

TEMA 47: *Bacterias anaerobias. Técnicas especiales de recogida, procesamiento, cultivo e identificación.***Autor: Guillermo Sans Gimeno****Esquema:**

1. Introducción.
2. Principales bacterias anaerobias de interés clínico.
3. Infecciones producidas por anaerobios.
 - 3.1. Toxiinfecciones.
 - 3.1.1. Clostridios histotóxicos.
 - 3.1.2. Clostridios enterotoxigénicos.
 - 3.1.3. Clostridium tetani.
 - 3.1.4. Clostridium botulinum.
 - 3.2. Infecciones endógenas.
 - 3.2.1. Bacilos Gram negativos.
 - 3.2.2. Bacilos Gram positivos (no esporulados).
 - 3.2.3. Cocos Gram positivos.
 - 3.2.4. Cocos Gram negativos.
4. Toma de muestras.
5. Transporte de muestras.
 - 5.1. Medios de transporte de anaerobios.
6. Procesamiento de las muestras.
 - 6.1. Recepción.
 - 6.2. Procesamiento.
 - 6.2.1. Preparación
 - 6.2.2. Inoculación de la muestra.
 - 6.2.3. Examen directo.
 - 6.2.4. Medios de cultivo.
 - 6.2.5. Sistemas de incubación en anaerobiosis.
 - 6.2.6. Tiempo de incubación.
 - 6.2.7. Procesamientos especiales.
7. Examen de los cultivos y aislamiento.
8. Identificación preliminar
9. Identificación final.
10. Nuevos métodos de diagnóstico.
11. Conclusiones.
12. Bibliografía.

1. INTRODUCCIÓN.

Las bacterias anaerobias son aquellas que necesitan una atmósfera con tensión de oxígeno disminuida para su crecimiento y que dejan de

crecer en la superficie de un medio de cultivo sólido en una atmósfera de aire ambiental con 10% de CO₂. Por tanto el oxígeno es tóxico para ellas, y poseen un metabolismo fermentativo en el que los aceptores finales de electrones son sustancias orgánicas. No obstante, algunas especies pueden sobrevivir con pequeñas cantidades de oxígeno. A estas especies se les denomina aerotolerantes.

Los anaerobios son el mayor componente de la flora cutánea y mucosa, pero muchas veces pueden producir patología en las zonas vecinas a estas superficies mucosas, de ahí su importancia clínica. Otras secretan potentes exotoxinas que originan *toxiinfecciones*.

Su aversión por el oxígeno determina una metodología microbiológica especial en lo referente a la toma y transporte de las muestras, así como al cultivo e identificación. Los medios de cultivo han de estar, en lo posible, libres de oxígeno e incubarse en una atmósfera anaerobia.

Esto hace que el conocimiento de estos microorganismos sea todavía escaso, ya que hasta hace pocos años era muy difícil conseguir condiciones de anaerobiosis en el laboratorio. Actualmente la introducción de equipos y reactivos sencillos para conseguir dichas condiciones han facilitado su estudio, pero todavía existen pocos especialistas en el tema, la taxonomía está en constante revisión y se desconocen muchos aspectos de los anaerobios.

2. PRINCIPALES BACTERIAS ANAEROBIAS DE INTERÉS CLÍNICO.

Vamos a establecer una clasificación sencilla basada en características morfológicas y metabólicas:

1. *Bacilos Gram positivos esporulados: Clostridium.*
2. *Bacilos Gram positivos no esporulados:*
 - Con fermentación propiónica: *Propionibacterium.*
 - Con fermentación láctica principalmente: *Bifidobacterium* y *Lactobacillus.*
 - Con fermentación láctica y succínica (a veces acética): *Actinomyces.*
 - Con fermentación butírica y fórmica: *Eubacterium* y *Egghertella.*
3. *Bacilos Gram negativos:*
 - Morfología fusiforme y producción de gránulos de azufre, fermentación butírica: *Fusobacterium.*

- Bacterias sacarolíticas que crecen en bilis e hidrolizan la esculina: Grupo del *Bacteroides fragilis*.
 - Bacterias asacarolíticas y no tolerantes a la bilis que producen colonias pigmentadas de negro: *Porphyromonas*.
 - *Prevotella*, con especies pigmentadas o no pigmentadas, sacarolíticas y no tolerantes a la bilis.
4. Cocos Gram positivos:
- En cadenas: *Peptoestreptococcus* y *Anaerococcus*.
 - En masas o racimos: *Peptococcus*.
5. Cocos Gram negativos: *Veillonella*.

3. INFECCIONES PRODUCIDAS POR ANAEROBIOS.

Las patologías ocasionadas por anaerobios responden a dos mecanismos principales: producción de toxinas (toxiinfecciones) e infecciones endógenas. Hay una serie de signos y síntomas que orientan al clínico acerca de una posible infección por anaerobios:

1. Olor fétido característico.
2. Heridas contaminadas con tierra (presenta abundantes esporas de clostridios tetánicos).
3. Tejidos necróticos, a veces con presencia de gas.
4. Heridas quirúrgicas con infección supurada, sobre todo de cirugía abdominal.
5. Tromboflebitis séptica.
6. Heridas por mordedura.
7. Infecciones localizadas en las proximidades de las mucosas.
8. Exudados sanguinolentos
9. Supuración con gránulos de azufre (*Actinomyces*).

