

**INFECCIONES POR BACTERIAS ANAEROBIAS:
CRITERIOS DE MANEJO CLÍNICO Y PROCEDIMIENTOS
MICROBIOLÓGICOS DE DIAGNÓSTICO**

**ANAEROBIC BACTERIAL INFECTIONS:
CRITERIA FOR HANDLING CLINICAL AND
MICROBIOLOGICAL DIAGNOSTIC PROCEDURES**

**INFECCÕES POR BACTÉRIAS ANAERÓBIAS:
CRITÉRIOS DE GESTÃO CLÍNICA E PROCEDIMENTOS
MICROBIOLÓGICOS DE DIAGNÓSTICO**

Luz Angélica Quintero B.





INFECCIONES POR BACTERIAS ANAEROBIAS: CRITERIOS DE MANEJO CLÍNICO Y PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS DE DIAGNÓSTICO

ANAEROBIC BACTERIAL INFECTIONS: CRITERIA FOR HANDLING CLINICAL AND MICROBIOLOGICAL DIAGNOSTIC PROCEDURES

INFECCÕES POR BACTÉRIAS ANAERÓBIAS: CRITÉRIOS DE GESTÃO CLÍNICA E PROCEDIMENTOS MICROBIOLÓGICOS DE DIAGNÓSTICO

Luz Angélica Quintero B.*

RESUMEN

El incremento de las infecciones por bacterias anaerobias, la resistencia de estos gérmenes a las limitadas opciones terapéuticas de uso empírico, el poco y reciente conocimiento que se tiene sobre estos gérmenes, conlleva a que el clínico no sospeche en la mayoría de los casos que se encuentra ante un posible cuadro infeccioso cuyo agente etiológico involucra un germen anaerobio, retardando el diagnóstico oportuno y el inicio adecuado de la antibioticoterapia, explicando el súbito aumento en la morbi-mortalidad y en la vulnerabilidad de los pacientes. Esto crea la apremiante necesidad en las instituciones hospitalarias de desarrollar protocolos y estandarizar guías de manejo de infecciones por bacterias anaerobias actualizados y acordes a los recursos disponibles que garanticen y optimicen los procesos que intervienen en la búsqueda y recuperación de estos gérmenes tan exigentes, y que le permitan a todo el cuerpo médico y paramédico

un adecuado manejo de estos eventos para el mejoramiento de la atención y seguridad de los pacientes.

El propósito de esta guía es estandarizar un protocolo actualizado en diagnóstico clínico y bacteriología anaeróbica que unifique criterios entorno a la selección, toma y transporte adecuados de muestras clínicas, el cual garantice la viabilidad del espécimen y la recuperación de gérmenes anaerobios con el fin de obtener su identificación y susceptibilidad antibiótica.

PALABRAS CLAVES

Anaerobios; infecciones anaerobias; bacteriología anaeróbica.

ABSTRACT

The increase of infections with anaerobic bacteria, the resistance of these organisms to limited treatment options for the empirical data, and the recent and little knowledge we have about these bodies, leads the doctor not to suspect that it is in most cases, compared to a possible infectious agent which involves an anaerobic germ, delaying diagnosis and timely initiation of appropriate antibiotic therapy, explaining the sudden increase in morbidity and mortality, and the vulnerability of patients. This creates an urgent need in the hospitals to develop updated and standardize protocols, guidelines management of infections caused by anaerobic bacteria and consistent with available resources to secure and optimize the processes involved in search and retrieval of these demanding germs, and it will allow all the medical and paramedical staff proper management of these events in order to improve the service and the patient safety.

The purpose of this study is to standardize an updated protocol of clinical and anaerobic bacteriology to unify the criteria for selection,

Fecha de Recepción del Artículo: 21 de Septiembre de 2009.

Fecha de Aceptación del Artículo: 30 de Noviembre de 2009.

* Sección de Microbiología, Hospital Central Policía Nacional.

collection and proper transportation of clinical samples, which ensures the viability of the specimen and the recovery of anaerobic organisms in order to obtain their identification and susceptibility to antibiotics.

KEY WORDS

Anaerobes; anaerobic infections, anaerobic bacteriology.

RESUMO

O aumento de infecções por bactérias anaeróbicas, a resistência destes organismos às opções limitadas do tratamento para o uso empírico, e o pouco e recente conhecimento que temos sobre estes organismos, leva o médico a não suspeitar que se encontra, na maioria dos casos, ante um possível quadro infeccioso cujo agente etiológico envolve um germe anaeróbio, retardando o diagnóstico oportuno e o início adequado da antibioticoterapia, explicando o súbito aumento na morbidez, na mortalidade e na vulnerabilidade dos pacientes.

Isso cria uma necessidade urgente nas instituições hospitalares de desenvolver e padronizar protocolos de orientações de gestão de infecções por bactérias anaeróbicas atualizados e consistentes com os recursos disponíveis para garantir e otimizar os processos envolvidos na pesquisa e recuperação desses germes tão exigentes, o que permitirá que todo o corpo médico e paramédico tenha adequada gestão desses eventos a fim de melhorar o atendimento e a segurança do paciente. O propósito deste estudo é padronizar um protocolo atualizado de diagnóstico clínico e bacteriologia anaeróbica que unifique os critérios de seleção, coleta e transporte adequados de amostras clínicas, o que garante a viabilidade do espécime e a recuperação de organismos anaeróbios com o

fim de se obter sua identificação e suscetibilidade a antibióticos.

