

Parte III

MICROORGANISMOS ANAEROBIOS

Editor responsable

SILVIA C. PREDARI

Jefa del Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Coordinadora del Comité de Emergencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Miembro del Comité Científico Asesor de la Revista Argentina de Microbiología, publicación científica oficial de la Asociación Argentina de Microbiología. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Miembro de la Subcomisión de Bacterias Anaerobias -Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas (SADEBAC)- Asociación Argentina de Microbiología (AAM). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Índice

Capítulo	Título	Pág
Parte III	MICROORGANISMOS ANAEROBIOS	1
	Editor responsable: Silvia C. Predari	
	Índice	2
IIIa.	CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS ANAEROBIOS	6
	Autores: María Adelaida Rossetti y Hebe M. Bianchini	
	Introducción	7
	Aspectos taxonómicos	7
	Hábitat	8
	Aspectos patogénicos	8
	Factores del hospedero	10
	Factores de virulencia del microorganismo	10
	Impacto clínico	11
	Diagnóstico microbiológico	13
	Recolección de la muestra	13
	Transporte y conservación de la muestra	14
	Procesamiento inicial - Figura 1	14
	Métodos diagnósticos	15
	Culturales y fenotípicos	15
	Miniaturizados, automatizados y moleculares	20
	Fallas en el procesamiento y aislamiento de anaerobios	22
	Bibliografía	24
	Tablas 1, 3, 4 y 5	28
	Figuras 2 a 5	32
	Nomenclatura de las bacterias anaerobias aisladas con mayor frecuencia de muestras clínicas - Tabla 2	36
IIIb.	COCOS ANAEROBIOS	42
	Cocos anaerobios gram positivos y gram negativos	
	Autores: Mirta R. Litterio Bürki y María Raquel Rollet	
	Introducción	43
	Aspectos taxonómicos	43
	Hábitat	44

Factores de virulencia	45
Impacto clínico	48
Diagnóstico microbiológico	50
Identificación a nivel de género y especie	50
Morfología microscópica	50
Características culturales	51
Pruebas bioquímicas	53
Métodos automatizados, miniaturizados y moleculares	54
Sensibilidad a los antimicrobianos	55
Bibliografía	58
Tablas 1 a 4	64
Figuras 1 a 5	72

IIIc	BACILOS GRAM POSITIVOS ANAEROBIOS ESPORULADOS	77
-------------	--	----

Autores: María Raquel Rollet, María Cristina Legaria y Graciela Carloni

Género <i>Clostridium</i>	78
Aspectos taxonómicos	78
Hábitat	78
Factores de virulencia	79
Genética	88
Impacto clínico	90
Diagnóstico microbiológico	98
Morfología microscópica	100
Características metabólicas y culturales	101
Cultivo	102
Identificación bioquímica e inmunológica	104
Métodos automatizados, miniaturizados y moleculares	107
Cromatografía	108
Inmunofluorescencia directa	109
Determinación de toxinas y toxinotipos	109
Identificación molecular	110
Diagnóstico de la infección por <i>Clostridium difficile</i>	111
Método de citotoxicidad y neutralización en cultivos celulares	112
Enzimoimmunoanálisis	112
Glutamato deshidrogenasa	114
Cultivo	115
Cultivo toxigénico	115
Métodos moleculares	116
Algoritmos	118
Sensibilidad a los antimicrobianos	118
Bibliografía	121
Tablas 1 a 6	133
Figuras 1 a 7	142

IIId. BACILOS GRAM POSITIVOS ANAEROBIOS NO ESPORULADOS 149

Autores: Liliana Castello y Silvia C. Predari

Aspectos taxonómicos	150
Hábitat	155
Factores de virulencia	156
Impacto clínico	159
Actinomyces y organismos relacionados	159
Mobiluncus	161
Propionibacterium	162
Atopobium y Olsenella	164
Eubacterium y organismos relacionados	165
Eggerthella y organismos relacionados	166
Lactobacillus	167
Bifidobacterium y organismos relacionados	169
Identificación a nivel de género y especie	169
Consideraciones prácticas en la identificación fenotípica	173
Cromatografía gas – líquido	175
Sistemas miniaturizados, automatizados y moleculares	176
Sensibilidad a los antimicrobianos	181
Bibliografía	185
Tablas 1 a 7	204

IIle. BACILOS GRAM NEGATIVOS ANAEROBIOS 212

Autores: Ana Di Martino, Liliana Fernández Canigia, Laura Gliosca y María Cristina Legaria

Aspectos taxonómicos	213
Hábitat	218
Factores de virulencia	220
Impacto clínico	224
Infecciones asociadas a los géneros:	
Bacteroides, Parabacteroides, Alistipes y Odoribacter	225
Porphyromonas y Tannerella	227
Prevotella	228
Fusobacterium y otras bacterias fusiformes	230
Infecciones asociadas a otros bacilos gram negativos	232
Identificación a nivel de género y especie	234

Métodos moleculares de identificación	244
Sensibilidad a los antimicrobianos	246
Bibliografía	250
Tablas 1 a 9	273

Apéndice X	MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS	288
	Pruebas bioquímicas manuales:	
	fundamento y método	

Autores: María Adelaida Rossetti y Hebe M. Bianchini

Agar bacteroides bilis esculina (ABBE)	288
Agar Brucella o agar infusión cerebro corazón (BHI) con antibiótico	288
Agar carne levadura o VL base	288
Agar infusión cerebro corazón (BHI) para anaerobios	289
Agar sangre Brucella	289
Bilis: a) Caldo con bilis	290
b) Discos con bilis	291
Caldo carne levadura	291
Caldo glicerinado al 15 %	291
Caldo infusión cerebro corazón (BHI) para anerobios	292
Hemina, solución madre	292
Hidrólisis de la esculina: a) Caldo esculina	293
b) Método de spot	293
Medio base para la fermentación de hidratos de carbono	294
Medio para la conservación de cepas a temperatura ambiente	295
Polianetol sulfonato de sodio (SPS)	295
Producción de catalasa	296
Producción de gelatinasa:	297
a) Método de los discos de Kohn	297
b) Método de Frazier	298
Producción de indol: a) En medio líquido	299
b) Prueba de toque	300
Producción de lecitinasa – lipasa:	300
Agar yema de huevo	
Producción de ureasa: a) En medio líquido	301
b) En disco	301
Prueba de esporulación	302
Reducción de nitrato	303
Sangre lacada	304
Suplementos para prueba de estimulación de crecimiento	304
Vitamina K1, solución madre	305

Capítulo IIIa. CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS ANAEROBIOS

MARÍA ADELAIDA ROSSETTI

Jefa de la Unidad Microbiología del Hospital Interzonal General de Agudos
Presidente Perón. Avellaneda, Pcia. de Buenos Aires, Argentina.

Coordinadora de la Subcomisión de Bacterias Anaerobias -Sociedad Argentina de
Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas (SADEBAC)- Asociación Argentina de
Microbiología (AAM). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

HEBE M. BIANCHINI

Asesora del Laboratorio de Bacteriología del Centro de Educación Médica e
Investigaciones Clínicas “Norberto Quirno” (CEMIC). Ciudad Autónoma de Buenos
Aires, Argentina.

Miembro de la Subcomisión de Bacterias Anaerobias -Sociedad Argentina de
Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas (SADEBAC)- Asociación Argentina de
Microbiología (AAM). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Introducción

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. Existe un amplio abanico de microorganismos, desde los muy tolerantes y resistentes hasta los extremadamente lábiles a este gas.

Según el requerimiento de O₂ las bacterias se pueden clasificar en aerobios obligados, microaerófilos, anaerobios facultativos, anaerobios aerotolerantes y anaerobios obligados (tabla 1).

Aspectos taxonómicos

El conocimiento de la genética microbiana ha determinado importantes cambios en la clasificación y taxonomía bacteriana que, en el caso de los anaerobios, han sido muy importantes.

Las primeras revisiones de la taxonomía de estas bacterias se realizaron a partir de los años 70. Desde 1980, se produjeron cambios muy relevantes que ayudaron a resolver los problemas taxonómicos. Sin duda, surgirán nuevas especies y modificaciones en la nomenclatura de estas bacterias. En la actualidad continuamos realizando la identificación de rutina de los aislamientos clínicos por medio de la observación de las características microscópicas, macroscópicas y fenotípicas. Utilizamos las pruebas moleculares para una caracterización taxonómica más minuciosa o para la identificación más rápida, cuando se dispone del equipamiento y de la logística adecuados.

En la tabla 2 (final del capítulo) se presenta la nomenclatura de las bacterias anaerobias aisladas con mayor frecuencia de los materiales clínicos, las modificaciones taxonómicas y los nuevos hallazgos informados en los últimos 10 años ¹⁸.

Hábitat

Toda la superficie mucosa y epitelial del cuerpo humano está colonizada por bacterias anaerobias en distinta concentración según el lugar de colonización, desde 10^3 UFC/g en la piel a 10^{11-13} UFC/g en la materia fecal. La relación aerobio-anaerobio es variable según la localización, por ejemplo $10^3:1$ en la piel y $1:10^3$ en el colon. Colonizan la cavidad oral, el tracto gastrointestinal, la vagina y el tracto genitourinario. Algunas de ellas se consideran patógenos oportunistas: cuando encuentran un lugar en el hospedero que les permite desarrollarse se transforman en patógenos ^{12,16,17,20,32,39}. En la tabla 3, se muestra la distribución de los anaerobios más frecuentes en la microbiota residente humana.

Aspectos patogénicos

Las infecciones por bacterias anaerobias, particularmente las producidas por gram negativos no esporulados, son en general endógenas. Pocas infecciones son producidas por bacterias anaerobias de origen exógeno. La mayoría de las infecciones se desarrollan cercanas a las mucosas, donde los anaerobios predominan como parte de la microbiota habitual como en orofaringe, piel, intestino y tracto genital femenino. Se presentan en una gran variedad de formas clínicas; las más frecuentes son la formación de abscesos y la necrosis de tejidos. En general son infecciones polimicrobianas que incluyen bacterias aerobias y anaerobias, de alto inóculo

microbiano. En muchas publicaciones se comunica el aislamiento de tres a seis especies microbianas en el sitio infectado ^{12,14,21,39}.

Si bien la microbiota colónica está formada por gran cantidad de microorganismos aerobios y anaerobios, sabemos que el grupo *Bacteroidesfragilis* es predominante y en consecuencia más factible de producir infecciones en zonas cercanas a esa mucosa. En pacientes gerontes, que repiten infecciones de las vías biliares relacionadas a carcinoma o a obstrucción biliar, o a cirugía biliar, es válido sospechar que el grupo *Bacteroidesfragilis* podría ser responsable de la infección.

En algunos casos estas bacterias actúan produciendo infecciones *per se* y en otras contribuyendo a modificar el ecosistema habitual, manifestando cuadros de difícil explicación como la vaginosis bacteriana ^{28,34}, las gingivitis y las periodontitis ^{19, 25, 27}.

Las causas predisponentes de las infecciones que involucran anaerobios son:

1. cualquier causa endógena o exógena que produzca una rotura en la continuidad de los tejidos (accidente automovilístico, extracción dentaria, cirugía oral, ginecológica o abdominal);
2. una colonización primaria que evoluciona a infección y que incluye microorganismos aerobios, anaerobios y/o aerobios facultativos;
3. la bacteria puede alcanzar el torrente sanguíneo y diseminarse a múltiples órganos y tejidos, obstruyendo capilares finos y creando de este modo, condiciones anaeróbicas. Si se forman trombos infectados en uno o más de estos sitios, se pueden formar abscesos y complicaciones tales como, hemólisis intravascular, necrosis de tejidos, toxemia, *shock*, coagulación intravascular, colapso vascular y también, la muerte.

Las causas predisponentes de la infección se asocian a:

✓ **Factores del hospedero:**

- a) modificación en la solución de continuidad de las mucosas (espontánea, accidental o quirúrgica), tejidos debilitados y cualquier injuria de tejidos que produzca isquemia, necrosis o disminución del potencial de óxido reducción^{14,23}. Esto contribuye a que los microorganismos puedan penetrar en los tejidos profundos y producir infección;
- b) variación en los mecanismos inmunológicos de defensa del hospedero²⁰. Algunos anaerobios pueden competir con otras bacterias por opsoninas del suero y en ciertas condiciones *in vitro*, pueden deprimir la función de los leucocitos polimorfonucleares, de los macrófagos y de los linfocitos.

✓ **Factores de virulencia del microorganismo**²⁰

Las bacterias anaerobias producen o poseen una cantidad de enzimas, cápsula y factores de adherencia que juegan un rol importante en su patogenicidad. Los más frecuentes son:

- a) su habilidad para adherirse o invadir las células epiteliales para colonizar o infectar. Por ejemplo, la cápsula, los *pili* y las adhesinas “lectina-like” son las responsables de la adherencia de *B. fragilis* y *Porphyromonas* spp. a las células epiteliales. La unión y degradación del fibrinógeno por *Porphyromonas gingivalis* puede mediar en la colonización de estos microorganismos en las encías, en la producción de toxinas y/o enzimas que le confieren un rol patogénico;
- b) las enzimas que parecen tener importancia como factores de virulencia son: fosfolipasa, colagenasa, hialuronidasa, neuraminidasa, heparinasa, proteinasas, sialidasa y varias enterotoxinas y neurotoxinas. La α -toxina

de *Clostridium perfringens* es una fosfolipasa C que hidroliza a la lecitina y a la esfingomiélin de la membrana celular, plaquetas, células endoteliales y musculares y afecta la permeabilidad capilar. También produce una colagenasa que favorece su difusión en los tejidos. *Clostridium difficile*, que es responsable de la colitis pseudomembranosa asociada a terapia antimicrobiana, produce una enterotoxina. *B.fragilis* también produce una enterotoxina descrita últimamente como productora de diarrea asociada a uso de antibióticos y a diarrea de origen desconocido en niños ³³. El polisacárido capsular de *B.fragilis*, libre de otros componentes de la célula bacteriana, es capaz de inducir la formación de abscesos.

Impacto clínico

Las bacterias anaerobias de origen endógeno pueden contribuir a infectar cualquier tejido, región anatómica u órgano que le dé posibilidad a la bacteria de colonizar y penetrar. Al ser infecciones polimicrobianas que incluyen aerobios, anaerobios y/o anaerobios facultativos se produce seguramente cooperación entre algunas de ellas, las cuales actúan en forma sinérgica en la producción de la infección. La mayoría de las infecciones son purulentas, aunque la ausencia de leucocitos no es regla para decir que un proceso no es infeccioso. En la mayoría de los casos en los que las bacterias anaerobias están involucradas, la producción de toxinas y citotoxinas hace que se produzca, frecuentemente, necrosis por destrucción de macrófagos, neutrófilos y otras células.

En la tabla 4 se muestran las infecciones más frecuentes producidas por anaerobios.

Si bien son muchas las especies de anaerobios que potencialmente podrían aislarse de muestras clínicas humanas, las que se aíslan rutinariamente son relativamente pocas. Los anaerobios asociados a infecciones clínicas se pueden resumir en los siguientes grupos²⁴:

- bacilos gram negativos que pertenecen al grupo *B. fragilis*. No pigmentados, sacarolíticos y tolerantes a la bilis;

- bacilos gram negativos que no pertenecen al grupo *B. fragilis*. No pigmentados, sacarolíticos, generalmente sensibles a la bilis, *Prevotella* spp. y otros géneros;

- bacilos gram negativos no pigmentados, débilmente sacarolíticos o asacarolíticos, tolerante a la bilis;

- bacilos gram negativos pigmentados. *Porphyromonas* spp. y *Prevotella* spp.

- bacilos gram negativos fusiformes: *Fusobacterium* spp.

- cocos gram positivos y gram negativos;

- bacilos gram positivos esporulados: *Clostridium* spp.

- bacilos gram positivos no esporulados: *Actinomyces* spp., *Eubacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Mobiluncus* spp., *Bifidobacterium* spp. y otros.

Según un trabajo colaborativo efectuado en el período 1992 - 2002 por la Subcomisión de Bacterias Anaerobias de SADEBAC-AAM (Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas, Asociación Argentina de Microbiología)⁷, los microorganismos anaerobios frecuentemente aislados de infecciones humanas, excluyendo las infecciones orales fueron: *Bacteroides* grupo *fragilis* 49 %, *Bacteroides* spp. 7 %, *Porphyromonas* spp. 2 %,

Prevotella spp. 4 %, *Fusobacterium* spp. 4 %, *Clostridium* spp. 17 %, bacilos gram positivos no esporulados 5 %, *Peptostreptococcus* spp. 12 %.

Diagnóstico microbiológico

La recuperación e identificación de estos microorganismos, de muestras provenientes de procesos infecciosos está condicionada a:

- **sospecha clínica** adecuada e interacción permanente entre el médico que solicita el estudio y el microbiólogo que procesa la muestra;
- **correcta toma, transporte y conservación de la muestra.** Un buen diagnóstico está asociado a la calidad de la muestra.

a) Recolección de la muestra

Es necesario evitar la contaminación de la muestra con la microbiota residente de piel y mucosas. Se debe descontaminar previamente la zona con alcohol al 70 % y luego aplicar tintura de yodo (30 segundos) o solución acuosa de yodo (un minuto). Posteriormente se debe remover el yodo con alcohol 70 %.

- Muestras apropiadas para el diagnóstico (tabla 5)
- Muestras no apropiadas para el cultivo de bacterias anaerobias: hisopado faríngeo o nasofaríngeo, hisopado de la mucosa oral, hisopado conjuntival, hisopado ótico, secreción bronquial obtenida por aspiración nasotraqueal u orotraqueal, lavado broncoalveolar, esputo, lavado gástrico, contenido intestinal, secreción de ileostomía o colostomía, orina obtenida por micción espontánea o por sonda vesical, hisopado vaginal o de endocérvix, hisopado de úlceras de decúbito, úlceras de pie diabético, escaras, abscesos superficiales abiertos, cualquier material adyacente a una mucosa que no haya sido descontaminada adecuadamente. Cada laboratorio debe proveer instrucciones claras y precisas del procedimiento de toma de muestras.

b) Transporte y conservación de la muestra

Las muestras deben ser protegidas del efecto deletéreo del O₂ hasta que puedan ser procesadas. Lo ideal es cultivarlas de inmediato.

Las muestras líquidas, purulentas y de volumen considerable pueden transportarse en tubos estériles si se van a cultivar antes de las dos horas. De lo contrario deben inyectarse en frascos comerciales con tapón de goma y atmósfera inerte, sin introducir aire.

No es conveniente el transporte de las muestras en jeringas, porque permite la difusión del oxígeno en el material.

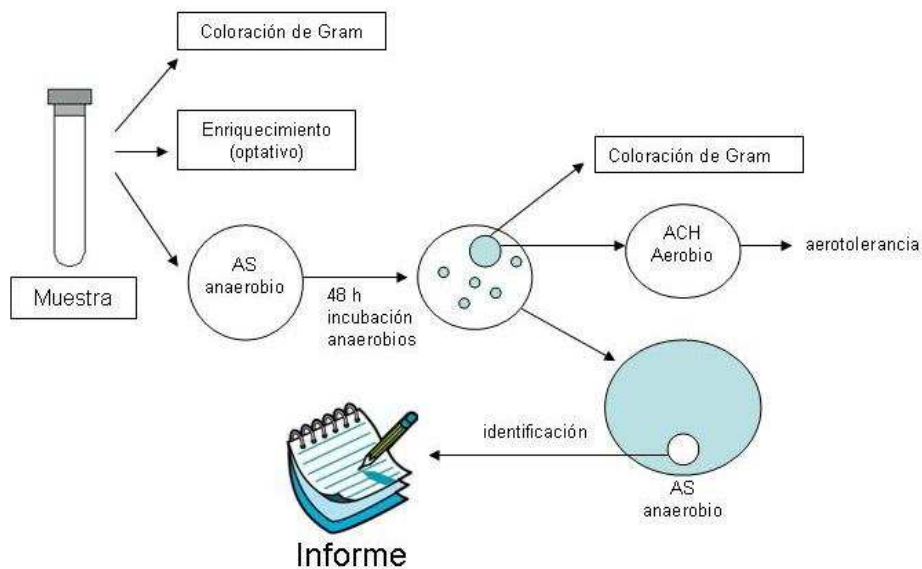
Los raspados, hisopados y piezas de tejido pequeñas pueden colocarse en tubos que contengan medio de Stuart o Cary-Blair, prerreducido.

Las piezas de tejido con un volumen mayor de 1 cm³, pueden transportarse en recipientes estériles, sin conservantes.

Las muestras deben mantenerse a temperatura ambiente hasta su procesamiento. La refrigeración aumenta la difusión del oxígeno al interior de la muestra.

Procesamiento inicial

Figura 1. Procesamiento inicial para el cultivo de bacterias anaerobias



- **Métodos diagnósticos**

Los métodos pueden ser fenotípicos o genotípicos.

a) Métodos culturales y fenotípicos

Microscopía

- Microscopía directa del material. Necesita del ojo experto para contribuir a un correcto diagnóstico presuntivo ²⁴.
- Coloración de Gram: a partir del material recibido se fija el preparado con metanol, para preservar la morfología de los elementos. Esta coloración permite: sospechar morfología compatible con anaerobios y observar la presencia de reacción inflamatoria, orientar el tratamiento empírico y evaluar la calidad del procedimiento, ya que la no recuperación de los microorganismos observados en la microscopía indicaría una falla en algunos pasos del

procesamiento (muestreo, transporte, técnica de siembra o que el paciente hubiese recibido antibióticos).

Cultivo e identificación

Los medios de cultivo usados para la recuperación de los microorganismos anaerobios, al igual que para los aerobios, pueden ser sólidos o líquidos, selectivos o no⁴. Para la siembra primaria, se recomienda el uso de medios selectivos cuando se sospecha flora mixta acompañante, aerobia y/o anaerobia.

Para la preparación de medios no selectivos (agar sangre) pueden utilizarse diferentes bases, agar tripteína de soja, agar infusión cerebro corazón, agar Brucella ⁴.

Existen dos nutrientes fundamentales para el desarrollo de la mayoría de los anaerobios, hemina y vitamina K1, que deben ser incluidos en la preparación de los medios cuando no están presentes en su fórmula.

La sangre se debe usar en una concentración final de 5 a 7 %. Se recomienda el uso de sangre lacada porque favorece la expresión del pigmento en los microorganismos que lo producen. Preferentemente se usa sangre de carnero, conejo o caballo. Los medios de cultivo deben ser recientemente preparados debido al efecto tóxico del oxígeno y de sus productos de reducción en el crecimiento de los anaerobios. Por lo tanto, no es aconsejable almacenar los medios sólidos ya plaqueados. La base de agar se puede fraccionar, autoclavar y guardar hasta que sea

necesario. Posteriormente se funde, se agregan los suplementos y se plaquea.

Los medios líquidos pueden ser almacenados. La oxigenación puede corregirse calentando a baño maría (previo a su uso), durante 10 o 15 minutos a partir de la ebullición y enfriando de inmediato.

Un buen indicador de que los medios de cultivo y el procesamiento de la muestra fueron adecuados está asociado a la cantidad y calidad de los microorganismos recuperados. El aislamiento de *B. fragilis* y *C. perfringens* únicamente, no es buen marcador de calidad del proceso, ya que estos microorganismos pueden tolerar ciertos períodos de exposición al oxígeno y no son muy exigentes en cuanto a los requerimientos nutricionales, a diferencia de otros anaerobios obligados como algunos cocos gram positivos, fusobacterias y bacilos pigmentados.

La siembra debe incluir:

1. un medio no selectivo con suplementos adecuados para permitir el desarrollo de los microorganismos más exigentes;
2. un medio con gentamicina o amicacina que inhiba el desarrollo de los microorganismos anaerobios facultativos;
3. un medio líquido para reserva.

- Incubación en atmósfera adecuada

Su aversión por el oxígeno condiciona una metodología microbiológica especial. Si se quieren aislar las especies más sensibles, se requiere el empleo de atmósfera que proporcione un ambiente con un bajo poder de óxido reducción. Esto se puede conseguir por procedimientos catalíticos, en los que el oxígeno es eliminado combinándolo con hidrógeno en presencia de un catalizador. Se usa alguno de los

siguientes sistemas: jarras (fig. 2), cajas (fig. 3), bolsas (fig. 4) y cámara (fig. 5). Esta última es costosa, requiere equipamiento complejo y se usa para estudios en laboratorios altamente especializados. Desde el punto de vista práctico, las jarras y los sobres o bolsas son aceptables para el aislamiento de bacterias anaerobias en el laboratorio clínico.

Las jarras o cajas para anaerobiosis son los sistemas más utilizados para generar una atmósfera anaeróbica. Consisten en una jarra o caja con una tapa que cierra herméticamente. La atmósfera anaerobia puede lograrse por dos métodos diferentes. El más sencillo utiliza un sobre comercial generador de hidrógeno y CO₂ que es activado. El H₂ se combina con el O₂ del aire para formar agua, generando la anaerobiosis. El segundo método consiste en la extracción del aire contenido en la jarra haciendo vacío y sustituyendo el mismo por otro gas libre de O₂ como el nitrógeno. El contenido final de la jarra consiste en una mezcla de gases que contiene 80 - 90 % de nitrógeno, 5 -10 % de hidrógeno y 5 -10 % de CO₂. Se utiliza como indicador de anaerobiosis una tira de papel impregnada en azul de metileno introducida en la jarra junto al material a estudiar.

La bolsa para anaerobiosis consiste en una bolsa plástica transparente, impermeable a los gases, con un indicador de anaerobiosis (azul de metileno o resazurina) y un sobre generador de anaerobiosis igual al utilizado para las jarras. Este sistema resulta práctico cuando se trabaja con pocas muestras o para la realización de los cultivos iniciales.

