pero lógicamente limitadas, no incluyen algunas especies que aún no siendo muy frecuentes pueden encontrarse en clínica (*Campylobacter* spp., *Bilophila/Sutterella*, *Acidaminococcus*), por ello con estos sistemas una cepa perteneciente a alguna de estas especies puede o no ser identificada o serlo erróneamente.^{1,5,6,12}

Cuando la lectura de las pruebas no proporciona ninguna identificación, esta es calificada por el propio sistema de poco fiable o de escasa discriminación, en estos casos o cuando este en clara contradicción con las observaciones realizadas para la identificación preliminar, es de gran ayuda disponer de alguna prueba complementaria cuyo resultado centre la identificación.^{1,5,6}

5.12. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS INDIVIDUALES COMPLEMENTARIAS REALIZADAS EN CASOS CONCRETOS.

1. Ante una identificación preliminar de bacilos Gram negativos anaerobios con crecimiento en bilis (-), vancomicina R, kanamicina S y colistina S, la producción de ácido butírico como producto final del metabolismo indica sin ninguna duda que se trata de *Fusobacterium*. (Vease fig. 5.23)



Fig. 5.23 *Fusobacterium* en Agar Sangre de Carnero⁷⁸

Una reducción de nitratos positiva sitúa en el grupo *Bacteroides ureolyticus/Campylobacter*. En las bases de datos de los micrométodos más

utilizados *F. nucleatum*, la especie más frecuente, se identifica bien pero con escasa discriminación, sólo una prueba positiva, y del grupo *Bacteroides ureolyticus/Campylobacter* sólo *B. ureolyticus* está contemplado.

2. Una prueba de lipasa (+) en *Fusobacterium* confirma su identificación como *F. necrophorum*, especie que con las galerías de micrométodos comerciales se identifica bien pero con escasa discriminación (sólo dos pruebas positivas).
3. Ante una identificación preliminar de bacilos gram negativos anaerobios crecimiento en bilis (-), vancomicina R, kanamicina S y colistina S, la producción de ácido láctico como producto final del metabolismo indica su pertenencia al género *Leptotrichia*.
4. Ante una identificación preliminar de bacilos Gram negativos anaerobios crecimiento en bilis (+), vancomicina R, kanamicina S, y colistina S, una prueba de catalasa (+) o (-) indica *Bilophila wadsworthia* o *Sutterella wadsworthensis*.
5. Una identificación preliminar de cocos Gram negativos anaerobios nitratos (+) separa el género *Veillonella*, y los productos finales del metabolismo definen perfectamente los tres géneros: *Veillonella* (ácido propiónico), *Acidaminococcus* (ácido butírico) y *Megasphaera* (ácido caproico).
6. Ante una identificación preliminar de bacilos Gram positivos anaerobios, que morfológicamente aparecen como *Propionibacterium*, la detección de ácido propiónico como producto final del metabolismo confirma el diagnóstico de género. Si se añaden las pruebas de catalasa (+), indol (+) y nitratos (+), está prácticamente identificada la especie *Propionibacterium acnés*.
7. La identificación de un bacilo Gram positivo anaerobio como *Eggerthella lenta* (antes *Eubacterium lentum*) con los micrométodos habituales, tanto con los que estudian la capacidad sacarolítica como con los que detectan enzimas preformados, es de escasa discriminación: resultado negativo en todas las pruebas en el primer caso (api 20 A[®]) y con sólo un resultado positivo, el ADH (arginina dehidrolasa), en el segundo caso (ID 32A[®]). La reducción de nitratos (+), la estimulación del crecimiento con arginina y la producción de SH₂ en medio de TSI (*triple sugar iron*) confirman plenamente el diagnóstico.
8. Ante una identificación preliminar de cocos Gram positivos anaerobios, la sensibilidad mediante la técnica de disco-placa a polianetol sulfonato sódico (SPS) indica la identificación de *Peptostreptococcus anaerobius* o, con menos probabilidad, *Micromonas micros*. Aparte de la fácil diferenciación de este último por su morfología microscópica (tamaño) y porque se identifica muy bien con los micrométodos que detectan enzimas preformados, un cromatograma abigarrado, incluyendo hasta ácido isocaproico en los productos finales del metabolismo orienta claramente hacia *P. anaerobius*.^{3,5,7,12} (Vease fig. 5.24)



Fig. 5.24 *Peptostreptococcus anaerobius*⁷⁹

9. En el taxonómicamente complicado grupo de los cocos Gram positivos anaerobios la detección de los productos finales del metabolismo delimita grupos más reducidos:

- Los que producen ácido acético:

Finegoldia magna

Micromonas micros

- Los que producen ácido butírico:

Indol (-):

Peptostreptococcus prevotii ® *Anaerococcus prevotii*

Peptostreptococcus tetradius ® *Anaerococcus tetradius*

Peptostreptococcus lactolyticus ® *Anaerococcus lactolyticus*

Peptostreptococcus vaginalis ® *Anaerococcus vaginalis*

Peptostreptococcus lacrimalis ® *Peptoniphilus lacrimalis* o *Schleiferella*

lacrimalis, *Peptostreptococcus ivorii* ® *Peptoniphilus ivorii*

Indol (+):

Peptostreptococcus indolicus ® *Peptoniphilus indolicus* o *Schleiferella*

indolica, *Peptostreptococcus asaccharolyticus* ® *Peptoniphilus*

asaccharolyticus o *Schleiferella asaccharolyticus*, *Peptostreptococcus*

harei ® *Peptoniphilus harei* o *Schleiferella harei*, *Peptostreptococcus*

vaginalis ® *Anaerococcus vaginalis*, *Peptostreptococcus*

hydrogenalis ® *Anaerococcus hydrogenalis*



Fig. 5.25 Microscopia de *Prevotella*⁸⁰

- Los que producen diversos ácidos orgánicos y hasta ácido isocaproico:
Peptostreptococcus anaerobius
- Los que producen diversos ácidos orgánicos y hasta ácido caproico:
Peptostreptococcus octavius ® *Anaerococcus octavius*
Peptococcus Níger.

