

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

16.

Bacterias Anaerobias

2 0 0 4

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

Coordinador: José Elías García Sánchez

Autores: Luis Alcalá

Carmen Betriu

José Elías García Sánchez

Milagros Reig



ISBN: 84-609-2291-X

INDICE:

INDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

1. Introducción
2. Consideraciones microbiológicas
3. Cambios taxonómicos recientes
4. Consideraciones clínicas
5. Toma de muestras
6. Transporte al laboratorio
7. Recepción y procesamiento de las muestras
 - 7.1 Recepción de la muestra
 - 7.2 Procesamiento
 - 7.2.1 Preparación
 - 7.2.2 Inoculación de la muestra
 - 7.2.3 Examen directo
 - 7.2.3.1. Examen macroscópico
 - 7.2.3.2. Examen microscópico
 - 7.2.4. Medios de cultivo
 - 7.2.5. Sistemas de incubación en anaerobiosis.
 - 7.2.6. Tiempo de incubación
 - 7.2.7. Otros procedimientos
 - 7.2.7.1 Procesamiento de los líquidos orgánicos
 - 7.2.7.2 Procesamiento del catéter telescópico
 - 7.2.7.3 Procesamiento del lavado broncoalveolar
8. Examen de los cultivos y aislamiento
9. Identificación
 - 9.1 Identificación preliminar
 - 9.2 Identificación final
 - 9.2.1 Capacidad de producir indol y de descomponer el H₂O₂
 - 9.2.2 Capacidad sacarolítica y/o proteolítica
 - 9.2.3 Detección de la dotación enzimática
 - 9.2.4 Detección de los productos finales del metabolismo bacteriano mediante cromatografía
 - 9.2.5 Recomendaciones
 - 9.2.6 Interpretación de los resultados
 - 9.2.6.1 Interpretación de los resultados obtenidos con micrométodos comerciales
 - 9.2.6.2 Interpretación de los resultados de las pruebas individuales complementarias realizadas en casos concretos
10. Pruebas de determinación de la sensibilidad
 - 10.1 Indicaciones
 - 10.2 Métodos
 - 10.2.1 Dilución en agar
 - 10.2.2 Microdilución en caldo
 - 10.2.3 Sistemas comercializados
 - 10.2.4 E-test
 - 10.2.5 Controles de calidad
 - 10.2.6 Detección de β-lactamasas
11. Procedimientos a realizar en situaciones especiales.
 - 11.1 Botulismo
 - 11.2 Diarrea y colitis por *Clostridium difficile* asociadas al uso de antibióticos
 - 11.3 Toxiinfección por *Clostridium perfringens*
 - 11.4 Angina de Vincent
 - 11.5 Actinomicosis
 - 11.6 Infecciones endometriales
 - 11.7 Enterocolitis del paciente con neutropenia
 - 11.8 Técnicas rápidas de diagnóstico
12. Bibliografía

INDICE DE LOS DOCUMENTOS TÉCNICOS

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE INFECCIONES POR ANAEROBIOS

1. Propósito y alcance
2. Fundamento
3. Documentación de consulta
4. Recogida y transporte de las muestras
 - 4.1 Selección de la muestra
 - 4.2 Obtención de la muestra
 - 4.3 Transporte de la muestra
 - 4.4 Recepción y registro de las muestras
 - 4.5 Criterios de aceptación y rechazo de las muestras. Acciones a tomar
5. Medios de cultivo, reactivos y productos
 - 5.1 Medios de cultivo
 - 5.2 Soluciones y reactivos
6. Aparatos y material
7. Procesamiento
 - 7.1 Preparación de la muestra
 - 7.2 Inoculación de la muestra
 - 7.3 Examen directo
 - 7.3.1 Examen macroscópico
 - 7.3.2 Examen microscópico
 - 7.4 Cultivo de la muestra
 - 7.5 Incubación de la muestra
 - 7.6 Procesamientos especiales
 - 7.6.1 Líquidos orgánicos
 - 7.6.2 Catéter telescópico
 - 7.6.3 Lavado broncoalveolar
 - 7.6.4 Heces para el diagnóstico de toxiinfección de *Clostridium perfringens*
 - 7.6.5 Diagnóstico de botulismo
 - 7.6.6 Diagnóstico de angina de Vincent
 - 7.6.7 Diagnóstico de actinomicosis
 - 7.6.8 Diagnóstico de las infecciones endometriales
 - 7.6.9 Diagnóstico de la enterocolitis del neutropénico
 - 7.7 Examen de los cultivos y aislamiento
 - 7.8 Identificación de los aislados anaerobios
 - 7.8.1 Identificación preliminar
 - 7.8.2 Identificación final
8. Obtención y expresión de resultados
9. Responsabilidades
10. Anotaciones al procedimiento
11. Limitaciones
12. Bibliografía

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE DIARREA O COLITIS ASOCIADA A *Clostridium difficile*

1. Propósito y alcance

2. Fundamento

3. Documentación de consulta

4. Recogida y transporte de las muestras

4.1 Selección y obtención de la muestra

4.2 Transporte de la muestra

4.3 Recepción y registro de las muestras

4.4 Criterios de aceptación y rechazo de las muestras. Acciones a tomar

5. Medios de cultivo, reactivos y productos

5.1 Medios de cultivo

5.2 Reactivos

6. Aparatos y material

7. Procesamiento

7.1 Preparación de la muestra

7.2 Cultivo toxigénico

7.2.1 Pretratamiento de las muestras

7.2.2 Siembra de las muestras

7.2.3 Aislamiento e identificación

7.2.4 Ensayo de citotoxicidad

7.3 Citotoxicidad directa

7.4 Métodos de detección rápida de *C.difficile* toxigénico

7.4.1 Técnicas que detectan glutamato deshidrogenasa

7.4.2 Técnicas que detectan toxina A

7.4.3 Técnicas que detectan toxinas A y B

8. Obtención y expresión de resultados

9. Responsabilidades

10. Anotaciones al procedimiento

11. Limitaciones

12. Bibliografía

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

16. BACTERIAS ANAEROBIAS. 2004

Coordinador: José Elías García Sánchez

Autores: Luis Alcalá

Carmen Betriu

José Elías García Sánchez

Milagros Reig

1. INTRODUCCIÓN

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

2. CONSIDERACIONES MICROBIOLÓGICAS

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

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

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

Su "aversión" por el oxígeno también condiciona una **metodología microbiológica** especial. Para el transporte de las muestras, particularmente si se quieren aislar las especies más sensibles, se requiere el empleo de medios adecuados que proporcionen un ambiente con un bajo poder de óxido-reducción. Los medios de cultivo, a parte de ser frescos, deben estar, en lo posible, libres de oxígeno e incubarse en una atmósfera anaerobia. Esta se puede conseguir bien por procedimientos catalíticos, en los que el oxígeno es eliminado combinándolo con hidrógeno en presencia de un catalizador, siendo las jarras de anaerobios el prototipo de este sistema, o por sustitución de la atmósfera normal por una mezcla de gases sin oxígeno, como ocurre en las cámaras de anaerobios y en ocasiones en las jarras.

Para la obtención de energía emplean como donantes y aceptores de electrones sustancias orgánicas. Por ello dan lugar, como productos finales de su metabolismo, a ácidos grasos de cadena corta. Su detección, por cromatografía, es esencial para identificarlas correctamente, pues muchas son metabólicamente muy inactivas. Por esta necesidad metodológica **no todos los laboratorios pueden identificar las bacterias anaerobias a nivel de especie**, aunque hay que señalar que las más importantes en clínica tienen una actividad metabólica mayor y algunas pueden ser caracterizadas con diferentes sistemas comerciales. Algunas tienen un tiempo de generación que permite obtener crecimiento visible en placas en 24 ó 48 horas, pero otras necesitan varios días para crecer o para observar algunas propiedades, como la pigmentación negra de algunas especies de *Prevotella* spp. y *Porphyromonas* spp., esenciales en su caracterización. Esto obliga a prolongar la incubación y, por eficacia y utilidad, informar a los clínicos de acuerdo con datos presuntivos de infección anaerobia: mal olor de las muestras, localización de la infección en las proximidades de mucosas colonizadas, cuadros relacionados con mordeduras, presencia de gas, morfotipos en la tinción de Gram, ausencia de leucocitos en las infecciones tóxicas-tisulares por *Clostridium perfringens*, no crecimiento en condiciones de aerobiosis, etc.

3. CAMBIOS TAXONOMICOS RECIENTES

El desarrollo de la genética ha determinado importantes cambios en la clasificación y taxonomía bacteriana que, en caso de los anaerobios, han sido enormes. Se han descrito nuevos géneros y especies y algunas, al conocerse sus relaciones

filogenéticas, se han transferido a otros géneros, quedando por situar, todavía, varias que están incorrectamente posicionadas, particularmente dentro de los microorganismos gramnegativos.

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

- 1 *Bacteroides*, que ha quedado restringido a las especies sacarolíticas resistentes a la bilis incluidas en el grupo de *Bacteroides fragilis* que, además de frecuentes, son las más virulentas y resistentes a los antibióticos. Otras especies han sido transferidas a otros géneros o están pendientes de que se realice
- 2 *Porphyromonas*, cuyos miembros producen colonias pigmentadas de negro tras varios días de incubación, son asacarolíticos y no tolerantes a la bilis
- 3 *Prevotella*, con especies pigmentadas o no pigmentadas, sacarolíticas y no tolerantes a la bilis
- 4 *Fusobacterium*, caracterizado por incluir bacterias que producen ácido butírico sin isobutírico e isovalérico
- 5 *Bilophila* y algunos géneros microaerófilos que necesitan para su crecimiento formato y fumarato

Entre los cocos gramnegativos destaca *Veillonella* y entre los grampositivos los desgajados de *Peptostreptococcus*, incluyendo *Anaerococcus*, *Finegoldia*, *Micromonas*, *Peptoniphilus*, *Schleiferella* y el propio *Peptostreptococcus*. *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Eggertella* y *Eubacterium* son importantes entre los bacilos grampositivos no esporulados y *Clostridium* entre los esporulados. En las tablas 1, 2 y 3 se muestran los cambios más importantes acaecidos en la taxonomía y clasificación de las bacterias anaerobias no esporuladas.

4. CONSIDERACIONES CLINICAS

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

El primero es el de los cuadros ocasionados por la acción de diferentes toxinas producidas por diversas especies del género *Clostridium*. Son infecciones específicas, de origen habitualmente exógeno -del ambiente- con frecuencia a partir de esporas, y en ocasiones oportunistas, pues pueden requerir una puerta de entrada traumática. Incluyen el **tétanos**, las diversas formas del **botulismo** -intoxicación, de heridas, del lactante (por colonización intestinal), indeterminado (por colonización intestinal del adulto consecuencia de alteraciones digestivas producidas por cirugía gastrointestinal o por el consumo de antimicrobianos) e inhalatorio (accidentes de laboratorio o por posible bioterrorismo)- **gangrena gaseosa** (producida por diversas especies, especialmente por *C. perfringens*, y las relacionadas con *C. septicum* que suelen aparecer en pacientes con cáncer colorectal, leucemias, linfomas y otras inmunodeficiencias), **celulitis anaerobias**, **enteritis necrotizante**

producida por *C. perfringens* tipo C (en pacientes con dietas hipoproteicas que condicionan un déficit de tripsina de forma que no se destruye la toxina beta), **intoxicación alimentaria** (por ingestión de alimentos cárnicos con elevado número de formas vegetativas de *C. perfringens* tipo A que al esporular en el intestino delgado producen una enterotoxina) y las diversas formas clínicas de **diarrea asociada a antimicrobianos** producida por las toxinas de *C. difficile*, con un importante impacto nosocomial y con posible transmisión cruzada; o en algunos casos por cepas de *C. perfringens* tipo A productoras de enterotoxina.

El segundo patrón es el resultado de la actuación de mecanismos patogénicos no exotóxicos, diferentes según las bacterias implicadas y a menudo aún no caracterizados. El resultado es la aparición de diferentes infecciones inespecíficas, en las que los síntomas y signos no permiten identificar al/a los agente/s etiológico/s. Su origen es endógeno a partir de componentes de la propia flora, excepto las derivadas de mordeduras (exógeno a partir de flora endógena por transmisión directa). Sólo un limitado número de géneros y especies son capaces de producir infecciones, incluidos los clostridios cuando no actúan con exotoxinas. En cualquier caso, requieren circunstancias favorecedoras por parte del hospedador (oportunistas): roturas traumáticas de las barreras cutáneomucosas de las localizaciones que las albergan, llegada a zonas lejanas de sus hábitats, junto con situaciones favorecedoras específicas (circunstancias que bajan el potencial de óxido-reducción) o generales. Como su origen está en la propia flora del huésped es habitual que sean de etiología polimicrobiana y mixta. La presencia de bacterias aerobias y facultativas además favorece a las anaerobias pues consumen el oxígeno existente.

Muchas de estas infecciones son piogénicas y la presencia de abscesos es característica. Numerosas infecciones, como bacteriemias -con una moderada implicación-, abscesos cerebrales, empiemas subdurales y abscesos epidurales, endoftalmítis, sinusítis y otítis crónicas, abscesos periamigdalares, diversos procesos relacionados con las caries dentales y periodontítis del adulto, neumonías por aspiración, abscesos de pulmón, bronquiectasias y empiemas pleurales, peritonítis secundarias y abscesos intraabdominales, infecciones de la pared abdominal y otras intraabdominales, de vías biliares y abscesos hepáticos, numerosos procesos infecciosos obstetro-ginecológicos, artrítis y osteomielítis, y multitud de infecciones de piel y tejidos blandos como el acné, celulítis, infecciones tras mordeduras, del diabético (pie diabético y gangrena), de úlceras por presión, etc., pueden estar causadas por estas bacterias.

Existe un tercer patrón, que se puede definir como de desequilibrio o sobrecrecimiento de bacterias anaerobias cuyo mejor exponente es la

Tabla 1.- Cambios taxonómicos recientes en los microorganismos gramnegativos anaerobios

| Actuales | Antiguos y/o posición taxonómica |
|---------------------------------------|---|
| Bacilos gramnegativos | |
| - <i>Anaerobiospirillum thomasii</i> | Nueva especie |
| - <i>Bacteroides distasonis</i> | Relacionado con el grupo <i>Porphyromonas</i> |
| - <i>Bacteroides forsythus*</i> | Relacionado con el grupo <i>Porphyromonas</i> |
| - <i>Bacteroides fursosus</i> | Relacionado con el grupo <i>Porphyromonas</i> |
| - <i>Bacteroides putredinis</i> | Posiblemente relacionado con <i>Rikenella</i> |
| - <i>Bacteroides pyogenes*</i> | Grupo II de <i>Bacteroides tectum</i> (algunas especies) |
| - <i>Bacteroides splanchnicus</i> | Posiblemente pertenece a un nuevo género |
| - <i>Bacteroides tectus</i> | <i>Bacteroides tectum</i> . Relacionado con <i>B. fragilis</i> |
| - <i>Butyrivibrio species</i> | Relacionado con <i>Clostridium</i> |
| - <i>Campylobacter gracilis</i> | <i>Bacteroides gracilis</i> (algunas especies) |
| - <i>Campylobacter hominis</i> | Nueva especie |
| - <i>Campylobacter showae</i> | Nueva especie |
| - <i>Capnocytophaga granulosa</i> | Nueva especie |
| - <i>Capnocytophaga haemolytica</i> | Nueva especie |
| - <i>Catonella morbi</i> | Relacionado con <i>Clostridium</i> |
| - <i>Centipeda periodontii</i> | Relacionado con <i>Selenomonas</i> . |
| - <i>Dialister pneumosintes</i> | Relacionado con <i>Sporomusa</i> , rama de <i>Clostridium</i> |
| - <i>Fusobacterium varium</i> | <i>Fusobacterium pseudonecrophorum</i> |
| - <i>Johnsonella innava</i> | Relacionado con <i>Clostridium</i> |
| - <i>Leptotrichia sanguinegens</i> | Nueva especie |
| - <i>Mitsoukella multiacida</i> | Relacionado con <i>Sporomusa</i> , rama de <i>Clostridium</i> , |
| - <i>Porphyromonas cangingivalis*</i> | Nueva especie |
| - <i>Porphyromonas canoris*</i> | Nueva especie |
| - <i>Porphyromonas cansulci*</i> | Nueva especie |
| - <i>Porphyromonas catoniae</i> | <i>Oribaculum catoniae</i> |
| - <i>Porphyromonas crevioricanis*</i> | Nueva especie |
| - <i>Porphyromonas gingivicanis*</i> | Nueva especie |
| - <i>Porphyromonas gulae*</i> | Nueva especie |
| - <i>Porphyromonas levii*</i> | <i>Bacteroides levii</i> |
| - <i>Porphyromonas macacae*</i> | <i>Bacteroides macacae</i> , <i>Porphyromonas salivosa</i> |
| - <i>Prevotella albensis*</i> | <i>Bacteroides ruminicola</i> subesp. <i>ruminicola</i> biovar 7, <i>Prevotella ruminicola</i> (algunas especie) |
| - <i>Prevotella brevis*</i> | <i>Bacteroides ruminicola</i> subesp. <i>brevis</i> biovars 1,2, <i>Prevotella ruminicola</i> (algunas especies) |
| - <i>Prevotella bryantii*</i> | <i>B. ruminicola</i> suespec. <i>brevis</i> biovar 3, <i>Prevotella ruminicola</i> (algunas especies) |
| - <i>Prevotella dentalis</i> | <i>Mitsuokella dentalis</i> , <i>Hanella seregens</i> |
| - <i>Prevotella enoeca</i> | Nueva especie |
| - <i>Prevotella heparinolytica</i> | Relacionado con el grupo de <i>Bacteroides fragilis</i> |
| - <i>Prevotella nigrescens</i> | Nueva especie; <i>P. intermedia</i> (algunas especies) |
| - <i>Prevotella pallens</i> | Nueva especie |
| - <i>Prevotella ruminicola*</i> | <i>B. ruminicola</i> subesp. <i>ruminicola</i> biovar 1 |
| - <i>Prevotella tannerae</i> | Nueva especie |
| - <i>Prevotella zoogloiformans</i> | Relacionado con el grupo de <i>Bacteroides fragilis</i> |
| - <i>Selenomonas</i> spp. | Relacionado con <i>Sporomusa</i> rama de <i>Costridium</i> |
| - <i>Sutterella wadsworthensis</i> | Nuevo genero y especie, <i>Campylobacter</i> (<i>Bacteroides</i>) <i>gracilis</i> (algunas especies) |
| - <i>Tissierella praeacuta</i> | Relacionado con <i>Clostridium</i> |
| Cocos gramnegativos | |
| - <i>Acidaminococcus fermentans</i> | Relacionado con <i>Sporomusa</i> rama de <i>Clostridium</i> |
| - <i>Megasphaera elsdenii</i> | Relacionado con <i>Sporomusa</i> rama de <i>Clostridium</i> |
| - <i>Veillonella</i> spp. | Relacionado con <i>Sporomusa</i> rama de <i>Clostridium</i> |

* De origen animal

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

Tabla 2.- Cambios taxonómicos recientes en los cocos grampositivos anaerobios

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

*Taxonómicamente *Schleiferella* tiene prioridad

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

Tabla 3.- Cambios taxonómicos recientes en los bacilos grampositivos anaerobios

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

*Especies nuevas

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

vaginosis bacteriana (no vaginitis), que es un cuadro caracterizado por un aumento de flujo vaginal, de pH más elevado (pH >4,5) y con aminas volátiles pero sin leucocitos polimorfonucleares. Por microscopía es característica la presencia de células de descamación en las que hay adheridas bacterias con morfotipos de *Gardnerella vaginalis* y de otras especies ("células clue"). Algunos de estos microorganismos, como *C. difficile*, son eminentemente nosocomiales y emergentes.