PALAVRAS-CHAVE

Anaeróbios; infecções anaeróbicas, bacteriologia anaeróbica.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismo anaerobios son aquellos gérmenes que solo son viables en ausencia de cantidades significativas de oxígeno (O₂) y bajo condiciones de potenciales REDOX (Eh) muy reducidos.

Las bacterias anaerobias no crecen ni se multiplican en presencia de oxígeno dado que son destruidas por este, así como por los radicales tóxicos de oxígeno. La razones por la que los anaerobios varían su tolerancia al oxígeno son múltiples: una es que la tolerancia al oxígeno de muchos anaerobios obligado moderados depende de su producción de superóxido dismutasa (SOD), catalasas y peroxidasas que son protectoras contra los productos tóxicos de la reducción del oxígeno y otra es que la exposición al O₂ atmosférico provoca diversas reacciones dentro de las células bacteriana, mediadas por flavoproteínas.

El potencial de oxidoreducción (redox) está afectado por el pH (o concentración de iones hidrógeno) y agentes reductores como tioglicolato y L-cisteína que se agregan al medio de transporte y a ciertos medios de cultivo para ayudar a mantener condiciones reductoras en el medio. Entre menor cantidad de formas oxidantes (receptor de electrones) y mayor sea la cantidad de formas reducidas (dador de electrones), mas bajo será el potencial REDOX, lo cual generara un ambiente propicio para el desarrollo de las bacterias anaerobias.

1. CLASIFICACIÓN DE LOS GÉRMENES ANAEROBIOS

Los anaerobios se dividen en 3 grupos principales:

Anaerobios facultativos

Son bacterias que proliferan mediante procesos oxidativos, utilizando oxígeno como aceptor terminal de electrones, o en anaerobiosis utilizando reacciones de fermentación para obtener energía. Estas bacterias son patógenos comunes que con frecuencia son llamadas aerobias.

Anaerobios obligados

Son bacterias que no utilizan oxígeno para su proliferación y metabolismo, sino que obtienen su energía de reacciones fermentativas, estos se subdividen en 2 grupos:

- Anaerobios obligados estrictos que son los que no son capaces de crecer en agares expuestos a niveles de O₂ mayores al 0.5 %, por ejemplo *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novy* tipo B *Selenomonas ruminantium*, *Treponema denticola*.
- Anaerobios obligados moderados, que son bacterias que pueden crecer cuando se exponen a niveles de O₂ del 2% al 8 %, por ejemplo: *Bacteroides fragilis*, *Prevotella* y *Porphyromonas* (pigmentadas), *Clostridium perfringens*, *Fusobacterium nucleatum*.

Anaerobios aerotolerantes

Pueden crecer pobremente en agares expuestos al aire o en incubadores de CO₂, pero que crecen abundantemente en condiciones anaerobias, por ejemplo: *Clostridium carnis*, *Clostridium histolyticum* y *Clostridium tertium*.

Los microorganismos microaerófilos requieren O₂ como aceptor final de electrones, pero no crecen en aerobiosis y crecen mínimamente en anaerobiosis, para su desarrollo se agrega una mezcla de gases (5% O₂, 10 % C O₂ y 85% NO), por ejemplo *Campylobacter jejuni*.

La mayoría de los aislamientos anaerobios de muestras seleccionadas y recolectadas en forma adecuadas corresponden a anaerobios obligados moderados (Forber B. Y Scott, 2004). Estos microorganismos son más tolerantes a los efectos tóxicos del oxígeno que los anaerobios obligados estricto; sin embargo; el oxígeno los mata a pesar de que las condiciones anaerobias se mantengan de modo apropiado durante la recolección y transporte de las muestras hacia el laboratorio y durante los pasos requeridos para el procesamiento de muestras y el aislamiento e identificación.

Han ocurrido muchos cambios recientes en la clasificación taxonómica, los cuales se han realizado en base a estudios genéticos que utilizan PCR y secuenciación de RNA 16S ribosómico, 16Sr DNA, PCR de región espaciadora de 16S-23S RNA, entre otros (Cercenado E. y Cantón R., 2004 & Jousimies-Somer, H. R Y Otros, 2002).

2. EPIDEMIOLOGÍA

Flora Anaerobia

La mayoría de las bacterias anaerobias que producen infecciones en los seres humanos también son parte de la flora comensal del hombre y se desarrollan en la vecindad de las superficies mucosas en las cuales predominan como flora normal anaerobia; el conocimiento de la flora autóctona es de gran utilidad para sospechar que gérmenes se encuentran produciendo la infección, ayuda al clínico a establecer una antibioticoterapia empírica

racional y al microbiólogo a correlacionar tipo de muestra, posibles gérmenes clínicamente importantes asociados e identificaciones bacterianas obtenidas.

La presencia de estos gérmenes en zonas ricas de O₂ se explica por la existencia de micronichos protegidos del medio ambiente y por el consumo de oxígeno y la producción de gas con lo que reducen el potencial redox y facilitan el crecimiento de las bacterias anaerobias, constituyendo este sinergismo una peculiaridad de estos patógenos (Koneman, 2008 & Forber, B. Y Scott, 2004).

En la piel se encuentran en los folículos pilosos y las glándulas sebáceas; la gran mayoría pertenecen al género *Propionibacterium* (en particular *P. acnés*). En la boca existen una gran variación del potencial “redox” entre las distintas partes, lo que determina los diferentes géneros presentes: *Actinomyces*, *Bacteroides*; *Bifidobacterium*, *Bilphila*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Leptotrichia*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Selemonas*, *Treponema*, *Veillonella* y *Wolinella*.