Únicamente en el caso de *P. anaerobius* la cromatografía separa un género y una especie concreta, en el resto, y según los últimos cambios taxonómicos, los productos finales del metabolismo son los mismos para los distintos géneros. Aquí se da la paradoja de que con los caracteres fenotípicos usualmente estudiados, hay que llegar al diagnóstico de especie para poder llegar al género adecuado. Cuando esto no sea posible, quizás sea bueno conocer en qué grupo se está.^{7,11,12}

Ante el amplio género *Clostridium*, definido por la capacidad de producir esporas, las pruebas complementarias como la detección de lecitinasa y lipasa pueden definir tres grupos:

- *Clostridium* lecitinasa (+), entre los que se encuentran especies tan frecuentes como *C. perfringens*, *C. novyi* A [ambos indol (-) y además *C. novyi* A productor también de lipasa], *C. bifementans* y *C. sordellii* [ambos indol (+) y además *C. sordellii* productor también de ureasa].
- *Clostridium* lipasa (+), incluyen además de *C. novyi* A, todos los biotipos de *C. botulinum* y *C. sporogenes*.
- *Clostridium* lecitinasa (-) y lipasa (-). A este grupo pertenecen multitud de especies que pueden a su vez agruparse por los productos finales de su metabolismo:
 - Los que producen sólo ácido acético (como *C. ramosum* y *C. clostridioforme*).
 - Los que producen ácido butírico, que constituyen un grupo con un elevado número de especies importantes en clínica (entre ellas *C. tetani*, *C. septicum*, *C. butyricum*).
 - Los que producen una gran variedad de productos finales en su metabolismo. En este grupo, con muy pocas especies y en general poco frecuentes en clínica, se encuentra *C. difficile* que produce de forma característica ácido isocaproico, de forma que esta especie podría identificarse con mucha fiabilidad por sus características morfológicas, inoculación de una placa de agar-yema de huevo y cromatografía de los productos finales de su metabolismo.^{1,6,7,12} (Vease fig. 5.26)
 -



Fig. 5.26 Api zim ® de *Clostridium sp*⁸¹

5.13. PRUEBAS DE DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD

INDICACIONES

No se recomienda realizar, de una forma rutinaria, ensayos de sensibilidad a todos los aislamientos de bacterias anaerobias. La comunicación con el clínico es importante para decidir la realización de dichas pruebas. En la actualidad, se consideran las siguientes indicaciones para realizar estudios de sensibilidad:

1. Estudios periódicos de vigilancia y seguimiento en cada centro hospitalario, con el fin de conocer los patrones locales de resistencia y de esta forma tener información útil para seleccionar la terapia antimicrobiana empírica más adecuada y detectar posibles cambios en la sensibilidad o aparición de resistencias.
2. Casos individuales de pacientes que no responden a la terapia empírica, o que presentan infecciones graves o infecciones que requieran terapia prolongada (absceso cerebral, endocarditis, osteomielitis, infección articular, de prótesis, de injertos vasculares, y bacteremias recurrentes).
3. Estudios de la actividad *in vitro* de nuevos antimicrobianos frente a bacterias anaerobias.
4. Infecciones producidas por especies de *Bacteroides*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Bilophila* y *Sutterella*, que son más virulentas y/o con una sensibilidad poco predecible a los antibióticos comúnmente utilizados para el tratamiento de las infecciones por anaerobios.^{1,5,6,7,12}

5.14. MÉTODOS

Para una información más completa sobre la metodología de los ensayos de sensibilidad de las bacterias anaerobias es conveniente consultar el Procedimiento en Microbiología Clínica nº 11 de la SEIMC (Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos). En el presente manual se incluyen, especialmente, las modificaciones que se han producido ulteriormente, especialmente en los últimos documentos del CLSI (M11-A5, 2001 y M11-A6, 2004). El método de difusión con discos en agar no está aprobado para las bacterias anaerobias y el de dilución en agar es el de referencia para todos los

anaerobios. En cuanto al método de microdilución en caldo el CLSI (solamente lo ha aprobado para el ensayo de aislamientos pertenecientes al grupo de *Bacteroides fragilis* y a un número limitado de antibióticos, ya que diversas especies anaerobias crecen poco o no lo hacen en los pocillos y, además, hay pocos estudios comparativos con el método de referencia. Cuando se realizan estudios amplios, ya sea para ensayar nuevos antimicrobianos o para conocer los patrones actuales de resistencia, la técnica de dilución en agar es el método más eficaz, ya que permite el crecimiento de una gran variedad de microorganismos anaerobios. El método de microdilución así como la utilización de tiras de E-test, son alternativas recomendadas para casos individuales.^{1,6,7} (Vease fig. 5.27)

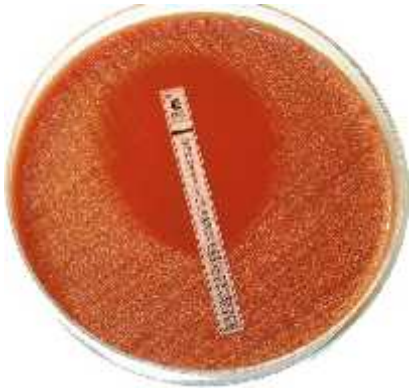


Fig. 5.27 Tiras de E-test⁸²

DILUCIÓN EN AGAR.

