

# Bacterias anaerobias

## Anaerobic bacteria

Clara Lina Salazar G.\*

Las bacterias anaerobias además de ser un importante componente de la microbiota humana del tracto intestinal, piel y mucosas; pueden convertirse en un patógeno potencial cuando ocurre una alteración en el tejido del hospedero o cuando se traslocan a otros sitios para producir infecciones en individuos que presentan condiciones que los hace susceptibles. Otra fuente de infección por estas bacterias es el ambiente externo, en su forma esporulada ingresan con el agua, tierra o partículas de polvo a través de traumas y heridas para luego germinar a la forma vegetativa responsable de la expresión de los factores de virulencia, y subsecuentemente invadir y producir daño en el hospedero.<sup>1,2</sup>

El éxito en el diagnóstico de estas infecciones, radica en una adecuada selección, recolección y transporte de la muestra. Se recomienda que sean aspirados profundos o biopsias para evitar la contaminación con la microbiota; para garantizar esta condición es preferible que la muestra sea obtenida en cirugía bajo las condiciones asépticas que allí se manejan, o también se pueden realizar aspirados guiados con ayuda imagenológica. Los hisopados no son una muestra adecuada en bacteriología anaerobia.<sup>3</sup>

El cultivo y la identificación precisa de los anaerobios es un desafío que requiere entrenamiento para una adecuada interpretación clínica en dos escenarios que se presentan con frecuencia: i) cuando ocurre colonización por anaerobios en los nichos naturales donde se encuentra el proceso infeccioso, y ii) en los cultivos polimicrobianos donde más de un patógeno facultativo y un anaerobio estricto se encuentran conviviendo.<sup>3</sup>

El proceso de cultivo e identificación de bacterias anaerobias puede tomar entre 7 y 14 días; éste ran-

go depende de la tasa de crecimiento, si es o no una muestra polimicrobiana y de la administración previa de antimicrobianos, entre otros. La muestra que se desea cultivar en búsqueda de bacterias anaerobias debe ser sometida a una siembra inicial en mínimo cuatro medios para incubación en condición anaerobia con atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>; los medios de cultivo deben contener vitamina K para promover el transporte de electrones y síntesis de esfingolípidos, también debe contener hemina para estimular en algunos anaerobios la expresión de enzimas como superóxido dismutasa y catalasas, y poder defenderse del oxígeno y sus productos tóxicos. Luego de la incubación, un paso importante en la identificación presuntiva es la descripción morfológica de las colonias obtenidas en los cultivos primarios con ayuda de un estereomicroscopio, principalmente para aquellos cultivos polimicrobianos, para luego proceder con la tinción de Gram modificado -Kopeloff-, seguido de la prueba de emisión de fluorescencia con una lámpara UV y otras pruebas rápidas como indol, catalasas y nitratos, y obtener una aproximación preliminar. Llegar hasta el género y la especie requiere de la realización de pruebas bioquímicas complementarias con el apoyo de sistemas manuales compuestos por galerías de pruebas bioquímicas disponibles en el mercado o sistemas automatizados.<sup>2,3</sup>

Para concluir, la identificación correcta de un anaerobio responsable de un proceso infeccioso es muy importante para la optimización del manejo clínico y la elección de una adecuada terapia antimicrobiana.<sup>4</sup> Se ha demostrado que retrasos en el diagnóstico o una identificación incorrecta de un

\*MSc. PhD(e). Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Contacto: [clarlin27@gmail.com](mailto:clarlin27@gmail.com) / Recepción: 04-30-2014. Aceptación: 05-26-2014.