¿Cuándo examinar las placas?

Cada vez que abrimos una jarra o un sobre estamos exponiendo las colonias de anaerobios al efecto potencialmente deletéreo del oxígeno, que afectará principalmente a los anaerobios estrictos y a los que crecen

lentamente. Por lo tanto, será conveniente efectuar la primera observación de los cultivos luego de 48 horas de incubación.

Algunas especies desarrollan rápidamente produciendo a las 24 horas colonias que permiten comenzar la identificación como las de los géneros *Clostridium* y del grupo *B.fragilis*. Por lo tanto, cuando se sospecha la presencia de estos microorganismos podría hacerse la primera observación a las 24 horas. Las placas deben colocarse nuevamente bajo condiciones anaerobias y continuar la incubación y observación cada 48 horas por lo menos durante 7 días.

¿Cómo continuar el procesamiento?

La simple observación de la colonia no permite diferenciar una especie aislada. Se deben estudiar todos los morfotipos que se encuentran en la muestra y confirmar si se trata de verdaderos anaerobios. El examen de las placas se realizará si es posible con lupa para poder diferenciar mejor las colonias y apreciar sus características. Se enumerarán y cuantificarán según las distintas morfologías. Seleccionados los distintos morfotipos se iniciará la identificación tomando solamente una colonia de cada uno de ellos y se efectuará:

- la descripción morfológica detallada de la colonia: tamaño, forma, bordes, color, opacidad y alguna otra característica importante como *pitting*, fluorescencia, pigmento o hemólisis. Estas características son orientadoras para la identificación; por ejemplo, colonias de bacilos gram negativos que se introducen en el agar harían sospechar en *Campylobacter ureolyticus* o *Campylobacter gracilis*. Colonias de bacilos gram positivos con *spreading*,

sugerirían ser *Clostridium septicum* o *Clostridium tetani*. Colonias de bacilos gram negativos pigmentadas, podrían ser *Porphyromonas* spp. o *Prevotella* spp. Una doble zona de hemólisis es característica de *C. perfringens*;

- coloración de Gram de cada colonia;
- incubación anaerobia de subcultivos de cada colonia en placa de agar sangre anaerobia y en medios adicionales teniendo en cuenta la morfología de la colonia y la coloración al Gram;
- confirmación del carácter anaerobio y tolerancia al oxígeno. Una porción de la colonia se sembrará en dos placas de agar chocolate que se incubarán en atmósfera de CO₂ y en aerobiosis. La ausencia de desarrollo en estas placas confirma que se trata de una bacteria anaerobia;
- identificación: en función de lo observado anteriormente;
- sensibilidad a los antimicrobianos.

b) Métodos miniaturizados, automatizados y moleculares

Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se basan en las características observables de las bacterias, como morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas. El cultivo, cuando es factible, continúa siendo el método diagnóstico de elección, permite el aislamiento del microorganismo implicado, su identificación, el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos y facilita la aplicación de marcadores epidemiológicos.

Existen en el mercado sistemas o equipos multipuebas que permiten conseguir una mayor rapidez en la identificación de algunas bacterias. Estos sistemas pueden ser manuales o automatizados.

Los sistemas comerciales manuales son celdillas aisladas con sustrato liofilizado que se inoculan individualmente y que permiten realizar simultáneamente varias pruebas bioquímicas. Una vez inoculada la galería con la suspensión del microorganismo a identificar, incubar en condiciones de anaerobiosis. Los resultados de las pruebas se expresan en forma numérica. En el mercado está disponible el sistema miniaturizado API [sistema API 20 A, Rapid ID 32 A (bioMérieux®, Marcy, l'Étoile, Francia)]. La inoculación y la lectura de estos paneles se suele hacer de forma automática, se incorporan los datos obtenidos en un programa de computadora y se obtiene con un alto índice de confiabilidad la identificación del microorganismo. Los sistemas comerciales disponibles en el mercado son: MicroScan, Vitek, Pasco, Wider y Phoenix.

Con los sistemas de identificación fenotípica, no todas las cepas de una misma especie repiten una característica específica lo que puede generar diferentes resultados en ensayos repetidos. Por esto se han introducido los métodos genotípicos de identificación como procedimientos complementarios o alternativos. En algunos casos decididamente éstos no son necesarios porque con los métodos fenotípicos se logra una identificación confiable y rápida. Es el caso de muchos bacilos gram negativos como los del grupo *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium* spp., especies de *Clostridium*; en cambio, con muchas de las especies de bacilos gram positivos no esporulados y de cocos gram positivos, la identificación definitiva sólo se obtiene, mediante estudios de secuenciación del gen 16S ARNr u otros. Una amplia variedad de genes han sido utilizados como blancos moleculares en los estudios taxonómicos o de filogenia. El análisis del ARNr 16S es el marcador inicial y en numerosas situaciones es suficiente para realizar una buena identificación. En otras circunstancias, la alta homología genética presente en determinados géneros bacterianos o un cambio reciente en su taxonomía, no permite realizar con el ARNr 16S una identificación correcta. En estos casos, podemos recurrir a

otros genes dianas, como el análisis del espacio intergénico del 16S-23S ARNr, del ARNr 23S y del *rpoB* (subunidad β de la ARN polimerasa).

Las técnicas de proteómica abordan el estudio de un conjunto de proteínas. Las más usadas se basan en la electroforesis y en la espectrometría de masas. Esta última permite analizar con gran precisión la medición de iones derivados de moléculas, separándolos en función de su relación masa/carga⁹.

La utilización de la espectrometría de masas [*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS)] presenta como ventaja una alta tasa de identificación y rapidez, ya que se obtienen resultados confiables en menos de un minuto. Mientras algunos estudios muestran porcentajes de identificación correcta muy satisfactorios, otros ofrecen porcentajes que no van más allá del 60-70 %. La mayor parte de los estudios referidos coinciden en la importancia de la amplitud de la base de datos para obtener buenos resultados con este sistema⁴¹.

Fallas en el procesamiento y aislamiento de anaerobios

Las principales fallas en el procesamiento y aislamiento de anaerobios pueden resumirse en los puntos que se mencionan a continuación:

- demora en la siembra con la consiguiente exposición prolongada de la muestra al aire ambiental;
- el uso de un medio líquido como único medio de cultivo. Algunos anaerobios pueden no desarrollar en medio líquido aún con el agregado de nutrientes especiales. Si hay más de un microorganismo es necesario usar un medio sólido para poder aislarlo y, en este caso, la recuperación es dificultosa;
- el uso de medios oxigenados;
- no agregar vitamina K1 y/o hemina, necesarias para algunos anaerobios;

- no usar los medios selectivos apropiados;
- no continuar la incubación hasta por lo menos 5 a 7 días;
- exponer las placas cultivadas al aire. Algunos anaerobios exigentes requieren que la exposición al aire no sea superior a 15 minutos;
- falta de control de calidad en los medios de cultivo y reactivos.

Bibliografía

1. Appleman MD, Heseltine PNR, Cherubin CE. Epidemiology, antimicrobial susceptibility, pathogenicity and significance of *Bacteroides fragilis* Group organisms isolated at Los Angeles County-University of Southern California Medical Center. Rev Infect Dis. 1991;13:12-8.
2. Asensi V, Carton JA, Maradona JA, Asensi JM, Perez F, Redondo P, Lopez A, Arribas JM. Imipenem therapy of brain abscesses. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1996;15:653-7.
3. Aucher P, Saunier JP, Grollier G, Sebald M, Fauchere JL. Meningitis due to enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1996;15:820-3.
4. Baron E, Song Y, Finegold S, Wade WG, Könönen E, Stevens DL, Bryant AE, Berger A, von Eichel-Streiber C, Citron M. Approaches to identification of anaerobic bacteria. En: Versalovic J, Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landri M, Warnock D, editors. Manual of Clinical Microbiology, 10th edition. Washington DC, ASM Press, 2011, p. 799-801.
5. Bartlett JG, Finegold SM. 1972. Anaerobic pleuropulmonary infections. Medicine. 1972; 6:413-50.
6. Bassa A, García Gasalla M, Losada I, Payeras A, Pareja A, Garau M, Gallegos C. Bacteriemia por anaerobios estrictos: estudio de 68 pacientes. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010; 28:144-9
7. Bianchini HM. Cambios en la resistencia a los antibióticos de los bacilos gram negativos anaerobios, frecuentemente aislados de infecciones humanas en nuestro medio. Tesis de Doctorado de la Universidad de Buenos Aires 2004. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.
8. Bisharat N, Goldstein L, Raz R, Elías M. Gram-negative anaerobic endocarditis: two cases reports and review of the literature. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2001;20:651-4.
9. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29:601-8.
10. Brook I. Bacteroides infections in children. J Med Microbiol. 1995;43:92-8.
11. Brook I. Diagnóstico y manejo de las infecciones anaeróbicas de la cabeza y el cuello. Anaerobia - Boletín Latinoamericano de la Anaerobe Society of the Americas (ASA). 1995;2:1-3.

12. Brook I, Finegold SM. Bacteriología aerobia y anaerobia de los abscesos cutáneos en los niños. *Pediatrics* (ed.esp) 1981;11:87-91.
13. Brook I, Frazier E. Clinical and microbiological features of necrotizing fasciitis. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2382-7.
14. Brook I, Frazier E. Aerobic and anaerobic microbiology of retroperitoneal abscesses. *Clin Infect Dis.* 1998;26:938-41.
15. Brook I, Burke P. The management of acute, serous and chronic otitis media: the role of anaerobic bacteria. *Hosp Infect.* 1992;22:75-87.
16. Di Martino A, Fernández N, Cattaneo S, Castro G, Asulay C, Altclas J, Efron E, Salgueira C, Catalano M. Infecciones del sistema nervioso central por *Bacteroides* del grupo *fragilis*. VII Congreso Latinoamericano de Microbiología Pediátrica. II Congreso Colombiano de Infectología, 1995. Cartagena de Indias, Colombia. Presentación oral.
17. Dorsher CW, Roseblatt JE, Wilson WR, Ilstrup DM. Anaerobic bacteremia: decreasing rate over 15 year period *Rev Infect Dis.* 1995;13:633-6.
18. Euzéby JP. List of Prokariotic names with standing in nomenclature. Disponible en: www.bacterio.cict.fr/html. Consultado el 24 de julio de 2014.
19. Fernández Canigia L, Nogueira Moreira A, Furman C, Piovano S, Bianchini H. Microbiological assesment of subgingival plaques from argentinian patients with adult periodontitis. *Anaerobe.* 1999;5:263-5.
20. Finegold S, Baron E, Wexler H. A clinical guide to anaerobic infection. Star Publishing Company USA. 1992.
21. Finegold SM. Anaerobic infections in humans: an overview. *Anaerobe.* 1995;1:3-9.
22. Finegold S, Flynn M, Rose F, Jousimies-Somer H, Jakielastzek C, Teague M, Wexler H, Berkowitz E, Wynne B. Bacteriologic findings associated with chronic bacteria maxillary sinusitis in adults. *Clin Infect Dis.* 2002;35:428-33.
23. Hentges DJ. The anaerobic microflora of the human body. *Clin Infect Dis.* 1993;16:S175-80.
24. Jousimies-Somer HR, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler HM, Finegold SM. *Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual.* 6th. edition. Star Publishing Company. Belmont, California, USA, 2002.

25. Krol J, Florek M, Pliszczyk-Krol A, Staroniewicz Z. Microbiologic analysis of bite wounds in humans caused by dogs and cats. *Medycyna Weterynaryjna*. 2006;62:498-501.
26. Lassman B, Gustafson D, Wood C, Roseblatt J. Reemergence of anaerobic bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2007;44:895-900.
27. Martínez-Gómez D, Ramírez-Almagro C, Campillo-Soto A, Morales-Cuenca G, Pagán-Ortiz J, Aguayo-Albasini J. 2009. Infecciones del pie diabético. Prevalencia de los distintos microorganismos y sensibilidad a los antimicrobianos. *Enf Infecc Med Clin*. 27:317-21.
28. Newman M G, Nisengard R. *Oral Microbiology and Immunology*. WB Saunders Company. Philadelphia, USA, 1988.
29. Nogueira Moreira A, Fernández Canigia L, Furman C, Chiappe V, Marcantoni M, Bianchini H. Estudio clínico y microbiológico de la enfermedad periodontal del adulto. *Rev Argent Microbiol*. 2001;33:133-40.
30. Peterson M L, Hovde L V, Wright D H, Hoang A D, Raddatz J K , Boysen P J, Rotschafer J C. Fluoroquinolones resistance in *Bacteroides fragilis* following sparfloxacin exposure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;49:2251-5.
31. Puapermpoonsiri S, Kato N, Watanabe K, Ueno K, Chongsomchai Ch, Lumbiganon P. Vaginal microflora associated with bacterial vaginosis in Japanese and Thai pregnant women. *Clin Infect Dis*. 1996;23:748-52.
32. Santoianni J E, Abalo A B, Figueroa A S, Predari S C. Meningitis por *Bacteroides distasonis*. *Medicina*. 1989;49:357-9.
33. Sears C L, Myers LL, Lazenby A, Van Tassell R L. 1995. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Clin Infect Dis*. 20:142-8.
34. Smayevsky J, Fernández Canigia L, Lanza A, Bianchini H. Vaginal microflora associated with bacterial vaginosis in nonpregnant women: reliability of sialidase detection. *Dis Obstet Gynecol*. 2001;9:17-22.
35. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque *J Clin Periodontol*. 1998;25:134-44.
36. Strong C, Wexler H, and F S. Wadsworth *Anaerobic Bacteriology Manual*. 5th ed. Star Publishing Company, USA, 1993.
37. Suárez Lescay C, Infante Carbonell M. Mionecrosis por clostridio: una enfermedad de

todos los tiempos. MEDISAN 2010;15:112.

38. Suata K, Watanabe K, Ueno K, Hama M. Antimicrobial susceptibility patterns and resistance transferability among *Bacteroides fragilis* group isolates from patients with appendicitis in Bali, Indonesia. Clin Infect Dis. 1993;16:561-6.

39. Summanen P, Baron E, Citron D, Strong C, Wexler H, Tenover FC. Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual, 5th edition. Star Publishing Company, USA, 1993, p. 1-20.

40. Templeton III WC, Wawrukiewicz A, Melo JC, Schiller MG, Raff MJ. Anaerobic osteomyelitis of long bones. Rev Infect Dis. 1983;5:692-711.

41. Vega-Castaño S, Ferreira L, González-Avila M, Sánchez-Juanes F, García-García MI, García-Sánchez JE, González-Buitrago JM, Muñoz-Bellido JL. Eficacia de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la identificación de bacterias anaerobias Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012;30:597-601.

Tabla 1. Clasificación de las bacterias según su requerimiento de oxígeno

Grupos	Crecimiento en:			
	Aire +/- 21 % O ₂	Inc. en CO ₂ y 15 % O ₂	Microaerobiosis 5 % O ₂	0 % O ₂
Aerobio obligado	++++	++++	+++	V
Microaerófilo	0	+++	++++	V
Anaerobio facultativo	++++	++++	++++	++++
Anaerobio aerotolerante	+	++	+++	++++
Anarobio obligado	0	0	0	++++

Inc: incubación, V: variable, +++++: desarrollo abundante, +++: desarrollo abundante colonias pequeñas, ++: escaso desarrollo colonias pequeñas, +: muy escaso desarrollo, 0: sin desarrollo

Tabla 3. Incidencia de bacterias anaerobias en la microbiota residente humana

Microorganismos	Áreas colonizadas							
	Piel	Tracto resp. superior	Cavidad oral	Intestino	Genitales externos	Uretra	Vagina	Endo-cervix
Gram positivos								
<i>Clostridium</i> spp.	0	0	0	v	0	v	v	v
<i>Actinomyces</i> spp.	0	+	+	v	0	0	v	0
<i>Bifidobacterium</i> spp.	0	0	+	++	0	0	v	0
<i>Eubacterium</i> spp.	v	V	+	++	ND	ND	v	v
<i>Lactobacillus</i> spp.	0	0	+	++	0	v	++	+
<i>Propionibacterium</i> spp.	+	+	v	v	ND	0	v	v
Cocos	+	+	++	++	+	V	++	++
Gram negativos								
Grupo <i>Bacteroides fragilis</i>	0	0	0	++	v	v	v	v
<i>Fusobacterium</i> spp.	0	+	++	+	v	v	v	v
<i>Prevotella</i> spp.	0	++	++	+	v	ND	v	v
<i>Porphyromonas</i> spp.	0	+	++	+	v	ND	v	v
Otros bacilos	0	++	++	++	+	+	+	+
Cocos	0	+	+	+	0	ND	v	v

v: variable, ++: desarrollo abundante, +: desarrollo escaso, ND: no detectado, 0: sin desarrollo.

Tabla 4. Infecciones asociadas a bacterias anaerobias

Infección	Cultivo positivo de bacterias anaerobias
Bacteriemias	10 a 84 % ⁽¹⁹⁾ ; 7 % ⁽¹⁾ ; 20 % ⁽⁵⁾
Endocarditis	2 casos ⁽⁸⁾
Infecciones de cabeza y cuello	
Meningitis	17 % ⁽³⁾ , 22 % ⁽³¹⁾
Sinusitis	48 % ⁽²¹⁾ ; 2 % ⁽¹⁰⁾
Abscesos	89 % ⁽¹⁰⁾ ; 39 % ⁽²⁾
Otitis	33 a 59 % ⁽³⁵⁾ ; 27 % ⁽¹⁴⁾
Enfermedad periodontal	64 % ⁽³⁴⁾
Abscesos dentales	89 -100 % ⁽²⁹⁾
Infecciones respiratorias	
Neumonía aspirativa	16 % ⁽⁶⁾
Abscesos de pulmón	51 a 84 % ⁽⁶⁾
Empiema	6 a 17 % ⁽⁶⁾ ; 10 % ⁽¹⁰⁾
Infecciones abdominales	
Peritonitis	51 % ⁽³⁷⁾ ; 93 % ⁽⁹⁾
Heridas posquirúrgicas	76 % ⁽¹⁾
Aborto séptico	79 % ⁽¹³⁾
Piel y tejidos blandos	
Mordeduras	5 % ⁽¹²⁾ ; 20-75 % ⁽²⁴⁾
Pie diabético	25 % ⁽²⁶⁾
Abscesos cutáneos	26 % ⁽¹⁹⁾
Úlceras de decúbito	15 % ⁽⁹⁾
Gangrena gaseosa	100 % ⁽³⁶⁾
Osteomielitis	35 a 91 % ⁽³⁸⁾
Fascitis necrotizante	90 % ⁽¹²⁾

Tabla 5. Muestras apropiadas para el cultivo de bacterias anaerobias

Localización	Muestra	Método
Cabeza, cuello	Colección	Punción-aspiración percutánea, biopsia
Sistema nervioso central	Tejido	
Periodontal	Colección profunda del surco gingival	Raspado y absorción con conos de papel estéril Aspiración con aguja
Oído medio	Secreción	Punción-aspiración
Senos paranasales	Colección	Punción-aspiración a través del ostium
Pulmonar	Absceso	Punción percutánea
	Tejido	Biopsia
	Secreción broncoalveolar	Aspiración traqueal o con cepillo protegido
	Líquido pleural	Punción-aspiración
Articulaciones	Líquido articular	Punción percutánea
Hueso	Tejido	Biopsia
Partes blandas	Tejido	Biopsia
Tracto genital femenino	Material purulento	Punción-aspiración por piel sana
	Líquido peritoneal	Laparoscopia o cirugía
	Material de endometrio	Aspirado endometrial con catéter
	Tejido	Biopsia
	DIU	Extracción del dispositivo
Abdominal	Líquido peritoneal	Punción percutánea
	Absceso	Aspirado obtenido en cirugía, guiado por TAC o ecografía
	Bilis	Punción vesicular
	Tejido	Biopsia
Aparato circulatorio	Sangre	Venopuntura
Orina	Orina vesical	Punción suprapúbica

DIU: dispositivo intrauterino, TAC: tomografía axial computarizada.

Figura 2. Jarra para anaerobiosis



Figura 3. Caja para anaerobiosis



Figura 4. Bolsa para anaerobiosis



Figura 5. Cámara para anaerobiosis

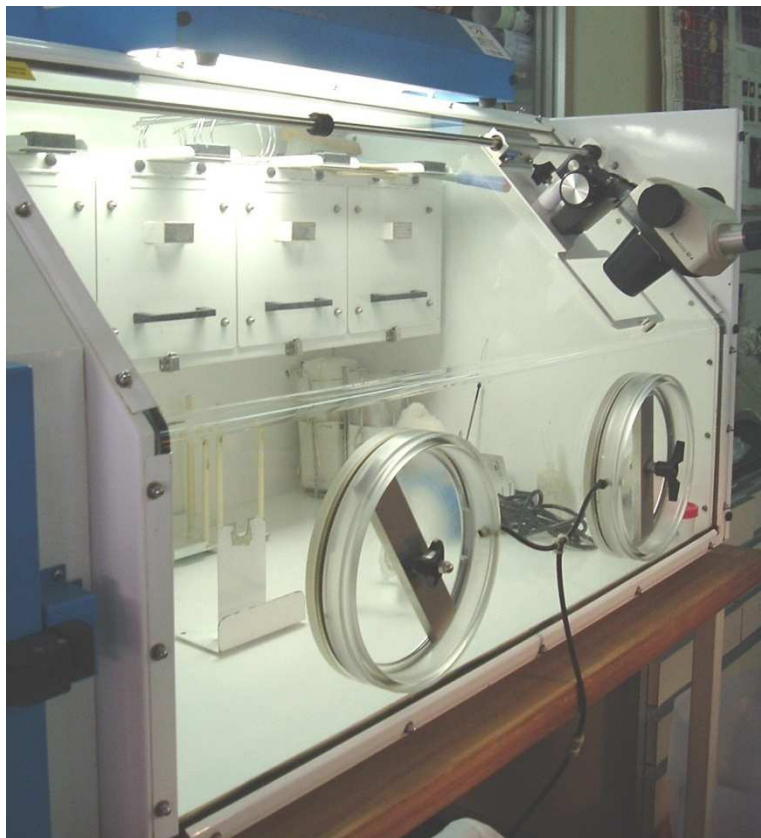


Tabla 2. Nomenclatura de las bacterias anaerobias aisladas con mayor frecuencia de muestras clínicas

Nomenclatura actual	Nuevas especies y modificaciones desde el año 2000	Nomenclatura actual	Nuevas especies y modificaciones desde el año 2000
Bacilos gram negativos			
<i>Akkermansiamuciniphila</i>	Nueva especie	<i>Megamonas funiformis</i>	Nueva especie
		<i>Megamonas hypermegale</i>	
<i>Alistipes finegoldii</i>	Nueva especie	<i>Megamonas rupellensis</i>	Nueva especie
<i>Alistipes indistinctus</i>	Nueva especie		
<i>Alistipes onderdonkii</i>	Nueva especie	<i>Mitsuokella multiacida</i>	
<i>Alistipes putredinis</i>	<i>Bacteroides putredinis</i>		
<i>Alistipes senegalensis</i>	Nueva especie	<i>Odoribacter laneus</i>	Nueva especie
<i>Alistipes shahii</i>	Nueva especie	<i>Odoribacter splanchnicus</i>	<i>Bacteroides</i>
<i>Alistipes timonensis</i>	Nueva especie		
		<i>Parabacteroides distasonis</i>	<i>Bacteroides distasonis</i>
<i>Alloprevotella rava</i>	Nueva especie	<i>Parabacteroides goldsteinii</i>	<i>Bacteroides goldsteinii</i>
<i>Alloprevotella tannerae</i>	<i>Prevotella tannerae</i>	<i>Parabacteroides gordonii</i>	Nueva especie
		<i>Parabacteroides johnsonii</i>	Nueva especie
<i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i>		<i>Parabacteroides merdae</i>	<i>Bacteroides merdae</i>
<i>Anaerobiospirillum thomasii</i>		<i>Paraprevotella clara</i>	Nueva especie
		<i>Paraprevotella xylaniphila</i>	Nueva especie
		<i>Parasutterella</i>	Nueva especie
<i>Anaerorhabdus furcosa</i>	<i>Bacteroides furcosus</i>	<i>excrementihominis</i>	
<i>Anaerospira hongkongensis</i>	Nueva especie	<i>Parasutterella secunda</i>	Nueva especie
		<i>Phocaeicola abscessus</i>	Nueva especie
<i>Bacteroides caccae</i>		<i>Porphyromonas</i>	
<i>Bacteroides cellulosilyticus</i>	Nueva especie	<i>asaccharolytica</i>	
<i>Bacteroides clarus</i>	Nueva especie	<i>Porphyromonas bennoni</i>	Nueva especie
<i>Bacteroides coagulans</i>		<i>Porphyromonas cangingivalis</i>	
<i>Bacteroides coprocola</i>	Nueva especie	<i>Porphyromonas canoris</i>	
<i>Bacteroides scopophilus</i>	Nueva especie	<i>Porphyromonas cansulci</i>	
<i>Bacteroides dorei</i>	Nueva especie	<i>Porphyromonas catoniae</i>	<i>Oribaculum catoniae</i>
<i>Bacteroides seggerthii</i>		<i>Porphyromonas circudentaria</i>	
<i>Bacteroides faecis</i>	Nueva especie	<i>Porphyromonas crevioricanis</i>	
<i>Bacteroides finegoldii</i>	Nueva especie	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	
<i>Bacteroides fluxus</i>	Nueva especie	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	
<i>Bacteroides fragilis</i>		<i>Porphyromonas gingivicanis</i>	
<i>Bacteroides galacturonicus</i>		<i>Porphyromonas gulae</i>	
<i>Bacteroides intestinalis</i>	Nueva especie	<i>Porphyromonas levii</i>	
<i>Bacteroides massiliensis</i>	Nueva especie	<i>Porphyromonas macacae</i>	<i>Porphyromonas salivosa</i>
<i>Bacteroides nordii</i>	Nueva especie	<i>Porphyromonas somerae</i>	Nueva especie
<i>Bacteroides oleiciplenus</i>	Nueva especie	<i>Porphyromonas uenonis</i>	Nueva especie
<i>Bacteroides ovatus</i>			
<i>Bacteroides plectinophilus</i>		<i>Prevotella amnii</i>	Nueva especie
<i>Bacteroides plebeius</i>	Nueva especie	<i>Prevotella aurantiaca</i>	Nueva especie
<i>Bacteroides pyogenes</i>		<i>Prevotella baroniae</i>	Nueva especie
<i>Bacteroides salyersiae</i>	Nueva especie	<i>Prevotella bergensis</i>	Nueva especie
<i>Bacteroides stercoris</i>	Nueva especie	<i>Prevotella bivia</i>	<i>Bacteroides bivius</i>
<i>Bacteroides</i>		<i>Prevotella buccae</i>	<i>Bacteroides buccae</i>
<i>thetaiotaomicron</i>		<i>Prevotella buccalis</i>	<i>Bacteroides buccalis</i>
<i>Bacteroides uniformis</i>		<i>Prevotella copri</i>	Nueva especie
<i>Bacteroides vulgatus</i>		<i>Prevotella corporis</i>	

