



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**Revisión bibliográfica sobre el diagnóstico de  
bacterias esporuladas: *Bacillus* y *Clostridium***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIADA EN BIOQUÍMICA  
DIAGNÓSTICA**

**P R E S E N T A:**

**ISABEL MONTOYA URBINA**

**ASESORA:**

**Q.F.B. LETICIA CUBILLO CARRILLO**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE  
MÉXICO, 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN



ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: DRA. MARIA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautilán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis y Examen Profesional**

**Revisión bibliográfica sobre el diagnostico de bacterias esporuladas: Bacillus y Clostridium.**

Que presenta la pasante: **Isabel Montoya Urbina**

Con número de cuenta: **313041516** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**

**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**

Cuautilán Izcalli, Méx. a 23 de Febrero de 2023.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Q.F.B. Ladislao Palomar Morales	
<b>VOCAL</b>	Q.F.B. Dulce María Ruvalcaba Sil	
<b>SECRETARIO</b>	Q.F.B. Leticia Cubillo Carrillo	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Q.F.B. Guadalupe Hernández Torres	
<b>2do. SUPLENTE</b>	Q.F.B. David Ladislao Sánchez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

MCVB/cga\*

## ***AGRADECIMIENTOS***

A mi madre, Rubí, que desde el inicio depositó su fé y confianza en mí y brindó su apoyo incondicional día a día. Por tanto trabajo, dedicación, preocupaciones y desvelos para que yo pudiera lograr esta meta.

A mi padre, Otilio, por cada uno de sus sabios consejos que me guiaron durante mi vida. Por formarme con reglas y algunas libertades, pero a fin de cuentas me motivó constantemente para alcanzar mis anhelos. Eres el mejor.

Y sin dejar atrás a toda mi familia, por su apoyo. En especial a mi tía Isabel Montoya que nunca dudó de mí y siempre me motivó durante esta travesía.

## ***DEDICATORIA***

A mí misma, por la perseverancia y el esfuerzo.

A mis padres, porque este logro es tanto mío como de ellos.

Los amo.

**Isabel Montoya Urbina**

# ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Objetivos .....	2
• Objetivo General.....	2
• Objetivos Particulares .....	2
3. Justificación.....	3
4. Marco teórico .....	4
4.1. Generalidades de <i>Bacillus</i> .....	4
4.1.1. <i>Bacillus anthracis</i> .....	6
4.1.1.1. Características.....	6
4.1.1.2. Enfermedad clínica .....	6
4.1.1.3. Diagnóstico.....	8
4.1.2. <i>Bacillus cereus</i> .....	14
4.1.2.1. Características.....	14
4.1.2.2. Enfermedad clínica .....	15
4.1.2.3. Diagnóstico.....	18
4.1.3. <i>Bacillus subtilis</i> .....	21
4.1.3.1. Características.....	21
4.1.3.2. Enfermedad clínica .....	21
4.1.3.3. Diagnóstico.....	22
4.2. Generalidades de <i>Clostridium</i> .....	24
4.2.1. <i>Clostridium tetani</i> .....	26
4.2.1.1. Características.....	26
4.2.1.2. Enfermedad clínica .....	26
4.2.1.3. Diagnóstico.....	27
4.2.2. <i>Clostridium botulinum</i> .....	29
4.2.2.1. Características.....	29
4.2.2.2. Enfermedad clínica .....	29
4.2.2.3. Diagnóstico.....	30
4.2.3. <i>Clostridium difficile</i> .....	33

4.2.3.1. Características.....	33
4.2.3.2. Enfermedad clínica.....	34
4.2.3.3. Diagnóstico.....	34
4.2.4. <i>Clostridium perfringens</i> .....	37
4.2.4.1. Características.....	37
4.2.4.2. Enfermedad clínica.....	38
4.2.4.3. Diagnóstico.....	39
5. Conclusiones.....	43
6. Referencias.....	44
7. Glosario.....	54
Anexos.....	57
Anexo I. Tablas de identificación de <i>Bacillus</i> y <i>Clostridium</i> .....	58
Anexo II. Medios de cultivo.....	60

## Abreviaturas

%	Porcentaje
°C	Grados centígrados
µm	Micrómetros
ATSDR	Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades
<i>B. anthracis</i>	<i>Bacillus anthracis</i>
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BHI	Brain Heart Infusion medium (Medio Infusión cerebro corazón)
BoNT	Neurotoxina botulínica
BSM	<i>Clostridium botulinum</i> selective medium (Medio selectivo para <i>Clostridium botulinum</i> )
<i>C. botulinum</i>	<i>Clostridium botulinum</i>
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
<i>C. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>C. tetani</i>	<i>Clostridium tetani</i>
CBI	<i>Clostridium botulinum</i> isolation agar (Agar para aislamiento de <i>Clostridium botulinum</i> )
CCFA	Agar Cicloserina Cefoxitina Fructosa
CD	<i>Clostridium difficile</i>
CDC	Centers for Disease Control and Prevention (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades)
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CYTK	Citotoxina K

DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EFSA	European Food Safety Authority (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)
FDA	Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos)
g	Gramos
GDH	Glutamato Deshidrogenasa
GRAS	Generally recognized as safe (Generalmente reconocido como seguro)
h	Horas
HBL	Hemolisina BL
ICD	Infección por <i>Clostridium difficile</i>
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
ISO	International Organization for Standardization (Organización Internacional de Normalización)
L	Litro
LCR	Líquido cefalorraquídeo
m <sup>3</sup>	Metro cúbico
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (Desorción/ionización láser asistida por matriz)
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mm <sup>3</sup>	Milímetro cúbico
MYP	Agar Manitol-Yema de huevo y Polimixina
n/a	Not available (No disponible)

NaCl	Cloruro de sodio
NHE	Enterotoxina no hemolítica
NIH	National Institutes of Health (Institutos Nacionales de Salud)
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
ONPG	o-nitrofenil-D-galactopiranosido
OSHA	Occupational Safety and Health Administration (Administración de Seguridad y Salud Ocupacional)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PLET	Medio Polimixina B-Lisozima-EDTA-Acetato de talio
QPS	Qualified Presumption of Safety (Presunción cualificada de seguridad)
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TSC-EYA	Agar Triptosa Sulfito Cicloserina con yema de huevo
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
VP	Voges Proskauer

## 1. Introducción

Los bacilos Gram positivos formadores de esporas pertenecen a las especies de *Bacillus* y *Clostridium*, y debido a su capacidad para formar esporas, pueden vivir en el ambiente por varios años. Si bien las especies de *Bacillus* son aerobias, las especies de *Clostridium* son anaerobias (Riedel *et al.*, 2020).

De las muchas especies de *Bacillus* y géneros afines que aún no han sido bien clasificadas en la microbiología médica, la mayoría no causa enfermedades. Sin embargo, existen algunas especies que generan enfermedades importantes en los seres humanos. El carbunco, enfermedad clásica en la historia de la microbiología, es producido por *Bacillus anthracis* y sigue siendo una enfermedad importante entre los animales y ocasionalmente entre los seres humanos. Debido a sus toxinas tan potentes, *B. anthracis* es un microorganismo potencialmente importante para el bioterrorismo y la guerra biológica. *Bacillus cereus* y *Bacillus thuringiensis* causan intoxicación alimentaria y ocasionalmente infecciones oculares (Riedel *et al.*, 2020).

El género *Clostridium* es extremadamente heterogéneo y se han descrito más de 190 especies. Sigue creciendo la lista de microorganismos patógenos, así como nuevas especies aisladas a partir de heces humanas. Los clostridios causan varias enfermedades importantes producidas por toxinas: *Clostridium tetani*, tétanos; *Clostridium botulinum*, botulismo; *Clostridium perfringens*, gangrena gaseosa y *Clostridium difficile*, colitis pseudomembranosa. También existen otros clostridios en las infecciones anaerobias mixtas en el ser humano (Riedel *et al.*, 2020).

En 1980 se notificaron nueve brotes de enfermedades transmitidas por alimentos al CDC, involucrando alimentos como carne bovina, pavo y comidas mejicanas [sic]. En 1981 se informaron ocho brotes, donde los principales alimentos involucrados fueron arroz, crustáceos y moluscos. Otros casos no se registran o son mal diagnosticados debido a la semejanza con los síntomas de la intoxicación por *Staphylococcus aureus* (toxiinfección emética de *B. cereus*) o alimentos contaminados por *C. perfringens* tipo A (toxiinfección diarreica de *B. cereus*) (Organización Panamericana de la Salud, 2022).

Los casos de enfermedades transmitidas por alimentos registrados representan apenas la "punta del iceberg". La probabilidad de que un caso se reconozca y notifique por las autoridades de salud depende, entre otros factores, de la comunicación de los consumidores, del relato de los médicos y de las actividades de vigilancia sanitaria de las secretarías municipales, departamentales y provinciales de salud (Organización Panamericana de la Salud, 2022).

Es por esta razón que se debe mantener informado y actualizado a los alumnos, así como profesionales de la salud sobre la correcta identificación de este tipo de microorganismos para llegar a un adecuado diagnóstico y poder brindar al paciente un tratamiento oportuno.

## 2. Objetivos

- **Objetivo General**

Elaborar una recopilación bibliográfica sobre el diagnóstico de los microorganismos esporulados como *Bacillus* y *Clostridium* y sus especies de mayor importancia clínica, realizando una recolección exhaustiva de información en diversas fuentes para ser utilizado como material de apoyo para los alumnos que estén cursando la asignatura de Bacteriología y deseen ampliar sus conocimientos sobre este tipo de microorganismos así como personal relacionado al área de la salud.

- **Objetivos Particulares**

- Realizar un material de apoyo para la asignatura de Bacteriología para el reforzamiento del tema de bacterias esporuladas.
- Realizar una recopilación bibliográfica del diagnóstico diferencial de *Bacillus anthracis*, *B. cereus* y *B. subtilis* así como de *Clostridium tetani*, *C. botulinum*, *C. perfringens* y *C. difficile*.

### 3. Justificación

Actualmente el número de fuentes que contienen información sobre el diagnóstico de microorganismos esporulados es muy extenso, por lo que este texto se enfocará en recopilar la información sobre el diagnóstico diferencial entre las especies de mayor importancia clínica de microorganismos esporulados como *Bacillus* y *Clostridium*, mediante la investigación bibliográfica sistemática que complemente los conocimientos de los alumnos que estén cursando la asignatura de Bacteriología o personal perteneciente al área de la salud.

## 4. Marco teórico

### 4.1. Generalidades de *Bacillus*

El género *Bacillus* incluye bacterias en forma de bastón, aerobias y anaerobias facultativas (dependiendo de la especie) dispuestas en cadenas comprendiendo un grupo de especies Gram positivas en su mayoría, puesto que existen cepas de algunas especies consideradas Gram positivas solo en las primeras etapas de crecimiento ya que con la edad pueden volverse Gram negativas (Gordon, Haynes y Pang, 1973; Claus & Berkeley, 1986). Sin embargo se sigue tratando el microorganismo *Bacillus* como un género de bacilos en su mayoría Gram positivos debido a que las especies importantes de interés médico, en particular *B. anthracis* y *B. cereus*, son claramente Gram positivas (Cowan & Steel, 1993).

Debido a su naturaleza productora de endosporas (formas bacterianas durmientes, termoresistentes), *Bacillus* puede sobrevivir durante años en los ambientes más inhóspitos, por lo que en la naturaleza pueden aislarse muchas especies (Murray, 2018).

Son positivos a la prueba de catalasa aunque negativos a la reacción de oxidasa y pueden fermentar u oxidar los carbohidratos dependiendo de la especie así como pueden ser móviles o no, tal como se puede observar en la Figura 1.

**Table 6.1.** First-stage table for Gram-positive bacteria

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Shape	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Acid fast	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w	+
Spores	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motility	-	-	-	-	D	-	-	d	-	-	+	-	-	-	-	-	-	D	D	-	-
Growth in air	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	d	+	+	+
Growth anaerobically†	-	+	w	w	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	D	-	-	?
Catalase	+	+	w	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
Oxidase	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	?	?	?	?	d	-	-	-
Glucose (acid)	D	+	+	+	+	+	+/-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	D	D	+	+
Carbohydrates [F/O/-]	O/-	F	F	F	F	F	F/-	-	-	F	F/-	F	F	F	F	F	-	F/-	F/O/-	O	O
<i>Micrococcus</i> <sup>a</sup>	+																				
<i>Staphylococcus</i>		+																			
<i>Aerococcus</i>			+	+																	
<i>Enterococcus</i>					+																
<i>Streptococcus</i>						+															
<i>Lactococcus</i>							+														
<i>Pediococcus</i> <sup>b</sup>								+													
<i>Gemella</i>									+												
<i>Anaerobic cocci</i> <sup>*</sup>										+											
<i>Kurthia</i>											+										
<i>Corynebacterium</i>												+	+								
<i>Listeria</i>														+							
<i>Brochothrix</i>																					
<i>Erysipelothrix</i>																					
<i>Lactobacillus</i>																					
<i>Arcanobacterium</i>																					
<i>Arachnia</i> <sup>c</sup>																					
<i>Rothia</i>																					
<i>Propionibacterium</i>																					
<i>Actinomyces</i>																					
<i>Bifidobacterium</i>																					
<i>Eubacterium</i>																					
<i>Clostridium</i> <sup>d</sup>																					
<b><i>Bacillus</i></b>																					
<i>Nocardia</i> <sup>e</sup>																					
<i>Mycobacterium</i>																					

- \* *Peptococcus* and *Peptostreptococcus*.
- a Also *Stomatococcus*.
- b Also *Leuconostoc*.
- c Also *Actinomyces odontolyticus*.
- d Exceptions: *C. histolyticum*; *C. tertium*; *C. carnis*.
- e Also *Actinomadura*.
- † Anaerobic growth of anaerobes inhibited by metronidazole.
- D Different reactions in different species of the genus.
- d Different reactions in different strains.
- F Fermentation.
- O Oxidation.
- w Weak reaction.
- ? Not known.
- ◊ Asporogenous variants.
- ⊕ Typical form.

- ◊ Cultural characters of these organisms can be found in tables with the number indicated.
- S Sphere (coccus).
- R Rod-shaped (bacillus).
- NT Not testable.

**Figura 1.** Pruebas para la identificación del género *Bacillus* (Cowan & Steel, 1993).

#### 4.1.1. *Bacillus anthracis*

##### 4.1.1.1. Características

*B. anthracis* es una bacteria Gram positiva en forma de bastón que forma esporas que crecen en condiciones anaeróbicas y aeróbicas. Las células de *B. anthracis* son bastante grandes, con una variación de tamaño de los bastones de  $1 \times 3 \mu\text{m}$  hasta  $1.3 \times 10 \mu\text{m}$  (Pohanka, 2020).

El organismo produce toxinas que son importantes para la virulencia clínica. El origen del nombre proviene de la palabra griega "anthrakis", que significa negro, en referencia a la lesión necrótica que se observa en el ántrax cutáneo (Simonsen & Chatterjee, 2021).

Para que *B. anthracis* cause enfermedades, debe poseer genes para la producción de cápsula y tres proteínas individuales:

- Polipéptido capsular de ácido poli-D-glutámico que inhibe la fagocitosis,
- Toxina del edema (antígeno protector + factor del edema) con actividad adenilato-ciclasa, responsable de la acumulación de fluidos,
- Y toxina letal (antígeno protector + factor letal), que estimula la liberación de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y otras citocinas proinflamatorias por parte de los macrófagos (Murray, 2018).

##### 4.1.1.2. Enfermedad clínica

En los seres humanos, existen tres vías principales de infección por *B. anthracis*: cutánea, respiratoria y gastrointestinal.

El ántrax (carbunco) cutáneo es la manifestación más común de *B. anthracis* en humanos, representando > 95 % de los casos. La mayoría de las veces se contrae a través de esporas que ingresan a través de cortes en la piel en personas que manipulan productos animales infectados, como carne, lana, pieles y cuero, y más raramente, a través de picaduras de insectos (Figura 2) (Chateau *et al*, 2020).

Es el más frecuente en humanos manifestándose como pápulas indoloras que progresan a ulceración con vesículas perilesionales y posteriormente formación de

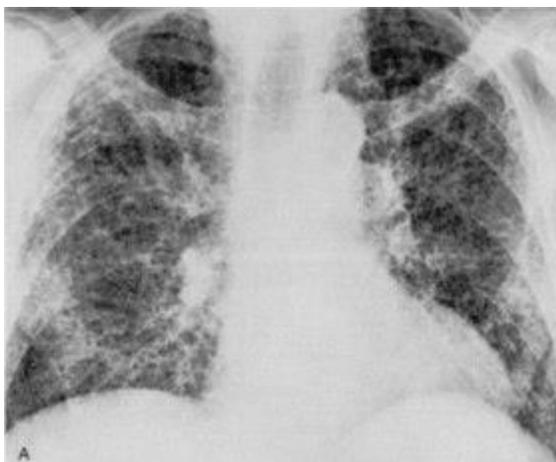
escara; si no se trata puede cursar con adenopatía dolorosa, edema y signos sistémicos (Murray, 2018).



**Figura 2.** Propagación de *Bacillus anthracis*.

Para que se pueda producir la infección es necesario que la piel de la persona esté lesionada, bien sea por una herida, un corte, o cualquier otro daño, de tal forma que el microorganismo pueda penetrar a través de esa zona y llegar al interior del cuerpo (Laboratorio de Análisis Clínicos ALFA, 2016).

El ántrax por inhalación presenta signos iniciales inespecíficos seguidos de un cuadro de sepsis de comienzo rápido, con fiebre, edema y adenopatías (mediastínicas). El mayor riesgo asociado al carbunco en los países industrializados corresponde a la utilización de *B. anthracis* como agente de bioterrorismo (Murray, 2018).