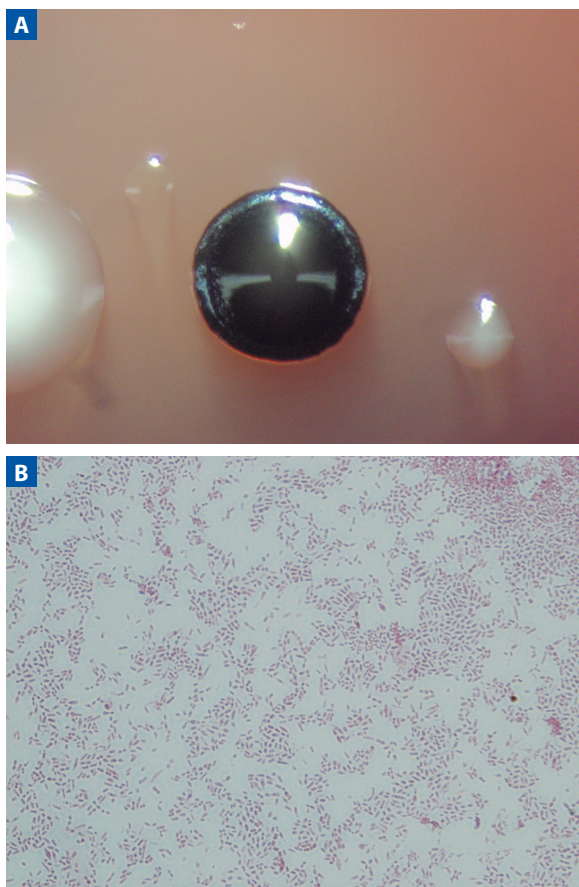
anaerobio en un proceso infeccioso, contribuyen a un incremento de la morbilidad y mortalidad de los pacientes. A continuación se presentan algunas características morfológicas macro y microscópicas de algunos géneros de patógenos anaerobios.

### ***Prevotella* spp.**

Fenotípicamente *P. nigrescens* es indistinguible de *P. Intermedia*, y solo puede diferenciarse por secuenciación de 16S rRNA.

#### **DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA**

Después de 2 días de incubación la colonia mide de 0,5 a 2 mm de diámetro, la forma es circular de



**Figura 1. A.** Colonia de *Prevotella intermedia* / *nigrescens* en medio de cultivo agar sangre brucella suplementado con hemina y vitamina K. **B.** Tinción de Gram modificada para anaerobios -Kopeloff- a partir de colonia de *Prevotella intermedia* / *nigrescens*.

borde continuo, poco convexa, translúcida, lisa y  $\beta$ -hemolítica; las colonias más grandes pueden ser opacas. Es indol positivo, produce ácido a partir de fructosa, glicógeno, inulina, maltosa, rafinosa, almidón y sucrosa.

La colonia al inicio presenta un color gris marrón rojizo, a partir del cuarto día de incubación se presenta una pigmentación de café a negra, producto de la acumulación del pigmento hierro protoporfirina IX y como un mecanismo para defenderse del  $H_2O_2$ ; la intensidad y la velocidad de la pigmentación dependen del tipo de sangre, la hemólisis, temperatura, el pH, y la presencia de otras bacterias (Figura 1A). Otra característica macroscópica es la emisión de fluorescencia de color rojo brillante bajo la luz ultravioleta 365 nm. Otras especies patógenas pigmentadas son: *P. melaninogenica*, *P. loescheii*, *P. corporis*, *P. pallens*.<sup>2,3,5,6</sup>

#### **DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA**

Se observan coco bacilos cortos Gram negativos, no esporulados, pleomórficos, generalmente miden de 0,4 a 0,7 x 1,5 a 2,0  $\mu$ m y ocasionalmente pueden llegar a medir hasta 12  $\mu$ m de longitud (Figura 1B).<sup>2,3,5,6</sup>