La búsqueda de bacterias anaerobias sólo se debe hacer cuando se pueda discernir su papel y tenga interés etiológico y terapéutico. Estos microorganismos son resistentes a aminoglicósidos (carecen de los sistemas necesarios para su penetración) y monobactámicos y pueden desarrollar resistencia a otros antimicrobianos habitualmente eficaces, particularmente el grupo de *Bacteroides fragilis*. Suelen presentar alta actividad las asociaciones de beta lactámico/inhibidor de beta-lactamasa (amoxicilina/ácido clavulánico y piperacilina/tazobactam), las carbapenemas (imipenema, meropenema y ertapenema), el metronidazol y el cloranfenicol. La resistencia del grupo de *Bacteroides fragilis* a la cefoxitina y a la clindamicina es elevada, como lo es aún más a la penicilina, situación compartida por otros bacilos gramnegativos.

5. TOMA DE MUESTRAS

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

En los abscesos cerrados, empiemas, infecciones de cavidades cerradas y líquidos habitualmente estériles las muestras se deben tomar, si es posible, por punción percutánea-**aspiración**, empleando las medidas de desinfección preconizadas para los hemocultivos, o en el transcurso de prácticas quirúrgicas.

En estas y en otras situaciones **se desaconseja el uso de torundas**.

Las muestras de sangre se deben sembrar en frascos de **hemocultivos para anaerobios** siguiendo las directrices marcadas en el procedimiento correspondiente para este análisis microbiológico.

Las **muestras quirúrgicas y las biopsias** también son idóneas para la investigación de bacterias anaerobias.

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.

El uso del **broncofibroscopio** ha mejorado las tomas en neumonías (catéter telescópico protegido o lavado broncoalveolar) y la punción transtraqueal ha caído en desuso. Otras muestras respiratorias válidas son la **punción pulmonar directa** y la **toracocentesis** (tabla 4).

6. TRANSPORTE AL LABORATORIO

En el transporte de una muestra para la búsqueda de bacterias anaerobias se debe evitar la presencia de oxígeno, aunque estas pueden sobrevivir varias horas, incluso días, en un medio de transporte adecuado, dependiendo de su naturaleza. En general, en las muestras purulentas pueden sobrevivir más tiempo que en los líquidos claros. Para el transporte en anaerobiosis se encuentran disponibles en el mercado tubos, frascos y viales con una atmósfera anaerobia que contienen un medio de transporte reducido y resazurina como indicador de la presencia de oxígeno (Port-A-Cul[®], Becton Dickinson).

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

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

En los casos en que solamente sea posible obtener la muestra mediante torunda, se utilizarán para su envío tubos adecuados, con un medio de transporte para anaerobios, donde se introduce la torunda hasta aproximadamente 5 mm del fondo, se rompe el palillo a la altura de la tapa del tubo y se cierra rápidamente. Existen tubos de plástico de escaso calibre con un estrechamiento en la parte inferior a la superficie del agar con el fin de dificultar la difusión del oxígeno hacia la base de la torunda. El envío de las muestras al laboratorio de microbiología debe ser inmediato. Se deben transportar manteniéndolas a temperatura ambiente. Las temperaturas de incubación pueden ocasionar el sobrecrecimiento de especies poco exigentes,

Tabla 4.- Infecciones por anaerobios y tomas adecuadas

| Infecciones | Muestras |
|--|--|
| SNC (abscesos y empiemas) | Aspiración Biopsias |
| Cabeza y cuello | Aspirados Biopsias |
| Oculares - Endoftalmitis | Aspiración intraocular |
| ORL - Sinusitis - Otitis media crónica | Aspiración percutanea o por rinoscopia y material quirúrgico de los senos. Torunda |
| Tracto respiratorio inferior - Neumonías - Empiema pleural | Catéter telescopado protegido Lavado broncoalveolar Punción pulmonar percutanea Toracocentesis |
| Aparato circulatorio - Bacteriemia - Endocarditis - Pericarditis | Hemocultivo Válvula, verruga Líquido pericárdico |
| Intraabdominales - Peritonitis y abscesos - Colecistitis - Heridas laparótomicas | Aspiración y cirugía Bilis tomada quirúrgicamente Tomas en profundidad |
| Tubo digestivo - Diarrea asociada a antimicrobianos - Intoxicación por <i>C. perfringens</i> | Heces Heces para toxina y recuento |
| Genitales femeninas | Cirugía Culdocentesis Aspiración (absceso Bartholino) Aspiración endometrial protegida DIUs (actinomycosis) |
| Urinarias | Punción suprapubica |
| Osteoarticulares -9 Artritis -10 Osteomielitis | Aspiración Aspiración, cirugía, biopsia. |
| Tejidos blandos | Aspiración percutanea Cirugía Tomas en profundidad |
| Relacionadas con alimentos - Intoxicación por <i>C. perfringens</i> - Botulismo | Alimento sospechoso (recuento) Alimento sospechoso (toxina, bacteria) |
| Botulismo | Alimento sospechoso (toxinas, cultivo) Suero (detección de las toxinas, no suele ser positiva en el lactante) Contenido gástrico y vómitos (toxinas) Heces (toxinas y cultivo) Material de heridas (cultivo) Muestras ambientales (bioterrorismo) Torundas nasales (bioterrorismo) |
| Tétanos | Material de la presunta puerta de entrada |

fundamentalmente facultativas, y la pérdida de algunas más sensibles, mientras que las temperaturas bajas permiten un aumento de la difusión del oxígeno.

En la tabla 5 se resumen los diferentes sistemas utilizables para el transporte de muestras para la búsqueda de anaerobios, así como los tiempos óptimos para su recepción en el laboratorio. Después de su procesamiento se recomienda conservar las muestras a temperatura ambiente hasta 24 h, en caso de que hubiera algún problema y fuera necesario recuperarlas para un nuevo procesamiento.

7. RECEPCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

7.1 RECEPCIÓN

Una vez recibida la muestra en el laboratorio se anota la fecha y hora de recepción y se comprueba que cumple los requisitos para su aceptación (correcta identificación, muestra adecuada, condiciones de transporte, etc.). Una información más detallada sobre la recepción aparece en el Procedimiento 1a de la SEIMC (Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología).

7.2 PROCESAMIENTO

El procesamiento inicial incluye su preparación, examen directo e inoculación en los medios de cultivo apropiados (figura 1).

7.2.1 Preparación. Tras el examen inicial, la muestra se procesa con las máximas precauciones y lo antes posible, siendo aconsejable que no transcurran más de 15 minutos desde su recepción. Si es posible, la preparación se deberá hacer en una cámara de anaerobiosis para minimizar su oxigenación. El material purulento se mezcla bien con la ayuda del agitador Vortex. Las muestras de tejido o de biopsia se homogeneizan, 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 (ver más adelante en el apartado 11.2).

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

7.2.3 Exámen directo. Proporciona de forma inmediata información semicuantitativa acerca de los microorganismos presentes y un diagnóstico presuntivo de la existencia de bacterias anaerobias,

lo cual es importante para establecer una terapia inicial, ya que el proceso de aislamiento e identificación puede demorarse varios días.

7.2.3.1 Exámen macroscópico. Consiste en la observación de los siguientes datos: mal olor (productos finales del metabolismo de bacterias anaerobias), fluorescencia roja a la luz ultravioleta (producción de protoporfirina por las especies pigmentadas de *Prevotella* y *Porphyromonas*), exudados sanguinolentos, exudados de color negruzco (presencia de bacilos gramnegativos pigmentados), existencia de tejidos necróticos, gas en los tejidos, existencia de gránulos de "azufre" en el exudado (presencia de *Actinomyces* spp. y *Propionibacterium propionicus*), exudados purulentos, etc.

7.2.3.2 Exámen microscópico. La tinción de Gram es de una gran utilidad en el diagnóstico microbiológico presuntivo, ya que proporciona información acerca de los tipos de bacterias existentes, cantidad relativa de las mismas, presencia de leucocitos, etc. Por otra parte, es un elemento importante para el control de calidad del laboratorio. Si no se consigue aislar todos los 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.

La morfología y afinidad tintorial de los bacilos anaerobios gramnegativos varía según las diferentes especies. Las de *Bacteroides*, por lo general, aparecen como bacilos pleomórficos que se tiñen débilmente con la tinción de Gram; las formas cocobacilares son sugestivas de especies pigmentadas de *Prevotella* o *Porphyromonas*. *Fusobacterium nucleatum* suele presentarse como un bacilo gramnegativo fino y fusiforme y a menudo dispuesto en parejas, unidos por un extremo. Hay que señalar que también *Fusobacterium periodonticum*, y las especies microaerófilas de *Capnocytophaga* muestran estas características. *Fusobacterium mortiferum* se presenta como un bacilo muy pleomórfico, con filamentos que contienen zonas hinchadas, o formas redondas y de tinción irregular. Este tipo de morfología se puede observar asimismo en *Fusobacterium ulcerans* y, ocasionalmente, en *Fusobacterium necrophorum*. La presencia de pequeños cocos gramnegativos son indicativos de *Veillonella*. Los bacilos grampositivos anaerobios adoptan múltiples formas y pueden aparecer grampositivos o "gramvariables". Las esporas de *Clostridium* se ven raramente en las tinciones de los exudados. Un bacilo grampositivo grueso, de forma rectangular y sin esporas es sugestivo de *Clostridium perfringens*. Un bacilo grampositivo ramificado es sugestivo de *Actinomyces* o *Propionibacterium*.

Para establecer un diagnóstico presuntivo de una infección por anaerobios es importante que el microbiólogo correlacione el origen de la muestra con los morfotipos observados en la tinción de Gram.

Tabla 5.- Sistemas de transporte de muestras para anaerobios

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

Además, la presencia de tipos morfológicos múltiples en la tinción de Gram sugiere específicamente este diagnóstico puesto que la mayoría de las infecciones en las que están implicados los anaerobios son polimicrobianas.

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

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

- Agar *Bacteroides bilis* esculina con amicacina (BBE). Es un medio selectivo para *Bacteroides* del grupo *fragilis* y *Bilophilla* spp. Contiene amicacina (100 µg/ml) que inhibe la mayoría de facultativos, bilis (20%) que con casi exclusividad sólo permite el crecimiento de las especies citadas y esculina que al ser hidrolizada en presencia de un indicador (citrato férrico) vira el medio a color negro. Permite una fácil detección de las especies de *Bacteroides* del grupo *fragilis* al ser esculina positivas. A veces, pueden crecer otras especies, como *Fusobacterium mortiferum*, *Fusobacterium varium*, algunas enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, enterococos, levaduras, etc., aunque se distinguen de los *Bacteroides* del grupo *fragilis* por el tamaño de sus colonias, que normalmente es inferior a 1 mm de diámetro.

- Agar con alcohol fenil-etílico (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.

- Un agar sangre selectivo, como agar Schaedler con neomicina (75 µg/ml) y vancomicina (7,5 µg/ml) (SNV) o con kanamicina (75 µg/ml) y vancomicina

(7,5 µg/ml) (SKV) o el clásico agar *Brucella* con kanamicina, vancomicina y en este caso sangre lacada (ASLKV). Son medios selectivos para bacilos gramnegativos como el grupo de *Bacteroides fragilis* y especies de *Prevotella*. La presencia de neomicina o de kanamicina inhibe a la mayor parte de los aerobios facultativos y la presencia de vancomicina inhibe la mayoría de los grampositivos y especies de *Porphyromonas*. A veces pueden crecer en estos medios levaduras y anaerobios facultativos resistentes a estos aminoglicósidos por lo que siempre debe realizarse una tinción de Gram y un ensayo de aerotolerancia a todos los aislados.

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

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

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

7.2.5 Sistemas de incubación en anaerobiosis. Su elección viene determinada por el coste, número de cultivos y limitaciones de espacio. Los más comunes son las cámaras, jarras o cajas y bolsas de anaerobiosis.

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

Existen diferentes modelos de cámaras para anaerobios, en las que se consigue una atmósfera anaerobia mediante una mezcla de gases que contiene 5% de H₂, 5-10% de CO₂ y 85-90% de N₂. Poseen un sistema de intercambio que consiste en un compartimento rígido con una puerta interior y otra exterior. Las jarras son recipientes cilíndricos, de metal o de plástico rígido, que deben cerrarse herméticamente y en los que la atmósfera anaerobia se obtiene entre 1 y 2 horas después de introducir unos sobres (GasPak®, Becton Dickinson) en los

que, al añadir H₂O se libera H₂ y CO₂. El H₂ se combina con el oxígeno existente formando agua gracias a la presencia de un catalizador. Actualmente existen sistemas en los que no hace falta añadir H₂O o introducir el catalizador (Anaerogen[®], Oxoid). Mediante una técnica automatizada, Anoxomat[®], también se puede lograr una atmósfera anaerobia en las jarras. Como ya se ha señalado debe introducirse un indicador de oxígeno, que suelen ser tiras de papel con azul de metileno, que se decoloran al desaparecer la presencia del oxígeno.

También se encuentran disponibles en el mercado diferentes sistemas de bolsas de anaerobiosis de plástico transparente y flexible como GasPack Pouch[®] (Becton Dickinson) o AnaerogenCompact[®] (Oxoid) con generadores e indicadores adecuados. Se pueden utilizar tanto para el transporte de muestras al laboratorio como para la incubación de cultivos.

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

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.

7.2.7 Otros procedimientos

7.2.7.1 Procesamiento de los líquidos orgánicos.

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

chocolate, agar sangre con colistina y ácido nalidíxico y agar MacConkey, por ejemplo). Del frasco anaerobio se hacen subcultivos en agar sangre, agar chocolate y agar sangre para anaerobios.

Las bacterias anaerobias raramente causan meningitis, por lo que el cultivo de rutina del líquido cefalorraquídeo no es necesario. Los anaerobios pueden estar implicados en la formación de abscesos cerebrales, empiema subdural y absceso epidural y en estos casos no es útil el examen del líquido cefalorraquídeo.

Las muestras de sangre se procesan tal como se indica en el Procedimiento 3a de la SEIMC (Hemocultivos).

7.2.7.2 Procesamiento del catéter telescopado

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

7.2.7.3 Procesamiento del lavado broncoalveolar (LBA). Se preparan dos diluciones seriadas al 1/100 de la muestra inicial y se siembran en los mismos medios que el catéter telescopado.

8. EXAMEN DE LOS CULTIVOS Y AISLAMIENTO

En el análisis microbiológico de una muestra clínica se pueden distinguir, al menos teóricamente, dos etapas. La primera esta dedicada a “buscar” los anaerobios que pueda contener, obtenerlos en cultivo puro, identificarlos de forma preliminar (a nivel de género o “grupo”), e informar al clínico lo antes posible. En una segunda etapa se debe intentar conseguir una identificación más precisa y estudiar la sensibilidad a los antibióticos que habitualmente tienen actividad sobre estas bacterias. Sería deseable que la primera etapa se realizara en todos los laboratorios de microbiología, mientras que la segunda puede quedar restringida a unos pocos, cuya experiencia debe servir de base para el conocimiento general de las bacterias anaerobias que se pueden encontrar en muestras clínicas correctamente obtenidas y su sensibilidad/resistencia a los antibióticos habitualmente utilizados para su tratamiento.

Los medios con crecimiento deben observarse cuidadosamente para detectar todas las colonias diferentes, independientemente de su tamaño, y proceder a su subcultivo. Algunos anaerobios pueden formar colonias morfológicamente semejantes a las de los facultativos. **Los subcultivos se realizan siempre a partir de una única colonia.** Esta se inocula en una placa de agar sangre no selectivo para anaerobios (ver el apartado 7.2.4 Medios de cultivo) y en una de agar chocolate que se incuban en una atmósfera anaerobia y

aerobia con 10% de CO₂, respectivamente. Deben realizarse los reaislamientos necesarios para poder subcultivar colonias únicas de todos los tipos morfológicos. Las colonias subcultivadas que no crezcan en agar chocolate incubado en CO₂ se consideraran en principio anaerobios estrictos y se procede a su estudio. Hay que tener en cuenta que algunos bacilos grampositivos (*Actinomyces* spp., *Propionibacterium* spp., *Bifidobacterium* spp., e incluso algunas especies de *Clostridium*) pueden ser lo bastante aerotolerantes como para crecer en CO₂ y sin embargo se deben considerar como anaerobias. Por el contrario algunos estreptococos pueden aparecer como anaerobios estrictos en el primer subcultivo y mostrarse como perfectamente facultativos tras un periodo más o menos largo de adaptación. Confirmado el carácter de anaerobio estricto de la bacteria aislada se comunica el hallazgo lo antes posible al clínico, aunque sólo se le de una información muy general e inespecífica.

9 IDENTIFICACIÓN

9.1 IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR

El primer paso, el más básico pero imprescindible, es la observación detallada de las características de la colonia y de la tinción de Gram. Dado que entre los anaerobios hay especies que retienen de forma variable el colorante principal (cristal violeta), en ocasiones puede ser de gran ayuda un subcultivo con un disco de vancomicina de 5 µg para determinar el carácter de grampositividad o gramnegatividad. Con los datos obtenidos de estas observaciones ya se puede informar sobre: cocos grampositivos anaerobios, *Clostridium* spp. (visión adicional de esporas o morfología típica de *C. perfringens*) o bacilos grampositivos anaerobios, (en este último caso si la morfología es de *Propionibacterium* se puede notificar como tal si se detecta la producción de catalasa). Los cocos gramnegativos anaerobios se informan como tales o como *Veillonella* spp., puesto que este es el género más frecuentemente hallado en muestras clínicas. En el caso de los bacilos gramnegativos anaerobios es aconsejable informar de ellos una vez encuadrados en ciertos "grupos": grupo *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides/Prevotella*, *Prevotella/Porphyromonas*, *Bacteroides ureolyticus/Campylobacter*, *Fusobacterium*, o *Bilophila/Sutterella*. Este encuadre preliminar se puede lograr con algunas pruebas adicionales como: capacidad para crecer en presencia de un 20% de bilis (resistencia a la bilis u *oxgall*), y su sensibilidad (S) o resistencia (R) (halos de inhibición) por el método de difusión con discos a vancomicina (con carga de 5 µg), kanamicina (de 1000 µg), y colistina (de 10 µg). La interpretación de estas observaciones es la siguiente:

1 Crecimiento en bilis (+), vancomicina R, kanamicina R, colistina R = grupo *Bacteroides fragilis*.

2 Crecimiento en bilis (+), vancomicina R, kanamicina S, colistina S = grupo *Bilophila/Sutterella*.

3 Crecimiento en bilis (-), vancomicina variable

(V), kanamicina R, colistina V = grupo *Prevotella/Porphyromonas*.