<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	Nueva especie	<i>Prevotella dentalis</i>	
		<i>Prevotella denticola</i>	
<i>Barnesiella intestinhominis</i>	Nueva especie	<i>Prevotella disiens</i>	
		<i>Prevotella enoeca</i>	
		<i>Prevotella fusca</i>	Nueva especie
<i>Bilophila wadsworthia</i>		<i>Prevotella heparinolytica</i>	
		<i>Prevotella histicola</i>	Nueva especie
<i>Campylobacter curvus</i>		<i>Prevotella intermedia</i>	
<i>Campylobacter gracilis</i>	<i>Bacteroides gracilis</i>	<i>Prevotella jejuni</i>	Nueva especie
<i>Campylobacter rectus</i>		<i>Prevotella loescheii</i>	
<i>Campylobacter ureolyticus</i>	<i>Bacteroides ureolyticus</i>	<i>Prevotella maculosa</i>	Nueva especie
		<i>Prevotella marshii</i>	Nueva especie
<i>Catonella morbi</i>		<i>Prevotella melaninogenica</i>	
		<i>Prevotella micans</i>	Nueva especie
<i>Centipeda periodontii</i>		<i>Prevotella multiformis</i>	Nueva especie
		<i>Prevotella multisaccharivorax</i>	Nueva especie
<i>Desulfomicrobium orale</i>	Nueva especie	<i>Prevotella nanceiensis</i>	Nueva especie
		<i>Prevotella nigrescens</i>	
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>		<i>Prevotella oralis</i>	
<i>Desulfovibrio fairfieldensis</i>		<i>Prevotella oris</i>	
<i>Desulfovibrio piger</i>	<i>Desulfomonas pigra</i>	<i>Prevotella oulorum</i>	
		<i>Prevotella pallens</i>	
<i>Dialister invisus</i>	Nueva especie	<i>Prevotella pleuritidis</i>	Nueva especie
<i>Dialister micraerophilus</i>	Nueva especie	<i>Prevotella saccharolytica</i>	Nueva especie
<i>Dialister pneumosintes</i>	Nueva especie	<i>Prevotella salivae</i>	Nueva especie
<i>Dialister propionicifaciens</i>	Nueva especie	<i>Prevotella scopos</i>	Nueva especie
<i>Dialister succinatiphilus</i>	Nueva especie	<i>Prevotella shahii</i>	Nueva especie
		<i>Prevotella stercorea</i>	Nueva especie
<i>Fusobacterium gonidiaformans</i>		<i>Prevotella timonensis</i>	Nueva especie
		<i>Prevotella veroralis</i>	
<i>Fusobacterium mortiferum</i>		<i>Prevotella zoogloformans</i>	
<i>Fusobacterium naviforme</i>			
<i>Fusobacterium necrogenes</i>		<i>Pseudoflavonifractor capillosus</i>	<i>Bacteroides capillosus</i>
<i>Fusobacterium necrophorum</i>		<i>Pyramidobacter piscolens</i>	Nueva especie
<i>Fusobacterium nucleatum</i>		<i>Selenomonas artemidis</i>	
<i>Fusobacterium perfoetens</i>		<i>Selenomonas diana</i>	
<i>Fusobacterium periodonticum</i>		<i>Selenomonas flueggei</i>	
		<i>Selenomonas infelix</i>	
<i>Fusobacterium russii</i>		<i>Selenomonas noxia</i>	
<i>Fusobacterium ulcerans</i>		<i>Selenomonas sputigena</i>	
<i>Fusobacterium varium</i>			
		<i>Sneathia sanguinegens</i>	<i>Leptotrichia sanguinegens</i>
<i>Hallella seregenes</i>			
		<i>Suterella parvirubra</i>	Nueva especie
<i>Johnsonella ignava</i>		<i>Suterella wadsworthensis</i>	
<i>Jonquetella anthropi</i>	Nueva especie	<i>Tannerella forsythia</i>	<i>Bacteroides forsythus</i>
<i>Leptotrichia buccalis</i>			
<i>Leptotrichia goodfellowii</i>	Nueva especie		
<i>Leptotrichia hofstadii</i>	Nueva especie		
<i>Leptotrichia hongkongensis</i>	Nueva especie		
<i>Leptotrichia shahii</i>	Nueva especie		
<i>Leptotrichia trevisanii</i>	Nueva especie		
<i>Leptotrichia wadei</i>	Nueva especie		
Bacilos gram positivos no esporulados			

<i>Actinobaculum massiliense</i>	Nueva especie	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	<i>Fusobacterium prausnitzii</i>
<i>Actinobaculum schaalii</i>			
<i>Actinobaculum urinale</i>	Nueva especie		
		<i>Filifactor alocis</i>	<i>Fusobacterium alocis</i>
<i>Actinomyces cardiffensis</i>	Nueva especie	<i>Filifactor villosus</i>	<i>Clostridium villosum</i>
<i>Actinomyces dentalis</i>	Nueva especie	<i>Flavonifractorplautii</i>	<i>Eubacterium plautii</i>
<i>Actinomyces europaeus</i>			
<i>Actinomyces funkei</i>	Nueva especie	<i>Gordonibacter pamelaeeae</i>	Nueva especie
<i>Actinomyces georgiae</i>			
<i>Actinomyces gerencseriae</i>		<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
<i>Actinomyces graevenitzii</i>		<i>Lactobacillus antri</i>	Nueva especie
<i>Actinomyces hominis</i>	Nueva especie	<i>Lactobacillus casei</i>	
<i>Actinomyces hongkongensis</i>	Nueva especie	<i>Lactobacillus brevis</i>	
		<i>Lactobacillus buchneri</i>	
<i>Actinomyces israelii</i>		<i>Lactobacilluscoleohominis</i>	Nueva especie
<i>Actinomyces johnsonii</i>	Nueva especie	<i>Lactobacillus crispatus</i>	
<i>Actinomyces massiliensis</i>	Nueva especie	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
<i>Actinomyces meyeri</i>		<i>Lactobacillus fermentum</i>	
<i>Actinomyces naeslundii</i>		<i>Lactobacillus formicalis</i>	Nueva especie
<i>Actinomyces nasicola</i>	Nueva especie	<i>Lactobacillus gasseri</i>	
<i>Actinomyces neuii</i>		<i>Lactobacillus gastricus</i>	Nueva especie
<i>Actinomyces odontolyticus</i>		<i>Lactobacillus iners</i>	
<i>Actinomyces oricola</i>	Nueva especie	<i>Lactobacillus jensenii</i>	
<i>Actinomyces oris</i>	Nueva especie	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	
<i>Actinomyces radidentis</i>	Nueva especie	<i>Lactobacillus kalixensis</i>	Nueva especie
<i>Actinomyces radingae</i>		<i>Lactobacillus oris</i>	
<i>Actinomyces timonensis</i>	Nueva especie	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	
<i>Actinomyces turicensis</i>		<i>Lactobacillus paracasei</i>	
<i>Actinomyces urogenitalis</i>	Nueva especie	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	
<i>Actinomyces viscosus</i>		<i>Lactobacillus plantarum</i>	
		<i>Lactobacillus reuteri</i>	
<i>Adlercreutzia equolifaciens</i>	Nueva especie	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	
		<i>Lactobacillus rogosae</i>	
<i>Alloscardovia omnicolens</i>	Nueva especie	<i>Lactobacillus salivarius</i>	
		<i>Lactobacillus saniviri</i>	Nueva especie
<i>Anaerofustis stercorihominis</i>	Nueva especie	<i>Lactobacillus sakei</i>	
		<i>Lactobacillus senioris</i>	Nueva especie
		<i>Lactobacillus ultunensis</i>	Nueva especie
<i>Anaerostipes caccae</i>	Nueva especie		
<i>Anaerostipes hadrus</i>	<i>Eubacterium hadrum</i>	<i>Lactobacterium casei</i>	
<i>Anaerostipes rhamnosivorans</i>	Nueva especie		
		<i>Lactonifactor longoviformis</i>	Nueva especie
<i>Anaerotruncus colihominis</i>	Nueva especie	<i>Marvinbryantia formatexigens</i>	Nueva especie
<i>Atopobium minutum</i>		<i>Mobiluncus curtisii</i>	
<i>Atopobium parvulum</i>		<i>Mobiluncus mulieris</i>	
<i>Atopobium rimae</i>			
<i>Atopobium vaginae</i>		<i>Mogibacterium diversum</i>	Nueva especie
		<i>Mogibacterium neglectum</i>	Nueva especie
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>		<i>Mogibacterium pumilum</i>	Nueva especie
		<i>Mogibacterium timidum</i>	<i>Eubacterium timidum</i>
<i>Bifidobacterium angulatum</i>		<i>Mogibacterium vescum</i>	Nueva especie
<i>Bifidobacterium bifidum</i>			
<i>Bifidobacterium breve</i>		<i>Moryella indoligenes</i>	Nueva especie
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>			
		<i>Olsenella profusa</i>	Nueva especie
<i>Bifidobacterium dentium</i>		<i>Olsenella uli</i>	<i>Lactobacillus uli</i>

<i>Bifidobacterium gallicum</i>			
<i>Bifidobacterium kashiwanohense</i>	Nueva especie	<i>Oribacterium sinus</i>	Nueva especie
<i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>		<i>Paraeggerthella hongkongensis</i>	<i>Eggerthella hongkongensis</i>
<i>Bifidobacterium scardovii</i>	Nueva especie	<i>Parascardovia denticolens</i>	<i>Bifidobacterium denticolens</i>
<i>Bifidobacterium stercoris</i>	Nueva especie		
		<i>Propionibacterium acidifaciens</i>	
<i>Bulleidia extracta</i>	Nueva especie	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	
		<i>Propionibacterium acnés</i>	
<i>Catabacter hongkongensis</i>	Nueva especie	<i>Propionibacterium avidum</i>	
		<i>Propionibacterium</i>	
<i>Catenibacterium mitsuokai</i>	Nueva especie	<i>Propionibacterium granulosum</i>	
		<i>Propionibacterium jensenii</i>	
<i>Collinsella aerofaciens</i>	<i>Eubacterium aerofaciens</i>	<i>Propionibacterium lymphophilum</i>	Nueva especie
		<i>Propionibacterium propionicum</i>	
<i>Collinsella intestinalis</i>	Nueva especie	<i>Propionibacterium thoenii</i>	
<i>Collinsella stercoris</i>	Nueva especie		
<i>Collinsella tanakaei</i>	Nueva especie	<i>Propioniferax innocua</i>	<i>Propionibacterium innocua</i>
<i>Cryptobacterium curtum</i>		<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	
<i>Dorea formicigenerans</i>	<i>Eubacterium formicigenerans</i> Nueva especie	<i>Roseburia faecis</i>	Nueva especie
		<i>Roseburia hominis</i>	Nueva especie
<i>Dorea longicatena</i>		<i>Roseburia intestinalis</i>	Nueva especie
		<i>Roseburia inulinivorans</i>	Nueva especie
<i>Eggerthella lenta</i>	<i>Eubacterium lentum</i>		
<i>Eggerthella sinensis</i>	Nueva especie	<i>Scardovia inopinata</i>	<i>Bifidobacterium inopinatum</i>
<i>Eggerthia catenaformis</i>	<i>Lactobacillus catenaformis</i>	<i>Scardovia wiggsiae</i>	Nueva especie
		<i>Shuttleworthia satelles</i>	Nueva especie
<i>Eubacterium barkeri</i>			
<i>Eubacterium bifforme</i>		<i>Slackia equolifaciens</i>	Nueva especie
<i>Eubacterium brachy</i>		<i>Slackia exigua</i>	
<i>Eubacterium combesii</i>		<i>Slackia heliotrinireducens</i>	
<i>Eubacterium contortum</i>		<i>Slackia isoflavinoconvertens</i>	Nueva especie
<i>Eubacterium cylindroides</i>		<i>Slackia piriformis</i>	Nueva especie
<i>Eubacterium dolichum</i>			
<i>Eubacterium eligens</i>		<i>Solobacterium moorei</i>	Nueva especie
<i>Eubacterium hallii</i>			
<i>Eubacterium infirmum</i>		<i>Stomatobaculum longum</i>	Nueva especie
<i>Eubacterium limosum</i>			
<i>Eubacterium minutum</i>		<i>Turcibacter sanguinis</i>	Nueva especie
<i>Eubacterium moniliforme</i>			
<i>Eubacterium multiforme</i>		<i>Varibaculum cambriense</i>	Nueva especie
<i>Eubacterium nodatum</i>			
<i>Eubacterium ramulus</i>			
<i>Eubacterium rectale</i>			
<i>Eubacterium saburreum</i>			
<i>Eubacterium saphenum</i>			
<i>Eubacterium siraeum</i>			
<i>Eubacterium sulci</i>	<i>Fusobacterium sulci</i>		
<i>Eubacterium tenue</i>			
<i>Eubacterium tortuosum</i>			
<i>Eubacterium ventriosum</i>			

<i>Eubacterium yurii</i>			
Bacilos gram positivos esporulados			
<i>Clostridium aldenense</i>	Nueva especie	<i>Clostridium paraperfringens</i>	<i>Clostridium baratii</i>
<i>Clostridium argentinense</i>		<i>Clostridium paraputrificum</i>	
<i>Clostridium asparagiforme</i>	Nueva especie	<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Clostridium bifermentans</i>		<i>Clostridium propionicum</i>	
<i>Clostridium bolteae</i>	Nueva especie	<i>Clostridium putrificum</i>	
<i>Clostridium botulinum</i>		<i>Clostridium ramosum</i>	
<i>Clostridium butyricum</i>		<i>Clostridium rectum</i>	
<i>Clostridium cadaveris</i>		<i>Clostridium roseum</i>	
<i>Clostridium carnis</i>		<i>Clostridium scindens</i>	
<i>Clostridium celatum</i>		<i>Clostridium senegalense</i>	
<i>Clostridium citroniae</i>	Nueva especie	<i>Clostridium septicum</i>	
<i>Clostridium clostridioforme</i>		<i>Clostridium sordelli</i>	
<i>Clostridium difficile</i>		<i>Clostridium sphenoides</i>	
<i>Clostridium glycyrrhizinilyticum</i>	Nueva especie	<i>Clostridium spiroforme</i>	
<i>Clostridium hastiforme</i>	<i>Tissierella preacuta</i>	<i>Clostridium sporogenes</i>	
<i>Clostridium hiranonis</i>	Nueva especie	<i>Clostridium subterminale</i>	
<i>Clostridium histolyticum</i>		<i>Clostridium symbiosum</i>	
<i>Clostridium hylemonae</i>	Nueva especie	<i>Clostridium tertium</i>	
<i>Clostridium indolis</i>		<i>Clostridium tetani</i>	
<i>Clostridium innocuum</i>			
<i>Clostridium lavalense</i>	Nueva especie	<i>Hungatella hatewayi</i>	<i>Clostridium hatewayi</i>
<i>Clostridium limosum</i>			
<i>Clostridium nexile</i>		<i>Intestinibacter bartlettii</i>	<i>Clostridium bartlettii</i>
<i>Clostridium novyi</i>			
<i>Clostridium oroticum</i>		<i>Romboutsia lituseburensis</i>	<i>Clostridium lituseburensis</i>
Cocos gram negativos			
<i>Acidaminococcus fermentans</i>		<i>Veillonella alcalescens</i>	
<i>Acidaminococcus intestini</i>	Nueva especie	<i>Veillonella atypica</i>	
		<i>Veillonella denticariosi</i>	Nueva especie
<i>Anaeroglobus geminatus</i>	Nueva especie	<i>Veillonella dispar</i>	
		<i>Veillonella montpellierensis</i>	Nueva especie
<i>Megasphaera elsdenii</i>		<i>Veillonella parvula</i>	
<i>Megasphaera micronuciformis</i>	Nueva especie	<i>Veillonella rogosae</i>	Nueva especie
		<i>Veillonella tobetsuensis</i>	Nueva especie
<i>Negativococcus succinicivorans</i>	Nueva especie		
		<i>Victivallis vadensis</i>	Nueva especie
Cocos gram positivos			
<i>Anaerococcus hydrogenalis</i>	<i>Peptostreptococcus hydrogenalis</i>	<i>Peptoniphilus</i>	<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>
<i>Anaerococcus lactolyticus</i>	<i>Peptostreptococcus lactolyticus</i>	<i>Peptoniphilus coxii</i>	Nueva especie
		<i>Peptoniphilus duerdenii</i>	Nueva especie
<i>Anaerococcus murdochii</i>	Nueva especie	<i>Peptoniphilus gorbachii</i>	Nueva especie
<i>Anaerococcus octavius</i>	<i>Peptostreptococcus octavius</i>	<i>Peptoniphilus harei</i>	<i>Peptostreptococcus harei</i> <i>Peptostreptococcus</i>
<i>Anaerococcus prevotii</i>	<i>Peptostreptococcus prevotii</i>	<i>Peptoniphilus indolicus</i>	<i>Peptostreptococcus indolicus</i>
<i>Anaerococcus senegalensis</i>	Nueva especie	<i>Peptoniphilus ivorii</i>	<i>Peptostreptococcus ivorii</i>
<i>Anaerococcus tetradius</i>	<i>Peptostreptococcus tetradius</i>	<i>Peptoniphilus koenoenieniae</i>	Nueva especie

<i>Anaerococcus vaginalis</i>	<i>Peptostreptococcus vaginalis</i>	<i>Peptoniphilus lacrimalis</i>	<i>Peptostreptococcus lacrimalis</i>
<i>Blautia coccoides</i>	<i>Clostridium coccoides</i>	<i>Peptoniphilus olsenii</i>	Nueva especie
<i>Blautia faecis</i>	Nueva especie	<i>Peptoniphilus tyrrelliae</i>	Nueva especie
<i>Blautia hansenii</i>	<i>Ruminococcus hansenii</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	
<i>Blautia hydrogenotrophica</i>	<i>Ruminococcus hydrogenotrophicus</i>		
<i>Blautia luti</i>	<i>Ruminococcus luti</i>	<i>Peptostreptococcus canis</i>	
<i>Blautia producta</i>	<i>Ruminococcus productus</i>	<i>Peptostreptococcus stomatis</i>	
<i>Blautia schinkii</i>	<i>Ruminococcus schinkii</i>	<i>Ruminococcus callidus</i>	
<i>Blautia stercoris</i>	Nueva especie	<i>Ruminococcus champanellensis</i>	Nueva especie
<i>Blautia wexlerae</i>	Nueva especie		
		<i>Ruminococcus faecis</i>	Nueva especie
<i>Fingoldia magna</i>	<i>Peptostreptococcus magnus</i>	<i>Ruminococcus gauvreauii</i>	Nueva especie
		<i>Ruminococcus gnavus</i>	
<i>Gallicola barnesae</i>	<i>Peptostreptococcus barnesae</i>	<i>Ruminococcus torques</i>	Nueva especie
		<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	<i>Peptococcus saccharolyticus</i>
<i>Murdochiella asaccharolytica</i>	Nueva especie		
<i>Parvimonas micra</i>	<i>Micromonas micros</i>		
<i>Peptococcus niger</i>			

Capítulo IIIb. COCOS ANAEROBIOS

Mirta R. Litterio Bürki

Bioquímica de planta a cargo del Laboratorio de Bacterias Anaerobias, Servicio de Microbiología, Hospital Nacional de Pediatría Dr. Prof. Juan P. Garrahan. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Miembro de la Subcomisión de Bacterias Anaerobias -Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas (SADEBAC)- Asociación Argentina de Microbiología (AAM). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

María Raquel Rollet

Jefa de la Unidad Bacteriología, Hospital Francisco J. Muñiz. Ministerio de Salud, Gobierno de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Docente adjunta de la Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad del Salvador. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Profesora adjunta de la Cátedra de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Fundación Barceló. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Cocoordinadora del Área Bacteriología, RedLab, Dirección General Adjunta de Redes de Servicios de Salud, Ministerio de Salud. Gobierno de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Miembro de la Subcomisión de Bacterias Anaerobias -Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas (SADEBAC)- Asociación Argentina de Microbiología (AAM). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Cocos anaerobios gram positivos y gram negativos

Introducción

Los cocos anaerobios son microorganismos con metabolismo anaerobio estricto, no forman esporas y son inmóviles. Constituyen una parte importante de la microbiota humana normal. Con frecuencia se recuperan de materiales clínicos humanos en cultivos polimicrobianos, pero también en cultivos puros. Constituyen más del 25 % de los aislamientos de bacterias anaerobias en los laboratorios clínicos, sin embargo, su verdadero impacto en infecciones humanas es estimado de modo insuficiente^{28,40,41,51}.

Aspectos taxonómicos

Los cocos gram positivos anaerobios (CGPA) constituyen un grupo de organismos cuya taxonomía ha cambiado, es así que en los últimos años se han definido nuevos géneros y especies. El contenido de G+C es de 27 a 37 mol%, excepto para *Blautia producta* cuyo valor es de 44-45 mol%⁵¹.

Con la secuenciación del ARNr 16S se confirmó la heterogeneidad de este grupo bacteriano y sus marcadas diferencias en características fundamentales. Es así que, en la actualidad, además de *Peptococcus* sp. y *Peptostreptococcus* spp., se reconocen otros géneros: *Anaerococcus*, *Blautia*, *Fingoldia*, *Gallicola*, *Murdochiella*, *Parvimonas*, *Peptoniphilus* y *Ruminococcus*. Estos últimos surgieron de la reclasificación y transferencia de especies de *Peptostreptococcus* y de la inclusión de aislamientos no descritos con anterioridad^{37,40,41,51}.

Desde el punto de vista taxonómico se ubican en el *phylum* XIII *Firmucutes*. La especie *Staphylococcus saccharolyticus* pertenece a la clase I. *Bacilli*, orden I. *Bacillales*, familia I. *Staphylococcaceae*. Las demás, según se muestra en la tabla 1, se agrupan en

la clase II *Clostridia*, orden I *Clostridiales*, familias VI. *Peptococcaceae*, VII. *Peptostreptococcaceae*, VIII. *Ruminococcaceae* y XI *Insertae Sedis*^{17-24,44}.

Los géneros cuyo impacto clínico se ha descrito en el ser humano son: *Anaerococcus* spp., *Finegoldia* sp., *Murdochiella* sp., *Parvimonas* sp., *Peptococcus* sp., *Peptoniphilus* spp., *Peptostreptococcus* spp. y *Staphylococcus* sp.

Los cocos gram negativos anaerobios (CGNA) también sufrieron modificaciones en su clasificación taxonómica. Con anterioridad todos pertenecían a la familia *Acidaminococcaceae*, clase *Clostridia*. Hoy a excepción de *Victivallis vadensis*, la cual se clasifica en el *phylum Lentisphaerae*, las especies pertenecen a las familias *Acidaminococcaceae* y *Veillonellaceae*, *phylum Firmicutes*^{45,58} (Tabla 2).

Hábitat

Los cocos anaerobios forman parte de la microbiota normal del ser humano y de los animales^{14,28,40,41,51}.

Los CGPA están distribuidos en la piel y las mucosas de la boca, tracto respiratorio superior, tracto gastrointestinal y genitourinario femenino. Las especies recuperadas con mayor frecuencia de la piel son *Finegoldia magna* y *Peptostreptococcus asaccharolyticus*¹⁶. En la mucosa oral los CGPA constituyen el 1 al 15 % de la microbiota normal y la especie predominante es *Parvimonas micra*, seguida de *Peptostreptococcus anaerobius* y *F. magna*. Otras especies de CGPA se encuentran en menor proporción¹⁵. A nivel del tracto gastrointestinal se halla una gran variedad de especies de CGPA, entre las cuales se encuentran *Peptostreptococcus* spp., *B. producta*, *F. magna*, *Anaerococcus prevotii*, *Ruminococcus* spp.^{8,13,31,42,43,50}.

F. magna se encuentra en la mucosa vaginal en prepúberes, también en el 50 % de las mujeres embarazadas y en igual concentración tanto en mujeres sanas como en pacientes con vaginosis bacteriana⁴⁰.