### ***Fusobacterium nucleatum***

#### **DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA**

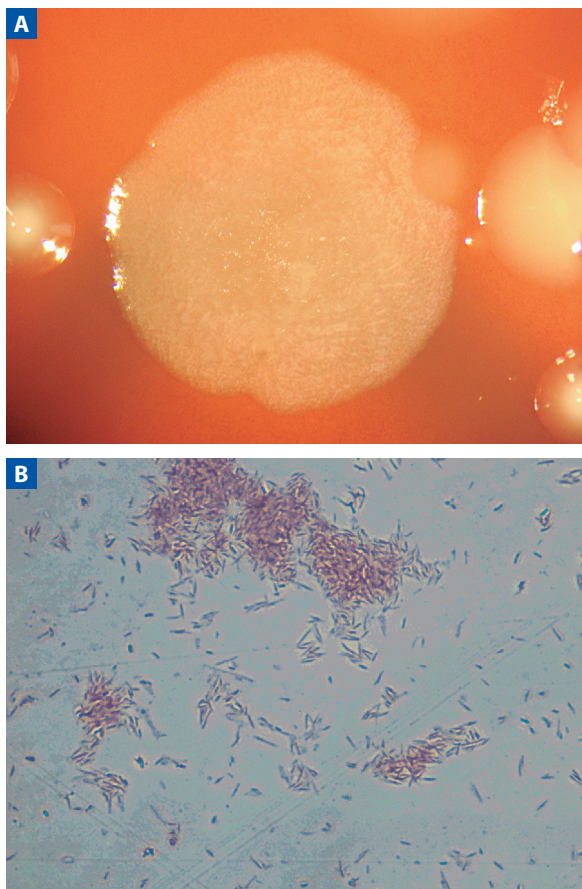
Esta especie habita como microbiota humana y en animales en el intestino y la cavidad oral, y están divididas en cinco subespecies: *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*, subsp. *polymorphum*, subsp. *vincetii*, subsp. *fusiforme*, and subsp. *animalis*.

Las colonias son por lo general no hemolíticas, de color blanco a amarillo-gris, lisas, de apariencia manchada o de “miga de pan”, después de 2 días de incubación las colonias miden de 1 a 2 mm de diámetro. Los cultivos producen un olor desagradable pero no fétido como si pasa en *F. necrophorum*, son indol positivo, catalasas, nitratos, esculina negativo, no forman ácido a partir de ningún carbohidrato (Figura 2A).<sup>2,3,7,8</sup>

#### **DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA**

Bacilos Gram negativos no esporulados delgados, en forma de huso con extremos afilados o puntiagudos de 0,4 a 0,7  $\mu$ m de espesor y de 4 a 10  $\mu$ m de largo, y aparecen individualmente, en parejas de

extremo a extremo, o en paquetes de bacilos en paralelo. El término *nucleatum* proviene de la apariencia nucleada observada al microscopio electrónico debido a la presencia de gránulos intracelulares (Figura 2B).<sup>2,3,7,8</sup>



**Figura 2. A.** Colonia de *Fusobacterium nucleatum* en medio de cultivo agar sangre brucella suplementado con hemina y vitamina K. **B.** Tinción de Gram modificada para anaerobios -Kopeloff a partir de colonia *Fusobacterium nucleatum*.

### ***Bacteroides fragilis***

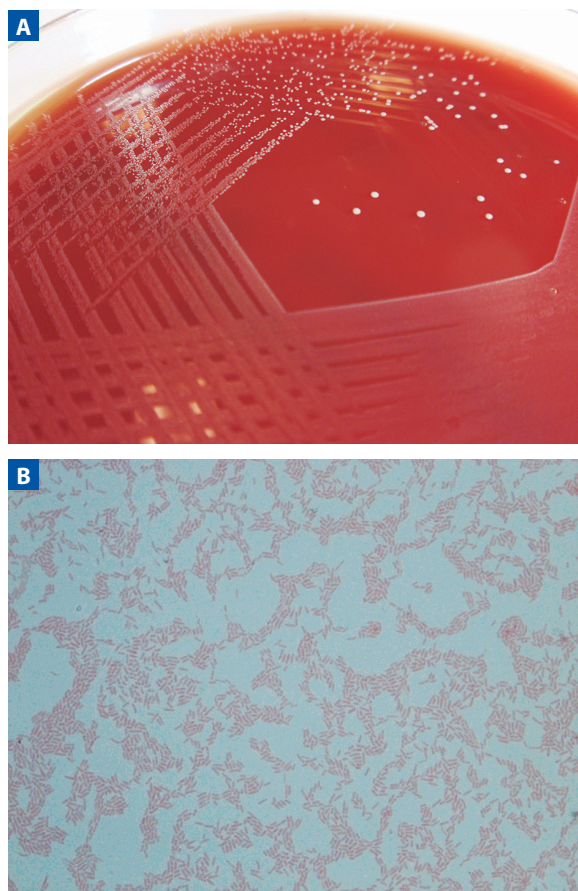
#### **DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA**

