



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

DETERMINACION DEL PATRON DE
RESISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS EN
Bacteroides fragilis POR MEDIO DE LA
TECNICA DE MICRODILUCION.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A ;

CLARA HUERTAS PEREZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	pág.
INTRODUCCION	
a) Antecedentes de resistencia bacteriana	1
b) Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	
- Método de Difusión	
- Método de Dilución	
- Método de Microdilución,	
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
III. FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA	13
IV. OBJETIVOS	17
V. HIPOTESIS	18
VI. MATERIAL Y METODOS	19
VII. RESULTADO	65
VIII. ANALISIS	79
IX. CONCLUSIONES	86
X. BIBLIOGRAFIA	88
XI. APENDICE	98

I INTRODUCCION

ANTECEDENTES DE RESISTENCIA BACTERIANA

Actualmente el uso de agentes antimicrobianos es objeto de análisis continuos debido a que su empleo indiscriminado - en la última década, ha propiciado la aparición de capas bacterianas altamente resistentes a agentes antimicrobianos a los cuales anteriormente eran sensibles. Debido a ésto el establecimiento de la terapia antimicrobiana ha sido radicalmente modificada. Esto se ha confirmado por estudios realizados en donde se demuestra la gran tendencia que existe a incrementar las dosis de antibióticos y a la realización de combinaciones que produzcan sinergismo y por lo tanto acciones más potentes (1,21,70). En las bacterias aerobias la situación o patrones de comportamiento con respecto a los antibióticos más empleados es frecuentemente valorada y por lo tanto más conocida; - en cambio en las bacterias anaerobias por ser necesaria una metodología de aislamiento e identificación más sofisticada, se dificulta el establecimiento de dichos patrones y a medida -- que se conoce la alta resistencia a los antibióticos más empleados, se pone al descubierto la serie de cambios en este - comportamiento.

Durante un período de dos años, en el Hospital de Saint-Joseph de la Universidad Pierre & Marie Curie de Francia (24) fueron aisladas 117 bacterias anaerobias predominando el género Bacteroides sp. con un 49%, el antibiograma reveló que esta especie es resistente a ampicilina (86%), Tetraciclina --- (63%), Clindamicina (20%), Cloranfenicol (2%) y Metronidazol (12%).

Phillips y cols. (73,74) en 1981 demostraron en el Departamento de Microbiología en St. Thoma's Londres que la resistencia antimicrobiana se ha incrementado en un amplio rango - en los microorganismos anaerobios desde 1972 siendo el germen más resistente el grupo Bacteroides fragilis aislado de pacientes con previo tratamiento con antimicrobianos donde solamente se encontró sensible a Matronidazol y Cloranfenicol.

Por otra parte en el Departamento de Medicina y Enfermedades Infecciosas en Boston Massachussetts (21). G. Churchural y cols, estudiaron 250 especies de Bacteroides fragilis - aisladas de procesos infecciosos, obteniendo que no existe -- prácticamente resistencia al Metronidazol y Cloranfenicol.

En un estudio realizado en el Departamento de Microbiología en la Universidad de Hiddinge en Estocolmo Suecia.(45,56) se encontró que la B-lactamasa del grupo Bacteroides fragilis, posee características especiales que hacen que esta cepa sea más resistente a los antibióticos B-lactámicos y que la transferencia de dicha resistencia se debe a plásmidos. La cefoxitina fue el agente más efectivo en dicho grupo.

Tally y cols. (87) realizaron un estudio de 1973 a 1980 donde se demostró que el número de cepas de Bacteroides fragilis resistentes a Clindamicina ha aumentado de 2.6 al 4.5% y que el tratamiento con este antibiótico requiere en algunos casos de más de 256 a 512 mcg/ml. para ser eficaz en cepas altamente resistentes.

Olsson-Liljequist y Nord, realizaron un estudio comparativo (71) entre los Nitroimidazoles: Metronidazol, Ornidazol y Tinidazol, los cuales inhiben al grupo Bacteroides fragilis a concentraciones de 2 mcg/ml o menos siendo el agente más efectivo contra estos gérmenes el Tinidazol.

S.J. Eykyn y I. Phillips (30) estudiaron en el Hospital St. Thoma's en Londres Inglaterra, a pacientes con sepsis anaeróbica les fue administrado Metronidazol intravenoso y oral y posteriormente al tratamiento, menos del 25% de estos pacientes resultaron con infecciones por anaerobios. Debido a su eficacia, el Metronidazol se recomendó en la profilaxis de infecciones después de Histerectomía, apendicectomía y cirugía de colón.

Así mismo, S.P. Bartlett y R.C. Burton (7) publicaron en 1982 un trabajo realizado en el Hospital General de Boston, durante el período de 1960 a 1980 en el cual recopilaron estudios sobre terapia antimicrobiana, llegando a la conclusión que la infección de heridas permanece aún como una complicación grave sobre todo después de cirugías de cavidad abdominal y tracto genital femenino, que los agentes antimicrobia-

nos más efectivos son aquellos que tienen actividad contra -- bacterias anaerobias y que el antibiótico óptimo, está todaví -- a por encontrarse.

PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Como una medida para encontrar una guía exacta y fidedigna sobre los antibióticos que resultan eficaces "in vivo" se procuró idear y perfeccionar pruebas de susceptibilidad "in vitro" que con una interpretación correcta ofrecieran la información necesaria para el establecimiento de la terapéutica más conveniente.

La determinación de la susceptibilidad a los antibióticos es una actividad de aplicación práctica por excelencia -- que altera radicalmente y de manera favorable la evolución de muchas enfermedades infecciosas, dichas pruebas consisten -- esencialmente en poner en contacto al microorganismo que contribuye activamente al proceso infeccioso frente a un antimicrobiano en un medio de cultivo adecuado para determinar el -- grado de inhibición del crecimiento de acuerdo a la concentración de dicho antimicrobiano.

Estas pruebas se dividen en dos tipos:

I. De Difusión

II. De Dilución

La prueba de Difusión es un procedimiento muy aceptado -- que utiliza discos de papel impregnados con un antibiótico, --

se le denomina también Método de Kirby-Bauer (10), y consiste esencialmente en aplicar un disco de papel a la superficie -- inoculada del medio de prueba, como consecuencia de la hume-- dad del medio el antimicrobiano difunde a través de éste de -- acuerdo a sus características fisicoquímicas, originando un -- gradiente de concentración antimicrobiana que cambia gradual-- mente en la zona que rodea al disco, y por lo tanto al aumen-- tar la difusión del antimicrobiano, aumenta la multiplicación bacteriana. Así pues no aparece ningún crecimiento en el -- área donde el antibiótico está presente en concentraciones -- inhibitoras, es decir, cuanto más susceptible es el microorga-- nismo probado mayor es la zona de inhibición.

La técnica de Difusión, generalmente es un procedimiento cualitativo que clasifica a los gérmenes en S (sensibles ó -- susceptibles) y MS (moderadamente susceptibles) ó B (resisten-- tes), el procedimiento es simple y puede adaptarse para pro-- bar casi cualquier antimicrobiano de manera individual o com-- binada se aplica generalmente a los microorganismos de rápido desarrollo y en caso de urgencia el material clínico (como -- L.C.R. Liq. Pleural o liq. peritoneal), puede usarse directa-- mente como inóculo, debido a que es posible detectar fácilmen-- te cultivos mixtos.

Las limitaciones de esta prueba son su falta de interpre-- tación cuantitativa, su ineficacia para microorganismos de -- lento desarrollo y su inexactitud con antibióticos que por -- sus características fisicoquímicas difunden mal.

La técnica de Dilución proporciona resultados cuantitativos para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se usa para determinar la concentración mínima de un antimicrobiano necesaria para inhibir o matar a un microorganismo.

Diluciones seriadas del antimicrobiano se inoculan con el microorganismo y se incuban, donde, la concentración inhibitoria mínima (CIM ó MIC) es la menor concentración sin crecimiento visible.

Esta prueba puede aplicarse para microorganismos de lento desarrollo como en el caso de las bacterias anaerobias - - pues no se ve influida por la velocidad de crecimiento de las mismas.

Es recomendable cuando se requiere vigilar las dosis - - aplicadas al administrar antibióticos cuyos niveles potencialmente tóxicos y terapéuticos están muy próximos entre sí, ó - cuando se requiere el uso prolongado de una antibioterapia que como consecuencia pueda modificar el antibiograma ó la susceptibilidad bacteriana al antimicrobiano empleado. Es útil - - cuando las pruebas de disco tienen resultados inexactos, inseguros ó para confirmar la concentración a la que un microorganismo es susceptible también se emplea para antibióticos difíciles de probar con el disco como polimixinas y aminoglucósidos y especialmente para determinar la actividad bactericida, sinergismo ó antagonismo de diversos antimicrobianos. Para uso de manera rutinaria se puede reducir el número de concen-

traciones probadas a unas pocas las que deben corresponder a niveles fácilmente alcanzables en suero u orina después de la administración de diferentes tipos de dosis de cada antibiótico.

Dentro de la prueba de susceptibilidad por dilución - - existen tres modificaciones:

- A.- Dilución del antibiótico en Agar (ó Método del Replicador de Steers)
- B.- Dilución del Antibiótico en Caldo nutritivo (utilizando tubos de ensayo).
- C.- Microdilución.

En la prueba de Dilución en Agar se emplea el aparato -- descrito por Steers y col (4,57) que permite repetir los inóculos al aplicar 36 cepas de bacterias aisladas al mismo tiempo, en la superficie de una placa de agar que contiene antibiótico.

Este método es recomendable para laboratorios de gran capacidad de trabajo que tienen que probar más de 36 capas bacterianas diferentes, así mismo se ha observado que con este método se obtienen resultados reproducibles (57) además de que puede observarse la heterogenicidad y contaminación antimicrobiana. Las limitaciones de este método consisten principalmente en el medio de cultivo que debido a sus características fisicoquímicas y componentes catiónicos induce variaciones en

la difusibilidad del antibiótico, reflejándose en los resultados de las pruebas. Se ha observado que esta variabilidad de resultados se obtiene aún de un lote a otro y ésto se debe a que no se ha estandarizado esta variable. Actualmente se utiliza el medio Hinton-Mueller por ser el de menor contenido catiónico pero para microorganismos exigentes, nutricionalmente, los suplementos como sangre, vitaminas, soluciones buffer ó cationes como calcio y magnesio también puede producir variaciones significativas. Además existe un factor importante que es la estabilidad del antimicrobiano en las placas de agar, - si estas placas se almacenan por más de dos semanas, puede haber variaciones significativas sobre todo en antibióticos como: penicilinas, ampicilina, cefalosporinas y nitrofurantoina.

La prueba de susceptibilidad por dilución en caldo fue realizada en tubos grandes empleando volúmenes de 1 ml. ó más y no fue muy aceptada de manera rutinaria pues el volumen de material utilizado era considerable, así pues al emplear dispositivos serológicos, se eliminó este obstáculo y la técnica miniaturizada se conoce actualmente como Método de Microdilución.

Este método emplea placas de plástico con caldo nutritivo en el que están disueltos los antibióticos en volúmenes de 0.1 ml. y con dispositivos especiales se inocula y se diluye el antimicrobiano hasta obtener un gradiente de dilución que permite la determinación "in vitro" de la MIC de un agente --

bacteriano.

Esta prueba es un procedimiento económico y técnicamente exacto para uso rutinario (51,66) en el cual las MICs son comparables con los procedimientos de referencia (51,65,76,78,89) y sus resultados reproducibles, se emplea este método tanto por los laboratorios que deben preparar sus propios productos como por los que pueden comprar las placas precongeladas o secas con el antibiótico comercial.

Las placas ya preparadas son de fácil manipulación y pueden prepararse gran número de ellas y congelarlas a -70° hasta su uso, con ésto se asegura la estabilidad máxima de las soluciones antimicrobianas.

El método de Microdilución posee las ventajas de los métodos de difusión de antimicrobianos, sin sus desventajas -- (9). Este método puede mantener estables a los agentes antimicrobianos, posee una mayor difusibilidad ya que utiliza medio líquido, pueden determinarse además de concentraciones mínimas inhibitorias (MICs), las concentraciones bactericidas mínimas que son de utilidad cuando se emplean agentes altamente tóxicos, además de las características antes mencionadas está la facilidad de poder realizar pruebas de susceptibilidad en serie con un costo mínimo, es útil para la mayoría de las bacterias patógenas y para todos los agentes antimicrobianos, los procedimientos empleados son sencillos, los equipos y elementos de trabajo baratos y accesibles. El mé-

todo posee un punto terminal poco influido por el tamaño del inóculo, cuantitativo, fácil de medir y que establece además de los puntos inhibidores, los puntos bactericidas.

Finalmente cabe aclarar que no existe el método ideal - que satisfaga al mismo tiempo todos los requerimientos existentes para la realización de las pruebas de susceptibilidad "in vitro", porque cada uno tiene sus ventajas e inconvenientes.

II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años el incremento de aislamientos de Bacteroides fragilis ha creado la necesidad de establecer un método rápido y confiable para probar la susceptibilidad a antimicrobianos en dichas bacterias.

La determinación exacta del patrón de susceptibilidad puede alterarse por diversos factores tales como las condiciones propias del desarrollo bacteriano y productos de excreción, los componentes del medio y las condiciones de cultivo (78, 88).

Los métodos para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para bacterias anaerobias muestran una extraordinaria variabilidad en los resultados obtenidos, pues se emplean actualmente distintas técnicas orientadas exclusivamente a las bacterias aerobias de rápido crecimiento.

En el presente trabajo se valorarán los patrones de susceptibilidad y resistencia del grupo Bacteroides fragilis aislados de procesos patológicos de pacientes internados en el Hospital General Centro Médico "La Raza", utilizando una variante de la técnica de dilución en caldo denominada: Método-

de Microdilución. Por medio de este método se pretende obtener además de los patrones de comportamiento a los antibióticos más usados en el tratamiento de dichas infecciones, la -- concentración mínima inhibitoria (CMI ó MIC) del grupo B. fragilis, empleando de manera comparativa el método de dilución en Agar (mejor conocido como el que utiliza el Replicador de Steers), utilizando como referencia la concentración que alcanza el antibiótico en los líquidos corporales para realizar el Método de Microdilución de manera cualitativa.

III FUNDAMENTACION DEL TEMA

Debido al gran avance de las técnicas microbiológicas, - el aislamiento de bacterias anaerobias es cada vez más frecuente y se ha observado que son la causa de varios tipos de infección (25).

Los anaerobios se encuentran distribuidos en toda la economía corpórea, por lo que pueden producir infección en cualquier región anatómica del cuerpo si existen las condiciones apropiadas para ello (29).

Así mismo, pueden originar abscesos profundos, complicar heridas penetrantes, producir cuadros de gangrena, así como procesos de tipo septicémico (33).

Están asociados a abscesos cerebrales pulmonares, biliares, de trompas y ovarios, actinomicosis, colitis asociada -- con antibióticos, apendicitis con peritonitis, colecistitis, otitis media crónica, celulitis crepitante y no crepitante, infecciones dentales y orales, endocarditis, endometritis, meningitis, mionecrosis, osteomielitis, empiema (torácico), salpingitis, artritis séptica y sinusitis entre otras (5,6, 34).

De todas las 600 especies de bacterias anaerobias que re

siden tanto en las cavidades como en las mucosas del cuerpo humano, solamente unas pocas son aisladas frecuentemente de infecciones clínicas, éstas incluyen: Bacteroides fragilis, -- Bacteroides melaninogenicus, Fusobacterium nucleatum, Clostridium perfringens, Peptococcus asaccharolyticus y Peptostreptococcus anaerobius. (34 bis)

El primer lugar corresponde a los bacilos anaerobios -- gram negativos que aparecen en más del 50% de las muestras -- clínicas (44). De éstos el grupo Bacteroides fragilis es el más comunmente recuperado de la mayoría de los procesos infecciosos intraabdominales y del aparato genital femenino debido a que constituye la parte principal de la flora normal de colon y se encuentra en menor número en el tracto genital femenino. (22,41). Aunque generalmente no se le encuentra en boca ni en el aparato respiratorio superior, se ha obtenido de muestras clínicas de diversas infecciones en todo el organismo (5).