P. micra se encuentra en forma usual a nivel de las hendiduras gingivales y en el tracto gastrointestinal, pero no hay acuerdo con respecto a su presencia en la mucosa vaginal. *P. anaerobius* es parte de la microbiota gastrointestinal normal no obstante, los informes sobre su presencia a nivel oral y vaginal son contradictorios. *P. asaccharolyticus* es parte de la microbiota normal gastrointestinal y genitourinaria y de la piel, sin embargo, no parece ser un comensal habitual de la mucosa oral⁴⁰.

Los CGNA se encuentran en las mucosas oral, genitourinaria, respiratoria e intestinal de humanos y animales, y a diferencia de los CGPA, no hay reportes que los describan como comensales normales de la piel^{51,58}.

Factores de virulencia

La información sobre los factores de virulencia de los cocos anaerobios es escasa y relativamente reciente. Sin embargo, en los últimos años se ha profundizado su estudio en particular en *F. magna* y *P. micra*⁴¹.

El impacto patogénico de los cocos anaerobios fue subestimado porque en la mayoría de los casos se recuperan de materiales clínicos en cultivos polimicrobianos. No obstante, se postula que su patogenicidad se cimienta en interacciones sinérgicas con organismos facultativos y otros anaerobios, los cuales ofrecerían protección mutua contra la fagocitosis y contribuirían a disminuir el potencial de óxido-reducción en los tejidos del huésped. Mediante el empleo de modelos animales Brook y colaboradores demostraron que cepas capsuladas de CGPA tienen capacidad para inducir el desarrollo de abscesos^{5,40,41}. Este factor de virulencia fue detectado en aislamientos de *F. magna*, *P. anaerobius*, *P. asaccharolyticus* y *P. micra*. Además, en algunos aislamientos de CGPA se detectó la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares como gelatinasa,

colagenasa, hialuronidasa, ARNasa, ADNasa, coagulasa y hemolisina aunque con menor actividad que la correspondiente a bacterias anaerobias gram negativas⁴⁰.

F. magna es el CGPA aislado con mayor frecuencia de materiales clínicos humanos. Se recupera en cultivos mixtos y también monomicrobianos. Su reconocimiento como agente patógeno ha incentivado el estudio de sus factores de virulencia. En 1985 Brook *et al.* señalaron que la cápsula de *F. magna* es un factor de virulencia relevante en la formación de abscesos. Con posterioridad se describieron otros factores de virulencia de *F. magna*. Los mejor estudiados son cuatro proteínas: L^{3,41}, PAB (*peptostreptococcal albumin binding*)^{11,41}, SufA (subtilasa)^{30,41} y FAF (*F. magna adhesion factor*)^{26,41}.

La proteína L adhiere con exclusividad y alta especificidad a las inmunoglobulinas (Ig) humanas IgM, IgA e IgG a través del dominio variable de la cadena liviana. Estimula la liberación de histamina al interactuar con la IgE de la superficie de mastocitos y basófilos de los pulmones y la piel. Induce la liberación de moléculas proinflamatorias como leucotrienos C4 y prostaglandina D2, por lo cual se sugiere que las cepas de *F. magna* que la expresan podrían ser más virulentas en los procesos infecciosos. Otras implicancias biológicas de esta proteína son la adherencia a la mucosa vaginal a través de su unión a la IgA local y la estimulación de la liberación de IL4 e IL13, lo cual llevó a clasificar a la proteína L como un superantígeno^{3,41}.

Algunas cepas de *F. magna* producen una proteína superficial con capacidad para unir seroalbúmina humana con alta especificidad. En 1996 de Chateau *et al.*¹² encontraron una asociación entre la producción de PAB e infecciones supurativas, por lo cual esta proteína tiene un rol importante en la virulencia bacteriana. La seroalbúmina humana es el mayor transportador de ácidos grasos de cadenas cortas, triptófano, tiroxina, iones de calcio. La unión de PAB a la seroalbúmina humana favorece la

disponibilidad por parte de la bacteria de dichas sustancias con la consecuente mejora en su desarrollo. La seroalbúmina humana se encuentra en forma extravascular en la mayoría de los tejidos y de las secreciones inflamatorias de las mucosas, en consecuencia PAB brinda una ventaja selectiva para el desarrollo de *F. magna* una vez establecida la infección^{11,12,41}.

SufA es una serin-proteasa con múltiples funciones, descrita por primera vez en *Bacillus*. Degrada péptidos antibacterianos humanos como LL-37 (catelisidina) y MIG/CXCL9 (quimioquina), los cuales interrumpen la integridad de la membrana del microorganismo. Esta actividad mejoraría la supervivencia y la proliferación de *F. magna* durante la infección. SufA también interactúa con el sistema de coagulación del huésped. Degrada el fibrinógeno por lo cual afecta la polimerización y la formación y estabilidad del coágulo con la consecuente demora en la cicatrización de la herida. Además, la hidrólisis de fibrinógeno impide que las células de *F. magna* adheridas a keratinocitos sean atrapadas en una red de fibrina lo cual facilita el establecimiento de la infección y promueve la virulencia^{30,41}.

FAF es una proteína que media la agregación bacteriana al interactuar con moléculas similares de células cercanas de *F. magna*. FAF se encuentra adherida a la superficie celular y también libre en el medio por acción de SufA. Se describieron dos ligandos para esta proteína: BM-40 y LL-37, ya mencionada. BM-40 es una glucoproteína ligada a la membrana basal de la piel cuyas funciones son aumentar el transporte de albúmina a través del epitelio y estimular la cicatrización y proliferación celular. La interacción de BM-40 con el FAF soluble y el estructural de *F. magna* alteraría la cicatrización de heridas crónicas. A su vez esa unión en conjunto con la acción de PAB aumentaría la disponibilidad de albúmina y promovería el desarrollo de *F. magna*. Las cepas que expresan FAF son más resistentes a la acción antimicrobiana de LL-37 y

ejercen una acción neutralizante sobre otras proteínas bactericidas como MK, BRAK/CXCL14 y hBD-3. Como consecuencia FAF afectaría de modo significativo la interacción entre la bacteria y el huésped y favorecería la supervivencia y colonización de *F. magna* a nivel de la piel^{26,41}.

P. micra, se aísla con frecuencia de infecciones mixtas en diferentes sitios del cuerpo. Es un importante patógeno oral y se relaciona con abscesos de variadas localizaciones. Los factores de virulencia de *P. micra* relacionados a la formación de abscesos incluyen las asociaciones sinérgicas con bacterias facultativas y anaerobias, la formación de cápsula, la síntesis de sulfuro de hidrógeno a partir de glutatión, la producción de hemolisinas y las estructuras fibrilares. Estas últimas permiten la agregación interbacteriana y la adherencia a receptores celulares. Dichas características se estudiaron en dos morfotipos de colonias de *P. micra*: rugosas y lisas. Aunque el morfotipo rugoso expone su superficie material fibrilar, los resultados obtenidos en distintas investigaciones fueron discordantes, por lo cual el impacto de estas estructuras en la agregación y adherencia es incierto⁴¹. Otro aspecto de la virulencia de *P. micra* es su actividad proteolítica ejercida por la acción de gelatinasas, elastasa y colagenasa. Además sintetiza una proteasa de tipo quimiotripsina la cual puede estar unida a la célula bacteriana o puede estar libre en el medio. Esta enzima junto a la gelatinasa favorece la penetración tisular del morfotipo rugoso. También se ha descrito la participación de *P. micra* en la activación de la respuesta inflamatoria. Estimula macrófagos y fibroblastos gingivales para producir FNT- α e IL-1 β ^{40,41}.

Impacto clínico

Los CGPA se aíslan en alrededor de un cuarto de todas las infecciones causadas por bacterias anaerobias.

Debido a las dificultades en la identificación de sus especies y a su frecuente recuperación en cultivos mixtos, el verdadero impacto clínico de los CGPA fue motivo de discusiones. En la actualidad se los reconoce como patógenos oportunistas, causan infecciones endógenas, en general mixtas, aunque también monomicrobianas^{14,28,40,41,51}.

Pueden estar presentes en infecciones localizadas en distintas áreas del cuerpo humano con diferentes niveles de gravedad que van desde un absceso de piel a infecciones que ponen en riesgo la vida del paciente, tales como absceso cerebral, bacteriemia, neumonía necrotizante y aborto séptico. También se comunicó su participación en infecciones abdominales y ginecológicas, y con menor frecuencia en meningitis, endocarditis, osteomielitis y artritis sépticas e infecciones asociadas a prótesis implantadas^{7,10,14,25,28,39,40,52,54-56}.

En la experiencia de dos centros de salud argentinos, uno de ellos con asistencia a pacientes pediátricos^{33,36} y el otro con asistencia a pacientes adultos⁴⁸, los CGPA se recuperaron con mayor frecuencia de muestras representativas de infecciones de partes blandas, cabeza y cuello, y tractos respiratorios superior e inferior. Las especies más prevalentes fueron: *F. magna*, *P. micra* y *P. anaerobius* las cuales constituyeron más del 50 % de los CGPA aislados. Cabe mencionar que en pacientes pediátricos también *P. asaccharolyticus* tuvo una elevada prevalencia. *F. magna* fue la especie aislada con mayor frecuencia (21–27 %) en estas series^{36,48}. Con respecto a su origen, entre el 33 y el 50 % de las mismas procedía de muestras de partes blandas.

En cuanto a los aislamientos en cultivo monomicrobiano, se documentó el hallazgo de las siguientes especies: *F. magna*, *P. micra*, *P. anaerobius*, *Peptoniphilus harei*, *Peptoniphilus lacrimalis*, *B. producta* (antes *Peptostreptococcus productus*) y de ellas la más frecuente fue *F. magna*^{7,34,48}. Otros autores comunicaron el aislamiento en

cultivos puros de *P. anaerobius*, *P. asaccharolyticus*, *Peptoniphilus indolicus*, *P. micra*, *Anaerococcus vaginalis*, *P. harei*, además de *F. magna*⁴⁰.

Por su parte, los CGNA representan un muy pequeño porcentaje de las infecciones humanas causadas por anaerobios. *Veillonella* es el género que se recupera con mayor frecuencia de muestras clínicas, en general a partir de cultivos mixtos con otros anaerobios o aerobios^{1,2,35,38}. Si bien muchas veces fue considerado un contaminante, estuvo implicado en casos de heridas quirúrgicas de cabeza (Litterio Bürki MR. Resultados no publicados), sinusitis, infecciones pulmonares, óseas, y en particular del sistema nervioso¹. En un estudio realizado para identificar especies bacterianas orales implicadas en bacteriemias secundarias a procedimientos dentales, *Veillonella* spp. se recuperó del hemocultivo de 12 de 290 pacientes sanos¹. Otras especies de CGNA aisladas de muestras clínicas humanas son *Acidaminococcus* spp. y *Negativicoccus* sp.^{29,38}

Diagnóstico microbiológico

Identificación a nivel de género y especie

La clasificación taxonómica de los CGPA ha sido objeto de grandes transformaciones en los últimos años y su identificación fenotípica es un desafío para los laboratorios de bacteriología clínica. Constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos, reunidos por su aspecto microscópico y su incapacidad para desarrollar en presencia de oxígeno.

Su papel etiológico en procesos infecciosos y las diferencias en su sensibilidad a antimicrobianos según la especie subrayaron la importancia en la identificación de las mismas.

Morfología microscópica

Las especies de CGPA presentan variaciones en el tamaño, la forma y la disposición de sus células, aunque la mayoría mantiene una morfología cocoide o cocobacilar, las cuales pueden disponerse en forma aislada, en pares, cadenas o racimos. Estas células gram positivas pueden tender a la decoloración o a la tinción irregular, en especial en los cultivos envejecidos^{28,40,51}.

Anaerococcus spp., *P. hareiy*, *Peptoniphilus ivorii* presentan células de tamaño variable; *Anaerococcus murdochii*, *F. magna*, *Peptoniphilus olsenii*, *Peptoniphilus duerdenii*, *Peptoniphilus gorbachii* y *Peptoniphilus koenoeneniae* tienen un diámetro $\geq 0,7$ μm mientras que el de *Ruminococcus faecis* es ≥ 1 μm . Las células de *Peptostreptococcus canis* son ovoides; las de *Ruminococcus callidus* tienen sus lados adyacentes redondeados y el opuesto cónico, y las células de *Ruminococcus gnavus* son algo elongadas con extremos cónicos. *P. indolicus* es un coco gram positivo, sin embargo en general se ve como gram negativo^{18-20,23,25,31,32,44,54}.

Estas características morfológicas y tintoriales sólo son orientadoras pero pueden ayudar en la diferenciación de especies cuyo perfil bioquímico sea similar. Cabe señalar que el aspecto microscópico de este grupo de bacterias anaerobias es insuficiente para su diferenciación de los cocos aerobios^{28,40,51}.

Los CGNA tienen un diámetro que oscila entre 0,3 y 1 μm a excepción de *Megasphaera* spp. cuyo diámetro varía entre 1,7 y 2,6 μm ^{45,51}.

Características culturales

Los requerimientos culturales para el desarrollo de los CGPA no difieren de manera sustancial de los correspondientes a otras bacterias anaerobias. Sin embargo, con el fin de optimizar su recuperación a partir de materiales clínicos se sugiere el agregado de suero y Tween 80^{28,51}.

En la gran mayoría de los casos el medio de cultivo sólido utilizado para gérmenes anaerobios como el agar base Columbia, Brucella o infusión cerebro corazón suplementados con sangre al 5 %, vitamina K1 y hemina permite el desarrollo de estos microorganismos y la implementación de medios de cultivo selectivos como el agar feniletanol y otros con antibióticos facilita el aislamiento de CGPA de muestras polimicrobianas^{40,41}.

La recuperación de CGNA también se hace en medios que contengan sangre al 5 %, hemina y vitamina K, aunque existen medios selectivos como el agar Veillonella-neomicina y el agar Veillonella-vancomicina, los cuales pueden emplearse para el aislamiento primario^{28,51}.

La siembra de medios líquidos complementa a los medios sólidos para el aislamiento de cocos anaerobios y sirve como respaldo de los cultivos iniciados.

Los medios de cultivo sembrados deben ser incubados en condiciones de anaerobiosis a 35-37 °C durante un tiempo de 48 h y hasta 7 días. El tamaño de las colonias de cocos anaerobios en general no excede los 2 mm de diámetro.

La identificación de estos grupos de microorganismos se hace mediante pruebas de tolerancia al oxígeno, características morfológicas y tintoriales y sensibilidad a los discos de vancomicina (5 µg) y colistina (10 µg). Los cocos gram positivos son sensibles a vancomicina (5 µg) y resistentes a colistina (10 µg).

Es ineludible confirmar la condición de microorganismo anaerobio mediante más de dos pruebas sucesivas de tolerancia al oxígeno. Estas pruebas son indispensables para diferenciar CGPA de microorganismos facultativos y microaerófilos como *Streptococcus* spp., algunos de los cuales crecen en cultivos anaeróbicos pero no lo hacen en los cultivos aeróbicos primarios. Una prueba de sensibilidad con el disco de metronidazol de 5 µg puede ayudar a resolver este problema ya que, salvo raras

excepciones y a diferencia de los organismos facultativos, los CGPA dan un halo de inhibición⁴⁰. Ante la falta de dicho halo de inhibición, se deben considerar las siguientes posibilidades: el aislamiento de una bacteria anaerobia facultativa, de una anaerobiosis deficiente, o de un CGPA con verdadera resistencia a MTZ, hechos que se deben confirmar con el método pertinente.

Peptococcus niger, la única especie representativa del género, se caracteriza porque sus colonias tienen un color marrón o negro característico.

El reconocimiento de los CGNA también exige demostrar su naturaleza anaeróbica mediante pruebas de tolerancia al oxígeno. Se identifican por sus caracteres microscópicos y porque a diferencia de los gram positivos son sensibles a colistina y resistentes a vancomicina^{28,51}.

Pruebas bioquímicas

La identificación de especies de CGPA puede ser difícil por la cantidad y la diversidad de pruebas requeridas para ello. Los esquemas propuestos incluyen la inhibición por polianetolsulfonato de sodio (PSS, disco con 1000 µg); la producción de catalasa, arginina dihidrolasa, fosfatasa alcalina, indol, ureasa, α-galactosidasa, β-galactosidasa, α-glucosidasa, β-glucuronidasa, arginina arilamidasa, prolina arilamidasa, fenilalanina arilamidasa, leucina arilamidasa, piroglutamina arilamidasa, tirosina arilamidasa, histidina arilamidasa, glicil-glicina arilamidasa, glicina descarboxilasa, lisil-glicina arilamidasa y α-fucosidasa; y la fermentación de arabinosa, celobiosa, glucosa, lactosa, manitol, manosa, rafinosa y ribosa^{28,40,41,51}.

La prueba de sensibilidad al disco de PSS es útil para la identificación presuntiva de *P. anaerobius*, ya que la frecuencia con la cual se aíslan otros organismos sensibles es baja. Algunas cepas de *P. micra* pueden dar halos de inhibición aunque de menor diámetro que los correspondientes a *P. anaerobius*⁴⁰.

El reconocimiento de los géneros y especies de cocos anaerobios mediante métodos convencionales es laborioso, puede requerir un tiempo prolongado y aun así, algunas veces resulta ineficaz para la definición de la bacteria en estudio. Cabe recordar que si se utiliza la metodología artesanal, dependiente del desarrollo del microorganismo (fermentación de hidratos de carbono, hidrólisis de esculina), los medios deben incubarse en condiciones de anaerobiosis.

Métodos automatizados, miniaturizados y moleculares

Las galerías miniaturizadas de pruebas bioquímicas son útiles para la identificación de cocos anaerobios en los laboratorios de bacteriología clínica. Son un buen complemento para las pruebas habituales y en particular en el caso de los CGPA ya que, la detección de enzimas preformadas es esencial para la identificación de este grupo bacteriano (ver tabla 3 y figuras 1-4). Existen equipos comerciales que incluyen pruebas para la mayoría de las enzimas requeridas, entre ellos: Rapid ID 32A, API-ZYM 20A (API bioMérieux Marcy l'Etoile France), y RapID ANA II (Remel, Inc., Lenexa, KS). Estas enzimas también se pueden detectar en forma individual mediante el empleo de tabletas Rosco (Rosco Diagnostics, Taastrup, Denmark) o Remel, sin embargo algunas publicaciones informan sobre resultados discordantes según el equipo empleado. El empleo de estos equipos comerciales debe efectuarse según las indicaciones de cada fabricante. Sin embargo, el resultado de las pruebas debe considerarse en forma individual y la interpretación conjunta de las mismas debe hacerse de acuerdo a tablas actualizadas y no a las de los equipos ya que sus bases de datos, en general, se encuentran incompletas y/o desactualizadas^{28,40,41,51,52}.

Existen equipos automatizados como Vitek2 (bioMérieux, Marcy, l'Etoile, Francia) y paneles de lectura directa o automatizada como MicroScan (Siemens, Erlangen, Alemania)⁵¹. Estos equipos son fáciles de usar en relación a los métodos convencionales

y, en algunos casos, permiten obtener resultados luego de unas pocas horas de incubación; sin embargo, persiste en ellos el inconveniente de sus bases de datos incompletas y/o desactualizadas.

Las metodologías moleculares constituyen una herramienta útil para la clasificación e identificación de cocos anaerobios. La secuenciación de genes de ARNr 16S, de los espacios intergénicos del ARNr 16S – 23 S y la detección de proteínas por espectrometría de masas (MALDI–TOF, Bruker Daltonik, Bremer, Alemania; Shimadzu Corporation, Tokio, Japón) son métodos más confiables y pueden resultar adecuados para la identificación de cocos anaerobios^{41,51,57}. Aunque en el caso de MALDI-TOF aún falta expandir la base de datos.

Las características fenotípicas para la diferenciación de las especies de cocos gram positivos constan en la tabla 3 y en las figuras 1, 2, 3 y 4 se desarrollan las llaves respectivas. Las concernientes a la identificación de CGNA se muestran en la tabla 4 y en la figura 5.

Sensibilidad a los antimicrobianos

La mayoría de los CGPA son sensibles a los antibióticos β -lactámicos. Hasta ahora no se ha informado de cepas productoras de β -lactamasas sin embargo, una disminución en la afinidad del antibiótico por su sitio blanco de acción puede conferir resistencia a estos agentes. En general, *P. assacharolyticus*, *F. magna* y *P. micra* son sensibles a penicilina, aunque algunos autores informaron un 16 % y 8 % de resistencia a este antibiótico entre cepas de *F. magna* y *P. micra*⁵¹, respectivamente. Litterio *et al.*³⁶ informaron una resistencia global de los CGPA del 6 % para amoxicilina (AMX) y del 5 % para amoxicilina-ácido clavulánico (AMC); mientras que la resistencia de *P. anaerobius* fue de 36,4 % para AMX y del 27,3 % para AMC³⁶. Brazier *et al.*⁴ encontraron un 3,5 %

de resistencia global a AMC en 113 aislamientos de CGPA, pero no detectaron resistencia a piperacilina-tazobactama ni a cefoxitina ni a imipenem.

La resistencia a clindamicina (CLI) entre CGPA se debe a alteraciones en su sitio blanco. En un estudio *in vitro* realizado sobre 94 cepas de CGPA, Lehmann *et al.*³³ encontraron 7 % de resistencia a CLI. Brazier *et al.*⁴ obtuvieron valores semejantes. En España, Reig *et al.*⁴⁷ encontraron un 22,8 % de resistencia a eritromicina (ERI) en *Peptostreptococcus* spp., mientras que la resistencia a CLI expresada en forma constitutiva fue del 17,7 % y la inducible del 5,1 %⁷⁹. En un trabajo realizado en la Argentina el 18 % de las cepas resistentes a ERI presentaba el fenotipo de resistencia inducible a CLI³³. Citron *et al.*⁹ encontraron resistencia a CLI en aislamientos de *P. assacharolyticus*, *F. magna* y *A. prevotii*.

El metronidazol (MTZ) es un antibiótico de amplio espectro frente a bacterias anaerobias y con excelente actividad frente a CGPA^{4,33,36} no obstante, existen cepas de cocos resistentes a este agente imidazólico, las cuales se recuperan en forma excepcional. Theron *et al.*⁵³ describieron dos aislamientos de *F. magna* resistentes a MTZ. Estas cepas eran portadoras del gen *nimB* el cual podría estar relacionado a la resistencia a dicho antibiótico. También Citron *et al.*⁹ encontraron resistencia a MTZ en aislamientos de *P. anaerobius*, *P. micra* y *A. prevotii*.

Se informaron valores elevados de resistencia a tetraciclina (41,6 %)⁴.

Hay pocos datos en la literatura con respecto a estrategias para el tratamiento de infecciones por *Veillonella* spp. y en algunos trabajos la penicilina ha demostrado actividad *in vitro* sobre las pocas cepas probadas². Sin embargo, en un estudio realizado por Litterio *et al.*³⁵ el 63 % de 33 aislamientos de *Veillonella* spp. fue resistente a este antibiótico y el 20 % lo fue a piperacilina, mientras que todos los aislamientos fueron sensibles a ampicilina. Estos resultados concuerdan con los publicados por Reig *et al.*

quienes hallaron resistencia a penicilina en el 80 % de los aislamientos de *Veillonella* spp. estudiados⁴⁶.

Bibliografía

1. Bahrani-Mougeot FK, Paster BJ, Coleman S, Ashar J, Barbuto S, Lockhart PB. Diverse and novel oral bacterial species in blood following dental procedures. *J Clin Microbiol.* 2008;46:2129–32.
2. Bhatti MA, Frank MO. *Veillonella parvula* meningitis: Case report and review of *Veillonella* infections. *Clin Infect Dis.* 2000;31:839–40.
3. Björck L. Protein L. A novel bacterial cell wall protein with affinity for Ig L chains. *J Immunol.* 1988;140:1194–7.
4. Brazier JS, Hall V, Morris TE, Gal M, Duerden BI. Antibiotic susceptibilities of gram-positive anaerobic cocci: results of a sentinel study in England and Wales. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52:224–8.
5. Brogden KA, Guthmiller JM, editors. 2002. Abscesses. ASM Press.[On-line] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2475>. Consultado el 26 de abril de 2014.
6. Carlier JP, Marchandin H, Jumas-Bilak E, Lorin V, Henry C, Carrière C, Jean-Pierre H. *Anaeroglobus geminatus* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Veillonellaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002;52:983–6.
7. Castello L, Bou M, Bazzana MS, Predari SC. Absceso mamario no puerperal por *Fingoldia magna*. *Rev Argent Microbiol.* 2007;39:95-8.
8. Chassard C, Delmas E, Robert C, Lawson PA, Bernalier-Donadille A. *Ruminococcus champanellensis* sp. nov., a cellulose-degrading bacterium from human gut microbiota. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2012;62:138-43.
9. Citron DM, Kwoka YY, Appleman MD. *In vitro* activity of oritavancin (LY333328), vancomycin, clindamycin, and metronidazole against *Clostridium perfringens*, *Propionibacterium acnes* and anaerobic gram-positive cocci. *Anaerobe.* 2005;11:93–5.
10. Citron DM, Tyrrell KL, Goldstein LJC. *Peptoniphilus coxii* sp. nov. and *Peptoniphilus tyrrelliae* sp. nov. isolated from human clinical infections. *Anaerobe.* 2012;18:244-8.
11. deChâteau M, Björck L. Protein PAB, a mosaic albumin-binding bacterial protein representing the first contemporary example of module shuffling. *J Biol Chem.* 1994;269:12147–51.
12. deChâteau M, Holst E, Björck L. Protein PAB, an albumin-binding bacterial surface protein promoting growth and virulence. *J Biol Chem.* 1996;271:26609-15.