**Figura 3.** Infección pulmonar por carbunco o ántrax.

Sucede cuando las esporas son inhaladas y llegan a los pulmones a través de la vía respiratoria, donde germinarán posteriormente (Laboratorio de Análisis Clínicos ALFA, 2016).

El carbunco gastrointestinal (más común en herbívoros) se manifiesta en forma de úlceras en el punto de invasión (p. ej., boca, esófago, intestino) y se siguen de adenopatías regionales, edema y sepsis (Murray, 2018).

El carbunco por inhalación o gastrointestinal debe ser tratado con ciprofloxacino o doxiciclina, en combinación con uno o dos antibióticos adicionales (p. ej., rifampicina, vancomicina, penicilina, imipenem, clindamicina, claritromicina) (Murray, 2018).

El carbunco cutáneo de adquisición natural puede ser tratado con amoxicilina. La vacunación del ganado y de las personas de las zonas endémicas puede controlar la enfermedad, pero las esporas son difíciles de eliminar de la tierra contaminada.

Cabe mencionar que el carbunco es una enfermedad animal, por lo que debemos considerar esta enfermedad como enfermedad zoonótica y tener en cuenta que los humanos son víctimas accidentales (Murray, 2018).

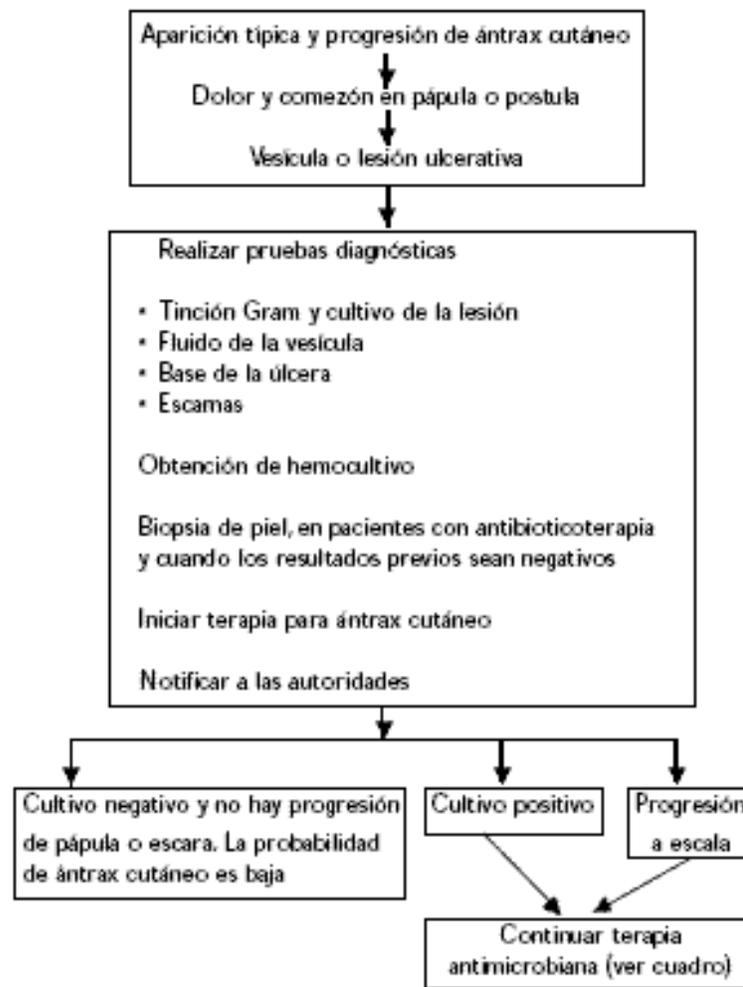
#### 4.1.1.3. Diagnóstico

*Bacillus anthracis* puede aislarse de muestras como: exudado, líquido pleural, LCR, sangre y tejidos (Elu Escalante *et al.*, 2021).

El diagnóstico diferencial del ántrax por inhalación incluye neumonía adquirida en la comunidad, influenza, virus respiratorio sincitial, peste neumónica y tularemia. El diagnóstico diferencial del ántrax cutáneo incluye absceso cutáneo estafilocócico,

enfermedad por arañazo de gato, tularemia, picadura de araña y ectima gangrenoso. Otras consideraciones diagnósticas diferenciales del ántrax gastrointestinal incluyen la tularemia ulceroglandular o la peste bubónica (Simonsen & Chatterjee, 2021).

En los casos en quienes se sospecha ántrax cutáneo se recomienda efectuar pruebas diagnósticas (tinción de Gram y cultivo en las lesiones, hemocultivo y biopsia de piel, si es necesario (Ver Figura 4) (Valdespino & García, s.f.).



**Figura 4.** Flujograma de evaluación clínica de casos posibles de ántrax cutáneo (Valdespino & García, s.f.).

Las infecciones por *B. anthracis* son raras, por lo que puede que no se piense en ellas inicialmente y que el microbiólogo tenga poca o ninguna experiencia en la identificación del microorganismo (Murray, 2018).

El microorganismo es inmóvil en medios semisólidos y además es catalasa positivo, estas dos especificaciones se utilizan para la identificación microbiológica. El agar PLET (Ver anexo) parece ser el medio más eficaz para el aislamiento de *B. anthracis*, preparado a base de polimixina, lisozima, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y acetato de talio. (Pohanka, 2020). Las colonias de *B. anthracis* en el medio de cultivo PLET se aprecian pequeñas, blancas, abultadas y circulares. Sin embargo, el acetato de talio es altamente tóxico y, por lo tanto, el uso del medio PLET está excluido en algunos países debido a las normas laborales y de seguridad (Zasada, 2020). Existen varias normas que prohíben el uso de agar PLET para la identificación de *Bacillus anthracis*, por ejemplo, la Administración de Seguridad y Salud Ocupacional (OSHA) ha establecido un límite de exposición ocupacional de 0.1 mg de compuestos solubles de talio por metro cúbico de aire en el lugar de trabajo (mg de talio/m<sup>3</sup>/piel) para un día laboral de 8 h durante una semana de trabajo de 40 h. En este caso, “piel” indica que deben tomarse medidas para prevenir la exposición de la piel al talio (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR), 2016).

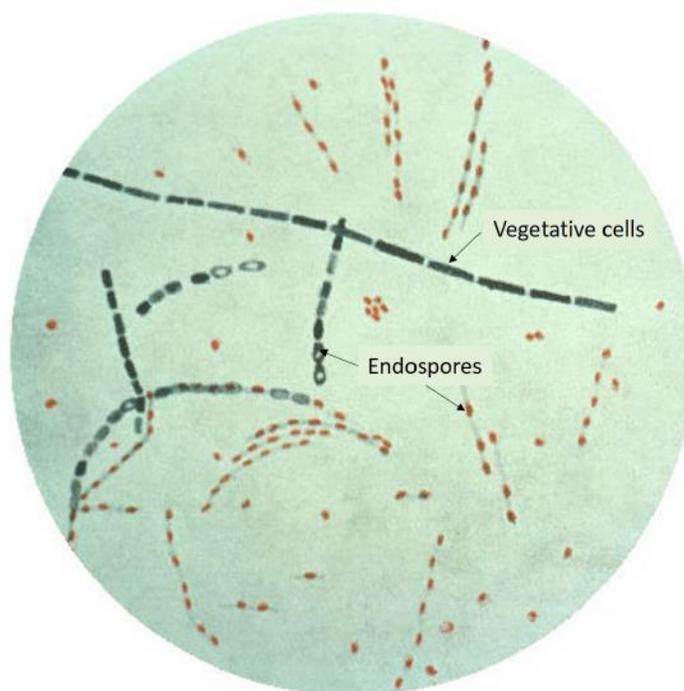
Sin embargo, al no ser considerado un bacilo exigente, el microorganismo crece bien en placas de agar con 5 % de sangre de cordero a 35-37 °C en 24 h con o sin CO<sub>2</sub>. En la primera lectura, se aprecian en ellas colonias grandes, blancas o grisáceas de entre 2-5 mm, con apariencia seca. Sus bordes son irregulares desarrollándose a menudo unas proyecciones de las colonias con aspecto de “cabeza de medusa” o “melenas de león” (Elu Escalante *et al.*, 2021).

Aunque el cultivo es un método estándar y es necesario para la confirmación de resultados, tiene un uso limitado para las contramedidas de primera respuesta debido a que los protocolos de cultivo tardan de uno a dos días (Zasada, 2020).

Dos pruebas para confirmar la identidad de *B. anthracis* son la lisis del fago gamma y la sensibilidad a la penicilina. Dado que el rendimiento de la prueba de lisis del fago gamma puede resultar afectada por la densidad del inóculo bacteriano,

Abshire *et al.* (2005) recomendaron sembrar una estría del cultivo sospechoso en la placa de agar sobre varios cuadrantes en lugar de emplear un formato de surco de estría e inocular una gota de fago gamma en los cuadrantes primero y segundo de la placa. Si se sospecha de *B. anthracis* resistente al antibiótico o al fago, pueden emplearse métodos de diagnóstico por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2018).

Con la reacción de M'Fadyean las bacterias deben verse fijadas con calor o por inmersión del frotis en alcohol al 95-100 % durante más o menos 1 min y secados al aire, y después teñido con azul de metileno policrómico. La cápsula se colorea de rosa, mientras que las células del bacilo se tiñen de azul oscuro. Las células se encuentran en pares o en cadenas cortas y a menudo terminan como cortadas a bisel (las cadenas a veces parecen un conjunto de coches del tren, el denominado aspecto en 'vagones de ferrocarril' o "cañas de bambú segmentadas") (Ver Figura 5). Ni la tinción de Gram ni la de Giemsa ponen de manifiesto la cápsula (Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2018).



**Figura 5.** Tinción de endosporas de *Bacillus anthracis* (Kagle, 2022).

La tinción mediante Verde de Malaquita (técnica de Shaeffer-Fulton) permite detectar la presencia de microorganismos con esporas. La gruesa pared externa de la espora es resistente al calor y a la tinción con diversos colorantes. Para forzar la tinción con el Verde de Malaquita se utiliza calor. Una vez el colorante ha penetrado en la espora, se retira la preparación de la fuente de calor y se elimina el colorante de las células vegetativas por un simple lavado con agua. La espora retiene el colorante y queda teñida de color verde. Como colorante de contraste, para la tinción de las células vegetativas, se utiliza Safranina (Química Clínica Aplicada, 2016).

La cápsula no se presenta en *B. anthracis* cuando crece aeróbicamente sobre agar nutritivo o en caldo nutritivo, pero puede verse cuando la bacteria virulenta se cultiva durante unas pocas horas en unos mililitros de sangre (la sangre desfibrinada de caballo o de oveja parece ser la más adecuada) (Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2018).

En la Figura 6 se pueden observar algunas pruebas bioquímicas secundarias para complementar el diagnóstico microbiológico de *Bacillus anthracis* como el crecimiento en NaCl al 10 %, positividad a la prueba de Voges Proskauer así como a la reducción de nitratos, etc.

La identificación de especies del género *Bacillus* por métodos clásicos suele ser difícil, a pesar de que todavía prevalecen en muchos laboratorios de Microbiología, debido a las similitudes entre especies estrechamente relacionadas que comparten un patrón de características morfológicas, bioquímicas y genéticas (Celandroni *et al.*, 2019).

**Table 6.9a.** Second-stage table for *Bacillus* species

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Gram reaction	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	d	d	d	-	d	+	-	-	d	+	d	d	d
Chains of cells	+	+	+	+	d	d	+	+	d	d	d	d	d	d	-	d	-	-	-	+	d	-	d	-
Motility*	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cell length > 3µm	+	+	+	+	-	-	d	-	-	-	-	+	-	+	d	d	d	d	d	+	+	-	-	-
Spore position and shape	VX	VTX	TYX	VX	VX	VTX	VX	VX	VX	TY	VTX	VX	VX	VTX										
Swelling of cell body by spore	-	-	-	-	d	d	-	-	-	-	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	d	+	+
Growth at 50 °C	-	-	-	-	-	-	-	d	+	+	+	+	+	-	+	d	-	+	-	-	d	+	+	+
Growth in 10% NaCl	+	d	d	d	+	-	+	d	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anaerobic growth	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	d	-	-
Carbohydrates, acid from ASS:																								
glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
cellobiose	-	d	d	d	-	d	+	+	+	+	+	d	-	+	-	+	d	+	+	-	-	d	d	d
galactose	-	-	d	-	-	d	+	+	d	+	d	d	-	d	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
mannose	-	-	-	d	d	+	d	+	+	+	d	+	d	+	d	-	+	d	+	+	-	+	d	+
melibiose	-	-	-	-	-	d	+	d	d	d	d	+	-	d	-	+	-	+	+	-	-	d	-	+
raffinose	-	-	-	-	-	-	d	+	+	+	d	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	d	d	+
salicin	-	+	d	d	-	d	+	+	+	+	+	d	d	d	-	+	d	+	+	-	-	d	+	d
xylose	-	-	-	-	-	+	+	+	d	+	d	d	-	-	+	-	+	+	+	-	-	d	+	-
ONPG	-	-	d	-	d	+	+	+	+	+	+	d	d	d	d	d	+	-	+	+	-	-	d	-
Utilization of citrate	-	d	d	+	-	-	+	+	+	+	d	d	-	-	d	-	-	-	-	d	d	-	-	-
Urease	-	d	d	-	-	+	d	-	-	d	-	-	-	d	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	+	+	+	+	-	-	-	+	+	d	+	d	d	+	-	d	+	d	+	-	-	d	+	d
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	-	d	-	+	+	+	d	d	-	d	d	+	+	+	d	-	+	-	d
Casein hydrolysis	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	d	-	+	+	d	-	-	d
Hippurate hydrolysis	-	-	-	-	+	+	-	+	d	-	-	+	-	+	+	-	d	d	-	-	d	+	+	+
Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+
Oxidase	d	d	d	d	-	+	-	-	-	-	-	-	d	+	-	-	-	+	-	+	d	-	-	-

<b>1</b> <i>Bacillus anthracis</i>	<b>9</b> <i>Bacillus subtilis</i>	<b>17</b> <i>Bacillus laterosporus</i>
<b>2</b> <i>Bacillus cereus</i> ; <i>B. anthracoides</i>	<b>10</b> <i>Bacillus licheniformis</i>	<b>18</b> <i>Bacillus macerans</i>
<b>3</b> <i>Bacillus mycoides</i>	<b>11</b> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<b>19</b> <i>Bacillus polymyxa</i>
<b>4</b> <i>Bacillus thuringiensis</i>	<b>12</b> <i>Bacillus coagulans</i>	<b>20</b> <i>Bacillus sphaericus</i>
<b>5</b> <i>Bacillus firmus</i>	<b>13</b> <i>Bacillus pantothenicus</i>	<b>21</b> <i>Bacillus badius</i>
<b>6</b> <i>Bacillus lentus</i>	<b>14</b> <i>Bacillus alvei</i>	<b>22</b> <i>Bacillus stearothermophilus</i> (Group I: Wolf & Barker, 1968; Walker & Wolf, 1971).
<b>7</b> <i>Bacillus megaterium</i>	<b>15</b> <i>Bacillus brevis</i>	<b>23</b> <i>Bacillus stearothermophilus</i> (Group II: Wolf & Barker, 1968; Walker & Wolf, 1971).
<b>8</b> <i>Bacillus pumilus</i>	<b>16</b> <i>Bacillus circulans</i>	<b>24</b> <i>Bacillus stearothermophilus</i> (Group III: Wolf & Barker, 1968; Walker & Wolf, 1971).

\* All motile species may produce non-motile variants

T spore terminal  
V spore central/subterminal  
X spore oval (ellipsoidal)  
Y spore round

**Figura 6.** Pruebas bioquímicas para la identificación de las especies de *Bacillus*. Podemos observar a *B. anthracis* y sus pruebas correspondientes señaladas con color morado (Cowan & Steel, 1993).

#### 4.1.2. *Bacillus cereus*

##### 4.1.2.1. Características

*Bacillus cereus* es una bacteria Gram positiva productora de toxinas, anaerobia facultativa, que se encuentra en el suelo, la vegetación y como contaminante de varios alimentos, es decir, carne de res, pavo, arroz, frijoles, vegetales. Comúnmente causa enfermedades intestinales con náuseas, vómitos y diarrea. Sin embargo, se ha asociado con infecciones graves en huéspedes inmunocomprometidos y puede causar septicemia y endoftalmítis, lo que puede conducir a la pérdida de la visión (McDowell, 2021).

El grupo *B. cereus* está formado por 6 especies bacterianas estrechamente relacionadas entre sí: *B. cereus sensu stricto*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis* y *B. weihentephanensis* (Adame, 2019).

El potencial de patogenicidad de *B. cereus* es extremadamente variable, siendo las cepas inofensivas y otras letales. Esta variabilidad dificulta la comunicación sobre la peligrosidad de *B. cereus* y, a menudo, conduce a malentendidos y mala gestión de los riesgos asociados. Por lo tanto, la caracterización del potencial de patogenicidad de *B. cereus* es un gran desafío para las industrias agroalimentarias y los hospitales (Ramarao, 2020).

Entre las toxinas secretadas por *B. cereus* se encuentran: la cereulida, toxina termoestable, resistente a pH ácido y a proteasas, originando el síndrome emético caracterizado por náuseas y vómito. Por otro lado, las toxinas diarreogénicas, como la hemolisina BL (HBL), enterotoxina no hemolítica (NHE) y citotoxina K (CYTK) son producidas durante el crecimiento vegetativo de la bacteria en el intestino delgado. Las tres toxinas tienen actividad lítica contra enterocitos, el mecanismo se desconoce con precisión; sin embargo, se sugiere la formación de poros en la membrana lipídica de las células, lo que conduce a la lisis osmótica (Adame, 2019).