La importancia patológica del grupo Bacteroides fragilis reside en su capacidad de producir enzimas extracelulares, como lipasas, proteasas, heparinasas y nucleasas entre otras, -- las cuales contribuyen a la formación de abscesos y a la invasión de tejidos (35).

Así mismo, poseen en la parte exterior de su membrana un complejo lipopolisacárido químicamente incompleto que se comporta como endotoxina y que favorece su acción patógena cau--

sando los síndromes clínicos observados (46,55).

Inmunológicamente, las cepas que poseen polisacárido capsular son mucho más patógenas, ya que producen por sí mismas abscesos intraabdominales de tipo septicémico y no necesitan sinergismo de gérmenes aerobios facultativos, disminuyen la respuesta fagocitaria y promueven la formación de anticuerpos específicos (54, 58).

Sin embargo, el grupo Bacteroides fragilis, posee especial importancia porque es más resistente a los agentes antimicrobianos que cualquier otro anaerobio (47).

Su resistencia genética puede ocurrir por los mecanismos tradicionales de transferencia para bacterias gram negativas, como es el caso de la conjugación. Datos recientes han demostrado que existen nuevos mecanismos de transferencia de resistencia que involucran plásmidos libres, que se unen al DNA de la célula donadora, (episomas) y que al ser estimulados con bajos niveles de antimicrobianos, se induce la síntesis de aparatos de transferencia produciéndose activación, excisión ó transposición de esta información genética, dando como resultado la transferencia de información a una bacteria receptora si algunos determinantes adyacentes se unen al elemento-transferibles, éstos también son transferidos, propiciando -- que además de la resistencia a los antibióticos, se obtengan otras características dependiendo de los determinantes transferidos (53,60,61).

Debido a que Bacteroides fragilis posee un recambio importante de material genético, el empleo indiscriminado de diferentes antimicrobianos en el medio hospitalario, condiciona la selección de cepas bacterianas resistentes (31,70). Por lo tanto, debe conocerse el patrón de resistencia de las bacterias aisladas de procesos patológicos pues da un indicio de los cambios producidos en cuanto a la susceptibilidad bacteriana, lo que permitirá utilizar racionalmente el antibiótico más apropiado, optimizando con ello la terapia antimicrobiana para infecciones anaerobias.

Observando la importancia que poseen las bacterias anaerobias, es imprescindible contar con pruebas confiables y rápidas de susceptibilidad antimicrobinas, que permitan mostrar las variaciones de la resistencia y permitir el cambio oportuno de los antibióticos en la terapéutica de los pacientes.

III OBJETIVOS

I. OBJETIVO GENERAL

Determinar los patrones de susceptibilidad y resistencia de cepas del grupo Bacteroides fragilis aisladas de procesos patológicos del Hospital General Centro Médico "La Raza".

II. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer las condiciones necesarias para el empleo del Método de Microdilución en las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para bacterias anaerobias del grupo B. fragilis.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de las bacterias del grupo B. fragilis por medio de la Técnica de Microdilución.
- Evaluar la resistencia a los antibióticos con el Método de Microdilución comparándolo con los métodos tradicionalmente empleados

IV HIPOTESIS

El abuso indiscriminado de ciertos antibióticos propicia que la susceptibilidad de Bacteroides fragilis se modifique - cuantitativa y cualitativamente durante el tratamiento de infecciones causadas por este microorganismo, entonces, las concentraciones empleadas serán ineficaces y ésto se verá reflejado "in vitro" por medio del Método de Microdilución.

VI MATERIAL Y METODOS

MATERIAL

Asas calibradas de 50 mcl

Cajas Petri

Jeringas desechables

10 y 20 ml.

Jarra de Anaerobiosis

capac. 2.5 l. Merck Co.

Matraces Erlenmeyer

1000, 250 y 125 ml.

Matraces volumétricos

250 y 100 ml.

Microplacas

8 por 12 pozos

Pipetas automáticas

100 y 50 mcl

Pipetas "dropper"

50 mcl

Pipetas gradudas

10 a 0.1 ml

Pipetas Pasteur

Porta Asas bacteriológicas

Probetas

100 x 250 ml.

Tubos de ensayo

13 x 100

Tubos con tapón de rosca

13 x 100

Tubos Vacutainer

13 x 100

Vasos de precipitados

250 y 100 ml.

MEDIOS DE CULTIVO

Caldo Agar Hinton-Mueller- Bioxon Lote 13B 1102 Cat 260-1.

Caldo Agar Infusión Cerebro-Corazón (BHI) Bioxon, Loete 105B
9 A 2 Cat 147-1.

Bruceia Gibco diagnostics L-1410250 cat M008600.

Gelosa Chocolate suplementada con Hemina-Menadiona al 0.1% -
Broxon Lote L 615026 Cat 0037.

Gelosa Sangre al 5% supl. con Hemina-Menadiona Bioxon Lote -
10 KB9/t Cat 260-t.

Agar Alcohol-feniletílico Difco Lote 524012.

Medio de Lombard-Dowell

Medio de Transporte Stuart

ANTIBIOTICOS

SALES PURAS DE: carbenicilina, Clindamicina, Cloranfenicol,--
Cefotaxima, Eritromicina, Metronidazol, Penicilina G. y Tetra
cilina.

EQUIPO

Balanza Analítica Mettler Mod. H18

Congelador Revco Mod. US 5575B/L/A

Replicador de Steers

Membrana Millipore Gelman Acrodisc. Product. 4184 0.45 nm.

MATERIAL BIOLÓGICO

Cepas de Enterobacterias aisladas de procesos patológicos

Cepas de B. fragilis aisladas de procesos patológicos

Cepas de referencia:

Bacteroides fragilis CDC 14462

Bacteroides tetatotaomicron ATCC 1041 A.

METODO DE AISLAMIENTO E IDENTIFICACION

Los hallazgos clínicos que sugieren infección por bacterias anaerobias incluyen los siguientes: olor fétido, lesión muy cercana a una superficie mucosa, infección subyacente con necrosis de tejidos y/o deterioro de la irrigación sanguínea, necrosis gangrenosa, absceso (tratamiento antibiótico previo), tromboflebitis séptica, infección por mordeduras ó picaduras, herida penetrante de abdomen o pelvis, infección consecutiva a cirugía gastrointestinal y aborto séptico.

Las muestras provenientes de las cuales se sospecha infección anaeróbica deben obtenerse por medio de aspiración -- del material con aguja y jeringa directamente de los sitios -- activos de la infección, evitando en todo momento la contaminación con flora normal y manteniendo la muestra en condiciones anaerobias, transportarla lo más pronto posible al laboratorio para su procesamiento.

Entre las muestras aceptables para el aislamiento de bacterias anaerobias se encuentran: pus aspirado, líquido cefalo

rraquideo, líquido pleural, líquido pericardico, líquido sinovial, aspirados de absesos, aspirados pulmonares, transtraqueales, y todas aquellas lesiones o heridas profundas que no puedan ser contaminadas con flora normal.

Por lo tanto, las muestras en el Laboratorio se recibieron de tres maneras:

- 1) Jeringas de plástico con la aguja doblada para mantener las condiciones de la muestra y evitar al mínimo el contacto con el oxígeno.
- 2) El caldo peptonado suplementado con vitaminas, envasado con atmósfera parcial de CO_2 (Tubo para hemocultivo "Vacutainer").
- 3) En el medio de transporte Stuart previamente reducido y adicionado con el indicador azul de metileno.

Las muestras enviadas al laboratorio de diferente manera fueron excluidas del estudio. Las muestras que sugieren la posibilidad de hallar anaerobios presentan tres características principales: Olor fétido, Aspecto purulento y Presencia de Gas.

Las muestras se procesaron de la siguiente manera: se realizó el estudio microscópico mediante una tinción de Gram, tanto para apreciar la morfología de los gérmenes como para dar un posible informe preliminar.

Debido a que casi todas las lesiones en las que se en-

cuentra un anaerobio son polimicrobianas y están asociadas -- con un germen aerobio o anaerobio facultativo, se realizaron los cultivos para indentificar a todos los gérmenes presentes.

Se sembró en medios de cultivo enriquecidos, selectivos y diferenciales, tanto para aerobios: Gelosa sangre, Staph 110- ó Agar Sal y Manitol, EMB ó Mc.Conkey, como para anaerobios:- Gelosa Sangre Hemina-Menadiona, Gelosa Sangre Alcohol Feniletílico y Tioglicolato enriquecido.

Para mantener viable la muestra sospechosa de anaerobios, además se utilizó un tubo de tioglicolato enriquecido.

Las bacterias aerobias se aislan fácilmente de los medios utilizados y posteriormente se identifican las especies por medio de pruebas bioquímicas. Estas bacterias por estar implicadas en un proceso infeccioso mixto, deben ser tratadas con un antibiótico eficaz, y para conocer su patrón de comportamiento con respecto a los antibióticos más empleados se realiza el Antibiograma.

Por otra parte, el aislamiento de las bacterias anaerobias requiere de más tiempo pues las incubaciones son de 43 - Hrs., excepto en el género Clostridium y Bacteroides donde se requiere de menor tiempo para su crecimiento. Se debe realizar un mínimo de dos resiembras o subcultivo de colonias a partir de la placa incubada en anaerobiosis, para tener la seguridad de trabajar con anaerobios estrictos. No se debe olvidar mantener un control de las colonias procesadas, por me-

dio de una placa de gelosa sangre Hemina-menadiona incubada - en una atmósfera de CO_2 , para descartar a los posibles microorganismos microaerofílicos o anaerobios facultativos. Al obtenerse la cepa pura se procede a su identificación, así como a su informe presuntivo.

IDENTIFICACION

Al cultivo puro se le realiza una tinción de gram para observar su morfología, en el caso de ser bacilos gramnegativos, teñidos pálidamente y de manera irregular, con extremos redondeados y pleomorfismo moderado, la muestra se resiembr en tioglicolato enriquecido para conservarla y para pruebas posteriores. Para su identificación presuntiva o parcial, la capa se siembra en los medios denominados: "Pruebas presuntivas de Lombard'Dowell" (LD), que son LD, LD esculina, LD yema de huevo y LD bilis (selectivo para el grupo Bacteroides fragilis).

PROCEDIMIENTO DE AISLAMIENTO E IDENTIFICACION
de Bacteroides fragilis.

25

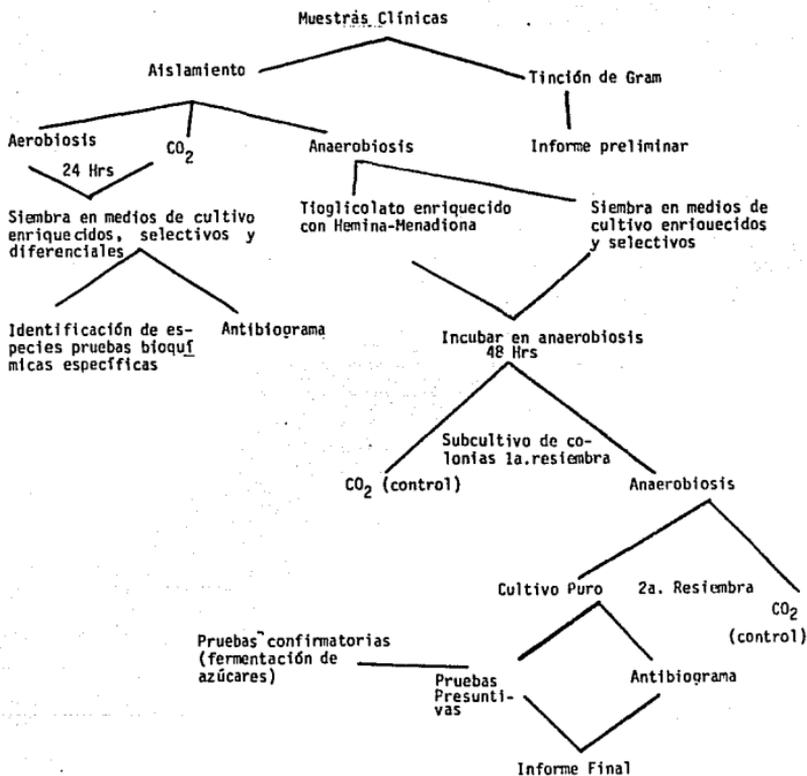


DIAGRAMA I. En este diagrama se muestra un esquema del procedimiento que se llevó a cabo para la identificación de B. fragilis a partir de muestras clínicas.

PROCEDIMIENTO UTILIZADO PARA LA IDENTIFICACION
DE ANAEROBIOS

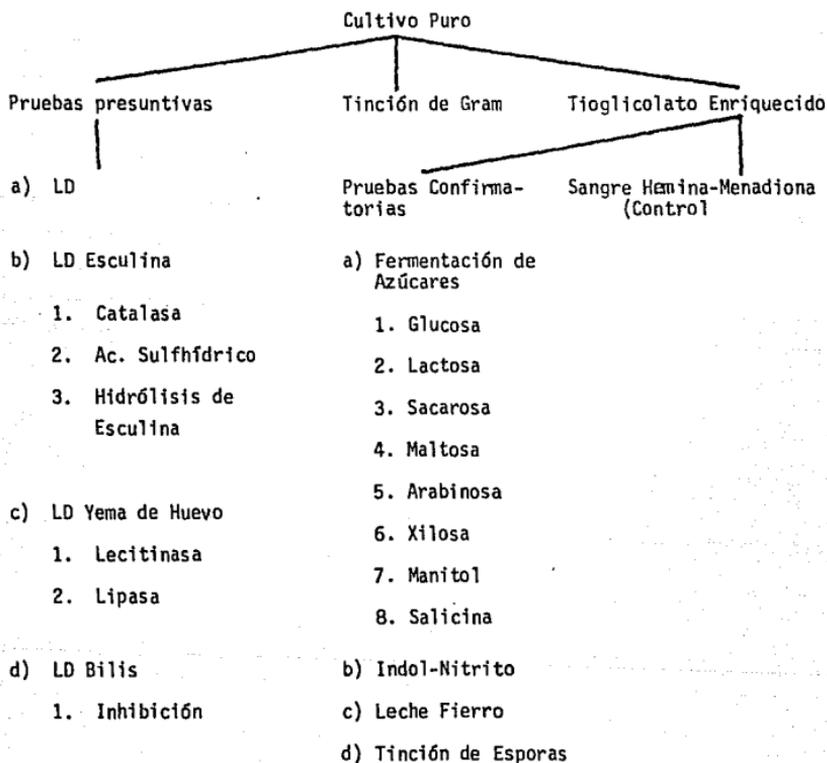


DIAGRAMA II

En este diagrama se muestra el procedimiento que se llevó a cabo para la identificación de bacterias anaerobias.

DIAGRAMA III.- DIAGRAMA QUE MUESTRA EL PROCEDIMIENTO QUE SE LLEVO A CABO PARA LA IDENTIFICACION DE B. fragilis.

INTERPRETACION DE LAS PRUEBAS PRESUNTIVAS

Las pruebas presuntivas de LOMBARD-DOWEL () son de gran utilidad porque permiten una identificación más rápida ya que se pueden observar varias características bioquímicas.

AGAR LD. Este medio se utiliza como testigo para comparar el crecimiento de los microorganismos con el crecimiento observable en el medio LD BILIS.

LD ESCULINA. Este medio se utiliza para detectar la Hidrólisis de la esculina, la producción de ácido sulfhídrico y la actividad de la catalasa (ver apéndice).

* Hidrólisis de la esculina. La prueba positiva se manifiesta por la presencia de un color café rojizo oscuro alrededor de las colonias.

* Producción de Acido Sulfhídrico. La prueba positiva es el ennegrecimiento de las colonias, al sacar las placas de la jarra, éste desaparece rápidamente al exponerse las colonias al aire.

* Catalasa. Se expone la placa al aire por 30 min. se agrega una gota de peróxido de hidrógeno al 3% sobre el crecimiento. La prueba positiva es la presencia de burbujas.

LD YEMA DE HUEVO. Este medio permite la detección de la lecitinasa y lipasa.

* Lecitinasa. La prueba positiva se manifiesta por la aparición de un halo blanquecino alrededor de las colonias.

El color original del medio es amarillo claro.

*Lipasa. La prueba positiva se manifiesta por la apariencia perlada sobre la colonia con brillo iridicente. Se puede agregar una gota de solución saturada de sulfato de cobre, la presencia de color azul y verdoso indica la liberación de ácidos grasos de cadena corta.