4 Crecimiento en bilis (-/+), vancomicina R, kanamicina S, colistina S = *Fusobacterium* spp. (dos especies bilis+).

5 Crecimiento en bilis (-), vancomicina R, kanamicina S, colistina S = grupo *Bacteroides ureolyticus/Campylobacter* (la diferenciación presuntiva entre este grupo y *Fusobacterium* tendría que basarse en las características morfológicas de la cepa). También estaría en este grupo el género *Leptotrichia*.

Aunque la sensibilidad a la vancomicina puede diferenciar los géneros *Prevotella* (vancomicina R) y *Porphyromonas* (vancomicina S), se sugiere la agrupación imprecisa de "grupo *Prevotella/Porphyromonas*" para los bacilos gramnegativos anaerobios que dan colonias negras, dada la dificultad que puede existir para conseguirlos en cultivo puro a pesar de su fácil detección por la pigmentación de sus colonias.

9.2 IDENTIFICACIÓN FINAL

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

La dificultad en la identificación de la totalidad de las bacterias anaerobias aisladas tiene un doble origen. En primer lugar taxonómico, ya que las clasificaciones utilizadas cambian constantemente debido a la introducción de estudios genómicos. Los análisis del RNA 16S han demostrado que muchos de los géneros definidos por caracteres fenotípicos eran muy heterogéneos y contenían géneros diversos, y que muchas especies, definidas igualmente sobre bases fenotípicas, estaban mal encuadradas en el esquema taxonómico. En segundo lugar la gran dificultad de los laboratorios de microbiología clínica estriba en el alto coste y tiempo requeridos para asignar sus aislamientos, por medio de caracteres fenotípicos, a géneros y especies definidos sobre bases genéticas, ya que es imposible recurrir de forma ordinaria a estudios del RNA 16S y a técnicas de amplificación genómica con cebadores específicos. Cada laboratorio debe intentar estudiar tantos caracteres fenotípicos como le sea posible y que le permitan llegar a una identificación adecuada. Los caracteres fenotípicos habitualmente estudiados, aparte de los morfológicos y de sensibilidad citados, son los derivados de la actividad metabólica: producción de indol,

descomposición del H₂O₂ (catalasa), capacidad sacarolítica y/o proteolítica, detección de determinados enzimas y caracterización de productos finales de su metabolismo.

9.2.1 El estudio de la capacidad de producir indol y de descomponer el H₂O₂ están al alcance de cualquier laboratorio de microbiología, por lo que deberían incluirse en todo esquema de identificación.

9.2.2 El estudio de la capacidad sacarolítica y/o proteolítica ha constituido la base de la identificación bacteriana desde los tiempos más remotos y aún hoy es el que se ofrece en todas las descripciones y/o redefiniciones de géneros y especies. La puesta en práctica de este estudio analizando un gran número de sustratos con métodos clásicos es larga, farragosa y costosa. Una buena alternativa es la utilización de sistemas comerciales, en los que se ofrecen, en pequeñas cúpulas o pocillos de plástico, un gran número de sustratos liofilizados que se rehidratan con el propio inóculo. En estos sistemas (por ejemplo, el api 20 A[®]) la bacteria tiene que crecer y ejercer su actividad metabólica, por lo que tienen que incubarse en anaerobiosis durante 24 a 48 horas.

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

9.2.4 La detección de los productos finales del metabolismo bacteriano mediante cromatografía gas-líquido sólo es asequible para los laboratorios que dispongan del cromatógrafo adecuado. En estos casos es una técnica de fácil realización y escaso coste, aunque exige cultivar y obtener un buen crecimiento en un medio líquido, preferentemente rico en glucosa (como el PRAS PYG). Este estudio, incluso después de los cambios taxonómicos mencionados, asociado a las características microscópicas (morfología cocoide o bacilar, grampositividad o gramnegatividad) continúa definiendo, en algunos casos, el género (*Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Veillonella*, *Acidaminococcus*, *Megasphaera*, *Propionibacterium*), en otros casos presta una gran ayuda para establecer diferencias entre determinados géneros (*Actinomyces* y *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Eubacterium*...) y en otros muchos permite "separar" géneros recientemente definidos (cocos grampositivos) y especies dentro de géneros muy amplios y heterogéneos (*Clostridium*). Su utilización facilita la identificación con los resultados de las otras pruebas bioquímicas (anexo 1).

9.2.5 Recomendaciones. Teniendo en cuenta todas estas técnicas que pueden estar al alcance de

muchos laboratorios de microbiología clínica, una buena práctica podría ser:

1 Realizar en todo aislamiento anaerobio estricto la identificación preliminar tal y como se ha descrito.

2 Añadir en todos los casos el estudio de la capacidad de descomponer el H₂O₂ o de producir indol (aunque esto último suele estar incluido en las galerías de micrométodos, puede ser más rápido y más fiable comprobarlo individualmente mediante el paradimetilaminocinamaldeido o en cualquier caldo rico en triptófano).

3 Estudiar la actividad metabólica con alguna de las galerías de micrométodos disponibles, bien las que detectan enzimas preformados o las que nos muestran la actividad sacarolítica o proteolítica, teniendo en cuenta que estas últimas sólo serán útiles en el caso de bacterias que posean una cierta actividad sacarolítica y que sean capaces de crecer bien en las condiciones proporcionadas por el micrométodo.

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

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

- Detección de lecitinasa y/o lipasa (*Clostridium*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, pigmentadas).

- Detección de ureasa (grupos *B. ureolyticus/Campylobacter*, *Bilophila/Sutterella*, *Clostridium*).

- Estímulo del crecimiento por determinados suplementos: (formato/ fumarato en el grupo *B. ureolyticus/Campylobacter*, arginina en *Eggerthella*...)

- Detección de los productos finales del metabolismo (*Fusobacterium*, cocos gramnegativos y grampositivos, bacilos grampositivos no esporulados y *Clostridium*).

9.2.6 Interpretación de los resultados

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

9.2.6.1 Interpretación de los resultados obtenidos con micrométodos comerciales. La realización e interpretación se hará siguiendo las instrucciones del fabricante. Todos vienen acompañados de tablas de identificación y de una base de datos que proporcionan la identificación de la cepa estudiada,

señalando, además, la precisión y fiabilidad de esta. Son de gran ayuda, aunque estos métodos también presentan ciertos problemas a tener en cuenta:

- La lectura de las galerías, tanto si se hace manualmente como si la realiza un lector automático no es siempre clara y definida, con lo que con determinadas cepas se obtienen, para algunas pruebas, resultados dudosos o difíciles de interpretar.

- La inercia de estos sistemas suele ser grande por lo que sus bases de datos no se actualizan con facilidad y no se adaptan a los frecuentes cambios taxonómicos. Cuando alguno de esos cambios consiste en que una determinada especie es transferida a otro género y/o recalificada el problema se limita a utilizar la denominación correcta cada vez que se de esa identificación (por ejemplo, *Peptostreptococcus magnus* → *Finegoldia magna*, *Peptostreptococcus micros* → *Micromonas micros*, *Eubacterium lentum* → *Eggerthella lenta*). El problema es mayor cuando el cambio supone la creación de nuevas especies, muchas veces a partir de una anteriormente descrita (por ejemplo, *Peptostreptococcus prevotii* → *P. prevotii*, *P. vaginalis*, *P. lacrimalis*, *P. lactolyticus*).

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

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

9.2.6.2 Interpretación de los resultados de las pruebas individuales complementarias realizadas en casos concretos:

- Ante una identificación preliminar de bacilos gramnegativos anaerobios con crecimiento en bilis (-), vancomicina R, kanamicina S y colistina S, la producción de **ácido butírico como producto final del metabolismo** indica sin ninguna duda que se trata de *Fusobacterium*. Una reducción de **nitratos** positiva sitúa en el grupo *Bacteroides ureolyticus/Campylobacter*. En las bases de datos de los micrométodos más utilizados *F. nucleatum*, la especie más frecuente, se identifica bien pero con escasa discriminación, sólo una prueba positiva, y del grupo *Bacteroides ureolyticus/Campylobacter* sólo *B. ureolyticus* esta contemplado.

- Una prueba de **lipasa (+)** en *Fusobacterium* confirma su identificación como *F. necrophorum*, especie que con las galerías de micrométodos comerciales se identifica bien pero con escasa discriminación (sólo dos pruebas positivas).

- Ante una identificación preliminar de bacilos gramnegativos anaerobios crecimiento en bilis (-),

vancomicina R, kanamicina S y colistina S, la producción de **ácido láctico como producto final del metabolismo** indica su pertenencia al género *Leptotrichia*.

- Ante una identificación preliminar de bacilos gramnegativos anaerobios crecimiento en bilis (+), vancomicina R, kanamicina S, y colistina S, una prueba de **catalasa (+) o (-)** indica *Bilophila wadsworthia* o *Sutterella wadsworthensis*.

- Una identificación preliminar de cocos gramnegativos anaerobios **nitratos (+)** separa el género *Veillonella*, y los productos finales del metabolismo definen perfectamente los tres géneros: *Veillonella* (ácido propiónico), *Acidaminococcus* (ácido butírico) y *Megasphaera* (ácido caproico).

- Ante una identificación preliminar de bacilos grampositivos anaerobios, que morfológicamente aparecen como *Propionibacterium*, la detección de ácido **propiónico como producto final del metabolismo** confirma el diagnóstico de género. Si se añaden las pruebas de **catalasa (+), indol (+) y nitratos (+)**, esta prácticamente identificada la especie *Propionibacterium acnes*.

- La identificación de un bacilo grampositivo anaerobio como *Eggerthella lenta* (antes *Eubacterium lentum*) con los micrométodos habituales, tanto con los que estudian la capacidad sacarolítica como con los que detectan enzimas preformados, es de escasa discriminación: resultado negativo en todas las pruebas en el primer caso (api 20 A[®]) y con sólo un resultado positivo, el ADH (arginina dehidrolasa), en el segundo caso (ID 32A[®]). La reducción de **nitratos (+), la estimulación del crecimiento con arginina y la producción de SH₂ en medio de TSI (triple sugar iron)** confirman plenamente el diagnóstico.

- Ante una identificación preliminar de cocos grampositivos anaerobios, la sensibilidad mediante la técnica de disco-placa a **polianetol sulfonato sódico (SPS)** indica la identificación de *Peptostreptococcus anaerobius* o, con menos probabilidad, *Micromonas micros*. Aparte de la fácil diferenciación de este último por su morfología microscópica (tamaño) y porque se identifica muy bien con los micrométodos que detectan enzimas preformados, un cromatograma abigarrado, incluyendo hasta ácido isocaproico en los **productos finales del metabolismo** orienta claramente hacia *P. anaerobius*.

- En el taxonómicamente complicado grupo de los cocos grampositivos anaerobios la detección de los **productos finales del metabolismo** delimita grupos más reducidos:

- Los que producen ácido acético:

 - Finegoldia magna*

 - Micromonas micros*

- Los que producen ácido butírico:

 - Indol (-):

 - Peptostreptococcus prevotii* → *Anaerococcus prevotii*

 - Peptostreptococcus tetradius* → *Anaerococcus tetradius*

 - Peptostreptococcus lactolyticus* → *Anaerococcus*

lactolyticus

Peptostreptococcus vaginalis → *Anaerococcus vaginalis*

Peptostreptococcus lacrimalis → *Peptoniphilus lacrimalis* o *Schleiferella lacrimalis*

Peptostreptococcus ivorii → *Peptoniphilus ivorii*

Indol (+):

Peptostreptococcus indolicus → *Peptoniphilus indolicus* o *Schleiferella indolica*

Peptostreptococcus asaccharolyticus → *Peptoniphilus asaccharolyticus* o *Schleiferella asaccharolytica*

Peptostreptococcus harei → *Peptoniphilus harei* o *Schleiferella harei*

Peptostreptococcus vaginalis → *Anaerococcus vaginalis*

Peptostreptococcus hydrogenalis → *Anaerococcus hydrogenalis*

- Los que producen diversos ácidos orgánicos y hasta ácido isocaproico:

Peptostreptococcus anaerobius

- Los que producen diversos ácidos orgánicos y hasta ácido caproico:

Peptostreptococcus octavius → *Anaerococcus octavius*

Peptococcus Níger

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

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

- *Clostridium* lecitinasa (+), entre los que se encuentran especies tan frecuentes como *C. perfringens*, *C. novyi* A [ambos **indol** (-) y además *C. novyi* A productor también de **lipasa**], *C. bifermentans* y *C. sordellii* [ambos **indol** (+) y además *C. sordellii* productor también de **ureasa**].

- *Clostridium* lipasa (+), incluyen además de *C. novyi* A, todos los biotipos de *C. botulinum* y *C. sporogenes*.

- *Clostridium* lecitinasa (-) y lipasa (-). A este grupo pertenecen multitud de especies que pueden a su vez agruparse por los productos finales de su metabolismo:

- Los que producen sólo ácido acético (como *C. ramosum* y *C. clostridioforme*).

- Los que producen ácido butírico, que constituyen un grupo con un elevado número de especies importantes en clínica (entre ellas *C. tetani*, *C. septicum*, *C. butyricum*,).

- Los que producen una gran variedad de

productos finales en su metabolismo. En este grupo, con muy pocas especies y en general poco frecuentes en clínica, se encuentra *C. difficile* que produce de forma característica ácido isocaproico, de forma que esta especie podría identificarse con mucha fiabilidad por sus características morfológicas, inoculación de una placa de agar-yema de huevo y cromatografía de los productos finales de su metabolismo.

10. PRUEBAS DE DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD

10.1 INDICACIONES

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

1) Estudios periódicos de vigilancia y seguimiento en cada centro hospitalario, con el fin de conocer los patrones locales de resistencia y de esta forma tener información útil para seleccionar la terapia antimicrobiana empírica más adecuada y detectar posibles cambios en la sensibilidad o aparición de resistencias.

2) Casos individuales de pacientes que no responden a la terapia empírica, o que presentan infecciones graves o infecciones que requieran terapia prolongada (absceso cerebral, endocarditis, osteomielitis, infección articular, de prótesis, de injertos vasculares, y bacteriemias recurrentes).

3) Estudios de la actividad *in vitro* de nuevos antimicrobianos frente a bacterias anaerobias.

4) Infecciones producidas por especies de *Bacteroides*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Bilophila* y *Sutterella*, que son más virulentas y/o con una sensibilidad poco predecible a los antibióticos comúnmente utilizados para el tratamiento de las infecciones por anaerobios.

10.2 MÉTODOS

Para una información más completa sobre la metodología de los ensayos de sensibilidad de las bacterias anaerobias es conveniente consultar el Procedimiento en Microbiología Clínica nº 11 de la SEIMC (Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos). En el presente documento se incluyen, especialmente, las modificaciones que se han producido posteriormente, especialmente en los últimos documentos del NCCLS (M11-A5, 2001 y M11-A6, 2004). El método de difusión con discos en agar no está aprobado para las bacterias anaerobias y el de dilución en agar es el de referencia para todos los anaerobios. En cuanto al método de microdilución en caldo el NCCLS solamente lo ha aprobado para el ensayo de aislamientos pertenecientes al grupo de *Bacteroides fragilis* y a un número limitado de antibióticos, ya que diversas especies anaerobias crecen poco o no lo hacen en los pocillos y, además, hay pocos estudios comparativos con el método de referencia. Cuando se realizan estudios amplios, ya sea para ensayar

nuevos antimicrobianos o para conocer los patrones actuales de resistencia, la técnica de dilución en agar es el método más eficaz, ya que permite el crecimiento de una gran variedad de microorganismos anaerobios. El método de microdilución así como la utilización de tiras de E-test, son alternativas recomendadas para casos individuales.

10.2.1 Dilución en agar.

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

Preparación del inóculo: A partir de un cultivo en placas de agar *Brucella* enriquecido para anaerobios, de 24 horas o del tiempo necesario para conseguir colonias de por lo menos 1 milímetro de diámetro, se suspenden de 3 a 5 colonias en un caldo de tioglicolato enriquecido sin indicador, que se incuba entre 6 y 24 horas o hasta que alcance una turbidez adecuada. Posteriormente, se ajusta la turbidez a una densidad equivalente al 0,5 de la escala turbidométrica de McFarland mediante la adición de caldo *Brucella* u otro caldo previamente reducido, o hervido y enfriado para eliminar el oxígeno. También se puede preparar el inóculo directamente haciendo una emulsión de las colonias y ajustándola a la turbidez mencionada partiendo del cultivo, medios citados y según el procedimiento anteriormente indicado. Las placas con medio de agar *Brucella* con antibióticos no deben dejarse en aerobiosis un tiempo superior a 30 minutos.

La inoculación en la superficie del agar se hace con la ayuda de un replicador de Steers. El inóculo final debe ser, aproximadamente, de 10⁵ UFC por punto de inoculación. Se recomienda, tanto al principio como al final de cada serie, inocular dos placas control sin antibiótico, una se incuba en una atmósfera con un 5% de CO₂ y la otra en anaerobiosis, durante 42-48 h, con el fin de comprobar la viabilidad y pureza del inóculo. Se debe empezar a inocular siempre por la concentración más pequeña de cada antibiótico. A las 42-48 h de incubación en anaerobiosis a 35-37°C, se lleva a cabo la lectura examinando en primer lugar las placas control. La CMI (concentración mínima inhibitoria) se considera como aquella concentración de antibiótico en la que se observa una reducción marcada en el crecimiento de la bacteria al compararlo con el crecimiento de la placa control, como es el cambio a una fina película, o a numerosas colonias pequeñas, o bien a una o varias colonias de tamaño normal.

La interpretación de los valores de CMI obtenidos para cada antibiótico se realiza según los criterios del documento M11-A6 del NCCLS.

10.2.2. Microdilución en caldo. Como se ha mencionado solamente está aceptado por el NCCLS para las especies del grupo de *Bacteroides fragilis* y para ampicilina-sulbactam, cefoxitina, clindamicina, ertapenem, metronidazol, piperacilina y

trovafloxacin. Para su realización se recomienda usar caldo *Brucella* suplementado con hemina (5 µg/ml), vitamina K₁ (1 µg/ml) y sangre lacada de caballo (5%). El inóculo puede prepararse siguiendo uno de los procedimientos descritos en el método de dilución en agar y debe ser de 1x10⁵ UFC/pocillo. Se aconseja realizar un control de pureza de la suspensión del inóculo, haciendo un subcultivo de una parte alícuota en un medio enriquecido y no selectivo para incubar en aerobiosis y en anaerobiosis.