Medios de cultivo: En sus últimos documentos el CLSI recomienda utilizar agar *Brucella* enriquecido con 5% de sangre de carnero lacada, vitamina K₁ (5 µg/ml) y hemina (5 µg/ml), en lugar del medio recomendado anteriormente, agar Wilkins-Chalgren, al comprobar que en el primero crecen mejor las bacterias anaerobias.^{1,6,7,15} (Vease fig. 5.28)



Fig 5.28 Agar *Brucella* enriquecido con ASC⁸³

Preparación del inóculo: A partir de un cultivo en placas de agar *Brucella* enriquecido para anaerobios, de 24 horas o del tiempo necesario para conseguir colonias de por lo menos 1 milímetro de diámetro, se suspenden de 3 a 5 colonias en un caldo de tioglicolato enriquecido sin indicador, que se incuba entre 6 y 24 horas o hasta que alcance una turbidez adecuada. Posteriormente, se ajusta la turbidez a una densidad equivalente al 0,5 de la escala turbidométrica de McFarland mediante la adición de caldo u otro caldo previamente reducido, o hervido y enfriado para eliminar el oxígeno. También se puede preparar el inóculo directamente haciendo una emulsión de las colonias y ajustándola a la turbidez mencionada partiendo del cultivo, medios citados y según el procedimiento anteriormente indicado. Las

placas con medio de agar *Brucella* con antibióticos no deben dejarse en aerobiosis un tiempo superior a 30 minutos.^{1,6,7}

La inoculación en la superficie del agar se hace con la ayuda de un replicador de Steers. El inóculo final debe ser, aproximadamente, de 10^5 UFC por punto de inoculación. Se recomienda, tanto al principio como al final de cada serie, inocular dos placas control sin antibiótico, una se incuba en una atmósfera con un 5% de CO_2 y la otra en anaerobiosis, durante 42-48 h, con el fin de comprobar la viabilidad y pureza del inóculo. Se debe empezar a inocular siempre por la concentración más pequeña de cada antibiótico. A las 42-48 h de incubación en anaerobiosis a 35-37°C, se lleva a cabo la lectura examinando en primer lugar las placas control. La CMI (concentración mínima inhibitoria) se considera como aquella concentración de antibiótico en la que se observa una reducción marcada en el crecimiento de la bacteria al compararlo con el crecimiento de la placa control, como es el cambio a una fina película, o a numerosas colonias pequeñas, o bien a una o varias colonias de tamaño normal.^{1,6,7}

La interpretación de los valores de CMI obtenidos para cada antibiótico se realiza según los criterios del documento M11-A6 del CLSI^{1,5,6,7}

MICRODILUCIÓN EN CALDO.

Solamente está aceptado por el CLSI para las especies del grupo de *Bacteroides fragilis* y para ampicilina-sulbactam, cefoxitina, clindamicina, ertapenem, metronidazol, piperacilina y trovafloxacin. Para su realización se recomienda usar caldo *Brucella* suplementado con hemina (5 µg/ml), vitamina K₁ (1 µg/ml) y sangre lacada de caballo (5%). El inóculo puede prepararse siguiendo uno de los procedimientos descritos en el método de dilución en agar y debe ser de 1×10^5 UFC/pocillo. Se aconseja realizar un control de pureza de la suspensión del inóculo, haciendo un subcultivo de una parte alícuota en un medio enriquecido y no selectivo para incubar en aerobiosis y en anaerobiosis.^{1,6,7,12,15}



(Vease fig. 5.29)

Fig. 5.29 Método de diluciones⁸⁴

A las 48 horas de incubación en atmósfera anaerobia a 35-37°C, se realiza la lectura en un fondo oscuro, con luz indirecta o mediante un espejo. Se considera como CMI aquella concentración del antibiótico en la que se observa una reducción significativa del crecimiento bacteriano al compararlo con el crecimiento del pocillo control, ya sea una inhibición completa del crecimiento o un botón de crecimiento muy tenue.^{1,6,7,15}

5.15. SISTEMAS COMERCIALES.

Se encuentran disponibles microplacas con diferentes antibióticos con actividad frente a bacterias anaerobias (Sensititre®, Trek Diagnostic Systems). Los paneles de Sensititre® contienen el sustrato antibiótico desecado, se pueden almacenar a temperatura ambiente y presentan larga caducidad (18-24 meses). El autoinoculador Sensititre® permite su inoculación automática. Como medio de cultivo se utiliza, siguiendo las normas del CLSI, caldo *Brucella* con sangre lacada de caballo (5%) que proporciona la casa comercial.^{1,4,5} (Vease fig. 5.30)



Fig. 5.30 Microplacas Sensititre®⁸⁵

Otro micrométodo de dilución en caldo comercializado son las galerías de sensibilidad para bacterias anaerobias ATB ANA® (bioMérieux). Contienen 16 pares de pocillos con diferentes antibióticos que se ensayan a dos concentraciones determinadas. La lectura se realiza mediante un lector automatizado.^{1,5,6}

E-test.

Las tiras de E-test® (AB Biodisk) consisten en unas tiras de plástico impregnadas con un gradiente exponencial continuo del antimicrobiano y una escala de valores de CMI. Siguiendo las normas de los fabricantes del producto, se prepara como inóculo una suspensión del microorganismo a ensayar en caldo *Brucella* hasta alcanzar una turbidez correspondiente al nº 1 de la escala de McFarland, que se aplica en placas de agar *Brucella* enriquecidas con 5% de sangre de carnero, vitamina K1 (1 µg/ml) y hemina (5 µg/ml). Una vez secas las placas se aplican las tiras sobre la superficie del agar con la escala hacia arriba y evitando la formación de burbujas bajo ella. Se incuban en anaerobiosis durante 24-48h. La lectura de la CMI se realiza en el punto de intersección de la escala de la tira y la zona de inhibición del crecimiento del microorganismo, que tiene forma de elipse. Para el metronidazol es importante alcanzar la atmósfera anaerobia en 1 ó 2 horas. Con la clindamicina se debe confirmar la lectura a las 48 horas.^{1,5,6}

5.16. CONTROLES DE CALIDAD.

Verificar la caducidad de los medios y los estándares de calidad de los medios de cultivo preparados en el laboratorio (control de esterilidad y eficiencia en cada nuevo lote preparado). Comprobar los medios comercializados exentos de control según el documento del CLSI "Quality Control for Commercially Prepared

Microbiological Culture Media: Approved Standard. 3 Edition M22-A3". Registrar los resultados de los controles realizados. Si no son adecuados, adoptar medidas correctoras. Aplicar un control interno que asegure que el funcionamiento de los reactivos (tinciones), equipos, (microscopios, centrifugas, pipetas, incubadores, cabinas de bioseguridad, jarras de anaerobiosis, etc.), sistemas de determinación de sensibilidad (manuales o automatizados), sistemas automatizados de identificación, hemocultivos, etc., sea el apropiado para los ensayos efectuados.^{3,5}

Con cualquiera de los métodos utilizados se deben realizar ensayos de control de calidad con las cepas de referencia de la colección americana de cultivos tipo ATCC® (*Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 y *Eubacterium lentum* ATCC 43055). El CLSI recomienda efectuar los ensayos de control de calidad en la dilución en agar, con al menos 2 de las cepas ATCC indicadas y en la microdilución en caldo, con 1 o más cepas ATCC. Los intervalos aceptables de los valores de CIM de cada uno de los 3 microorganismos ATCC y para los diferentes antibióticos se pueden obtener consultando el mencionado documento M11-A6 del CLSI^{1,6,14,15,16}

DETECCIÓN DE β -LACTAMASAS.