LD BILIS. Este medio debido a su contenido de bilis es un medio selectivo y diferencial, especialmente útil para la identificación de Bacteroides fragilis. La identificación se hace comparando el desarrollo de los microorganismos en este medio con el correspondiente al medio LD que se toma como testigo. Si el crecimiento es mayor o igual se denota por la letra E. Si el crecimiento es menor, se denota por la letra I. Puede existir la formación de un precipitado blanco insoluble de bajo crecimiento característico de Bacteroides fragilis. Una vez interpretadas las pruebas presuntivas, se recurre a la interpretación de los resultados basándose en las tablas que se muestran más adelante.

La identificación confirmatoria se llevó a cabo como sigue: a partir del tubo de tioglicolato enriquecido, se sembró la cepa en sangre hemina-menadiona incubándose tanto en anaerobiosis como en aerobiosis para el control de la misma.

Las pruebas confirmatorias fueron:

1. Fermentación de azúcares. Entre ellos se probaron a la glucosa lactosa maltosa, sacarosa, arabinosa, --

xilosa, manitol y salicina. (ver apéndice).

INTERPRETACION DE LAS PRUEBAS CONFIRMATORIAS

Estas pruebas sirven para determinar el género y la especie del microorganismo, llegando a la identificación total -- del mismo. Su interpretación se hace como sigue:

*Fermentación de Carbohidratos. La prueba positiva se manifiesta cuando el indicador que en este caso es el azul de bromotimol, vira a un color amarillo o naranja.

*Indol Nitrito. Este medio se utiliza para detectar la producción de indol y la reducción de los nitratos. Se divide el tubo en dos partes al momento de hacer las pruebas.

* Producción de Indol. Se puede emplear el reactivo de Kovac o de Ehrlich, se agregan unas gotas sobre el tubo, la prueba positiva consiste en el desarrollo de un anillo de color rojo.

*Reducción de Nitratos. Se agrega 1 ml. de Acido sulfanílico y 1 ml. de alfa-naftilamina. La prueba positiva se manifiesta por la aparición de un color rojo. En caso contrario se agrega una pizca de polvo de zinc. si continúa sin cambio de color, la prueba se considera positiva, pero si existe la aparición de un color rojo, la prueba es negativa.

METODO DE ANAEROBIOSIS UTILIZADO

El sistema Gas-Pack es la forma más común en los Laboratorios clínicos para producir anaerobiosis independiente de hidrógeno-dióxido de carbono. Este procedimiento elimina la necesidad de utilizar cilindros de gas, bombas de vacío, válvulas y calibradores. Usa la jarra anaeróbica común hecha de resina de policarbonato con una tapa anaeróbica provista de un relleno de goma que cierra a presión, una agarradera y un portacatalizador que contiene gránulos de alúmina recubiertos de paladio al 0.5%. Este catalizador es activo a temperatura ambiente. El sistema emplea un sobre generador de hidróxido-dióxido de carbono, así como un indicador de anaerobiosis de azul de metileno.

El sobre generador contiene una tableta de borhidruro de sodio que produce hidrógeno y una tableta de ácido cítrico + bicarbonato de sodio que produce dióxido de carbono, así como un indicador de anaerobiosis de azul de metileno. El sobre se activa por la adición de agua, la cual pasa a través de una serie de canales hacia un papel filtro. Este papel regula el flujo del agua hacia las tabletas generadoras de gas, proporcionando una liberación controlada de gases.

El hidrógeno generado a partir de la tableta de borhidruro de sodio, se combina en presencia del catalizador de paladio con el oxígeno presente en la jarra para formar agua.

El papel filtro detiene la introducción de agua dentro del compartimiento donde se encuentran las tabletas mientras se coloca la tapa sobre la jarra.

Aproximadamente se produce de 4-7% de dióxido de carbono a partir de la tableta de ácido cítrico + bicarbonato de sodio. Este sirve para estimular el crecimiento de algunos anaerobios que lo requieren.

Indicador.- Las condiciones de la anaerobiosis deben ser controladas mediante un indicador de potencial óxido-reducción. Este indicador está contenido en una bolsita de teflón unida a una tarjeta revestida de polietileno. La bolsita contiene un mililitro de solución indicadora compuesta por partes iguales de azul de metileno al 0.02%, dextrosa al 4% e hidroximetilaminometano al 60%. Puede esterilizarse antes de unirle a la tarjeta con óxido de etileno (1.5 Hrs a 20psi).

El azul de metileno es azul cuando está oxidado e incoloro cuando está reducido. El indicador cambia gradualmente de azul a incoloro a medida que el oxígeno dentro de la jarra se utiliza. Esto se produce durante varias horas.

Catalizador.- Es importante mantener las tapas de las jarras anaeróbicas limpias y secas cuando no se usan, para prevenir la inactivación del catalizador. Este puede inactivarse con gases como ácido sulfhídrico, cloro, dióxido de azufre, etc., por lo que los gránulos deben reemplazarse cada vez que la jarra se usa, con gránulos nuevos o "rejuvenecidos". La

actividad del catalizador puede restaurarse calentando los --
gránulos en un horno a 160 - 170° durante dos horas. Después-
se deben guardar en un recipiente limpio y seco hasta usarse.

El sistema Gas-Pack se usa de la siguiente manera:

- 1.- Quitar el catalizador usado de la tapa de la jarra y reemplazarlo con igual cantidad de gránulos nuevos o precalentados.
- 2.- Colocar el material e incubar y el indicador de azul de metileno en la jarra.
- 3.- Pipetear, la cantidad indicada en cada caso de agua en el sobre generador.
- 4.- Colocar rápidamente la tapa sobre la jarra. Apretar con el tornillo hasta asegurarse que se pueda sostener con la mano.
- 5.- Colocar la jarra en la estufa de incubación.

Tabla I.- Tabla de referencia que muestra el comportamiento -- bioquímico de Bacteroides spp y Fusobacterium spp en diferentes medios presuntivos utilizados en el CDC de Atlanta, - - - Georgia. Las pruebas presuntivas de Lombard-Dowell solamente comprenden la placa 1, los demás medios no se emplearon en es te estudio.

Tomada de Dowell y Lombard, 1981.

Tabla II.- Tabla de referencia que muestra el comportamiento bioquímico de Clostridium sp en diferentes medios presuntivos utilizados en el CDC de Atlanta, Georgia. Las pruebas presuntivas de Lombard-Dowell solamente comprenden la placa 1, los demás medios no se emplearon en este estudio.

Tomada de Dowell y Lombard, 1981.

T A B L A No. II

REACCIONES DE CLOSTRIDIUM spp EN LOS MEDIOS PRESUNTIVOS DE LOMBARD Y DOWELL (LD)
Y COC

E S P E C I E S	No. de Cepas	P L A C A 1							P L A C A 2				P L A C A 3			
		Indol	Derivada de Indol	Hidrólisis de Esculina	H ₂ S	Catalasa	Lecitinas	Lipasa	Crecimiento de Agar bilis	Fermentación glucosa	Hidrólisis de almidón	Digestión de la leche	DNA sa	Hidrólisis de gelatina	Fermentación manitol	Fermentación lactosa
Clostridium bifementans	30	+	-	+	-	-	+	E	+	-	+	-	+	-	-	-
Clostridium butyricum	9	-	-	+	-	-	+	E	+	-	-	-	+	-	-	-
Clostridium cadaveris	7	+	-	+	-	-	-	E	+	-	-	-	+	-	-	-
Clostridium clostridiiforme	13	-+	-	+	-	-	-	E	+	-	-	-	+	-	+	+
Clostridium difficile	59	-	-	+	-	-	-	E	+	-	-	-	+	-	-	-
Clostridium histolyticum	13	-	-	+	-	-	-	E	+	-	-	-	+	-	-	-
Clostridium innocuum	24	-	-	+	-	-	-	E	+	-	-	-	+	-	V	-
Clostridium limosum	5	-	-	-	-	-	+	E	-	-	-	-	-	-	-	-
Clostridium malenominatum	4	+	-	-	-	-	-	E	-	-	-	V	-	-	-	-
Clostridium paraperrfringens	2	-	-	+	-	-	+	E	+	+	-	-	-	-	+	-
Clostridium paraputrificum	7	-	-	+	-	-	-	E	+	+	-	-	-	-	-	-
Clostridium perenne	2	-	-	+	-	-	-	E	+	-	-	-	-	-	+	-
Clostridium perfringens	207	-	-	V	-	-	+	E	+	V	-	-	+	-	+	+
Clostridium ramosum	17	-	-	+	-	-	-	E	+	-	-	-	+	-	+	+
Clostridium septicum	33	-	-	+	-	-	-	E	+	-	+	-	+	-	+	-
Clostridium sordellii	25	+	-	+	+	-	+	E	+	-	-	-	+	-	-	-
Clostridium sphenoides	10	+	-	+	-	-	-	E	+	-	-	V	-	+	+	+
Clostridium sporogenes	55	-	+	+	-	-	-	E	+	-	+	-	+	-	-	-
Clostridium subterminale	14	-	-	-	V	-	+	E	-	-	+	-	+	-	-	-
Clostridium symbiosum	6	-	-	-	-	-	-	E	+	-	-	-	-	+	-	-
Clostridium tertium	13	-	-	+	-	-	-	E	+	-	-	+	-	+	+	-
Clostridium tetani	3-	V-	-	V	-	-	-	E	-	-	-	+	+	-	-	-

+ = Positivo en 90%
- = Negativo en 90%
+- = la mayoría positiva

+- = la mayoría negativa
E = crecimiento igual al control
sin bilis.
E' = crecimiento igual con inhibición en algunas cepas

Tabla III.- Tabla de referencia que muestra el comportamiento bioquímico de los cocos anaeróbicos en diferentes medios presuntivos utilizados en el CDC de Atlanta, Georgia. Las pruebas presuntivas de Lombard-Dowell solamente comprenden la placa 1, los demás medios no se emplearon en este estudio.

Tomada de Dowell y Lombard, 1981.

T A B L A No. III

REACCIONES DE COCOS ANAEROBIOS EN LOS MEDIOS PRESUNTIVOS DE LOMBARD Y DOWELL (LD)
Y CDC

E S P E C I E S	No. de cepas	Indol	Derivado del Indol	Hidrólisis de escuina	H ₂ S	Catalasa	Lecitinas	Crecimiento agar bilis	Fermentación glucosa	Hidrólisis de almidón	Digestión de la leche	DNA asa	Hidrólisis de gelatina	Fermentación manitol	Fermentación de lactosa	Fermentación ramnosa
PEPTOCOCCUS:																
P. asaccharolyticus	16	+	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
P. magnus	17	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
P. prevotii	7	-	-	-	-	V	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-
P. saccharolyticus	2	-	-	-	-	+	-	-	V	+	-	-	-	-	-	-
PEPTOSTREPTOCOCCUS																
P. anaerobius	21	-	-	-	-	-	-	-	1	-+	-	-	-	-	-	-
P. micros	10	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
STREPTOCOCCUS																
S. informadius	9	-	-	+	-	-	-	-	1	+	-	-	-	-	-	+
Veillonella:																
V. parvula	6	-	-	-	-	-	-+	-	1	-	-	-	-	-	-	-

+ = Positivo en 90%
 - = Negativo en 90%
 -+ = la mayoría negativa
 1 = inhibición de crecimiento
 V = Variable

(Dowell y Lombard, 1981)

Tabla IV.- Tabla de referencia que muestra el comportamiento bioquímico de los bacilos gram positivos no esporulados en diferentes medios presuntivos utilizados en el CDC de Atlanta, Georgia. Las pruebas presuntivas de Lombard-Dowell solamente comprenden la placa 1, los demás medios no se emplearon en este estudio.

Tomada de Dowell y Lombard, 1981.

T A B L A No. IV
 REACCIONES DE BACILOS GRAM POSITIVOS NO ESPORULADOS EN LOS MEDIOS PRESUNTIVOS DE LOMBARD
 DOWEL (LD) CDC

E S P E C I E S	No. de cepas	P L A C A 1							P L A C A 2				P L A C A 3			
		Indol Derivado de Indol	Hidrólisis de Esculina	H 2	S	Catalasa	Lecitinasa	Lipasa	Crecimiento agar bilis	Fermentación glucosa	Hidrólisis de almidón	Digestión de la leche	DNA asa	Hidrólisis de gelatina	Fermentación Manitol	Fermentación de lactosa
ACTINOMYCES:																
A. bovis	6	-	-	+	-	-	-	1	-	+	-	-	-	-	-	-
A. israelii	6	-	-	+	-	-	-	1	+	-	-	-	-	-	-	-
A. odontolyticus	14	-	-	V-1	-	-	-	1	V	-	-	-	-	-	-	-
ARACHNIA:																
A. propionica	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
BIFIDOBACTERIUM																
B. eriksonii	11	-	-	+	-	-	-	V	+	V	-	-	-	+	+	-
EUBACTERIUM																
E. alactolyticum	4	-	-	1	-	-	-	1	V	-	-	-	-	-	-	-
E. lentum	12	-	-	-	-	-	-	E	+	-	-	-	-	-	-	-
E. limosum	8	-	-	-	-	-	-	E	+	-	-	-	-	+	-	-
E. moniliforme	5	-	-	-	-	-	-	E	+	-	-	-	-	-	-	-
PROPIONIBACTERIUM																
P. acnes	45	+	-	-	-	+	+	V	E	-	-	+	-	+	+	-
P. avidium	3	-	-	+	-	+	-	E	+	-	-	-	+	-	-	-
P. granulosum	4	-	-	-	-	-	-	V	E	-	-	+	-	-	-	-

+ = Positivo en 90%
 - = Negativo en 90%
 +- = la mayoría positivo
 -+ = la mayoría negativa

V = Variable
 1 = Inhibición de crecimiento
 E = Crecimiento igual al control sin bilis
 E' = Crecimiento igual con inhibición en algunas cepas

Tabla V.- Tabla de referencia que muestra las diferentes reacciones de Bacteroides spp y Fusobacterium spp en los medios confirmatorios. Las cepas se probaron en estos medios después de su aislamiento en sangre hemina-menadiona.