13. Domingo MC, Huletsky A, Boissinot M, Bernard KA, Picard FJ, Bergeron MG. *Ruminococcus gauvreauii* sp. nov., a glycopeptide-resistant species isolated from the human faecal specimen. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008;58:1393-7.
14. Dowd SE, Sun Y, Secor PR, Rhoads DD, Wolcott BM, James GA, Wolcott RD. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiol.* 2008, 8:43.
15. Downes J, Wade WG. *Peptostreptococcus stomatis* sp. nov., isolated from the human oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006;56:751-4.
16. Evans CA, Mattern KL, Hallan SL. Isolation and identification of *Peptococcus saccharolyticus* from human skin. *J Clin Microbiol.* 1978;7:261-4.
17. Ezaki T. Genus I. *Ruminococcus*. En: Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Scheifer HH, Whitman WB, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition. Athens, GA, Springer, 2009, p. 1016-8.
18. Ezaki T, Kawamura Y, Li N, Li ZY, Zhao L, Shu S. Proposal of the genera *Anaerococcus* gen. nov., *Peptoniphilus* gen. nov. and *Gallicola* gen. nov. for members of the genus *Peptostreptococcus*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51:1521-8.
19. Ezaki T, Kawamura Y. Genus VI. *Peptoniphilus*. En: Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Scheifer KH, Whitman WB, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition. Athens, GA, Springer, 2009, p. 1136-7.
20. Ezaki T, Ohkusu K. Genus I. *Anaerococcus*. En: Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Scheifer HH, Whitman WB, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition. Athens, GA, Springer, 2009, p. 1130-1.
21. Ezaki T. Family VI. *Peptococcaceae*. En: Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Scheifer HH, Whitman WB, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition. Athens, GA, Springer, 2009, p. 969-71.
22. Ezaki T. Family VII. *Peptostreptococcaceae* fam. nov. En: Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Scheifer HH, Whitman WB, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition. Athens, GA, Springer, 2009, p. 1008.

23. Ezaki T. Genus II. *Finegoldia*. En: Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Scheifer HH, Whitman WB, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition. Athens, GA, Springer, 2009, p. 1131-2.
24. Ezaki T. Genus III. *Gallicola*. En: Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Scheifer HH, Whitman WB, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition. Athens, GA, Springer, 2009, p. 1132.
25. Fournier PE, Van Laa M, Casalta JP, Richet H, Collart F, Raoult D. *Finegoldia magna*, an early post-operative cause of infectious endocarditis: Report of two cases and review of the literature. *Anaerobe*. 2008;14:310–2.
26. Frick IM, Karlsson C, Mörgelin M, Olin AI, Janjusevic R, Hammarström C, Holst E, de Château M, Björck L. Identification of a novel protein promoting the colonization and survival of *Finegoldia magna*, a bacterial commensal and opportunistic pathogen. *Mol Microbiol*. 2008;70:695–708.
27. Goodfellow N, Kämpfer P, Vos P, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman WB. Genus V. *Parvimonas*. En: Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Scheifer HH, Whitman WB, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition. Athens, GA, Springer, 2009, p. 1135-6.
28. Jousimies-Somer HR, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler HM, Finegold SM. *Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual*, Belmont, California Star Publishing Company, 2002, p. 207-33.
29. Jumas-Bilak E, Carlier JP, Jean-Pierre H, Mory F, Teyssier C, Gay B, Campos J, Marchandin H. *Acidaminococcus intestini* sp. nov. isolated from human clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2007;57:2314-9.
30. Karlsson C, Andersson ML, Collin M, Schmidtchen A, Björck L, Frick IM. SufA—a novel subtilisin-like serine proteinase of *Finegoldia magna*. *Microbiology*. 2007;153:4208–18.
31. Kim MS, Roh SW, Bae JW. *Ruminococcus faecis* sp. nov., isolated from human faeces. *J Microbiol*. 2011;49:487-91.
32. Lawson P, Johnson CN, Bengtsson L, Charalampakis G, Dahlen G, Moore E, Falsen E. *Peptostreptococcus canis* sp. nov., isolated from subgingival plaque from canine oral cavity. *Anaerobe*. 2012;18:597-601.

33. Lehmann E, Pena Amaya P, Otaegui L, Lopardo H, Litterio M. Estudio de sensibilidad *in vitro* de cocos gram positivos anaerobios. III Congreso Nacional de Residentes Bioquímicos. COREBIO. 2005, Resumen P9. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina.
34. Litterio M, D'Amore V, Hernández C. *Finegoldia magna*. De dónde y cómo recuperamos este coco gram positivo anaerobio en pediatría. XIII Congreso Argentino de Microbiología. II Congreso Microbiología Agrícola y Ambiental. 2013, Resumen P-430, p. 171, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
35. Litterio M, Matteo M, Fiorilli G, Rubeglio E. Susceptibility of *Veillonella* spp. to ten different antibiotics. *Anaerobe*. 1999;5:477-8.
36. Litterio M, Vaustat CD, Blanco A, Beratz N, Gareis M, Lopardo HA. Cocos gram positivos anaerobios estudio de sensibilidad *in vitro*. VII Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas – SADEBAC. 2012, Resumen P43, p. 19-20, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
37. Liu C, Finegold SM, Song Y, Lawson PA. Reclassification of *Clostridium coccooides*, *Ruminococcus hansenii*, *Ruminococcus hydrogenotrophicus*, *Ruminococcus luti*, *Ruminococcus productus* and *Ruminococcus schinkii* as *Blautia coccooides* gen. nov., comb. nov., *Blautia hansenii* comb. nov., *Blautia hydrogenotrophica* comb. nov., *Blautia luti* comb. nov., *Blautia producta* comb. nov., *Blautia schinkii* comb. nov. and description of *Blautia wexlerae* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008;58:1896–902.
38. Marchandin H, Teyssier C, Campos J, Jean-Pierre H, Roger F, Gay B, Carlier JP, Jumas-Bilak EJ. *Negativicoccus succinicivorans* gen. nov., sp. nov., isolated from human clinical samples, emended description of the family *Veillonellaceae* and description of *Negativicutes* classis nov., *Selenomonadales* ord. nov. and *Acidaminococcaceae* fam. nov. in the bacterial phylum *Firmicutes*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010;60:1271–9.
39. Mincses LR, Shields RK, Sheridan K, Ho KS & Silveira FP. *Peptostreptococcus* infective endocarditis and bacteremia. Analysis of cases at a tertiary medical center and review of the literature. *Anaerobe*. 16:327–30.
40. Murdoch DA. Gram-positive anaerobic cocci. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11:81-120.

41. Murphy EC, Frick IM. Gram-positive anaerobic cocci commensals and opportunistic pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* 2013;37:520–53.
42. Park SK, Kim MS, Bae JW. *Blautia faecis* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013;63:599-603.
43. Park SK, Kim MS, Roh SW, Bae JW. *Blautia stercoris* sp. nov., isolated from human faeces *Int J Syst Evol Microbiol.* 2012;62:776–9.
44. Rainey FA. Family VIII. *Ruminococcaceae* fam. nov. En: Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Scheifer HH, Whitman WB, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition. Athens, GA, Springer, 2009, p. 1016-8.
45. Rainey FA. Family X. *Veillonellaceae*. En: Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Scheifer HH, Whitman WB, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition. Athens, GA, Springer, 2009, p. 1059-89.
46. Reig M, Mir N, Baquero F. Penicillin resistance in *Veillonella*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:1210.
47. Reig, M, Moreno A, Baquero F. Resistance of *Peptostreptococcus* spp. to macrolides and lincosamides: Inducible and constitutive phenotypes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992;36:662-4.
48. Rollet R, Cabrera R, Lehmann E, Costa N, Couto E, Hardie N. Cocos anaerobios gram positivos en materiales clínicos. IV Actividad Científica Anual de la Sociedad Argentina de Bacteriología Clínica, 2006, Resumen edición electrónica 16572, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
49. Schleifer KH, Bell JA. Family VIII. *Staphylococcaceae* fam. nov. En: Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Scheifer KH, Whitman WB, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition. Athens, GA, Springer, 2009, p. 413-4.
50. Simmering R, Taras D, Schwiertz A, Le Blay G, Gruhl B, Lawson PA, Collins MD, Blaut M. *Ruminococcus luti* sp. nov., isolated from the human faecal sample. *System Appl Microbiol.* 2002;25:189-93.
51. Song Y, Finegold S. *Peptostreptococcus*, *Finegoldia*, *Anaerococcus*, *Peptoniphilus*, *Veillonella*, and other anaerobic cocci. En: Versalovic J, Carrol K, Funke G, Jorgensen J, Landry ML, Warnock D, editors. *Manual of Clinical Microbiology*, 10th edition. Washington, DC, ASM Press, 2011, p. 803-16.

52. Song Y, Liu C, Finegold SM. Development of a flow chart for identification of gram-positive anaerobic cocci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 2007;45:512-6.
53. Theron MM, van Rensburg MNJ, Chalkley LJ. Nitroimidazole resistance genes (*nimB*) in anaerobic gram-positive cocci (previously *Peptostreptococcus* spp.) *J Antimicrob Chemother.* 2004;54:240-2.
54. Ulger-Toprak N, Lawson PA, Summanen P, O'Neal L, Finegold SM. *Peptoniphilus duerdenii* sp. nov. and *Peptoniphilus koenoeniae* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2012;62:2336-41.
55. Ulger-Toprak N, Liu C, Summanen PH, Finegold SM. *Murdochiella asaccharolytica* gen. nov., sp. nov., a Gram-stain-positive, anaerobic coccus isolated from human wound specimens. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010;60:1013-6.
56. Westblom TU, Gorse GJ, Milligan TW, Schindzielorz AH. Anaerobic endocarditis caused by *Staphylococcus saccharolyticus*. *J Clin Microbiol.* 1990;28:2818-9.
57. Zárate MS, Romano V, Nievas J, Smayevsky J. Utilidad de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la identificación de bacterias anaerobias. *Rev Argent Microbiol.* 2014;46:98-102.
58. Zoetendal EG, Plugge CM, Akkermans ADL, de Vos WM. *Victivallis vadensis* gen. nov., sp. nov., a sugar-fermenting anaerobe from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003;53:211-5.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de cocos gram positivos anaerobios^b

Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
XIII. Firmucutes	I. Bacilli	I. Bacillales	VIII. Staphylococcaceae	I. Staphylococcus	saccharolyticus
			VI. Peptococcaceae	I. Peptococcus	niger
	VII. Peptostreptococcaceae	I. Peptostreptococcus		anaerobius	
		I. Peptostreptococcus		canis	
		I. Peptostreptococcus		stomatis	
	VIII. Ruminococcaceae	I. Ruminococcus		callidus	
		I. Ruminococcus		champanellensis	
		I. Ruminococcus		faecis	
		I. Ruminococcus		gauvreauii	
		I. Ruminococcus		gnavus	
		I. Ruminococcus		torques	
		XI. Incertae Sedis		I. Anaerococcus	hydrogenalis
			I. Anaerococcus	lactolyticus	
			I. Anaerococcus	murdochii	
			I. Anaerococcus	octavius	
	I. Anaerococcus		prevotii		
	I. Anaerococcus		tetradius		
	I. Anaerococcus		vaginalis		
	II. Finegoldia		magna		
	III. Gallicola		barnesae		
	V. Parvimonas		micra		
	VI. Peptoniphilus	asaccharolyticus			
		coxii			
		duerdenii			
		gorbachii			
		harei			
		indolicus			
		ivorii			
		koenoenieniae			
		lacrimalis			
	olsenii				
	VI. Peptoniphilus	tyrrelliae			

Tabla 1. Continuación

<i>Blautia</i> ^a	<i>coccoides</i>
<i>Blautia</i> ^a	<i>faecis</i>
<i>Blautia</i> ^a	<i>hansenii</i>
<i>Blautia</i> ^a	<i>hydrogenotrophica</i>
<i>Blautia</i> ^a	<i>luti</i>
<i>Blautia</i> ^a	<i>producta</i>
<i>Blautia</i> ^a	<i>schinkii</i>
<i>Blautia</i> ^a	<i>stercoris</i>
<i>Blautia</i> ^a	<i>wexlerae</i>
<i>Murdochiella</i> ^a	<i>asaccharolytica</i>

^a Sin dato del número asignado al género en la familia correspondiente. ^b Los datos provienen de Ezaki *et al.*¹⁷⁻²⁴, Raney *et al.*⁴⁴, Schleifer *et al.*⁴⁹

Tabla 2. Clasificación taxonómica de cocos gram negativos anaerobios^a

Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
XIII. <i>Firmicutes</i>	<i>Negativicutes</i>	<i>Selenomonadales</i>	<i>Acidaminococcaceae</i>	<i>Acidaminococcus</i>	<i>fermentans</i>
				<i>Acidaminococcus</i>	<i>intestini</i>
			<i>Veillonellaceae</i>	<i>Anaeroglobus</i>	<i>geminatus</i>
				<i>Megasphaera</i>	<i>micronuciformis</i>
				<i>Megasphaera</i>	<i>elsdenii</i>
				<i>Negativicoccus</i>	<i>succinicivorans</i>
				<i>Veillonella</i>	<i>alcalescens</i>
				<i>Veillonella</i>	<i>atypica</i>
				<i>Veillonella</i>	<i>denticariosi</i>
				<i>Veillonella</i>	<i>dispar</i>
				<i>Veillonella</i>	<i>montpellierensis</i>
				<i>Veillonella</i>	<i>párvula</i>
				<i>Veillonella</i>	<i>rogosae</i>
				<i>Veillonella</i>	<i>tobetsuensis</i>
				<i>Lentisphaerae</i>	<i>Lentisphaeria</i>

^aLos datos provienen de Rainey *et al.*⁴⁵, Zoetendal *et al.*⁵⁸

Tabla 3. Características diferenciales de géneros y especies de cocos gram positivos^e

Género y especie	Producción de																	Fermentación de															
	Impacto clínico	Inhibición por PSS	Pigmento ^a	Hidrólisis de esculina	Arginina dihidrolasa ^d	Catalasa	Fosfatasa alcalina ^d	Indol	Ureasa ^d	α-galactosidasa ^d	β-galactosidasa ^d	α -glucosidasa ^d	β -glucuronidasa ^d	Arginina ariamidasa ^d	Prolina ariamidasa ^d	Fenilalanina ariamidasa ^d	Leucinaariamidasa ^d	Piroglutaminaariamidasa ^d	Tirosinaariamidasa ^d	Histidinaariamidasa ^d	Glicil-glicinaariamidasa ^d	Glicina descarboxilasa ^d	Lisil-glicinaariamidasa ^d	α-Fucosidasa ^d	Arabinosa	Celobiosa	Glucosa	Lactosa	Manitol	Manosa ^d	Rafinosa ^d	Ribosa	
<i>Anaerococcus hydrogenalis</i>	+	-	-	SD	-	-	^w	+	V	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	+	+	SD	+	+	-
<i>Anaerococcus lactolyticus</i>	+	-	-	SD	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	+	+	SD	+	-	-
<i>Anaerococcus murdochii</i>	+	-	-	SD	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	^w	-	SD	V	-	SD	SD	+	SD	SD	+	-	SD	
<i>Anaerococcus octavius</i>	+	-	-	SD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	W	-	-	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	+	-	SD	+	-	+
<i>Anaerococcus prevotii</i>	+	-	-	SD	-	-	-	V	+	-	+	+	+	-	-	-	+	W	+	-	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	V	-	SD	V	+	+
<i>Anaerococcus tetradius</i>	+	-	-	SD	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	W	+	W	W	W	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	+	-	SD	+	-	-
<i>Anaerococcus vaginalis</i>	+	-	-	SD	+	-	^w	V	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	+	-	SD	V	-	-
<i>Blautia coccoides</i>	-	SD	-	SD	-	-	-	SD	SD	+	+	+	SD	SD	SD	SD	-	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	+	+	SD

Tabla 3. Continuación

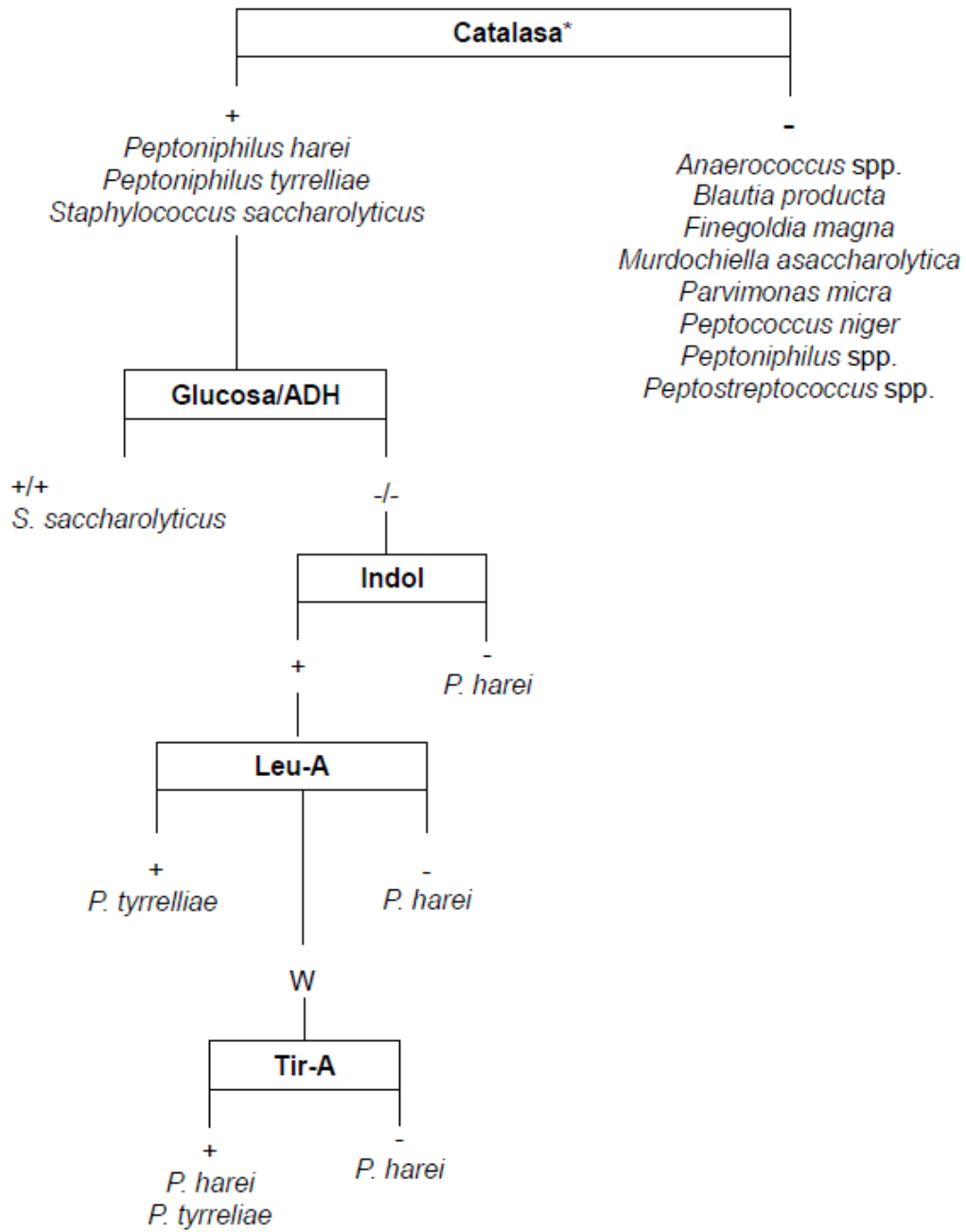
<i>Peptoniphilus ivorii</i>	+	-	-	SD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	SD	SD	SD	SD	SD	-	-	SD	-	-	-				
<i>Peptoniphilus lacimalis</i>	+	-	-	SD	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	V	+	-	SD	SD	SD	SD	SD	-	-	SD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
<i>Peptoniphilus coxii</i>	+	SD	-	SD	-	-	V	-	-	-	-	-	-	+	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>Peptoniphilus duerdenii</i>	+	-	-	SD	W	-	-	SD	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>Peptoniphilus gorbachii</i>	+	-	-	SD	-	-	-	V	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	SD	SD	SD	SD	SD	-	SD	SD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	SD	
<i>Peptoniphilus koenoeneniae</i>	+	-	-	SD	+	-	-	SD	-	-	-	SD	-	+	+	+	+	+	SD	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>Peptoniphilus olsanii</i>	+	-	-	SD	-	-	+	V	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	SD	SD	SD	SD	SD	-	SD	SD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	SD	
<i>Peptoniphilus tyrrelliae</i>	+	SD	-	SD	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+ ^w	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	+	+	-	SD	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	SD	SD	SD	SD	-	SD	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Peptostreptococcus canis</i>	-	SD	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	SD	
<i>Peptostreptococcus tomatis</i>	+	+	-	SD	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	W	-	SD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Ruminococcus callidus</i>	-	SD	-	V	SD	-	SD	-	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
<i>Ruminococcus champanellensis</i>	-	SD	-	V	SD	-	SD	-	-	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
<i>Ruminococcus faecis</i>	-	SD	-	+	SD	+	+	-	-	+	-	+	SD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	SD	
<i>Ruminococcus gauvreauii</i>	-	SD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	

Tabla 4. Características diferenciales de géneros y especies de cocos gram negativos de importancia clínica^b

Géneros y especies	Crecimiento		Sensibilidad a			Producción de catalasa	Reducción de nitrato	Fermentación de		
	en microaerobiosis	en bilis ^a	vancomicina (5 µg)	colistina (10 µg)	kanamicina (1000 µg)			glucosa	galactosa	manosa
<i>Acidaminococcus fermentans</i>	-	-	R	S	S	-	-	-	-	-
<i>Acidaminococcus intestini</i>	-	-	R	S	S	-	-	-	-	-
<i>Anaeroglobus geminatus</i>	-	-	R	S	S	-	-	-	+	+
<i>Megasphaera micronuciformis</i>	-	-	S	S	S	-	-	-	-	-
<i>Megasphaera elsdenii</i>	-	SD	SD	SD	SD	-	-	+	-	-
<i>Negativicoccus succinicivorans</i>	+	SD	SD	SD	SD	SD	-	-	-	-
<i>Veillonella alcalescens</i>	-	-	R	S	S	V	+	-	-	-
<i>Veillonella atypica</i>	-	-	R	S	S	V	+	-	-	-
<i>Veillonella denticariosi</i>	-	-	R	S	S	V	+	-	-	-
<i>Veillonella dispar</i>	-	-	R	S	S	V	+	-	-	-
<i>Veillonella montpellierensis</i>	-	-	R	S	S	V	+	-	-	-
<i>Veillonella parvula</i>	-	-	R	S	S	V	+	-	-	-
<i>Veillonella rogosae</i>	-	-	R	S	S	V	+	-	-	-
<i>Veillonella tobetsuensis</i>	-	-	R	S	S	V	+	-	-	-
<i>Victivallis vadensis</i>	-	SD	SD	SD	SD	SD	+	+	SD	SD

Referencias: ^a Desarrollo en medios con 20 % de bilis. + reacción positiva, - reacción negativa, V reacción positiva o negativa, SD sin dato, S sensible, R resistente. ^b Los datos provienen de Carlier *et al.*⁶, Jumas-Bilak *et al.*²⁹, Marchandin *et al.*³⁸, Rainey⁴⁵, Song *et al.*⁵¹, Zoetendal *et al.*⁵⁸.

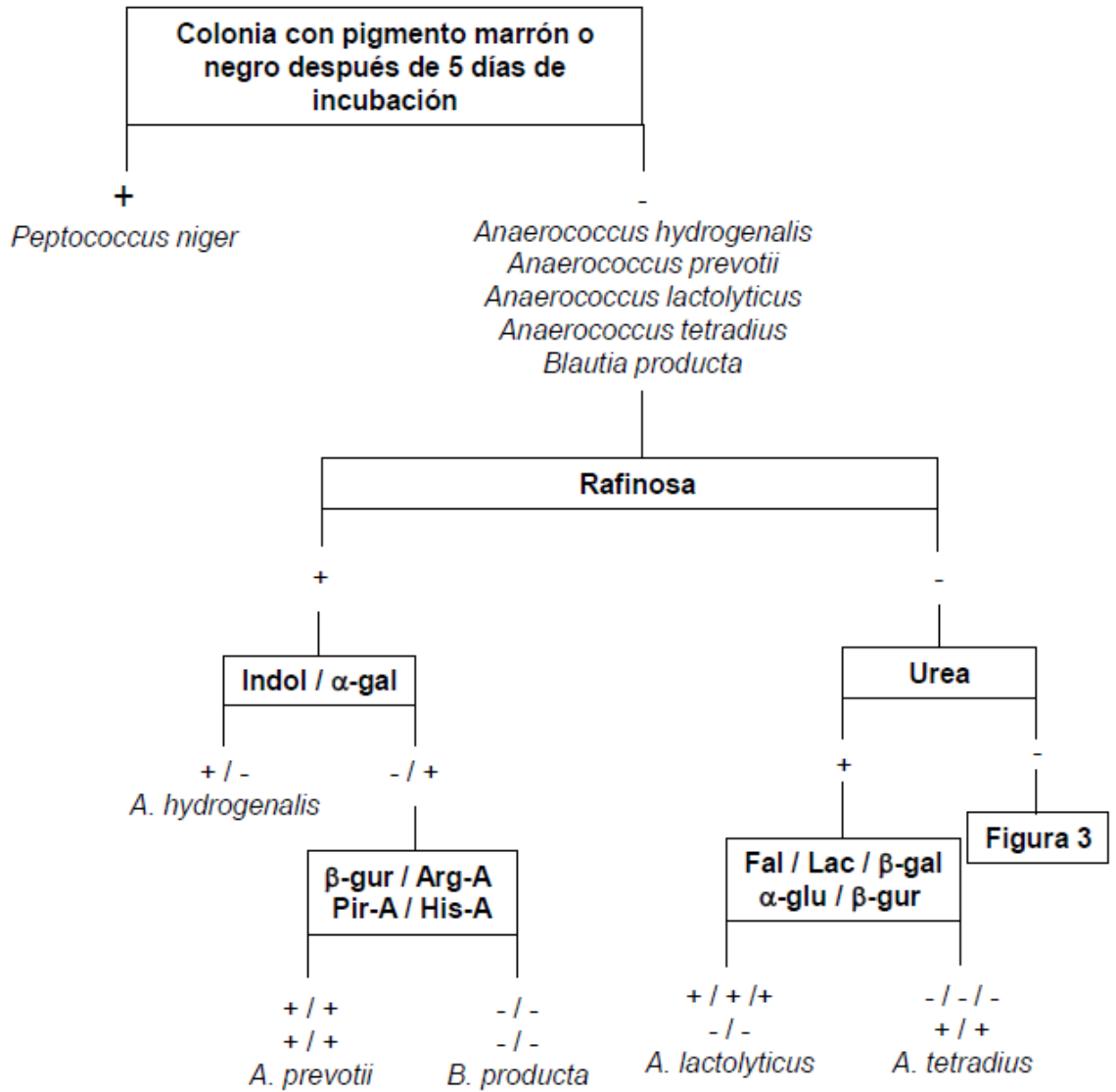
Figura 1. Cocos gram positivos.