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

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

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

10.2.4 E-test. Las tiras de E-test® (AB Biodisk) consisten en unas tiras de plástico impregnadas con un gradiente exponencial continuo del antimicrobiano y una escala de valores de CMI. Siguiendo las normas de los fabricantes del producto, se prepara como inóculo una suspensión del microorganismo a ensayar en caldo *Brucella* hasta alcanzar una turbidez correspondiente al n° 1 de la escala de McFarland, que se aplica en placas de agar *Brucella* enriquecidas con 5% de sangre de carnero, vitamina K₁ (1 µg/ml) y hemina (5 µg/ml). Una vez secas las placas se aplican las tiras sobre la superficie del agar con la escala hacia arriba y evitando la formación de burbujas bajo ella. Se incuban en anaerobiosis durante 24-48h. La lectura de la CMI se realiza en el punto de intersección de la escala de la tira y la zona de inhibición del crecimiento del microorganismo, que tiene forma de elipse. Para el metronidazol es importante alcanzar la atmósfera anaerobia en 1 ó 2 horas. Con la clindamicina se debe confirmar la lectura a las 48 horas.

10.2.5 Controles de calidad. Con cualquiera de los métodos utilizados se deben realizar ensayos de control de calidad con las cepas de referencia de la

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

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

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

11. PROCEDIMIENTOS A REALIZAR EN SITUACIONES ESPECIALES

11.1 BOTULISMO

Se trata de una enfermedad que es cada vez menos frecuente en los países desarrollados por la implantación de medidas preventivas en la elaboración y conservación de los alimentos envasados. Se reconocen cinco tipos de presentaciones clínicas: intoxicación alimentaria, botulismo de las heridas, botulismo del lactante, botulismo por colonización intestinal y botulismo inhalatorio. Está provocada por las neurotoxinas de *C. botulinum*, y, puntualmente, por las de *C. butyricum* y *C. baratii*. El diagnóstico se realiza demostrando las neurotoxinas y/o el agente etiológico en muestras del paciente. En la intoxicación alimentaria deben obtenerse 15-20 mililitros de suero, 25-50 gramos de heces y el alimento sospechoso de contener el agente infeccioso. En el botulismo de las heridas debe obtenerse suero, heces y material tisular o exudativo de la herida infectada. En el del lactante y en el producido por colonización intestinal se recomienda obtener suero, heces y contenido gástrico del

paciente, y en el botulismo inhalatorio, suero, contenido gástrico, heces, torundas nasales y el material sospechoso. 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 posterior procesamiento.

11.2 DIARREA Y COLITIS POR *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* ASOCIADAS AL USO DE ANTIBIÓTICOS

Clostridium difficile es la causa más frecuente de diarrea y colitis asociada al uso previo de antibióticos en el ambiente hospitalario. Su incidencia está alrededor de los 10 casos por 1.000 ingresos. Las toxinas implicadas son la A o enterotoxina y la B o citotoxina. El diagnóstico se basa esencialmente en la detección de las toxinas a partir de heces diarreicas frescas por ensayos de citotoxicidad. No se recomienda el análisis sobre heces sólidas ya que hay una importante disminución de la sensibilidad y además existen portadores sanos de *C. difficile* toxigénico. El procedimiento diagnóstico más sensible es el denominado **cultivo toxigénico**, es decir, el ensayo de citotoxicidad de la toxina B en líneas celulares de los aislados de *C. difficile* recuperados del cultivo. Sin embargo, es recomendable realizar a la vez un ensayo de **citotoxicidad directa de las heces** ya que aumenta la sensibilidad de la técnica en un 5% y reduce el tiempo necesario para el diagnóstico de la enfermedad. El ensayo de citotoxicidad se basa en la detección del efecto citopático específico de la citotoxina de *C. difficile* en ciertas líneas celulares de mamíferos como: fibroblastos humanos, células MRC-5 o células K-1 de ovario de hámster chino. El ensayo del cultivo toxigénico consiste en inocular en un caldo de enriquecimiento, como caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI), varias colonias sospechosas de *C. difficile*, incubarlo en anaerobiosis a 37°C durante 24 horas, filtrar el cultivo con un filtro de membrana, diluir el filtrado, añadir la dilución al cultivo celular elegido e incubar este a 37°C durante 48 horas. Se recomienda leer los cultivos a las 24 y 48 horas. La especificidad del efecto citopático se comprueba realizando el mismo ensayo en paralelo en un cultivo celular que contenga la antitoxina de la toxina B. Si se produce el efecto citopático en el cultivo sin antitoxina y no se produce en el que sí la contiene, entonces la detección es positiva. En el ensayo de citotoxicidad directa se parte de un filtrado de la muestra de heces que se procesa de forma idéntica al realizado con las colonias.

El cultivo de las heces puede realizarse en medios de cultivo selectivos como el agar fructosa-cicloserina-cefoxitina (CCFA) o el agar yema de huevo-cicloserina-cefoxitina (CCEY), o bien, en medios no selectivos, como el agar sangre para anaerobios, con un pretratamiento de las heces con alcohol absoluto durante 30-60 minutos o mediante choque térmico a 80°C durante 10 minutos. Tras 24-48 horas de incubación en anaerobiosis, las colonias son no hemolíticas, mates, planas, grandes e

irregulares, de color amarillento a grisáceo, con una estructura interna que se asemeja a un mosaico de cristales, y con olor a cuadra debido a la producción de p-cresol. Aunque el cultivo es muy sensible, es poco específico ya que permite crecer a las cepas no toxigénicas de *C. difficile* y a otros clostridios.

11.3 TOXIINFECCIÓN POR *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

Esta toxiinfección se produce por la enterotoxina de *C. perfringens* del tipo A. Esta especie posee cinco grupos toxigénicos (A, B, C, D y E), según la producción de las cuatro toxinas consideradas principales y la enterotoxina. Suele aparecer en forma de brotes, más frecuentes en restaurantes y colegios, debido a cocciones inadecuadas de productos cárnicos y, a veces, vegetales, que contienen esporas de *C. perfringens*, y a un ulterior enfriamiento lento. Las esporas supervivientes del cocinado germinan dando lugar a las formas vegetativas que se multiplican activamente por el enfriamiento lento. Tras la ingestión, las formas vegetativas producen endosporas debido al ambiente alcalino del intestino delgado. Este proceso de esporulación también da lugar a la elaboración y liberación de una enterotoxina que es la responsable del cuadro. Se estima que son necesarias 10^8 células vegetativas viables para que aparezcan síntomas. El periodo de incubación es de 6-24 horas. Los síntomas más frecuentes son diarrea acuosa (90%), calambres abdominales (80%), náuseas (25%), fiebre (24%) y vómitos (9%). Los síntomas suelen remitir espontáneamente en pocas horas. El cultivo de heces ($>10^5$ UFC/gramo) y del alimento sospechoso ($>10^6$ UFC/gramo) en medios específicos para clostridios tiene una alta sensibilidad pero la especificidad no es buena. Se recomienda la detección de la enterotoxina en heces mediante técnicas de aglutinación pasiva inversa mediante látex (Oxoid[®]) o ensayo inmunoquímico (TechLab[®]), o bien, mediante ensayos específicos de citotoxicidad en cultivos celulares de células Vero. No está recomendada la detección parcial o total del gen de la enterotoxina en aislados de *C. perfringens* mediante técnicas de PCR o sondas marcadas con digoxigenina ya que su presencia no implica que las cepas tengan la capacidad de producir la enterotoxina durante la esporulación en un ambiente similar al intestinal (condición imprescindible para producir la enfermedad).

11.4 ANGINA DE VINCENT

Es una infección de la cavidad oral caracterizada por faringitis, presencia de exudado membranoso, aliento fétido y úlceras orales. Esta causada por ciertas especies aerobias como *Borrelia* spp. o anaerobias como *Fusobacterium* spp. El diagnóstico ha de realizarse siempre mediante los hallazgos clínicos y una tinción de Gram de las úlceras bucales tomadas en torunda en la que se observaran espiroquetas, bacilos fusiformes y leucocitos polimorfonucleares. El cultivo no es útil para el diagnóstico de esta enfermedad.

11.5 ACTINOMICOSIS

La actinomicosis es una enfermedad granulomatosa crónica caracterizada por la presencia de lesiones supurativas que pueden evolucionar a abscesos y fístulas. En ocasiones, se produce una supuración purulenta con gránulos macroscópicos de azufre de color blanquecino, amarillento o marrón. Su principal agente etiológico es *Actinomyces israelii* aunque otras especies como *A. naeslundii*, *A. meyeri*, *A. odontolyticus*, *A. gerencseriae* o *A. viscosus* también pueden estar implicados. Esta infección suele ser polimicrobiana y los microorganismos más frecuentemente encontrados junto al género *Actinomyces* son *Propionibacterium propionicum*, *Fusobacterium* spp., *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga* spp., *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp. y algunos estreptococos. El diagnóstico se basa en primer lugar, y cuando estén presentes, en la observación microscópica de los gránulos de azufre (0, 1-5 mm) obtenidos de muestras como tejidos, lavados bronquiales, líquidos corporales, dispositivos intrauterinos o exudados purulentos. Estos gránulos tienen un borde irregular debido a la acumulación de bacterias bacilares pertenecientes al género *Actinomyces*. Con una tinción de Gram se observan bacilos grampositivos en forma de garrote, normalmente ramificados y que se deben diferenciar de otros microorganismos morfológicamente similares como *Nocardia* spp. o *Streptomyces* spp. La petición de un cultivo para *Actinomyces* spp. a partir de los gránulos de azufre o, en su ausencia, de las muestras sospechosas debe especificarse en el volante de solicitud ya que requiere un pretratamiento especial y una incubación prolongada. Se utilizan los medios de cultivo sólidos y líquidos habituales para el cultivo de microorganismos anaerobios pero deben ser lo más frescos posible. Los gránulos de azufre y las muestras sólidas se trituran en un medio de enriquecimiento líquido y el triturado se siembra en una placa de agar sangre para anaerobios, en una placa de agar con alcohol fenil-éfilico y sangre, y en un caldo de enriquecimiento. Estos medios de cultivo se incuban en ambiente anaerobio a 35-37°C durante un mínimo de 7 días, tiempo que puede extenderse hasta las 2-4 semanas. Cuando se trate de muestras ricas en microbiota, como genitales o dispositivos intrauterinos, es recomendable diluirlas de 1:10 a 1:10.000 y sembrar las diluciones en agar sangre Columbia con y sin metronidazol a una concentración de 2,5 µg/ml. Todas las especies de *Actinomyces* son anaerobias facultativas con excepción de *A. meyeri* que es anaerobia estricta. La morfología de las colonias de *Actinomyces* spp. varía de un aspecto liso a una apariencia molar dependiendo de ciertos factores como el tipo de medio y condiciones de cultivo y la edad de las colonias. El aspecto de las bacterias con la tinción de Gram también puede ser variable observándose desde bacilos grampositivos ramificados a formas cocoides. La diferenciación de las especies de *Actinomyces* es difícil aún utilizando los sistemas de identificación comerciales.

11.6 INFECCIONES ENDOMETRIALES

Son infecciones generalmente polimicrobianas con predominio de flora anaerobia. La muestra ideal para cultivo es tejido endometrial obtenido mediante una cánula de aspiración en condiciones de anaerobiosis y evitando la contaminación con la microbiota vaginal. No deben utilizarse hisopos, pues a los inconvenientes del uso de las torundas se une el que los agentes causales de la infección suelen encontrarse incluidos en el tejido. La muestra, transportada adecuadamente, se procesa lo más rápidamente posible triturándose en un caldo de cultivo. La mezcla resultante se siembra en los medios habituales para el cultivo de anaerobios, sólidos y líquidos, aerobios y facultativos, específicos de bacterias aerobias productoras de infecciones endometriales como agar Thayer-Martin o Martin-Lewis, agar Shepard AI y para micobacterias. El proceso ulterior coincide con el general previamente descrito.

11.7 ENTEROCOLITIS DEL PACIENTE CON NEUTROPENIA

La enterocolitis del paciente con neutropenia es una infección necrótica del ciego y otras zonas del intestino producida generalmente por *C. septicum* y, en menor medida, por otros clostridios como *C. tertium*, *C. perfringens*, *C. sporogenes* y *C. sordelli*. Se manifiesta por fiebre, dolor abdominal que aumenta cuando se palpa el cuadrante inferior derecho del abdomen, y diarrea acuosa ocasionalmente sanguinolenta. Los tejidos afectados están edematosos, hemorrágicos, necróticos y contienen numerosos clostridios. Esta infección afecta a pacientes neutropénicos o con procesos oncológicos gastrointestinales. El diagnóstico microbiológico se realiza a partir de las siguientes muestras: sangre (3 series de hemocultivos tomados de diferentes zonas de venopunción), heces (un mínimo de 25 gramos o mililitros), contenido del lumen y/o de tejido del área ileocecal afectada, estas dos últimas recogidas durante la intervención quirúrgica o la autopsia. Cuando se sospeche una mionecrosis u otra forma de infección progresiva también debe tomarse una biopsia o aspirado del músculo afectado. Tanto *C. septicum* como el resto de los clostridios implicados crecen muy bien y rápidamente en los medios de cultivo habituales para anaerobios, donde a las 48 horas de incubación producen colonias grandes e irregulares. Las colonias de *C. septicum* son muy características ya que crecen en velo por toda la superficie del medio de cultivo (del mismo modo que los microorganismos del género *Proteus* en agar sangre) y no crecen en agar con alcohol feniletílico.

11.8 TÉCNICAS RÁPIDAS DE DIAGNÓSTICO

Técnicas rápidas de detección de *Clostridium difficile* toxigénico

A pesar de la alta sensibilidad y especificidad del uso combinado del cultivo toxigénico y del ensayo de citotoxicidad, su realización puede llevar de 1 a 4 días. Además, existen muchos laboratorios de microbiología que carecen de la infraestructura

necesaria para la realización de cultivos celulares. Estos inconvenientes han dado lugar a la aparición de sistemas comerciales de detección de *C. difficile* toxigénico en heces que son muy sencillas de realizar y que han reducido considerablemente el tiempo de diagnóstico. Las principales técnicas comerciales disponibles en la actualidad son:

1) Técnicas que detectan glutamato deshidrogenasa: este enzima es un antígeno bastante específico de *C. difficile* pero tiene el inconveniente de que está presente tanto en las cepas toxigénicas como no toxigénicas, por ello las técnicas basadas en su detección no las discriminan y tienen valores de especificidad discretos. Los sistemas basados en aglutinación de partículas de látex (CDT[®], Becton Dickinson; Meritec *C. difficile*[®], Meridian Diagnostics) dan los resultados en pocos minutos y los que utilizan técnicas de enzoinmunoensayo (ImmunoCard *C. difficile*[®], Meridian Diagnostics; Triage *C. difficile* panel[®], Biosite Diagnostics) en 15-20 minutos. Los valores de sensibilidad y especificidad son del 84-92% y 96-100%, respectivamente.

2) Técnicas que detectan toxina A: existen numerosos sistemas comerciales que detectan la enterotoxina de *C. difficile* mediante técnicas de enzoinmunoensayo. El tiempo necesario para la obtención de resultados varía de unos pocos minutos a varias horas. Los valores de sensibilidad y especificidad son muy diversos dependiendo del sistema comercial que se utilice, aunque son superiores a los obtenidos por las técnicas basadas en la detección de glutamato deshidrogenasa. Su principal problema estriba en que no detectan cepas toxigénicas que no producen toxina A, que se estima suponen el 10% del total de cepas toxigénicas productoras de enfermedad.

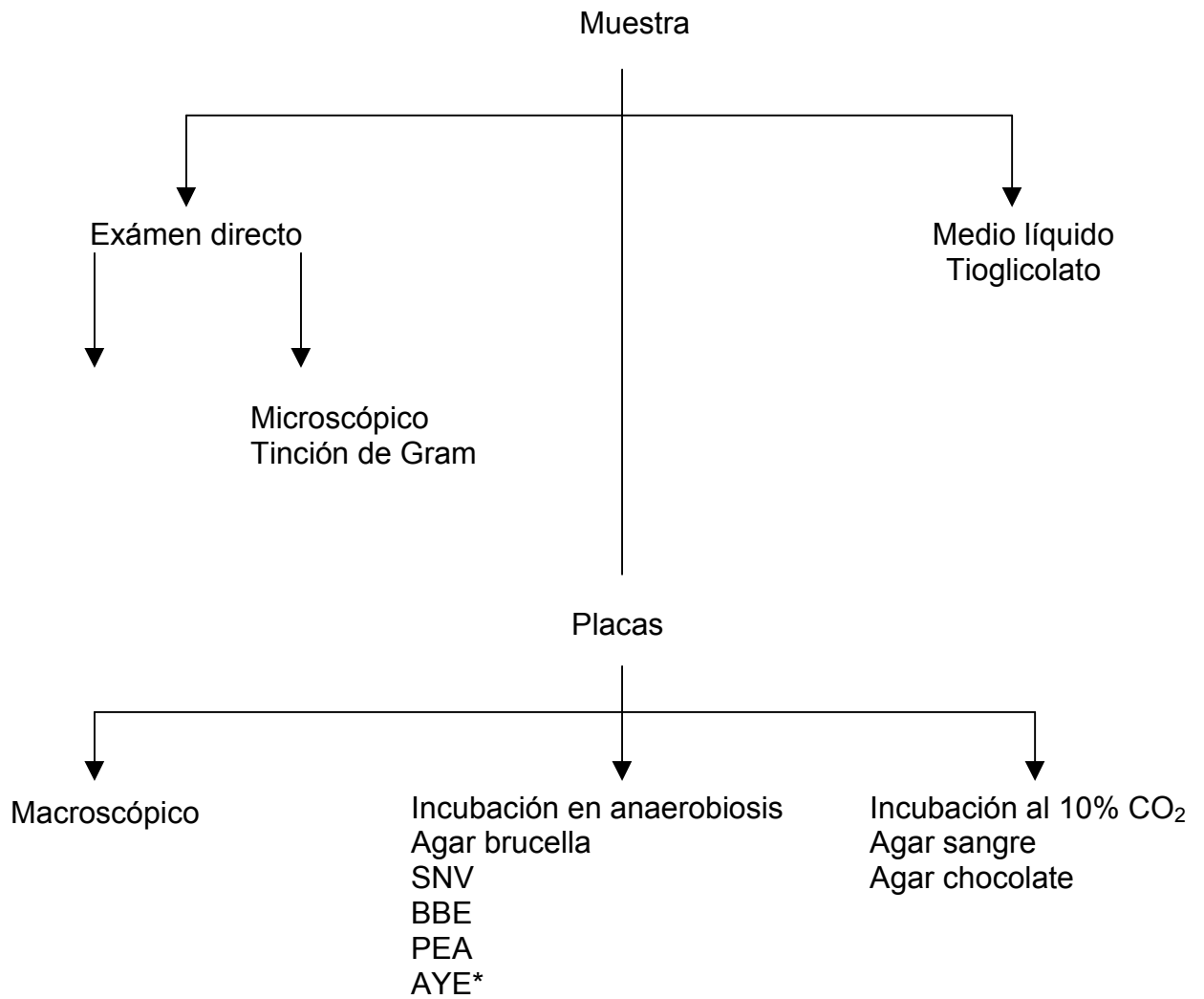
3) Técnicas que detectan toxina A y B: son más sensibles que las anteriores ya que son capaces de detectar cepas que no producen toxina A y si B. Los principales sistemas disponibles son *C. difficile* Tox-A/B Tets[®] (TechLab), Cd Toxin A+B[®] (Rohm Pharma) y Premier Cytoclone[®] (Meridian Diagnostics).