#### 4.1.2.2. Enfermedad clínica

Básicamente, *B. cereus* es responsable de dos tipos de enfermedades gastrointestinales. El tipo de enfermedad emética se caracteriza principalmente por náuseas y emesis, que aparecen tan pronto como media hora después del consumo del alimento contaminado y son clínicamente indistinguibles de las intoxicaciones con enterotoxinas de *Staphylococcus aureus*. (Dietrich, 2021) Se asocia más a menudo con los productos de arroz, pero también se ha asociado con otros tipos de productos ricos en almidón como la patata, la pasta y el queso (McDowell, 2021).

Por otro lado, la gastroenteritis de forma diarreica se manifiesta principalmente en un cuadro de diarrea y calambres abdominales, similar a la intoxicación alimentaria por *Clostridium perfringens* tipo A. Los síntomas ocurren después de aproximadamente 8-16 h (Dietrich, 2021). La enfermedad diarreica a menudo está relacionada con las carnes, la leche, las verduras y el pescado. *B. cereus* también se ha implicado en infecciones de los ojos, vías respiratorias y heridas (McDowell, 2021).

Entre el diagnóstico diferencial de las enfermedades gastrointestinales que causa *Bacillus cereus* se encuentran (McDowell, 2021):

- Infecciones virales (p. ej., rotavirus): La gastroenteritis viral es una infección de los intestinos que suele causar diarrea acuosa, dolor o calambres en el abdomen, náuseas o vómitos, y a veces fiebre. Cualquier persona puede contraer gastroenteritis viral. Algunas personas tienen más probabilidad de tener síntomas severos, incluyendo los bebés y los niños pequeños, los adultos mayores y las personas que tienen un sistema inmunitario debilitado (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2018).
- Infecciones bacterianas: Los síntomas más habituales son diarrea, dolor abdominal y malestar general. Cuando el agente causal invade la mucosa intestinal y libera su toxina, como es el caso de la *Salmonella*, *Shigella* y

*Campylobacter*, el periodo de incubación es superior (24-48 h). Puede padecerlo cualquier persona (Clínica Universidad de Navarra, s.f.).

- Infecciones parasitarias: Ciertos parásitos intestinales, en especial la *Giardia intestinalis*, se adhieren a las células del revestimiento intestinal, causando náuseas, vómitos, diarrea y una sensación de malestar general. Otro parásito intestinal, llamado *Cryptosporidium parvum*, provoca diarrea acuosa que algunas veces se acompaña de retortijones abdominales, náuseas y vómitos. la gastroenteritis puede provenir de aguas contaminadas o alimentos cocinados inadecuadamente, estropeados o contaminados, como puede ocurrir con los mariscos crudos o la mayonesa dejada fuera de la nevera demasiado tiempo (Gotfried, 2021)
- Toxinas (*Staphylococcus aureus*): La enterotoxina B estafilocócica (EBE) es una exotoxina producida por *Staphylococcus aureus*. Es una de las toxinas responsables de intoxicación alimentaria por estafilococos en humanos; y en algunos países ha sido producida como arma biológica (The Center for Food Security & Public Health, 2007). Entre los alimentos que más frecuentemente están contaminados se incluyen las salsas, los pasteles con crema, la leche, las carnes preparadas y el pescado. Por lo general, los síntomas de la intoxicación alimentaria por estafilococos se inician de forma repentina con náuseas y vómitos intensos, alrededor de 0.5 -8 h después de ingerir los alimentos contaminados. Otros síntomas consisten en retortijones abdominales, diarrea y a veces dolor de cabeza y fiebre (Gotfried, 2021)
- Apendicitis: Los signos y síntomas suelen ser anorexia, cólico periumbilical, náuseas y vómitos, seguidos de fiebre moderada (38 °C) y signos de inflamación peritoneal en el cuadrante inferior derecho del abdomen. Ocurre en pacientes entre 10 y 20 años (Valverde *et al.*, 2021). Entre las principales bacterias asociadas a apendicitis aguda se

encuentran *E. coli*, *Bacteroides fragilis* y *Klebsiella pneumoniae* (Pacheco, 2014).

- **Diverticulitis:** Se presenta una diverticulitis cuando los divertículos se inflaman. La diverticulitis puede aparecer repentinamente y podría causar complicaciones graves. La diverticulitis podría causar síntomas agudos como dolor con mayor frecuencia en el lado inferior izquierdo del abdomen, estreñimiento o diarrea, fiebre y escalofrío, náuseas o vómito. Entre los factores que causan la diverticulitis se encuentran: bacterias o heces que quedan atrapadas en una bolsa, o divertículo, en el colon o cambios en la microbiota de los intestinos (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2021).
- **Isquemia mesentérica:** La pérdida repentina del flujo sanguíneo al intestino delgado (isquemia mesentérica aguda) a causa de un coágulo de sangre requiere cirugía de inmediato. Entre los signos y síntomas se encuentran: Dolor abdominal abrupto e intenso, necesidad urgente de defecar, fiebre, náuseas y vómitos.

La isquemia mesentérica que se desarrolla a lo largo del tiempo (crónica) se trata con una angioplastia o una cirugía abierta. Algunos de los signos y síntomas de la forma crónica de la isquemia mesentérica son: dolor abdominal que comienza unos 30 min después de comer, dolor que empeora durante una hora y dolor que desaparece al cabo de una a tres horas (Mayo Clinic, 2021).

Las personas mayores de 50 años tienen más probabilidades de desarrollar la enfermedad (Mayo Clinic, 2021).

#### 4.1.2.3. Diagnóstico

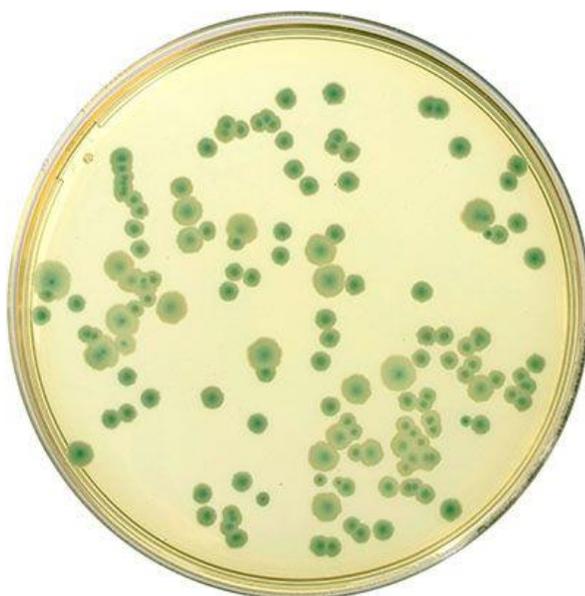
*Bacillus cereus* puede aislarse de muestras como: arroz, suelo (Riedel *et al.*, 2020)

*B. cereus* es un bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo y móvil debido a la presencia de flagelos peritricos. Es capaz de crecer en un amplio rango de temperaturas, desde los 4-48 °C, a pH's de 4.9-9.3 y soporta concentraciones de NaCl en el medio hasta del 7 % (Sánchez, 2016).

El método tradicional para la detección de *B. cereus* es el recuento basado en placas de agar, para el cual las directrices las proporciona la norma **ISO 7932:2004**. Se necesitan varios subpuntos laboriosos, como: homogeneización de la muestra, numerosas centrifugaciones y preparaciones de dilución en serie, todas realizadas en condiciones asépticas para evitar cualquier contaminación. Los pasos de siembra deben realizarse por duplicado para cada dilución utilizando medios específicos. Luego, las placas deben incubarse a 30 °C durante 24-48 h. Finalmente, las colonias tienen que ser sembradas en el medio de agar Brain Heart Infusion (BHI) (Ver anexo).

El método **ISO 7932:2004** especifica una prueba horizontal para la enumeración de presuntas células de *B. cereus*. Este método consiste en una dilución seriada de las muestras y una posterior dilución esparcida en agar Mossel (Ver anexo), medio selectivo para *B. cereus* (MYP). Es necesaria la incubación de las colonias a 30 °C durante 18-24 h. En medio MYP, colonias de *B. cereus* tienen un color rosa-morado, rodeadas de un halo característico formado por una precipitación rosada, que permite su identificación (Ramarao, 2020).

Los métodos AFNOR BKR 23-06-02-10 y AFNOR AES-10/10-07/10 utilizan un medio cromogénico selectivo, COMPASS y BACARA (Ver anexo) respectivamente. Después de la hidrolización del sustrato cromogénico, las colonias de *B. cereus* aparecen en verde (COMPASS) (Figura 7) o en naranja rodeadas por un halo opaco (BACARA). Estos agares selectivos inhiben la mayoría de la microbiota de fondo y permiten una fácil identificación. Además, ahorran tiempo y no implican un paso de confirmación.



**Figura 7.** Crecimiento de *Bacillus cereus* en medio COMPASS.

COMPASS *Bacillus cereus* Agar, es un medio usado para la detección y enumeración de esporas y formas vegetativas de presuntos *Bacillus cereus* en productos para la alimentación humana y animal (Bioser, s.f).

En la Figura inferior se muestran las diferentes pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de *B. cereus*.

**Table 6.9a.** Second-stage table for *Bacillus* species

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Gram reaction	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	d	d	d	-	d	+	-	-	d	+	d	d	d
Chains of cells	+	+	+	+	d	d	+	+	d	d	d	d	d	d	-	d	-	-	-	-	+	d	-	d
Motility*	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cell length > 3µm	+	+	+	+	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	+	d	d	d	d	+	+	-	-	-
Spore position and shape	VX	VTX	TYX	VX	VX	VTX	VX	VX	VX	TY	VTX	VX	VX	VTX										
Swelling of cell body by spore	-	-	-	-	d	d	-	-	-	-	-	-	d	+	+	+	+	+	+	+	-	d	+	+
Growth at 50 °C	-	-	-	-	-	-	-	d	+	+	+	+	+	-	+	d	-	+	-	-	d	+	+	+
Growth in 10% NaCl	+	d	d	d	+	-	+	d	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anaerobic growth	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	d	-	-
Carbohydrates, acid from ASS:																								
glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
cellobiose	-	d	d	d	-	d	+	+	+	+	d	d	-	+	-	+	d	+	+	-	-	d	d	d
galactose	-	-	d	-	d	+	+	+	d	+	d	d	-	d	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
mannose	-	-	-	d	d	+	d	+	+	+	d	+	d	d	-	+	d	+	+	-	-	+	d	+
melibiose	-	-	-	-	d	+	d	d	d	d	+	+	-	d	-	+	-	+	+	-	-	d	+	+
raffinose	-	-	-	-	-	d	+	+	+	d	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	d	d	+
salicin	-	+	d	d	-	d	+	+	+	+	+	d	d	d	-	+	d	+	+	-	-	d	+	d
xylose	-	-	-	-	-	-	+	+	d	+	d	d	-	-	+	-	+	+	+	-	-	d	+	+
ONPG	-	-	d	-	d	+	+	+	+	+	d	d	d	d	+	+	+	+	+	-	-	d	-	-
Utilization of citrate	-	d	d	+	-	-	+	+	+	+	d	d	-	-	d	-	-	-	-	d	d	-	-	-
Urease	-	d	d	-	-	+	d	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	+	+	+	+	-	-	+	+	d	+	d	d	+	-	d	+	d	+	+	-	-	d	+	d
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	-	d	-	+	+	+	d	d	-	d	d	+	+	+	+	d	-	+	d
Casein hydrolysis	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	d	-	+	+	d	-	-	d
Hippurate hydrolysis	-	-	-	-	+	+	-	+	d	-	+	-	+	+	-	d	d	-	-	-	d	+	+	+
Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Oxidase	d	d	d	d	-	+	-	-	-	-	-	-	d	+	-	-	-	+	-	+	d	-	-	-

<b>1</b> <i>Bacillus anthracis</i>	<b>9</b> <i>Bacillus subtilis</i>	<b>17</b> <i>Bacillus laterosporus</i>
<b>2</b> <i>Bacillus cereus</i> ; <i>B. anthracoides</i>	<b>10</b> <i>Bacillus licheniformis</i>	<b>18</b> <i>Bacillus macerans</i>
<b>3</b> <i>Bacillus mycoides</i>	<b>11</b> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<b>19</b> <i>Bacillus polymyxa</i>
<b>4</b> <i>Bacillus thuringiensis</i>	<b>12</b> <i>Bacillus coagulans</i>	<b>20</b> <i>Bacillus sphaericus</i>
<b>5</b> <i>Bacillus firmus</i>	<b>13</b> <i>Bacillus pantothenicus</i>	<b>21</b> <i>Bacillus badius</i>
<b>6</b> <i>Bacillus lentus</i>	<b>14</b> <i>Bacillus alvei</i>	<b>22</b> <i>Bacillus stearothermophilus</i> (Group I: Wolf & Barker, 1968; Walker & Wolf, 1971).
<b>7</b> <i>Bacillus megaterium</i>	<b>15</b> <i>Bacillus brevis</i>	<b>23</b> <i>Bacillus stearothermophilus</i> (Group II: Wolf & Barker, 1968; Walker & Wolf, 1971).
<b>8</b> <i>Bacillus pumilus</i>	<b>16</b> <i>Bacillus circulans</i>	<b>24</b> <i>Bacillus stearothermophilus</i> (Group III: Wolf & Barker, 1968; Walker & Wolf, 1971).

\* All motile species may produce non-motile variants  
T spore terminal  
V spore central/subterminal  
X spore oval (ellipsoidal)  
Y spore round

**Figura 8.** Pruebas bioquímicas para la identificación de las especies de *Bacillus*. Podemos observar a *Bacillus cereus* y sus pruebas correspondientes señaladas con color azul (Cowan & Steel, 1993).

Los métodos moleculares utilizados para la identificación de *B. cereus* ofrecen muchas ventajas en comparación con los métodos tradicionales, como versatilidad, menor consumo de tiempo y recursos, y alta especificidad.

A pesar de las ventajas que ofrecen las técnicas moleculares, al superar los inconvenientes del método tradicional, como la rápida identificación bacteriana a menor costo de análisis, el primero presenta varias limitaciones. De hecho, se requieren

profesionales capacitados para realizar este tipo de ensayos, que aún son laboriosos (la prueba de PCR toma de 2-24 h) y costosos (Ramarao, 2020).

#### 4.1.3. *Bacillus subtilis*

##### 4.1.3.1. Características

*Bacillus subtilis* es una bacteria aerobia Gram positiva. Produce esporas en condiciones ambientales adversas, lo que ayuda a la supervivencia de sus cepas a pesar de las diversas tensiones ambientales (Lv, 2020).

*B. subtilis* es un probiótico multifuncional ideal, con un gran potencial para prevenir el crecimiento de bacterias patógenas y mejorar la asimilación de nutrientes (Su, 2020).

Debido a su estado GRAS (Generally recognized as safe), las proteasas de *B. subtilis* se pueden utilizar en diversas aplicaciones alimentarias, como la preparación de hidrolizado de soja, el ablandamiento de la carne, la preparación de hidrolizado de caseína, la coagulación de la leche y el tratamiento de residuos alimentarios (Su, 2020).

Además, tiene excelentes características fisiológicas y un metabolismo muy adaptable, lo que facilita su cultivo en sustratos económicos. En consecuencia, *B. subtilis* crece rápido y el ciclo de fermentación es más corto, por lo general, alrededor de 48 h, mientras que el ciclo de fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* es de alrededor de 180 h (Su, 2020).

##### 4.1.3.2. Enfermedad clínica

El grupo de *Bacillus subtilis* que incluye especies de gran importancia en la agricultura como *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. pumilus*, tradicionalmente no son considerados como patógenos para humanos, incluso a *B. subtilis* se le ha otorgado el estado de QPS (Qualified Presumption of Safety) por la **Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria** (EFSA, 2015). Sin embargo, existen algunos casos aislados de intoxicaciones por manifestaciones digestivas, es así el reportado por Pavic *et al.* (2005), señalando a *B. subtilis* y *B. licheniformis* como agentes causantes del brote de

intoxicación en un jardín de niños, ocasionado por la ingesta de leche en polvo, la cual contenía dichas especies bacterianas (Villarreal, 2018).

#### 4.1.3.3. Diagnóstico

*B. subtilis* crece a temperaturas que oscilan entre 10 °C y 55 °C, con tasas de crecimiento más rápidas a 42 °C. Forma esporas a temperaturas de hasta unos 44 °C, según la cepa y el medio, pero no se vuelve competente para la transformación por encima de los 37 °C. La mayoría de los estudios utilizan 37 °C. A esa temperatura, *B. subtilis* crece con un tiempo de duplicación de unos 30 min en un medio rico (Piggot, 2009). Puede crecer en un medio con concentraciones de NaCl hasta del 7 % (Calvo & Zuñiga, 2010).

*B. subtilis* puede crecer en un medio mínimo que contiene solo sales esenciales y fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo. Una gama de mono-, di-, oligo- y polisacáridos y alcoholes derivados del azúcar pueden servir como fuentes de carbono, al igual que los aminoácidos, péptidos y compuestos de 2, 3 y 4 carbonos. El nitrato, los iones de amonio, la urea, los aminoácidos, los péptidos y los nucleósidos pueden servir como fuentes de nitrógeno (Piggot, 2009).

Es por eso que por lo ya mencionado las bacterias presuntas de *B. subtilis* se deben someter a pruebas bioquímicas para exhibir el metabolismo de estas. En la Figura 9 podemos observar algunas pruebas bioquímicas que nos pueden dar una orientación para la identificación de dicha especie.