3.1. Toxiinfecciones.

Son patologías de origen exógeno (con frecuencia a partir de las esporas del ambiente) u oportunista. Las toxinas están producidas por especies del género *Clostridium* (clostridios), que son bacilos Gram positivos esporulados cuyas especies patógenas secretan potentes exotoxinas de naturaleza proteica. Se distinguen cuatro grandes grupos de clostridios:

3.1.1. *Clostridios histotóxicos.*

El más importante es el *Clostridium perfringens*. Produce la *gangrena gaseosa* que es una mionecrosis con presencia de gas. Hay varios serotipos de la bacteria, de los cuales el principal es el A, que produce la denominada alfatoxina (que es una lecitinasa) y algunas otras toxinas de menor poder. Se halla como flora normal en el hombre y en los animales, sobre todo en el intestino.

Clostridium septicum y *Clostridium hystoliticum* son componentes de la flora normal que producen también alfatoxina y están relacionados con mionecrosis o sepsis de origen endógeno que suelen aparecer en pacientes con cáncer colorectal, leucemias, linfomas y otras inmunodeficiencias). *C. hystoliticum* segrega también una betatoxina (colagenasa) que destruye el colágeno de los tejidos conjuntivos.

3.1.2. *Clostridios enterotoxigénicos.*

Las enterotoxinas que secretan originan cuadros de gastroenteritis de gravedad diversa.

- *C.perfringens* tipo A produce una enterotoxina que origina una intoxicación alimentaria leve por ingestión de carnes contaminadas por esporas. Si la carne se cuece poco, sobrevive un número suficiente de esporas que germinan en el intestino delgado.
- *C. perfringens* tipo C origina la *enteritis necrotizante*, debida a una betatoxina. La enfermedad, que es muy grave e incluso mortal, suele aparecer en pacientes con dietas hipoproteicas que condicionan un déficit de tripsina, de modo que no se destruye la toxina beta.
- *Clostridium difficile* es el agente etiológico de la colitis pseudomembranosa. Produce 2 toxinas: una toxina B citotóxica y una enterotoxina A. El origen de la enfermedad es endógeno generalmente, y se debe a tratamientos antibióticos que eliminan la flora normal del intestino y permiten un desarrollo excesivo de este clostridio.

3.1.3. *Clostridium tetani.*

Es el agente productor del tétanos. Posee esporas terminales que deforman el citoplasma y le dan un aspecto característico al microscopio en forma de raqueta o palillo de tambor. La enfermedad se debe a la producción de una potente toxina llamada tetanoespasmina, que es una proteína termolábil. Se inactiva por calentamiento a 60°C durante 20 minutos o por formaldehído, transformándose en toxoide sin poder

patógeno, pero con poder antigénico, por lo que se utiliza para inmunizar a la población mediante vacuna.

La toxina es una neurotoxina que se une a receptores gangliósidos de las neuronas e interfiere la sinapsis impidiendo la liberación de neurotransmisores inhibitorios como la glicina. El efecto es una parálisis espástica generalizada con afectación de los músculos respiratorios, alteraciones cardiovasculares y muerte.

La enfermedad se contrae generalmente por heridas contaminadas con esporas, ya que éstas se hallan ampliamente distribuidas en el suelo y medio ambiente, ya que la bacteria forma parte de la flora intestinal de los animales.

Estas heridas deben poseer unas características especiales (*heridas tetanígenas*) debidas al carácter anaerobio de la bacteria; en general se trata de heridas punzantes, cuerpos extraños como astillas, espinas, etc. También hay una forma conocida como *tetanos neonatorum*, provocado por el corte del cordón umbilical con instrumentos contaminados.

El diagnóstico es clínico ya que es muy difícil el aislamiento bacteriológico; apenas unos pocos gérmenes que produzcan ínfimas cantidades de toxina son suficientes para desencadenar el proceso.

3.1.4. *Clostridium botulinum*.

Produce el botulismo que es una intoxicación alimentaria grave, y a veces mortal, por ingestión generalmente de alimentos en conserva mal esterilizados. La patogenicidad se debe exclusivamente a la exotoxina (8 tipos serológicos, del A al G) que habitualmente es producida fuera del organismo, al punto que más que una infección se debería considerar como intoxicación (es uno de los venenos más potentes que se conocen).

La toxina se genera al incubarse los gérmenes en el alimento entre 25 a 38°C a un pH neutro ó próximo a éste. Si bien es considerada una exotoxina, se libera cuando se produce la lisis de la bacteria. La toxina ingerida sorteada la barrera digestiva y se absorbe en el intestino, llegando por vía hemática a las uniones neuromusculares, donde impide la liberación de acetilcolina, produciendo un bloqueo presináptico que origina una parálisis flácida irreversible que conduce a la muerte por parada de los músculos respiratorios.

Existen 4 formas principales de botulismo.

- Botulismo alimentario. Forma clásica letal por ingestión de la toxina producida en alimentos conservados mal esterilizados.
- Botulismo infantil. Se debe a la ingestión por los lactantes de alimentos con esporas (miel, generalmente) con lo que se produce una colonización intestinal de clostridios que producen la toxina.

- Botulismo de las heridas. Forma muy rara a partir de heridas infectadas.
- Botulismo no determinado. Puede aparecer en niños mayores de un año sin hallarse ningún vehículo aparente, o por colonización intestinal del adulto debida a alteraciones digestivas producidas por cirugía gastrointestinal o por el consumo de antimicrobianos.

El diagnóstico es fundamentalmente clínico, pudiendo confirmarse la intoxicación con el estudio de los alimentos ingeridos para buscar toxina botulínica.