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Allen SD, Emery CL, Lysterly DM. *Clostridium*. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, White
2. Dowell VR Jr. Botulism and tetanus: selected epidemiologic and microbiologic aspects. Rev Infect Dis 1984;6:S202-S207.
3. García-Rodríguez JA, Cantón R, García Sánchez JE, Gómez-Lus ML, Martínez Martínez L, Rodríguez-Avil C, Vila J. Procedimientos en Microbiología Clínica 11. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. SEIMC.
4. Guerrero Gómez C, Sánchez Carrillo C. Procedimientos en Microbiología Clínica 1a. Recogida, transporte y procedimiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología. SEIMC.
5. Isenberg HD: Clinical Microbiology Procedures Handbook. American Society for Microbiology, Washington, D.C.; 1992, 1997.

6. Jousimies-Somer HR, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler HM, Finegold SM. Wadsworth –KTL Anaerobic Bacteriology Manual. Star Publishing Company. Belmont, C.A. 2002.
7. Jousimies-Somer HR, Summanen PH, Wexler H, Finegold SM, Gharbia SE, Shah HN. *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, and other anaerobic gram-negative bacteria. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC editores. Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition. American Society for Microbiology, Washington, D.C.; 2003. p. 880-901.
8. Loza Fernández de Bobadilla E, Planes Reig A, Rodríguez Creixems M. Procedimientos en Microbiología Clínica 1a. Hemocultivos. SEIMC.
9. Lyster DM, Krivan HC, Wilkins TD. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. Clin Microbiol Rev 1988;1:1-18.
10. Moncla BJ, Hillier SL. *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, and other non-spore-forming anaerobic gram-positive bacteria. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC editores. Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition. American Society for Microbiology, Washington, D.C.; 2003. p. 857-879.
11. NCCLS. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. Approved Standard. Fifth Edition. M11-A5, 2001.
12. NCCLS. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. Approved Standard. Sixth Edition. M11-A6, 2004.
13. Rood JI, McClane BA, Songer JG et al. The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis. San Diego: Academic; 1997.
14. Shandera WX, Tacket CO, Blake PA. Food poisoning due to *Clostridium perfringens* in the United States. J Infect Dis 1983;147:167-170.

Figura 1.- Esquema del procesamiento inicial de la muestra



* Cuando se sospecha la presencia de clostridios

Anexo 1.- Análisis de los productos finales del metabolismo mediante cromatografía gas-líquido

1º - Incubar, hasta obtener un buen crecimiento, un cultivo en medio líquido de la bacteria a estudiar

2º - Añadir dos gotas de H₂SO₄ al 50% a 5 ml del cultivo (acidificar a un pH aproximadamente de 2), centrifugar, y recoger el sobrenadante para analizar aquí los productos metabólicos acumulados.

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

3º - a) Extraer directamente los ácidos volátiles con éter

b) Metilar los ácidos no volátiles y extraer los metilderivados con cloroformo

4º - Inyectar 1 µl del extracto correspondiente en la columna del cromatógrafo para separar e identificar los productos extraídos

A.- Extracción con éter de los ácidos volátiles acumulados en el medio de cultivo

1. Separar 1 ml del sobrenadante (en tubo de cristal)
2. Añadir 0.2 ml de H₂SO₄ al 50% y 0,4 g de NaCl
3. Añadir 1ml de éter (tapar y mezclar bien invirtiendo el tubo 20 veces)
4. Centrifugar brevemente para separar la capa de éter
5. Inyectar 1 µl de éter en la columna

Si el cromatógrafo utilizado esta equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna SP-1220, se puede prescindir de esta extracción e inyectar directamente el sobrenadante del cultivo

B.- Preparar metil derivados (de los ácidos pirúvico, láctico y succínico) y proceder a su extracción con cloroformo

1. Separar 1 ml del sobrenadante (en tubo de cristal)
2. Añadir 0.2 ml de H₂SO₄ al 50% + 1 ml de metanol. Tapar y mezclar bien
3. Colocar a baño o bloque de calor a 60°C 30 minutos
4. Dejar enfriar
5. Añadir 0.5 ml de cloroformo (tapar y mezclar bien invirtiendo el tubo 20 veces)
6. Centrifugar brevemente para separar la emulsión
7. Eliminar con una pipeta parte de la capa acuosa
8. Usando la jeringa de inyección aspirar directamente el cloroformo que se encuentra en el fondo del tubo.
9. Inyectar 1 µl de cloroformo en la columna

DOCUMENTO TÉCNICO

**PNT-AN-01
PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE INFECCIONES POR ANAEROBIOS**

| ELABORADO | | REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio | |
|--------------|-------|---|-------|
| Nombre/Firma | Fecha | Nombre/Firma | Fecha |
| | | | |

| EDICIÓN | FECHA | ALCANCE MODIFICACIONES |
|---------|-------|------------------------|
| 01 | | Edición inicial |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |

COPIA REGISTRADA Nº.ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

| | | | |
|---------------------------|-----------------------------|------------------|----------------|
| Servicio de Microbiología | Bacterias Anaerobias | Fecha: PNT-AN-01 | |
| Hospital..... | | Edición N° 01 | Página 2 de 12 |

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es normalizar el procesamiento de muestras para el diagnóstico microbiológico de las infecciones producidas por microorganismos anaerobios. Su aplicación se extiende desde la extracción de las muestras, hasta la identificación definitiva de los aislados anaerobios. En este documento quedan excluidas la descripciones correspondientes a los hemocultivos de microorganismos anaerobios (ver PNT-HC-01) y al diagnóstico de *Clostridium difficile* toxigénico (ver PNT-AN-02). Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de hospitales, centros de salud o cualquier laboratorio que realice determinaciones de microbiología clínica.

2. FUNDAMENTO

Las bacterias anaerobias producen un amplio abanico de infecciones en el hombre, desde cuadros ocasionados por toxinas producidas por diferentes especies del género *Clostridium* (botulismo, tétanos, gangrena gaseosa, diarrea asociada al uso de antibióticos, etc) hasta infecciones endógenas no exotóxicas que pueden afectar a casi cualquier parte del organismo. Los requisitos especiales de crecimiento de las bacterias anaerobias condicionan un procesamiento particular de las muestras y sus cultivos que va a ser detallado a continuación.

3. DOCUMENTACIÓN DE CONSULTA

Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica (Procedimiento 10). Procedimientos en microbiología clínica. SEIMC, 2000.

Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología (PNT-RTP-01). SEIMC, 2003.

Hemocultivos (PNT-HC-01). SEIMC, 2003.

Procedimientos específicos para cada tipo de técnica.

4. RECOGIDA Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

4.1. SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Para que los estudios microbiológicos tengan valor es necesario tomar las muestras de forma que la flora normal no las contamine. Las muestras de elección para cada tipo de infección se muestran en la siguiente tabla 1.

4.2. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

- Muestras obtenidas mediante aspiración con jeringa. Una vez obtenida la muestra, expulsar el gas del interior de la jeringa tapando la aguja con una gasa estéril impregnada en alcohol para eliminar el riesgo de aerosoles. A continuación, cambiar la aguja por otra estéril e inocular, previa desinfección del tapón de goma, el contenido de la jeringa en la superficie del agar de un vial de transporte para anaerobios.

- Muestras de tejidos y biopsias quirúrgicas.

Pueden remitirse en un frasco estéril siempre y cuando el procesamiento sea rápido. En caso contrario, el frasco puede introducirse en una bolsa de anaerobiosis. Otra opción, es introducir las muestras a unos 5 mm de la base de agar de unos frascos especiales que contienen un indicador de anaerobiosis.

- Muestras recogidas en torunda. Aunque no se recomienda la utilización de torundas, en ciertas ocasiones no es posible utilizar otro método. En tales casos usar unos tubos con medio para anaerobios e introducir las torundas a 5 mm del fondo del tubo cerrándolo inmediatamente.

4.3. ENVÍO DE LAS MUESTRAS AL LABORATORIO

Rellenar un volante para cada muestra. Es necesario indicar en los volantes el nombre del paciente, el servicio donde se encuentra ingresado, el número de cama y el número de teléfono del control de enfermería. Facultativo que solicito el análisis. Datos del centro de salud si es una petición de la comunidad. Sería deseable añadir en los volantes otra información que ayudara a la valoración del cultivo en el laboratorio como el tratamiento antibiótico previo a la toma de muestras, la enfermedad de base del paciente, el síndrome clínico que padece en el momento actual y si la infección es de adquisición nosocomial o comunitaria.

Introducir la muestra con su respectivo volante en una bolsa de plástico y enviarla inmediatamente al Servicio de Microbiología, donde se mantendrá a temperatura ambiente (las temperaturas de incubación pueden ocasionar sobrecrecimiento bacteriano o pérdida de cepas mientras que las temperaturas bajas pueden permitir un aumento en la difusión de oxígeno) con la excepción de las orinas suprapúbicas (2-8°C) y los hemocultivos (35-37°C). El tiempo óptimo desde la toma de la muestra hasta el procesamiento es de 2-3 horas con la excepción de las muestras transportadas en frascos estériles que deben procesarse idealmente en menos de 30 minutos. Para una descripción más detallada del transporte y conservación de las muestras incluidos los volúmenes mínimos aceptables de cada tipo de muestra ver el PNT-RTP-01.

4.4. RECEPCIÓN Y REGISTRO DE LAS MUESTRAS

Una vez ha llegado la muestra al laboratorio anotar la fecha y hora de recepción, asignar a la muestra un número del registro general del laboratorio de Microbiología y comprobar que cumple los requisitos para su aceptación. Los volantes pasarán a Secretaría para su registro en el sistema de gestión del laboratorio.

4.5. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO DE LAS MUESTRAS. ACCIONES A TOMAR

El laboratorio de microbiología debe determinar, una vez recibida la muestra en el laboratorio, si esta

| | | | |
|---------------------------|-----------------------------|------------------|----------------|
| Servicio de Microbiología | Bacterias Anaerobias | Fecha: PNT-AN-01 | |
| Hospital..... | | Edición N° 01 | Página 3 de 12 |

cumple con los requisitos para ser procesada. Estos requisitos incluyen entre otros, una correcta identificación, tipo de muestra adecuada para la

| | | | |
|---------------------------|-----------------------------|------------------|----------------|
| Servicio de Microbiología | Bacterias Anaerobias | Fecha: PNT-AN-01 | |
| Hospital..... | | Edición N° 01 | Página 4 de 12 |

Tabla 1. Muestras de elección para cada tipo de infección

| Infecciones | Muestras |
|--|--|
| SNC (abscesos y empiemas) | Aspiración Biopsias |
| Cabeza y cuello | Aspirados Biopsias |
| Oculares - Endoftalmitis | Aspiración intraocular |
| ORL - Sinusitis - Otitis media crónica | Aspiración percutánea o por rinoscopia y material quirúrgico de los senos Torunda |
| Tracto respiratorio inferior - Neumonías - Empiema pleural | Catéter telescopado protegido Lavado broncoalveolar Punción pulmonar percutánea Toracocentesis |
| Aparato circulatorio - Bacteriemia - Endocarditis - Pericarditis | Hemocultivo Válvula, verruga Líquido pericárdico |
| Intraabdominales - Peritonitis y abscesos - Colecistitis - Heridas laparotómicas | Aspiración y cirugía Bilis tomada quirúrgicamente Tomas en profundidad |
| Tubo digestivo - Diarrea asociada a antimicrobianos - Intoxicación por <i>C. perfringens</i> | Heces Heces para toxina y recuento |
| Genitales femeninas | Cirugía Culdocentesis Aspiración (absceso Bartholino) Aspiración endometrial protegida DIUs (actinomycosis) |
| Urinarias | Punción suprapúbica |
| Osteoarticulares - Artritis - Osteomielitis | Aspiración Aspiración, cirugía, biopsia |
| Tejidos blandos | Aspiración percutánea Cirugía Tomas en profundidad |
| Relacionadas con alimentos - Intoxicación por <i>C. perfringens</i> - Botulismo | Alimento sospechoso (recuento) Alimento sospechoso (toxina, bacteria) |
| Botulismo | Alimento sospechoso (toxinas, cultivo) Suero (detección de las toxinas, no suele ser positiva en el lactante) Contenido gástrico y vómitos (toxinas) Heces (toxinas y cultivo) Material de heridas (cultivo) Muestras ambientales (bioterrorismo) Torundas nasales (bioterrorismo) |
| Tétanos | Material de la presunta puerta de entrada |

| | | | |
|---------------------------|-----------------------------|------------------|----------------|
| Servicio de Microbiología | Bacterias Anaerobias | Fecha: PNT-AN-01 | |
| Hospital..... | | Edición N° 01 | Página 5 de 12 |

petición, y condiciones adecuadas de transporte y conservación. Es necesario que cada laboratorio establezca y difunda a los servicios peticionarios sus propios requisitos de la aceptación de una muestra para estudio microbiológico.

El laboratorio de microbiología debe disponer también de un sistema de registro de estas incidencias en el que figure la muestra implicada, la persona que la recibe, el tipo de incidencia, la persona de contacto del servicio solicitante y la resolución de la incidencia (si la muestra no se procesa, si finalmente se decide su procesamiento y en qué condiciones, etc.).

Las incidencias más frecuentes en la llegada de una muestra al laboratorio de microbiología y las acciones a realizar (toma de decisiones) ante cada caso son las siguientes:

- Muestra deficientemente identificada: no se aceptará una muestra sin identificar, mal identificada o en la que no coincidan la identificación del volante de petición con la de la muestra. En cualquier caso se contactará con el servicio peticionario haciéndole conocer la necesidad de que procedan a la correcta identificación de la muestra. Si se puede recoger otra muestra, se solicitará nuevamente. Dependiendo de la importancia de la muestra, se puede optar a su procesamiento antes de la correcta identificación con el objeto de que no se deteriore la misma.

- Muestras derramadas: no se aceptarán muestras claramente derramadas y se solicitará una nueva muestra. En el caso de no ser posible la recogida de una nueva muestra, desinfectar externamente el envase o trasvasar la muestra a un contenedor estéril. En este caso, se indicará en el informe que la muestra estaba derramada y que los resultados deben ser interpretados con la debida precaución.

- Transporte/conservación inadecuados: una de las causas más frecuentes es la existencia de viales de anaerobiosis que han sido abiertos por lo que el oxígeno ha entrado en contacto con la muestra y ha virado el indicador resazurina a color violeta. En el caso de muestras que no se puedan volver a recoger (por ejemplo: muestras quirúrgicas) se puede optar por procesarlas informando por escrito al servicio solicitante de la incidencia en la recogida/transporte de la muestra y alertando de que los resultados obtenidos deben ser interpretados con la precaución correspondiente. En el caso de que el transporte deficiente invalide totalmente el estudio microbiológico (por ejemplo, muestras en formol), no se aceptarán estas muestras y se informará al servicio solicitante de la inadecuación de la muestra.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1. MEDIOS DE CULTIVO:

- Agar sangre (Nevera a 4°C)
- Agar chocolate (Nevera a 4°C)
- Agar MacConkey (Nevera a 4°C)
- Agar *Brucella* o agar Schaedler con 5% de

- sangre de carnero con vitamina K1 (1µg/ml) y hemina (5µg/ml) (Nevera a 4°C)
- Agar *Bacteroides bilis* esculina con amicacina (BBE) (Nevera a 4°C)
- Agar con alcohol fenil-etílico (PEA) (Nevera a 4°C)
- Agar Schaedler con neomicina (75µg/ml) y vancomicina (7,5µg/ml) (SNV) o con kanamicina (75 µg/ml) y vancomicina (7,5µg/ml) (SKV) (Nevera a 4°C)
- Agar sangre con 2,5 µg/ml de metronidazol (Nevera a 4°C)
- Agar con yema de huevo (AYE) (Nevera a 4°C)
- Agar TSI (Nevera a 4°C)
- Agar Thayer-Martin o Martin-Lewis (Nevera a 4°C)
- Agar Shepard AI (Nevera a 4°C)
- Medios de cultivo específicos para micobacterias (Nevera a 4°C)
- Caldo de tioglicolato sin indicador suplementado con vitamina K1 (200 µl) y hemina (20 µl). (Nevera a 4°C)
- Caldo PRAS PYG (Nevera a 4°C)

5.2. SOLUCIONES Y REACTIVOS:

- Tubos de agua destilada estéril (Temperatura ambiente)
- Tubos con solución estéril de Ringer lactato (Nevera a 4°C)
- Sistemas de identificación:
 - Discos de bilis (Nevera a 4°C)
 - Oxgall (Nevera a 4°C)
 - Desoxicolato sódico (Nevera a 4°C)
 - Discos de 5µg de vancomicina (Nevera a 4°C)
 - Discos de 1.000 µg de kanamicina (Nevera a 4°C)
 - Discos de 10µg de colistina (Nevera a 4°C)
 - Galerías de identificación de anaerobios (Nevera a 4°C)
 - Otros reactivos necesarios para la realización de las pruebas de identificación final

Reactivos para tinciones (Temperatura ambiente)
 Reactivos necesarios para las técnicas de detección de la enterotoxina de *Clostridium perfringens*
 Las condiciones de almacenamiento (temperatura, humedad, etc.) de los reactivos y medios de cultivo utilizados deben ser establecidas, controladas y revisadas.
 Se debe realizar, con periodicidad (semanal, mensual, trimestral, etc.) establecida por el propio laboratorio, una revisión de los materiales almacenados (cantidad, caducidades, estado general) con el fin de comprobar el estado de los mismos, verificando su correcta ubicación en los espacios identificados y definidos para ellos en el almacén y su aptitud para el uso (ver como ejemplo de formato el del Anexo 2, Revisión de almacén, PNT-RTP-01).

6. APARATOS Y MATERIAL

| | | | |
|---------------------------|-----------------------------|------------------|----------------|
| Servicio de Microbiología | Bacterias Anaerobias | Fecha: PNT-AN-01 | |
| Hospital..... | | Edición N° 01 | Página 6 de 12 |

Neveras (control diario de temperatura).
 Cámaras, jarras o bolsas de anaerobiosis (controles de anaerobiosis).
 Estufa de cultivo a 35°C (control diario de temperatura).
 Cabina de seguridad biológica (limpieza diaria después de su utilización).
 Microscopio óptico (limpieza después de su utilización).
 Centrífuga.
 Congeladores de -20° C y - 80° C.
 Cromatógrafo gas-liquido

Otro material necesario:

Asas desechables
 Portas
 Cubres
 Tubos pequeños estériles
 Guantes
 Papel de filtro
 Clorogel y lejía
 Papel de manos
 Otros

Al finalizar cada jornada de trabajo, revisar y reponer los productos y el material necesario para el trabajo del día siguiente. Semanalmente, por escrito, solicitar al supervisor el material fungible que precise ser repuesto.