Referencias:

*: La prueba de catalasa para *S. saccharolyticus* debe ser hecha a partir de un medio que contenga hemina. +: reacción positiva. -: reacción negativa. W: reacción positiva débil. ADH: arginina dehidrolasa. Leu-A: leucina arilamidasa. Tir-A: tirosina arilamidasa.

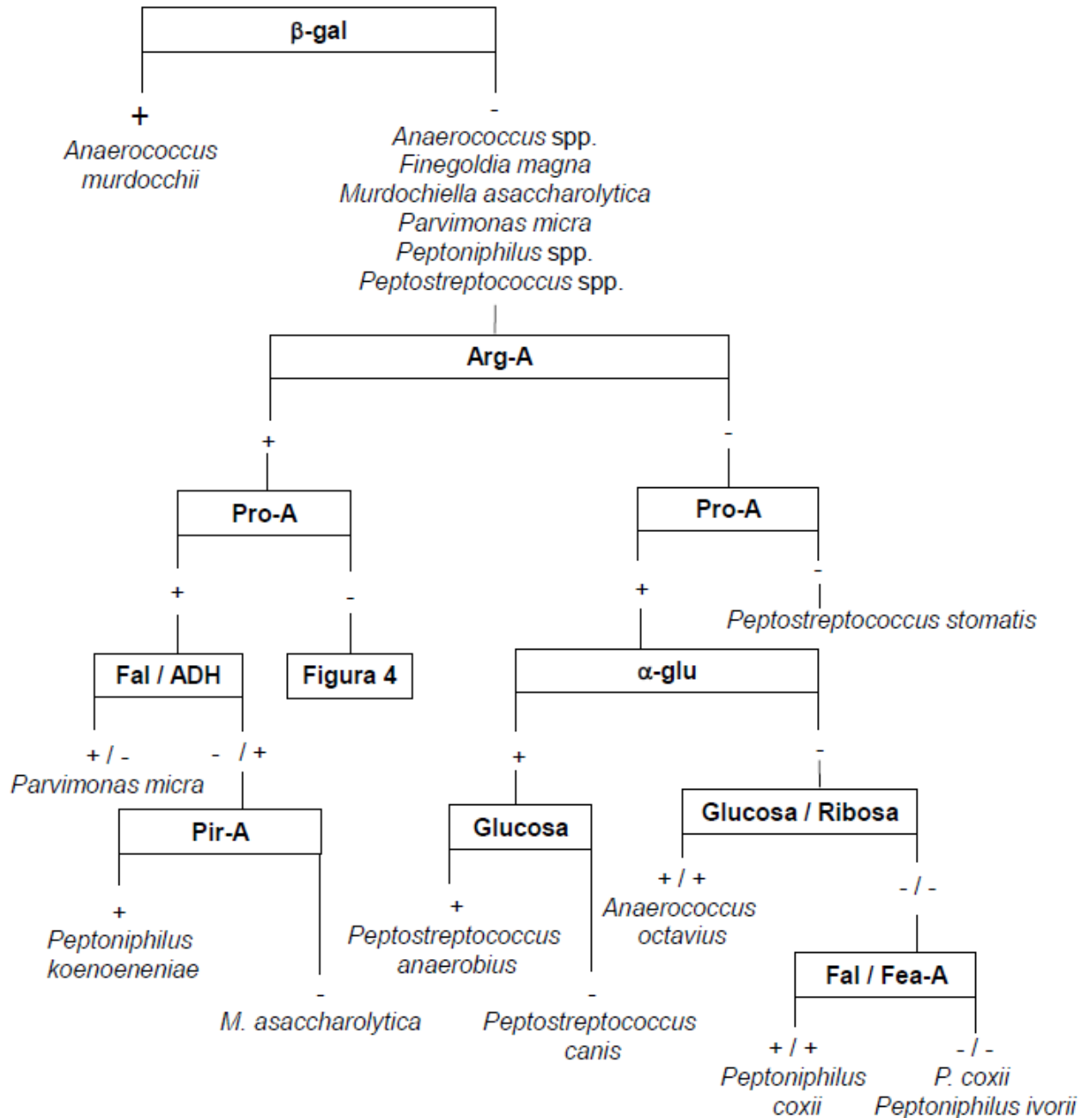
Figura 2. Cocos gram positivos, catalasa negativa.



Referencias:

+ : reacción positiva. - : reacción negativa. Rafinosa: fermentación de rafinosa. Lac: fermentación de lactosa. Urea: producción de ureasa. α-gal: α-galactosidasa. α-glu: α-glucosidasa. β-gal: β-galactosidasa. β-gur: β-glucuronidasa. Arg-A: arginina arilamidasa. Pir-A: piroglutamil arilamidasa / His-A: histidina arilamidasa. Fal: fosfatasa alcalina.

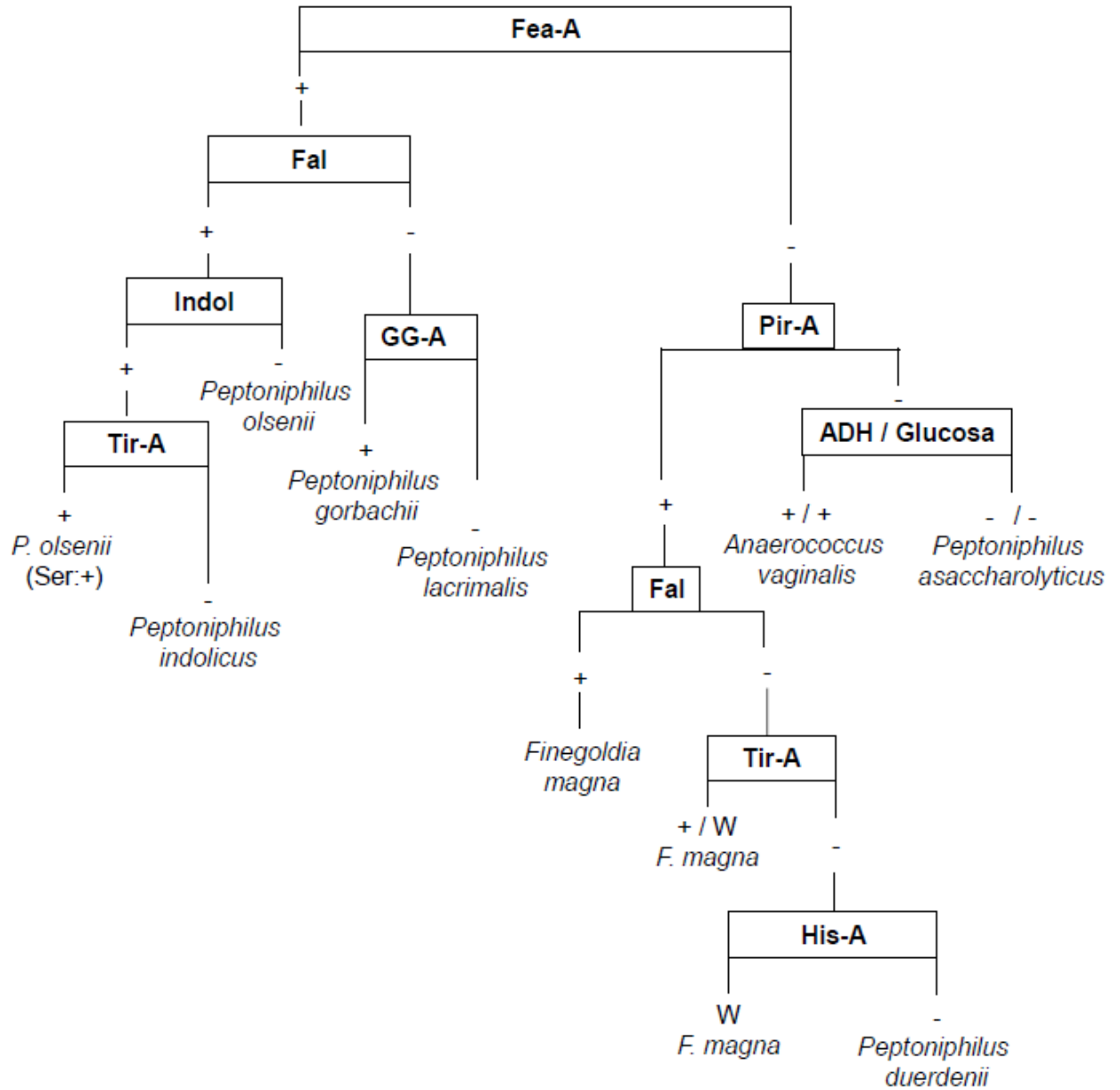
Figura 3. Cocos gram positivos, catalasa negativa, colonias sin pigmento, no fermentador de rafinosa y ureasa negativo.



Referencias:

+: reacción positiva. -: reacción negativa. ADH: arginina dehidrolasa. Fal: fosfatasa alcalina. Arg-A: arginina arilamidasa. Fea-A: fenilalanina arilamidasa. Pir-A: piroglutamil arilamidasa. Pro-A: prolina arilamidasa. α-glu: α-glucosidasa. β-gal: β-galactosidasa. Glucosa: fermentación de glucosa. Ribosa: fermentación de ribosa.

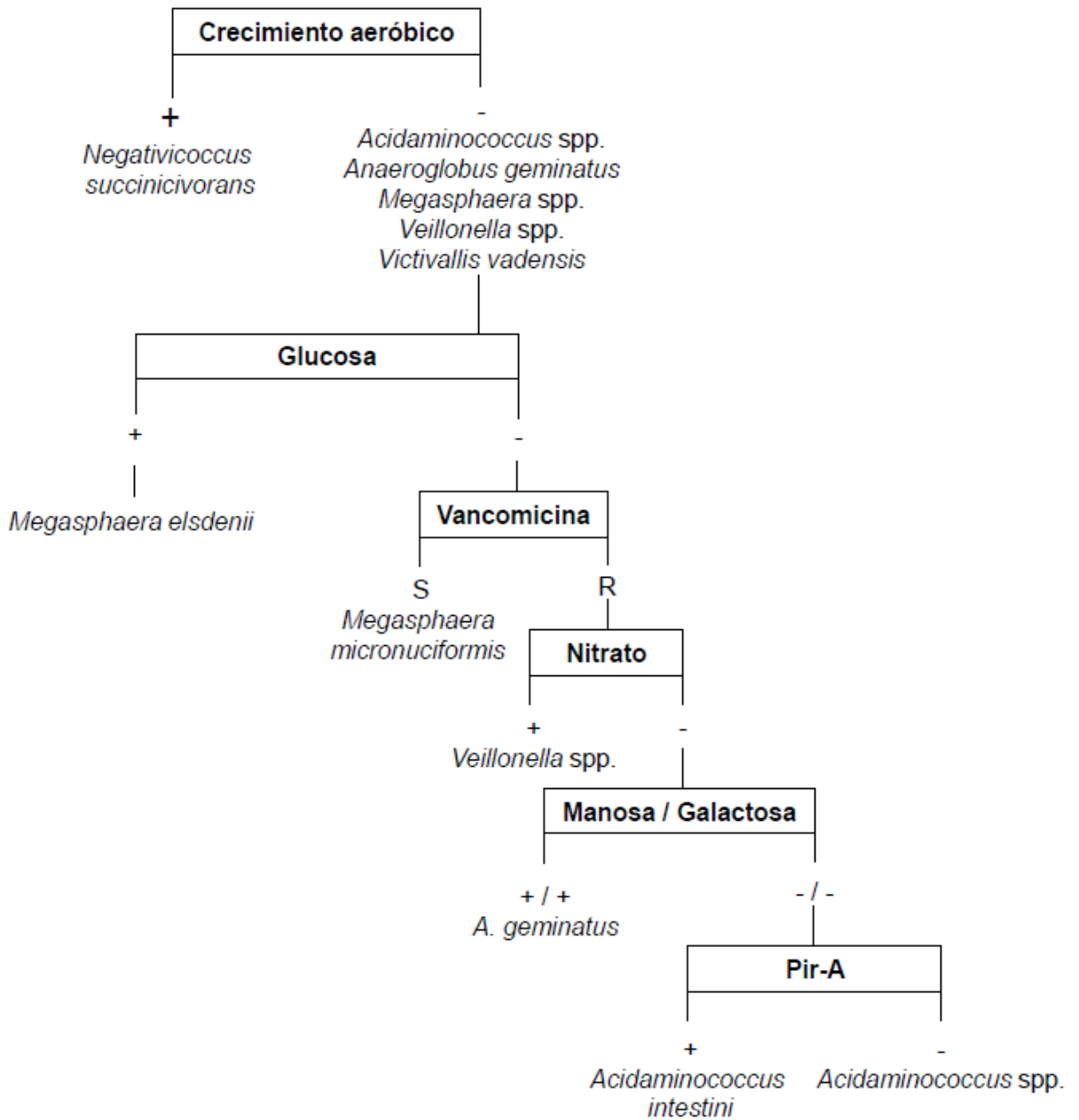
Figura 4. Cocos gram positivos, catalasa negativa, colonias sin pigmento, no fermentadores de rafinosa, ureasa, β -galactosidasa, prolina arilamidasa negativos y arginina arilamidasa positiva.



Referencias:

+: reacción positiva. -: reacción negativa. W: reacción positiva débil. ADH: arginina dehidrolasa. Fea-A: fenilalanina arilamidasa. Fal: fosfatasa alcalina. His-A: histidina arilamidasa. Indol: producción de indol. GG-A: glutamilglutámico arilamidasa. Tir-A: tirosina arilamidasa. Pir-A: piroglutamil arilamidasa. Glucosa: fermentación de glucosa.

Figura 5. Cocos gram negativos.



Referencias:

+: reacción positiva. -: reacción negativa. S: sensible. R: resistente. Glucosa: fermentación de glucosa. Manosa: fermentación de manosa. Galactosa: fermentación de galactosa. Vancomicina: inhibición por el disco de 5 µg de vancomicina. Pir-A: piroglutamil arilamidasa. Nitrato: reducción de nitrato a nitrito.

Capítulo IIIc. BACILOS GRAM POSITIVOS ANAEROBIOS ESPORULADOS

María Raquel Rollet

Jefa de la Unidad Bacteriología, Hospital Francisco J. Muñiz. Ministerio de Salud, Gobierno de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Docente adjunta de la Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad del Salvador. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Profesora adjunta de la Cátedra de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Fundación Barceló. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Cocoordinadora del Área Bacteriología, RedLab, Dirección General Adjunta de Redes de Servicios de Salud, Ministerio de Salud. Gobierno de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Miembro de la Subcomisión de Bacterias Anaerobias -Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas (SADEBAC)-Asociación Argentina de Microbiología (AAM). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

María Cristina Legaria

Bioquímica de planta en el Laboratorio de Bacterias Anaerobias del Hospital General de Agudos Dr. Enrique Tornú. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Miembro de la Subcomisión de Bacterias Anaerobias -Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas (SADEBAC)-Asociación Argentina de Microbiología (AAM). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Graciela Carloni

Ex Profesor Adjunto de Microbiología
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Miembro de la Subcomisión de Bacterias Anaerobias -Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas (SADEBAC)-Asociación Argentina de Microbiología (AAM). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Género *Clostridium*

Aspectos taxonómicos

El género *Clostridium* pertenece al dominio Bacteria, reino *Eubacteria*, filo *Firmicutes*, clase *Clostridia*, orden *Clostridiales* y actualmente está ubicado dentro de la familia *Clostridiaceae*.

Este género incluye, a la fecha, más de 200 especies y subespecies, de las cuales unas 30 se consideran patógenas o se han aislado a partir de muestras clínicas humanas o animales. Algunas como *Clostridium asparagiforme*, *Clostridium celatum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Clostridium hiranonis*, *Clostridium hylemonae* y *Clostridium lavalense* se han recuperado a partir de heces humanas sin que, hasta el momento, se asociaran a procesos patológicos. Otras se han reclasificado como *Hungatella hathewayi* (*Clostridium hathewayi*), *Flavonifractor plautii* (*Clostridium orbiscindes*) e *Intestinibacter bartlettii* (*Clostridium bartlettii*)^{61,66,93}.

La definición práctica, empleada y aceptada por la mayoría de los bacteriólogos describe a este género como un grupo importante y heterogéneo de especies de bacilos gram positivos, anaerobios con capacidad para esporular, con actividad fermentativa variable y que no producen catalasa. La mayoría es móvil por la presencia de flagelos peritricos y algunas especies poseen la propiedad de elaborar una cápsula^{16,31,66,94}.

Hábitat

Costridium spp. se distribuyen en el medio ambiente en forma ubicua, es así que pueden encontrarse en el suelo, sedimentos marinos y lacustres, pasturas y vegetales en descomposición.

Si bien son bacterias anaerobias, la resistencia de sus esporas les permite sobrevivir bajo condiciones adversas de acidez, temperatura, radiación ultravioleta (UV), cambios osmóticos, desecación, carencia de nutrientes y también, a la acción de la lisozima, de antisépticos y desinfectantes, incluido el alcohol y otros de uso frecuente en los nosocomios. Al respecto, cabe señalar que *Clostridium difficile* se distribuye en el medio hospitalario y que sus esporas pueden ser transportadas por el agua, el polvo, el instrumental médico u otros objetos. Se encontraron también en la proximidad de pacientes con diarrea causada por este germen, en los pisos debajo de sus camas, ropas y baños.

Algunas especies integran la microbiota residente del hombre y de los animales, entre ellas *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum* y *C. difficile*. Sin embargo, en muchas ocasiones causan infecciones endógenas^{7,16,34,94}.

Factores de virulencia

Toxinas

La mayoría de las especies patógenas elaboran toxinas, las cuales son las principales responsables de su patogenicidad. La calidad y la cinética de su producción difieren según la toxina y la especie microbiana que la elabora. Se trata de complejos proteicos cuyo peso molecular varía entre 22 y 600 kDa, tienen actividad enzimática y se exportan al medio con facilidad. Estas toxinas extracelulares, atraviesan la pared celular y se detectan en su máxima concentración durante la fase logarítmica de crecimiento. Otras se encuentran ligadas a estructuras de la pared celular, en el interior de la bacteria y se evidencian en la fase final de la esporulación, como es el caso de la enterotoxina elaborada por algunos toxinotipos de *C. perfringens*. Finalmente, un tercer grupo está constituido por las toxinas de localización protoplasmática,

las cuales se acumulan en el citoplasma bacteriano y se liberan al medio solamente cuando ocurre la lisis celular. Estas últimas se sintetizan *in vitro*, a 30-35 °C. Son ejemplos de ellas las neurotoxinas de *Clostridium botulinum*, la toxina alfa de *Clostridium novyi* y la neurotoxina tetánica^{74,75,89}.

La actividad biológica de las toxinas permite la identificación y caracterización de las especies y se evidencia por los efectos producidos en animales de laboratorio, sobre cultivos de tejidos o mediante la degradación de diferentes sustratos *in vitro*. Poseen actividades enzimáticas capaces de hidrolizar gradualmente estructuras celulares eucariotas, desde la membrana citoplasmática hasta la cromatina nuclear. Pueden tener actividad de neuraminidasa y contribuir a la unión con las células del hospedero; de lipasa o fosfolipasa y producir la ruptura de eritrocitos; de hialuronidasa y favorecer la invasión tisular; o de desoxiribonucleasa (DNasa), al destruir la estructura genómica de las células musculares que invaden. Otras, como las toxinas botulínicas y la tetánica son neurotoxinas, se unen a receptores del sistema nervioso a nivel de las sinapsis neuromusculares y alteran la fisiología de la musculatura estriada^{14,15,32,48}.

También varía la forma de ingresar al hospedero y difundirse por el organismo. Algunas toxinas se pueden ingerir preformadas en un alimento, como ocurre con las toxinas botulínicas. Otras pueden ser absorbidas desde el intestino después de la proliferación anormal del microorganismo en las vías digestivas, hecho que ocurre en la mayoría de los cuadros de enterocolitis y en el botulismo infantil. En otros casos, como sucede en la gangrena gaseosa, las formas vegetativas del microorganismo elaboran las toxinas cuando las esporas germinan en los tejidos infectados. Estas ejercen su acción en forma

local pero además se absorben, difunden y producen una toxemia generalizada, la cual puede llevar a la muerte del individuo afectado.

Por último, algunas infecciones se desarrollan con carácter local con producción de lesiones tisulares de menor importancia pero, con la elaboración de potentes toxinas que actúan a distancia como en los casos de tétanos, en algunos tipos de enterotoxemias y también en la hemoglobinuria bacilar de los herbívoros. El desarrollo de las infecciones clostridiales es el resultado del efecto combinado de la acción local del microorganismo y de la actividad de las toxinas que elabora^{74,75,89}.

Las toxinas clostridiales de mayor impacto clínico son las producidas por *C. perfringens*, *Clostridium tetani*, *C. botulinum*, *C. difficile* y *C. septicum*.

C. perfringens produce varias toxinas clasificadas como mayores o menores de acuerdo a la importancia que posean en la patología en cuestión. En la tabla 1 se describen los cinco toxinotipos reconocidos: A, B, C, D y E, según la elaboración de las cuatro toxinas mayores: α , β , ϵ e ι . Estas toxinas se secretan al medio durante la fase exponencial de crecimiento y los sobrenadantes de los respectivos cultivos resultan letales para animales de laboratorio y/o para cultivos celulares.

Las cepas del toxinotipo A elaboran además una enterotoxina (CPE) la cual se produce al final de la fase de esporulación y es la responsable de síndromes gastroentéricos. También se han encontrado cepas de *C. perfringens* tipos B y E productoras de CPE⁵¹.

La toxina α , una fosfolipasa C, se adhiere y actúa sobre las membranas celulares, y es producida en diferentes niveles por todos los tipos de *C. perfringens*. Es una zinc-metaloenzima con actividad de lecitinasa y

esfingomielinasa, se une al colesterol, a la esfingomielina y a la fosfatidil-colina de las membranas y los degrada. Tiene acción hemolítica y necrótica y es esencial en el desarrollo de gangrenas. Activa las plaquetas y estimula su agregación, así como la de los leucocitos en los capilares y arteriolas. De ese modo contribuye a la trombosis microvascular, a la necrosis isquémica de los tejidos y a la inhibición de la diapédesis de los neutrófilos. En altas concentraciones esta toxina produce la ruptura de las membranas celulares y en bajos niveles altera el metabolismo de fosfolípidos. Induce la activación de la proteína quinasa, el metabolismo del ácido araquidónico y la movilización de calcio. Las células endoteliales alteradas, las plaquetas y los neutrófilos llevan a la producción descontrolada de mediadores intracelulares y moléculas de adhesión, las cuales inhiben el *clearance* bacteriano e inducen eventos trombóticos^{16,74,75}.

La toxina β incluye dos variantes denominadas $\beta 1$ y $\beta 2$. Las mismas se pueden producir en forma separada o conjunta. La primera es letal y necrotizante, muy lábil y puede ser degradada por la tripsina, por lo cual su detección resulta dificultosa. La segunda posee actividad citotóxica y necrótica y se cree que actúa formando poros en la membrana celular^{107,113}.

La toxina ϵ es una proteína secretada en forma inactiva. Por acción de proteasas aumenta su toxicidad, se une a membranas celulares y altera su permeabilidad con la consiguiente producción de edema.

La toxina ι es una toxina binaria formada por dos proteínas independientes, un componente de unión a la célula (ιb) y otro enzimático (ιa), los cuales actúan en conjunto. El componente ιb reconoce al receptor de

superficie celular, ambos se internalizan por endocitosis y la fracción 1a se libera, altera la estructura del citoesqueleto y causa destrucción tisular⁷⁰.

C. perfringens secreta también otras enzimas hidrolíticas las cuales degradan diversos sustratos y contribuyen al daño tisular. En general son denominadas toxinas menores y se han identificado 17 variedades. En la tabla 2 se enumeran las más importantes junto con su actividad enzimática⁷⁴.