En el tracto gastrointestinal los anaerobios se hallan en el intestino grueso en su mayoría, donde suponen el 98-99% del total de microorganismos; se han aislado más de 400 especies, donde predominan los *Bacteroides* del grupo *fragilis* (especialmente *B. vulgatus* y *B. thetaiotaomicron*). *Peptostreptococcus* y *Clostridium* son muy frecuentes. En este sitio anatómico cumplen un papel fisiológico importante: protegen de la colonización e infección por agentes patógenos e intervienen en un gran número de procesos metabólicos, como la síntesis de vitamina K, la desconjugación de los ácidos biliares, la producción de compuestos nitrogenados y la alteración de fármacos, sulfas y digoxina entre otros.

En la vagina predomina el *Lactobacillus spp.*, aunque también se aíslan otros anaerobios como cocos, *Bacteroides*, *Prevotella* y *Clostridium*. Otros anaerobios patógenos (*Clostridium botulinum* y *Clostridium tetani*) son habitantes del suelo y del ambiente, y no se consideran parte de la flora normal de los seres humanos.

La adquisición de infecciones y enfermedades anaerobias son de distinta índole: disminución del Eh, compromiso de las mucosas que ejercen como barrera de la flora comensal, alteraciones de sistema de defensa del huésped (diabetes, quemaduras, inmunosupresión, procesos malignos), modificaciones del equilibrio bacteriano entre aerobios y anaerobios, procedimientos invasivos (bacteremias por extracción dental causa de endocarditis infecciosa) (Rajasuol A. y Otros, 2004), contaminación de una herida, ingesta de toxinas, entre otras.

Tabla 1. Incidencia de Anaerobios en las Infecciones

***Incidencia de Anaerobios en las Infecciones
(1, 2,10,9)***

TIPO DE INFECCION	INCIDENCIA (%)
Neumonía, absceso pulmonar, neumonía necrosante.	62-93
Bacteriemia (10)	4
Absceso cerebral	60-89
Sinusitis crónica	52
Dental/bucal	90-100
Empiema (torácico)	76
Infección pleural (9)	
Sepsis intrabdominal/pelviana	60-100
Otras infecciones de tejido blandos	
•absceso mamario	53-83
•Heridas posapendicectomía y poscirugía electiva de colon	79-95
•Osteomielitis	40
•Absceso perirrectal	77
•Abscesos cutáneos y de tejidos blandos	60-62
•Celulitis crepitantes no clostridianas	75
•Gangrena gaseosa (mionecrosis clostridiana)	100
•Absceso pilonidal	88
•Gangrena diabética infectada, ulcera de pie diabético	85-95
Infección urinaria	<=1

El resurgimiento de las bacteremias anaerobias pueden depender de la región geográfica, el uso de antibióticos, de las políticas de la institución,

la casuística de la población en estudio, la morbilidad del paciente y la inmunosupresión (Lukas F. y otros, 2008).

¿Cuándo se sospecha de una infección causada o en asociación con anaerobios?

Consiste en la observación de los siguientes datos: mal olor (productos finales del metabolismo de bacterias anaerobias), de aspecto purulento, con fluorescencia roja a la luz ultravioleta (producción de protoporfirina por las especies pigmentadas de *Prevotella* y *Porphyromonas*), exudados sanguinolentos, exudados de color negrozco (presencia de bacilos gramnegativos pigmentados), existencia de tejidos necróticos, gas en los tejidos, existencia de gránulos de “azufre” en el exudado (presencia de *Actinomyces* spp. y *Propionibacterium propionicus*), exudados purulentos; cuando la infección persiste sin lograr aislamiento de gérmenes. Tratamiento previo con trimetoprim-sulfa, quinolonas y aminoglicosidos. Ausencia de crecimiento en aerobiosis.

En muchas ocasiones la ayuda de un examen tan sencillo pero de tanto valor diagnóstico como una tinción de Gram es de una gran utilidad en el diagnóstico clínico-microbiológico presuntivo, ya que proporciona información acerca de los tipos de bacterias existentes, cantidad relativa de las mismas, presencia de leucocitos, etc.

Por otra parte, es un elemento importante para el control de calidad del laboratorio. Si no se consigue aislar todos los morfotipos observados esto puede ser debido, probablemente, a algún fallo en los distintos pasos del diagnóstico de los anaerobios (recolección de la muestra, transporte o procesamiento), o bien se trata, aunque es menos común, de una inhibición del microorganismo por un antibiótico residual. No solo revela los tipos y las cantidades relativas de microorganismos y células del huésped

presentes sino también es una medida de control para la eficacia de las técnicas anaerobias. Sin embargo, la ausencia de leucocitos no descarta una infección grave por anaerobios ya que ciertos microorganismos, como los clostridios, producen toxinas necrosantes que destruyen los glóbulos blancos.

3. BACTERIOLOGÍA ANAERÓBICA

Aislamiento de Bacterias Anaerobias

Muchos estudios han mostrado que si los especímenes no son recolectados ni cultivados adecuadamente para la recuperación de estos microorganismos y sin una óptima selección, recolección, transporte, cultivo y técnicas de aislamiento pueden ser múltiples los organismos aislados (Ronald M., 2004 & Citron, D. M. y Otros, 2007).

Muestras Clínicas Adecuadas para Cultivo Anaerobio (Picaso J., 2003).