**Table 6.9a.** Second-stage table for *Bacillus* species

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Gram reaction	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	d	d	d	-	d	+	-	-	d	+	d	d	d
Chains of cells	+	+	+	+	d	d	+	+	d	d	d	d	d	d	-	d	-	-	-	-	+	d	-	d
Motility*	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cell length > 3µm	+	+	+	+	-	-	d	-	-	-	-	+	-	+	+	d	d	d	d	d	+	+	-	-
Spore position and shape	VX	VTX	TYX	VX	VX	VTX	VX	VX	VX	TY	VTX	VX	VX	VTX										
Swelling of cell body by spore	-	-	-	-	d	d	-	-	-	-	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	d	+	+
Growth at 50 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	d	-	+	-	-	d	+	+	+
Growth in 10% NaCl	+	d	d	d	+	-	-	+	d	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anaerobic growth	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	d	-	-
Carbohydrates, acid from ASS:																								
glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
cellobiose	-	d	d	d	-	d	+	+	+	+	+	d	-	+	-	+	d	+	+	-	-	d	d	d
galactose	-	-	d	-	-	d	+	+	d	+	d	d	-	d	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
mannose	-	-	-	d	d	+	d	+	+	+	d	+	d	d	-	+	d	+	+	-	-	+	d	+
melibiose	-	-	-	-	-	d	+	d	d	d	d	+	-	d	-	+	-	+	+	-	-	d	-	+
raffinose	-	-	-	-	-	-	d	+	+	d	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	d	d	+	+
salicin	-	+	d	d	-	d	+	+	+	+	+	d	d	d	-	+	d	+	+	-	-	d	+	d
xylose	-	-	-	-	-	-	+	+	d	+	d	d	-	-	+	-	+	+	+	-	-	d	+	-
ONPG	-	-	d	-	d	+	+	+	+	+	+	d	d	d	d	+	-	+	+	+	-	d	-	-
Utilization of citrate	-	d	d	+	-	-	+	+	+	+	d	d	-	-	d	-	-	-	-	d	d	-	-	-
Urease	-	d	d	-	-	+	d	-	-	d	-	-	-	d	-	-	-	-	-	d	d	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	+	+	+	+	-	-	-	+	+	d	+	d	d	+	-	d	+	d	+	-	-	d	+	d
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	-	d	-	+	+	+	d	d	-	d	d	+	+	+	d	-	+	-	d
Casein hydrolysis	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	d	-	+	+	d	-	-	d
Hippurate hydrolysis	-	-	-	-	+	+	-	+	d	-	-	+	-	+	+	-	d	d	-	-	d	+	+	+
Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Oxidase	d	d	d	d	-	+	-	-	-	-	-	-	d	+	-	-	+	-	+	+	d	-	-	-

<b>1</b> <i>Bacillus anthracis</i>	<b>9</b> <i>Bacillus subtilis</i>	<b>17</b> <i>Bacillus laterosporus</i>
<b>2</b> <i>Bacillus cereus</i> ; <i>B. anthracoides</i>	<b>10</b> <i>Bacillus licheniformis</i>	<b>18</b> <i>Bacillus macerans</i>
<b>3</b> <i>Bacillus mycoides</i>	<b>11</b> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<b>19</b> <i>Bacillus polymyxa</i>
<b>4</b> <i>Bacillus thuringiensis</i>	<b>12</b> <i>Bacillus coagulans</i>	<b>20</b> <i>Bacillus sphaericus</i>
<b>5</b> <i>Bacillus firmus</i>	<b>13</b> <i>Bacillus pantothenicus</i>	<b>21</b> <i>Bacillus badius</i>
<b>6</b> <i>Bacillus lentus</i>	<b>14</b> <i>Bacillus alvei</i>	<b>22</b> <i>Bacillus stearothermophilus</i> (Group I: Wolf & Barker, 1968; Walker & Wolf, 1971).
<b>7</b> <i>Bacillus megaterium</i>	<b>15</b> <i>Bacillus brevis</i>	<b>23</b> <i>Bacillus stearothermophilus</i> (Group II: Wolf & Barker, 1968; Walker & Wolf, 1971).
<b>8</b> <i>Bacillus pumilus</i>	<b>16</b> <i>Bacillus circulans</i>	<b>24</b> <i>Bacillus stearothermophilus</i> (Group III: Wolf & Barker, 1968; Walker & Wolf, 1971).

\* All motile species may produce non-motile variants

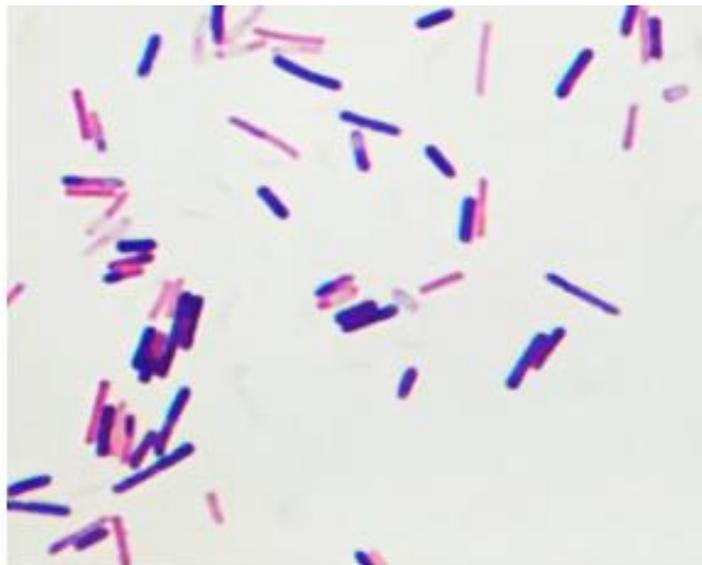
T spore terminal  
V spore central/subterminal  
X spore oval (ellipsoidal)  
Y spore round

**Figura 9.** Pruebas bioquímicas para la identificación de las especies de *Bacillus*. Podemos observar a *Bacillus subtilis* y sus pruebas correspondientes señaladas con color naranja (Cowan & Steel, 1993).

#### 4.2. Generalidades de *Clostridium*

*Clostridium* es un género de bacterias Gram positivas. Son anaerobios obligados capaces de producir endosporas. Las células reproductoras normales de *Clostridium*, denominadas forma vegetativa, tienen forma de bastón, lo que les da su nombre, del griego “*klostro*” o huso. Las endosporas de *Clostridium* tienen una forma distintiva de bolo o botella que las distingue de otras endosporas bacterianas, que suelen tener una forma ovoide (Ver Figura 10). Las especies de *Clostridium* habitan en los suelos y el tracto intestinal de los animales incluidos los humanos (Maczulak, 2011).

Los miembros mejor conocidos de este género son *Clostridium tetani* (causante del tétanos), *C. botulinum* (causante del botulismo) y *Clostridium perfringens* (causante de la gangrena gaseosa). Más recientemente, *C. difficile* ha ganado notoriedad por ser la causa más importante de enfermedad diarreica asociada a antibióticos y en la actualidad se considera una de las causas más importantes de infecciones nosocomiales (lo que no sorprende por el uso agresivo de los antibióticos) (Murray, 2018).



**Figura 10.** Bacilos de *Clostridium difficile* teñidos con la tinción de Gram (Flores, 2017).

En la Figura 11 podemos observar algunas pruebas con las que podemos identificar una bacteria Gram positiva con el género *Clostridium*.

**Table 6.1.** First-stage table for Gram-positive bacteria

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Shape	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Acid fast	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w	+
Spores	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Motility	-	-	-	-	D	-	-	d	-	-	+	-	-	-	-	-	-	D	D	-	-
Growth in air	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	d	+	+	+
Growth anaerobically†	-	+	w	w	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	D	-	?
Catalase	+	+	w	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
Oxidase	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	?	?	?	?	?	d	-	-
Glucose (acid)	D	+	+	+	+	+	+/-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	D	D	+	+
Carbohydrates [F/O/-]	O/-	F	F	F	F	F	F/-	-	-	F	F/-	F	F	F	F	F	-	F/-	F/O/-	O	O/NT
<i>Micrococcus</i> <sup>a</sup>	+	+																			
<i>Staphylococcus</i>		+																			
<i>Aerococcus</i>			+	+																	
<i>Enterococcus</i>					+																
<i>Streptococcus</i>						+															
<i>Lactococcus</i>							+														
<i>Pediococcus</i> <sup>b</sup>								+													
<i>Gemella</i>									+												
<i>Anaerobic cocci</i> <sup>*</sup>										+											
<i>Kurthia</i>											+										
<i>Corynebacterium</i>												+									
<i>Listeria</i>													+								
<i>Brochothrix</i>														+							
<i>Erysipelothrix</i>															+						
<i>Lactobacillus</i>																+					
<i>Arcanobacterium</i>																	+				
<i>Arachnia</i> <sup>c</sup>																		+			
<i>Rothia</i>																			+		
<i>Propionibacterium</i>																				+	
<i>Actinomyces</i>																					+
<i>Bifidobacterium</i>																					+
<i>Eubacterium</i>																					+
<i>Clostridium</i> <sup>d</sup>																					+
<i>Bacillus</i>																					+
<i>Nocardia</i> <sup>e</sup>																					+
<i>Mycobacterium</i>																					+

- \* *Peptococcus* and *Peptostreptococcus*.
- a Also *Stomatococcus*.
- b Also *Leuconostoc*.
- c Also *Actinomyces odontolyticus*.
- d Exceptions: *C. histolyticum*; *C. tertium*; *C. carnis*.
- e Also *Actinomadura*.
- † Anaerobic growth of anaerobes inhibited by metronidazole.
- D Different reactions in different species of the genus.
- d Different reactions in different strains.
- F Fermentation.
- O Oxidation.
- w Weak reaction.
- ? Not known.
- ◊ Asporogenous variants.
- ⊕ Typical form.

- ◊ Cultural characters of these organisms can be found in tables with the number indicated.
- S Sphere (coccus).
- R Rod-shaped (bacillus).
- NT Not testable.

**Figura 11.** Pruebas para la identificación del género *Clostridium* (Cowan & Steel, 1993).

#### 4.2.1. *Clostridium tetani*

##### 4.2.1.1. Características

*C. tetani* es un bacilo Gram positivo, saprofito, anaeróbico obligado, formador de esporas (Oliveira *et al.*, 2020; Almas *et al.*, 2021) (De Melo & Ferreira, 2022).

Las esporas de *C. tetani* pueden soportar condiciones anaeróbicas y de temperatura extrema tanto en ambientes interiores como exteriores y pueden aislarse de muestras fecales humanas y animales y/o del suelo (De Melo & Ferreira, 2022). Crece óptimamente entre 33 y 37 °C (Soria, 2007). Es bien sabido que las esporas del tétanos sobreviven en el medio ambiente durante varios años y son resistentes al calor y a los desinfectantes/antisépticos, pero pueden destruirse calentándolas a 239 °F (115 °C) durante 20 min (Hanif *et al.*, 2015; Almas *et al.*, 2021; George *et al.*, 2021) (De Melo & Ferreira, 2022).

La enfermedad se debe a una neurotoxina termolábil codificada por un plásmido (tetanospasmina). La tetanospasmina es una toxina A-B que inactiva las proteínas que regulan la liberación de los neurotransmisores inhibitorios glicina y ácido gamma-aminobutírico. El resultado es la falta de regulación de la actividad sináptica excitatoria en las motoneuronas, dando lugar a una parálisis espástica (Murray, 2018).

##### 4.2.1.2. Enfermedad clínica

*C. tetani* puede ingresar al cuerpo humano a través de heridas punzantes, laceraciones, cortes en la piel o inoculación con una jeringa infectada o picaduras de insectos. La fuente más común de infección es una herida que a menudo es trivial y puede pasar desapercibida, como una laceración menor por astillas o espinas de madera o metal (Bae & Bourget, 2022).

*C. tetani* es el agente causal de tétanos y según las características clínicas existen cuatro tipos: tétanos generalizado, neonatal, localizado y cerebral.

El tétanos generalizado es la forma más común de tétanos y ocurre en aproximadamente el 80 % de los casos. Los pacientes presentan un patrón

descendente de espasmos musculares, primero con trismo y risus sardonicus (sonrisa rígida debido a la contracción sostenida de la musculatura facial). Esto puede progresar a rigidez en el cuello, dificultad para tragar y músculos pectorales y de la pantorrilla rígidos. Estos espasmos pueden ocurrir hasta por 4 semanas, y la recuperación completa lleva meses (Bae & Bourget, 2022).

El tétanos neonatal es una forma generalizada de tétanos que se presenta en recién nacidos de madres no inmunizadas o por infección a través de un instrumento contaminado al cortar el cordón umbilical (Bae & Bourget, 2022).

El tétanos localizado y el tétanos cefálico son las formas más raras de tétanos. El tétanos localizado es la contracción persistente de los músculos en el sitio de la lesión que puede persistir durante semanas. Este tipo es raramente fatal; sin embargo, puede progresar a la forma generalizada de tétanos, que es más peligrosa para la vida. El tétanos cefálico o cerebral se limita a los músculos y nervios de la cabeza (Bae & Bourget, 2022).

#### 4.2.1.3. Diagnóstico

Para el aislamiento de *C. tetani*, se recomienda el uso de un método de Fildes modificado en el que el material se inoculara en un área pequeña de una placa de Agar Sangre. Después de una incubación de unas 10 h, se hacen subcultivos a partir del borde de la película de swarming en la placa (Figura 12); *C. tetani* suele moverse más rápidamente que otras bacterias, de modo que el borde del crecimiento a menudo produce el organismo en cultivo puro (Cowan & Steel, 1993).



**Figura 12.** Crecimiento de *Clostridium tetani* en Agar Sangre.

Se observa una película delgada y transparente de crecimiento con swarming característico de *C. tetani* (Ganesh et al, 2016).

La producción de indol es una característica exclusiva de *C. bifermentans*, *C. sordelli*, *C. sphenoides* y *C. tetani* entre las especies en consideración (Cowan & Steel, 1993).

En clostridios teñidos con Gram, algunas especies, en especial los anaerobios estrictos como *C. tetani* y *C. novyi*, a veces se tiñen de forma Gram negativa, sobre todo en cultivos viejos (Cowan & Steel, 1993).

Las esporas se muestran como áreas circulares u ovaladas sin teñir dentro de las células, pero se pueden teñir con el método del verde de malaquita. Cabe mencionar que las esporas terminales esféricas (baqueta) son características de *C. tetani* (Cowan & Steel, 1993).

## 4.2.2. *Clostridium botulinum*

### 4.2.2.1. Características

Los organismos *Clostridium botulinum* son rectos a ligeramente curvados, Gram positivos (en cultivos jóvenes), anaeróbicos móviles de 0.5-2.0 µm de ancho y de 1.6-22.0 µm de largo, con esporas subterminales ovaladas. *C. botulinum* son un grupo de organismos anaerobios, que se encuentran comúnmente en los suelos y hábitats acuáticos en todo el mundo. Los siete tipos de *C. botulinum* (A a G) se distinguen por las características antigénicas de las neurotoxinas que producen (L. Shiflett & Robinson-Dunn, 2016).

### 4.2.2.2. Enfermedad clínica

El botulismo humano es causado principalmente por las cepas de *C. botulinum* que producen los tipos de toxina A, B y E, pero se han informado casos raros de tipo F (L. Shiflett & Robinson-Dunn, 2016).

La exposición a la neurotoxina se produce a través de la ingestión de la toxina (botulismo transmitido por los alimentos), la colonización bacteriana de una herida (botulismo por heridas) o los intestinos (botulismo infantil y botulismo por colonización intestinal en adultos) y las inyecciones cosméticas o terapéuticas de alta concentración de toxina (botulismo iatrogénico). Además, se han planteado preocupaciones sobre la posibilidad de un evento de bioterrorismo que involucre exposición a toxinas a través de la contaminación intencional de alimentos o bebidas o mediante aerosolización. Los síntomas neurológicos son similares independientemente de la vía de exposición (Rao, 2021).

El botulismo clásicamente comienza con parálisis de los nervios craneales ("síntomas bulbares") que progresan a la debilidad descendente simétrica del tronco, las extremidades y el músculo liso, con parálisis flácida final. Los pacientes por lo general no tienen déficits sensoriales excepto visión borrosa, aunque ocasionalmente se observan parestesias. Los primeros síntomas típicos incluyen diplopía (trastornos visuales), disfagia (dificultad para tragar), disfonía (cambio de voz) y disartria (habla

arrastrada), lo que refleja la alta susceptibilidad de las terminales presinápticas eferentes de los nervios craneales a la actividad de BoNT (neurotoxina botulínica). (Jeffery, 2022)

En abril de 2002, la FDA aprobó el uso de la toxina botulínica tipo A con fines cosméticos. La toxina botulínica terapéutica contiene aproximadamente el 0.3 % de la dosis letal humana por inhalación estimada y solo el 0.005 % de la dosis letal humana oral estimada. Por lo tanto, no es probable que esta forma de toxina se utilice como arma biológica (L. Shiflett & Robinson-Dunn, 2016).