Tomada de Dowell y col, 1978 pág. 29

T A B L A No. V

CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE CATEROIDES Y FUSOBACTERIUM Sp EN LOS MEDIOS CONFIRMATORIOS
CDC

ESPECIES	No. de cepas	Crecimiento aeróbico	Gelosa sangre color negras	Movilidad	Glucosa	Manitol	Lactosa	Sacarosa	Maltosa	Salicina	Xilosa	Arabinosa	Reducción de Nitratos	Hidról esculina	Hidról gelatina	Indol	Leche
BACTEROIDES																	
<i>B. corrodens</i>	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	NC
CDC Grupo F-1	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
CDC Grupo F-2	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	NC
<i>B. Clostridiformis</i> ssp girans	7	-	-	+	A	-	A	A	A	A	A	A	-	+	-	-	C
<i>B. fragilis</i> ssp distasonis**	11	-	-	-	A	-	A	A	A	V	A	A	-	+	-	-	C
<i>B. fragilis</i> spp fragilis**	376	-	-	-	A	-	A	A	A	-	A	-	-	+	-	-	C
<i>B. fragilis</i> ssp thetaiotaomicron	84	-	-	-	A	-	A	A	V	A	A	A	-	+	-	+	(C)
<i>B. fragilis</i> ssp vulgatus**	46	-	-	-	A	-	A	A	A	V	A	A	-	+	-	-	(C)
<i>B. melaninogenicus</i> ssp asaccharolyticus	12	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	V	CD
<i>B. melaninogenicus</i> ss intermedius	5	-	+	-	A	-	-	V	V	+	-	-	+	-	+	+	CD
FUSOBACTERIUM																	
<i>F. mortiferum</i>	20	-	-	-	A	-	A	A	A	A-	-	-	-	+	-	-	(CG)
<i>F. necrophorum</i>	46	-	-	-	A	-	-	-	A-	-	-	-	-	-	-	+	NC
<i>F. nucleatum</i>	76	-	-	-	A-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	NC

+ = Reacciones positivas en el 90-100% de las cepas
 - = Reacciones negativas en el 90-100% de las cepas
 un índice sobre escrito indica que la reacción es en el 11-25% de las cepas
 V = Reacción variable
 () = Variable
 A = Acido (Color amarillo con indicador azul de bromotimo, pH menor a 6.0)
 C = Coagulado
 D = Digerido

G= gas
 NC= No coagulación
 A= Acido Acético
 P= Acido propiónico
 IB= Acido isobutírico
 B= Acido butírico
 IV= Acido isovalérico
 L= Acido láctico
 S= Acido succínico

T A B L A No. VI
 CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE CLOSTRIDIUM sp EN LOS MEDIOS CONFIRMATORIOS

ESPECIES	No. de cepas	Crecimiento aeróbico	Esporas	Movilidad	Lecitinasas	Lipasa	Glucosa	Manitol	Lactosa	Sacarosa	Maltosa	Salicina	Glicerol	Xilosa	Arabinosa	Red de nitratos	Indol	Hidrol Esculina	Hidrol Gelatina	Leche	Toxigenicidad en ratón
<i>C. bifermentans</i>	119	-	ST	+	+	-	A	-	-	-	A	V	V	-	-	-	+	V	+	CD	-
<i>C. botulinum</i> A	24	-	ST	+	+	+	A	-	-	-	A-	-A	V	-	-	-	-	+	+	CD	+
B	14	-	ST	+	+	+	A	-	-	-A	A	-A	-A	-	-	-	-	+	+	(C)(D)	+
C	14	-	ST	+	+	+	A	-	-	-A	V	-	-	-	-	+	-	+	+	(NC)	C
D	5	-	ST	+	+	+	A	-	-	-	V	-	V	-	-	-	-	V	V	NC	+
E	10	-	ST	+	+	+	A	-	-	A	V	-	V	-	-	-	-	V	V	NC	+
F	7	-	ST	+	+	+	A	-	-	V	A	V	V	-	-	-	-	V	V	(C)(D)	+
<i>C. butyricum</i>	74	-	ST	+	+	+	A	-	-	A	A	A	A-	A	A-	+	+	+	+	CG	+
<i>C. cadaveris</i> +	45	-	T	+	+	+	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	CG	+
<i>C. chauvoei</i>	13	-	ST	+	+	+	A	-	A	A-	A	-	-	-	-	+	+	+	+	(C)	V
<i>C. difficile</i>	10	-	ST	+	+	+	A	A	-	-	-	A-	-	V	-	-	+	+	+	NC	V
<i>C. histolyticum</i>	6	-	ST	+	+	+	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	CD	V
<i>C. innocuum</i>	84	-	T	+	+	+	A	A	-A	A-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	NC	-
<i>C. limosum</i> +	47	-	ST	+	+	+	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	CD	-
<i>C. novyi</i> A	13	-	ST	+	+	+	A	-	-	-	A-	-	A	-	-	+	-	V	+	(C)(G)	V
<i>C. paraputrificum</i>	29	-	T	+	+	+	A	-	A	A-	A	A	-	-	-	V	+	+	+	(C)(G)	-
<i>C. perfringens</i>	678	-	ST	+	+	+	A	-	A	A	A	V	A	-	-	+	-	V	+	CG	V
<i>C. ramosum</i> +	61	-	T	+	+	+	A	A	A	A	A	-	-	-	-	-	-	+	+	(C)(G)	+
<i>C. septicum</i>	83	-	ST	+	+	+	A	-	A	A	A	A	-	-	-	+	+	+	+	(C)(G)	+
<i>C. sordellii</i>	88	-	ST	+	+	+	A	-	A	A	A	-	A-	-	-	-	-	+	+	CD	-
<i>C. sphenoides</i>	9	-	ST	+	+	+	A	V	A-	V	A-	A	-A	A-	A-	+	+	+	+	(C)(G)	-
<i>C. sporogenes</i>	132	-	ST	+	+	+	A	-	-	-A	-	V	V	-	-	-	-	+	+	(C)(G)	-
<i>C. subterminale</i>	53	-	ST	+	+	+	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	CD	-
<i>C. tertium</i>	103	+	T	+	+	+	A	A	A	A	A	-	-	A-	-	+	-	+	+	(C)(G)	+
<i>C. tetani</i>	52	-	T	+	+	+	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	+	NC	+

**Tabla VII.- Tabla de referencia que muestra las diferentes --
reacciones de los cocos anaeróbicos en los medios confirmato-
rios. Las cepas se probaron en estos medios después de su --
aislamiento en sangre hemina-menadiona.**

Tomada de Dowell y col, 1978 pág. 34.

T A B L A No. VII

CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE COCOS ANAEROBICOS EN LOS MEDIOS CONFIRMATORIOS

GRUPOS	No. de cepas	Tinción de Gram	Tolerancia al oxígeno	Movilidad	Glucosa	Manitol	Lactosa	Sacarosa	Maltosa	Salicina	Glicerol	Xilosa	Arabinosa	Hidrol Esculina	Hidrol Gelatina	Reacción de Nitratos	Indol	Leche	Catalasa
<u>Peptococcus</u>																			
<u>Peptococcus</u> CDC grupo 2	10	+	An	-	A	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	+	-	NC	+
<u>Peptostreptococcus</u>																			
<u>Peptostreptococcus</u> CDC gpo. 1	23	+	An	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	NC	-
<u>Peptostreptococcus</u> CDC gpo. 2	83	+	An	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NC	-
<u>Peptostreptococcus</u> CDC gpo. 3	42	+	An	-	A	-A	-A	V	A-	A-	-	-	-	-	-	+	-	NC	-
<u>Peptostreptococcus</u> CDC gpo. 4**	5	+	An	-	A	V	A	A	A	A	-	V	V	+	-	-	-	(C)	-
<u>Sarcina</u>																			
<u>Sarcina</u> sp	12	+	An	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	NC	-
<u>Veillonella alcalicens</u>																			
<u>Veillonella alcalicens</u>	14	-	An	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	NC	+
<u>Veillonella parvula</u>	7	-	An	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NC	-
<u>Veillonella</u> (tbl. grupo 3)	13	-	An	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NC	-

+ = Positiva
 - = Negativa
 () = Variable
 V = Reacción variable

A = Reacción ácida
 C = Coagulación
 NC = No coagulación
 An = Anaerobico

** = Las características de Peptostreptococcus CDC grupo 4 están más relacionadas AL GENERO Sirenotstreptococcus que al género Peptostreptococcus de acuerdo al esquema descrito por Rugosa M. (peptococcaceae) una nueva familia que incluye cocos anaerobicos Gram positivos de los géneros Peptococcus y ppl.

Tabla VIII:- Tabla de referencia que muestra las diferentes reacciones de los bacilos gram positivos no esporulados en los medios confirmatorios. Las cepas se probaron en estos medios después de su aislamiento en sangre hemina-menadiona.

Tomada de Dowell y col, 1978 pág. 32

ANTIBIOGRAMA

La sensibilidad a los antimicrobianos se realizó por el Método de Microdilución, por el Método de Dilución en Placa - utilizando el Replicador de Steers y como método de referencia Dilución en tubo.

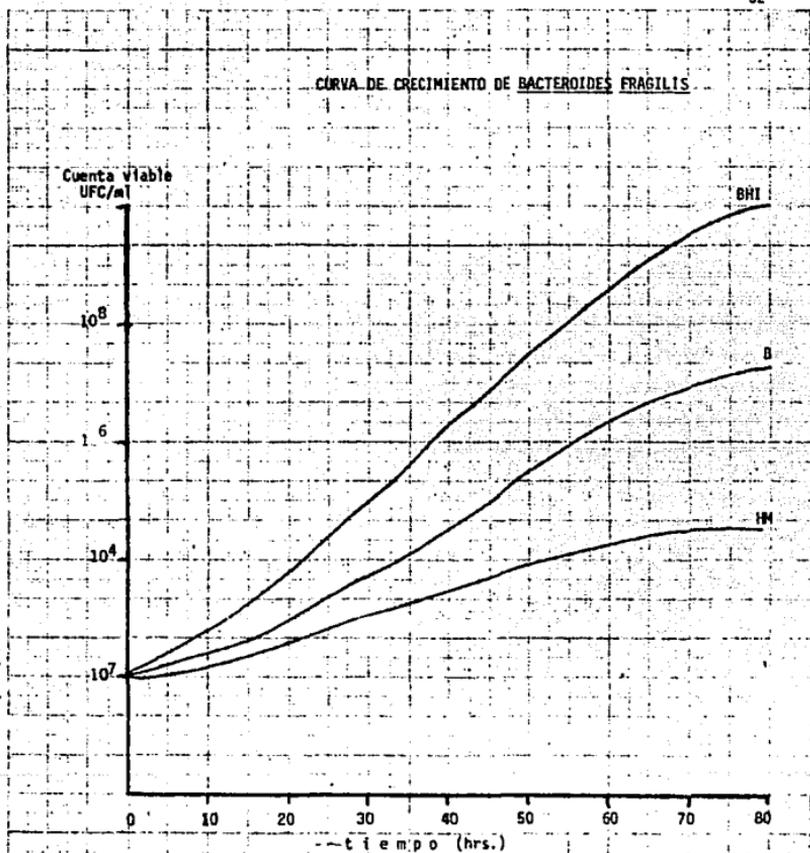
METODO DE MICRODILUCION

La prueba de susceptibilidad por Microdilución, es una - variante del procedimiento de Dilución en Caldo (utilizado en este trabajo como Método de Referencia) que originalmente fue empleado para probar bacterias aerobias y anaerobias facultativas.

Por medio de esta prueba se determina la concentración - mínima inhibitoria (MIC) que es la menor concentración de un antimicrobiano necesaria para inhibir o matar a un microorganismo.

* Medio de Cultivo.

Debido a que Bacteroides fragilis es un microorganismo - exigente nutricionalmente, se probaron tres medios de cultivo: Caldo Brucella, Caldo Infusión Cerebro-Corazón (BHI) y Caldo-Hinton-Mueller, adicionados con una solución de Himna-Menadiona, se realizó la curva de crecimiento y se determinó utilizar el medio de Cultivo BHI (Gráfica I).



Gráfica 1.- Curva de crecimiento utilizando los medios de cultivo HM-Hinton Mueller
 B = Bruella BHI = Infusión cerebro-corazón utilizados comúnmente como
 medios de soporte para antibiogramas.

ANTIMICROBIANOS USADOS EN EL ESTUDIO

ANTIMICROBIANO	POTENCIA BIOLÓGICA	SOLVENTE
Cefotaxima		Agua
Clindamicina	100.0%	Agua
Cloranfenicol	99.0%	Etol absoluto más agua
Carbenicilina	83.5%	Agua
Eritromicina		Metanol más buffer fosfatos 0.1M pH 8
Metronidazol	100.0%	Agua Caliente
Penicilina	1670 u/mg	Agua
Tetraciclina	100.0%	Agua caliente

TABLA IX. En este cuadro se muestran los antimicrobianos que se utilizaron en el estudio, así como su potencia biológica y su solvente.

**CALCULO DE LAS CONCENTRACIONES FINALES DE ANTIMICROBIANOS EMPLEADAS
PARA EL METODO DE MICRODILUCION**

Solución Antimicrobiana		+ Caldo Nutritivo estéril Vol.(ml.)	Conc. Intermedia mcg/ml	Concentración Final	
Concentración mcg/ml	Volumen			diluc. 1:2 mcg/ml	Microplacas Conc. Log ₂
1000	6.4	18.6	256	128	7
				64	6
				32	5
				16	4
				8	3
				4	2
				2	1
				1	0
				0.5	-1
				0.25	-2
				0.12	-3

Tabla X, Cuadro que muestra esquemáticamente el cálculo para obtener las concentraciones de antimicrobianos para el Método de Microdilución. La primera concentración es la de la Solución de Trabajo. Las concentraciones siguientes se obtienen en la realización del Método.

CONCENTRACIONES FINALES DE ANTIMICROBIANOS EMPLEADAS EN EL
MÉTODO DE MICRODILUCIÓN

Agente Antimicrobiano	Concentración mcq/ml											
	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	---
Pozo No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Carbenicilina			X									
Cefotaxima ^a												
Clindamicina										X		
Cloranfenicol						X						
Eritromicina								X				
Metronidazol ^a												
Penicilina				X								
Tetraciclina										X		

TABLA XI. Cuadro que muestra las concentraciones finales de antimicrobiano al aplicar el Método de Microdilución.

X Representa la MIC teórica encontrada en las cepas de Bacteroides fragilis (tomadas del Lennette, Microbiología Clínica, ed. 3).

e = MIC no reportado en literatura.

METODO UTILIZADO PARA EL ANTIBIOGRAMA

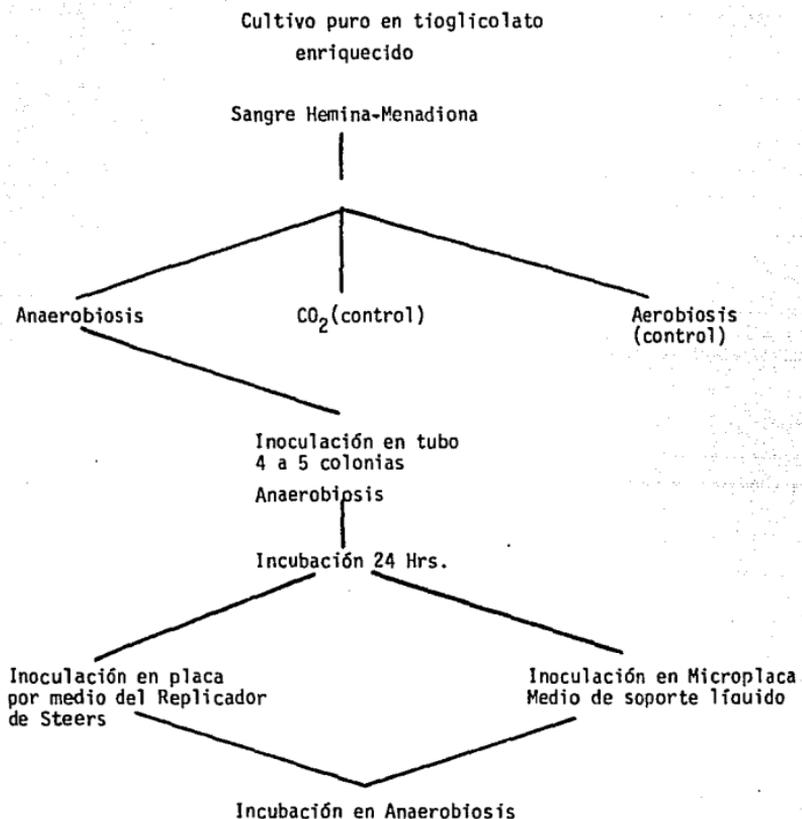


Diagrama IV. En este diagrama se muestra un esquema del procedimiento que se llevó a cabo para el antibiograma de los microorganismos.

* Preparación de Antibióticos

Para preparar las soluciones de antibióticos se tomó en consideración su potencia biológica y su capacidad de disolución. La cantidad real de la sal que se utilizó se calculó -- por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad Real} = \frac{\text{Concentración en mcg. del antibiótico} \times 100}{\text{Potencia Biológica}}$$

Los antibióticos usados se resumen en la Tabla IX.

Las soluciones Stock se prepararon a una concentración - de 1000 mcg/ml excepto la Carbenicilina que se preparó a - - 10 000 mcg/ml. Posteriormente se esterilizaron por medio de filtración con membranas y se guardaron en congelación a - - -20°C. Para preparar la solución de trabajo del Antimicrobia no se tomó en cuenta la concentración de la solución Stock y se diluyó hasta una concentración final de 256 mcg/ml.

* Preparación del inóculo.

A partir de tioglicolato enriquecido se sembró la cepa en sangre Hemina-Menadiona, incubándose tanto en aerobiosis como en anaerobiosis para tener un control de la misma. Después de la incubación se inocularon de 4 a 5 colonias de la placa anaeróbica de Agar Sangre Hemina-Menadiona en un tubo con Caldo BHI y se incubó en anaerobiosis por 24 Hrs. Al cabo de este tiempo la suspensión bacteriana se diluyó 1:20 y el inóculo resultante se utilizó para realizar las pruebas.

* Inoculación de la Microplaca

Las microplacas están fabricadas de material plástico y contienen ocho por doce hileras de pequeños pocitos con capacidad de 0.1 ml. A cada pocito (excepto a la primera hilera) se añadieron volúmenes de caldo de 50 mcl (0.05ml) mediante una pipeta dispensadora semiautomática (pipetas dropper).