La presencia de β -lactamasas se puede investigar con el método de la cefalosporina cromogénica utilizando como sustrato nitrocefín (Cefinase®, Becton Dickinson). El disco de nitrocefín se humedece con agua estéril y sobre el mismo se extienden varias colonias. El cambio de color amarillo a rojo indica una reacción positiva. La reacción suele ser positiva a los 5-10 minutos. En algunas cepas la reacción puede ser más lenta, pero no debe observarse tras un periodo de tiempo superior a 30 minutos.^{1,7,12}

Dado que la mayoría del grupo *Bacteroides fragilis* son productores de β -lactamasas, se consideran de forma natural resistentes a penicilina, por lo que no es necesario ensayar de rutina la producción de β -lactamasas en este grupo. Cualquier otra bacteria anaerobia que sea productora de β -lactamasas se debe considerar resistente a penicilina y ampicilina e informar como tal, independientemente de los resultados de los estudios de sensibilidad *in vitro*. Una prueba de detección de β -lactamasas negativa no implica necesariamente que la bacteria sea sensible a la penicilina, ya que puede ocurrir que la bacteria sea resistente a los β -lactámicos por otros mecanismos diferentes a la producción de β -lactamasas.^{1,7,12}

REFERENCIAS CAPITULO 1

1. www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteriasAnaerobias.pdf. 25/05/12.
2. SEIMC. Microbiología Clínica, Cap.16.Bacterias Anaerobias 2004.
3. <http://schaechter.asmblog.org/schaechter/2007/07/tetracycline-as.html> 16:56 27/08/13
4. <http://www.lookfordiagnosis.com/images.php?term=Bilophila&lang=2> 16:58 12/08/13
5. C. Rivas, M Mota. Bacterias Anaerobias. PDF.
6. Jawetz, Ernest, Melnick, Joseph L. Adelberg, Edward A. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 14ª Edición. Editorial. El Manual Moderno. México 1992.
7. Kliegman Robert, E. Behrman Richard. Tratado de Pediatría. Vol. 2. Ed.19ª. Editorial. Eselvier. España. 2012.
8. Sabiston, David, Townsend Courtney M. Tratado de Patología quirúrgica. Tomo 2. Editorial. McGraw- Hill. México 2003.
9. Drs. Eliecer Villagra C., María Angélica Martínez T., y Alfredo Ovalle S. Flora Microbiana genital en una población de alto riesgo obstétrico Chil Obstet Ginecol. 10-04-2014. Vol. 1. pág. 32-38. file:///C:/Users/PC_00/Downloads/EIP%20estudio%20cl%C3%ADnico%20y%20microbiol%C3%B3gico%20R%20Ch%20O%20G%2093.pdf
10. Sergio Mella M., Marcela Sepúlveda A., Gerardo González R., Helia Bello T., Mariana Domínguez Y., Raúl Zemelman Z. y César Ramírez G. Aminoglucósidos-aminociclitolos: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. 16-04-2014. Vol.4. pág. 330-338. http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071610182004000400007&script=sci_arttext
11. Dra. Tatiana Peña Ruíz; Dr. Ariel Delgado Ramos; y Dra. Yudit Martínez Abreu. Nociones actuales sobre la flora microbiana del surco gingival. Rev. Cubana Estomatol. 22 – 04- 20014. Vol. 44 pág. 13. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75072007000300012&script=sci_arttext
12. Palomino J, Pachón J. Amino glucósidos. Enf Infecc Microbiol Clin 2003; 21: 105-15.
13. Manuel Álvarez L, Robinson González D, Isabel L, Colomba Cofre D, Jaime Labarca L, Pablo Viral C, Patricia García C. Diagnostico de diarrea por *Clostridium difficile*: en busca de un enfoque clínico más eficiente. Rev. Med. Chile. 15 – 03 - 2014 Vol. 129. http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S003498872001000600004&script=sci_arttext

14. Claran P. Kelly, Thomas Lamont. *Clostridium difficile*. Rev. Engl J. Med 2008. 21 – 02- 2014
<http://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidolD=57005>
15. Murray PR., Baron EJ, Pfaller MA, et al. Manual of Clinical Microbiology. 6a ed., American Society for Microbiology, Washington DC, 2002.

REFERENCIAS CAPITULO 2

1. SEIMC. Microbiología Clínica, Cap.16. Bacterias Anaerobias 2004.
2. Summanen PE, Baron EJ, Citron DM et al; Wadsworth anaerobic bacteriology manual, ed 5, Belmont, California, 1993, Star.
3. Jousimies-Somer HR, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler y HM, Finegold SM. Wadsworth –KTL Anaerobic Bacteriology Manual. Star Publishing Company. Belmont, C.A. 2002.
4. Moncla BJ, Hillier. SL. *Peptostreptococcus, Propionibacterium, Lactobacillus, Actinomyces*, and other non-spore-forming anaerobic gram-positive bacteria. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC editores. Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition. American Society for Microbiology, Washington, D.C.; 2003. p. 857-879.
6. Bailey & Scott. Diagnóstico Microbiológico, 11º ed. México: Editorial Médica Panamericana, 2004.
7. Jawetz, Ernest, Melnick, Joseph L. Adelberg, Edward A. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 14ª Edición. Editorial. El Manual Moderno. México 1992.
8. Kliegman Robert, E. Behrman Richard. Tratado de Pediatría. Vol. 2. Ed. 19ª. Editorial. Elsevier. España. 2012.
9. Dra. Raquel I. Caballero Pozo, Dr. Ricardo Batista Moliner, Lic. Manuel Crue Brugueras, Dra. Lilia Ortega González y Dra. María E. Rodríguez Barrera. Vaginosis bacteriana. 15-04-2014. Vol. 2. Pág. 63-75.
http://www.bvs.sld.cu/revistas/res/vol13_2_00/res04200.htm
10. Quezada – Gómez Carlos. Infecciones en humanos por bacterias anaerobias del género bacteroides: actualización en aspectos taxonómicos, bioquímicos, inmunológicos, patogénicos y clínicos. 21-03-2014. Vol. 21. Pág. 89 – 96.
<http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb102125.pdf>