- Bilis.
- Biopsia de tejido de endometrio obtenido con una cureta de aspiración del endometrio.
- Biopsia de mucosa intestinal. Ciertas poblaciones bacterianas se alteran en colitis ulcerativa activa y pueden desempeñar un papel en la patogénesis de la enfermedad (Katja L. y Otros, 2006).
- Sangre.
- Médula ósea.
- Lavados bronquiales obtenidos de un catéter de doble vía tapado (Tunney M. y Otros, 2008).
- LCR. Organismos anaerobios son raramente aisladas. Meningitis anaeróbica es

aproximadamente el 1% de meningitis bacteriana aguda. Se ha asociado con infecciones contiguas (otitis, sinusitis, faringitis, absceso cerebral), de cabeza y cuello malignidad, la reciente cirugía de trauma cabeza y cuello, y el sistema nervioso central (SNC-ventriculitis y un absceso cerebral, cirugía craneal o dental, traumatismo craneoencefálico). Se destaca la importancia del cultivo anaeróbico, sin el cual no habría habido ningún diagnóstico o susceptibilidad antibiótica pautas para orientar el tratamiento adecuado (Anneke K. y Otros, 2008).

- Aspirado de culdocentesis.
- Úlcera decúbito, si se obtiene de la base de la lesión después del desbridamiento cuidadoso de los detritos superficiales (Citron D. M. y Otros, 2007).
- Líquidos de sitios normalmente estériles (Peritoneal).
- Material de aspirado de los abscesos.
- En las infecciones abiertas es necesario recurrir a muestras representativas, que deben ser de la parte profunda, tomadas quirúrgicamente por aspiración percutánea o tras la eliminación de los tejidos necróticos superficiales por curetaje o por aspiración. En su defecto, se puede tomar la muestra con un hisopo de la base de la lesión.
- Aspirado o biopsia percutánea del pulmón.
- Gránulos de azufre a partir del drenaje de una fístula.
- Líquido de toraconcentesis (pleural).
- Aspirado transtraqueal.
- Contenido uterinos, si se colecta con hisopo protegido.

- Las muestras quirúrgicas y las biopsias también son idóneas para la investigación de bacterias anaerobias. Para evitar el aislamiento de colonizadores (en lugar de patógenos) de la flora, se utiliza una primera limpieza y posterior un debridamiento para obtener muestras de biopsia de tejidos, especialmente en pie diabético (Citron D. M. y Otros, 2007).

Muestras Clínicas Inadecuadas para Cultivo Anaerobio (Cercenado E. y Cantón R., 2004)

- Lavado o cepillado bronquial (excepto si se recolecta con un catéter de doble vía tapado).
- Exudado de garganta, nasofaringe o bucales.
- Espujo expectorado. A pesar que el esputo expectorado contiene en un alto grado gérmenes anaerobios existen una población de pacientes para la cual es importante determinar la presencia de anaerobios estrictos. Las condiciones de anaerobiosis existen en los pulmones de pacientes con Fibrosis Quística y la presencia de anaerobios contribuye a la inflamación e infección de los pulmones FQ, un tratamiento adecuado puede mejorar la función pulmonar y el conocer la flora independientemente de que sea colonizante permite determinar infecciones por exacerbación de la misma. El estudio manejo expectoraciones espontáneas y BAL tomados y clasificados por tinción de Gram como muestras adecuadas tanto de pacientes sanos como de pacientes con FQ (Tunney M. y Otros, 2008).
- Heces (excepto para *Clostridium difficile*, diarrea asociada a antimicrobianos y toxiinfección por *C. perfringens*).
- Contenido gástrico o de intestino delgado (excepto en e síndrome de asa ciega).
- Drenaje de ileostomía o colostomía.

- Secreciones obtenidas por aspiración nasotraqueal u orotraqueal.
- Hisopado de lesión cutánea superficial (abierta).
- Hisopado de fauces, uretral vaginal o cervical y rectal.
- El empleo de hisopos no es una alternativa adecuada debido a la exposición excesiva de la muestra a los efectos de la desecación, la posibilidad de contaminación durante la recolección y a que los microorganismos pueden quedar retenidos dentro de las fibras del hisopo.
- Orina por micción espontánea o por sonda (La orina emitida espontáneamente o con sonda se contamina por la colonización natural de la porción distal de la uretra y el meato o por la colonización de la sonda. Si existen catéteres suprapúbicos o renales pueden utilizarse para tomar la muestra con resultados aceptables).
- El uso del broncofibroscopio ha mejorado la toma en neumonías (catéter telescopado protegido o lavado broncoalveolar) y la punción transtraqueal ha caído en desuso. Otras muestras respiratorias válidas son la punción pulmonar directa y la toracocentesis.

Cuadro 1. Métodos de Obtención de las Muestra según Localización

**Métodos de Obtención de las Muestra
según Localización (3,7)**

Infecciones	Muestras
SNC (abscesos y empiemas)	Aspiración Es el mejor método por su sencillez y facilidad. Biopsias
Cabeza y cuello	Aspirados Biopsias
Oculares - Endoftalmitis	Aspiración intraocular
ORL - Sinusitis - Otitis media crónica	Aspiración percutánea o por rinoscopia y material quirúrgico de los senos. Torunda
Tracto respiratorio inferior - Neumonías - Empiema pleural	Catéter telescopado protegido Lavado broncoalveolar Punción pulmonar percutánea Toracocentesis