A la primera hilera se le añade la solución de trabajo del antimicrobiano y ésta se transfiere del primer pozo al segundo por medio de asas calibradas de 50 mcl., luego el contenido de los pozos se mezcla girando las asas y se transfieren 50 mcl. al siguiente pozo, este proceso continúa para preparar la serie con la dilución deseada de cada antimicrobiano hasta el penúltimo pozo, al que se eliminan 50 mcl. El último pozo no recibe antimicrobiano y sirve de control de crecimiento o esterilidad.

Finalmente se adicionan 50 mcl de inóculo bacteriano estandarizado con una densidad final de 10^6 a 10^5 ufc/ml a cada pocito con una pipeta semiautomática. (Gráfica II).

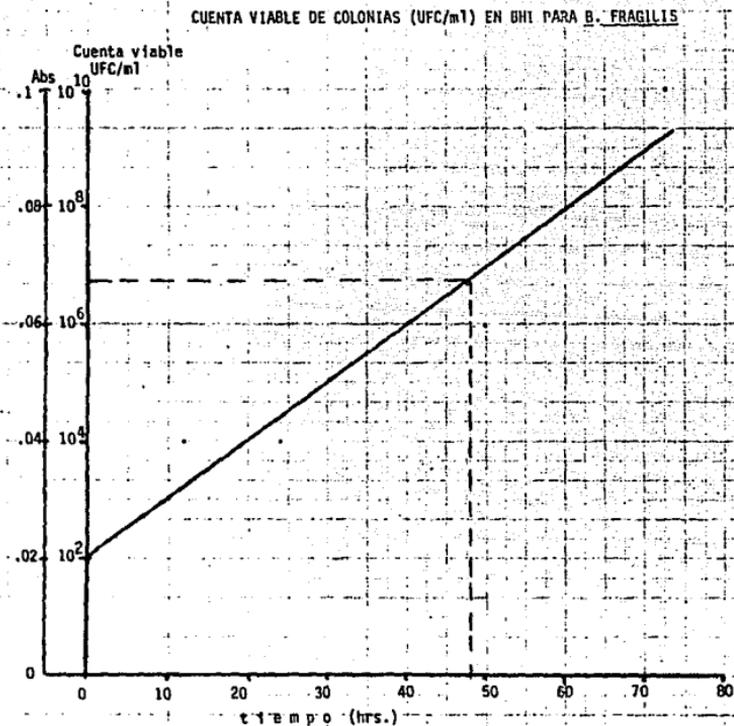
* Incubación de las microplacas.

Después de la inoculación de las microplacas éstas se cubren con una película de papel plástico para reducir la evaporación y contaminantes, se introducen en la Jarra de Anaerobiosis, donde la atmósfera es producida por el sistema Anaerocult de Merck Co. ó Gas-Pack. La incubación se realiza a --- $35-37^{\circ}$ durante 24 Hrs. y se leen los resultados.

* Lecturas e Interpretación.

Después de 24 Hrs. de incubación las placas se examinaron con una lámpara de luz blanca. El punto terminal MIC se tomó como la menor concentración de Antimicrobiano en la - - - cual la bacteria no mostró crecimiento.

El criterio de crecimiento se tomó de acuerdo a las características de crecimiento de la bacteria en los pozos de control (sin antimicrobiano)..



Gráfica II. Curva de crecimiento de B. fragilis utilizando como medio de soporte el caldo BHI, que muestra el tiempo necesario para obtener inóculo con 6×10^6 UFC/ml.

METODO DE DILUCION EN PLACA

Este método implica el uso de una serie de placas de agar con diferentes concentraciones de antibióticos. Las concentraciones de antibióticos se muestran en la tabla. El método de dilución en placa se aplicó utilizando el aparato de Steers llamado replicador de Steers, que consta de una cabeza de resorte provista de 32 agujas inoculadoras de aproximadamente 3 mm de diámetro, la cabeza puede desplazarse hacia arriba y hacia abajo en plano vertical. La contraparte es una placa de siembra que contiene 32 pequeños cilindros, ordenados de tal modo que las agujas de inoculación de la cabeza móvil, entran dentro de éstos. En cada cilindro se colocan las diferentes suspensiones bacterianas.

Los medios de cultivo y la preparación del inóculo fueron realizados de la misma manera que en el Método de Microdilución.

* Preparación de las placas

Se utilizaron cajas de Petri con 25 ml. de Agar BHI'suplementado con una solución de Hemina-Menadiona. Cuando el medio estéril se encontró a una temperatura de aproximadamente 40°C, se diluyó el antimicrobiano y se vació a las placas. Las concentraciones finales de las placas se muestran en la tabla (XII).

* Inoculación de las placas.

La inoculación de la placa se efectuó tomando 0.8 ml. de

la suspensión bacteriana que se depositaron en los orificios correspondientes de la base del Replicador de Steers. de izquierda a derecha y al terminar la fila se inicia la siguiente empezando nuevamente por la izquierda. Para inocular las cajas se coloca la placa de siembra sobre la base del replicador, entonces la cabeza con las 32 varillas inoculadoras se ajusta de tal manera que al hacer la presión sobre la caja de siembra las varillas tocan la superficie sin romperla.

Cada aguja inocular 0.001ml por lo que el inóculo final en la superficie del Agar es de 10^3 ufc/ml. Las placas inoculadas se dejaron secar y se incubaron en anaerobiosis por 24-Hrs.

Al cabo de este tiempo se anota la lectura indicando si existió o no desarrollo en cada una de las concentraciones -- probadas de antibiótico.

**CALCULO DE LAS CONCENTRACIONES FINALES DE ANTIMICROBIANOS
EMPLEADAS PARA EL METODO DE DILUCION EN PLACA.**

SOLUCION ANTIMICROBIANA		Caldo Nutri- + tivo estéril Vol.(ml)**	Concentración Final (mcg/ml)	
Concentración	Volumen		Diluc 1:2	Conc. Final
1000*	51.2*	148.8*		256
256	100	100	128	128
128	100	100	64	64
64	100	100	32	32
32	100	100	16	16
16	100	100	8	8
8	100	100	4	4
4	100	100	2	2

TABLA XII. Cuadro que muestra el cálculo así como los volúmenes necesarios para obtener las concentraciones de antimicrobianos para el Método de dilución en Placa.

Los cálculos están realizados a partir de una solución Madre de 1000 mcg/ml ()

**El volumen final de medio de cultivo está calculado para 4 placas (25 ml c/u).

**CONCENTRACIONES FINALES DE ANTIMICROBIANO EMPLEADAS EN
EL METODO DE DILUCION EN PLACA**

Agente Antimicrobiano	Concentraciones en mcg/ml											
	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	
Carbenicilina	X	X	X									
Cefotaxima		X	X	X	X							
Clindamicina	X	X	X									
Cloranfenicol					X	X	X					
Eritromicina			X	X	X							
Metronidazol		X	X	X								
Penicilina		X	X	X								
Tetraciclina		X	X	X								

TABLA XIII. Cuadro que muestra las diferentes concentraciones de Antimicrobiano empleadas en este estudio.

VII RESULTADOS

De las 70 muestras estudiadas provenientes de: líquido pleural, secreción de heridas, secreción quirúrgica, empiema y hemocultivos, se obtuvieron los siguientes resultados:

6 cultivos puros de bacterias anaerobias y 16 cultivos mixtos de anaerobios asociados a enterobacterias, obteniéndose así 22 cepas de anaerobios, lo que significa que en el 31.4% de los aislamientos se encontró implicada una bacteria anaerobia.

Del 100% de aislamientos el 63% correspondió a Bacteroides fragilis, el cual casi siempre se encontró asociado con bacterias anaerobias facultativas del grupo Enterobacteriaceas. El segundo lugar lo ocuparon los Cocos anaerobios Peptococcus sp con 18.1% seguido de Clostridium sp. con 13.6% y finalmente el género Veillonella con 4.5% (Tabla XIV).

El patrón de susceptibilidad a los antibióticos se efectuó primeramente, por el método de Microdilución, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Para el grupo Bacteroides fragilis tanto en el metronidazol como en el cloranfenicol, a 8 mcg/ml se obtuvo una suscep

tibilidad del 99% en todas las cepas aisladas.

La carbenicilina, cefotaxima, Penicilina y tetraciclina poseen 100% de susceptibilidad a concentraciones superiores a 128 mcg/ml. La eritromicina a 64mcg/ml tiene un 100% de susceptibilidad, en tanto que la clindamicina a 32 mcg/ml. Apenas posee un 92% de inhibición bacteriana. (Tabla XV).

Tomando en cuenta los valores promedio de las concentraciones mínimas inhibitorias individuales de cada cepa, se calcularon para cada antibiótico los valores promedio generales que sirvieron para obtener las concentraciones a las cuales se prepararon las cajas de antimicrobiano para la prueba de Dilución en Placa.

Utilizando este método se obtuvieron los resultados siguientes:

Para la carbenicilina a una concentración de 64 mcg/ml se obtuvo una susceptibilidad del 75% en tanto que a 128 mcg/ml ya no había crecimiento bacteriano. Con la cefotaxima a una concentración de 64 mcg/ml, ya no se obtuvieron cepas resistentes, aún cuando a 32 mcg/ml la susceptibilidad fue de 64%.

Se observó que existen cepas resistentes a más de 129 mcg/ml para la clindamicina, y que aún a dicha concentración solo se halló un 72% de cepas susceptibles.

El cloranfenicol es el mejor antibiótico puesto que a --

4 mcg/ml alcanza la inhibición total del crecimiento bacteriano y no se encontraron cepas resistentes a dicho antibiótico.

Para la eritromicina se encontró una inesperada resistencia pues a 32 mcg/ml apenas el 75% de las cepas fueron susceptibles, del mismo modo sucedió con la Tetraciclina y la Penicilina, los cuales poseen el 100% de susceptibilidad en valores superiores a 128 mcg/ml. (Tabla XVI).

FRECUENCIA DE AISLAMIENTOS DE BACTERIAS ANAEROBIAS
PROVENIENTES DE MUESTRAS CLINICAS

GRUPO BACTERIANO	% DE AISLAMIENTOS
<u>Bacteroides fragilis</u>	63.6
<u>Peptococcus sp</u>	18.1
<u>Clostridium sp</u>	13.6
<u>Veillonella parvula</u>	4.5

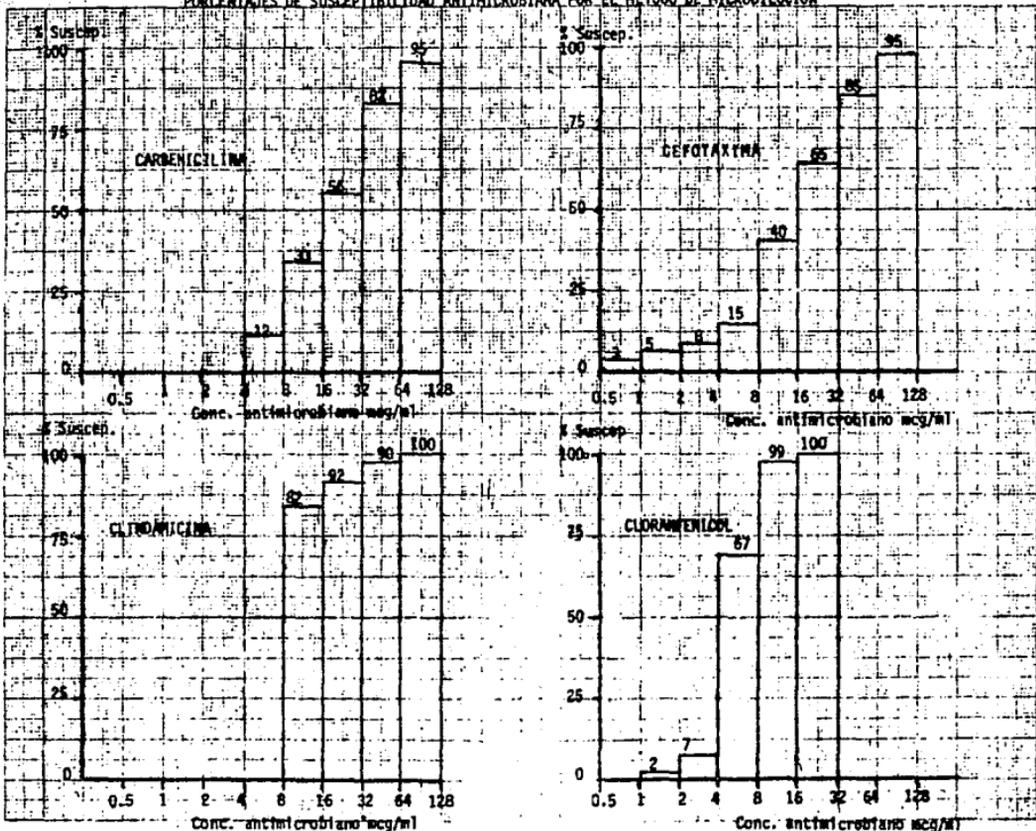
TABLA IV. Tabla que muestra la frecuencia de aislamientos bacterianos obtenidos de las muestras clínicas estudiadas. Sólo se hace referencia a las bacterias anaerobias, los aerobios no se incluyen.

PORCENTAJES DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR EL
MÉTODO DE MICRODILUCIÓN

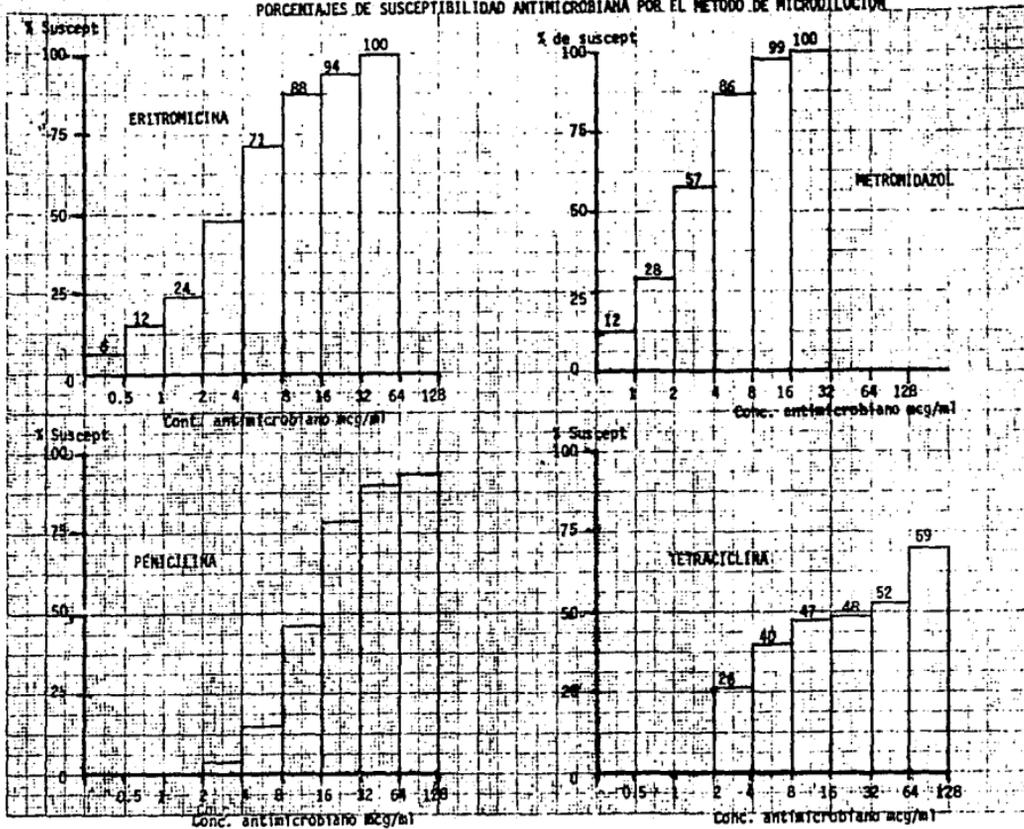
AGENTE ANTIMICROBIANO	CONCENTRACIONES DE ANTIMICROBIANO mcg/ml											
	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	
CARBENICILINA								12	33	56	82	95
CEFOTAXIMA			3	5	8	15	40	65	85	98	99	
CLINDAMICINA								85	92	99	100	
CLORANFENICOL				2	7	67	99	100	100	100	100	
ERITROMICINA			6	15	24	47	71	88	94	100	100	
METRONIDAZOL			12	28	57	86	99	100	100	100	100	
PENICILINA						3	14	47	79	93	95	
TETRACICLINA						26	40	47	48	52	69	

TABLA XV. Los valores están dados en porcentaje tomando en cuenta el 100% del total de cepas probadas. Estos valores fueron obtenidos por el Método de Microdilución.