11. Murray PR., Baron EJ, Pfaller MA, et al. Manual of Clinical Microbiology. 6a ed., American Society for Microbiology, Washington DC, 2002.
12. Koneman Ew, Allen SD, Janda WM, et al. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 4a ed., Lippincott Company. 2003.
13. Lorber B. gas gangrene and other clostridium associate diseases. En: Mandell GL; Bennett J.E, Dolin R. (eds). Principles and practice of infectious diseases 5^a Ed. Philadelphia; Churchill – Livingstone, 2000. Pag. 2549 – 2570.
14. Claran P. Kelly, Thomas Lamont. Clostridium difficile. Rev. Engl J. Med 2008. 21 – 02- 2014 <http://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoID=57005>
15. MSc. Wilmer Martínez Martínez. Actualización sobre la vaginosis bacteriana. Rev. Obstet ginecol. 21 – 01 – 2014. Vol. 39 pág. 10. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-600X2013000400012
16. Tamara Soler v, Lucia Salamanca F, Eliana Molina. Susceptibilidad In vitro de bacterias anaeróbicas en infecciones pleuropulmonares. 10 – 03 -2014. Rev. Med Chile. 2006. Vol. 134. Pág. 465 – 468. http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=s0034-98872006000400009&script=sci_arttext

REFERENCIAS CAPITULO 3

1. C. Rivas, M Mota. Bacterias Anaerobias. PDF.
2. Jousimies-Somer HR, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler y HM, Finegold SM. Wadsworth –KTL Anaerobic Bacteriology Manual. Star Publishing Company. Belmont, C.A. 2002.
3. Moncla BJ, Hillier. SL. *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, and other non-spore-forming anaerobic gram-positive bacteria. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC editores. Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition. American Society for Microbiology, Washington, D.C.; 2003. p. 857-879.
4. Bailey & Scott. Diagnóstico Microbiológico, 11^o ed. México: Editorial Médica Panamericana, 2004.
5. Jawetz, Ernest, Melnick, Joseph L. Adelberg, Edward A. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 14^a Edición. Editorial. El Manual Moderno. México 1992.
6. Kliegman Robert, E. Behrman Richard. Tratado de Pediatría. Vol. 2. Ed.19^a. Editorial. Eselvier. España. 2012.

7. Sabiston, David, Townsend Courtney M. Tratado de Patología quirúrgica. Tomo 2. Editorial. McGraw- Hill. México 2003.
8. Murray, Baron, Pfaller, Towner, Tenover, Tenover. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. Washington D.C. ASM, 1999.
9. Drs. Eliecer Villagra C., María Angélica Martínez T., y Alfredo Ovalle S. Flora Microbiana genital en una población de alto riesgo obstétrico Chil Obstet Ginecol. 10-04-2014. Vol. 1. pág. 32-38. file:///C:/Users/PC_00/Downloads/EIP%20estudio%20cl%C3%ADnico%20y%20microbiol%C3%B3gico%20R%20Ch%20O%20G%2093.pdf
10. Sergio Mella M., Marcela Sepúlveda A., Gerardo González R., Helia Bello T., Mariana Domínguez Y., Raúl Zemelman Z. y César Ramírez G. Aminoglucósidos-aminociclitolos: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. 16-04-2014. Vol.4. pág. 330-338. http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071610182004000400007&script=sci_arttext
11. Dra. Tatiana Peña Ruíz; Dr. Ariel Delgado Ramos; y Dra. Yudit Martínez Abreu. Nociones actuales sobre la flora microbiana del surco gingival. Rev. Cubana Estomatol. 22 – 04- 20014. Vol. 44 pág. 13. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75072007000300012&script=sci_arttext
12. Palomino J, Pachón J. Amino glucósidos. Enf Infecc Microbiol Clin 2003; 21: 105-15.
13. Manuel Álvarez L, Robinson González D, Isabel L, Colomba Cofre D, Jaime Labarca L, Pablo Viral C, Patricia García C. Diagnostico de diarrea por *Clostridium difficile*: en busca de un enfoque clínico más eficiente. Rev. Med. Chile. 15 – 03 - 2014 Vol. 129. http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S003498872001000600004&script=sci_arttext
14. Claran P. Kelly, Thomas Lamont. *Clostridium difficile*. Rev. Engl J. Med 2008. 21 – 02- 2014 <http://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoID=57005>
15. Murray PR.,Baron EJ, Pfaller MA, et al.Manual of Clinical Microbiology. 6a ed., American Society for Microbiology, Washington DC, 2002.