#### 4.2.2.3. Diagnóstico

Es necesario diferenciar el botulismo de otras enfermedades neurológicas, como (L. Shiflett & Robinson-Dunn, 2016):

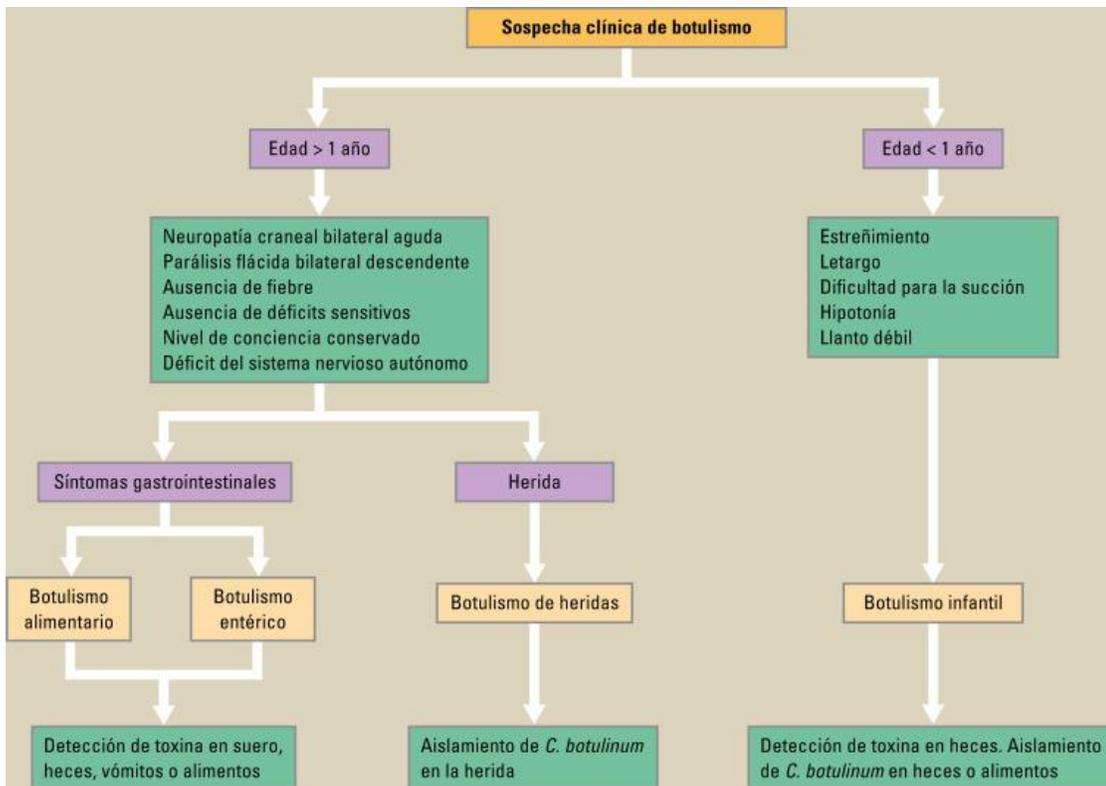
- El síndrome de Landry-Guillain-Barré el cual suele empezar con un hormigueo y debilidad que comienza en los pies y las piernas y luego se difunde a la parte superior del cuerpo y los brazos. Algunas personas notan los primeros síntomas en los brazos o la cara. A medida que este síndrome avanza, la debilidad muscular puede evolucionar a una parálisis. Puede afectar a personas de todas las edades, pero el riesgo aumenta a medida que envejeces (Mayo Clinic, 2022)
- Parálisis por garrapatas: En Norteamérica, algunas especies de *Dermacentor* y *Amblyomma* causan parálisis por garrapata debido a una neurotoxina secretada en su saliva. Los signos y síntomas de la parálisis por garrapatas incluyen anorexia, letargia, debilidad muscular, deterioro de la coordinación, nistagmo y parálisis flácida ascendente (Barish & Arnold, 2022)
- Miastenia grave, una enfermedad autoinmune que causa debilitamiento en los músculos voluntarios. Esto puede llevar a una gran variedad de síntomas como dificultad para deglutir o masticar, dificultad para hablar, cabeza y párpados caídos, parálisis facial, entre otros. La miastenia grave

puede afectar a personas de cualquier edad. Es más común en mujeres jóvenes y hombres de edad avanzada (MedlinePlus, 2021e).

- Síndrome de Lambert-Eaton, una enfermedad autoinmune que causa debilidad muscular y fatigabilidad fácil, particularmente en los músculos pélvicos y muslos (L. Shiflett & Robinson-Dunn, 2016).

Debido a que la terapia debe administrarse lo antes posible y la confirmación de laboratorio del botulismo lleva varios días, el tratamiento a menudo se llevará a cabo basándose únicamente en la sospecha clínica (Jeffery, 2022).

El diagnóstico de laboratorio (Ver Figura 13) debe realizarse solamente en los pacientes sintomáticos (diarrea y/o dolor abdominal, frecuentemente acompañados de leucocitosis y fiebre) y en heces no formales (niveles 5 a 7 de la escala de Bristol), con la importante excepción de los casos en que haya sospecha de íleo paralítico o megacolon tóxico. Las muestras pueden ser líquido cefalorraquídeo, suero, restos de alimentos, heces y vómitos. En botulismo alimentario se debe confirmar la presencia de la toxina en el alimento (López *et al.*, 2021).



**Figura 13.** Diagrama de evaluación clínica por sospecha de botulismo (Córdoba et al, 2022).

*C. botulinum* proteolítico (Grupo I) se asocia con frecuencia a botulismo transmitido por alimentos, heridas y botulismo infantil/intestinal. Las cepas poseen uno o dos genes de neurotoxinas de tipo A, B, o F.

Es una bacteria mesófila con temperatura mínima de crecimiento de 10-12 °C, aunque algunas cepas crecen poco por debajo de 15 °C. La temperatura óptima de crecimiento está en el rango de 37-42 °C, y la máxima es de aproximadamente 48 °C. El crecimiento y producción de neurotoxina no ocurren a pH < 4.6, o a  $\geq 10\%$  NaCl (Peck, 2014).

Cabe mencionar que todas las cepas de *C. botulinum* Grupo I fermentan glucosa, algunas fermentan la fructosa y maltosa, mientras que la manosa, sacarosa y trehalosa no son fermentadas por este grupo (Peck, 2014).

Por otro lado, *C. botulinum* no proteolítico (Grupo II) se asocia principalmente con el botulismo transmitido por alimentos, con solo un caso informado de botulismo infantil y de heridas. Las cepas forman una sola toxina de tipo B, E o F.

*C. botulinum* no proteolítico es una bacteria sacarolítica psicrótrófica que fermenta una amplia gama de azúcares tales como la glucosa, fructosa, maltosa, sacarosa y trehalosa (Peck, 2014).

La temperatura mínima para el crecimiento y la formación de neurotoxinas es de 2.5-3.0 °C, aunque algunas cepas crecen poco por debajo de 5 °C. La temperatura óptima de crecimiento es de aproximadamente 25-30 °C, y la máxima de aproximadamente 40 °C. *C. botulinum* no proteolítica no se multiplica ni forma neurotoxinas a un pH de 5.0 ni a  $\geq 5$  % de NaCl (Peck, 2014).

Se debe permitir un período prolongado de incubación (7 días o más) para el crecimiento y la formación de neurotoxinas. Una porción del cultivo enriquecido se puede usar para probar la neurotoxina botulínica o el gen codificante, y otra porción se siembra en un medio de cultivo selectivo (p. ej., agar de aislamiento de *C. botulinum* (CBI), medio selectivo de botulinum (BSM)) (Ver anexo) o no selectivo (p. ej., agar yema de huevo). La yema de huevo se incluye en estos medios ya que las colonias de *C. botulinum* proteolítico y *C. botulinum* no proteolítico tienen un aspecto típico asociado con su actividad de lipasa (Peck, 2014).

#### 4.2.3. *Clostridium difficile*

##### 4.2.3.1. Características

*Clostridium difficile* es un bacilo Gram positivo, anaerobio, formador de esporas y productor de toxinas, cuyo nombre oficial se cambió en 2016 a *Clostridioides difficile*. El nuevo nombre refleja las diferencias taxonómicas entre esta especie y otros miembros del género *Clostridium* (Czepiel *et al.*, 2019).

El organismo se encuentra comúnmente en el agua, el aire, las heces humanas y animales, las superficies de los hospitales y el suelo. La temperatura óptima para el crecimiento de los organismos es de unos 37 °C. El principal modo de transmisión de la

enfermedad es la vía fecal-oral. El organismo produce dos tipos de toxinas que son los principales factores virulentos: la toxina A y la toxina B. Si bien la mayoría de las cepas patógenas asociadas con la infección por *C. difficile* producen tanto la toxina A como la toxina B, se han informado cepas que producen solo la toxina B en todo el mundo (Mada & Alam, 2022).

#### 4.2.3.2. Enfermedad clínica

*C. difficile* es la causa más común de diarrea nosocomial.

El cuadro clínico de la infección (ICD) es muy heterogéneo, y va desde el estado de portador asintomático, diarrea leve o moderada, hasta la colitis fulminante potencialmente mortal (Czepiel *et al.*, 2019).

Las características clínicas de la ICD, además de la diarrea acuosa, incluyen dolor abdominal, fiebre, náuseas y vómitos, debilidad y pérdida del apetito. La prueba de sangre oculta en heces suele ser positiva, aunque el sangrado activo rara vez está presente (Czepiel *et al.*, 2019).

La infección grave por *C. difficile* identificada por un recuento de glóbulos blancos superior a 15 000 por mm<sup>3</sup>, hipoalbuminemia y lesión renal aguda, es un predictor independiente de colectomía urgente y muerte (Leffler & Lamont, 2015).

#### 4.2.3.3. Diagnóstico

Las pruebas comerciales disponibles son rápidas y de bajo costo, pueden detectar directamente solo la toxina A, las toxinas A+B o A y B individualmente (Flores Reyes & Duery Alzerrera, 2017).

Además, existen pruebas inmunocromatográficas que incorporan la detección del antígeno GDH lo que favorece el rendimiento del ensayo detectando el microorganismo y sus toxinas (Flores Reyes & Duery Alzerrera, 2017).

El cultivo toxigénico es una metodología que tiene una alta sensibilidad y especificidad, que consiste en el cultivo de la muestra de deposición en medios selectivos y enriquecidos, para luego determinar la toxicidad del aislamiento obtenido. CD crece en medios selectivos y enriquecidos, el más usado es el Cicloserin Cefoxitin

Fructosa Agar (CCFA) con o sin sangre (Ver anexo), también se encuentran disponibles actualmente medios cromogénicos comerciales. Para mejorar la selectividad de la técnica, la muestra se somete previamente a un shock etanólico, se incuba en ambiente anaeróbico por 48 horas en un rango de temperaturas que va de los 25 y 45 °C siendo 30-37 °C su temperatura óptima de crecimiento. El procedimiento consiste en traspasar 2 a 3 mL o g de la muestra homogenizada de deposición a un tubo limpio y se agrega la misma cantidad de alcohol de 95 °, dejar a temperatura ambiente por 30-60 min agitando cada 15 min y posteriormente cumplido este tiempo se siembra en un medio selectivo para CD (Flores Reyes & Duery Alzerreca, 2017).

Las placas son incubadas por 48 h a 35 °C en anaerobiosis, se revisan las placas, el aislamiento se realiza bajo lupa estereoscópica según cantidad y pureza del cultivo. En medios con sangre las colonias alcanzan un tamaño 2 a 5 mm de diámetro, pueden ser de color blancas o amarillentas, no presentan hemólisis, son planas o levemente convexas, pueden ser circulares o rizoides, opacas y de aspecto granuloso, poseen un olor característico a estiércol debido a la producción de un compuesto orgánico volátil llamado paracresol y muestran fluorescencia bajo la luz UV (Flores Reyes & Duery Alzerreca, 2017).

En la tinción de Gram de estas colonias se observan bacilos Gram positivos o Gram variables que pueden presentar esporas ovoides subterminales (Alcalá *et al.*, 2015).

Si se encuentra algún tipo de colonia sospechosa, se debe realizar la identificación mediante alguna de las metodologías disponibles como la detección de GDH (Glutamato Deshidrogenasa), galerías bioquímicas comerciales o espectrometría de masas (MALDI-TOF). Las pruebas bioquímicas tradicionales incluyen lipasa, lecitinasa, hidrólisis de gelatina, hidrólisis de esculina y fermentación de manitol (Figura 14) (Flores Reyes & Duery Alzerreca, 2017).

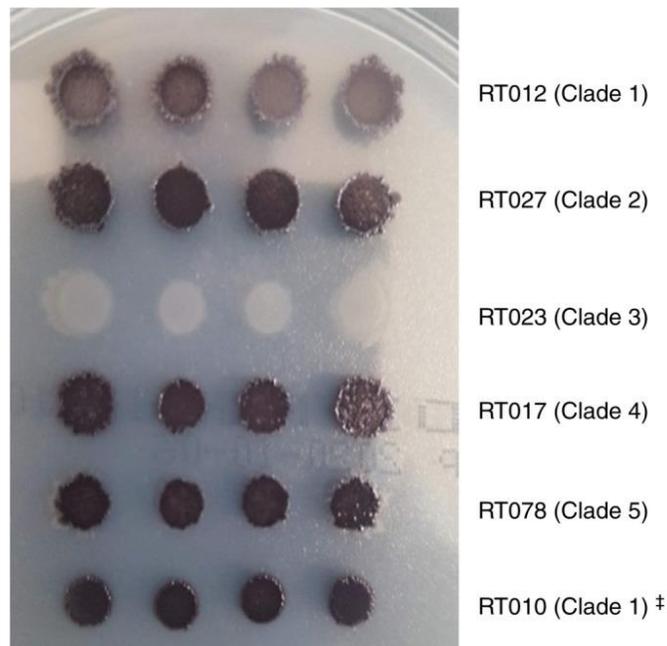
Una vez confirmado el crecimiento de colonias de *C. difficile* debe procederse a la detección de las toxinas in vitro, directamente de colonia (Alcalá *et al.*, 2015). Tradicionalmente la técnica más utilizada era el ensayo de citotoxicidad, sin embargo, en la actualidad es preferible el uso de técnicas rápidas para la detección de toxinas

tales como inmunoensayos o técnicas de amplificación molecular comerciales, que permiten disponer del resultado el mismo día (Alcalá *et al.*, 2015).

*Características bioquímicas de C. difficile.*

Prueba	Resultado
Hidrólisis gelatina	Positivo (reacción débil)
Hidrólisis de esculina	Positivo
Lipasa	Negativo
Lecitinasa	Negativo
Manitol	Positivo

**Figura 14.** Pruebas bioquímicas típicas para la identificación de *C. difficile* (Flores Reyes & Duery Alzerreca, 2017).



**Figura 15.** Diferentes cepas de *Clostridium difficile* positivas a hidrólisis de esculina.

Colonias de *C. difficile* en agar ChromID de *C. difficile*. Colonias negras producidas por cepas positivas a hidrólisis de esculina de *C. difficile* clado 1 (RT012), clado 2 (RT027), clado 4 (RT017), clado 5 (RT078) y cepa de jardín RT010, en ChromID. Las colonias incoloras producidas por cepas negativas a hidrólisis de esculina corresponden a la cepa RT023 de *C. difficile* siendo esta la única excepción para la positividad de esta prueba (Shivaperuma *et al.*, 2022).

#### 4.2.4. *Clostridium perfringens*

##### 4.2.4.1. Características

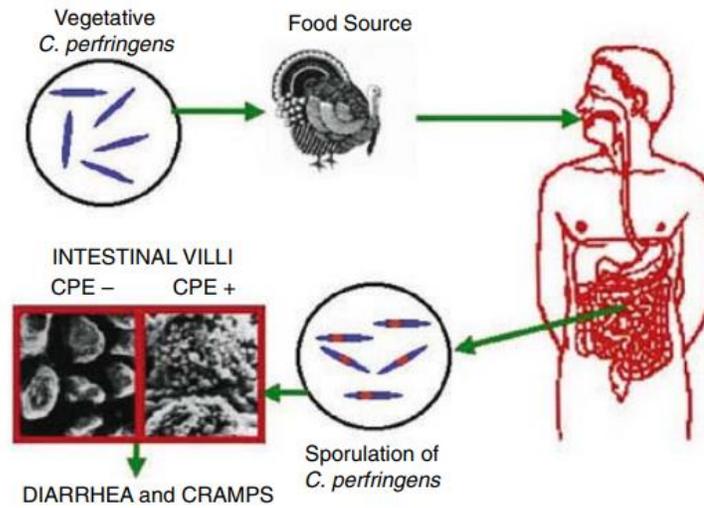
*Clostridium perfringens* es un bacilo anaeróbico Gram positivo formador de esporas que se relaciona con infecciones gastrointestinales agudas que varían en gravedad desde diarrea hasta enterocolitis necrosante y mionecrosis en humanos. Este patógeno posee un arsenal de toxinas que son responsables de la patogénesis de la enfermedad y pueden formar esporas que son resistentes al estrés ambiental (Yao & Annamaraju, 2022).

Aunque tiene una presencia ambiental omnipresente en la vegetación en descomposición, el suelo, las heces y la microbiota normal del tracto gastrointestinal de humanos y otros animales, *C. perfringens* también es un patógeno importante de humanos y ganado (Mehdizadeh *et al.*, 2021).

La clasificación de *C. perfringens* se basa en la producción de seis toxinas principales: toxina alfa (CPA), toxina beta (CPB), toxina épsilon (ETX), toxina iota (ITX), enterotoxina (CPE) y enteritis necrótica B como toxina (NetB) (Yao & Annamaraju, 2022).

La toxina alfa (CPA) se conserva en todos los tipos de *C. perfringens* y el gen estructural se localiza en el cromosoma (Ohtani & Shimizu, 2016).

## *Clostridium perfringens* Food Poisoning



**Figura 16.** Patogenia de la intoxicación alimentaria por *C. perfringens* tipo A.

Un alimento se contamina con células vegetativas de un tipo A que portan un gen cromosómico de enterotoxina de *C. perfringens*. Después de la ingestión, esas bacterias esporulan en los intestinos.

La producción de la enterotoxina de *Clostridium perfringens* (CPE) se lleva a cabo durante la esporulación in vivo. Luego la toxina se libera en el lumen al finalizar la esporulación (cuando la célula madre se lisa). Una vez libre, la enterotoxina se une y, a través de alteraciones de la membrana mata los enterocitos, produciendo daño intestinal que inicia la diarrea y calambres (McClane, 2006)

### 4.2.4.2. Enfermedad clínica

Clínicamente, *C. perfringens* se ha asociado constantemente con varias enfermedades sistémicas y entéricas significativas, tanto en humanos como en animales, incluida la gangrena gaseosa (mionecrosis clostridial), la intoxicación alimentaria y la diarrea no transmitida por los alimentos, y la enterocolitis. Es importante destacar que se sabe que las cepas de *C. perfringens* secretan más de 20 toxinas o enzimas identificadas que podrían ser los principales factores de virulencia implicados en la fisiopatología (Kiu & Hall, 2018).