La prevención es evitar la fabricación y consumo de alimentos caseros si no existe seguridad de la perfecta esterilización. En cuanto a alimentos de origen comercial, las normas bromatológicas hacen casi imposible la contaminación; si no existe esa certeza deberá siempre calentar los alimentos a ebullición durante unos minutos, ya que la toxina es termolábil. Respecto al botulismo del lactante se evitarán los alimentos posiblemente contaminados (la miel no se dará hasta que el niño tenga casi un año, ya que entonces su intestino estará completamente colonizado por la flora normal).

3.2. Infecciones endógenas.

Requieren circunstancias favorables, como roturas traumáticas de las barreras cutáneomucosas, llegada a zonas lejanas de su hábitat, etc. Como su origen está en la propia flora, suelen ser de etiología polimicrobiana y mixta (anaerobios y aerobios facultativos).

Muchas de estas infecciones son piogénicas y cursan con abscesos (cerebrales, periamigdalares, pulmonares, intraabdominales, etc.). También hay bacteriemias, sinusitis y otitis crónicas, osteomielitis, infecciones relacionadas con las caries y periodontitis, neumonías por aspiración, peritonitis secundarias y otras. Son también importantes las infecciones de la piel y tejidos blandos como el acné, celulitis, infecciones tras mordeduras, úlceras por presión, etc.

Vamos a ver estas patologías según los microorganismos que las ocasionan.

3.2.1. Bacilos Gram negativos.

- A. *Bacteroides*. Destaca *B. fragilis*, que es muy abundante en la flora intestinal y también *B. ureolyticus* y *B. gracilis* (algunas subespecies de este último se clasifican actualmente como *Campylobacter*). Son cocobacilos capsulados resistentes a las penicilinas (por betalactamasas) que crecen en presencia de bilis, lo que permite su aislamiento.

Su poder patógeno radica en la actividad de endotoxina de sus antígenos de membrana y del polisacárido capsular. Se asocian con infecciones subdiafragmáticas (quirúrgicas o traumáticas) y genitales (por su vecindad con la porción final del aparato digestivo y región perineal). También se han descrito cepas productoras de enterotoxinas

B. *Prevotella*. Son bacilos que antes se clasificaban como grupo del *Bacteroides melaninogenicus* (actualmente *Prevotella melaninogenica*) y subespecies asociadas.

Muchas cepas producen pigmentos negros o marrones en los medios de cultivo, por lo que son fácilmente identificables. Son flora normal de boca y vías respiratorias superiores y partes blandas subyacentes.

La *Prevotella bivia* prevalece en flora vaginal y produce vaginosis e infecciones de origen obstétrico.

C. *Porphiromonas*. Flora normal de boca y encías (*P. gingivalis* y *P. endodontalis*) y flora intestinal (*P. asacarolítica*) producen infecciones relacionadas con su hábitat. Las colonias son convexas, lisas y pigmentan con el tiempo, algunas veces se observa beta hemólisis. La vitamina K estimula su desarrollo.

D. *Fusobacterium*. Son miembros de la flora normal de bucofaringe e intestino. *Fusobacterium nucleatum* es el más común en infecciones del aparato respiratorio como la *angina de Vincent* (aunque también la produce la espiroqueta *Borrellia*), mientras que *F. necrophorum* se aísla de infecciones subdiafragmáticas.

3.2.2. Bacilos Gram positivos (no esporulados).

A. *Actinomyces*. El patógeno principal es *A. israeli*, que es anaerobio estricto, si bien otras especies son aerotolerantes.

Actinomyces israeli forma parte de la flora normal de la boca y produce una enfermedad llamada actinomicosis que tiene varias formas clínicas:

- *Actinomicosis cervicofacial*. Es secundario a caries o periodontitis. El germen atraviesa la mucosa bucal y produce una osteomielitis del maxilar, que a veces forma una fístula, por la que se evacua el pus al exterior. El diagnóstico se basa en la observación con tinción de Gram de los "gránulos de azufre" (material granulomatoso con colonias de microorganismos y filamentos ramificados).

- *Actinomicosis torácica*. Se produce una enfermedad pulmonar por aspiración del agente o por extensión de lesiones cervicofaciales, que puede extenderse a costillas o vértebras. Si la enfermedad progresa, también se forma fístula.
 - *Actinomicosis abdominal*. Se desarrolla a partir de una perforación intestinal. Es posible la extensión vertebral y la fistulización al exterior.
 - *Actinomicosis genital*. Se ha descrito en mujeres que utilizan dispositivos intrauterinos. La sintomatología es escasa y sin presencia de gránulos.
- B. *Eubacterium*. Pequeños bacilos aerotolerantes, de lento desarrollo en los medios de cultivo. Viven en la boca, vías respiratorias superiores, e intestino, produciendo infecciones en zonas adyacentes (odontológicas, de cabeza y cuello, y aparato genital femenino). *Egghertella lenta* (antes *Eubacterium lentum*) produce infecciones gastrointestinales graves.
- C. *Propionibacterium*. De escasa patogenicidad, son integrantes de la flora cutánea. *Propionibacterium acnes* ha sido relacionado con el acné.
- D. *Lactobacillus*. Son bacilos largos con los bordes paralelos y los extremos rectangulares. Forman parte de la microflora bucal y vaginal. No tienen apenas poder patógeno.
- E. *Mobiluncus*. Microorganismos Gram variables que se consideran responsables con otras bacterias de las vaginosis bacterianas (ver tema de ETS).
- F. *Bifidobacterium*. Miembros de la flora normal de boca y tracto gastrointestinal. Hay varias especies sin apenas poder patógeno.