REFERENCIAS CAPITULO 4

1. C. Rivas, M Mota. Bacterias Anaerobias. PDF.
2. Jousimies-Somer HR, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler y HM, Finegold SM. Wadsworth –KTL Anaerobic Bacteriology Manual. Star Publishing Company. Belmont, C.A. 2002.
3. Moncla BJ, Hillier. SL. *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, and other non-spore-forming anaerobic gram-positive bacteria. En: Murray

- PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenenbaum BC, Tenenbaum BC editores. Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition. American Society for Microbiology, Washington, D.C.; 2003. p. 857-879.
4. Bailey & Scott. Diagnóstico Microbiológico, 11^o ed. México: Editorial Médica Panamericana, 2004.
 5. Jawetz, Ernest, Melnick, Joseph L. Adelberg, Edward A. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 14^a Edición. Editorial. El Manual Moderno. México 1992.
 6. Kliegman Robert, E. Behrman Richard. Tratado de Pediatría. Vol. 2. Ed.19^a. Editorial. Eselvier. España. 2012.
 7. Sabiston, David, Townsend Courtney M. Tratado de Patología quirúrgica. Tomo 2. Editorial. McGraw- Hill. México 2003.
 8. Moncla BJ, Hillier SL. *Peptostreptococcus, Propionibacterium, Lactobacillus, Actinomyces*, and other non-spore-forming anaerobic gram-positive bacteria. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenenbaum BC, Tenenbaum BC editores. Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition. American Society for Microbiology, Washington, D.C.; 2003. p. 857-879.
 9. Jousimies-Somer HR, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler y HM, Finegold SM. Wadsworth –KTL Anaerobic Bacteriology Manual. Star Publishing Company. Belmont, C.A. 2002.
 10. Drs. Eliecer Villagra C., María Angélica Martínez T., y Alfredo Ovalle S. Flora Microbiana genital en una población de alto riesgo obstétrico Chil Obstet Ginecol. 10-04-2014. Vol. 1. pág. 32-38. file:///C:/Users/PC_00/Downloads/EIP%20estudio%20cl%C3%ADnico%20y%20microbiol%C3%B3gico%20R%20Ch%20O%20G%2093.pdf
 11. Sergio Mella M., Marcela Sepúlveda A., Gerardo González R., Helia Bello T., Mariana Domínguez Y., Raúl Zemelman Z. y César Ramírez G. Aminoglucósidos-aminociclitolos: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. 16-04-2014. Vol.4. pág. 330-338. http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071610182004000400007&script=sci_arttext
 12. Dra. Tatiana Peña Ruíz; Dr. Ariel Delgado Ramos; y Dra. Yudit Martínez Abreu. Nociones actuales sobre la flora microbiana del surco gingival. Rev. Cubana Estomatol. 22 – 04- 20014. Vol. 44 pág. 13. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75072007000300012&script=sci_arttext
 13. Palomino J, Pachón J. Amino glucósidos. Enf Infecc Microbiol Clin 2003; 21: 105-15.

REFERENCIAS CAPITULO 5

1. Alcalá L., Betriu C., García J., Reig M. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Capítulo 16. España, 2004.
2. http://www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2003/bisso_af/html/sdx/bisso_af-TH.back.2.html. 16:21 29/12/2014
3. García I., García F., García J., Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: Capítulo 41. España 2010.
4. <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb991025.pdf> 18:17 29/12/2014.
5. Gerard, J., Tortora Berdell, Cristine, L. Case, R. Funke, Introducción a la Microbiología, Ed. 9ª, Editorial Panamericana Buenos Aires, 2007.
6. Pratts Guillen, Microbiología Clínica, Editorial Médica Panamericana, Argentina, Buenos Aires 2005.
7. Bailey & Scott. Diagnóstico Microbiológico, 11º ed. México: Editorial Médica Panamericana, 2004.
8. Jawetz, Ernest, Melnick, Joseph L. Adelberg, Edward A. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 14ª Edición. Editorial. El Manual Moderno. México 1992.
9. Kliegman Robert, E. Behrman Richard. Tratado de Pediatría. Vol. 2. Ed.19ª. Editorial. Eselvier. España. 2012.
10. Everts RJ; Vinson EN; Adholla PO; Reller BL. Contamination of catheter-drawn blood cultures. J. Clin. Microbiol. 2001; 39:3393-3394.
11. Mermel LA; Farr BM; Sherertz RJ; Raad II; O'Grady N; Harris JS; Craven de Guidelines for the managements of intravascular catheter-related infections. Clin. Infect. Dis. 2001; 32:1249-1272.
12. Murray, Baron, Pfaller, Tenover, Tenover, Tenover, Tenover, Tenover. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. Washington D.C. ASM, 1999.
13. Francisco Hernandez; Manuel Moraga. Valor diagnostico de la tincion de Gram en la vaginosis bacteriana. Rev. Costarric. Cienc. 03 – 03 – 2014. Vol 18. pág. 1- 2
http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S025329481997000100005&script=sci_arttext
14. Secretaría de Salud. NOM-109-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Procedimiento para la Toma, Manejo y Transporte de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico. Norma Oficial Mexicana. México.
15. Secretaría de Salud. NOM-110-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico. Norma Oficial Mexicana. México.

16. Secretaría de Salud. NOM-092-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de Bacterias Aerobias en Placa. Norma Oficial Mexicana. México.

REFERENCIAS DE IMÁGENES

- 1) **Figura 1.1** *Clostridium novyi* en agar yema de huevo. <http://www.monografias.com/trabajos73/bacteriologia-anaerobica-practica/bacteriologia-anaerobica-practica2.shtml>
- 2) **Figura 1.2** Mecanismos de transferencia de plásmidos. <http://www.monografias.com/trabajos81/resistencia-bacteriana/resistencia-bacteriana.shtml>
- 3) **Figura 1.3** *Bacteroides fragilis* http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacteroides_fragilis
- 4) **Figura 1.4** Transporte activo <http://biologiafisiologiacelular.wikispaces.com/Trasporte+por+Menbranas+que+Requiere+Ener%C3%ADa>
- 5) **Figura 1.5** Ciclo de las vías Embden-Meyerhof- Parnas (EMP), el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y la vía de la pentosa fosfato.
- 6) **Figura 1.6** Cámara para el cultivo de anaerobios <http://ccicalidad.blogspot.mx/2010/03/camara-climatica-de-investigacion.html>
- 7) **Figura 1.8** Agrupaciones de las bacterias. <http://pablomartinezcisneros.wikispaces.com/Morfolog%C3%ADa+de+las+Bacterias>
- 8) **Figura 1.9** Representación de la membrana bacteriana http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Endotoxinas&lang=2
- 9) **Figura 1.10** Diferencias entre gram negativa y gram positiva <http://elprofedebiolo.blogspot.mx/2010/01/la-celula-procariota.html>
- 10) **Figura 1.11** Fimbrias <http://estructurayfuncioncelularbacteriana.wikispaces.com/Diferencias+procariotas+y+eucariotas>
- 11) **Figura 1.12** Flagelo bacteriano <http://artigoo.com/el-flagelo-bacteriano>
- 12) **Figura 1.13** Formación de una endospora bacteriana. <http://elvagoveterinario.galeon.com>