<p>Aparato circulatorio</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bacteriemia - Endocarditis 	<p>Hemocultivo. Sólo debe realizarse hemocultivo específico cuando se sospeche una bacteriemia por anaerobios. Probablemente debe realizarse rutinariamente en Servicios donde la bacteriemia por anaerobios es frecuente (Cirugía abdominal y ginecológica especialmente).</p>
<ul style="list-style-type: none"> - Pericarditis 	<p>Válvula, verruga Líquido pericárdico</p>
<p>Intraabdominales</p> <ul style="list-style-type: none"> - Peritonitis y abscesos - Colecistitis - Heridas laparotómicas 	<p>Aspiración y cirugía Bilis tomada quirúrgicamente Tomas en profundidad</p>
<p>Tubo digestivo</p> <ul style="list-style-type: none"> - Diarrea asociada a antimicrobianos - Intoxicación por <i>C. perfringens</i> 	<p>Heces Heces para toxina y recuento</p>
<p>Genitales femeninas</p>	<p>Cirugía Culdocentesis Aspiración (absceso Bartholino) Aspiración endometrial protegida DIUs (actinomicosis)</p>
<p>Urinarias</p>	<p>Punción suprapubica</p>
<p>Osteoarticulares</p> <ul style="list-style-type: none"> -Artritis -Osteomielitis 	<p>Aspiración Aspiración, cirugía, biopsia.</p>
<p>Tejidos blandos</p>	<p>Aspiración percutánea Cirugía Tomas en profundidad</p>
<p>Relacionadas con alimentos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Intoxicación por <i>C. perfringens</i> - Botulismo 	<p>Alimento sospechoso (recuento) Alimento sospechoso (toxina, bacteria)</p>

Botulismo

Alimento sospechoso (toxinas, cultivo)
Suero (detección de las toxinas)
Contenido gástrico y vómitos (toxinas)
Heces (toxinas y cultivo)
Material de heridas (cultivo)
Muestras ambientales (bioterrorismo)

Transporte de muestras

Un factor crucial para el éxito en el aislamiento de anaerobios es el transporte de muestras. Se debe proteger a los microorganismos de los efectos del O₂ durante el tiempo que transcurre entre la extracción y la siembra anaeróbica; aunque estas pueden sobrevivir varias horas, incluso días, en un medio de transporte adecuado; en las muestras purulentas pueden sobrevivir más tiempo que en los líquidos claros, estas se comportan como medios de transporte 'per se' por su propia constitución y se han podido recuperar anaerobios hasta 24-48 después de realizada la extracción. Las muestras deben ser colocadas en un sistema de transporte que asegure la anaerobiosis.

En casos de extracción de material con aguja y jeringa, si la demora no supera los 30 minutos puede enviarse el material en la misma jeringa expulsando el aire residual y obturando la aguja con un tapón de goma. Las jeringas utilizadas en la aspiración de pus no deben utilizarse como transporte debido al riesgo de pinchazos y la posible expulsión accidental de su contenido; además, el oxígeno difunde a través del plástico de sus paredes. Una vez realizada la aspiración se debe expulsar el posible contenido gaseoso, tapando la aguja con una gasa estéril impregnada en alcohol para eliminar el riesgo

de aerosoles. A continuación, se cambia la aguja por otra estéril y se inocula el contenido, previa desinfección del tapón de goma, en la superficie del agar de un vial de transporte para anaerobios o simplemente se transporta así, la jeringa con el contenido a estudiar con aguja estéril nueva y con su debido protector, haciendo énfasis en que la muestra no debe tardar más de 30 minutos en llegar al laboratorio.

Si solo puede obtenerse una muestra con hisopo, se requiere un dispositivo especial para la recolección con una atmósfera libre de oxígeno. En el mercado existen 2 sistemas de transporte Port-A-Cul y Copán, estudios publicados coinciden con que ambos métodos son eficaces en el mantenimiento de la viabilidad del organismo y la prevención de sobrecrecimiento (Tunney M. y Otros, 2008).

Para muestras tisulares. El tejido se coloca en poca cantidad de solución fisiológica para mantener la humedad. Se inserta en una bolsa independiente que genera una atmósfera de anaerobiosis para el transporte (Sistema GasPak). También los tejidos (biopsias y raspados) se enviarán en tubos de tapón de rosca, viales para transporte de anaerobio de tejidos, y si son de gran tamaño, en placas de Petri o recipientes para recogida de orina. En cualquier caso los tejidos no deben ponerse en contacto con formol o cualquier sustancia.

Los cepillos protegidos tomados por broncoscopia se colocaran si se quiere buscar anaerobios en tubos con caldo prereducido que además sirve de diluyente.

El envío de las muestras al laboratorio de microbiología debe ser inmediato. Se deben transportar manteniéndolas a temperatura ambiente. Las temperaturas de incubación pueden ocasionar el sobrecrecimiento de especies poco exigentes, fundamentalmente facultativas, y la pérdida de algunas más sensibles, mientras que las temperaturas bajas permiten un aumento de la difusión del oxígeno.

Procesamiento de muestras clínicas

La muestra se procesa con las máximas precauciones y lo antes posible, siendo aconsejable que no transcurran más de 15 minutos desde su recepción en el laboratorio. Si es posible, la preparación se deberá hacer en una cámara de anaerobiosis para minimizar su oxigenación. El material purulento se mezcla bien con la ayuda del agitador Vortex. Las muestras de tejido o de biopsia se homogenizan, ya sea con un bisturí, cortando trozos muy finos hasta obtener una consistencia homogénea, o en un mortero estéril añadiendo 1 mililitro de caldo.