El término *fragilis* proviene de las colonias quebradizas o frágiles que se forman bajo ciertas condiciones de cultivo. Las colonias en un medio con sangre de carnero miden de 1 a 3 mm de diámetro, son de forma convexa y circulares con borde continuo, y de

contextura lisa, de color blanco a gris y no hemolíticas. Crecen bien en medios con 20% de sales biliares, utilizan la esculina, son catalasa y nitratos negativos; son altamente fermentativas y producen ácido acético y succínico a partir de la glucosa (Figura 3A).<sup>2,3,9</sup>

#### **DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA**

Se observan bacilos Gram negativos pálidos con extremos redondeados, en disposición individual o en parejas. El tamaño de las células es aproximadamente de 0,5 a 2,0 x 1,6 a 12  $\mu\text{m}$ , las células pueden ser uniformes, pleomórficas o con vacuolas dependiendo de la edad y el medio de cultivo. Tienen la capacidad de sobrevivir a la exposición de oxígeno hasta por 6 h (Figura 3B).<sup>2,3,9</sup>



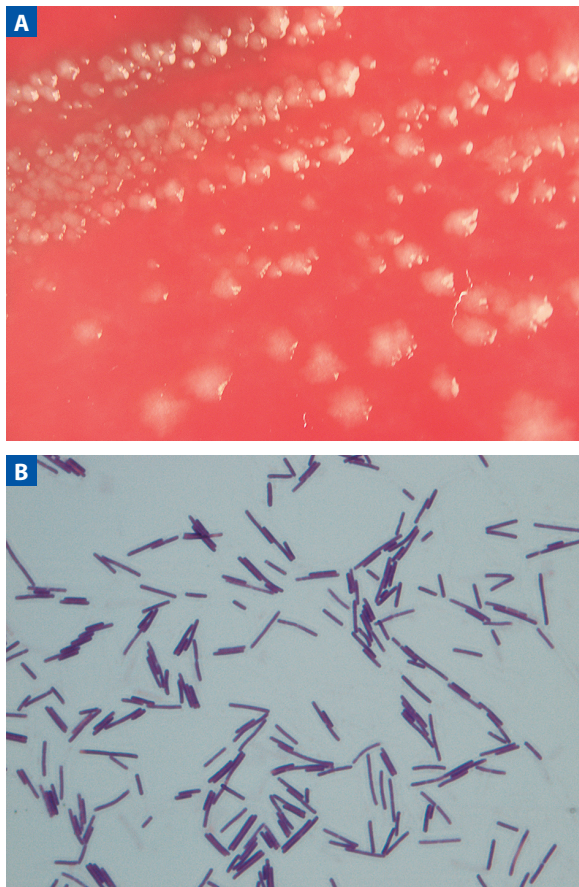
**Figura 3. A.** Colonias de *Bacteroides fragilis* en medio de cultivo agar sangre brucella suplementado con hemina y vitamina K. **B.** Tinción de Gram modificada para anaerobios -Kopeloff a partir de colonia *Bacteroides fragilis*.