3.2.3. Cocos Gram positivos.

Destaca el género *Peptoestreptococcus*. Forman parte de la flora de la boca, intestino y genitales. Ocasionalmente ocasionan infecciones pleuropulmonares, abscesos, infecciones ginecológicas, sinusitis, etc.

3.2.4. Cocos Gram Negativos.

Veillonella parvula es miembro de la flora bucal, intestinal y genital. Se aísla de materiales clínicos, pero es dudoso su poder patógeno.

4. TOMA DE MUESTRAS.

Hay que procurar siempre una muestra que no contenga flora normal para tener resultados positivos verdaderos. No se deben cultivar, por tanto, las muestras contaminadas con anaerobios de la microbiota como, por ejemplo:

- Exudados de garganta, nasofaríngeos, bucales.
- Muestras cutáneas.
- Espujo tosido u obtenido por fibroscopia o aspirado nasotraqueal. Se contamina con la flora faríngea y bucal.
- Contenido gástrico, intestinal y heces, salvo para procesos muy concretos (botulismo, diarrea asociada a antimicrobianos y toxiinfección por *C. perfringens*).
- Orina obtenida por micción o sondaje. Se contamina con las bacterias del meato o uretra, o por la colonización de la sonda.
- Exudados vaginales y cervicales.

Después de su procesamiento se recomienda conservar las muestras a temperatura ambiente hasta 24 h, en caso de que hubiera algún problema y fuera necesario recuperarlas para un nuevo procesamiento.

Los métodos de toma más adecuados son los siguientes:

Muestra	Procedimiento
Abscesos. Empiemas. Cavidades cerradas. Líquidos estériles.	Punción-aspiración con jeringa y aguja. Si la infección es abierta se ha de tomar de la parte más profunda.
Muestras pulmonares.	Punción transtraqueal, punción pulmonar o broncofibroscopia (lavado brocoalveolar o catéter telescopado).
Muestras pleurales.	Toracocentesis
Orina.	Punción suprapúbica.
Genital femenina.	Culdocentesis, punción-aspiración.
Sangre.	Extracción y recogida en frascos de hemocultivo anaerobio.

Las muestras quirúrgicas y las biopsias también son válidas para la investigación de anaerobios.

5. TRANSPORTE DE MUESTRAS.

Ha de realizarse lo más rápido posible y se debe proteger a los microorganismos de los efectos del O₂ durante el tiempo de transporte y hasta el momento de la siembra.

Si el material se ha extraído por punción-aspiración y el transporte al laboratorio se va a realizar en menos de 30 minutos, puede enviarse en la misma jeringa expulsando el aire residual y obturando la aguja con un tapón de goma, si bien es mejor sustituir la aguja por otra estéril.

Las muestras deben ser colocadas en un sistema de transporte que asegure la anaerobiosis. Para ello, una vez realizada la aspiración se debe expulsar el posible aire contenido, y tapar la aguja con una gasa estéril impregnada en alcohol para eliminar el riesgo de aerosoles. Luego se cambia la aguja por otra estéril y se inocula el contenido, previa desinfección del tapón de goma, en la superficie del medio de transporte para anaerobios.

En las muestras purulentas (abscesos, empiemas) los anaerobios pueden sobrevivir más tiempo y muchas veces no necesitan sistema de transporte.

5.1. Medios de transporte de anaerobios.

Existen en el mercado tubos, frascos y viales. Todos están cerrados con un tapón de goma y en su interior hay una atmósfera anaerobia (se sustituye el aire por otro gas). Además, incorporan un medio de transporte reducido y un indicador de la presencia de oxígeno.

Para períodos prolongados hay de tubos con medios de transporte adecuados o bolsas plásticas con sistemas de anaerobiosis química.

Las muestras de tejidos y biopsias quirúrgicas se remiten en un frasco estéril que se puede introducir en una bolsa de anaerobiosis de plástico. Además, existen frascos de transporte para estas muestras con una base de agar y un indicador de anaerobiosis. El tejido se introduce a unos 5 milímetros de la base e inmediatamente se enrosca el tapón.

Si sólo es posible obtener la muestra mediante torunda (no se recomienda en ningún caso), se utilizarán para su envío tubos de transporte, en los que se introduce la torunda hasta aproximadamente 5 milímetros del fondo, se rompe el palillo a la altura de la tapa del tubo y se cierra rápidamente. Hay tubos de plástico de escaso calibre con un estrechamiento en la parte inferior a la superficie del agar para dificultar la difusión del oxígeno hacia la base de la torunda.

6. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

6.1. Recepción.

Antes de procesar las muestras en el laboratorio se procede a su recepción, anotando la fecha y hora de entrada y comprobando si cumple los criterios para ser aceptada (correcta identificación, muestra adecuada, condiciones de transporte, etc.). Luego se pasa al procesamiento propiamente dicho.

6.2. Procesamiento.

El procesamiento inicial incluye su preparación, examen directo e inoculación en los medios de cultivo apropiados.

6.2.1. Preparación.

Ha de ser lo más rápida posible y en una cámara de anaerobiosis (si se dispone de ésta).

El material purulento se mezcla bien en un agitador Vortex. Las muestras de tejido o biopsia se homogeneizan con un bisturí, cortando trozos muy finos hasta consistencia homogénea, o en un mortero estéril añadiendo 1 mililitro de caldo. Si la muestra se ha obtenido con torunda, se exprime en un pequeño volumen de caldo mediante movimientos rotatorios sobre las paredes del tubo, procesando luego como una muestra líquida.