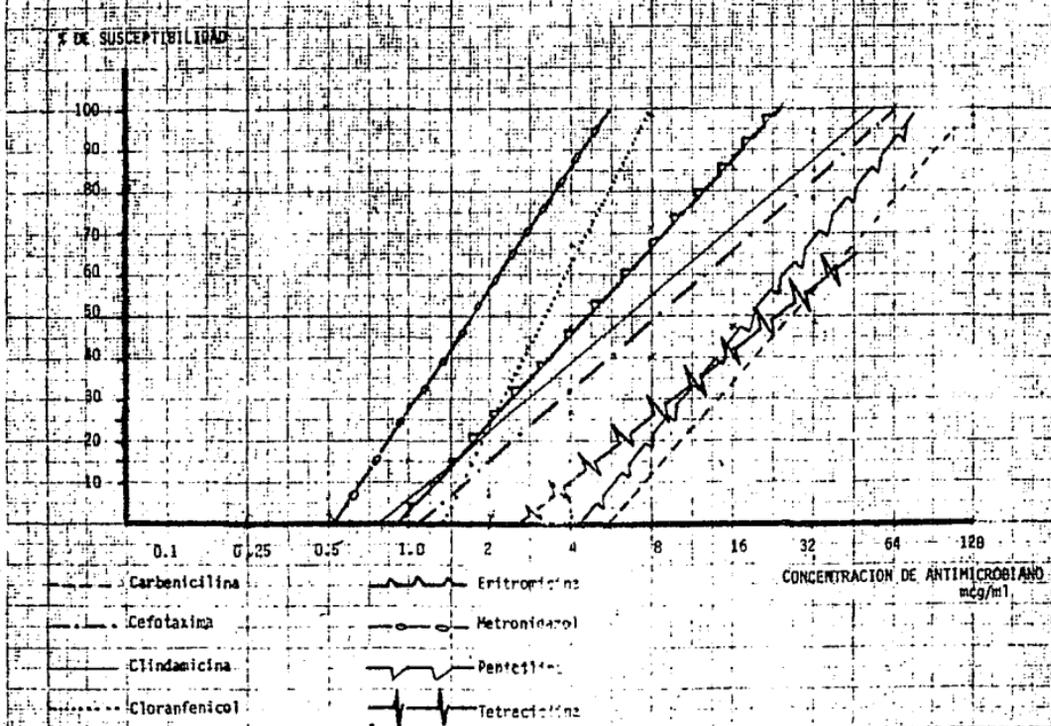
PORCENTAJES DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR EL METODO DE MICRODILUCION



PORCENTAJES DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR EL METODO DE MICRODILUCION



PORCENTAJES DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA
POR EL METODO DE MICRODILUCION

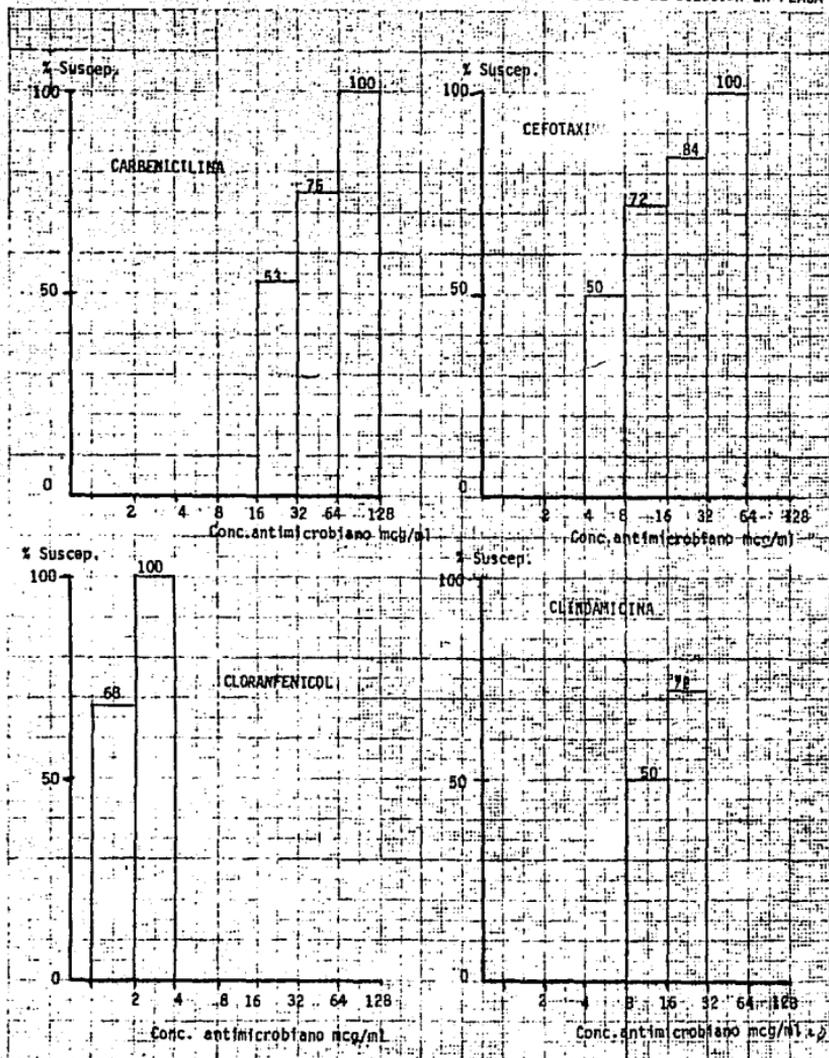


PORCENTAJES DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR
EL METODO DE DILUCION EN AGAR.

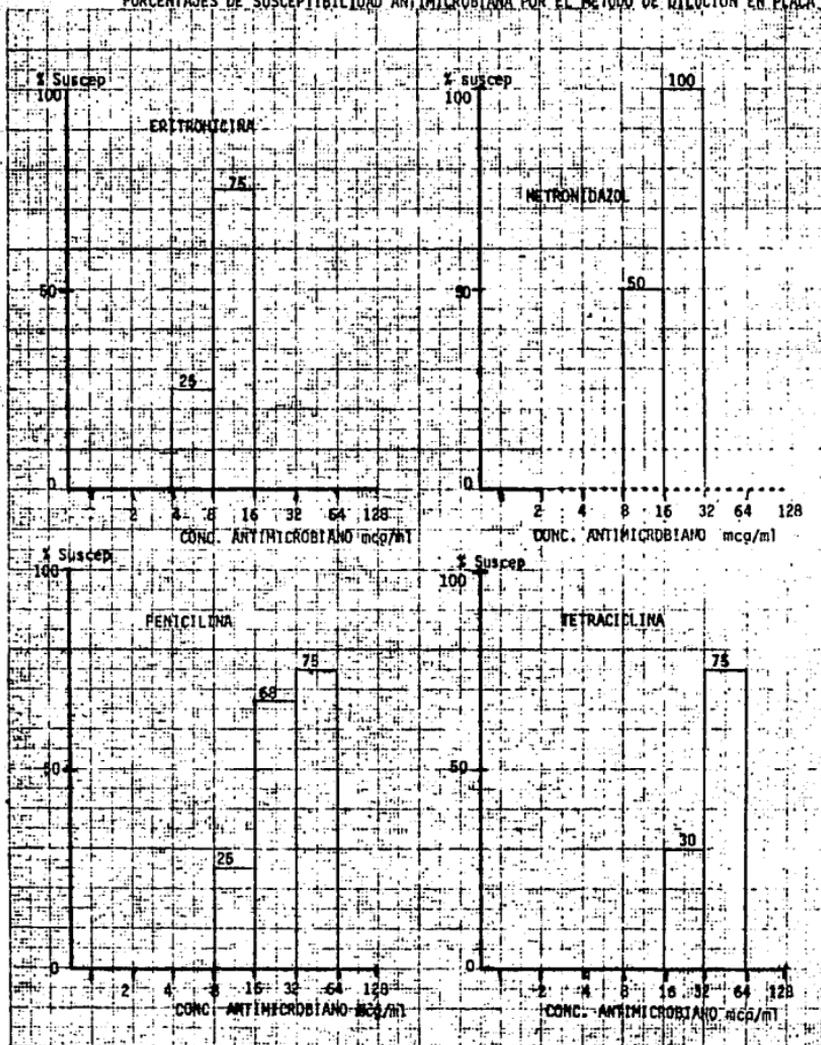
AGENTE ANTIMICROBIANO	CONCENTRACIONES DE ANTIMICROBIANO mcg/ml						
	2	4	8	16	32	64	128
CARBENICILINA					53	75	100
CEFOTAXIMA			50	72	84	100	
CLORANFENICOL	68	100	100				
CLINDAMICINA				60	72	72	72
ERITROMICINA			25	75	75		
METRONIDAZOL				50	100	100	
PENICILINA				25	69	75	75
TETRACICLINA					30	75	75

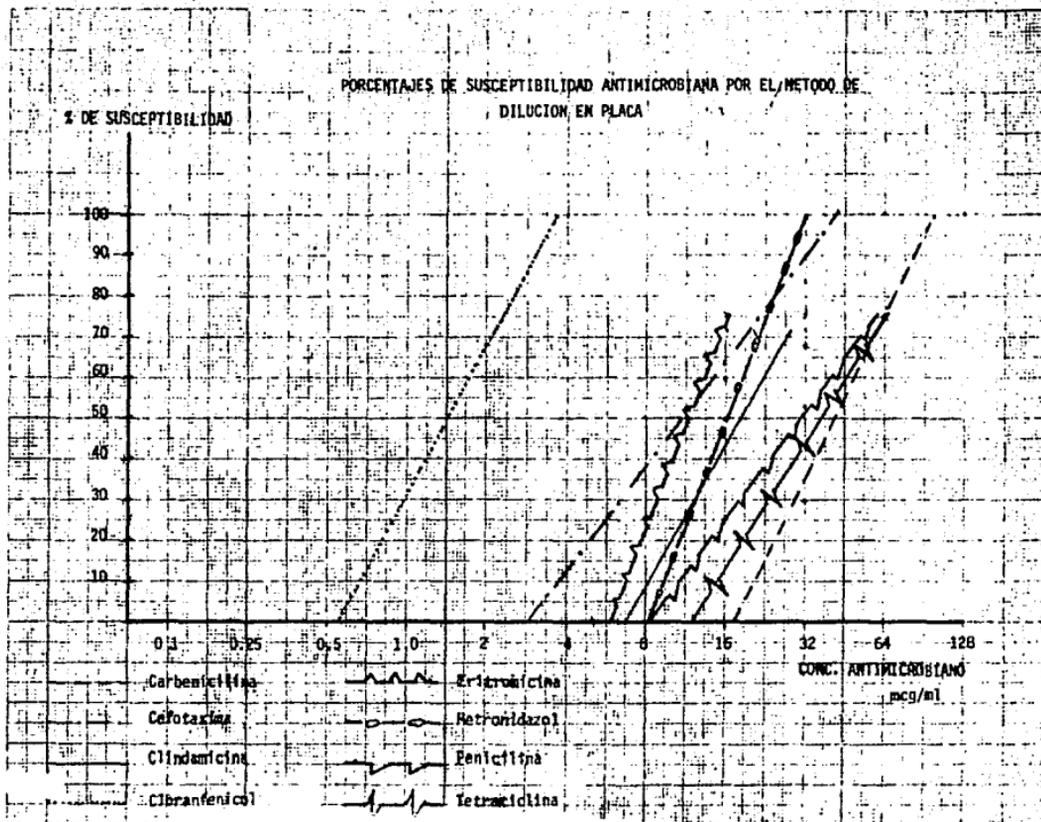
TABLA XVI. Porcentajes de susceptibilidad antimicrobiana obtenidos por el Método de Dilución en Placa. Los valores están dados de acuerdo al 100% de capas probadas.

PORCENTAJES DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR EL METODO DE DILUCION EN PLACA



PORCENTAJES DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR EL METODO DE DILUCION EN PLACA





CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (MIC) DE CEPAS
DE Bacteroides fragilis

AGENTE ANTIMICROBIANO	CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA PROMEDIO	
	MICRODILUCION mcg/ml	VALOR TEORICO mcg/ml
CARBENICILINA	45	64
CEFOTAXIMA	15	
CLINDAMICINA	49	2.0
CLORANFENICOL	7	8.0
ERITROMICINA	22	9.0
METRONIDAZOL	10	4.0
PENICILINA G	37	32
TETRACICLINA	55	32

TABLA XVII. Comparación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (MIC) en mcg/ml del Método de microdilución con las reportadas en la bibliografía. (Tomadas de Lennette, Microbiología Clínica, ed.3).

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (MIC) DE CEPAS DE
Bacteroides fragilis

AGENTE ANTIMICROBIANO	CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA PROMEDIO	
	MICRODILUCION mcg/ml	DILUCION EN PLACA mcg/ml
CARBENICILINA	45	64
CEFOTAXIMA	15	16
CLINDAMICINA	49	32
CLORANFENICOL	7	4
ERITROMICINA	22	16
METRONIDAZOL	10	16
PENICILINA	37	32
TETRACICLINA	55	64

TABLA XVIII. En este cuadro se muestra la comparación de las MICs promedio obtenidas por los diferentes métodos empleados en este estudio.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

VIII ANALISIS

El interés por estudiar a las bacterias anaerobias, en especial a las comprendidas dentro del grupo Bacteroides fragilis, así como su patrón de susceptibilidad y resistencia a los antimicrobianos más usados en el medio hospitalario, se debe a que cada día aumentan las complicaciones infecciosas debido al alto intercambio genético que tiene éste microorganismo con las bacterias anaerobias facultativas (en especial del grupo Enterobacteriaceas) asociadas a infecciones mixtas que forman parte de la flora normal del organismo y que muy a menudo son expuestas a tratamientos extremos o prolongados -- con antibióticos. Por tal motivo se desarrolló este trabajo.

En el laboratorio se efectuaron una serie de técnicas -- desde el procesamiento de la muestra, la identificación y clasificación bacteriana, hasta la determinación del patrón de susceptibilidad a los antimicrobianos.

Con respecto a la toma de muestra, aunque no se recolectó directamente, solamente se procesaron las muestras en las que se tenía sospecha de que se pudieran encontrar y recuperar estos gérmenes, es decir: las muestras con aspecto purulento, olor fétido y presencia de gas, al igual que las prove

nientes de endocarditis con hemocultivos negativos y/o cuando a pesar de la presencia de bacterias en el frotis inicial, -- fue imposible el desarrollo de gérmenes en los medios usuales aerobios. Así mismo, las muestras que fueron transportadas - al laboratorio en jeringa con aguja doblada, medio de trans-- porte Stuart con atmósfera parcial de CO₂ y/o tubo para Hemo-- cultivo "Vacutainer", fueron procesadas. Las muestras obteni-- das por medio de hisopos ó en tubos con tapón de algodón no - se procesaron debido a que la recuperación de bacterias anaerobias aún del grupo Bacteroides fragilis, en muestras así -- tratadas es prácticamente imposible, pues el nivel máximo to-- lerable de oxígeno para algunas cepas de Bacteroides spp es - de 8 a 10%.

Los medios de cultivo utilizados en el aislamiento e - - identificación de bacterias anaerobias, fueron los empleados en el Centro de Control de Enfermedades (CDC de Atlanta, - - Georgia), encontrándose que las pruebas presuntivas de Lom-- bard-Dowell (LD) son de gran ayuda en la identificación de - géneros y en ocasiones dan un indicio de la especie, p. ej.-- la prueba LD bilis, donde se observa que el grupo Bacteroi-- des fragilis crece abundantemente en este medio.