La enterotoxina de *C. perfringens* es un polipéptido de 35 kDa el cual actúa como un superantígeno al promover una respuesta inflamatoria exacerbada. Es resistente a la acción de tripsina y quimiotripsina, pero sensible a pronasa. En el intestino delgado, a nivel del ribete en cepillo, se une a un receptor de membrana e induce una alteración de la permeabilidad celular, como consecuencia se produce una pérdida de iones y metabolitos. Esto altera la función metabólica, provoca un daño morfológico y una eventual lisis celular^{33,68,74,87}.

C. botulinum comprende 6 toxinotipos denominados con letras desde la A hasta la F. *C. botulinum* tipo G se reclasificó como *C. argentinense*. Todos los toxinotipos producen una neurotoxina con idéntica actividad, pero con diferente potencia y estructura antigénica. Entre las toxinas bacterianas identificadas, las botulínicas se reconocen como las más potentes. La dosis letal de la toxina A para una persona adulta se encuentra entre 0,1 y 1 µg. Esta toxicidad extrema ha convertido a las toxinas botulínicas en una de las principales armas biológicas conocidas. No obstante, se emplean en diluciones elevadas con fines terapéuticos para afecciones de hiperactividad muscular, trastornos espásticos o también con fines estéticos^{16,94}.

Las toxinas botulínicas se sintetizan a pH alcalino como un precursor inactivo en una cadena polipeptídica de 150 kDa. Se liberan durante la lisis bacteriana y luego se fragmentan a nivel del N terminal por la acción de proteasas bacterianas o de enzimas digestivas como tripsina. De este modo se originan dos cadenas, una pesada y una liviana unidas por un puente disulfuro. Cuando se ingiere la toxina, en el tracto digestivo se asocia a proteínas no tóxicas para formar complejos de mayor tamaño y llegan a los 300 kDa. Esta asociación permite su pasaje por el tracto intestinal y evita su degradación por la acidez gástrica y las enzimas digestivas.

La toxina botulínica ingerida con un alimento o producida *in situ*, llega al torrente sanguíneo y actúa en la membrana presináptica de las neuronas motoras donde bloquea la liberación del neurotransmisor. La porción C terminal de la cadena pesada es la responsable de la unión a un receptor en la membrana de la célula blanco, la región N terminal regula la penetración y la cadena liviana, dentro del citosol, bloquea la liberación de acetilcolina. El resultado es una parálisis flácida que puede concluir con la muerte del individuo afectado⁷⁵.

C. tetani produce una hemolisina sin actividad patogénica denominada tetanolisina y una neurotoxina, tetanospasmina, responsable de la sintomatología de la enfermedad. Esta última es una toxina espasmogénica y letal aún en pequeñas concentraciones. Es una de las toxinas bacterianas más potentes que se conoce y sólo es superada por las toxinas botulínicas. Se sintetiza como un precursor inactivo ligado a la pared bacteriana. Con la lisis del microorganismo por acción de las proteasas bacterianas se libera y se fragmenta en una cadena pesada y una liviana. Se trata de una proteína

binaria, plasmídica, antigénica y lábil a la acción de las enzimas del tracto digestivo. Esta toxina tiene como blanco a las neuronas reguladoras de la médula espinal y llega a las mismas a través de los axones de las neuronas motoras o por vía sanguínea. La cadena pesada se fija a las terminaciones de las neuronas motoras periféricas y a través del axón, mediante un transporte intra neuronal retrógrado llega al sistema nervioso central (SNC). En las terminales pre-sinápticas bloquea la liberación de los neurotransmisores inhibidores: glicina y GABA (ácido gamma-aminobutírico)^{16,75,84,94}.

C. septicum elabora varias toxinas proteicas con actividad enzimática. La toxina α se secreta como protoxina, es una hemolisina que se une a las membranas celulares eucarióticas, forma canales y produce un desbalance osmótico con la consecuente lisis celular. La toxina β posee actividad de DNasa y de leucocidinas. La toxina γ es una hialuronidasa y la δ (delta) es una hemolisina lábil al oxígeno. También elabora otras toxinas con actividad de neuraminidasa, lipasa y fibrinolisisina. Todo este conjunto enzimático genera una mionecrosis y un aumento de la permeabilidad capilar seguidos de una toxemia generalmente mortal^{48,76}.

C. novyi comprende los toxinotipos A, B y C (ver tabla 3). El primero es agente causal de gangrena en el hombre y en los animales, mientras que los otros causan principalmente patologías en los animales. El factor de virulencia más importante de esta especie bacteriana es la toxina α ; la toxina β es una fosfolipasa con actividad hemolítica, necrotizante y letal. La función de las otras toxinas no se conoce bien, aunque la toxina γ es una fosfolipasa con actividad necrotizante y la δ es una hemolisina lábil al oxígeno.

Clostridium haemolyticum es semejante a *C. novyi* B, pero produce toxina β en mayores cantidades que éste y no elabora toxina α ^{16,74}.

Clostridium sordellii produce fosfolipasas, una hemolisina lábil al oxígeno, una toxina letal (TL) y una hemorrágica. La TL posee un alto peso molecular y presenta una secuencia de aminoácidos similar a la toxina B de *C. difficile* y a la toxina α de *C. novyi*, pero difiere en los receptores celulares a los cuales se une. Mediante su actividad de glucosiltransferasa todas estas toxinas alteran la estructura de los filamentos de actina y con ello el citoesqueleto de las células blanco. La TL es antigénica y su antisuero da reacción cruzada con la citotoxina de *C. difficile*.

Clostridium chauvoei elabora un complejo toxigénico que comprende cuatro toxinas principales: α , β , γ y δ . Este complejo expresa actividad de fosfolipasa, DNasa y hialuronidasa e interviene en el proceso de miositis gangrenosa. Además elabora una sialidasa con actividad de neuraminidasa la cual actúa como adhesina en la unión con los receptores de las células blanco^{16,74,94}.

La patogenicidad de *C. difficile* resulta de la acción de las toxinas A (TcdA, 308 kDa) y B (TcdB, 269 kDa). Según su capacidad para elaborar una o ambas toxinas las cepas se clasifican como A+/B+ o A-/B+. Las cepas A-/B- designadas también NoA-NoB, no se consideran patógenas. Sin embargo, estas últimas podrían elaborar otros factores de virulencia aún no aclarados por completo. Ambas toxinas son glucosiltransferasas, se producen al final de la fase logarítmica y durante la fase estacionaria de crecimiento como consecuencia de la estimulación del ambiente en el que se encuentran. TcdA tiene actividad de enterotoxina y TcdB de citotoxina. Cada una de ellas está

formada por una cadena única con una fuerte homología entre sí. Poseen tres dominios: el dominio C terminal es responsable de la fijación a los receptores celulares, el intermedio se relaciona a la internalización de la toxina y el N terminal posee actividad tóxica. El receptor para TcdA es un carbohidrato Gal- β -(1,4)-N-Ac-Glc y el receptor para TcdB aún no está definido, aunque debido al amplio rango de células que afectan, este último puede ser ubicuo⁷².

Las toxinas se internalizan por endocitosis y en el citoplasma de la célula del hospedero inactivan las Rho-GTPasas (Rho, Rac y Cdc42, pequeñas proteínas reguladoras del citoesqueleto de actina). Así provocan despolimerización de la actina, pérdida del citoesqueleto y muerte celular. Las proteínas Rho desregulan las uniones complejas entre los enterocitos, aumenta la permeabilidad de la mucosa del colon y se produce la diarrea típica por *C. difficile*. Un efecto adicional es la activación del factor de necrosis tumoral alfa y de interleuquinas. Este hecho genera un aflujo masivo de neutrófilos y promueve la apoptosis celular, con la consiguiente formación de las estructuras pseudomembranosas presentes en algunos casos.

Ambas toxinas presentan actividad similar, TcdB es 100 a 1000 veces más potente en su efecto citotóxico. Por su parte, TcdA causa necrosis, aumento de la permeabilidad intestinal e inhibición de la síntesis proteica, daña las microvellosidades de la mucosa intestinal y puede producir una erosión completa de las mismas^{74,81,88,108}.

Algunas cepas de *C. difficile* elaboran una toxina binaria (ADP-ribosil-transferasa) denominada CDT. Esta toxina se une en forma irreversible a la actina e induce la formación de largas protuberancias de microtúbulos en las células del hospedero con lo cual se favorece la adherencia bacteriana. CDT

se ha detectado en cepas virulentas como las del RT 027/NAP1/BI y RT 078, aunque aún no está esclarecida su función en la patogenicidad. Otros factores que podrían estar involucrados son enzimas extracelulares, adhesinas, fimbrias, una cápsula y una proteína S; además de una toxina ι , flagelos, y algunos serotipos^{35,74,81,92,108}.

Genética

El género *Clostridium* posee una concentración de G + C de 22 a 55 moles %, lo cual indica una variedad genómica significativa coincidente con su biodiversidad. La síntesis de las toxinas descritas se encuentra codificada en genes de virulencia ubicados en el cromosoma o en ADN extracromosómico. En la mayoría de los casos estos genes comprenden secuencias ubicadas en regiones correspondientes a islas de patogenicidad, flanqueadas por transposones u otros elementos de inserción. Este hecho, sumado a la codificación en plásmidos o fagos, cuya movilidad puede ocurrir por conjugación, transposición y posiblemente por transducción, explicaría los diferentes niveles de toxigenicidad detectados en los aislamientos de laboratorio. Es así que *C. perfringens* se ubica como un reservorio de genes transmisibles a otras especies dentro y fuera del género *Clostridium*.

En el caso de *C. perfringens* se conoce completamente su mapa cromosómico y la mayoría de los genes de virulencia están caracterizados. Los genes que codifican para las toxinas α , ϕ , κ y μ (alfa, theta, kappa y mu) se localizan en regiones variables del cromosoma cercanas al origen de replicación. Solo aquellos que codifican para neuraminidasas se localizan en regiones conservadas. Por el contrario, los genes codificantes de las toxinas β 1 y β 2, ϵ , ι y λ se encuentran en plásmidos de diferentes tamaños (entre 55 y 140

Kb). El gen que codifica CPE se ha encontrado en regiones variables del cromosoma y en plásmidos (tabla 4)^{51,58,67}.

Los genes codificantes de las toxinas de *C. botulinum* A, B, E y F se encuentran en el cromosoma y los de las toxinas C y D en fagos. Los correspondientes a *C. argentinense* se ubican en plásmidos^{74,75}.

Las toxinas de *C. septicum* y *C. sordellii* se codifican en el cromosoma, mientras que el gen de la toxina α de *C. novyi* A se ubica en un plásmido^{16,74,75}.

Las toxinas TcdA y TcdB de *C. difficile* son cromosómicas y se encuentran codificadas en un *locus* de patogenicidad (PaLoc de 19,6 kb) junto a los genes reguladores *tcdC*, *tcdR* (anteriormente *tcdD*) y *tcdE*. El gen *tcdC* actúa como regulador negativo, aumenta su expresión en la fase de crecimiento exponencial y disminuye en la estacionaria. Se encontró que cepas hipervirulentas del ribotipo (RT) 027/NAP1/BI producen altos niveles de TcdA y TcdB debido a alteración del gen *tcdC*. Este hecho también se observó en el RT 078³⁵. Por el contrario, el gen *tcdR* es un regulador positivo y se expresa en la fase estacionaria. El gen *tcdE* participa en la liberación de ambas toxinas al incrementar la permeabilidad de la pared bacteriana. Se ha propuesto que el medio ambiente, las concentraciones subinhibitorias de antibióticos y los catobolitos cumplen un papel inductor de la síntesis de las toxinas.

La toxina CDT también está codificada en el cromosoma por los genes *cdtA* y *cdtB*, ubicados en el locus CdtLoc, el cual codifica además el gen regulador positivo *cdtR*^{92,108}.

C. difficile posee un antígeno común, glutamato deshidrogenasa (GDH), el cual se sintetiza en niveles elevados. Este antígeno da reacciones cruzadas con otras especies de *Clostridium* y en particular con *C. sordellii*. El gen *gluD*,

ubicado en el cromosoma, codifica la síntesis de esta enzima y se encuentra tanto en cepas toxigénicas como en las no toxigénicas^{10,83}.

Impacto clínico

Las especies de clostridios pueden causar una amplia variedad de infecciones, así como intoxicaciones o toxoinfecciones, aunque también pueden ser contaminantes de materiales clínicos^{15,29,38,79,80,94}.

Las infecciones causadas por los miembros de este género son principalmente de origen endógeno y en general de etiología mixta. Sin embargo, en afecciones histotóxicas como la gangrena gaseosa y la celulitis se pueden encontrar como agentes etiológicos únicos y en algunos casos su origen es exógeno. Entre las infecciones e intoxicaciones causadas por clostridios se enumeran bacteriemias, infecciones de partes blandas como celulitis y mionecrosis, infecciones intraabdominales, de vías biliares, del tracto genital femenino, pleuropulmonares, del SNC, infecciones entéricas, intoxicaciones alimentarias y patologías como tétanos y botulismo. En forma independiente de su origen, la especie recuperada con mayor frecuencia de muestras clínicas es *C. perfringens*^{2,27,59,97,111}.

Las bacteriemias por *Clostridium* tienen como principal puerta de entrada la mucosa intestinal y con menor frecuencia la genital. No obstante, se pueden producir bacteriemias secundarias a infecciones de partes blandas y a cirugías biliar e intestinal. Estas bacteriemias pueden presentarse como complicaciones de enfermedades gatrointestinales, asociadas a cirrosis y diabetes y pueden causar infecciones metastásicas⁸⁵. La especie más aislada de hemocultivos es *C. perfringens*⁹⁸ y en menor grado *C. septicum*⁸². En el caso particular de esta última especie, las bacteriemias se presentan en pacientes con cáncer de colon

sin manifestaciones previas de dicha patología⁸². No obstante, el aislamiento de *Clostridium* spp. de una muestra de sangre también puede corresponder a una contaminación (seudobacteriemia) o puede representar una bacteriemia transitoria sin consecuencias clínicas y muchas veces sin una puerta de entrada evidente.

La gangrena gaseosa clostrídica es un proceso agudo que requiere una intervención pronta y “heroica”. Se presenta luego de traumatismos abiertos o cerrados, pero se asocia en particular a heridas contaminadas. La acción de las toxinas de *C. perfringens*, en especial la toxina α , causa gran destrucción tisular al mismo tiempo que favorece la diseminación del microorganismo, exacerba la toxemia y genera una marcada hemólisis intravascular. El período de incubación varía desde pocas horas hasta algunos días, según la carga infectante y el nivel de producción de toxinas⁹⁰.

C. septicum es un agente primario de gangrenas gaseosas en el hombre y en diversas especies animales⁸². La infección se adquiere a través de heridas, por transmigración intestinal, por contaminación quirúrgica o por infección del cordón umbilical. En los rumiantes, especialmente en ovinos, la infección se asocia a heridas en el tracto digestivo causadas por la ingestión de pastos congelados. También puede aparecer en distintos tejidos como un invasor *post mortem*.

C. sordelli junto con otras especies causa gangrenas gaseosas y abscesos en humanos y animales, o se aísla como un contaminante de heridas quirúrgicas¹⁰¹. Puede causar enterotoxemias en animales, en especial cuando se hallan hacinados¹⁶.

Otros agentes asociados a infecciones de piel y partes blandas son *C. novyi*, *C. histolyticum*, *C. sordellii*. Pueden causar infecciones necróticas agudas, graves, por acción de proteasas, fosfolipasas y citotoxinas, en especial en pacientes diabéticos, aunque también pueden formar abscesos. *C. histolyticum* es causal de endocarditis en usuarios de drogas endovenosas. *Clostridium clostridioforme* se aísla de heridas abdominales y otros procesos relacionados a la mucosa intestinal¹³.

La intoxicación alimentaria por *C. perfringens* se presenta con náuseas, dolor abdominal y diarrea espumosa y maloliente. Se asocia a la ingestión de alimentos, en particular cárnicos, contaminados con una elevada carga del toxinotipo A. El período de incubación es de 8 a 24 h. Los síntomas son relativamente leves, de corta duración (menos de 24 h) y se deben a la acción de la enterotoxina. En general la enfermedad se autolimita⁴⁵.

El botulismo es una enfermedad causada por acción de neurotoxinas sintetizadas por una especie heterogénea, *C. botulinum*. Se caracteriza por una parálisis flácida, simétrica y descendente. La misma comienza por los pares de nervios craneales, desciende hacia los músculos del tórax y de las extremidades y puede causar la muerte del individuo por falla respiratoria. Las manifestaciones de flaccidez suelen estar precedidas por síntomas gastrointestinales como náuseas, vómitos, diarrea o constipación. En la mayoría de los casos, el botulismo se asocia a una intoxicación por ingesta de alimentos con toxina preformada y se presenta como un brote en el grupo de individuos que ha ingerido dichos alimentos. También puede tratarse de una toxoinfección por la germinación de esporas en el tubo digestivo, lo cual sucede en lactantes, con menor frecuencia en niños menores de 1 año o en algunos

adultos con colonización intestinal por *C. botulinum* y factores predisponentes. Otras formas, son el botulismo por contaminación de heridas y el botulismo por inhalación accidental de la toxina o debido a acciones de bioterrorismo.

Las esporas de *C. botulinum* son muy resistentes al calor. Requieren 121 °C durante 20 minutos para su destrucción. Por el contrario, las toxinas se inactivan a 80 °C en 30 minutos o a 100 °C durante 10 minutos, por lo tanto, la cocción suficiente de los alimentos es una adecuada medida de prevención del botulismo alimentario. Se reconocen cuatro grupos de *C. botulinum*, según sus características fenotípicas y toxigénicas (tabla 5)^{16,75,94,115}.

El diagnóstico de botulismo se basa en las manifestaciones clínicas y la epidemiología. La detección del microorganismo y de la toxina involucrada resulta importante para la confirmación del diagnóstico de botulismo y para fines bromatológicos. La identificación de las toxinas se realiza en laboratorios de referencia. Para ello se examinan alimentos, heces y suero de los individuos afectados y en el caso de animales, también se incluyen tejidos. La identificación de la toxina botulínica se realiza mediante técnicas de neutralización en animales de laboratorio con las antitoxinas específicas de tipo o por enzimoimmunoanálisis (EIA), pero su sensibilidad es menor que la de la prueba biológica.

El tétanos es una enfermedad toxigénica, con frecuencia se asociada a heridas, mordeduras, fracturas expuestas o quemaduras contaminadas por el polvo o por objetos corto-punzantes (astillas, espinas, clavos) que contengan esporas de *C. tetani*. En algunos casos estas heridas pueden ser inaparentes. Bajo condiciones adecuadas se genera la neurotoxina tetánica y se disemina al SNC. El resultado es una hiperexcitabilidad de las neuronas motoras con

contracciones tónicas y clónicas, espasmos musculares, parálisis y disfunción autónoma, lo cual puede conducir a un estado de contractura generalizada y permanente de la musculatura estriada y finalmente, a la muerte del paciente por parálisis espástica de los músculos respiratorios. Las manifestaciones clínicas comienzan en general a los 3 días a varias semanas después de producirse la herida. Este período de incubación depende entre otros factores, de la distancia entre la herida y el SNC. Cuanto menor sea la misma, el cuadro revestirá mayor gravedad^{39,94}.

Clasificación del tétanos según sus manifestaciones clínicas

Tétanos generalizado: el síntoma más común es el trismo (contracción de los músculos maseteros) y la risa sardónica. Con frecuencia se acompaña de rigidez de nuca, espalda y abdomen, además de espasmos reflejos dolorosos y parálisis espástica.

Tétanos localizado: es inusual. Afecta a la extremidad relacionada a una herida y puede progresar hasta un tétanos generalizado.

Tétanos cefálico: se asocia a infecciones en la cabeza y en el oído medio. El período de incubación es corto (1 ó 2 días) y tiene mal pronóstico.

Tétanos neonatal: suele detectarse en países en desarrollo, en hijos de madres no inmunizadas y se asocia a infecciones del cordón umbilical⁸⁴.

El diagnóstico de tétanos se realiza en base a las manifestaciones clínicas y a los antecedentes del paciente. El laboratorio de microbiología puede confirmar el diagnóstico clínico, pero el paciente requiere un tratamiento inmediato. *C. tetani* se puede aislar a partir del tejido infectado u objeto hallado en la herida; sin embargo, este procedimiento no es muy empleado ya que la sensibilidad de los cultivos es baja y algunas veces la puerta de entrada es

inaparente. De los cultivos de heridas asociadas al tétanos realizados entre 1987 y 1996 en la Unidad Bacteriología del Hospital "F.J. Muñoz", se aisló *C. tetani* en el 16 % de los casos (Rollet, R. Resultados no publicados).

C. chauvoei y *C. haemolyticum* son patógenos casi exclusivos de animales. *C. chauvoei* es el agente etiológico del carbunco sintomático, pierna negra (*black leg*) o mancha de los herbívoros. Sus esporas pueden ser captadas por los macrófagos de la mucosa intestinal y son transportadas al hígado y al músculo estriado, donde permanecen latentes. Ante un trauma o una herida que lesionen los tejidos, las esporas germinan y las toxinas elaboradas se diseminan por vía sanguínea y provocan la muerte del animal afectado^{16,34,38}.

C. haemolyticum ingresa por vía digestiva y reside en el intestino o en el hígado. En animales jóvenes y con antecedentes de destrucción del estroma hepático produce una afección denominada hemoglobinuria bacilar. Sus toxinas provocan necrosis hepática y su diseminación por vía sanguínea conlleva a hemólisis intravascular y hemorragias, con la muerte del hospedero^{16,74}.

C. difficile causa el 25-30 % de las diarreas adquiridas en el medio hospitalario y el 15 a 25 % de los episodios asociados a tratamientos antibióticos. La infección por *C. difficile* toxigénico (ICD) produce un amplio espectro de manifestaciones clínicas, desde la colonización del tracto gastrointestinal, diarrea leve a moderada hasta colitis pseudomembranosa con graves complicaciones y riesgo de vida para el paciente como en los casos de megacolon tóxico, ileo paralítico y perforación colónica.

Las esporas se transmiten de persona a persona o desde el medio ambiente e ingresan por vía oral. Germinan en el intestino delgado, hecho que se estimula por la presencia de sales biliares y algunos aminoácidos, luego puede colonizar el intestino grueso donde producirá las toxinas.

Los factores de riesgo para el desarrollo de ICD son la hospitalización prolongada, la administración de antibióticos en los 2 meses previos al episodio, la permanencia en residencias geriátricas y la edad mayor de 65 años. Otros factores son la administración de citostáticos, la radioterapia, los procedimientos invasivos del tracto gastrointestinal, las enfermedades crónicas y la inmunodepresión. Además se relacionó al consumo de antiácidos y a la transmisión a partir de animales, pero el impacto de estos factores no se ha demostrado de modo fehaciente. La ICD también se puede manifestar en pacientes de la comunidad, jóvenes y sin factores de riesgo conocidos^{12,69,91}.

Con respecto al tratamiento antibiótico previo, los agentes asociados con mayor frecuencia son clindamicina (CLI), cefalosporinas y fluoroquinolonas, aunque la mayoría de los antibióticos se puede relacionar con los episodios.

C. difficile coloniza el tracto intestinal del 4-62 % de los neonatos y este porcentaje desciende durante la infancia hasta alcanzar a los 3 o 4 años una prevalencia de colonización similar a la de los adultos. En la población pediátrica, como en la adulta, la ICD es la causa más frecuente de diarrea de origen nosocomial en pacientes con antecedentes de tratamiento antibiótico reciente e inmunosupresión con esteroides o quimioterapia^{9,19,60,77}.

Hasta un 20 % de los pacientes con ICD y evolución favorable puede presentar un episodio de recurrencia dentro de las 4 semanas de haber

completado el tratamiento. Entre los pacientes que presentaron el segundo episodio el riesgo de un tercero se eleva hasta un 60 %.

Se observó que pacientes asintomáticos portadores de cepas toxigénicas presentan niveles de IgG anti toxina A más elevados que quienes desarrollan la enfermedad, por lo cual estos anticuerpos se vinculan con un efecto protector^{17,50}. Se postula que la falta de una respuesta inmune humoral adecuada podría ser un predictor adicional de la gravedad de la ICD y de su recurrencia^{20,46,47,112}.

El cuadro puede remitir con la suspensión de los agentes desencadenantes y el mantenimiento de la homeostasis. Ante la imposibilidad de esta suspensión, o ante pacientes con cuadros graves o recurrentes se administra vancomina por vía oral o parenteral o, junto con metronidazol (MTZ), ambos por esta última vía parenteral. Otros agentes útiles para el tratamiento son fidaxomicina y tigeciclina, y se podrían emplear probióticos, ligantes de toxinas, trasplante fecal e inmunoterapia²².

La mayoría de los casos de ICD se asocia a cepas TcdA+TcdB+CDT- y a cepas TcdA-TcdB+. Estas últimas también dieron origen a brotes con igual presentación clínica en diferentes países, incluido Argentina^{9,74,81,105,108}. Las cepas variantes más estudiadas a partir de brotes son las A-B+ RT 017 y las A+B+CDT+ RT 027 y RT 078. Las últimas, además de CDT, producen muy elevados niveles de TcdA y TcdB. Entre ellas, las cepas hipervirulentas RT027/BI/NAP1/toxinotipo III, producen un cuadro clínico más grave y fueron responsables de brotes principalmente entre 2003 y 2006 en Europa, Canadá y EE.UU. y también se detectaron en nuestro país^{1,11,36,54,55,103}.

El RT 017 se relaciona principalmente con el toxinotipo VIII, serogrupo F, análisis por enzimas de restricción [*restriction endonuclease analysis* (REA)] tipo CF, y las cepas de este RT presentan el gen *tcdA* truncado (1,8-kb)¹¹.