Cuando se investiga la presencia de *Clostridium* se puede realizar un enriquecimiento, eliminando todas las estantes formas vegetativas con calor o alcohol (las esporas se conservan).

6.2.2. Inoculación de la muestra.

Se deposita una gota de la muestra homogeneizada en un porta para su examen microscópico, otra gota en cada medio de cultivo (mayor cantidad si el líquido no es purulento), y el resto en un caldo de tioglicolato para enriquecimiento.

Este último medio se usa cuando las bacterias se encuentran en cantidades muy pequeñas, o cuando hay una inhibición del crecimiento debido a antibióticos o a otros factores. También permite recuperar los anaerobios si falla la anaerobiosis en la incubación de los cultivos primarios,

6.2.3. Examen directo.

Permite un diagnóstico presuntivo de la existencia de bacterias anaerobias para así establecer un tratamiento inicial, ya que el aislamiento e identificación pueden demorarse varios días.

a) *Examen macroscópico*. Se observan los siguientes datos:

- Mal olor (productos finales del metabolismo de bacterias anaerobias),
- Fluorescencia roja a la luz ultravioleta (producción de protoporfirina por las especies pigmentadas de *Prevotella* y *Porphyromonas*),
- Exudados sanguinolentos.
- Exudados negruzcos (presencia de bacilos gramnegativos pigmentados),
- Existencia de tejidos necróticos, o gas en los mismos
- Presencia de gránulos de azufre en el exudado (*Actinomyces*).
- Exudados purulentos, etc.

b) *Examen microscópico*. Se realiza una tinción de Gram para ver la morfología y coloración, presencia de leucocitos, etc. Los anaerobios se tiñen mal tanto en el examen directo como en los cultivos, ya que tienen tendencia a tornarse Gram negativos, debido a la poca estabilidad frente a la decoloración y también porque puede haber variaciones tintoriales en los cultivos bacteriológicos.

Para minimizar este problema se efectúa la decoloración solamente con alcohol etílico (prescindiendo de la acetona), y se prolonga el tiempo de contacto con lugol hasta 1 minuto.

Las características microscópicas de los principales anaerobios son:

- Los *Bacteroides* aparecen como bacilos pleomórficos que se tiñen débilmente.
- Las formas cocobacilares son sugestivas de especies pigmentadas de *Prevotella* o *Porphyromonas*.
- La morfología de *Fusobacterium* es característica. Son bacilos largos con extremos acintados o filamentos delgados. A menudo se disponen en parejas unidas por un extremo. *F. mortiferum* y *F. necrophorum* son más pleomórficos, con filamentos, o formas redondas y de tinción irregular.
- Las especies de *Veillonella* son pequeños cocos Gram negativos en parejas o cadenas cortas y racimos.
- Un bacilo grampositivo grueso, de forma rectangular y sin esporas es sugestivo de *Clostridium perfringens*.

- Un bacilo grampositivo largo y ramificado es sugestivo de *Actinomyces* o *Propionibacterium*. A veces se fragmentan simulando bacilos de tipo difterioide.
- *Peptoestercoccus* son cocos Gram positivos que forman pares, tétradas, racimos y cadenas. Se pueden distinguir de los cocos Gram positivos aerobios por su decoloración variable.

La presencia de tipos morfológicos múltiples en la tinción de Gram sugiere una etiología anaerobia, ya que la mayoría de las infecciones en las que están implicados estos gérmenes son polimicrobianas.

6.2.4. Medios de cultivo.

Para el aislamiento primario de los anaerobios suelen combinarse medios de cultivo no selectivos con medios selectivos y diferenciales.

Los medios más usados son

- Agar sangre para anaerobios. Se usa agar *Brucella* o agar *Schaedler* con un 5% de sangre de carnero, a los que se añade vitamina K₁ y hemina (la mayoría de estos microorganismos requieren estos factores para su crecimiento). En este medio crecen los anaerobios, pero también los facultativos.
- Un medio selectivo para anaerobios, como el agar sangre con alcohol fenil-etílico (PEA). Inhibe los bacilos Gram negativos facultativos, así como el crecimiento en velo de algunos clostridios (*C. septicum*). Se usa si se sospecha infección mixta.
- Un caldo de enriquecimiento (tioglicolato sin indicador, suplementado con vitamina K₁ y hemina), como ya vimos en lo referente a la inoculación de las muestras.
- Agar sangre selectivo para *Bacteroides*. Hay varios tipos:
 - SNV (agar *Schaedler* con neomicina y vancomicina).
 - SKV (agar *Schaedler* con kanamicina y vancomicina).
 - ASLKV (agar sangre lacada con kanamicina y vancomicina).

Permiten el crecimiento de los *Bacteroides* del grupo *fragilis*, así como de algunas especies de *Prevotella*. La vancomicina inhibe el crecimiento de la mayoría de los grampositivos y especies de *Porphyromonas*, mientras que los aminoglucósidos lo hacen con los facultativos.

- Agar *Bacteroides* bilis esculina con amicacina (BBE) para el crecimiento selectivo y diferencial de *Bacteroides* del grupo *fragilis*. Éstos crecen dando colonias normalmente mayores de 1 mm y el medio vira a color negro debido a la hidrólisis de la esculina.
- Agar con yema de huevo (AYE), si se sospecha *Clostridium*. Detecta la producción de lipasa y/o lecitinasa, produciéndose un halo opaco alrededor de las colonias.
- Un agar selectivo para *Clostridium difficile*, como agar fructosa-cicloserina-cefoxitina (CCFA) o agar yema de huevo-cicloserina-cefoxitina (CCEY).