Los géneros Bacteroides y Clostridium fueron los más -- frecuentemente recuperados, esto coincide con lo que se espe-- raba pues el grupo Bacteroides fragilis ocupa el primer lu-- gar en aislamientos en infecciones de cavidad abdominal, así

como de heridas y abscesos, por ser un germen que se encuentra ampliamente distribuido en el organismo como flora normal y que además posee gran resistencia a los antibióticos hasta ahora conocidos.

Debido a que en la actualidad no existe un método estandarizado y aceptado internacionalmente para conocer el patrón de susceptibilidad antimicrobiana (antibiograma) de las bacterias anaerobias, se procedió a estandarizar el método de microdilución.

Para la realización de estas pruebas se probaron tres medios de cultivo: Caldo Infusión cerebro-corazón (BHI), Caldo Brucella y Caldo Hinton-Mueller. Lo importante de los soportes es que no interfieran con el antibiótico, pero en este caso especial, se requiere que sean suficientemente nutritivos para obtener un buen desarrollo de Bacteroides fragilis. Con el medio BHI y Brucella se observó perfectamente "el botón de crecimiento" en la microplaca, en cambio con el caldo Hinton-Mueller, no se encontró bien definido el crecimiento apreciándose solamente una ligera turbidez. El crecimiento es un parámetro importante sobre todo en el Método de Microdilución, pues de no crecer adecuadamente puede interpretarse como "resistente a la concentración antimicrobiana expuesta" y por lo tanto puede dar lugar a falsos resultados de resistencia antimicrobiana. Resultados muy similares se encontraron tanto en BHI como en caldo Brucella, pero se eligió el medio BHI --

por ser el de menor contenido catiónico y el que menos interferencia ejerce con los antimicrobianos. Para estos gérmenes no se recomienda el medio Hinton-Mueller, pues el escaso crecimiento que se observa puede dar lugar a confusiones.

Por su fácil manejo primeramente se emplearon cepas de E. coli de las cuales se conocía el antibiograma, estas cepas se probaron simultáneamente tanto por el método de dilución en tubo (utilizado como método de referencia), como por el método de microdilución. Se controlaron las variables tales como: medio de cultivo empleado, pureza de las cepas, concentración de inóculo, fase de crecimiento y tiempo de desarrollo del microorganismo, homogeneidad de las diluciones seriadas, temperatura, soluciones stock de antimicrobiano y condiciones anaerobias.

Se realizaron diversos ensayos hasta que el método de Microdilución resultó reproducible en un 95%, variando ocasionalmente la MIC de un pozo a otro.

Los resultados fueron muy semejantes a los obtenidos con el método de dilución en tubo, el cual no se usa de manera rutinaria por los grandes inconvenientes que presenta, en cuanto a material utilizado, espacio y tiempo, pero que ha sido estandarizado y aceptado internacionalmente como exacto y reproducible.

Posteriormente se utilizaron las cepas de referencia - - Bacteroides fragilis CDC 14462 y Bacteroides thetaiotaomicron

ATCC 1041 A que también se probaron simultáneamente por los dos métodos, encontrando gran correlación.

Una vez estandarizado el método se probó nuevamente contra el método de Dilución en Placa que utiliza cajas petri -- con el antibiótico inmerso en el agar nutritivo y el aparato llamado Replicador de Steers, este método es el que normalmente se emplea en el Hospital General Centro Médico "La Raza" -- de manera rutinaria, el inconveniente de este método es que -- en cada inoculación se tienen que aplicar 32 cepas por caja -- de antibiótico, y aún para el grupo Bacteroides fragilis la -- frecuencia de aislamientos no es suficiente para poder probar 32 capas diarias y el desperdicio de material y reactivos es -- considerable.

Así pues, una vez controladas las variables y obteniendo exactitud y reproducibilidad del Método de Microdilución, se probaron en las mismas condiciones las cepas de Bacteroides fragilis obtenidas de los procesos infecciosos de pacientes ahí hospitalizados, por los dos métodos de Dilución en -- Placa y Microdilución, obteniéndose los resultados que se -- muestran en las tablas correspondientes.

Por los resultados obtenidos puede decirse que no existe parámetro de comparación entre los dos métodos, tomando -- en cuenta que el método de Dilución en Placa no es cuantitativo y que solo se prueban concentraciones aisladas de antimicrobiano, pero que a menudo se encuentran cepas bacteria--

nas que poseen mayor o menor resistencia antimicrobiana y que solo se puede conocer con exactitud su patrón de comportamiento por medio de técnicas de dilución seriadas.

Así pues, el método de Microdilución por sus características tales como: potencia controlada de los antibióticos por el uso de soluciones Stock, versatilidad para usarse en pruebas de sinergismo o antagonismo de antibióticos, cuantitativo, no está bajo la influencia de la velocidad de crecimiento de microorganismo, evita las complejidades de la difusión de antibióticos en medios sólidos, pueden obtenerse concentraciones bactericidas o bacteriostáticas del antimicrobiano, así como ampliar la escala para observar tolerancia antimicrobiana, pueden usarse placas pre-congeladas, es práctico, económico, exacto y reproducible; resulta ser el idóneo para probar microorganismos de este tipo. Cabe aclarar que no es necesario conocer todo el patrón de comportamiento de todas las capas aisladas de Bacteroides fragilis siempre que esto ocurre, sin embargo estas pruebas suelen ser necesarias para los pacientes con infecciones serias como endocarditis o absceso cerebral, con infecciones que requieran tratamiento prolongado como osteomielitis, o en enfermedades persistentes o recurrentes. También son necesarias para supervisar la susceptibilidad de especies aisladas comúnmente como es el caso de Bacteroides fragilis y poder detectar los cambios de resistencia en los antibiogramas comunes, llevando así un control epide--

miológico que pueda favorecer al paciente al aplicar la terapia antimicrobiana adecuada.

Finalmente las pruebas de susceptibilidad "in vitro" son muy útiles, pues dan una idea del comportamiento de los microorganismos que participan activamente en el proceso infeccioso ante los antibióticos empleados, sin embargo son un modelo incompleto de la situación "in vivo", porque los niveles de los antimicrobianos en el tejido no suelen ser conocidos, los grados de unión con proteínas varían con el antimicrobiano empleado, la interacción de los mecanismos de defensa del huésped ejerce un efecto importante y algunos aspectos de la selección de la prueba son totalmente arbitrarios.

Aún así, se debe continuar con el perfeccionamiento de estos métodos para acrecentar y confirmar su valor en la predicción de la Susceptibilidad bacteriana, especialmente actualizando procedimientos de referencia, normas de interpretación, recomendaciones para series de rutina y control de calidad de modo que las interpretaciones de los resultados de estas pruebas pueden refinarse a través de la experiencia acumulativa.

CONCLUSIONES

El grupo Bacteroides fragilis fue el microorganismo predominante en los aislamientos, encontrándose en un 63.6% del total de cepas obtenidas.

Los agentes más efectivos para Bacteroides fragilis fueron tanto el metronidazol como el cloranfenicol que con una concentración "in vitro" de 8 mcg/ml se obtiene una susceptibilidad del 100% de todas las cepas aisladas.

Para clindamicina, eritromicina y cefotaxima es necesario comprobar su eficacia por medio del antibiograma de manga regular, antes de recomendar su empleo. Así mismo, carbencilina, penicilina G y tetraciclina por el elevado porcentaje de cepas resistentes a altas concentraciones de estos agentes, resultan inocuos para infecciones producidas por Bacteroides fragilis.

El Método de Susceptibilidad por Microdilución, resultó bastante satisfactorio tanto en reproducibilidad, versatilidad, eficiencia, rapidez y economía, y se obtuvo una correlación satisfactoria con el método de referencia (Dilución en tubo).

Con respecto al método de Dilución en Placa, no existe parámetro de comparación tomando en cuenta que este método es esencialmente cualitativo.

Se sugiere que cada Hospital realice su propio patrón de Susceptibilidad y Resistencia antimicrobiana para los gérmenes recuperados dentro del mismo, así como un control de sus cepas, investigando las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) por lo menos para este grupo de bacterias cada dos meses.

La metodología aquí empleada está sujeta a modificaciones para aumentar su eficiencia en cuanto a identificación y determinación de la susceptibilidad antimicrobiana, disminuyendo así el tiempo para el informe de los resultados que estará en relación con la experiencia que se vaya adquiriendo.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Acar J.F., Goldstein, F.W., Kitzis M.D. & Eyquem M.T., - Resistance pattern of anaerobe bacteria isolated in hospital during two year period., J. Antimicrob. Chem. Suppl. D (8); 1981: 9-16.
- 2.- Anderson K.E., Hojer H.M., Nord, C.E., 1981 Nitroimidazole and anaerobic infections., Scand. J. Infect. Dis. -- Suppl. 26.
- 3.- Bailei, W.R. & Scott, E.G., Diagnostic Microbiology, 4a. ed. The CV Mosby Company 90-94 St. Louis 1974.
- 4.- Balows, A. Susceptibility to Antibiotics Test. 6a. Ed. - American Public Health Association p.p. 741-745 Washington, D.C. 1981.
- 5.- Bartlett, J.G., Anaerobic lower respiratory tract infections., Scand. J. Infect. Dis Suppl. 26: 118-122, 1981.
- 6.- Barlett., J.G., Gorbach S.L., Thadepalli H., Finegold S. M., Bacteriology of empiema., Lancet 1974 (2); 338-339.
- 7.- Bartlett, S.P., Burton R.C. Effects of prophylactic antibiotic on wound infection after elective colon surgery -- 1960-1980. Am J. Surg. 145 (R):300-309. 1983.
- 8.- Bartlett, J.G. Condon R.E., Gorbach, S.L., Clarke, J.S. Nichols. R. y Ochi. S. Impact of oral antibiotic regimen on colonic flora wound irrigation, cultures and bacteriology of septic complications. Annals of Surg. 188 (2): 249-254. 1978.

- 9.- Barry A.L., Jones R.N., Gavan T.L. Evaluation of the Micro Media system for quantitative antimicrobial drug susceptibility testing. A collaborative study, Antimicrob - Chem 13 (1): 61-69. 1978.
- 10.- Baur A.W., Kirby, W.M., Sherris J.G. Turck, M., Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 45 (4): 493-496. 1970.
- 11.- Bjornson. A.B. y Bjornson H.S., Participation of Immunoglobulin and the alternative complement., Pathway in - - Opsonization of. *B. fragilis* and *B. thetaiomicon.*, Rev. Infect Dis 1 (2) 1979. 347-355.
- 12.- Borth, S.J. Van Tassell R.I., Johnson J.L., Wilkins T.D. Bacteriopaages of *Bacteroides.*, Rev. Infect. Dis. 1(2), 1979: 325-334.
- 13.- Braude I. Farmacoterapia antimicrobiana. Ed. Médica --- Transamericana Buenos aires, Argentina. 1979.
- 14.- Britz, M.L. Resistance to Chloramphenicol an metronidazole in anaerobic bacteria.. J. Antimicrob. Chem. Suppl. D (8) 1981 49-58.
- 15.- Brook, L. Controni. G. Rodriguez, W.J. y Martin N.L. Anaerobic bacteriemia in children. American J. Dis. Child. 134 (2) 1052-1056, 1980.
- 16.- Britz, M.L. Wilkinson R.G. Chloramphenicol acetyltransferase of *Bacteroides fragilis*. Antimicrob Ag. Chem. 14 (105) 1978.
- 17.- Bryan L.F. and. Kwan S.L. Mechanisms of aminoglycoside-resistance of anaerobic bacteria and facultative bacteria. J Antimicrob. Chem. Suppl D 98) 1981: 1-3
- 18.- Colier, J. Colhoun, E.M. y Hill P.L. A multicenter comparison of clindamicin and metronidazole in the treatment of anaerobe infections. Scand. J. Infect. Dis. - - Suppl. 26: 96-100, 1981.

- 18.- Collier, J. Colhoun, E.M. y Hill P.L. A multicenter comparison of clindamicin and metronidazole in the treatment of anaerobe infections. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 26: 96-100, 1981.
- 19.- Colee, J.G., Brown R., Poxton and Eraser G., Current Approaches to the clasification, characterization and typing of pathogenic anaerobic bacteria., *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 35:17-22, 1982.
- 20.- Corona-Brambila G.O. Avances en el conocimiento de la resistencia bacteriana, *Rev. Infectología* 1(29); 1982.
- 21.- Cuchural, G. Jacobus N., Sherwood L., Gorbach and Tally, F.P., A survey of bacteroides susceptibility in the United States, *J. Antimicrob them Suppl D.* (8):27-31, 1981.
- 22.- Croucher, S.C. Bacterial populations associated with different regions of the human colon wall., *Appl. Env. Microbiol.* 45(3) 1025-1033, 1983.
- 23.- De la Cruz F.R., Calderón J.R. Análisis de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos, *Rev. Infectol.* 2 (29): 1982.
- 24.- Dornbush, K., Nord. C.E. Olsson-Liliequist B. Antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria with special reference to *B. fragilis.*, *Scand J. Infect. Dis. Suppl.* 35: 17-19, 1979.
- 25.- Dowell V.R. and S.D. Allen, Anaerobic Bacterial infections. Publication of U.S. Department of Health and Human Services Public. Health Service, from Diagnostic Procedures for bacterial, mycotic and parasitic infections 6a. 171-214. Capt. 4.
- 26.- Dowell V.R. Hill E.O. and Altemeier W.A. Use of phenetyl alcohol in media for isolation of anaerobic bacteria, *J. Bacteriol.* 88: 1811-1813, 1964.
- 27.- Dowell V.R. and Lombard, G.L. Procedures for preliminary identification of bacteria. Department of Health and Human Serices Public Health Service Centers for Disease

Control, Atlanta Georgia, 1984.

- 28.- Dowell V.R. Lombard, G.L. Presumptive identification of anaerobe nonspore forming gram negative bacilli, U.S. - - Department of health education and Welfare, Public Health Service Center for Disease Control, Atlanta Georgia, - - 1977.
- 29.- Evaldson G. Heimdahl a Kager L. and Nord, H.E. The normal anaerobic human microflora, Scand J. Infect. Dis - - Suppl 35: 9-15, 1982.
- 30.- Eykyn S.J. y Phillips, I. Metronidazole in surgical - - infections. J. Antimicrob. Chem. Suppl. C. (4) 75-81, -- 1978.
- 31.- Farrar W.E. Medical perspective: Molecular analysis of - plasmids in epidemiologic investigation, J. Infect. Dis. 148 (1): 1-6, 1983.
- 32.- Fidian R.V. Prophylaxis in colonic surgery, J. Antimicrob. Chem. Suppl C,: 39-47, 1978.
- 33.- Finegold S.M. Anaerobic Bacteria in Human Disease. Academic Press. Inc. pp. 30-35, N.Y. 1977.
- 34.- Finegold, S.M. Pathogenic anaerobes, Archives of Internal Med. 142 (11) 1988-1991, 1982.
- 34bis. Finegold, S.M. The role of anaerobes in human infections. Scand. J. Infect. Dis., Suppl 26: 9-13, 1981.
- 35.- Finegold, S.M. Taxonomy, enzymes and clinical relevance of anaerobic bacteria, Rev. Infect. Dis 1(2): 248-253, - 1979.
- 36.- Gillespie, G. Mac Naught. W. Prophylactic oral metronidazole in intestinal surgery, J. Antimicrob Chem. 4 - - (Suppl Co: 29-32, 1978.

- 37.- Giono S. y Garcia. E. Curso precongreso sobre bacteriología anaeróbica. Asociación Mexicana de Microbiología, -- pp. 25-115, 1983.
- 38.- Goodman, L.S. y Gilman, A. Bases farmacológicas de la terapéutica. 5a. Ed. Interamericana pp. 914-993, México, - 1975.
- 39.- Gorbach S.L. Bartlett H. Anaerobic Infections N. Engl. - J. Med. 290: 1177-1184, 1237-1245, 1289-1294, 1974.
- 40.- Gorbach S.L. and McCowan K., Comparative clinical trials in treatment of intra-abdominal sepsis, J. Antimicrob Chem Suppl D. (8): 95-104, 1981.
- 41.- Gorbach, S.L. Intestinal Microflora, Gastroenterology -- 60 (7): 1110-1129, 1971.
- 42.- Ghiney D.G. Hasegawa, P. Stalker D. and Davies C.E., - - Genetic análisis of clindamicin resistance in bacteroides species, J. Infec Dis. 147 (3): 551-559, 1983.
- 43.- Hansen S.L. Swonley P. Drusano.G. Effect of carbon dioxide and pH on susceptibility of *Bacteroides fragilis* - - groups to eritromicin. Antimicrob Chem. 1981, 19 (2): -- 335-336.
- 44.- Hnatko, S.I. Epidemiology of anaerobic infections, Surgery 93 (1): 125-133, 1983.
- 45.- Hiroshi, O. Antibiotic resistance in pathogenic and - - producing bacteria with special referente to B-lactam -- antibiotics, Microbiol. Rev. 45 (4): 591-619, 1981.
- 46.- Hofstad, T. Sween, K. The chemotactic effect of bacteroides fragilis lipopolisaccharide, Rev. Infect. Dis 1 (2): 342-346, 1979.
- 47.- Ingham, H.R., Selkon J.B. Cood, P.A. A study in vitro -- of the sensitivity to antibiotics of *bacteroides fragilis*, J. Clin. Pathol 21: 432-436, 1968.