- 13) **Figura 1.14** *Bacteroides fragilis*
<http://schaechter.asmblog.org/schaechter/2007/07/>
- 14) **Figura 1.15** *Fusobacterium nucleatum*
http://www.genomenewsnetwork.org/articles/03_02/fusobacterium_sequenced.shtml
- 15) **Figura 1.16** *Bilophila wadsworthia*
<http://www.newscientist.com/article/dn21920-milk-fats-clue-to-inflammatory-bowel-disease.html>
- 16) **FIGURA 1.17** Jarra de anaerobiosis
<http://www.cardinal.com/us/en/distributedproducts/ASP/J3051-1A.asp?cat=laboratory>
- 17) **Figura 1.18** Requerimientos de oxígeno
<http://www.monografias.com/trabajos73/bacteriologia-anaerobica-practica/bacteriologia-anaerobica-practica2.shtml>
- 18) **Figura 1.19** *Clostridium botulinum* <http://health.india.com/news/bug-that-causes-food-poisoning-can-fight-arthritis-and-asthma/>
- 19) **Figura 2.1** Herida gangrenosa <http://www.ferato.com/wiki/index.php/Gangrena>
- 20) **Figura 2.2** Vaginosis <http://materno-fetal.blogspot.mx/2011/06/vaginosis-bacteriana-y-embarazo.html>
- 21) **Figura 2.3** *Clostridium difficile*
<http://vietsciences2.free.fr/khaocuu/nguyenlandung/cacnhomvikhuanchuyeu6.htm>
- 22) **Figura 3.1** Colonias de *Actinomyces*
http://es.m.wikipedia.org/wiki/Archivo:Actinomyces_spp_01.jpg
- 23) **Figura 3.2** *Actinomyces israelii*
<http://www.sampac.es/content/bacteriolog%C3%AD?page=1>
- 24) **Figura 3.3** *Actinomyces spp*
<http://www.sampac.es/content/bacteriolog%C3%AD?page=1>

- 25) **Figura 3.4** *Propionibacterium acnes* http://en.wikipedia.org/wiki/File:Propionibacterium_acnes.jpg
- 26) **Figura 3.5** *Lactobacillus* <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/microbiology-focus/lactobacilli.html>
- 27) **Figura 3.6** *Mobiluncus mulieris* <http://lib.jiangnan.edu.cn/ASM/028-3.jpg>
- 28) **Figura 3.7** *Bifidobacterium* http://www.greenhealthlive.com/images/e211/greenhealth_08_Bifidobacterium%20infantis.jpg
- 29) **Figura 3.8** *Clostridium perfringens* http://www.allposters.es/-sp/Clostridium-Perfringens-Bacteria-are-Anaerobic-Food-Borne-Pathogens-Posters_i6016382_.htm
- 30) **Figura 3.9** Lisis eritrocitaria <http://estudiarfarmacia.blogspot.mx/2011/05/lisis-celular-adn.html>
- 31) **Figura 3.10** Herida gangrenosa <http://www.clinicadam.com/imagenes-de-salud/17190.html>
- 32) **Figura 3.11** Intestino perforado http://eksपोze.files.wordpress.com/2012/04/clostridium-difficile-colon_fs1.jpg
- 33) **Figura 3.12** Microfotografía del patógeno *Clostridium difficile* (fuente: [Microbiology Bytes](#))
- 34) **Figura 3.13** *Clostridium tetani* <http://1.bp.blogspot.com/-Fujwtz5hrNo/UMnue5rDBEI/AAAAAAAAAAM/bh90eUJqr5Q/s1600/Clostridium-tetani.jpg.jpg>
- 35) **Figura 3.14** *Clostridium tetani* en Agar Sangre <http://fundacionio.org/imgbacteriology/img/clostridium01.jpg>
- 36) **Figura 3.15** *C. tetani* en un bebe http://www.sepeap.org/index.php?menu=documentos&id=30&id_doc=452&show=1

- 37) **Figura 3.16** Contracciones por *C. tetani*
<http://doctorpercyzapata.blogspot.mx/2011/12/tetanos-percy-zapata-mendo-carmen.html>
- 38) **Figura 3.17** Vacuna antitetánica
http://www.allignanihnos.com.ar/productos/lineas/inmunovet/fichas_productos/vacunaantitet.html
- 39) **Figura 3.18** Lata inflada por toxinas <http://cocinacasera.net/entrantes-y-huevos/conservas-durante-todo-el-ano>
- 40) **Figura 3.19** *C. botulinium* <http://pubs.ext.vt.edu/2911/2911-7041/2911-7041.html>
- 41) **Figura 3.20** Toxina botulínica
http://www.150facultadefarmacia.com/aef/index.php?option=com_content&view=article&id=229:icosmetica-seminario-3-antiarrugas-y-toxina-botulinica&catid=57:leopen&Itemid=97
- 42) **Figura 3.22** Mecanismo de la toxina <http://dramaryhouse.blogspot.mx/>
- 43) **Figura 3.23** Botulismo en lactante
http://bacteriologiaequipo7.blogspot.mx/2011_06_01_archive.html
- 44) **Figura 3.24** Espora del *C. botulinium* <http://microblog.me.uk/359>
- 45) **Figura 4.1** *Veillonella sp*
<http://www.npr.org/blogs/health/2011/08/31/140096272/what-we-eat-shapes-microbe-societies-inside-us>
- 46) **Figura 4.2** *Megasphaera spp*
<http://vietsciences.free.fr/khaocuu/nguyenlandung/cacnhomvikhuanchuyeu4.htm>
- 47) **Figura 4.3** *Acidaminococcus spp*
<http://vietsciences.free.fr/khaocuu/nguyenlandung/cacnhomvikhuanchuyeu4.htm>