Los laboratorios deben realizar control de calidad de todos los medios utilizados, tanto de los comerciales como de los preparados en el propio centro.

6.2.5. Sistemas de incubación en anaerobiosis.

Los más comunes son las *cámaras*, *jarras* y *bolsas* de anaerobiosis.

- a) Las cámaras consiguen una atmósfera anaerobia mediante una mezcla de gases que contiene 5% de H₂, 5-10% de CO₂ y 85-90% de N₂. Poseen un sistema de intercambio que consiste en un compartimento rígido con una puerta interior y otra exterior. Son equipamientos muy caros y sólo están al alcance de laboratorios especializados.
- b) Las jarras son recipientes cilíndricos, de metal o plástico rígido, cuya tapa se cierra herméticamente. El sistema más utilizado para generar la atmósfera anaeróbica (GasPak[®], Becton Dickinson) se basa en los siguientes pasos:
 1. Se introducen las placas de cultivo en la jarra, así como un sobre al que se añade previamente un volumen de agua. En el sobre hay unos sustratos separados que reaccionan formando H₂ y CO₂ al incorporar el agua.
 2. El H₂ se combinará después con el oxígeno existente formando agua gracias a la presencia de un catalizador (granalla de zinc recubierta de paladio, que se encuentra depositada en una canastilla dentro de la jarra).
 3. Se introduce asimismo una tira de papel con azul de metileno (azul en presencia de O₂, incoloro en ausencia), como indicador de anaerobiosis.
 4. Por último se cierra la tapa y se comienza a incubar. La atmósfera de anaerobiosis se consigue en unas dos horas.

Actualmente existen sistemas en los que no hace falta añadir H₂O o introducir el catalizador y técnicas automatizadas para lograr la anaerobiosis.

c) Bolsas de anaerobiosis. El sistema BioBag® consiste en una bolsa plástica transparente, una ampolla de indicador de anaerobiosis (resazurina) y una ampolla generadora de anaerobiosis. Se introducen una o dos placas de Petri antes de sellar la bolsa por calor. Luego se rompen las ampollas de indicador y generador. Los gérmenes crecen y se mantienen viables al menos una semana. Tiene la ventaja de poder observar directamente si existe crecimiento sin abrir la bolsa. Se puede utilizar tanto para el transporte de muestras como para la incubación de cultivos.

d) Medios líquidos. Los sistemas anteriores sólo valen para medios sólidos. El uso de medios líquidos no se recomienda salvo para hemocultivos y líquidos orgánicos, ya que la mayoría de las infecciones por anaerobios son polimicrobianas incluyendo facultativos o microaerófilos.

Los frascos de hemocultivos para anaerobios están cerrados al vacío y contienen CO₂, una base nutritiva (digerido de soja o peptonas) y un agente reductor (tiol o tioglicolato). Además suelen llevar polianetol sulfonato sódico (SPS), que estimula el desarrollo de los anaerobios. Los frascos se examinan diariamente buscando turbidez, hemólisis o gas; se consideran negativos definitivamente a los 10 días de incubación previo subcultivo final.

e) Medios en tubo.

Se usan medios previamente reducidos y anaeróticamente esterilizados (medios PRAS), que se envasan en tubos con tapón de caucho butílico bajo atmósfera de gas libre de O₂. El agente reductor suele ser L-cisteína, que va incorporado a la fórmula del medio.

Tras la esterilización se enfrían en una máquina giratoria resultando de este modo una capa fina de agar en la superficie interna de los tubos. También existen medios líquidos de este tipo.

Los tubos se inoculan bajo corriente de CO₂. Cada tubo PRAS se convierte así en su propia cámara de cultivo anaeróbico y puede incubarse e inspeccionarse en atmósfera de aire ambiental.

6.2.6. Tiempo de incubación.

Las placas de cultivo se incuban a 35-37°C en anaerobiosis 48 horas generalmente, salvo que se use una cámara, en cuyo caso se pueden examinar a las 24 h, puesto que no es necesario sacarlas.

Si en las placas no se observa ningún crecimiento se deben reincubar hasta la semana, al menos las de agar sangre no selectivo, ya que algunos anaerobios crecen más lentamente (*Porphyromonas*, *Propionibacterium*, *Bilophila*, etc).

Deben realizarse subcultivos del caldo de tioglicolato, si se aprecia turbidez u otro signo de crecimiento, en agar sangre y agar chocolate que se incubarán en atmósfera con 10% de CO₂, y en agar sangre para anaerobios incubado en anaerobiosis. Este mismo proceder se realiza a los 7 días si no se ha detectado crecimiento para considerarlo definitivamente estéril.

Para *Actinomyces* el tiempo de incubación debe ser mayor, generalmente entre 2 y 4 semanas.