De manera periódica (preferiblemente a diario) debe controlarse la temperatura (y humedad/presión de CO₂ si fuera necesario) de cada estufa/nevera/congelador al inicio de la jornada de trabajo con un termómetro situado permanentemente en el centro de cada equipo. El termómetro debe permitir la medida de la temperatura máxima y mínima alcanzadas. Se anotará en la hoja de registro de temperatura de cada aparato (como ejemplo se propone la del Anexo 3, Registro de temperatura, PNT-RTP-01) y en el caso de temperaturas mínima o máxima fuera del rango de aceptación, anotar la incidencia y realizar las acciones frente a esa variación. Estas acciones, por un lado, deben asegurar los resultados derivados de los cultivos y por otro corregir esa desviación.

Se sugieren los siguientes intervalos de aceptación:

- estufas de 35-37°C se acepta una mínima superior o igual a 34° C y máxima inferior o igual a 37,5°C.

- para las neveras el intervalo de tolerancia que se acepta es generalmente de 2° - 8° C, aunque puede variar en función de los reactivos que contengan.

Todos los termómetros utilizados en la medida de temperaturas de los aparatos se han de verificar mediante un termómetro de referencia calibrado. Se introducirá el termómetro utilizado para la medición de la temperatura y el termómetro calibrado en el equipo correspondiente (nevera, congelador o estufa) durante un mínimo de 15 minutos. Se aceptarán aquellos termómetros cuyas desviaciones

no sobrepasen los límites establecidos para cada uso concreto. La periodicidad de la verificación de los termómetros con el termómetro calibrado debe ser establecida por el propio laboratorio.

Existen sistemas automáticos para el control de la temperatura, humedad, presión de CO₂, etc., que controlan de una manera permanente (en intervalos de 15-20 minutos) los anteriores parámetros con gran fiabilidad y que utilizan sondas de referencia verificadas por organismos certificados. Estos sistemas alertan de las desviaciones que se producen de una manera más rápida que el control manual, controlan todos los equipos del laboratorio y generan los informes de estos parámetros.

7. PROCESAMIENTO

7.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Procesar la muestra atendiendo a las normas del Procedimiento de Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica (documento 10, SEIMC). Es aconsejable procesar la muestra durante los primeros 15 minutos tras su recepción. Idealmente, utilizar una cámara de anaerobios para el procesamiento de la muestra. Previamente al cultivo, homogeneizar las muestras tanto líquidas o purulentas (vórtex) como sólidas (troceando el material con ayuda de un bisturí o triturándolo en 1 ml de caldo mediante un mortero). Cuando la muestra se ha recogido en torunda, exprimir ésta en un pequeño volumen de caldo mediante movimientos rotatorios sobre las paredes del tubo.

7.2. INOCULACIÓN DE LA MUESTRA

Una vez homogeneizada la muestra depositar una gota del material purulento, o bien, 2-3 gotas si no es purulento, en cada uno de los medios de cultivo, una gota en un portaobjetos para la tinción de Gram y el resto en el medio de enriquecimiento.

7.3. EXAMEN DIRECTO

7.3.1. Examen macroscópico. Consiste en observar ciertas características como presencia de mal olor (productos metabólicos), fluorescencia roja con luz ultravioleta (protoporfirina de especies pigmentadas de *Prevotella* o *Porphyromonas*), presencia de sangre, color negruzco (anaerobios pigmentados), necrosis, gas, gránulos de azufre (*Actinomyces* spp. y *Propionibacterium propionicum*), pus, etc.

7.3.2. Examen microscópico. Mediante la tinción de Gram.

7.4. CULTIVO DE LA MUESTRA

La mayoría de las bacterias anaerobias requieren para su crecimiento vitamina K₁ y hemina. Es aconsejable utilizar una combinación de medios enriquecidos no selectivos, selectivos y diferenciales, entre los que se incluyen:

- Agar Brucella o agar Schaedler con sangre de cordero, vitamina K₁ y hemina: son medios enriquecidos no selectivos.

- Agar *Bacteroides* bilis esculina con amikacina

| | | | |
|---------------------------|-----------------------------|------------------|----------------|
| Servicio de Microbiología | Bacterias Anaerobias | Fecha: PNT-AN-01 | |
| Hospital..... | | Edición N° 01 | Página 7 de 12 |

(BBE): es un medio selectivo y diferencial que permite el crecimiento y diferenciación de *Bacteroides* del grupo *fragilis* que produce colonias que viran el medio a un color negrozco. También pueden crecer otras especies aunque se distinguen de los anteriores por producir colonias más pequeñas con un diámetro inferior a 1 mm.

- Agar con alcohol fenil-etílico (PEA): es un medio selectivo que inhibe el crecimiento de los bacilos gramnegativos facultativos y el crecimiento en forma de velo de algunos clostridios.

- Agar Schaedler con neomicina o kanamicina y vancomicina: es un medio selectivo para *Bacteroides* grupo *fragilis* y algunas especies de *Prevotella*.

- Agar con yema de huevo (AYE): medio selectivo y diferencial para especies del género *Clostridium*.

- Caldo de tioglicolato sin indicador suplementado con vitamina K₁ y hemina: utilizado como medio de enriquecimiento o de mantenimiento.

- Medios para aerobios y facultativos.

Cada laboratorio debe realizar una vigilancia de la calidad de los medios de cultivo que utiliza, tanto de los preparados en el propio laboratorio (aparición, crecimiento/inhibición, esterilidad) como de los que se adquieren comercialmente.

El laboratorio debe solicitar al proveedor de medios de cultivo los certificados de los controles de calidad donde deben estar incluidas las características físicas y químicas que definen al medio de cultivo. Esos certificados deben conservarse en el laboratorio. Asimismo, se deberán realizar controles de calidad a los medios adquiridos comercialmente. El propio laboratorio debe elegir tanto la periodicidad como la selección de los medios a los que realizar el control de calidad en función del tipo de medios que utilice, la variedad y los datos históricos de la conformidad de los controles realizados por el laboratorio con las características que el proveedor facilite: un medio estable y que no haya ocasionado problemas de crecimiento según registros previos se debe controlar menos que uno que sea menos estable y haya ocasionado problemas en su uso. El laboratorio debe generar registros de este control de medios adquiridos de proveedores y conservar estos registros para poder evaluar los medios y reconsiderar permanentemente el control de calidad de los mismos. Como ejemplo de formato para el registro de control de medios adquiridos comercialmente se propone el formato del Anexo 4 (Control de medios preparados, PNT-RTP-01). Con este control no sólo se evalúa la conformidad del laboratorio con los medios que adquiere ya preparados sino que también se evalúan las condiciones de procesamiento, estufas y atmósferas utilizadas.

Para el control de los medios se deben utilizar preferentemente cepas de colección (ATCC, CECT u otras colecciones) pero en el caso de no tener acceso a estas cepas se podrán utilizar cepas aisladas en el propio laboratorio con características

perfectamente definidas.

7.5. INCUBACIÓN DE LA MUESTRA

Inmediatamente después de realizar la siembra en las placas incubárlas en atmósfera anaerobia (cámaras, jarras o bolsas de anaerobios) a 35-37° C. Las placas incubadas en cámara de anaerobios se pueden examinar a las 24 horas de incubación mientras que las placas incubadas en jarras o bolsas deben mantenerse 48 horas antes de examinarlas. Medios selectivos como el de BBE para *Bacteroides* grupo *fragilis* o el de AYE para clostridios se pueden examinar a las 24 horas, ya que ambos microorganismos crecen rápidamente. Se aconseja mantener las placas no selectivas, incluidas aquellas con crecimiento de colonias, un mínimo de 7 días para facilitar la recuperación de los crecedores lentos (*Actinomyces*, *Porphyromonas*, *Propionibacterium*, *Bilophila*, etc). Se recomienda reincubar aquellos caldos de enriquecimiento que no muestren turbidez un total de 10 días. En el diagnóstico de la actinomicosis el tiempo de incubación debe ser mayor, generalmente entre las 2 y las 4 semanas. Incubar en CO₂ y ambiente las placas para aerobios y facultativos.

7.6. PROCESAMIENTOS ESPECIALES

7.6.1. Líquidos orgánicos. Inocularlos en frascos de hemocultivos aerobios y anaerobios reservando un pequeño volumen para la tinción de Gram. A diferencia de otros líquidos, los líquidos amnióticos y fluidos obtenidos por culdocentesis no necesitan centrifugarse antes de la tinción de Gram. El periodo de incubación varía de 5 a 7 días dependiendo del sistema de cultivo utilizado. 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 aunque sí lo pueden ser los abscesos cerebrales, los empiemas subdurales y los abscesos epidurales.

7.6.2. Catéter telescópico. Cortar el cepillo y colocarlo en un tubo que contenga 1 ml. de solución estéril de Ringer lactato. Agitar en el vórtex durante 30 segundos y preparar dos diluciones seriadas al 1/100 en Ringer lactato. Sembrar 0,1 ml de cada una de las dos diluciones en agar sangre, agar MacConkey, agar chocolate, y en medios selectivos y no selectivos para anaerobios.

7.6.3. Lavado broncoalveolar. Agitar en el vórtex durante 30 segundos 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 telescópico.

7.6.4. Heces para el diagnóstico de toxoinfección de *Clostridium perfringens*. Realizar la detección de la enterotoxina en heces a través de técnicas de aglutinación pasiva reversa mediante látex (Oxoid) o ensayo inmunoensayo (TechLab), o bien, mediante ensayos específicos de citotoxicidad en cultivos celulares de células Vero de acuerdo a las instrucciones del sistema utilizado.

| | | | |
|---------------------------|-----------------------------|------------------|----------------|
| Servicio de Microbiología | Bacterias Anaerobias | Fecha: PNT-AN-01 | |
| Hospital..... | | Edición N° 01 | Página 8 de 12 |

7.6.5. 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 15-20 ml de suero, 25-50 gramos de 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. En el botulismo inhalatorio se ha de obtener suero, contenido gástrico, heces, torundas nasales del individuo y el material sospechoso de contener las esporas del agente etiológico. 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 posterior procesamiento.

7.6.6. Diagnóstico de angina de Vincent. El cultivo no es útil para el diagnóstico de esta enfermedad. El diagnóstico siempre ha de realizarse mediante los hallazgos clínicos y una tinción de Gram de las úlceras bucales tomadas en torunda en la que aparezcan espiroquetas, bacilos fusiformes y leucocitos polimorfonucleares.

7.6.7. Diagnóstico de actinomicosis. El diagnóstico de la actinomicosis debe basarse, en primer lugar y cuando estén presentes, en la observación microscópica de los gránulos de azufre (0, 1-5 mm) obtenidos de muestras afectadas como tejidos, lavados bronquiales, líquidos corporales, dispositivos intrauterinos o exudados purulentos. Estos gránulos tienen un borde irregular debido a la acumulación de bacterias bacilares perteneciente al género *Actinomyces*. Con una tinción de Gram se observan bacilos grampositivos en forma de garrote normalmente ramificados y que deben ser diferenciados de otros microorganismos como *Nocardia* spp. o *Streptomyces* spp. El cultivo para *Actinomyces* spp. de los gránulos de azufre o, ante su ausencia, de las muestras sospechosas debe especificarse en el volante de la muestra ya que requiere un pretratamiento especial y una incubación prolongada. Deben utilizarse los medios de cultivo sólidos y líquidos habituales para el cultivo de microorganismos anaerobios aunque éstos deben ser lo más frescos posible. Cuando se trate de gránulos de azufre o de muestras sólidas éstas deben triturarse en medio de enriquecimiento líquido y el triturado debe sembrarse en una placa de agar sangre para anaerobios, en una placa de agar PEA y en un caldo de enriquecimiento. Los medios de cultivo deben incubarse en ambiente anaerobio a 35-37° C durante un periodo mínimo de 7 días que puede ser extendido hasta las 2-4 semanas. Cuando se trate de muestras ricas en microflora como las muestras genitales o los dispositivos intrauterinos es recomendable hacer diluciones de 1:10 a 1:10.000

de la muestra y sembrar las diluciones en agar sangre Columbia con y sin metronidazol a una concentración de 2,5 µg/ml. Todas las especies de *Actinomyces* con excepción del anaerobio estricto *A. meyeri* son anaerobios facultativos. La morfología de las colonias de *Actinomyces* spp. varía de una aspecto liso a una apariencia molar dependiendo de ciertos factores como el tipo de medio de cultivo, las condiciones de cultivo y la edad de las colonias. El aspecto de las bacterias con la tinción de Gram también puede ser variable observándose desde bacilos grampositivos ramificados a formas cocoides. La diferenciación de las especies de *Actinomyces* es difícil aún utilizando los sistemas de identificación comerciales.

7.6.8. Diagnóstico de las infecciones endometriales. Obtener muestra de tejido endometrial mediante una cánula de aspiración en condiciones de anaerobiosis y evitando la contaminación con la flora vaginal. La obtención de una muestra con un hisopo no es recomendable ya que los agentes causales de la infección suelen encontrarse dentro del tejido. Una vez obtenida la muestra, ésta debe introducirse en un medio de transporte anaeróbico y procesarse lo más rápidamente posible. La muestra de endometrio debe triturarse en caldo de cultivo y la mezcla resultante debe sembrarse en medio habituales para el cultivo de microorganismos aerobios y anaerobios, y en medios específicos de bacterias aerobias productoras de infecciones endometriales como agar Thayer-Martin o Martin-Lewis, agar Shepard AI o medios específicos para micobacterias. Los cultivos para anaerobios deben incubarse un mínimo de 7 días antes de descartarlos como estériles.

7.6.9. Diagnóstico de la enterocolitis del neutropénico. Extraer 3 tandas de hemocultivos tomadas de diferentes zonas de venopunción, un mínimo de 25 gramos o mililitros heces y muestras de lumen o de tejido del área ileocecal afectada recogidos durante la intervención quirúrgica o la autopsia y transportados en medios para anaerobios. Cuando se sospeche de mionecrosis u otra forma de infección progresiva debe también tomarse una biopsia o aspirado del músculo afectado. Sembrar en medios habituales de microorganismos anaerobios e identificar los aislados según los procedimientos habituales para microorganismos anaerobios.

7.7. EXAMEN DE LOS CULTIVOS Y AISLAMIENTO
Examinar los cultivos, seleccionar todas las colonias morfológicamente distintas y realizar, a partir de cada colonia distinta, un subcultivo en un medio para anaerobios no selectivo (atmósfera anaerobia) y en un medio de agar chocolate (atmósfera aerobia enriquecida con CO₂), e incubar durante 48 horas a 35°C. Cuando se trate de cultivos de catéteres telescopados o de lavados broncoalveolares, seleccionar sólo las colonias con recuentos significativos (10³ ó 10⁴ UFC/ml, respectivamente).

Seleccionar los subcultivos que crezcan sólo

| | | | |
|---------------------------|-----------------------------|------------------|----------------|
| Servicio de Microbiología | Bacterias Anaerobias | Fecha: PNT-AN-01 | |
| Hospital..... | | Edición N° 01 | Página 9 de 12 |

en el medio anaerobio (anaerobios estrictos) y aquellos subcultivos que también crezcan en medio aerobio débilmente y con características morfológicas sugestivas de anaerobios aerotolerantes (*Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, algunos clostridios).

En el caso de que en los cultivos primarios no se aislen microorganismos anaerobios y el caldo de enriquecimiento aparezca turbio, realizar un subcultivo de éste tanto en medios aerobios como en medios anaerobios no selectivos. Si, por el contrario, el caldo no está turbio, realizar un pase ciego a los 10 días de incubación.

7.8. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS ANAEROBIOS

7.8.1. Identificación preliminar. Realizar una tinción de Gram de cada uno de los aislados anaerobios. Ya que algunas especies de anaerobios retienen el colorante con mucha variabilidad, el resultado de la tinción de Gram puede ser dudoso. En estos casos, y cuando las características coloniales no ayuden a resolver esta duda, es recomendable realizar un subcultivo en un medio no selectivo con un disco de 5µg de vancomicina para diferenciar los grampositivos (sensibles) de los gramnegativos

(resistentes). Cuando se trate de bacilos gramnegativos, realizar la prueba de la bilis (ver apartado 10), y otro subcultivo en un medio no selectivo al que se se colocarán 3 discos de antibióticos que contengan, respectivamente, 5µg de vancomicina, 1.000 µg de kanamicina y 10µg de colistina. Con los resultados de la identificación preliminar anterior, informar al clínico siguiendo la siguiente clasificación:

- Cocos grampositivos anaerobios.
- Bacilos grampositivos anaerobios. Entre éstos se puede discriminar entre *Clostridium* spp., cuando se observen esporas o una morfología típica de *C. perfringens*, o *Propionibacterium* spp., cuando se observe la morfología característica y una catalasa positiva.
- Cocos gramnegativos anaerobios. Pueden ser informados también como *Veillonella* spp. ya que este es el género más frecuentemente encontrado en clínica.
- Bacilos gramnegativos. Es recomendable clasificarlos en 5 subgrupos atendiendo a las pruebas de la resistencia a la bilis y de la sensibilidad a los discos de antibióticos de acuerdo al siguiente esquema:

| Subgrupo | Bilis-resistencia | Sensibilidad | | |
|--|-------------------|----------------|----|----|
| | | Va | Ka | Co |
| <i>Bacteroides</i> grupo <i>fragilis</i> | Sí | R | R | R |
| BGNA grupo <i>Prevotella/Porphyromonas</i> | No | V ¹ | R | V |
| <i>Fusobacterium</i> spp. ² | No | R | S | S |
| BGNA grupo <i>Bacteroides ureolyticus/Campylobacter</i> ² | No | R | S | S |
| BGNA grupo <i>Bilophila/Sutterella</i> | Sí | R | S | S |

Aunque la sensibilidad a la vancomicina puede diferenciar ambos géneros (*Prevotella* spp.: vancomicina R.; *Porphyromonas* spp.: vancomicina S), se recomienda informar preliminarmente de una forma agrupada atendiendo a la pigmentación de las colonias ya que el lento crecimiento de estos microorganismos puede retrasar varios días la información.

²La diferenciación presuntiva de ambos grupos ha de basarse en características morfológicas de la cepa.

Abreviaturas: BGNA, bacilo gramnegativo anaerobio; Va, vancomicina; Ka, kanamicina; Co, colistina; S, sensible; V, con sensibilidad variable; R, resistente.