- 48) **Figura 4.4** *Bacteriodes*
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bacteroides_biacutis_01.jpg
- 49) **Figura 4.5** *Bacteriodes fragilis*
http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:B_fragilis.jpg
- 50) **Figura 4.6** *Bacteriodes fragilis*
http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:B_fragilis.jpg
- 51) **Figura 4.7** Cirugia abdominal <http://www.revistapediatria.cl/vol4num1/4.htm>
- 52) **Figura 4.8** *Peptococcus* <http://kids.britannica.com/comptons/art-115845/Each-Peptococcus-is-spherical-the-individual-bacteria-clump-together-a>
- 53) **Figura 4.9** *Porphyromonas endontalis*
http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:Porphyromonas_gingivaris.jpg
- 54) **Figura 4.10** *Fusobacterium nucleatum* <http://lib.jiangnan.edu.cn/ASM/100.jpg>
- 55) **Figura 4.11** *F.necroporum*
<http://loudoun.nvcc.edu/vetonline/vet132/micro/images/lesson5/FusobactCDCDrV RDOWELLJr.jpg>
- 56) **Figura 5.1** Hemocultivos adultos
<http://www.monografias.com/trabajos75/normas-procedimiento-hemocultivos/normas-procedimiento-hemocultivos2.shtml>
- 57) **Figura 5.2** Material para toma de muestras
<http://www.sanmarcovet.it/pagina.asp?m1=211&m2=1025>
- 58) **Figura 5.3** Broncofibroscopio
http://www.hospitalolavarria.com.ar/instalaciones_cuadro.asp?imprime=1
- 59) **Figura 5.4** Envase esteril de boca ancha
http://perso.wanadoo.es/sergioram1/images/Microbiologia/envase_boca_ancha.jpg
- 60) **Figura 5.5** Port-A-Cul Vial
http://perso.wanadoo.es/sergioram1/images/Microbiologia/envase_boca_ancha.jpg

- 61) **Figura 5.6** Port-A-Cul en tubo
http://perso.wanadoo.es/sergioram1/images/Microbiologia/envase_boca_ancha.jpg
- 62) **Figura 5.7** Contenedor especial para -Pak
http://perso.wanadoo.es/sergioram1/images/Microbiologia/envase_boca_ancha.jpg
- 63) **Figura 5.8** *Porphyromonas* http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0001-63652002000200007&script=sci_arttext
- 64) **Figura 5.9** *Bacteriodes* http://homeociencia.org/?attachment_id=155
- 65) **Figura 5.10** *Porphyromonas* <https://ecm.univ-rennes1.fr/nuxeo/site/esupversions/e3e30eba-1b28-4739-8bb7-85d986a78866/html/cours-N109F8-5.html>
- 66) **Figura 5.11** Agar para anaerobios
<http://www.monografias.com/trabajos60/tracto-respiratorio-superior/tracto-respiratorio-superior2.shtml>
- 67) **Figura 5.12** Jarra de anaerobiosis
<http://raulcalasanz.wordpress.com/2010/05/25/anaerobios-espiroquetas-y-rickettsias/>
- 68) **Figura 5.13** Bolsa de plástico transparente
https://es.vwr.com/app/catalog/Product?article_number=1.01611.0001
- 69) **Figura 5.14** Preparación del catéter
<http://www.siacardio.org/cientifico.asp?xItem=1536>
- 70) **Figura 5.15** Lavado broncoalveolar
<http://www.bayhealth.org/ImagePopup.aspx?ImageId=128113>
- 71) **Figura 5.16** Antibiograma
http://www.tlahui.com/medic/medic32/fito_antibiogramas.htm
- 72) **Figura 5.17** sembrado por aislamiento
<http://eriikazhu.blogspot.mx/2009/06/tipos-de-siembra.html>
- 73) **Figura 5.18** Crecimiento bacteriano
http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0001-63652002000200007&script=sci_arttext
- 74) **Figura 5.19** Prueba de catalasa
<http://microbitos.files.wordpress.com/2011/09/catalaseresults1.jpg>

- 75) **Figura 5.20** Sistema Api Zim http://pharmaweb.univ-lille2.fr/apache2-default/labos/Bacteriologie/generalites_ana/ID32A.JPG
- 76) **Figura 5.21** Cromatografía de bacterias
<http://mazzally.files.wordpress.com/2011/05/prac21.jpg>
- 77) **Figura 5.22** Pruebas de identificación de bacterias
<http://diagnosticopatya.blogspot.mx/2008/10/pruebas-para-identificacion-de.html>
- 78) **Figura 5.23** Agar sangre de carnero
http://pictures.life.ku.dk/atlas/microatlas/veterinary/bacteria/Fusobacterium_necrophorum_B/
- 79) **Figura 5.24** *Peptostreptococcus anaerobius*
https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/content/hugo/AnaeroGRO-BrucellaAgarwithHandK.html
- 80) **Figura 5.25** Microscopia
<http://www.picsearch.com/imageDetail.cgi?id=CVbqgLMNUzEOhdd8aC5s6uitlO9w7wZJ2z1jnrwllww&start=1&q=Prevotella>
- 81) **Figura 5.26** Api Zim <http://www.tgw1916.net/Tests/api.html>
- 82) **Figura 5.27** Tiras de E-test
<http://www.lapizarradeyuri.com/2010/11/07/superbacterias-enfermedades-resistentes-a-los-antibioticos/>
- 83) **Figura 5.28** Agar Brucella enriquecido con ASC 5%
<http://www.gramnegativeanaerobier.de/files/imagemanagermodule/@random4304de986b7cc/Agars.JPG>
- 84) **Figura 5.29** Método de diluciones
<http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioAntibioticos.htm>
- 85) **Figura 5.30** Microplacas sensitire <http://es.medwow.com/med/microbiological-culture-analyzer/trek-diagnostic-systems/sensititre-aris/2793.model-spec>