En el caso de que la muestra se haya obtenido con torunda, se exprime en un pequeño volumen de caldo mediante movimientos rotatorios sobre las paredes del tubo y este caldo se procesa como una muestra líquida. Cuando se investiga la presencia de *Clostridium* se puede realizar un enriquecimiento, que consiste en eliminar todas las formas vegetativas y conservar las esporas tratando la muestra con calor o alcohol.

La elección de los sistemas de incubación viene determinado por el costo, número de cultivos y limitaciones de espacio. Los más comunes son

las cámaras, jarras o cajas, bolsas de anaerobiosis y medios líquidos (hemocultivos).

Inmediatamente después de su siembra las placas de cultivo se incuban a 35-37°C en el sistema de anaerobiosis disponible. Si se emplean jarras o bolsas hay que esperar 48 h (los cultivos no deben exponerse al oxígeno hasta después de 48 horas de incubación, debido a que los anaerobios son más sensibles al oxígeno durante su fase de crecimiento logarítmico y la morfología de la colonia a menudo cambia entre las 24 y las 48 horas), a no ser que se busquen microorganismos de crecimiento rápido y se empleen medios selectivos como el BBE para el grupo de *Bacteroides fragilis* o el EYA para clostridios, en cuyo caso se pueden examinar a las 24 h.

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

En el diagnóstico de la actinomicosis el tiempo de incubación debe ser mayor, generalmente entre 2 y 4 semanas.

Para conseguir una recuperación óptima de bacterias anaerobias es fundamental elegir correctamente los medios de cultivo primarios. Existen medios que pueden ser incluidos o

sustituidos, por ejemplo el medio de carne picada y glucosa se usan a menudo en vez del medio tioglicolato y el agar ácido nalidixico colistin (CNA) puede usarse en lugar del agar feniletanol (PEA) (Koneman, 2008).

La mayoría de estas bacterias requieren para su crecimiento vitamina K1 y hemina. Para su aislamiento e identificación presuntiva se aconseja utilizar una combinación de medios enriquecidos no selectivos, selectivos y diferenciales, entre los que se incluyen (Ronald, M., 2004):

Medios Sólidos

- Un medio de agar sangre para anaerobios como agar Schaedler con un 5% de sangre de carnero, a los que se añaden vitamina K1 (1 µg/ml) y hemina (5 µg/ml). En estos medios crecen tanto las bacterias anaerobias facultativas como las anaerobias obligadas.
- Agar con alcohol fenil-étílico (PEA) con un 5% de sangre de carnero. El alcohol inhibe el crecimiento de bacilos gramnegativos facultativos, principalmente el crecimiento en velo de las especies de *Proteus*. También evita el crecimiento en velo de algunas especies de *Clostridium* como *Clostridium septicum*, facilitando de este modo su aislamiento. Se aconseja sembrar en este medio las muestras purulentas o cuando sea previsible una infección mixta.

Medios Líquidos

En el comercio se dispone de botellas especiales para hemocultivos en anaerobiosis que contienen diversos medios, como caldo tioglicolato, caldo tiol y caldo Schaedler. Muchos anaerobios se desarrollan en las botellas para hemocultivos en aerobiosis, pero es mejor utilizar un caldo de anaerobios hermético cuando se desea aislar

estos microorganismos a partir de sangre o médula ósea. Se disponen en el mercado de: Bactec Plus Anaerobic/F; Bactec Lytic/10 Anaerobic F; Bactec Anaerobic F; BacT/ALert FN (con carbón activado); BacT/Alert; ESP 80N y ESP 40 N (caldos) 200.

Existen en el mercado también medios de transporte de sangre que contienen polyanethol sulfonato de sodio (SPS) que es un componente común de los medios de cultivo de sangre, debido a sus propiedades anticoagulantes, anticomplemento, y antifagocíticas; también inactiva la lisozima, aminoglucósidos, y Polimixinas pero inhibe el crecimiento de *Peptostreptococcus anaerobius*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptobacillus moniliformis*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus ducreyi*, y *Campylobacter* sp, sin embargo, comparado con las botellas Anaeróbicas el porcentaje de recuperación e inhibición es el mismo (Brian C. P. y Otros, 2007). Otros caldos tradicionales disponibles son caldo tripticasa de soja, caldo suplementado de peptona, caldo con infusión cerebro corazón, caldo Brucella, caldo Columbia.

Además deben sembrarse en aerobiosis agar sangre de carnero al 5%, agar chocolate y agar MacConkey, debido a que la mayoría de las infecciones anaerobias son polimicrobianas y pueden incluir bacterias aerobias y anaerobias facultativas.

La preparación de las placas para los cultivos primarios debe ser reciente o usarse dentro de las 2 semanas luego de su preparación. Las placas almacenadas durante periodos prolongados acumulan peróxidos y se deshidratan; esto produce una inhibición del desarrollo. La reducción de los medios en un ambiente anaerobio elimina el oxígeno disuelto pero no ejerce efecto alguno sobre los peróxidos.

Inspección de Colonia

Se debe determinar el número de sitios diferentes de colonias en las placas anaerobias y registrar una estimación semicuantitativa del número de cada tipo (escaso, moderado o abundante desarrollo). Con un asa o pipeta de pasteur se debe transferir cada colonia diferente a otra placa de agar sangre para anaerobios para obtener un cultivo puro y a una placa de agar sangre para aerobios para probar la aerotolerancia.