7.8.2. Identificación final. El grado de exactitud en la identificación de los aislados anaerobios depende en buena medida de los recursos de cada laboratorio. Idealmente, se deberían realizar las siguientes pruebas: estudio de la capacidad de producir indol, capacidad de descomponer el H₂O₂, otras pruebas específicas de cada uno de los grupos tal y como se detallarán en la descripción de éstos, estudio de la capacidad sacarolítica y/o proteolítica (pruebas manuales o

bioMerieux), o bien, estudio de la dotación enzimática (pruebas manuales o sistemas comerciales, como el API ZIM o el ATB32A, bioMerieux) y, por último, la detección de los productos finales del metabolismo bacteriano mediante cromatografía gas-líquida (ver apartado 10). Atendiendo a estas pruebas, el esquema de clasificación de cada uno de los 5 grupos de bacterias anaerobias será el siguiente:

sistemas comerciales, como el API20A,

7.8.2.1. Cocos grampositivos anaerobios

| Producto metabolismo | Prueba del indol | Especies ¹ |
|----------------------|------------------|---|
| Ácido acético | | <i>Fingoldia magna</i> <i>Micromonas micros</i> |
| Ácido butírico | Negativa | <i>Anaerococcus (Peptostreptococcus) prevotii</i> <i>Anaerococcus (Peptostreptococcus) tetradius</i> <i>Anaerococcus (Peptostreptococcus) lactolyticus</i> <i>Anaerococcus (Peptostreptococcus) vaginalis</i> <i>Peptoniphilus (Peptostreptococcus) lacrimalis</i> ² |

| | | | |
|---------------------------|-----------------------------|------------------|-----------------|
| Servicio de Microbiología | Bacterias Anaerobias | Fecha: PNT-AN-01 | |
| Hospital..... | | Edición N° 01 | Página 10 de 12 |

| | | |
|--|----------|---|
| | | <i>Peptoniphilus (Peptostreptococcus) ivorii</i> |
| Ácido butírico | Positiva | <i>Peptoniphilus (Peptostreptococcus) indolicus</i> ² <i>Peptoniphilus (Peptostreptococcus) asaccharolyticus</i> ² <i>Peptoniphilus (Peptostreptococcus) hare</i> ² <i>Anaerococcus (Peptostreptococcus) vaginalis</i> <i>Anaerococcus (Peptostreptococcus) hydrogenalis</i> |
| Ácido isocaproico y otros ácidos orgánicos | | <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> |
| Ácido caproico y otros ácidos orgánicos | | <i>Anaerococcus (Peptostreptococcus) octavius</i> |

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

² O Schleiferella

7.8.2.2. Bacilos grampositivos anaerobios:

- *Clostridium* spp.:

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

| | | | |
|---------------------------|-----------------------------|------------------|-----------------|
| Servicio de Microbiología | Bacterias Anaerobias | Fecha: PNT-AN-01 | |
| Hospital..... | | Edición Nº 01 | Página 11 de 12 |

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

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

7.8.2.3. Cocos gramnegativos anaerobios:

- *Veillonella* spp.: nitratos (+)

- *Acidaminococcus* spp.: nitratos (-) y producción de ácido butírico

- *Megasphaera* spp.: nitratos (-) y producción de ácido caproico

7.8.2.4. 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

- BGNA grupo *Bacteroides ureolyticus/Campylobacter*: nitratos (+)

- *B. ureolyticus*: ureasa (+)

- *Campylobacter* (*Bacteroides*) *gracilis*: ureasa (-), inmóvil

- *Campylobacter* (*Wolinella*) *rectus*: ureasa (-), móvil

- BGNA grupo *Bilophila/Sutterella*:

- *Bilophila wadsworthia*: catalasa (+)

- *Sutterella wadsworthensis*: catalasa (-)

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Una vez realizada la identificación preliminar de los aislados anaerobios y, en su caso, la identificación definitiva de los aislados aerobios, registrar los resultados en el programa de gestión del laboratorio e imprimir el informe definitivo. Una vez impresos todos los informes positivos, el facultativo responsable debe revisarlos y firmarlos. Repetir el proceso cuando se obtengan las identificaciones finales de los microorganismos anaerobios. Cuando se obtengan resultados cuyo conocimiento precoz por parte del clínico sea importante en el manejo del paciente, informar telefónicamente el resultado anotando en un registro la persona que recibe la información.

Después de enviar la información hacia las áreas de hospitalización o centros de salud correspondientes, anotar todos los resultados en el Libro de Registro del laboratorio y en la hoja diaria. Guardar ordenados en archivadores todos los protocolos de trabajo significativos.

Se recomienda archivar, al menos, las cepas de los microorganismos anaerobios más significativos, especialmente las especies de *Bacteroides* grupo *fragilis* para la realización periódica de pruebas de

sensibilidad a antimicrobianos.

9. RESPONSABILIDADES

Los técnicos de laboratorio serán los responsables de la realización de los procedimientos, de realizar, cuando sea necesario, el informe preliminar verbal de los resultados y de emitir el informe escrito tanto preliminar como definitivo.

El facultativo tendrá bajo su responsabilidad la interpretación de los resultados y la validación de todos los informes emitidos.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Prueba de la resistencia a la bilis. Se puede realizar siguiendo uno de los siguientes procedimientos:

- Prueba en disco. Realizar un subcultivo del microorganismo en un medio sólido enriquecido no selectivo y colocar un disco de bilis sobre la primera descarga. Incubar anaeróticamente durante 24-48 horas. El microorganismo será resistente a la bilis cuando no exista halo de inhibición.

- Prueba en agar BBE. Realizar un subcultivo en agar BBE. Incubar anaeróticamente durante 24-72 horas. El microorganismo será resistente a la bilis en el caso de que sea capaz de crecer en el medio siempre y cuando no produzca colonias mucho más pequeñas que las producidas en un medio no selectivo. Este test sólo está recomendado cuando se sospeche de especies de *Bacteroides* grupo *fragilis* o *Bilophila* spp. ya que este medio tiene ciertas sustancias que pueden inhibir el crecimiento de otras especies.

- Prueba en caldo. Inocular 2 tubos de medio líquido (caldo tioglicolato o caldo PRAS PYG), uno suplementado con Oxgall al 2% y desoxicolato sódico al 0,1% y otro sin suplementar, con 2 gotas de un cultivo líquido del microorganismo en crecimiento exponencial. Incubar ambos tubos hasta que el tubo sin suplementar muestre turbidez. Se considerará resistente a la bilis cuando el tubo con suplemento con Oxgall muestre una turbidez al menos similar que la del tubo control.

Análisis de los productos finales del metabolismo mediante cromatografía gas-líquida:

- Inocular varias colonias del microorganismo a estudiar en un medio líquido e incubar hasta que se obtenga abundante crecimiento

- Añadir dos gotas de H₂SO₄ al 50% a 5 ml. del cultivo (pH ≅ 2), centrifugar, y recoger el sobrenadante.

- Extracción de los ácidos grasos volátiles:

- Separar 1ml. del sobrenadante (en tubo de cristal)

- Añadir 0.2ml. de H₂SO₄ al 50% y 0,4 g de NaCl

- Añadir 1ml. de éter (tapar y mezclar bien invirtiendo el tubo 20 veces)

- Centrifugar brevemente para separar la capa de éter

Si el cromatógrafo utilizado está equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna

| | | | |
|---------------------------|-----------------------------|------------------|-----------------|
| Servicio de Microbiología | Bacterias Anaerobias | Fecha: PNT-AN-01 | |
| Hospital..... | | Edición Nº 01 | Página 12 de 12 |

SP-1220, se puede prescindir de esta extracción e utilizar directamente el sobrenadante del cultivo

- Extracción de los ácidos grasos no volátiles:
 - Separar 1 ml. del sobrenadante (en tubo de cristal)
 - Añadir 0.2 ml. de H₂SO₄ al 50% y 1 ml. de metanol. Tapar y mezclar bien
 - Colocar a baño o bloque de calor a 60°C durante 30 minutos
 - Dejar enfriar
 - Añadir 0.5ml. de cloroformo (tapar y mezclar bien invirtiendo el tubo 20 veces)
 - Centrifugar brevemente para separar la emulsión
 - Eliminar con una pipeta parte de la capa acuosa
 - Usando la jeringa de inyección aspirar directamente el cloroformo que se encuentra en el fondo del tubo.

Inyectar 1 µl del extracto correspondiente en la columna del cromatógrafo para separar e identificar los productos extraídos.

11. LIMITACIONES

Por razones de extensión de este procedimiento, no se describen las técnicas utilizadas para la identificación definitiva de los microorganismos anaerobios. Esta descripción se encontrará en la bibliografía citada a continuación.

12. BIBLIOGRAFÍA

- 1- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition. American Society for Microbiology, Washington, D.C.; 2003.
- 2- Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. American Society for Microbiology, Washington, D.C.; 1992, 1997.
- 3- Jousimies-Somer HR, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler HM, Finegold SM. Wadsworth –KTL Anaerobic Bacteriology Manual. Star Publishing Company. Belmont, C.A.; 2002.
- 4- Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica (Procedimiento 10). Procedimientos en microbiología clínica. SEIMC, 2000. En: <http://www.seimc.org/>.
- 5- Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología (PNT-RTP-01). SEIMC, 2003. En: <http://www.seimc.org/>.
- Hemocultivos (PNT-HC-01). SEIMC, 2003. En: <http://www.seimc.org/>.

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT-AN-02
PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE DIARREA O COLITIS ASOCIADA A
Clostridium difficile

| ELABORADO | | REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio | |
|--------------|-------|---|-------|
| Nombre/Firma | Fecha | Nombre/Firma | Fecha |
| | | | |

| EDICIÓN | FECHA | ALCANCE MODIFICACIONES |
|---------|-------|------------------------|
| 01 | | Edición inicial |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |

COPIA REGISTRADA Nº.ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

| | | | |
|---------------------------|-------------------------------------|------------------|---------------|
| Servicio de Microbiología | <i>Clostridium difficile</i> | Fecha: PNT-AN-02 | |
| Hospital..... | | Edición N° 01 | Página 2 de 7 |

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es normalizar el procesamiento de muestras para el diagnóstico microbiológico de la diarrea o colitis asociada al uso de antibióticos producida por *Clostridium difficile* toxigénico. Su aplicación se extiende desde la extracción de las muestras, hasta la detección de las toxinas de *C. difficile*. Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de hospitales, centros de salud o cualquier laboratorio que realice determinaciones de microbiología clínica.

2. FUNDAMENTO

Clostridium difficile es la causa más frecuente de diarrea y colitis asociada al uso previo de antibióticos en el ambiente hospitalario. Su incidencia está alrededor de los 10 casos por 1.000 admisiones. Las toxinas implicadas son la toxina A o enterotoxina y la toxina B o citotoxina. El diagnóstico se basa en la detección de las toxinas a partir de heces, lumen o biopsias del intestino grueso. No se recomienda el análisis sobre heces sólidas ya que la sensibilidad queda disminuida y por la existencia de portadores sanos de *C. difficile* toxigénico. El procedimiento diagnóstico más sensible es el denominado cultivo toxigénico, es decir, el ensayo de citotoxicidad de la toxina B en líneas celulares de los aislados de *C. difficile* recuperados del cultivo. Sin embargo, es recomendable realizar a la vez un ensayo de citotoxicidad directa sobre las heces ya que aumenta la sensibilidad de la técnica en un 5% y reduce el tiempo medio necesario para el diagnóstico de la enfermedad. Para aquellos laboratorios que carezcan de las infraestructuras necesarias para la realización del ensayo de citotoxicidad, o bien, en casos en los que sea urgente el diagnóstico, hay disponibles sistemas comerciales para la detección rápida de toxina A ó A+B.

3. DOCUMENTACIÓN DE CONSULTA

Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica (Procedimiento 10). Procedimientos en microbiología clínica. SEIMC, 2000.

Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología (PNT-RTP-01). SEIMC, 2003.

Procedimientos específicos para cada tipo de técnica.

4. RECOGIDA Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

4.1. SELECCIÓN Y OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

El tipo de muestra necesario para el diagnóstico de diarrea o colitis asociada a *C. difficile* son heces líquidas o no formadas, contenido de lumen o biopsias del intestino grueso de pacientes con síntomas de la enfermedad. El volumen de muestra de heces debe ser de 5-20 ml.

4.2. TRANSPORTE DE LA MUESTRA

Una vez obtenida la muestra, debe transportarse en

un recipiente estéril sin ningún medio con conservante. Las torundas rectales no están recomendadas salvo para estudios epidemiológicos. Rellenar un volante para cada muestra. Es necesario indicar en los volantes el nombre del paciente, el servicio donde se encuentra ingresado, el número de cama y el número de teléfono del control de enfermería. Sería deseable añadir en los volantes otra información que ayudara a la valoración del cultivo en el laboratorio como el tratamiento antibiótico previo a la toma de muestras, la enfermedad de base del paciente, el síndrome clínico que padece en el momento actual y si la infección es de adquisición nosocomial o comunitaria.

Introducir la muestra con su respectivo volante en una bolsa de plástico y enviarla al laboratorio de Microbiología. El tiempo máximo recomendado para el transporte de la muestra dependerá de la temperatura de ésta durante el envío desde el lugar de la extracción hasta el laboratorio de Microbiología:

- Temperatura ambiente: 1 hora.
- Refrigerada a 2-8° C: 24 horas.
- Congelada a -20° C: más de 24 horas.

4.3. RECEPCIÓN Y REGISTRO DE LAS MUESTRAS

Una vez haya llegado la muestra al laboratorio anotar la fecha y hora de recepción, asignar a la muestra un número del registro general del laboratorio de Microbiología y comprobar que cumple los requisitos para su aceptación. Los volantes pasarán a Secretaría para su registro en el sistema de gestión del laboratorio.

4.4. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO DE LAS MUESTRAS. ACCIONES A REALIZAR

El laboratorio de microbiología debe determinar, una vez recibida la muestra en el laboratorio, si esta cumple con los requisitos para ser procesada. Estos requisitos incluyen entre otros, una correcta identificación, una correcta consistencia diarreica de la muestra y condiciones adecuadas de transporte y conservación. Es necesario que cada laboratorio establezca y difunda a los servicios peticionarios sus propios requisitos de la aceptación de una muestra para estudio microbiológico.

El laboratorio de Microbiología debe disponer también de un sistema de registro de estas incidencias en el que figure la muestra implicada, la persona que la recibe, el tipo de incidencia, la persona con la que se contacta del servicio solicitante y la resolución de la incidencia (si la muestra no se procesa, si finalmente se decide su procesamiento y en qué condiciones, etc.).

Las incidencias más frecuentes en la llegada de una muestra al laboratorio de microbiología y las acciones a realizar (toma de decisiones) ante cada caso son las siguientes:

- Heces sólidas: la muestra será automáticamente rechazada y se solicitará otra inmediatamente.

| | | | |
|---------------------------|-------------------------------------|------------------|---------------|
| Servicio de Microbiología | <i>Clostridium difficile</i> | Fecha: PNT-AN-02 | |
| Hospital..... | | Edición N° 01 | Página 3 de 7 |

- Muestra deficientemente identificada: no se aceptará una muestra sin identificar, mal identificada o en la que no coincidan la identificación del volante de petición con la de la muestra. En cualquier caso se contactará con el servicio peticionario haciéndole conocer la necesidad de que procedan a la correcta identificación de la muestra. Si se puede recoger otra muestra, se solicitará nuevamente.

- Muestras derramadas: no se aceptarán muestras claramente derramadas y se solicitará una nueva muestra. Se procederá como en los casos anteriores solicitando una nueva muestra. En el caso de no ser posible la recogida de una nueva muestra, desinfectar externamente el envase o trasvasar la muestra a un contenedor estéril. En este caso, se indicará en el informe que la muestra estaba derramada y que los resultados deben ser interpretados con la debida precaución.

- Transporte/conservación inadecuados: En el caso de muestras que no se puedan volver a recoger se puede optar por procesarlas informando por escrito al servicio solicitante de la incidencia en la recogida/transporte de la muestra y alertando de que los resultados obtenidos deben ser interpretados con la precaución correspondiente.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1. MEDIOS DE CULTIVO

Agar Brucella o agar Schaedler con 5% de sangre de carnero con vitamina K1 (1 µg/ml) y hemina (5 µg/ml) (Nevera a 4°C)

Agar fructosa-cicloserina-cefoxitina (CCFA) o agar yema de huevo-cicloserina-cefoxitina (CCEY)

Caldo de tioglicolato sin indicador suplementado con vitamina K1 (200 µl) y hemina (20 µl) (Nevera a 4°C)

Monocapa de células de mamíferos susceptibles al efecto citopático de la toxina B (fibroblastos humanos, células MRC-5, células K-1 de ovario de hamster chino, etc.)

Medio de mantenimiento celular (EMEM, etc.)

5.2. REACTIVOS

PBS estéril (Nevera a 4°C)

Etanol (Temperatura ambiente)

Sistemas de identificación:

- Discos de prolina (Nevera a 4°C)
- p-dimetilaminocinnamaldehído (Nevera a 4°C)
 - Reactivos necesarios para la realización de la cromatografía gas-líquido

Reactivos para tinciones (Temperatura ambiente)

Reactivos necesarios para las técnicas de detección de la toxina A y/o B de *C. difficile*

Las condiciones de almacenamiento (temperatura, humedad, etc.) de los reactivos y medios de cultivo utilizados deben ser establecidas, controladas y revisadas.

Se deben realizar, con periodicidad (semanal, mensual, trimestral, etc.) establecida por el propio

laboratorio, una revisión de los materiales almacenados (cantidad, caducidades, estado general) con el fin de comprobar el estado de los mismos, verificando su correcta ubicación en los espacios identificados y definidos para ellos en el almacén y su aptitud para el uso (ver como ejemplo de formato el del Anexo 2, Revisión de almacén, PNT-RTP-01).

6. APARATOS Y MATERIAL

Neveras (control diario de temperatura).

Cámaras, jarras o bolsas de anaerobiosis (controles de anaerobiosis).

Estufa de cultivo a 35°C (control diario de temperatura).

Cabina de seguridad biológica (limpieza diaria después de su utilización).

Microscopio óptico (limpieza después de su utilización).

Microscopio de inversión (limpieza después de su utilización).

Congelador.

Cromatógrafo gas-líquido.

Otro material necesario

Filtros Millipore de 0,22 µm

Shell-vial

Tubos de 3 ml estériles

Asas desechables

Portas

Cubres

Guantes

Papel de filtro

Clorogel y lejía

Papel de manos

Otros

Al finalizar cada jornada de trabajo, revisar y reponer los productos y el material necesario para el trabajo del día siguiente. Semanalmente, por escrito, solicitar al supervisor el material fungible que precise ser repuesto.

De manera periódica (preferiblemente a diario) debe controlarse la temperatura de cada estufa/nevera/congelador al inicio de la jornada de trabajo con un termómetro situado permanentemente en el centro de cada equipo. El termómetro debe permitir la medida de la temperatura máxima y mínima alcanzadas. Se anotará en la hoja de registro de temperatura de cada aparato (como ejemplo se propone la del Anexo 3, Registro de temperatura, PNT-RTP-01) y en el caso de temperaturas mínima o máxima fuera del rango de aceptación, anotar la incidencia y realizar las acciones frente a esa variación. Estas acciones, por un lado, deben asegurar los resultados derivados de los cultivos y por otro corregir esa desviación.

Se sugieren los siguientes intervalos de aceptación:

- estufas de 35-37°C se acepta una mínima superior o igual a 34°C y máxima inferior o igual a 37,5°C.

| | | | |
|---------------------------|-------------------------------------|------------------|---------------|
| Servicio de Microbiología | <i>Clostridium difficile</i> | Fecha: PNT-AN-02 | |
| Hospital..... | | Edición N° 01 | Página 4 de 7 |

- para las neveras el intervalo de tolerancia que se acepta es generalmente de 2° - 8°C, aunque puede variar en función de los reactivos que contengan.