La fisiopatología de *C. perfringens* es a través de la necrosis tisular mediada por toxinas. La mayoría de las toxinas forman poros, lo que provoca una afluencia de soluto y agua, lo que lleva a la inflamación y muerte celulares. Una característica distintiva de

la infección por *C. perfringens* es la producción de gas histotóxico a través de la fermentación de la glucosa (Yao & Annamaraju, 2022).

#### 4.2.4.3. Diagnóstico

##### **Diagnóstico diferencial:**

- Diarrea infecciosa aguda: *Norovirus*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* productora de toxina Shiga.
- Sepsis abdominal: Apendicitis, colitis infecciosa, colitis isquémica, úlcera péptica perforada, pancreatitis.
- Celulitis por clostridios/mionecrosis: *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacteroides* y *Peptostreptococcus* (Yao & Annamaraju, 2022).

Para el diagnóstico de *C. perfringens* se pueden realizar cultivos cuantitativos de heces y de muestras de los alimentos implicados. Se consideran positivos recuentos superiores a  $10^6$  UFC por g de alimento (Vila *et al.*, 2009).

En particular, *C. perfringens* representa uno de los organismos de crecimiento más rápido que se conocen actualmente, y se informa que tiene un tiempo de generación muy corto de 8-12 min cuando se cultiva a 43 °C en medios óptimos, y de 12-17 min a 37 °C. El rápido crecimiento de esta bacteria predispone mucho al huésped a la infección tisular, como en los casos de enteritis necrótica en aves, enteritis necrohemorrágica bovina (puede ser <5 h) y gangrena gaseosa (Kiu & Hall, 2018).

##### **Aislamiento:**

- Sembrado directo: Siembra directa en TSC-EYA (Agar Triptosa Sulfito Cicloserina con yema de huevo) (Ver anexo), que consiste en base de agar *perfringens* con emulsión de yema de huevo al 5 % y D-cicloserina) (Kotsanas *et al.*, 2010) más 18-24 h de incubación anaeróbica a 37 °C. Las colonias de tono negro con halos opacos son presuntivas de *C. perfringens* (Figura 17).



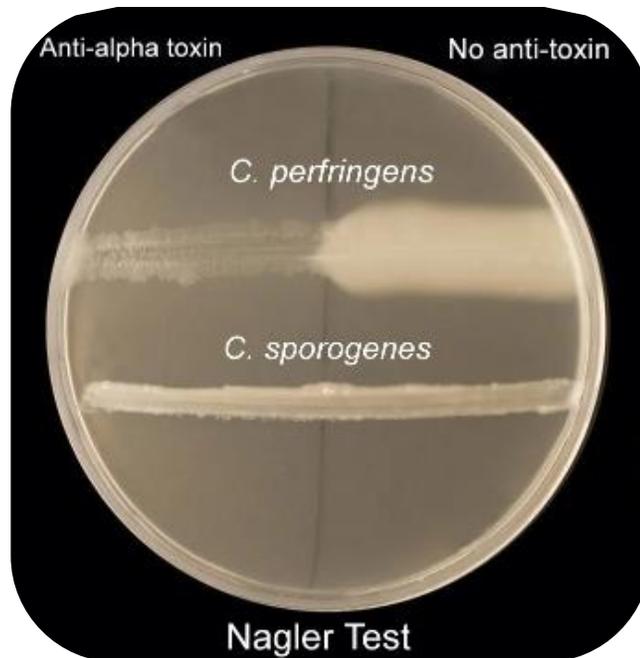
**Figura 17.** *C. perfringens* en Agar TSC con yema de huevo.

El metabisulfito de sodio y el citrato de amonio férrico se utilizan como indicador de  $H_2S$  por parte de *Clostridium perfringens* produciendo colonias negras y la emulsión de yema de huevo incorporada al medio detecta la actividad lecitinasas de esta bacteria (Trafalgar Scientific, s.f.).

- **Pretratamiento con etanol:** Pretratamiento con etanol (etanol al 50 %) durante 30 minutos más cultivo en placas en Fastidious Anaerobe Agar (Agar para anaerobios fastidiosos) (Ver anexo) (a veces complementado con 0,1 % de taurocolato). Las colonias que presentan hemólisis beta se identifican preliminarmente como *C. perfringens* (Kiu & Hall, 2018).

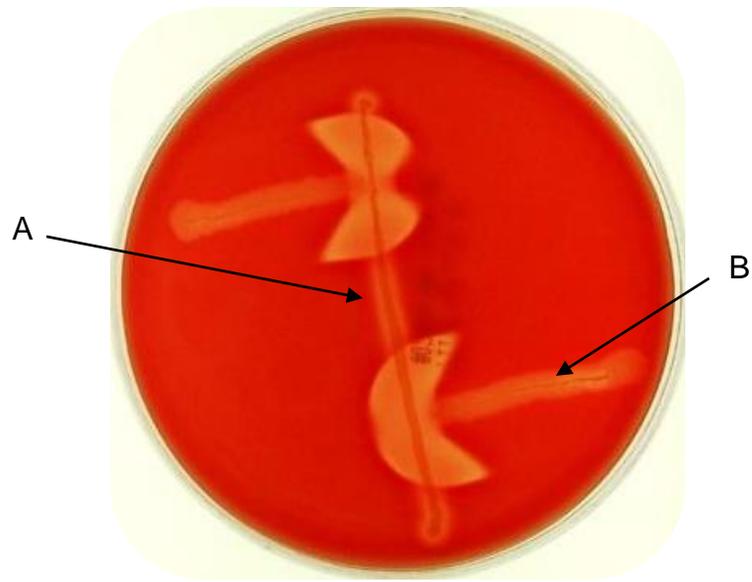
#### **Identificación bioquímica.**

- **Reacción de Nagler:** Conocida como prueba de lecitinasas (alfa-toxina). La placa de agar yema de huevo se divide en dos, donde una mitad contiene anti-toxina alfa, y después de la incubación anaerobia, la positividad se define como turbidez alrededor de las colonias en el lado libre de anti-toxina alfa, lo que confirma *C. perfringens* (Kiu & Hall, 2018).



**Figura 18.** Reacción de Nagler para la identificación de microorganismos capaces de producir la enzima lecitinasa. Se observa un halo opaco alrededor de las colonias de *C. perfringens* en la zona donde no hay anti-toxina alfa mientras que en la zona que contiene anti-toxina alfa dicho halo quedará inhibido (Rijal, N., 2022).

- **CAMP inverso:** Se realiza una estría con *Streptococcus agalactiae* en el centro del agar sangre y *C. perfringens* se siembra perpendicularmente. Después de 24-48 h de incubación anaeróbica, se formará una zona de "corbatín", lo que confirma *C. perfringens* (Kiu & Hall, 2018). Esto se debe a que la toxina alfa producida por *Clostridium perfringens* interactúa con el factor CAMP, una proteína secretada por *Streptococcus agalactiae*, produciendo una sinergia en la zona de hemólisis (Erasmus MC, s.f.).



**Figura 19.** CAMP inverso.

Empleo de *Streptococcus agalactiae* (A) para la identificación de *Clostridium perfringens* (B) productor de toxina alfa y estreptococos  $\beta$ -hemolíticos del grupo B donde se observa una zona de “corbata” de hemólisis intensificada (Modificada de: Pokhrel, 2015).

## 5. Conclusiones

Se realizó una recopilación bibliográfica sobre el diagnóstico microbiológico de las especies más importantes del género *Bacillus* y *Clostridium* seleccionando la información más relevante de bases de datos científicas y libros.

Esta investigación sistemática servirá como material de apoyo para los alumnos que se encuentren cursando la asignatura de Bacteriología y/o profesionales del área de la salud que deseen ampliar sus conocimientos sobre el diagnóstico de dichas bacterias esporuladas principalmente, así como algunos diagnósticos diferenciales y características particulares que se incluyen en este texto, esperando que esta información seleccionada minuciosamente brinde una orientación al lector en su vida laboral, pues el dar una sugerencia o el saber tomar decisiones rápidamente al presentarse un caso clínico es crucial para la vida del paciente ya que el tiempo juega un papel muy importante en cuanto al diagnóstico de estos microorganismos.

Es importante saber diagnosticar bacterias tales como *Bacillus* y *Clostridium* porque ambas pueden causar enfermedades graves tanto en humanos como en animales. Por ejemplo, algunas especies de *Bacillus* pueden producir infecciones cutáneas, gastrointestinales o pulmonares, así como intoxicaciones alimentarias graves. *Clostridium*, por su parte, puede causar infecciones como botulismo, tétanos, colitis pseudomembranosa o gangrena.

Diagnosticar correctamente estas bacterias es esencial para un tratamiento adecuado y para evitar la propagación de la infección a otras personas o animales. Además, el conocimiento de su presencia en diferentes entornos puede contribuir a la prevención de enfermedades y a la implementación de medidas de control adecuadas.

## 6. Referencias

- Adame, R., Castro, N., Vences, A., Rodríguez, E., Santiago, M. & Ramírez, A. (2019). Prevalencia de cepas del grupo de *Bacillus cereus* productoras de biopelícula en helados comercializados en México. *Kasmera*, 47(2), 115-122. doi: 10.5281/zenodo.3520530
- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). (2016). *Resúmenes de Salud Pública - Talio (Thalium)*. [https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs54.html](https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs54.html)
- Alcalá L., Marín M., Mena A., & Niubó J. (2015). Diagnóstico microbiológico de la infección por *Clostridium difficile*. 53. En L. Alcalá Hernández (coordinador). E. Cercenado Mansilla & R. Cantón Moreno (editores). *Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*. (pp. 6-54)
- Anaerobe Systems. (s.f.(a)). *Botulism Selective Media (BSM)*. <https://anaerobesystems.com/products/plated-media/botulism-selective-media-bsm/>
- Anaerobe Systems. (s.f.(b)). *Brain Heart Infusion Agar*. <https://anaerobesystems.com/products/plated-media/brain-heart-infusion-agar/>
- Anaerobe Systems. (s.f.(c)). *Product Insert. CYCLOSERINE-CEFOXITIN FRUCTOSE AGAR (CCFA)*. <https://anaerobesystems.com/wp-content/uploads/2018/09/CCFA-Insert-Rev-3-9-27-17.pdf>
- Bae, C., & Bourget, D. (2022). Tetanus. En: *StatPearls*. Treasure Island (FL). [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459217/#\\_NBK459217\\_pubdet\\_](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459217/#_NBK459217_pubdet_)
- Barish, R. A., & Arnold, T. (2022). *Parálisis por garrapata*. <https://bit.ly/3WNPXA1>
- Biokar diagnostics. (s.f.). *COMPASS BACILLUS CEREUS AGAR. COMPASS BACILLUS PLUS AGAR*. [https://www.bioser.com/wp-content/uploads/2022/05/TDS\\_COMPASS-BACILLUS-CEREUS-AGAR\\_V12-EN-5-1.pdf](https://www.bioser.com/wp-content/uploads/2022/05/TDS_COMPASS-BACILLUS-CEREUS-AGAR_V12-EN-5-1.pdf)

- Biomeriux. (s.f.). *Medios de cultivo para Bacillus cereus*. <https://www.biomerieux.es/microbiologia-industrial/medios-de-cultivo-para-bacillus-cereus>
- Bioser. (s.f.). COMPASS *Bacillus cereus* agar. <https://bit.ly/3N9o55h>
- Britania Lab. (s.f.). *Bacillus cereus Selectivo Agar (según Mossel)*. [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_60705f42f3f0e.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_60705f42f3f0e.pdf)
- Britania Lab. (s.f.). *Cerebro Corazón Infusión Agar*. [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_6092dbb1a7ed4.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6092dbb1a7ed4.pdf)
- Britania Lab. (s.f.). *Sangre Agar Base*. [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_6070906bed89d.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6070906bed89d.pdf)
- Calvo, P., & Zuñiga, D. (2010). CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE CEPAS de *Bacillus spp.* AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DE PAPA (*Solanum tuberosum*). *Ecología aplicada*, 9(1), 31-39. <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v9n1/a04v9n1>
- Celandroni, F., Vecchione, A., Cara, A., Mazzantini, D., Lupetti, A., & Ghelardi, E. (2019). Identification of *Bacillus* species: Implication on the quality of probiotic formulations, *PLoS One*. 14(5). doi: 10.1371/journal.pone.0217021
- Chateau, A., Van der Verren, S. E., Remaut, H., & Fioravanti, A. (2020). The *Bacillus anthracis* Cell Envelope: Composition, Physiological Role, and Clinical Relevance. *Microorganisms*, 8(12), 1864. doi: 10.3390/microorganisms8121864
- Clínica Universidad de Navarra. (s.f.(a)). *Endospora*. <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/endospora>
- Clínica Universidad de Navarra. (s.f.(b)). *Gastroenteritis infecciosa aguda*. <https://www.cun.es/enfermedades-tratamientos/enfermedades/gastroenteritis-infecciosa-aguda>
- Condalab. (2019). *Ficha técnica. Producto: TSC Agar + Egg Yolk*. <https://www.condalab.com/int/en/ready-to-use-media/1166-7402-tsc-agar-egg-yolk.html>

- Córdoba, M. V., López, J. A., García, A. M. P., & Caso, A. A. (2022). Protocolo diagnóstico de las infecciones por anaerobios: tétanos y botulismo. *Medicine - Programa De Formación Médica Continuada Acreditado*, 13(52), 3059–3063. doi: 10.1016/j.med.2022.03.014
- Cowan & Steel. (1993). *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*. Cambridge University Press.
- Czepiel, J., Drózdź, M., Pituch, H. *et al.* (2019). *Clostridium difficile* infection: review. *European Journal Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38, 1211–1221. doi: 10.1007/s10096-019-03539-6
- De Melo, U. P, & Ferreira, C. (2022). Clinical findings and response to treatment of 17 cases of tetanus in horses (2012-2021). *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, 44, 1-7. doi: 10.29374/2527-2179.bjvm005321
- Dietrich, R., Jessberger, N., Ehling-Schulz, M., Märtlbauer, E., & Granum, P. E. (2021). The Food Poisoning Toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins*, 13(2), 98. doi: 10.3390/toxins13020098
- Elu Escalante, M., Berrocal Elu, A., Pedragosa González, V., Sánchez Barrón, G., Candala Ramírez, D., & Pérez Caamaño, N. (2021). *Bacillus anthracis*. *Revista Sanitaria De Investigación*. <https://revistasanitariadeinvestigacion.com/bacillus-anthraxis/>
- Erasmus, M. C. (s.f.). CAMP-test revers\_ *Clostridium perfringens*. <https://microbe-canvas.com/tests.php?p=2087>
- Flores, R., & Duery, O. (2017). Diagnóstico microbiológico de *Clostridium difficile*. *Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia: Instituto de Salud Pública de Chile*, 3-10. [https://www.ispch.cl/sites/default/files/Diagnostico\\_Microbiologico\\_de\\_C\\_difficile.pdf](https://www.ispch.cl/sites/default/files/Diagnostico_Microbiologico_de_C_difficile.pdf)
- Fox, A. (s.f.). *Bacteriología - Capítulo Uno. Célula bacteriana*. <https://www.microbiologybook.org/Spanish/chapter1.htm>
- Ganesh, M., Sheikh, N. K., Shah, P., Mehetre, G. T., Dharne, M. S., & Nagoba, B. (2016). Detection of *Clostridium tetani* in human clinical samples using tetX

specific primers targeting the neurotoxin. *Journal of Infection and Public Health*, 9(1), 105–109. doi: 10.1016/j.jiph.2015.06.014

- Gotfried, J. (2021a). *Intoxicación alimentaria por estafilococos*. <https://bit.ly/3qllrkV>
- Gotfried, J. (2021b). *Introducción a la gastroenteritis*. <https://bit.ly/3OOSisF>
- Instituto Valenciano de Microbiología (IVAMI). (2018). *Microorganismos psicrófilos y psicrotróficos en alimentos y aguas - Cultivo cualitativo y cuantitativo; Identificación molecular (secuenciación)*. <https://bit.ly/3qemfYW>
- Insumolab. (s.f.). *Agar MYP (Manitol-Yema de huevo y Polimixina)*. [https://insumolab.cl/descargas/industria/placas\\_90mm/ficha\\_tecnica/12.pdf](https://insumolab.cl/descargas/industria/placas_90mm/ficha_tecnica/12.pdf)
- Jeffery, I. A., Karim, S. Botulismo. (2022). En: *StatPearls*. Treasure Island (FL). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459273/>
- Kagle. (2022). Selected Pathogens. En: Courses Mansfield University of Pennsylvania Sp21. Recuperado el 02/02/2023 de <https://bit.ly/3qoxM80>
- Kiu, R. & Hall, L. J. (2018) An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. *Emerging microbes & infections*, 7(1), 141. doi: 10.1038/s41426-018-0144-8
- Kotsanas, D., Carson, J. A., Awad, M. M., Lyras, D., Rood, J. I, Jenkin, G. A., Stuart, R. L., & Korman, T. M. (2010). Novel use of tryptose sulfite cycloserine egg yolk agar for isolation of *Clostridium perfringens* during an outbreak of necrotizing enterocolitis in a neonatal unit. *Journal of clinical microbiology*. 48(11), 4263-4265. doi: 10.1128/JCM.01724-10
- Laboratorio de Análisis Clínicos ALFA. (2016). *CARBUNCO O ANTRAX*. <https://alfalaboratorioclinico.wordpress.com/2016/07/23/carbunco-o-antrax/>
- Leffler, D. A. & Lamont, J. T. (2015). *Clostridium difficile* Infection. *New England Journal of Medicine*, 372(16), 1539–1548. doi: 10.1056/nejmra1403772
- Lifeder. (2020). *Mesófilos: características, tipos, hábitat, ejemplos*. <https://www.lifeder.com/mesofilos/>
- López, M., Fuentes, M. D., Sabanza, M., Ciprian, G., Jimenez, B., & Miguel, A. C. (2021). Detección y diagnóstico de *Clostridium botulinum* en el laboratorio de microbiología. *Revista Sanitaria de Investigación*. <https://bit.ly/3MGIwG8>