## *Clostridium difficile*

### DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA

Después de 48 h de incubación las colonias miden aproximadamente de 2 a 5 mm, de color grisáceo con un centro ligeramente más blanco, planas o convexas, de borde irregular y con frecuencia apuntando hacia la dirección de la propagación. Los cultivos presentan un olor típico a estiércol de caballo. Todas las cepas producen una fluorescencia de color verde pálido bajo la luz ultravioleta después de 48 h de incubación.<sup>2,3,10</sup>

Esta bacteria utiliza para su crecimiento prolina, ácido aspártico, serina, leucina, alanina, treonina, valina, fenilalanina, metionina, isoleucina. Son negativos a las pruebas de indol, nitratos, lipasa y lecitinasa (Figura 4A).<sup>10</sup>



**Figura 4. A.** Colonias de *Clostridium difficile* en medio de cultivo agar sangre brucella suplementado con hemina y vitamina K. **B.** Tinción de Gram modificada para anaerobios -Kopeloff a partir de colonia *Clostridium difficile*.

### DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA

Son bacilos Gram positivos, no esporulados, dispuestos en pares o cadenas cortas, móviles por medio de flagelos peritricos y miden de 0,5 a 1,9 x 3,0 a 16,9  $\mu\text{m}$ . Algunas cepas se disponen en cadenas de 2 a 6 células alineadas de extremo a extremo. Las esporas son de forma ovalada, subterminal y raramente terminal. La esporulación se produce en agar sangre Brucella incubando durante 2 días. El término *difficile* proviene de la dificultad que se presentaba en la época de 1935 para su aislamiento y estudio (Figura 4B).<sup>11</sup>

## *Clostridium perfringens*

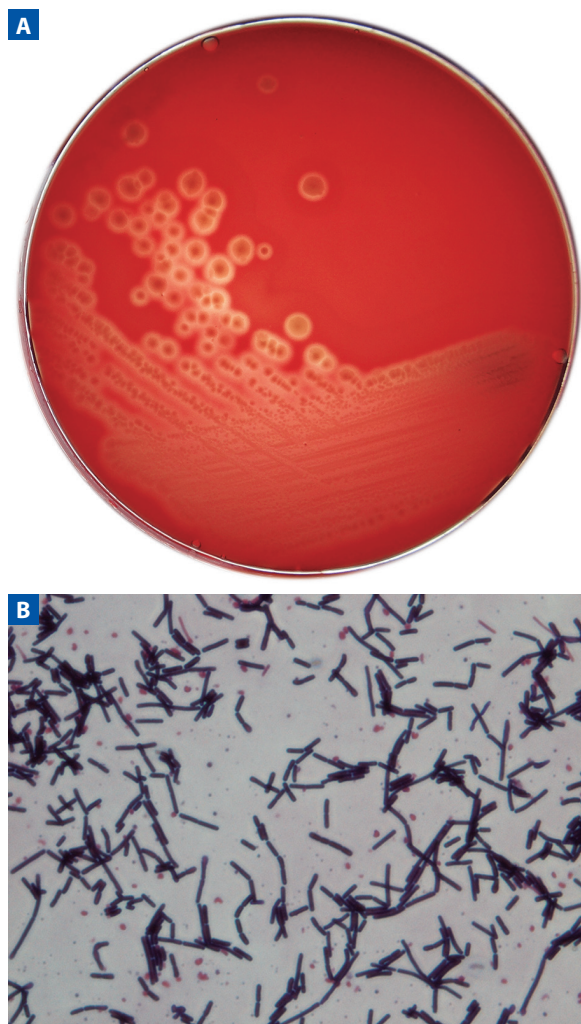
### DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA

Las colonias miden de 2 a 5 mm de diámetro, son circulares con borde continuo, en forma de cúpula, de color gris a amarillo grisáceo translúcido con una superficie brillante. Ocasionalmente pueden observarse otras morfologías coloniales en el mismo medio como: colonias rugosas con márgenes lobuladas y colonias planas con una superficie irregular y márgenes filamentosas (Figura 5A).