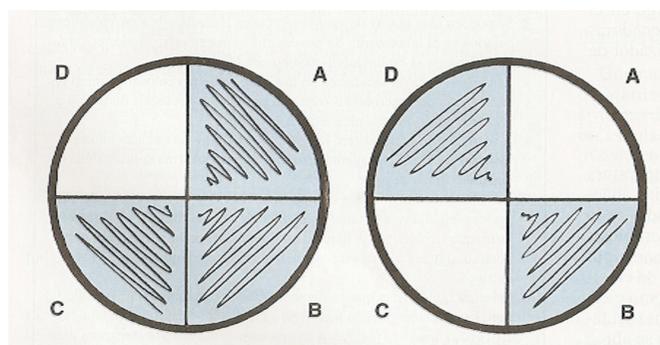
Se examinan los caldos inoculados con la muestra original junto con todas las placas de aislamiento primario. Si no existe desarrollo evidente en las placas anaerobias primarias o si las colonias aisladas no corresponden a los tipos morfológicos encontrados en los frotis directos teñidos con Gram de la muestra, cada medio de caldo debe ser subcultivado en dos placas de agar sangre anaerobio: una para incubación anaerobia y otra para CO₂ 5-10%.

Prueba de Aerotolerancia

Cada una de las colonias de la placa de aislamiento anaerobio o de la placa primaria si están separadas se subcultiva en una placa de agar sangre aerobia y anaerobia para una incubación de toda la noche. *Haemophilus influenzae*, que se desarrolla en agar sangre anaerobio en anaerobiosis pero no en agar sangre ordinario en aerobiosis, puede ser confundido con un anaerobio. Esto se puede evitar mediante la inoculación en una placa de agar chocolate (medio aerobio) en lugar de la placa de agar sangre e incubar en CO₂ 5-10%.

Se puede dividir la caja en 4 o 6 cuadrantes para probar la aerotolerancia de 4 a 6 colonias, pero debe realizarse con colonias bien separadas o si seleccionan de una placa pura. O se deben sembrar en estría placas únicas con cada aislamiento para transferir un cultivo puro.

Figura 1



Agar Sangre Anaerobio incubado en anaerobiosis Agar Sangre Aerobio incubado en anaerobiosis por extinción de vela

La placa de la izquierda ha sido incubada en un jarra de anaerobiosis durante 18 a 24 horas, mientras que la placa de la derecha se incubó en un jarra de anaerobiosis por extinción con vela. Los aislamientos A y C son anaerobios obligados. El aislamiento B es anaerobio facultativo. El aislamiento C es un microaerofilo o un anaerobio obligado y debe ser probado luego por su capacidad de crecimiento en aire ambiente y comparado con el medioambiente que contiene CO₂ aumentado (Koneman, 2008).

Identificación de Bacterias Anaerobias

La identificación llega hasta donde el microbiólogo tenga capacidad. Con capacidad limitada (nivel 1) deben poder aislar anaerobios en cultivos puros y evaluar la morfología de la colonia, las características microscópicas y la prueba de aerotolerancia, esta información debería ser transmitida al médico como informe preliminar; si es clínicamente relevante sobre la base de:

- Situación clínica vista por el medico
- Frotis directo teñido con gran de una herida o un absceso, liquido peritoneal u otras muestras, que revelen evidencia de inflamación aguda (como numerosos leucocitos polimorfonucleares, pero ausencia de células epiteliales pavimentosas) o necrosis.

- Evidencia microscópica de mionecrosis de clostridios
 - Gránulos de azufre sugestivos de actinomicetos
- Cultivos, tinciones y hemocultivos positivos deben ser llevados a un laboratorio de referencia.

El segundo nivel de capacidad propuesto debe tener alguna capacidad de identificación. Debe realizar la diferenciación del grupo *B. fragilis* de los anaerobios gram negativos y la identificación de *C. perfringens*. Aislamientos y frotis directos de los casos relevantes deben ser transportados a un laboratorio de referencia para identificaciones adicionales.

El tercer nivel de capacidad propuesto debería hacer identificación presuntiva de la mayoría de los doce grupos de anaerobios más comunes y de especies, con la ayuda de pruebas rápidas simples.

El nivel cuarto de capacidad propuesto debería hacer identificación definitiva incluyendo cromatografía de gas-líquida, pruebas enzimáticas, electroforesis de proteínas, PCR.

Pruebas de sensibilidad de las bacterias anaerobias a los antibióticos

El manejo de enfermedades producidas por bacterias anaerobias requiere de la selección y tratamiento con antibióticos apropiados, junto con la eliminación de cuerpos extraños y desbridamiento del tejido necrótico y otras medidas quirúrgicas.

Se creía que los anaerobios tenían patrones predecibles de sensibilidad a los antibióticos y que la identificación de la cepa era todo lo necesario para predecir la sensibilidad de los aislamientos. Mientras algunos antibióticos son activos contra el 95% de los anaerobios (imipenem, meropenem, piperacilina-

tazobactam y cloranfenicol), otros antibióticos que se pueden seleccionar para usar en el tratamiento no son tan predecibles en sus actividades contra los géneros y especies de anaerobios. Por ejemplo, el *Bacteroides fragilis* ha presentado resistencia a metronidazol, al igual que el *Actinomyces*, *Propionibacterium* y *Lactobacillus* (Katja L. y Otros, 2006).

También se ha desarrollado con rapidez resistencia a fluoroquinolonas. Las penicilinas y las ureidopenicilinas, las cefalosporinas de segunda y tercera generación y la clindamicina pueden o no ser activas contra ciertas especies de bacilos gram negativos anaerobios y clostridios.