6.2.7. Procesamientos especiales.

- a) *Líquidos orgánicos*. Inocularlos en frascos de hemocultivos aerobios y anaerobios reservando un pequeño volumen para la tinción de Gram. Subcultivar los frascos en los que se detecta crecimiento de manera idéntica a los hemocultivos. En general, el cultivo anaerobio del líquido cefalorraquídeo no es útil (son muy raras las meningitis por anaerobios), aunque sí lo pueden ser los abscesos cerebrales, los empiemas subdurales y los abscesos epidurales.
- b) *Catéter telescopado*. Cortar el cepillo y colocarlo en un tubo que contenga 1 ml. de solución estéril de Ringer lactato. Agitar y preparar dos diluciones seriadas al 1/100 en Ringer lactato. Sembrar cada una de las dos diluciones en agar sangre, agar MacConkey, agar chocolate, y en medios selectivos y no selectivos para anaerobios.
- c) *Lavado broncoalveolar*. Agitar y preparar dos diluciones seriadas al 1/100 a partir de la inicial en Ringer lactato. Procesar de manera idéntica a como se procesa el catéter telescopado.
- d) *Heces para el diagnóstico de toxiinfección de Clostridium perfringens*. Realizar la detección de la enterotoxina en heces a través de técnicas de aglutinación pasiva reversa mediante látex o enzimoimmunoensayo, o bien, mediante ensayos específicos de citotoxicidad en cultivos celulares de células Vero.
- e) *Diagnóstico de botulismo*. El diagnóstico debe realizarse mediante la confirmación de las neurotoxinas y/o el cultivo del agente etiológico de muestras del paciente. Para el diagnóstico de la intoxicación alimentaria, deben obtenerse suero, heces y la comida sospechosa de contener el agente infeccioso. En el botulismo de las heridas se

recomienda obtener suero, heces y material tisular o exudativo de la herida infectada. Cuando se sospeche botulismo del lactante y botulismo por colonización intestinal se recomienda obtener suero, heces y contenido gástrico del paciente.

Debido a la gran toxicidad de las neurotoxinas, todas las muestras sospechosas deben enviarse al laboratorio de referencia del Instituto de Salud Carlos III para su procesamiento.

7. EXAMEN DE LOS CULTIVOS Y AISLAMIENTO.

Los cultivos se examinan y deben subcultivarse todas las colonias que sean diferentes. Los subcultivos se realizan siempre a partir de una única colonia, que se siembra en los siguientes medios:

- Agar sangre no selectivo para anaerobios. Se incuba en anaerobiosis 48 horas a 35° C.
- Agar chocolate que se incuba también 48 horas a 35° C, pero en atmósfera aerobia con 10% de CO₂

Las colonias subcultivadas que crezcan en el primer medio se consideran en principio anaerobios estrictos y se procede a su estudio y comunicación al clínico. También deben considerarse aquellas que crezcan en medio aerobio débilmente y cuya morfología sea sugestiva de aerotolerantes (*Actinomyces*, *Propionibacterium*, etc.).

8. IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR.

El análisis básico de los anaerobios consiste en su aislamiento en cultivo puro a partir de una muestra clínica y la identificación preliminar a nivel de grupo, y si es posible, llegar al género. Con estos datos ya se puede informar al clínico para el establecimiento de un diagnóstico y un tratamiento primario.

El primer paso es pues, la observación de las colonias y su correspondiente Gram. También pueden observarse las placas de Petri bajo luz ultravioleta para determinar la fluorescencia de las colonias. Como los anaerobios se tiñen mal, si hay duda puede hacerse un subcultivo con un disco de vancomicina. Los Gram positivos son sensibles, y los Gram negativos, resistentes.

Con todos estos datos puede hacerse una primera tipificación en varios grupos:

1. Cocos Gram positivos anaerobios.
2. *Clostridium sp.* (Visión adicional de esporas o morfología típica de *C. perfringens*).
3. Bacilos Gram positivos anaerobios. Si la morfología es de *Propionibacterium* se puede notificar como tal si se detecta la producción de catalasa.
4. Cocos gramnegativos anaerobios. Se informan como tales o como *Veillonella spp.*, ya que es el género más frecuente en muestras clínicas.
5. Bacilos gramnegativos anaerobios. Se encuadran en varios grupos según su capacidad para crecer en bilis y la susceptibilidad a vancomicina (V), kanamicina (K) y colistina (C), según sean resistentes (R), sensibles (S) o variables (V)

Grupo	Bilis-resistencia	Sensibilidad		
		V	K	C
Bacteroides grupo <i>fragilis</i>	Sí	R	R	R
Grupo <i>Prevotella/Porphyromonas</i>	No	V	R	V
<i>Fusobacterium spp.</i>	No	R	S	S
Grupo <i>Bacteroides ureolyticus/Campylobacter</i>	No	R	S	S
Grupo <i>Bilophila/Sutterella</i>	Sí	R	S	S

El grupo *Prevotella/Porphyromonas* se refiere a los bacilos Gram negativos que dan colonias negras. Dentro de ellos *Prevotella* es resistente a vancomicina y *Porphyromonas* es sensible, aunque es difícil aislarlos en cultivo puro.

Por otra parte, las características de *Fusobacterium* y del grupo *Bacteroides ureolyticus/Campylobacter* son las mismas, por lo que para diferenciarlos se recurre a la morfología.

9. IDENTIFICACIÓN FINAL.

Un análisis más detallado incluiría una identificación más precisa hasta el género e incluso la especie, así como pruebas de sensibilidad a los antibióticos (se detallan en el tema correspondiente de esta oposición). Esta etapa puede realizarse en laboratorios de referencia, mientras que el análisis preliminar sería deseable que se efectuara por todos los laboratorios de Microbiología.

Idealmente, se deberían realizar las siguientes pruebas:

1. *Pruebas bioquímicas*. Son las siguientes:

- Indol.
- Catalasa.
- Pruebas específicas de cada grupo.
- Estudio de la capacidad sacarolítica y/o proteolítica (pruebas manuales o sistemas comerciales, como el API20A ®, bioMerieux), o bien, estudio de la dotación enzimática (pruebas manuales o sistemas comerciales, como el API ZIM ® o el Rapid ID 32A ®).