- Lv, P., Song, Y., Liu, C., Yu, L., Shang, Y., Tang, H., Sun, S., & Wang, F. (2020). Application of *Bacillus subtilis* as a live vaccine vector: A review. *The Journal of veterinary medical science*, 82(11), 1693–1699. doi: 10.1292/jvms.20-0363
- Maczulak, A. (2011). *Encyclopedia of Microbiology*. Facts on file.
- Mada, P. K., & Alam, M. U. (2022). Clostridioides difficile. En: *StatPearls Treasure Island (FL)*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK431054/?report=classic>
- Mayo Clinic. (2021). *Isquemia mesentérica*. <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/mesenteric-ischemia/symptoms-causes/syc-20374989>
- Mayo Clinic. (2022). *Síndrome de Guillain-Barré*. <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/guillain-barre-syndrome/symptoms-causes/syc-20362793>
- McClane, B. A., Uzal, F. A., Miyakawa, M. E. F., Lyerly, D. M., & Wilkins, T. D. (2006). The Enterotoxic Clostridia. En: *Springer eBooks*. 698–752. doi: 10.1007/0-387-30744-3\_22
- McDowell, R. H., Sands, E. M., & Friedman, H. (2021). Bacillus Cereus. En *StatPearls Treasure Island (FL)*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459121/>
- MedlinePlus. (2015). *Ectima gangrenoso*. [https://medlineplus.gov/spanish/ency/esp\\_imagepages/2647.htm](https://medlineplus.gov/spanish/ency/esp_imagepages/2647.htm)
- MedlinePlus. (2020a). *Parálisis cerebral*. <https://medlineplus.gov/spanish/cerebralpalsy.html>
- MedlinePlus. (2020b). *Septicemia*. <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/001355.htm>
- MedlinePlus. (2021a). *Edema*. <https://medlineplus.gov/spanish/edema.html>
- MedlinePlus. (2021b). *Endoftalmitis*. <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/001626.htm>
- MedlinePlus. (2021c). *Gangrena gaseosa*. [https://medlineplus.gov/spanish/ency/esp\\_imagepages/17190.htm](https://medlineplus.gov/spanish/ency/esp_imagepages/17190.htm)
- MedlinePlus. (2021d). *Miastenia grave*. <https://medlineplus.gov/spanish/myastheniagravis.html>

- MedlinePlus. (2021e). *Miastenia grave*.  
<https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000712.htm>
- MedlinePlus. (2021f). *Tularemia*.  
<https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000856.htm>
- MedlinePlus. (2022). *Diverticulitis*.  
<https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000257.htm>
- Mehdizadeh, I., A. Navarro, M., Li, J., Shrestha, A., Uzal, F., & A. McClane, B. (2021). Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. *Virulence*, 12(1), 723–753. doi: 10.1080/21505594.2021.1886777
- Miranda, C., & Rojo M, D. (2004). *Clostridium perfringens*: INFECCIONES DE PIEL Y TEJIDOS BLANDOS. *Control Calidad SEIMC*. 1-10.  
<https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/Clostper.pdf>
- Murray, P. (2018). *Microbiología médica básica*. ELSEVIER.
- National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. (2018). *Definición y hechos sobre la gastroenteritis viral (“gripe estomacal”)*.  
<https://bit.ly/42bcw2P>
- National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. (2021). *Síntomas y causas de la enfermedad diverticular*. <https://bit.ly/45Y0WLJ>
- National Institutes of Health (NIH). (2022). *Parestesia*.  
<https://espanol.ninds.nih.gov/es/trastornos/parestesia>
- Neogen. (2018). *Technical Specification Sheet. Fastidious Anaerobe Agar (NCM0014)*.  
[https://www.neogen.com/globalassets/pim/assets/original/10006/ncm0014\\_ts\\_en-us.pdf](https://www.neogen.com/globalassets/pim/assets/original/10006/ncm0014_ts_en-us.pdf)
- Neogen. (s.f.). *perfringens Agar (TSC)*.  
<http://www.labm.com/product.asp?id=1730>
- Ohtani, K., & Shimizu, T. (2016). Regulation of Toxin Production in *Clostridium perfringens*. *Toxins*, 8(207), 1-14. doi: 10.3390/toxins8070207
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). (2018). Enfermedades de la lista de OIE y otras enfermedades importantes. En: *Manual terrestre de la OIE*.

2018.

[https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/3.01.01\\_Carbunco\\_bacteridiano.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.01.01_Carbunco_bacteridiano.pdf)

- Organización Panamericana de la Salud. (2015). *Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)*. <https://bit.ly/3oumLLA>
- Pacheco, M., Jiménez, A., & Franco L. (2014). Aislamientos bacterianos en apendicitis aguda. *Repertorio de Medicina y Cirugía*, 23(3), 184-188. <https://bit.ly/3qwphHS>
- Peck, M. W. (2014). Bacteria: *Clostridium botulinum*. *Encyclopedia of Food Safety*, 1, 381-394. doi: 10.1016/B978-0-12-378612-8.00091-3
- Piggot, P. J. (2009). *Bacillus subtilis*. *Encyclopedia of Microbiology*, 45-56. doi: 10.1016/b978-012373944-5.00036-5
- Pohanka, M. (2020). Bacillus anthracis as a biological warfare agent: infection, diagnosis and countermeasures. *Bratislavske lekarske listy*, 121(3), 175-181. doi: 10.4149/BLL\_2020\_026
- Pokhrel, P. (2015). Reverse CAMP test for the identification of *Clostridium perfringens*. *Microbiology notes*. <https://microbiologynotes.com/reverse-camp-test-for-the-identification-of-clostridium-perfringens/>
- Pujol, M., & Limón, E. (2013). Epidemiología general de las infecciones nosocomiales. Sistemas y programas de vigilancia. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 31(2), 108–113. doi: 10.1016/j.eimc.2013.01.001
- Química Clínica Aplicada S.A. (2016). VERDE DE MALAQUITA. <https://qca.es/es/tincion-de-endosporas/189-verde-de-malaquita.html>
- Ramarao, N., Tran, S.L, Marin, M., & Vidic, J. (2020). Advanced Methods for Detection of Bacillus cereus and Its Pathogenic Factors. *Sensors*, 20(9), 2667. doi: 10.3390/s20092667
- Rao, A. K., Sobel, J., Chatham-Stephens, K., & Luquez, C. (2021). Clinical Guidelines for Diagnosis and Treatment of Botulism. *Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report*, 70(2), 1–30. doi: 10.15585/mmwr.rr7002a1
- Real Academia Española. (s.f.). *Emesis*. <https://dle.rae.es/emesis>

- Real Academia Nacional de Medicina de España. (2012). *Diccionario de Términos Médicos*.  
[https://dtme.ranm.es/buscador.aspx?NIVEL\\_BUS=3&LEMA\\_BUS](https://dtme.ranm.es/buscador.aspx?NIVEL_BUS=3&LEMA_BUS)
- Riedel, S., Morse, S., Mietzner, T., & Miller, S. (2020). CAPÍTULO 11: Bacilos grampositivos formadores de esporas: Bacillus y Clostridium en *Microbiología Médica* (27 ed). McGraw-Hill.
- Rijal, N. (2022). *Nagler Reaction (Lecithinase Test)*. Microbeonline.  
<https://microbeonline.com/nagler-reaction-lecithinase-test-principle-procedure-results-limitations/>
- Sánchez, J., Correa, M., Castañeda, L. (2016). Bacillus cereus un patógeno importante en el control microbiológico de los alimentos. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 34(2), 230-242. doi: 10.17533/udea.rfnsp.v34n2a12
- Secretaría de Salud. (1997). *NORMA Oficial Mexicana NOM-129-SSA1-1995, Bienes y servicios. Productos de la pesca: secos-salados, ahumados, moluscos cefalópodos y gasterópodos frescos-refrigerados y congelados. Disposiciones y especificaciones sanitarias*.  
<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/129ssa15.html>
- Shiflett, S., & Robinson-Dunn, B. (2016). Botulinum Toxin-*Clostridium botulinum*. En A. L. Leber (Ed.), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. (4ª ed., Vol. 1, pp. 16.5.1-16.5.9). American Society for Microbiology. doi: 10.1128/9781555818814.ch16.5
- Shivaperumal, N., Knight, D. R., Imwattana, K., Androga, G. O., Chang, B. J., & Riley, T. V. (2022). Esculin hydrolysis negative and TcdA-only producing strains of *Clostridium* (Clostridioides) *difficile* from the environment in Western Australia. *Journal of applied microbiology*, 133(3), 1183–1196. doi: 10.1111/jam.15500
- Sigma Aldrich. (s.f.). 55678 PLET Agar (Polymyxin B - Lysozyme - EDTA – Thallous acetate Agar). <https://bit.ly/3MBNvld>
- Simonsen, K. A., & Chatterjee K. (2021). Anthrax. En: *StatPearls*. Treasure Island (FL). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507773/>
- Soria, R. (2007). *Expresión en tomate de un polipéptido antigénico con epítomos de 3 exotoxinas bacterianas (DPT) codificado por un gen sintético*. [Tesis de

posgrado en biología molecular]. Repositorio Institucional de IPICYT. <https://ipicyt.repositorioinstitucional.mx/jspui/>

- St. Jude Children’s Research Hospital. (s.f.). *Trismo*. <https://bit.ly/3qg LZDS>
- Su, Y., Liu, C., Fang, H., & Zhang, D. (2020). *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microbial cell factories*, 19(1), 173. doi: 10.1186/s12934-020-01436-8
- Suárez-Contreras, L. Y., & Yañez-Meneses, L.F. (2020). ARNr 16S como herramienta aplicada en la caracterización molecular de géneros y especies de bacterias. *Respuestas*, 25(1), 127–137. doi: 10.22463/0122820X.2430
- The Center for Food Security & Public Health. (2007). *Enterotoxina B estafilocócica*. [https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/entertoxina\\_B\\_estafilococica.pdf](https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/entertoxina_B_estafilococica.pdf)
- Trafalgar Scientific. (s.f.). Perfringens TSC Agar with Egg Yolk PP Plates Pk 10. <https://trafalgarscientific.co.uk/perfringens-tsc-agar-with-egg-yolk-pp-plates-pk-10-memo/>
- Valdespino, J., & García, M. (s.f.). *El A, B, C, sobre ántrax, para personal de salud*. <https://saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/6358/7672>
- Valverde, F., Cango, L., Yunga, A. & Casa, P. (2021). Prevalencia de bacterias en apendicitis aguda complicada y su relación con complicaciones postquirúrgicas. *Dominio de las ciencias*, 7(4), 173-194. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/8384036.pdf>
- Vila, J., Alvarez-Martínez, M.J., Buesa, J., & Castillo, J. (2009). Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales [Microbiological diagnosis of gastrointestinal infections]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(7):406-11. doi: 10.1016/j.eimc.2008.11.009.
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & Santos-Villalobos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(1), 95-130. doi: 10.18781/r.mex.fit.1706-5

- Yao, P., & Annamaraju, P. (2022). Clostridium Perfringens. En: *StatPearls*. Treasure Island (FL). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559049/>
- Zasada, A. A. (2020). Detection and Identification of Bacillus anthracis: From Conventional to Molecular Microbiology Methods. *Microorganisms*, 8(1), 125. doi: 10.3390/microorganisms8010125

## Glosario

**Adenopatía:** Aumento del volumen de un ganglio linfático que puede deberse, entre otras causas, a infecciones, neoplasias del tejido linfático, metástasis tumorales o trastornos inmunitarios (Real Academia Nacional de Medicina de España, 2012).

**Diverticulitis:** Los divertículos son pequeñas bolsas o sacos abultados que se forman en la pared interna del intestino. La diverticulitis ocurre cuando estas bolsas se inflaman o infectan (MedlinePlus, 2022).

**Ectima gangrenoso:** El ectima gangrenoso es una infección cutánea bacteriana (causada por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*) que por lo general se presenta en personas inmunocomprometidas (MedlinePlus, 2015).

**Edema:** Hinchazón causada por la acumulación de líquido en los tejidos del cuerpo. Suele ocurrir en los pies, los tobillos y las piernas, pero puede afectar todo el cuerpo (MedlinePlus, 2021a).

**Emesis:** Vómito. Acción de vomitar (Real Academia Española, s.f.)

**Endoftalmitis:** La endoftalmitis implica hinchazón (inflamación) dentro del globo ocular. Es una afección grave (MedlinePlus, 2021b).

**Endospora:** Espora bacteriana altamente resistente al calor, las radiaciones y los desinfectantes. Es producida en el interior de la célula bacteriana por los géneros *Clostridium*, *Bacillus* y otros gram-positivos próximos (Clínica Universidad de Navarra, s.f.).

**Enterocito:** Célula prismática del epitelio intestinal, de 18 a 25  $\mu\text{m}$  de altura, que reviste mayoritariamente la superficie del intestino delgado y cuya función consiste en

absorber los productos finales de la digestión (Real Academia Nacional de Medicina de España, 2012).

**Espasmo:** Contracción tónica involuntaria, brusca y persistente, de un músculo esquelético o de un grupo muscular (Real Academia Nacional de Medicina de España, 2012).

**Espora:** Formas latentes de células bacterianas producidas por ciertas bacterias en condiciones de ayuno (Fox, A., s.f.).

**Forma vegetativa:** Forma de crecimiento activo de la célula bacteriana (Fox, A., s.f.).

**Iatrógeno:** Causado u originado por el tratamiento u otra actuación del médico (Real Academia Nacional de Medicina de España, 2012).

**Infección nosocomial:** Las infecciones nosocomiales infecciones adquiridas durante la estancia en un hospital y que no estaban presentes ni en el período de incubación ni en el momento del ingreso del paciente (Pujol, M., & Limón, E., 2013).

**Isquemia mesentérica:** Ocurre cuando las arterias estrechas o bloqueadas restringen el flujo sanguíneo al intestino delgado (Mayo Clinic, 2021).

**Mesófilo:** Organismos que alcanzan su desarrollo óptimo a temperaturas que oscilan entre 20 y 45 °C (Lifeder, 2020).

**Miastenia grave:** Enfermedad autoinmune que causa debilitamiento en los músculos voluntarios (MedlinePlus, 2021d).

**Mionecrosis:** También llamada gangrena gaseosa, es una forma severa de gangrena (muerte del tejido) causada por la bacteria *Clostridium perfringens* (MedlinePlus, 2021c).

**Parálisis espástica:** Provoca un aumento del tono muscular, rigidez de los músculos y dificultad con los movimientos (MedlinePlus, 2020a).

**Parestesia:** Sensación de quemadura o de pinchazos que se suele sentir en las manos, brazos, piernas o pies y a veces en otras partes del cuerpo (National Institutes of Health (NIH), 2022).

**Psicrotrófico:** Los microorganismos psicrotrofos, son aquellos cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra por encima de entre los 15 y 20 °C, pero también pueden multiplicarse a temperaturas inferiores a 7 °C (Instituto Valenciano de Microbiología (IVAMI), 2018).

**Septicemia:** También conocida como sepsis, la septicemia es una respuesta grave y potencialmente mortal a una infección que empeora de forma muy rápida (MedlinePlus, 2020b).

**Trismo:** El trismo es una enfermedad que dificulta la apertura de la boca. Puede ocurrir por un daño en los nervios o en una articulación, o por un daño en los músculos de la mandíbula (St. Jude Children's Research Hospital, s.f.).

**Tularemia:** Es una infección bacteriana en roedores salvajes. La bacteria se transmite a los humanos por contacto con tejidos de animales infectados. La bacteria también se puede transmitir por medio de garrapatas, picadura de moscas y mosquitos. (MedlinePlus, 2021f).

# Anexos

## Anexo I. Tablas de identificación de *Bacillus* y *Clostridium*

### Características fenotípicas de distintas especies de *Bacillus*.

Característica	Referencia	<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. anthracis</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>B. pseudomycoides</i>	<i>B. weihenstephanensis</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. subtilis</i>
Actividad lecitinasas	[19]	+	+	+	+	+	+	-	-
Manitol	[20]	-	-	-	-	-	-	+	+
Hemólisis	[18]	+	+	-	+	ND	ND	-	-
Cristal parasporal	[21]	-	+	-	-	-	-	-	-
Reducción de nitratos	[18]	+	+	+	+	ND	+	-	+
Movilidad	[22]	+	+	-	-	-	+	+/-	+/-
Catalasa	[20]	+	+	+	+	ND	+	+	+
Sensibilidad a penicilina	[19]	-	-	+	-	ND	ND	-	+
Hidrólisis de urea	[18]	+/-	+	-	+/-	+	-	+/-	-
Crecimiento rizoide	[19]	-	-	-	+	ND	ND	ND	+/-
Presencia de plásmido emético	[13]	+	-	-	-	-	+/-	-	-
Presencia de genes enterotóxicos	[13]	+	+	+	+	+	+	-	-

+: presencia    -: ausencia    +/-: variable    ND: no definido

(Sánchez *et al.*, 2016)

### Pruebas bioquímicas de diferentes especies de *Clostridium*.

Tabla 4. Características de bacilos grampositivos anaerobios esporulados<sup>a, b</sup>.