Sin embargo el médico se ve en la necesidad de iniciar tratamiento antibiótico en forma empírica antes de que estén disponibles los resultados de la identificación y de las pruebas de sensibilidad.

Las pruebas de sensibilidad son solicitadas por:

- La variabilidad en los patrones de sensibilidad de los anaerobios de importancia clínica.
- Cuando se requieren tratamientos prolongados, como en abscesos cerebrales, endocarditis, abscesos pulmonares, infecciones articulares, osteomielitis, infecciones por dispositivos protésicos, injertos vasculares, bacteriemia recurrente, o cuando la infección no responde al tratamiento empírico.
- Controlar los patrones de sensibilidad de anaerobios en la comunidad local y en lo hospitalario.
- Investigación de nuevos antibióticos comercializados o en etapa de investigación.

Entre los microorganismos considerados para las pruebas de sensibilidad a los antibióticos, debido a su virulencia o a que suelen ser resistentes a ciertos antibióticos se incluyen

especies del grupo *Bacteroides fragilis*, especies del grupo *Prevotella-Porphyrromons pigmentado*, otras *Prevotella*, *Fusobacterium moriferum*, *F. varium* y *F. necrophorum*, *Bilophila*, *Sutterrella* y algunas especies de *Clostridium*.

Las técnicas de difusión con disco no son convenientes ya los anaerobios crecen de modo muy lento para trabajar este procedimiento; la metodología de Kirby-Bauer no fue diseñada para anaerobios, la técnica ideal es dilución en agar.

El CLSI recomienda efectuar los ensayos de control de calidad en la dilución en agar, con al menos 2 de las cepas ATCC indicadas y en la microdilución en caldo, con 1 o más cepas ATCC. Los intervalos aceptables de los valores de CIM de cada uno de los 3 microorganismos ATCC y para los diferentes antibióticos se pueden obtener consultando el mencionado documento M11-A7 CLSI (Ronald M., 2004).

CONCLUSIÓN

En conclusión, el personal de salud asistencial debe estar familiarizado con la selección, recolección, transporte y manejo adecuado de las muestras clínicas que van a ser analizadas por el laboratorio de microbiología basados en un protocolo que además de ser un instructivo para el personal hospitalario sea un compendio de información muy clara, concisa, actualizada que unifique los aspectos relevantes que implican el estudio de las bacterias e infecciones anaeróbicas. A demás, en base a los estudios referenciados en este documento se concluyo que los protocolos deben estar sujetos a modificaciones y a la aceptación de criterios que considerábamos no validos en la búsqueda de gérmenes anaerobios, ya que el incremento de estas infecciones logra estar suscitado por el VIH, inmunosupresión, quimioterapia, entre otras factores.



BIBLIOGRAFÍA

ANNEKE, K. y otros (2008). *A rare presentation of ventriculitis and brain abscess caused by Fusobacterium nucleatum*. Journal of Medical Microbiology, 57, 668–671.

BRIAN C., P. y otros (2007). *Controlled Clinical Comparison of BacT/ALERT Standard Aerobic and Standard Anaerobic Blood Culture Bottles Inoculated Directly or after Transport in Sodium Polyanethol Sulfonate Tubes*. Journal of Clinical Microbiology, Vol. 45, No. 4.

CERCENADO, E. y CANTÓN, R. (2004). *Bacterias anaerobias: Procedimientos en Microbiología Clínica*. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Médica. SEIMC.

CITRON, D. M. y otros (2007). *Bacteriology of Moderate-to-Severe Diabetic Foot Infections and In Vitro Activity of Antimicrobial Agents*. Journal of Clinical Microbiology, , p. 2819–2828, Vol. 45, No. 9.

FORBER, B. Y SCOTT (2004). *Diagnóstico Microbiológico*. 11° Edición. Editorial Panamericana, pp. 337-369.

Inserto ATB ANA. *Biomerieux*.

JOUSIMIES-SOMER, H. R y otros (2002). *Anaerobic Bacteriology Manual*. Belmont, C.A.: Star Publishing Company.

KATJA, L. y otros (2006). *Prevalence of Bacteroides and Prevotella spp. In ulcerative colitis*. Journal of Medical Microbiology, 55, 617–624.

KEVIN, S. y otros (2008). *Quantitative Survival of Aerobic and Anaerobic Microorganisms in Port-A-Cul and Copan Transport Systems*. Journal of Clinical Microbiology, p. 2739–2744 Vol. 46, No. 8.

KONEMAN (2008). *Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas a color*. 6 edición. Washington: Editorial Médica Panamericana, pp. 837-896.

LUKAS, F. y otros (2008). *Is the Incidence of Anaerobic Bacteremia Decreasing?* Journal of Clinical Microbiology, p. 2432–2434, Vol. 46, No. 7.

Manual del Usuario Vitek 2. *Biomerieux*.

PICASO, J. (2003). *Recogida, transporte y conservación de las muestras: Procedimientos en Microbiología Clínica*. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Médica.



RAJASUOL, A. y otros (2004). *Bacteremia Following Surgical Dental Extraction with an Emphasis on Anaerobic Strains*. J Dent Res 83(2):170-174.

RONALD, M. (2004). *Hankbook of microbiological media*. Anaerobic Bacteriology Section 4.

TUNNEY, M. y otros (2008). *Detection of Anaerobic Bacteria in High Numbers in Sputum from Patients with Cystic. Fibrosis* Am J Respir Crit Care Med., Vol 177, pp. 995–1001.