- 48.- Ingham H.R., Selkon, J.B., Codd, A.A. and Holl, J.H. -- The effect of carbon dióxido on the sensitivity of *Bacteroides fragilis* to certain antibiotics in vitro, J. Clin. Pathol. 23: 254-259, 1970.
- 49.- Itzahak, B., William B.S. Martin J. Sydeney D., Finegold M. Neonatal pneumonia caused by members of the bacteroides fragilis group. Clin. Pediatrics. 19 (8): 41-44, --- 1980.
- 50.- Jones R.N., Barry A.L., Cotton, J.L., Sutter V.L., - - Swenson, J.M., Collaborative evaluation of the micromedia system anaerobe susceptibility panel comparison, - - with reference method and test reproducibility, J. Clin. Microbiol, 16(2): 245-249, 1982.
- 51.- Jones R.N. and Fuchs, P.C. Identification and antibacterial susceptibility of 200 *Bacteroides fragilis* subspecies tested by broth microdilution methods. Antimicrob, Chem 9 (4): 719-721, 1976.
- 52.- Jokipii, A.M.M. and Jokipi, L. Metronidazole, Tinidazole, Ornidazole and Anaerobic infections of the middle ear, - maxillary sinus and central nervous system. Scand, J. - Infect. Dis, Suppl. 26: 123-129, 1981.
- 53.- Julian DAVIES? Mechanisms of antibiotic resistance. Department of Biochemistry College of Agriculture and Life Sciences. University of Wisconsin, Madison.
- 54.- Kasper L.D. Virulence factors of anaerobic bacteria. Rev. Infect. Dis 1(2) 278-288, 1979.
- 55.- Kasper D.L., Onderdonk A.B., Polk B.F., Bartlett J.G. -- Surface antigens as virulence factors in infections - - with *Bacteroides fragilis*, Rev. Infectl. Dis. 1 (2): -- 278-287, 1979.
- 56.- Kaye D., Kabasa, W., Kaye, K. Susceptibilities of anaerobic bacteria to cefoperazon an other antibiotics, Antimicrob. Chem 17 (6): 957-960, 1980.

- 57.- Lennette, D.R. et al Microbiología clínica, 3a. Ed. Panamericana, pp. 556-560, 602-606.
- 58.- Lindberg, A.A., Weintraub, D.L. Kasper and Lönngreen J. Virulence factors in infections with bacteroides fragilis: Isolation and characterization and of capsular polysaccharide and lipopolysaccharide, Scand J. Infect. Dis. Suppl. 35: 45-52, 1982.
- 59.- Lisa, M. Dunkle, M.D., Thomas J.B., Ralph D.F., Anaerobic infections in children: A perspective study, Clin. Pediatrics 57 (3) 311-319, 1976.
- 60.- Mácrina, F.L., Mayo, T.D., Smith, C.J., Welch R.A., Non plasmid associated transfer of antibiotics resistance in Bacteroides, J. Antimicrob. Chem. Suppl D. (8): 77-86, - 1981.
- 61.- Malamy, M.L. and Tally, F.P., Mechanismos of drug-resistance transfer in Bacteroides fragilis, J. Antimicrob. - Chem, Suppl. D. (8): 59-71, 1981.
- 62.- Manual Media for Isolation Characterization and Identification of Obligately Anaerobic Bacteria, from U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service Centers for Disease Control.
- 63.- Mansheim B.L., Onderdonk K.A.B. and Kasper D.L., Immunochemical Characterization of surface antigens of Bacteroides melaninogenicus.
- 64.- Martin, W.J. M. Gardner and J.A. Washington, In vitro -- antimicrobial susceptibility of anaerobic Bacteria isolated from clinical specimens, Antimicrobial Chem 1 (2): 148-158, 1972.
- 65.- Marymonth, J.H., Wentz, R.M., Serial dilution antibiotic sensitivity testing, with the microtitration system, Am J. Clin Pathol. 45 (6): 548-551, 1970.
- 66.- Mc Lowry, S.D., Marsh, H.H., Semiatomatic microtechnique for serial dilution-antibiotic sensitivity testing in -- the clinical laboratory. J. Lab. Clin. Med. 72 (4): - - 685-687, 1968.

- 67.- Murray, P.R., Christman, J.L. Anaerobic Susceptibility - test: Evaluation of the stability of antimicrobial in -- Wilkens-Chalgren broth and the effect of media prerreduction, *J. Antimicrob.* 31 (12), 1296-1298, 1978.
- 68.- Nicholson, R.L., Smith, J.W., Fassedal E.N. and London R.E., Efficacy of parenteral antibiotics in the treatment of experimentally induced intraabdominal sepsis, *Rev. -- Infect Dis.* 1 (2): 302-309, 1979.
- 69.- Nord, E.C., Liljequist, B.O., Resistance to B-lactam - - antibiotics in *Bacteroides* species, *J. Antimicrob. Chem. Suppl. D.* (8): 32-42, 1981.
- 70.- Nordbring, F. and C.E. Nord, Aspects on antibacterial - treatment of anaerobic infections, *Scand. J. Infect. - - Dis. Suppl* 35: 59-62, 1982.
- 71.- Olsson-Liljequist and C.E. Nord. In vitro susceptibility of anaerobic bacteria to nitroimidazole, *J. Scand. - -- Infect. Dis Suppl.* 26: 42-45, 1981.
- 72.- Onderdonk, A.B., Kasper, D.B., Mansheim, B.J. Gorbach, - S.I. and Bartlett, J.G., Experimental animals model for anaerobes *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 35: 31-36, 1982.
- 73.- Phillips, I. Antibiotic Sensitivity testing of anaerobes. *scand. Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 35: 31-36, 1982.
- 74.- Phillips, I., Warren S. Taylor, E. Trimewell., R., Three Antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria, *J. Antimicrob. Chem. Suppl. D.* (8): 17-26, 1981.
- 75.- Polk, B.F. Antimicrobial prophylaxis to prevent mixed -- bacterial infection, *J. Antimicrob. Chem. Suppl. D.* (8): 115-129, 1981.
- 76.- Polonski, J.C., Bauer, S.H., Micromedia system anaerobe panel versus broth disk method in anaerobe antimicrobial test, *J. Clin Microbiol*, 17 (6): 449-952, 1983.

- 77.- Privitera, G., Bota, G., and Sebald, M. Macrolide, - - lincosamina streptogramina and tetraciclina, transferable resistance in the bacteroides fragilis group, J. - - Antimicrob. Chem. Suppl. D. (8), 87-94, 1981.
- 78.- Reeves, I. Phillips, J.D. Williams, Wise, R., Laboratory methods in antimicrobial chemotherapy, Ed. Edinburgh - - London 1978.
- 79.- Rosenblatt, J.E. and Schoenknecht, F. Effects of several components of anaerobic incubation on antibiotic susceptibility test results N. Engl. J. Med. 1 (5): 443-440, - 1971.
- 80.- Schwan, A. and Danielson, D., Immune response to Bacteroides fragilis in experimentally infected rabbits, Scand J. Infect. Dis., 15: 25-32, 1983.
- 81.- Selkon, J.B., The Need for and choice of chemotherapy -- for anaerobe infections, Scand J. Infect. Dis, 26: 19-23, 1981.
- 82.- Sigeti, J.S., Guiney, D.G. and Davies, C.E., Mechanisms of action of metronidazole on bacteroides fragilis, J. - Infect. Dis 148 (6) 1083-1089, 1983.
- 83.- Sonnenwirth, A.C., Antibody response to anaerobic bacteria, Rev. Infect. Dis. 1 (2): 337-341, 1979.
- 84.- Sutter, V.L. Vargo, V.L., Finegold, S.M., Manual de Bacteriología médica, Ed. Panamericana, 1978.
- 85.- Tally, F.P., Goldin, B. and Sullivan N.E. Nitroimidazoles: In vitro activity and efficacy in anaerobic infections. Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 26: 46-53, 1981.
- 86.- Tally F.P. and Malamy, M.H. Mechanisms of antimicrobial resistance and resistance transfer in anaerobic bacteria, Scand, J. Infect. Dis., Suppl. 35: 37-44, 1982.
- 87.- Tally, F.P., Sosa, A., Clindamicyn sis ance in Bacteroides fragilis, J. Antimicrob. Chem (8) Suppl D.: 43-48, 1981.

- 88.- Verklin, P.M. and Mandell, G.L. Alteration of effectiveness of Antibiotics by anaerobiosis, L. Lab. Clin. Med. 89 (1): 65-71, 1977.
- 89.- Witesbsky, F.G. McClowry, J.D., Broth dilution Minimum - Inhibitory concentrations rationale for use of selected antimicrobial concentrations, J. Clin Microbiol 9 (5): - 589-595, 1979.

APENDICE

MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

Medios para aislamiento de bacterias anaerobias

* CDC GELOSA SANGRE HEMINA MENADIONA

Tripticasa	5.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar	20.0 g
Extracto de Levadura	5.0 g
Hemina	5.0 mg
Vitamina K ₁ (Menadiona)	10.0 mg
L-cistina	400 mg
Agua destilada	1000 ml
Sangre desfibrinada	50 ml
Ajustar pH 7.3 a 7.5	

SOLUCION MADRE DE HEMINA

Hemina	50 mg
Hidróxido de Sodio 1 N	1.0 ml
Agua destilada	100 ml

SOLUCION MADRE DE MENADIONA

Menadiona	100 mg
Alcohol etílico al 95%	20.0 ml
Esterilización por filtración	

SOLUCION DE HEMINA-MENADIONA

Solución estéril de Menadiona	1.0 ml
Solución estéril de Hemina	100.0 ml

* CDC AGAR SANGRE CON ALCOHOL FENILETILICO

Tripticasa	15.0 g
Cloruro de Sodio	5.0 g
Agar	20.0 g
Extracto de Levadura	5.0 g
Hemina	5.0 mg
Menadiona	10.0 mg*
L-cistina	400.0 mg
Agua destilada	1000 ml
Sangre de carnero desfibrinada	50.0 ml
Alcohol fenil etílico	2.5 g
Ajustar pH 7.5	

* AGAR INFUSION DE CEREBRO Y CORAZON (B.H.I.)

Infusión de cerebro de ternera y corazón de res	200 g
Mezcla de peptones	10.0 g
Fosfato de Potasio	2.5 g
Cloruro de Sodio	5.0 g
Dextrosa	2.0 g
Hemina	5.0 mg
Menadiona	10.0 mg
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 ml
Ajustar pH 7.3 a 7.5	

* AGAR MUELLER-HINTON

Infusión de carne de res	300.0 g
Peptona de caseína	17.5 g
Almidón de maíz	1.5 g
Agar	17.0 g
Hemina	5.0 mg
Menadiona	10.0 mg
Agua destilada	1000 ml
Ajustar pH 7.3 a 7.5	

* AGAR BRUCELLA

Peptona 180 (Tejido animal, caseinato polipeptona)	20.0 g
Dextrosa	1.0 g
Extracto de Levadura	2.0 g
Cloruro de Sodio	5.0 g
Bisulfito de Sodio	0.1 g
Buffer de Citratos	
Hemina	5.0 mg
Menadiona	10.0 mg
Agua destilada	1000 ml
Ajustar pH final 7.0 a 7.2	

* TIOGLICOLATO ENRIQUECIDO

Tioglicolato sin dextrosa e indicador	1000.0 ml
Solución Hemina menadiona	10.0 ml

* TIOGLICOLATO SIN DEXTROSA E INDICADOR

Peptona de caseína	20.0 g
Cloruro de sodio	2.5 g
Fosfato dipotásico	1.5 g
Tioglicolato de sodio	0.6 g
L-cistina	0.4 g
Sulfito de sodio	0.2 g
Agar	0.5 g
Agua destilada	1000 ml

MEDIOS PARA PRUEBAS PRESUNTIVAS DE LOMBARD Y DOWELL (LD)

* AGAR LD

Trypticasa	5.0 g
Extracto de Levadura	5.0 g
Cloruro de Sodio	2.5 g
Sulfito de Sodio	0.1 g
L-Triptófano	0.2 g
Vitamina K ₁ (menadiona)	0.01 g
L-cistina	0.4 g
Hemina	0.01 g
Agar	20.0 g
Agua destilada	1000 ml

* LD ESCULINA

Trypticasa	5.0 g
Extracto de Levadura	5.0 g
Cloruro de Sodio	2.5 g
L-triptófano	0.2 g
Menadiona	0.01 g
L-cistina	0.4 g
Hemina	0.01 g
Esculina	1.0 g
Citrato férrico	0.5 g
Agar	20.0 g
Agua destilada	1000 ml

* LD YEMA DE HUEVO

Trypticasa	5.0 g
Extracto de Levadura	5.0 g
Cloruro de sodio	2.5 g
Sulfito de sodio	0.1 g
L-triptófano	0.2 g
Menadiona	0.01 g

L-cistina	0.4 g
Hemina	0.01 g
Dextrosa	2.0 g
Fosfato dibásico de sodio	5.0 g
Sulfato de Magnesio	0.2 ml
(de una sol. al 5%)	
Agar	20.0 g
Agua destilada	900 ml
Suspensión estéril de yema de huevo	100 ml

* LD BILIS

Tripticasa	5.0 g
Extracto de Levadura	5.0 g
Cloruro de Sodio	2.5 g
Sulfito de sodio	0.1 g
L-triptofano	0.2 g
Menadiona	0.01 g
L-cistina	0.4 g
Hemina	0.01 g
Oxgall	20.0 g
Agua destilada	1000 ml

MEDIOS PARA PRUEBAS CONFIRMATORIAS

* FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS

Tioglicolato sin dextrosa e indicador (medio líquido base)	8 ml
Solución acuosa de azúcar	0.5 ml
Solución de azul de bromotimol al 0.1%	gotas

CARBOHIDRATO	CONCENTRACION
Glucosa	6%
Sacarosa	10%
Lactosa	10%
Maltosa	10%
Arabinosa	10%
Xilosa	10%
Manitol	10%
Salicina	5%

INDICADOR AZUL DE BROMOTIMOL

Azul de bromotimol	1.0 g
Hidróxido de Sodio	20 ml
Agua destilada	80 ml

COLORANTES

* TINCION DE GRAM

Cristal violeta (solución madre)	
Cristal Violeta	20.0 g
Etanol al 95%	100 ml
Oxalato de amonio (solución madre)	
Oxalato de amonio	1.0 g
Agua destilada	100 ml
Cristal violeta (solución de trabajo)	
Cristal violeta (solución madre)	1 ml
Agua destilada	10 ml
Oxalato de amonio (solución madre)	4 volúm.
Lugol	
Iodo Cristalino	1.0 g
Yoduro de potasio	2.0 g
Agua destilada	5 ml

Agregar

Agua destilada	240	ml
Carbonato de sodio al 5% en solución ac.	60	ml
Solución Alcohol - Acetona		
Alcohol etílico absoluto	50	ml
Acetona	50	ml
Safranina (solución madre)		
Safranina	2.5	g
Etanol al 95%	100	ml
Safranina (solución de trabajo)		
Safranina solución madre	1.0	ml
Agua destilada	10.0	ml

REACTIVOS**Reactivo de Indol de Kovac**

Alcohol amílico o isoamílico	150	ml
p-dimetilaminobensaldehido	10.0	g
Acido clorhídrico concentrado	50	ml

*Alcohol etílico absoluto (reactivo de erlich)