Todos los termómetros utilizados en la medida de temperaturas de los aparatos se han de verificar mediante un termómetro de referencia calibrado. Se introducirá el termómetro utilizado para la medición de la temperatura y el termómetro calibrado en el equipo correspondiente (nevera, congelador o estufa) durante un mínimo de 15 minutos. Se aceptarán aquellos termómetros cuyas desviaciones no sobrepasen los límites establecidos para cada uso concreto. La periodicidad de la verificación de los termómetros con el termómetro calibrado debe ser establecida por el propio laboratorio.

Existen sistemas automáticos para el control de la temperatura, humedad, presión de CO₂, etc., que controlan de una manera permanente (en intervalos de 15-20 minutos) los anteriores parámetros con gran fiabilidad y que utilizan sondas de referencia verificadas por organismos certificados. Estos sistemas alertan de los desvíos que se producen de una manera más rápida que el control manual, controlan todos los equipos del laboratorio y generan los informes de estos parámetros.

7. PROCESAMIENTO

7.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Procesar la muestra atendiendo a las normas del Procedimiento de Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica (documento 10, SEIMC). Es aconsejable procesar la muestra durante los primeros 15 minutos tras su recepción. Cuando no sea posible, procesar para cultivo en un máximo de 48 horas siempre que se conserve refrigerado a 2-8°, y procesar para ensayo de citotoxicidad en un máximo de 72 horas cuando se conserve refrigerado (para periodos mayores hay que congelar las muestras a temperaturas entre -60 y -80°C). Homogeneizar las muestras líquidas y semilíquidas con ayuda de un vórtex. Si se trata de biopsias, triturarlas en un medio líquido. Cuando la muestra se ha recogido en torunda, exprimir ésta en un pequeño volumen de caldo mediante movimientos rotatorios sobre las paredes del tubo. Actualmente, se recomienda realizar el denominado cultivo toxigénico, es decir, el ensayo de citotoxicidad de la toxina B en líneas celulares de los aislados de *C. difficile* recuperados del cultivo. Sin embargo, puede ser recomendable realizar a la vez un ensayo de citotoxicidad directa sobre las heces ya que aumenta la sensibilidad de la técnica en un 5% y reduce el tiempo medio necesario para el diagnóstico de la enfermedad

7.2. CULTIVO TOXIGÉNICO

7.2.1. Pretratamiento de las muestras. En ocasiones, las muestras necesitan un tratamiento previo al cultivo según la selectividad del medio de cultivo utilizado:

- No necesario pretratamiento: medios de cultivo selectivos como el agar CCFA (de elección) o el agar CCEY.

- Necesario pretratamiento: cuando se utilicen medios no selectivos como el agar Brucella o el agar Schaedler con 5% de sangre de carnero con vitamina K1 y hemina. La finalidad del pretratamiento es compensar la inexistencia de antibióticos selectivos en el medio de cultivo mediante la selección de esporas de *C. difficile* y la eliminación de los microorganismos acompañantes. Este pretratamiento consiste en añadir volúmenes iguales de muestra homogeneizada y alcohol absoluto en un tubo, mezclar bien y dejar actuar al alcohol durante un periodo de 30-60 minutos. Otra posibilidad es realizar un choque térmico a 80°C de las muestras homogeneizadas durante un periodo de 10 minutos aunque este procedimiento es menos efectivo. También es posible utilizar un medio de cultivo ligeramente selectivo como el medio CCEY que contiene una menor concentración de antibióticos que el agar CCFA.

7.2.2. Siembra de las muestras. La siembra de las muestras puede realizarse de alguna de las siguientes maneras:

- siembra cuantitativa: diluir 1 ml de homogeneizado (o de mezcla de homogeneizado con alcohol absoluto) con 9 ml de caldo de tioglicolato u otro caldo de enriquecimiento en tubos que contengan perlas de cristal, mezclar en vórtex durante unos 60 segundos hasta que la suspensión sea homogénea, realizar diluciones seriadas al 1:10 y sembrar 0,1 ml de las diluciones 10⁻¹, 10⁻³ y 10⁻⁵ en placas de agar. Tras 24-48 horas de incubación en ambiente anaeróbico a 37°C contar el número de colonias de *C. difficile* sólo en aquellas placas en las que el recuento esté entre 30 y 300 unidades formadoras de colonias (UFC). Realizar la inspección de las placas a las 24 horas de incubación sólo cuando éstas se incuben en cámaras de anaerobiosis, para los demás casos incubar las placas 48 horas. Calcular el número de UFC por ml multiplicando las UFC de cada una de las placas elegidas para el recuento por el factor de dilución y por 10 (por ejemplo, si hay 30 UFC en la placa sembrada con 0,1 ml de dilución 10⁻³, el número de UFC por ml será de 30x10³x10= 3x10⁵ UFC/ml). Cuando se parta de la mezcla de heces y alcohol multiplicar por dos el valor obtenido. En el caso de que haya varias placas elegidas para el recuento realizar una media aritmética de los valores de UFC/ml obtenidos para cada una de ellas.

- siembra semicuantitativa: inocular 0,1 gramos o 2-3 gotas de muestra homogeneizada (o de mezcla de homogeneizado con alcohol) en el primer cuadrante del medio de cultivo y realizar un total de 4 estrías en cada uno de los 4 cuadrantes de la placa. Incubar la placa al igual que en la siembra cuantitativa y cuantificar el resultado como 1+ (crecimiento sólo en el primer cuadrante), 2+ (primer

| | | | |
|---------------------------|-------------------------------------|------------------|---------------|
| Servicio de Microbiología | <i>Clostridium difficile</i> | Fecha: PNT-AN-02 | |
| Hospital..... | | Edición N° 01 | Página 5 de 7 |

y segundo cuadrante), 3+ (primer, segundo y tercer cuadrante) o 4+ (todos los cuadrantes). El grado de cuantificación de +4 suele corresponderse con un recuento real de 10^5 UFC/ml.

- siembra cualitativa: sembrar 0,1 gramos o 2-3 gotas de muestra homogeneizada (o de mezcla de homogeneizado con alcohol) en el medio de cultivo e incubar la placa de igual manera que en los casos anteriores. Informar el cultivo como crecimiento o ausencia de crecimiento de *C. difficile*.

7.2.3. Aislamiento e identificación. Las colonias de *C. difficile* en agar CCFA tienen unos 4 mm de diámetro y son amarillas, con aspecto de vidrio esmerilado, circulares, con un perfil en forma de botón o lisas y que viran el color rosa-anaranjado del medio a un color amarillo. Además, las colonias producen p-cresol que recuerda al olor de las cuadras. Las colonias en agar CCEY son grises en un primer momento y con el centro blanquecino cuando se reincuban tiempos más prolongados, son fluorescentes con un color verde-amarillento brillante al ser expuestas a luz UV de longitud de onda larga y también tienen el característico olor a p-cresol. En la tinción de Gram se observan bacilos grampositivos rectos que contienen, especialmente en los medios no selectivos, esporas ovales subterminales en su interior. La confirmación de las colonias sospechosas puede realizarse de alguna de las siguientes maneras:

- prueba de la L-prolina aminopeptidasa: extender con la ayuda de un asa una colonia en un disco humedecido de PRO-KIT (Remel), esperar 2 minutos y añadir una gota de p-dimetilaminocinnamaldehído dejando actuar 1 minuto. Las cepas de *C. difficile* producen una reacción positiva caracterizada por el desarrollo de una coloración rosa intensa o roja. Alternativamente, puede realizarse una suspensión de la colonia en 2-3 ml de agua o suero salino, añadir un disco de prolina (Rosco, WEE-TABS), incubar 2-4 horas, añadir una gota de p-dimetilaminocinnamaldehído e interpretar igual que en el caso anterior. Existen otros clostridios que también producen esta reacción como *C. sordellii*, *C. bifermentans*, *C. clostridioforme*, *C. sporogenes* y *C. glycolicum*, especialmente, cuando crecen en medios no selectivos. La diferenciación ha de basarse en la morfología de las colonias, la actividad lecitinasas (*C. sordellii* y *C. bifermentans* la hidrolizan, a diferencia de *C. difficile*) y lipasa (*C. sporogenes* la hidroliza, a diferencia de *C. difficile*).
- detección de glutamato deshidrogenasa: mediante aglutinación por látex (Becton-Dickinson) o por enzoinmunoensayo. Las cepas de *C. difficile* producen esta enzima aunque otras especies, como las mencionadas arriba también pueden producir resultados positivos.
- cromatografía de gas-líquido: la presencia de ácido isocaproico es característica de *C. difficile*

(ver PNT-AN-01).

7.2.4. Ensayo de citotoxicidad. Consiste en la detección de la toxina B o citotoxina en ciertas líneas celulares de mamíferos (fibroblastos humanos, células MRC-5, células K-1 de ovario de hamster chino, etc.) mediante la observación de un típico efecto citopático producido por la toxina que es neutralizado por la antitoxina específica. Aunque existen diversos sistemas comerciales para la detección de la toxina B (Advanced Clinical Diagnostics, Bartels Inc., Biowhittaker Inc., TechLab Inc.) el procesamiento general es de la siguiente manera. Suspender varias colonias de *C. difficile* en un caldo de enriquecimiento como caldo tioglicolato, incubar el caldo en anaerobiosis durante 24 horas a 37°C, filtrar la suspensión y añadir 1 ml de filtrado y 1 ml de medio de mantenimiento (como, por ejemplo, medio EMEM) en cada uno de dos shell-vial que contengan la monocapa de células humanas, añadir la antitoxina B en uno de los shell-vial e incubar durante 24 horas en un ambiente anaerobio a 35-37°C. Observar la monocapa mediante microscopio de inversión. Si se observa el efecto citopático en el vial sin antitoxina y no existe tal efecto en el vial con antitoxina se tratará de una cepa toxigénica de *C. difficile*. Si, en cambio, el efecto citopático también se produce en el vial con antitoxina se tratará de una toxicidad inespecífica por lo que habrá que diluir el filtrado y repetir el procedimiento para intentar eliminar esta toxicidad inespecífica (cuando se parte de colonias puras de *C. difficile* es muy raro que se produzca una toxicidad inespecífica). Si no se produce efecto citopático en ningún vial, reincubar 24 horas más e interpretar de la misma forma. Si transcurridas 48 horas no existe efecto citopático se tratará de una cepa no toxigénica de *C. difficile*.

7.3. CITOTOXICIDAD DIRECTA

Diluir 0,5 ml de muestra homogeneizada en 1 ml de PBS, centrifugar la mezcla a 3.500g durante 15 minutos y filtrar el sobrenadante. Procesar el filtrado tal como se describe en el apartado 7.2.4. Ya que se trata de un filtrado de la muestra y no de un cultivo puro, es más frecuente que se produzcan toxicidades inespecíficas.

7.4. MÉTODOS DE DETECCIÓN RÁPIDA DE *C. DIFFICILE* TOXIGÉNICO

A pesar de la alta sensibilidad y especificidad del uso combinado del cultivo toxigénico y del ensayo de citotoxicidad, su realización puede llevar de 1 a 4 días. Además, existen muchos laboratorios de Microbiología que carecen de la infraestructura necesaria para la realización de cultivos celulares. Estos inconvenientes han dado lugar a la aparición de técnicas comerciales de detección de *C. difficile* toxigénico directamente de la muestra que son muy sencillas de realizar y que han reducido el tiempo de diagnóstico considerablemente. Las principales técnicas comerciales disponibles en la actualidad son:

| | | | |
|---------------------------|-------------------------------------|------------------|---------------|
| Servicio de Microbiología | <i>Clostridium difficile</i> | Fecha: PNT-AN-02 | |
| Hospital..... | | Edición N° 01 | Página 6 de 7 |

7.4.1. Técnicas que detectan glutamato deshidrogenasa. Ésta enzima es un antígeno bastante específico de *C. difficile* aunque tiene el inconveniente de que no discrimina entre las cepas toxigénicas y no toxigénicas por lo que las técnicas basadas en su detección suelen tener valores de especificidad discretos. Existen ciertos sistemas comerciales basados en aglutinación mediante látex (CDT, Becton Dickinson; Meritec *C. difficile*, Meridian Diagnostics) capaces de obtener resultados en pocos minutos. Otros sistemas, basados en técnicas de enzimoimmunoensayo (ImmunoCard *C. difficile*, Meridian Diagnostics; Triage *C. difficile* panel, Biosite Diagnostics), pueden dar resultados en tan solo 15-20 minutos, con valores de sensibilidad y especificidad del 84-92% y 96-100%, respectivamente.

7.4.2. Técnicas que detectan toxina A. Existen numerosos sistemas comerciales que detectan la toxina A o enterotoxina de *C. difficile* mediante técnicas de enzimoimmunoensayo. El tiempo necesario para la obtención de resultados varía de unos pocos minutos a varias horas. Los valores de sensibilidad y especificidad son muy variados dependiendo del sistema comercial que se utilice, aunque son superiores a los obtenidos por las técnicas basadas en la detección de glutamato deshidrogenasa. Su principal problema estriba en que no detectan cepas toxigénicas que carecen de toxina A (se estima que suponen el 10% del total de cepas toxigénicas productoras de enfermedad).

7.4.3. Técnicas que detectan toxina A y Son más sensibles que las anteriores ya que son capaces de detectar cepas Tox A- y ToxB+. Los principales sistemas comerciales son *C. difficile* Tox-A/B Test (TechLab), Cd Toxin A+B (Rohm Pharma) y Premier Cytoclone (Meridian Diagnostics).

Seguir las instrucciones del fabricante para la realización de cada una de las pruebas rápidas descritas anteriormente.

El laboratorio debe solicitar al proveedor de medios de cultivo los certificados de los controles de calidad, donde estarán incluidas las características físicas y químicas que los definen y que deberá conservar. Asimismo realizará sus propios controles de calidad de los medios adquiridos comercialmente. El propio laboratorio debe elegir tanto la periodicidad como la selección de los medios a los que realiza el control de calidad en función del tipo, variedad y de los datos históricos de la conformidad de los controles realizados por el laboratorio con las características que el proveedor facilite: un medio estable y que no haya ocasionado problemas de crecimiento según registros previos se debe controlar menos que uno que sea menos estable y haya ocasionado problemas en su uso. El laboratorio debe generar registros de este control de medios adquiridos de proveedores y conservar estos registros para poder evaluar los medios y reconsiderar permanentemente el control de calidad de los mismos. Como ejemplo de formato para el registro de control de medios

adquiridos comercialmente se propone el formulario del Anexo 4 (Control de medios preparados, PNT-RTP-01). Con este control no sólo se evalúa la conformidad del laboratorio con los medios que adquiere ya preparados sino que también se evalúan las condiciones de procesamiento, estufas y atmósferas utilizadas.

Para el control de los medios se deben utilizar preferentemente cepas de colección (ATCC, CECT u otras colecciones) pero en el caso de no tener acceso a estas cepas se podrán utilizar cepas aisladas en el propio laboratorio con características perfectamente definidas.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Si se realiza como única técnica la detección rápida de la toxina A o las toxinas A+B y el resultado es negativo informar como "Detección rápida de toxina A (ó A y B) negativa". Si el resultado es dudoso informar como "Detección rápida de toxina A (ó A y B) dudosa. Rogamos envíen nueva muestra". Si el resultado es positivo informar como "Detección rápida de toxina A (ó A y B) positiva".

Si se realiza la detección rápida de la toxina A o las toxinas A+B como una técnica urgente previa al cultivo toxigénico o a la citotoxicidad directa y el resultado es negativo informar preliminarmente como "Detección rápida de toxina A (ó A y B) negativa. Resultado pendiente de confirmación mediante cultivo toxigénico (o citotoxicidad directa)". Si el resultado es dudoso informar como "Detección rápida de toxina A (ó A y B) dudosa. Resultado pendiente de confirmación mediante cultivo toxigénico (o citotoxicidad directa)". Si el resultado es positivo informar como "Detección rápida de toxina A (ó A y B) positiva. Resultado pendiente de confirmación mediante cultivo toxigénico (o citotoxicidad directa)". Una vez obtenidos los resultados del cultivo toxigénico o de la citotoxicidad directa y si el resultado es positivo añadir al resultado de la detección rápida, en el caso de que se haya hecho, "Cultivo toxigénico (o citotoxicidad directa) de *Clostridium difficile* positivo". Si el resultado es negativo añadir al resultado de la detección rápida, en el caso de que se haya hecho, "Cultivo toxigénico (o citotoxicidad directa) de *Clostridium difficile* negativo". Si se produce una toxicidad inespecífica a pesar de la realización de diluciones seriadas añadir al resultado de la detección rápida, en el caso de que se haya hecho, "Muestra tóxica. Rogamos envíen nueva muestra". Cuando la siembra de los cultivos sea cuantitativa o semicuantitativa, expresar los resultados positivos de una manera cuantitativa.

La forma de expresar cada uno de los posibles resultados descritos anteriormente son orientativos. Cada laboratorio debe establecer los suyos propios. Registrar los resultados en el programa de gestión del laboratorio e imprimir el informe definitivo. Una vez impresos todos los informes, el facultativo responsable debe revisarlos y firmarlos. Cuando se obtengan resultados cuyo conocimiento precoz por

| | | | |
|---------------------------|-------------------------------------|------------------|---------------|
| Servicio de Microbiología | <i>Clostridium difficile</i> | Fecha: PNT-AN-02 | |
| Hospital..... | | Edición N° 01 | Página 7 de 7 |

parte del clínico sea importante en el manejo del paciente, informar telefónicamente el resultado anotando en un registro la persona que recibe la información.

Después de enviar la información hacia las áreas de hospitalización correspondientes, anotar todos los resultados en el Libro de Registro del laboratorio y en la hoja diaria. Guardar ordenados en archivadores todos los protocolos de trabajo significativos.

9. RESPONSABILIDADES

Los técnicos de laboratorio serán los responsables de la realización de los procedimientos, de realizar, cuando sea necesario, el informe preliminar verbal de los resultados y de emitir el informe escrito tanto preliminar como definitivo.

El facultativo tendrá bajo su responsabilidad la interpretación de los resultados y la validación de todos los informes emitidos.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

No existe una procedimiento internacionalmente aceptado para el procesamiento de las muestras para el diagnóstico de la diarrea y/o colitis por *C. difficile*. Por este motivo, el procedimiento aquí desarrollado es únicamente orientativo.

11. LIMITACIONES

No aplicable.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition. American Society for Microbiology, Washington, D.C.; 2003.
2. Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. American Society for Microbiology, Washington, D.C.; 1997.
3. Jousimies-Somer HR, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler HM, Finegold SM. Wadsworth – KTL Anaerobic Bacteriology Manual. Star Publishing Company. Belmont, C.A.; 2002.
4. Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica (Procedimiento 10). Procedimientos en microbiología clínica. SEIMC, 2000. En: <http://www.seimc.org/>.
5. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología (PNT-RTP-01). SEIMC, 2003. En: <http://www.seimc.org/>.
6. Lyerly DM, Krivan HC, Wilkins TD. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. Clin Microbiol Rev 1988; 1:1-18.