Posee tres tipos de hemolisinas: alfa, delta, y teta, que se producen en cantidades variables. En medios con sangre de conejo, oveja, vaca, caballo o sangre humana, la mayoría de cepas producen una estrecha zona de hemólisis completa debido a la toxina teta y una zona circundante de hemólisis incompleta debido a la toxina alfa. El 95% de las cepas fermentan carbohidratos como la sucrosa, fructosa, manosa, maltosa etc, produce lecitinasa pero no lipasa, nitratos variables y son indol negativos.<sup>2,3,10</sup>

### DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA

Se observan bacilos Gram positivos, rectos con extremos romos, inmóviles. Las esporas rara vez son vistas *in vivo* o en condiciones *in vitro*, cuando están presentes son grandes, ovaladas, en posición central o subterminal y deforman la célula. *C. perfringens*, se ha dividido en cinco tipos: A, B, C, D y E, con base en la producción de las toxinas letales; éstas no se pueden diferenciar de manera confiable sobre la morfología celular o de la colonia, reacciones bioquímicas, o por análisis cromatográfico de ácidos grasos (Figura 5B).<sup>2,3,10</sup>



**Figura 5. A.** Colonias de *Clostridium perfringens* en medio de cultivo agar sangre brucella suplementado con hemina y vitamina K. **B.** Tinción de Gram modificada para anaerobios -Kopeloff a partir de muestra positiva para *Clostridium perfringens*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Wilson M.** Bacteriology of Humans: an ecological perspective. Blackwell Publishing, Oxford, 2008.
2. **Gerri S.** Hall. Anaerobic Bacteriology. In: Iseberg HD editor. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2<sup>nd</sup> ed. Washington, D.C: ASM Press; 2007 section. 4.0.
3. **Jousimies-Somer H, Summanen P, Citron DM et al.** *Wadsworth-KTL anaerobic bacteriology manual*. 6<sup>th</sup> ed. Star Publishing: Belmont, CA. 2002.
4. **Japanese Society of Chemotherapy Committee on guidelines for treatment of anaerobic infections.** Chapter 1-1. Anaerobic infections (General): epidemiology of anaerobic infections *J Infect Chemother*. 2011 Jul; 17 Suppl 1:67-71.
5. **Smalley JW, Silver J, Birss AJ, Withnall R, Titler PJ.** The haempigment of the oral anaerobes *Prevotella nigrescens* and *Prevotella intermedia* is composed of iron (III) protoporphyrin IX in the monomeric form. *Microbiology* 2003; 149:1711-8.
6. **Yang JJ, Kwon TY, Seo MJ, Nam YS, Han CS, Lee HJ.** 16S ribosomal RNA identification of *Prevotella nigrescens* from a case of cellulitis. *Ann Lab Med*. 2013 Sep; 33(5):379-82.
7. **Bolstad A, Jensen H, Bakken V.** Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9:55-71.
8. **Strauss J, White A, Ambrose C, McDonald J, Allen-Vercoe.** Phenotypic and genotypic analyses of clinical *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium periodonticum* isolates from the human gut. *Anaerobe* 2008; 14:301-9.
9. **Krieg NR, Ludwig W, Euzéby J, Whitman WB.** Whitman. Phylum XIV. Bacteroidetes phyl. nov. 2<sup>nd</sup> ed. Vol. 4. Family I. *Bacteroidaceae*. Edited by Jones, Krieg NR, Staley WJT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Ludwig W, Whitman WB. Springer, New York, USA. 2010 pp. 25-48.
10. **Juergen Wiegel.** Family I. *Clostridiaceae*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2<sup>nd</sup> ed. Vol. 3. The Firmicutes. Edited by P. DeVos, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K-H, and Whitman WB. Springer, New York, USA. 2009. pp. 736-829.
11. **Burns DA, Heap JT, Minton NP.** *Clostridium difficile* spore germination: an update. *Res Microbiol*. 2010. Nov; 161(9): 730-4.