Aunque no se consideran pruebas preliminares, todos los laboratorios pueden realizar la prueba del indol y la catalasa, así como la reducción de nitratos y los micrométodos comerciales.

2. *Detección de productos finales del metabolismo bacteriano por cromatografía gas-líquido*. Para ello se toma un cultivo líquido, se acidifica con ácido sulfúrico al 50% y se centrifuga recogiendo el sobrenadante, en el cual se encuentran los metabolitos. Los productos acumulados que interesan para la identificación bacteriana son fundamentalmente:

- a) Ácidos grasos volátiles: fórmico, acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, isocaproico y caproico.
- b) Ácidos grasos no volátiles: láctico y succínico

Los ácidos volátiles se extraen con éter y el extracto se inyecta en el cromatógrafo. Los no volátiles se metilan con sulfúrico y metanol, y los metilderivados obtenidos se extraen con cloroformo, inyectando después este extracto en el cromatógrafo.

3. *Espectrometría de masas*. Se utiliza en la detección de productos de algunas especies, como *Eggerthella lenta*.

Pruebas específicas para cada grupo.

a) *Cocos Gram positivos anaerobios:*

Se investigan los productos del metabolismo por cromatografía de gases, técnicas manuales o micrométodos, obteniéndose diversos grupos metabólicos:

- Con ácido acético como producto final: *Fingoldia magna* y *Micromonas micros*.

- Con ácido butírico: Diversas especies de *Anaerococcus* y *Peptoniphilus* (Estos géneros formaban parte antes de *Peptoestreptococcus*). Se dividen en dos subgrupos, indol positivos e indol negativos. La caracterización de las especies dentro de cada subgrupo se realiza mediante pruebas bioquímicas.
- Con ácido isocaproico y otros ácidos orgánicos: *Peptoestreptococcus anaerobius*.
- Con ácido caproico y otros ácidos orgánicos: *Anaerococcus octavius*.

b) *Bacilos Gram positivos anaerobios:*

- *Propionibacterium* posee como producto final ácido propiónico: La confirmación de *P. acnes* se realiza por diversas pruebas: catalasa (+), indol (+) y nitratos (+).
- Las especies y subespecies de *Clostridium* se investigan determinando lecitinasa, lipasa, indol y ureasa. También se determinan a veces los productos finales.

b) *Cocos gramnegativos anaerobios:* La más habitual es *Veillonella spp.* Da positivo la prueba de nitratos.

d) *Bacilos gramnegativos anaerobios:*

- *Bacteroides* grupo *fragilis*: diferenciación entre especies mediante pruebas bioquímicas manuales o mediante sistemas comerciales.
- BGNA grupo *Prevotella/Porphyromonas*: diferenciación entre géneros por la sensibilidad a la vancomicina (*Prevotella spp.*: resistente; *Porphyromonas spp.*: sensible) y entre especies mediante pruebas bioquímicas manuales o mediante sistemas comerciales.
- *Fusobacterium spp.*: producción de ácido butírico como producto final del metabolismo
- Grupo *Bacteroides ureolyticus/Campylobacter*. Se diferencian por la ureasa. *B. ureolyticus* es ureasa (+), mientras que los *Campylobacter* de este grupo son ureasa (-).
- Grupo *Bilophila/Sutterella*: *Bilophila wadsworthia* es catalasa (+) y *Sutterella wadsworthensis*: catalasa (-).

10. NUEVOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.

Dentro de la identificación, destacan las técnicas de Biología Molecular. Cada vez se utiliza más la secuenciación genómica, sobre todo la del ARNr16S, muy útil en la taxonomía y también en la identificación de anaerobios difíciles de tipificar. Además, es posible la automatización.

Se han desarrollado biochips de ADN (Microarrays), tarjetas que incorporan múltiples secuencias genéticas que luego se ensayan por técnicas de hibridación, previa amplificación con PCR. Permiten la identificación sobre colonia de numerosas especies anaerobias de interés clínico. La PCR cuantitativa en tiempo real se utiliza también en la detección de *Bacteroides*.

También existen nuevas técnicas basadas en la proteómica, que actualmente se consideran de gran futuro por su rapidez y mayor fiabilidad que la identificación bioquímica clásica, si bien aún sólo están disponibles para un número limitado de especies anaerobias.

11. CONCLUSIONES.

Se han revisado en este tema los aspectos fundamentales de la clínica de las bacterias anaerobias, así como las principales técnicas de toma de muestras, procesamiento e identificación de dichas bacterias.

Si bien el título del tema parece sólo hacer referencia a las técnicas de laboratorio, creo conveniente ilustrarlo con principios de Clínica, para una mayor profundización. El opositor es el que ha de decidir la extensión que va a dedicar a esta parte. No obstante, me parece muy importante incluirla en la exposición junto a la parte propiamente técnica.

12. BIBLIOGRAFÍA.

Libros:

- Prats, G. Microbiología Clínica. 1ª ed. Ed. Médica Panamericana.
- Henry, J.B. (2005). El Laboratorio en el Diagnóstico Clínico. 20ª ed. Ed. Marbán.

Internet:

- <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2026.pdf>
- <http://www.monografias.com/trabajos73/bacteriologia-anaerobica-practica/bacteriologia-anaerobica-practica2.shtml>
- <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-las-bacterias-anaerobias-150anos-despues-S0213005X13000876>
- <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia16.pdf>