	Hidrólisis gelatina	Fermentación glucosa	Lecitinasas	Lipasa	Indol	Crecimiento aerobio	Urea	Nitratos	Movilidad	Esculina	Esporas
<i>C. bifementans</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	OS
<i>C. sordelli</i>	+	+	+	-	+	-	±	-	+	-	OS
<i>C. perfringens</i>	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	RV
<i>C. novyi A</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	OS
<i>C. sporogenes</i>	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	OS
<i>C. cadaveris</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	OT
<i>C. septicum</i>	+	+	-	-	-	-	-	V	+	+	OS
<i>C. difficile</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	OS
<i>C. putrificum</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	- <sup>+</sup>	T
<i>C. baratii</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	S,RV
<i>C. tertium</i>	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	OT
<i>C. butyricum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	OS
<i>C. innocuum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	OT
<i>C. ramosum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	R,OT,RV
<i>C. clostridioforme</i>	-	+	-	-	- <sup>+</sup>	-	-	±	+	+	OS,RV
<i>C. tetani</i>	+	-	-	-	V	-	-	-	+	-	RT
<i>C. hastiforme</i>	+	-	-	-	-	-	-	- <sup>+</sup>	+	-	S
<i>C. subterminale</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	- <sup>+</sup>	OS,RV
<i>C. histolyticum</i>	+	-	-	-	-	±	-	-	+	-	OS
<i>C. limosum</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	OS

<sup>a</sup>Abreviaturas. +: positivo 90-100% de las cepas, -: negativo 90-100% de las cepas, ±: mayoría de las cepas positivas, -<sup>+</sup>: mayoría de las cepas negativas, RV: raramente vista, O: oval, R: redonda, S: subterminal, T: terminal.

<sup>b</sup>Modificado de Isenberg HD.

(Miranda & Rojo, 2004)

Temperatura óptima y % de NaCl necesarios para el crecimiento de *Bacillus* y *Clostridium* (Recopilación).

Bacteria	Temperatura óptima de crecimiento (°C)	Crecimiento en NaCl (%)
<i>Bacillus anthracis</i>	35-37	10
<i>Bacillus cereus</i>	30	7
<i>Bacillus subtilis</i>	37	7
<i>Clostridium tetani</i>	33-37	n/a
<i>Clostridium botulinum</i> (Grupo I)	37-42	<10
<i>Clostridium botulinum</i> (Grupo II)	25-30	<5
<i>Clostridium difficile</i>	30-37	n/a
<i>Clostridium perfringens</i>	37	n/a

n/a: not available (no disponible)

## Anexo II. Medios de cultivo.

### A. Agar PLET (Polimixina B-Lisozima-EDTA-Acetato de talio)

#### Uso

El medio PLET es el mejor medio selectivo para el aislamiento y cultivo de *Bacillus anthracis* de especímenes ambientales, productos animales o especímenes clínicos, inhibiendo *Bacillus cereus*.

#### Composición

Fórmula (en gramos por litro)

Infusión de corazón de res (extracto de 500 g).....	10.0 g
Triptosa.....	10.0 g
Cloruro de sodio.....	5.0 g
EDTA.....	0.3 g
Acetato de talio.....	0.04 g
Agar.....	15.0 g

pH final  $7.3 \pm 0.2$  a 25 °C

#### Fundamento

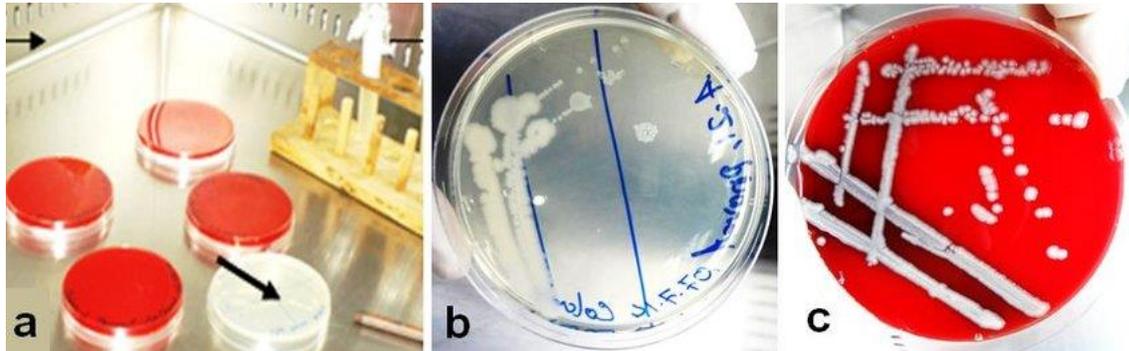
La infusión de corazón de res y la triptosa son una fuente de carbono, nitrógeno y otros compuestos necesarios para el crecimiento de bacterias. El cloruro de sodio mantiene la presión osmótica. EDTA, acetato de talio y polimixina (presente en el suplemento) son los agentes selectivos e inhiben la mayoría de los microorganismos. La lisozima (presente en el suplemento) ataca la pared celular de las bacterias Gram negativas y las inhibe.

#### Interpretación

Las colonias de *Bacillus anthracis* aparecen entre 36 y 40 h después de la incubación a 37 °C. Las colonias son circulares, de color blanco crema con textura de vidrio esmerilado. Para la confirmación, las colonias sospechosas deben subcultivarse en

placas de agar sangre para su identificación. La formación de cápsulas se puede ver directamente o en placas de agar sangre.

(Sigma Aldrich, s.f.)



**Figura 1.** Crecimiento de *Bacillus anthracis* en agar PLET (b), también se observa el crecimiento de colonias en agar sangre (c) (Saha, *et al.*, 2020).

## B. Medio Brain Heart Infusion (BHI)

### Uso

Medio sólido apropiado para el cultivo de bacterias y hongos, incluyendo los de difícil desarrollo.

### Composición

Fórmula (en gramos por litro)

Infusión de cerebro de ternera.....	200.0 g
Infusión de corazón.....	250.0 g
Peptona.....	10.0 g
Cloruro de sodio.....	5.0 g
Glucosa.....	2.0 g
Fosfato disódico.....	2.5 g
Agar.....	15.0 g
pH final	7.4 ± 0.2

### Fundamento

Es un medio muy rico en nutrientes, que proporciona un adecuado desarrollo microbiano. La infusión de cerebro de ternera, la infusión de corazón vacuno y la peptona, son la fuente de carbono, nitrógeno, y vitaminas. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el fosfato disódico otorga capacidad buffer. El agar es el agente solidificante.

(Britania Lab, s.f.)



Figura 2. Medio BHI (Anaerobe Systems, s.f.).

### C. *Bacillus cereus* Selectivo Agar (según Mossel)

#### Uso

Medio diagnóstico utilizado para el aislamiento y recuento de *Bacillus cereus* en alimentos.

#### Composición

Fórmula (en gramos por litro)

Peptona de carne.....	10.0 g
Extracto de carne.....	1.0 g
Manitol.....	10.0 g
Cloruro de sodio.....	10.0 g
Rojo fenol.....	0.025 g
Agar.....	15.0 g
pH final 7.2 ± 0.2	



Figura 3. *Bacillus cereus* (Microkit, s.f.).

#### Fundamento

Es diferencial debido a la presencia de manitol. Bacterias fermentadoras de manitol, acidifican el medio produciendo el viraje del indicador de pH rojo de fenol del rojo al amarillo, mientras las bacterias que no lo fermentan, producen colonias del color del medio.

La adición de emulsión de yema de huevo mejora el aislamiento de esta bacteria, además favorece y facilita la visualización de las colonias de *Bacillus cereus* ya que se produce un halo de precipitación de la lecitina hidrolizada alrededor de las mismas.

El diagnóstico primario y presuntivo de *Bacillus cereus*, se basa en la morfología y color de la colonia, en la precipitación de la lecitina hidrolizada y en la no fermentación de manitol.

#### Interpretación

*Bacillus cereus* presenta colonias de tamaño aproximado de 5 mm, rojas, rugosas y secas, con halo de precipitación de la yema de huevo sobre fondo rosa-púrpura.

(Britania Lab, s.f.)

## D. COMPASS *Bacillus cereus* Agar

### Uso

El COMPASS *Bacillus cereus* Agar es un medio utilizado para la detección y recuento de presuntos *Bacillus cereus*, tanto esporas como formas vegetativas, en productos para la alimentación humana y animal.

### Composición

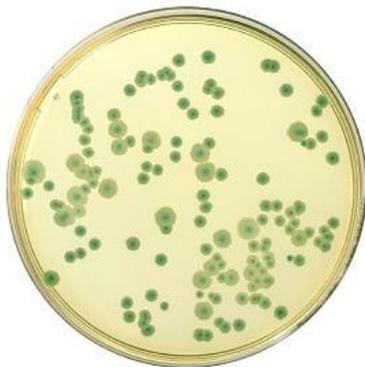
Fórmula (en gramos por litro)

Sistema de nutrientes.....	38.7 g
Cloruro de sodio .....	5.0 g
Sistema selectivo.....	5.0 g
Sustrato cromogénico.....	0.1 g
Agar bacteriológico.....	16.0 g
pH final 7.0 ± 0.2 a 25 °C	

### Fundamento

El sustrato cromogénico incluido en el medio de cultivo es hidrolizado por las especies pertenecientes al grupo *Bacillus cereus*; las colonias que se desarrollan presentan una coloración característica de verde pálido a verde. El sistema selectivo utilizado permite la inhibición de la mayoría de la flora secundaria contaminante.

La asociación entre el sustrato cromogénico y los agentes selectivos en la formulación de COMPASS *Bacillus cereus* Agar permite una enumeración directa de colonias características después de solo 24 h de incubación, sin confirmación.



(Biokar diagnostics, s.f.)

**Figura 4.** Colonias de *Bacillus cereus* (Bioser, s.f.).

## E. Medio BACARA

### Uso

Este medio cromogénico garantiza resultados rápidos y fiables. Su base nutritiva específica y su mezcla específica de antibióticos dan como resultado una selectividad extremadamente alta.

### Interpretación

Las colonias del grupo *Bacillus cereus* crecen de color rosa anaranjado, con un halo opaco.

(Biomérieux, s.f.)



**Figura 5.** *Bacillus cereus* en medio BACARA (Biomérieux, s.f.).

## F. Agar Sangre

### Uso

Medio de cultivo utilizado para el aislamiento de numerosos microorganismos. Al ser suplementado con sangre ovina, permite el crecimiento de microorganismos nutricionalmente exigentes y la clara visualización de reacciones de hemólisis.

### Composición

Fórmula (en gramos por litro)

Infusión de músculo de corazón.....	375.0 g
Peptona.....	10.0 g
Cloruro de sodio.....	5.0 g
Agar.....	15.0 g
pH final	7.3 ± 0.2

### Fundamento

La infusión de músculo de corazón y la peptona, otorgan al medio un alto valor nutritivo, que permite el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, aún de aquellos nutricionalmente exigentes. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar es el agente solidificante.

El agregado de 5-10 % sangre ovina desfibrinada estéril promueve el desarrollo de bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales y la adecuada observación de las reacciones de hemólisis.

(Britania Lab, s.f.)



**Figura 6.** Colonias de *Clostridium perfringens* en placa de agar sangre (Sochinf, 2022).

## G. Agar para aislamiento de *C. botulinum* (CBI) o Medio Selectivo para *C. botulinum* (BSM)

### Uso

El medio selectivo para botulismo (BSM) es un medio selectivo y diferencial para la identificación presuntiva de *Clostridium botulinum* a partir de alimentos o muestras clínicas.

### Composición

Fórmula (en gramos por litro)

Infusión de Corazón de Ternera.....	10.00 g
Triptosa.....	10.00 g
Cloruro de sodio.....	5.00 g
Cicloserina.....	0.25 g
Sulfametoxazol.....	0.076 g
Trimetoprim.....	0.06 g
Fosforilasa de timidina.....	0.10 mL
Suspensión de yema de huevo.....	40.00 mL
Agar.....	20.00 g
Agua desionizada.....	1.00 L

pH final: 7.4 ± 0.3 a 25 °C

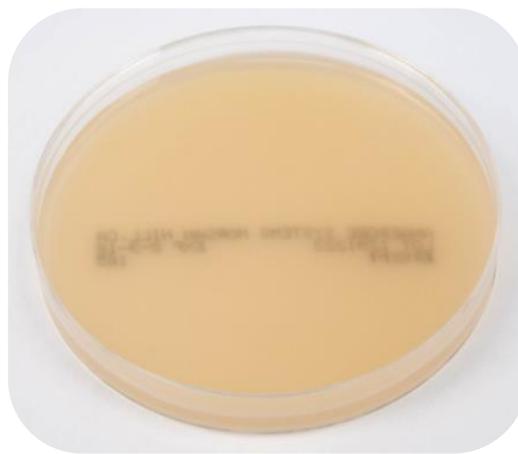


Figura 7. Medio BSM (Anaerobe Systems, s.f.).

### Fundamento

El agar BSM es un medio selectivo y diferencial utilizado para la identificación presuntiva de *Clostridium botulinum* a partir de alimentos o muestras fecales. BSM contiene cicloserina, sulfametoxazol y trimetoprim como agentes inhibidores selectivos. Se añade una suspensión de yema de huevo para la detección de lecitinasa, lipasa y actividad proteolítica. La degradación de la lecitina en la yema de huevo da como resultado un precipitado opaco alrededor de las colonias. La lipasa destruye las grasas dentro de la yema de huevo, lo que da como resultado un brillo iridiscente en la

superficie de la colonia. La actividad proteolítica se indica por una limpieza del medio alrededor de las colonias.

(Anaerobe Systems, s.f.)

## H. Agar Cicloserina Cefoxitina Fructosa (CCFA)

### Uso

CCFA es un medio enriquecido, selectivo y diferencial utilizado para el aislamiento de *Clostridium difficile*.

### Composición

(En gramos por litro)

Proteosa Peptona.....	40.00 g
Fosfato de sodio dibásico.....	5.00 g
Fosfato de Potasio Monobásico.....	1.00 g
Cloruro de sodio.....	2.00 g
Sulfato de Magnesio Heptahidratado.....	0.20 g
Fructosa.....	6.00 g
Agar.....	15.00 g
Rojo neutro (solución al 0.3 % ).....	3.00 mL
Cicloserina (solución al 10.0 % ).....	5.00 mL
Cefoxitina (solución al 1.56 % ).....	1.00 mL

### Fundamento

La base nutritiva básica consiste en peptonas animales y fructosa, y se complementa con cefoxitina y cicloserina en concentraciones que inhiben el crecimiento de la flora fecal más normal. La cicloserina inhibirá las bacterias Gram negativas, mientras que la cefoxitina inhibirá tanto los organismos Gram positivos como los Gram negativos.

Exhibirá una morfología colonial amarilla característica, en vidrio esmerilado. Se añade rojo neutro como indicador de pH. La presencia de *C. difficile* cambiará el indicador de rosa/naranja a amarillo debido a los aminoácidos que utiliza el organismo, lo que aumenta el pH general y provoca el cambio de color del indicador.

(Anaerobe Systems, s.f.)



**Figura 8.** Crecimiento de *C. difficile* en CCFA (Anaerobe Systems, s.f.).

## I. Agar Triptosa Sulfito Cicloserina con yema de huevo (TSC-EYA)

### Uso

Medio de cultivo sólido para aislamiento y identificación presuntiva de *Clostridium perfringens* según Normas ISO.

### Composición

Fórmula (en gramos por litro)

Triptona.....	15.0 g
Peptona de soja.....	5.0 g
Extracto de levadura.....	5.0 g
Meta-Bisulfito sódico.....	1.0 g
Citrato férrico amónico.....	1.0 g
Cicloserina.....	0.4 g
Yema de huevo (emulsión).....	50.0 mL
Agar.....	18.0 g



Figura 9. *Clostridium perfringens* en agar TSC-EYA (Trafalgar Scientific, s.f.).

### Fundamento

El Medio de Triptosa-Sulfito-Cicloserina es una modificación del medio clásico del TSN de Marshall, Steenbergen y McClung en el que se han sustituido los antibióticos tradicionales, polimixina y neomicina, por la cicloserina.

Por otra parte, *Clostridium perfringens* es más resistente a la cicloserina que a la sulfadiacina, polimixina y neomicina, lo que permite una dosificación más eficaz. El medio incorpora meta-bisulfito sódico y citrato férrico-amónico para poner de manifiesto la capacidad reductora de sulfitos y de esta forma se puede verificar en un solo ensayo las tres características diferenciales de esta especie anaeróbica: sulfito-reducción, crecimiento a  $44 \pm 1$  °C y resistencia a la cicloserina.

(Condalab, 2019)

## J. Fastidious Anaerobe Agar (Agar para anaerobios fastidiosos)

### Uso

Fastidious Anaerobe Agar se utiliza para el cultivo de microorganismos anaerobios y no está destinado a uso en el diagnóstico de enfermedades u otras condiciones en humanos.

### Composición

Fórmula (en gramos por litro)

Mezcla de Peptona.....	23.0 g
Cloruro de sodio.....	5.0 g
Almidón soluble.....	1.0 g
Agar.....	12.0 g
Bicarbonato de Sodio.....	0.4 g
Glucosa.....	1.0 g
Piruvato de sodio.....	1.0 g
Cisteína HCl Monohidrato.....	0.5 g
Hemina.....	0.01 g
Vitamina K.....	0.001 g
L-Arginina.....	1.0 g
Pirofosfato soluble.....	0.25 g
Succinato de Sodio.....	0.5 g
pH final 7.2 ± 0.2 a 25 °C	



**Figura 10.** *Bacteroides vulgatus* en agar para anaerobios fastidiosos (SGLab, s.f.).

### Fundamento

Las peptonas incluidas han sido elegidas para estimular al máximo el crecimiento. El almidón y el bicarbonato de sodio actúan como agentes desintoxicantes, mientras que la hemina estimula la producción de pigmentos en *Porphyromonas melaninogenicus*. Los agentes promotores del crecimiento específicos son cisteína para *Fusobacterium necrophorum*, *Propionibacterium acnes* y *Bacteriodes fragilis*, arginina para *Eubacterium spp.* pirofosfato soluble para *Porph. gingivalis* y *Porph. asaccharolyticus*. El piruvato ayuda a neutralizar el peróxido de hidrógeno y también es utilizado por

*Veillonella spp.* como fuente de energía. La vitamina K y el succinato de sodio proporcionan factores de crecimiento esenciales para algunos anaerobios, al igual que la glucosa al 0.1 %.

(Neogen, 2018)