En un centro hospitalario de Argentina se ha descrito la diseminación de este RT y el consecuente desplazamiento de otros RT circulantes (001, 012, 014, 031, 039). En otro centro de la misma ciudad también se describió el REA tipo CF (con TcdA-TcdB+, serogrupo F, toxinotipo VIII y RT 017) con una prevalencia de 85 %^{55,62}.

Las infecciones extraintestinales por *C. difficile* son raras. Se citan casos de peritonitis, infecciones de heridas, pielonefritis, celulitis, fascitis, infecciones de prótesis artrosis, osteomielitis, empiema, abscesos y bacteriemia^{20,65,78,81}.

Diagnóstico Microbiológico

El aislamiento y la diferenciación de las especies de *Clostridium* pueden resultar complejos debido a la variedad de especies, a la diversidad de las pruebas requeridas y la variabilidad en los resultados de algunas de ellas. Una dificultad aún mayor es la correcta valoración de los aislamientos, ya que si bien pueden ser agentes etiológicos únicos, también pueden estar involucrados en proceso de etiología mixta, o ser contaminantes de los materiales clínicos.

La valoración requiere el procesamiento de especímenes adecuados y la integración de los hallazgos microbiológicos con los datos clínicos y epidemiológicos. Las muestras deben ser representativas del foco de la infección, libres de contaminantes y transportadas bajo condiciones de anaerobiosis. Son aptas las obtenidas por punción-aspiración de cavidades cerradas a través de la piel sana o de tejidos no contaminados, tejidos de

biopsias o autopsias. Los materiales fluidos purulentos o necróticos, por tener un potencial de óxido-reducción (Eh) bajo, se pueden transportar en tubos plásticos con cierre hermético a temperatura ambiente pero, siempre que el volumen permita formar una columna de por lo menos 1 cm de altura. En estas condiciones se conserva hasta 30 minutos; un volumen mayor a 2 ml se conserva por 2 ó 3 h. Las piezas de tejido cuyo volumen sea mayor de 1 cm³ pueden transportarse en recipientes estériles, sin conservantes, a temperatura ambiente y se deberán procesar en forma inmediata.

Las muestras de colecciones claras o de volúmenes reducidos deben protegerse del efecto deletéreo del oxígeno mediante el empleo de sistemas de transporte adecuados, como frascos con medios de transporte y atmósfera inerte balanceada o anaeróbica^{7,42,43,94}.

El diagnóstico de la ICD involucra pautas clínicas, epidemiológicas, microbiológicas y endoscópicas. En la clasificación del nivel de gravedad de la enfermedad también se incluyen otras determinaciones como recuento leucocitario en sangre periférica, nivel de albuminemia y parámetros ecográficos. Pero el diagnóstico de certeza es el bacteriológico, el cual debe ser preciso y rápido a fin de instaurar el tratamiento adecuado al paciente y de implementar las medidas de control epidemiológico pertinentes dirigidas a evitar su diseminación en el medio hospitalario. El método de referencia, en la actualidad, es el cultivo toxigénico^{9,17}.

Las pruebas de laboratorio se deben realizar en heces de pacientes que presenten al menos 3 deposiciones diarreicas diarias de más de 24 h de evolución y con factores de riesgo. En el caso de pacientes con íleo se estudian las muestras intestinales obtenidas por endoscopia o las disponibles.

Los estudios se deberían repetir ante la persistencia de un episodio y frente a resultados previos negativos. Sin embargo, no se aconseja la realización de las pruebas diagnósticas en pacientes o contactos asintomáticos, en episodios ya diagnosticados, ni como seguimiento o control de tratamiento^{30,95}. De rutina no se deben repetir muestras de individuos con resultado previo de toxina negativo a excepción de aquellos casos en los cuales persista la sospecha de ICD y se hubiese detectado el antígeno GDH. También se deberá evaluar en forma individual la necesidad y el valor del diagnóstico en pacientes ambulatorios^{9,17}.

El diagnóstico de la ICD se realiza sobre una muestra de materia fecal diarreica de reciente emisión. Se recolecta un volumen de 10 a 20 ml (mínimo 5 ml) en un frasco estéril de boca ancha y se transporta en forma inmediata, a temperatura ambiente al laboratorio para su procesamiento dentro de las 2 h de su obtención. Ante una eventual demora, se debe conservar a 4 - 8 °C durante pocas horas, a -20 °C hasta 48 h, o a -70 °C por períodos más prolongados, ya que la actividad de la/s toxina/s decae/n a temperatura ambiente. Los hisopados rectales no son adecuados ya que la cantidad de muestra es insuficiente para realizar la prueba de toxigenidad^{81,94}.

Morfología microscópica

El examen microscópico del extendido de un material clínico puede brindar una información preliminar muy útil para el tratamiento de un paciente con una infección clostrídica. Este examen rápido es fundamental para la toma de decisión sobre el tratamiento radical que requiere la mionecrosis por *C. perfringens* y su diferenciación de celulitis o fascitis. En el primer caso, la observación microscópica revelará la presencia de bacilos gram positivos grandes, rectangulares, relativamente cortos y gruesos, en general sin esporas,

y también la ausencia de reacción inflamatoria o la sola presencia de algunas células eucarióticas con contornos desdibujados. *C. perfringens*, el principal agente causal de gangrena gaseosa, en general no forma esporas en los tejidos y la acción de su toxina alfa afecta la presencia de polimorfonucleares en el foco activo de este proceso infeccioso. Por el contrario, en las fascitis y celulitis se observa una microbiota mixta, la cual puede o no incluir células clostridiales. La experiencia previa del observador es fundamental para evitar confusiones con bacterias de características morfológicas y tintoriales similares.

Algunas especies de *Clostridium* se pueden observar como gram negativas, sobre todo en cultivos envejecidos. No obstante, *Clostridium clostridioforme*, *Clostridium innocuum* y *Clostridium ramosum* se observan así aún en cultivos jóvenes. Para la identificación de estas especies y la definición de su género, se utilizan discos de colistina (10 µg) y vancomicina (5 µg) ya que este género es resistente al primero y sensible al segundo^{7,42,43,61}.

La detección de las esporas es importante en la identificación del género, pero su formación requiere condiciones y tiempos variables según la especie en cuestión. Las esporas pueden ser ovaladas o redondas y tener una ubicación terminal o subterminal. En algunas especies como *C. tetani*, pueden tener un diámetro mayor que el del bacilo y dar al soma bacteriano un aspecto deformado. Al igual que las de *Bacillus*, las endosporas de *Clostridium* spp. no se tiñen con los colorantes habituales y requieren coloraciones especiales como la de Wirtz o la observación con condensador de contraste de fases. Con la técnica de Gram se observa el perfil de las esporas sin teñir^{7,16,42,43,94}.

Características metabólicas y culturales

El género *Clostridium* comprende un grupo de microorganismos anaerobios estrictos, aunque *Clostridium tertium* y *Clostridium histolyticum* son aerotolerantes y pueden desarrollar bajo una atmósfera aerobia. *Clostridium* spp. tienen actividad sacarolítica y proteolítica variable, hecho que contribuye a su diferenciación^{7,16,42,43,94}.

Cultivo

La mayoría de las especies de *Clostridium* crece en los medios de cultivo de uso habitual para bacterias anaerobias. Al cabo de 24 a 72 h de incubación desarrollan colonias de tamaño, aspecto y forma variables según la especie, el medio de cultivo y el tiempo de incubación.

Clostridium spp. se recuperan de muestras sembradas en una combinación de medios de cultivo sólidos enriquecidos, selectivos, diferenciales y también de medios de cultivo líquidos como Rosenow, tioglicolato y Tarozzi, los cuales permiten detectar microorganismos gasógenos. El agregado de lizosima o taurocolato a los medios líquidos estimula la transformación de esporas a células vegetativas. Entre los medios no selectivos que se emplean habitualmente, *Clostridium* desarrolla en agar anaerobios, agar base Columbia, agar Brucella o agar infusión cerebro corazón, todos suplementados con 5 % de sangre ovina desfibrinada. En medios con sangre, algunas especies producen una hemólisis completa, mientras que las colonias de *C. perfringens* (tipo A) presentan un halo de doble hemólisis, con un área central de lisis completa que se extiende con el transcurso del tiempo y una zona periférica de lisis parcial. El hallazgo de colonias grandes con esta doble hemólisis sugiere la presencia de

dicha especie. En el mismo medio, *C. bifermentans* forma colonias blancas de 1 mm de diámetro^{16,42,43,94}.

C. septicum y *C. tetani* son microorganismos muy móviles, tienden a diseminarse sobre la superficie de los medios de cultivo y al cabo de 48 horas de incubación pueden formar una película que cubre completamente la placa (*swarming*) y que puede pasar inadvertida.

Para el aislamiento primario también se pueden emplear medios selectivos y/o diferenciales cuando se trate de muestras polimicrobianas o contaminadas o, para realizar una temprana identificación presuntiva. Entre otros, podemos citar el agar fenil etil alcohol, medios con antibióticos como aminoglucósidos y polimixina B, agar yema de huevo y los medios agar *Tryptose sulphite cycloserine* (TSC) y el agar Shahadi Ferguson perfringens (SFP) para *C. perfringens*.

C. difficile desarrolla fácilmente en agar sangre, aunque su aislamiento a partir de muestras fecales es difícil. Un medio de cultivo selectivo y diferencial es el agar cefoxitina, cicloserina y fructosa (CCFA), en el cual desarrolla colonias de color amarillo debido a la fermentación de la fructosa. Este medio se modificó con distintas formulaciones, algunas con yema de huevo, sangre, menor concentración de peptonas e inhibidores. El medio CCFL es similar al CCFA, pero además contiene lisozima. Una alternativa es el agar para anaerobios con el agregado de cefoxitina a una concentración final de 16 µg/ml. El agar *Clostridium difficile* (bioMérieux) es un medio selectivo y diferencial en el cual *C. difficile* forma colonias negras. En los medios de cultivo sólidos *C. difficile* forma colonias planas, de borde rizados, con aspecto de vidrio molido. Los cultivos de este microorganismo desprenden un olor

característico (olor a establo) debido a la producción de p-cresol, derivado del metabolismo de tirosina. La exposición de las colonias a la luz UV de 366 nm permite detectar una fluorescencia verdosa característica de *C. difficile*¹⁰⁰.

Otra manera de seleccionar el desarrollo de *Clostridium* spp. es mediante la aplicación de un tratamiento térmico o con alcohol, pero la sensibilidad de este método puede ser menor ya que, además de las formas vegetativas podrían eliminarse esporas inmaduras. El choque con alcohol consiste en mezclar volúmenes iguales de la muestra y etanol absoluto e incubar dicha mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente; el método térmico consiste en someter la muestra a un baño térmico de 80 °C durante 10 minutos. Luego de realizar alguno de estos procedimientos se siembra una alícuota de la muestra tratada sobre un medio no selectivo como agar anaerobio o agar sangre, y se podría incluir un medio selectivo con 16 µg/ml de cefoxitina. Todos los medios sembrados se incuban en anaerobiosis a 35 - 37 °C durante 48 a 96 h y se realizan pruebas de tolerancia al oxígeno^{7,42,43,94}.

En el diagnóstico de ICD el cultivo, si bien es una técnica laboriosa y demora más de 48 - 72 h, es el método más sensible y permite aislar el microorganismo para posteriores estudios epidemiológicos y de sensibilidad a los antibióticos. Cuando se acompaña de la determinación de toxina/s alcanza una elevada especificidad por lo cual el cultivo toxigénico se considera el método de referencia^{10,17,30,94}. La búsqueda de aislamientos toxigénicos con fines diagnósticos se debe realizar frente a la sospecha clínico-epidemiológica pero con resultado previo de toxina/s negativo en la materia fecal y en particular, si GDH fue positivo.

Identificación bioquímica e inmunológica

La identificación de todas las especies del género es muy compleja y en la actualidad, supera las necesidades clínicas. No obstante, algunas de las especies de mayor impacto se pueden identificar mediante pruebas disponibles en los laboratorios de bacteriología clínica. La caracterización lograda puede alcanzar diferentes niveles de exactitud, desde el reconocimiento del género, hasta la identificación presuntiva o certera de la especie y eventualmente del toxinotipo.

El reconocimiento del género requiere la realización de pruebas de aerotolerancia y la demostración o puesta en evidencia de su capacidad de esporulación. Esta última puede ser difícil de demostrar ya que ciertas especies sólo lo hacen bajo condiciones específicas de cultivo. La prueba de esporulación consiste en inocular el microorganismo en un caldo con carne, como el caldo Tarozzi, o en tioglicolato e incubar a 37 °C bajo condiciones de anaerobiosis y luego a temperatura ambiente hasta la esporulación. Con posterioridad se realiza un *shock* alcohólico o térmico con el subsiguiente cultivo según la metodología ya descrita. La prueba de la selección de esporas con alcohol o calor tiene un valor limitado, pero puede ayudar a ponerlas en evidencia y, su hallazgo en bacilos gram positivos anaerobios de importancia clínica identifica al género *Clostridium*.

Las especies de *Clostridium*, en su calidad de microorganismos anaerobios, no desarrollan en atmósferas aeróbicas, con excepción de *C. histolyticum* y *C. tertium*. Estos últimos pueden diferenciarse del género *Bacillus* al comparar el tamaño de las colonias desarrolladas bajo las diferentes atmósferas. El diámetro de éstas será mayor bajo condiciones anaeróbicas en oposición a lo que ocurrirá con *Bacillus*. Además, el género *Clostridium* no

produce la enzima catalasa. *C. histolyticum* y *C. tertium* pueden diferenciarse mediante las pruebas de hidrólisis de gelatina o esculina según se muestra en la tabla 6. Otra especie que crece en aerobiosis es *Clostridium carnis*, la cual se aísla del suelo y con baja frecuencia causa patologías en los animales y excepcionalmente en el hombre. *C. carnis* es un organismo sacarolítico, no proteolítico y puede diferenciarse de *C. tertium* por su menor actividad glucolítica y porque algunas cepas de esta última especie pueden reducir los iones nitrato a nitrito, tabla 6.

C. perfringens es otra especie cuya identificación preliminar o presuntiva se puede realizar con facilidad. Al cabo de 48 h de incubación desarrolla en placas de agar sangre dando colonias de varios mm de diámetro rodeadas de un halo de doble hemólisis, total en el centro y parcial en la periferia. Al extender y realizar la coloración de Gram de estas colonias, se observan bacilos gram positivos gruesos, de extremos rectos, en los cuales es difícil reconocer esporas. Otra característica de fácil demostración en los laboratorios clínicos es la reacción de CAMP reversa que se realiza en agar sangre ovina frente a una cepa de *Streptococcus agalactiae*.

C. tetani y *C. septicum* son bacterias muy móviles y cuando desarrollan en medios sólidos forman una película o *swarming*, algunas veces homogénea, que cubre la totalidad de la superficie del agar por lo cual puede ser difícil de detectar. Ambos son microorganismos anaerobios, proteolíticos, pero solo el segundo es sacarolítico. En ocasiones, en particular cuando el medio contiene una concentración de gelificante mayor que la usual, *C. septicum* puede formar colonias de borde irregular con aspecto rizoide (cabeza de medusa)^{7,42,43,94}.

C. sporogenes y *C. septicum* esporulan con mucha facilidad y en la coloración de Gram de sus cultivos de 24 a 48 h se observan esporangios e imágenes correspondientes a esporas en un porcentaje superior al de las formas vegetativas.

C. difficile se puede identificar en forma presuntiva mediante la morfología microscópica, el aspecto de las colonias y el olor característico de los cultivos.

Las especies del género *Clostridium* se agrupan en forma primaria de acuerdo a su aerotolerancia, actividad proteolítica (gelatinasa) y sacarolítica y su diferenciación se puede lograr mediante pruebas complementarias como la detección de lecitinasa, lipasa, ureasa y movilidad, la producción de SH₂ y de indol y la fermentación de otros carbohidratos.

Con el fin de facilitar el reconocimiento de las especies, se agregan las figuras 1 a 6 donde se muestran los algoritmos de identificación que agrupan a las especies de acuerdo a las propiedades mencionadas^{7,42,43,94}.

Otras metodologías: métodos automatizados, miniaturizados y moleculares

Una forma rápida y práctica de reconocer especies de *Clostridium* es mediante la utilización de métodos de identificación automatizados o semiautomatizados. Los mismos se comercializan por empresas con representación en Argentina y entre ellos se encuentran galerías miniaturizadas como API 20A, API-ZYM 20A y RapID 32A (bioMérieux, Marcy, l'Etoile, Francia), y RapID ANA II (Remel, Inc., Lenexa, KS, EE.UU.); tarjetas con pruebas cinéticas de lectura automatizada como Vitek 2 (bioMérieux) y paneles de lectura directa o automatizada como MicroScan (Siemens, Alemania). Se trata de métodos que proporcionan resultados de lectura rápida de una

cantidad considerable de pruebas y evitan la preparación de medios de cultivo diferenciales, por lo cual pueden ser de utilidad en los laboratorios de microbiología clínica. Sin embargo, la exactitud de los resultados varía de acuerdo a la especie en cuestión^{34,94}. La interpretación de los mismos se realiza en forma conjunta a través de la base de datos proporcionada por cada fabricante. Debido a los constantes cambios en la clasificación taxonómica es posible que dichas bases se encuentren desactualizadas, con el consiguiente error diagnóstico. Otros inconvenientes de estos sistemas es que sus bases de datos no siempre tienen en cuenta las características morfológicas y tintoriales de la bacteria y en lo referente al género *Clostridium* no incluyen algunas pruebas fundamentales como la producción de lecitinasa y lipasa. Por estos motivos, se debe proceder con precaución para la validación del resultado.

Estos equipos resultan útiles por su practicidad, en especial cuando no se dispone de la diversidad de sustratos necesarios. Se recomienda que las pruebas se lean en forma individual, hecho que no se aconseja para el método cinético. También se aconseja que los resultados obtenidos se complementen con los ensayos metabólicos faltantes, con las características morfológicas, tintoriales y culturales y que la interpretación conjunta se efectúe mediante bases de datos o tablas actualizadas.

Cromatografía

La detección de ácidos grasos a partir de un cultivo, mediante la técnica de cromatografía gaseosa, es un método complementario de identificación de clostridios. Cada especie posee un perfil cromatográfico determinado que contribuye a la identificación. Esta metodología tiene muy poca aplicación clínica por el equipamiento requerido y la complejidad de su realización. Por lo

cual ha sido reemplazada por técnicas moleculares más precisas y rápidas^{7,16,42,43,94}.

Inmunofluorescencia directa

Este método se ha empleado en el diagnóstico de infecciones tisulares en animales. Requiere equipamiento y reactivos específicos normalizados. Además, la presencia de clostridios residentes en algunos tejidos, como por ejemplo en el hígado y en los músculos, afecta el valor predictivo positivo de esta prueba, motivos por los cuales esta metodología se encuentra en desuso en la actualidad^{7,16,42,43,94}.

Determinación de toxinas y toxinotipos

La detección de las toxinas se puede realizar por la demostración de su efecto en animales de laboratorio o en cultivos celulares, seguida de su neutralización con antitoxinas específicas o mediante EIA o métodos moleculares. Algunas toxinas expresan un efecto citopático característico, pero la detección en cultivo de líneas celulares aún no se encuentra normalizada ni validada internacionalmente.

Las determinaciones de toxinas en general, requieren su extracción desde las muestras clínicas o de los cultivos y para ello se emplean solventes orgánicos, centrifugación o filtración. Además, según el tipo de toxina, se puede hacer un tratamiento con tripsina previo al reconocimiento¹⁵. Una alternativa es la aplicación de EIA para la detección de toxina/s de *C. perfringens* y *C. difficile* en materia fecal. Para detectar la enterotoxina de *C. perfringens* existen equipos comerciales (PET-RPLA Toxin Detection, Oxoid, Japón Ridascreen, R-Biopharm, Alemania). Los EIA también se pueden emplear para el dosaje de anticuerpos específicos anti toxina alfa (BIO K 222, Teknokroma Analitica SA,

Barcelona, España) y anti toxina beta (Bio-X Diagnostics, Jemelle, Bélgica) de *C. perfringens*⁸⁶.

En la actualidad dichos equipos comerciales no se encuentran disponibles en nuestro medio, por lo cual algunos laboratorios aplican métodos artesanales, como por ejemplo para algunas toxinas de *C. perfringens*⁴⁹ y también para detectar anticuerpos contra fracciones antigénicas de otros clostridios⁵.

Con respecto a los EIA para *C. difficile* se comentará más adelante.

Identificación molecular

La búsqueda de secuencias de genes específicos de especie en el ARNr 16S o de factores de virulencia mediante técnicas moleculares resulta de utilidad para el diagnóstico clínico a partir de las muestras aptas, para la caracterización de aislamientos y para estudios epidemiológicos. Los métodos de amplificación genética (PCR) presentan una alta sensibilidad, permiten acortar los tiempos de diagnóstico y detectar elementos de gérmenes inviables o no relacionados a la patología en estudio. Por tales motivos sus resultados siempre se deben integrar con el contexto clínico y epidemiológico del paciente^{6,34,41,102}. Existen escasos equipos comerciales validados para el diagnóstico clínico, entre los cuales se encuentran los de *C. perfringens* y de *C. difficile*. No obstante, se cuenta con una variedad de protocolos desarrollados para la detección de genes codificantes de toxinas de *C. septicum*, *C. novyi*, *C. haemolyticum* (Ferreyra y Koval, comunicación personal), *C. tetani*, *C. sordelli*, *C. chauvoei*, *C. perfringens*, y *C. difficile* (los correspondientes a los dos últimos se describen más adelante)^{23,37,45,56,57,68,99,101,102}.

La espectrometría de masas [*matrix-assisted laser desorption/ionization*

time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)], es un los métodos proteómicos de identificación bacteriana que aborda el estudio y la caracterización de proteínas. Comparalos espectros obtenidos con una base de datos y en pocos minutos proporciona resultados comparables a la secuenciación del ARNr 16S. Debido a la complejidad para identificar bacterias anaerobias en los laboratorios clínicos y al tiempo que demanda, MALDI-TOF MS es una herramienta con un gran potencial en el área. Los equipos disponibles en la actualidad (Bruker Daltonik, Bremer, Alemania; Vitek MS, bioMèrieux, Shimadzu Corporation, Tokio, Japón) permiten identificar bacterias anaerobias con una exactitud variable del 61 al 86 %. Este comportamiento, se podrá corregir al mejorar la base de datos, la cual se debe actualizar y ampliar aún más con cepas clínicas que incluyan especies de *Clostridium*^{28,44,106,114}.

Diagnóstico de la infección por *C. difficile*

La ICD se define por la presencia de síntomas compatibles (diarrea o ilio paralítico) y la detección de *C. difficile* toxigénico o sus toxinas. Un resultado de laboratorio no es suficiente en sí mismo y debería ser interpretado a la luz de los datos clínicos^{17,52}.

El diagnóstico de la ICD requiere de una metodología confiable y rápida. Los métodos disponibles comprenden desde equipos comerciales de EIA, los cuales dan resultados en menos de 1 hora hasta cultivos toxigénicos que pueden requerir entre 3-7 días y pasan por citotoxicidad en líneas celulares y técnicas moleculares de amplificación artesanales o en tiempo real. La/s técnica/s seleccionadas dependerán de la complejidad de cada laboratorio clínico. Se recomienda una combinación de ellos y el conjunto de los resultados se debe interpretar en el marco de un flujograma diagnóstico (figuras 6 y

7)^{4,10,20,109,110}.

Método de citotoxicidad y neutralización en cultivos celulares

La citotoxicidad sobre líneas celulares seguida de su neutralización se consideró como método de referencia, sin embargo, su sensibilidad no es óptima, es costoso, requiere una infraestructura y personal entrenado y además el tiempo de respuesta supera a las necesidades clínico-epidemiológicas³⁰.

Este método detecta la actividad citotóxica de TcdB sobre distintas líneas celulares, como fibroblastos de piel, fibroblastos diploides humanos, células Vero, células McCoy, fibroblastos de pulmón MRC-5 y células Hep2. Consiste en inocular una monocapa de la línea celular seleccionada con un filtrado de las heces líquidas y luego de 24-48 h de incubación se busca un efecto citopático. Ante su aparición se debe realizar un ensayo de neutralización para confirmar la etiología del efecto. Para ello se inoculan 2 cultivos celulares en paralelo, uno con el filtrado de la muestra y el otro con el mismo filtrado pero neutralizado con la antitoxina de *C. sordellii* o anticuerpos monoclonales contra TcdB. La repetición del efecto citopático con el filtrado de heces y su ausencia en el cultivo de la muestra neutralizada confirma el diagnóstico de ICD^{10,99}. La especificidad de este método es del 85 al 100 %³⁰ y su sensibilidad varía entre el 65 y el 85 % cuando se compara con el cultivo citotóxico^{52,73}. Esta diferencia podría deberse a la pérdida de actividad biológica de la toxina por un transporte y conservación de la muestra inadecuados.

Ante los inconvenientes en su implementación y mantenimiento, esta metodología tampoco se adopta con fines diagnósticos.

Enzimoinmunoanálisis (EIA)

Los equipos de EIA resultan prácticos para el diagnóstico en los laboratorios de microbiología clínica y permiten obtener resultados rápidos con una relación costo–beneficio adecuada, pero su sensibilidad es menor que la del cultivo citotóxico por lo cual se deberían emplear junto a otra prueba como puede ser un método molecular (detección del gen *tcdB*) o el cultivo toxigénico. El uso de dichos equipos se encuentra muy difundido en nuestro medio y los más usuales son los que detectan TcdA y TcdB en forma simultánea.

Se desarrollaron EIA en placas con policubetas y ensayos sobre membranas (técnica de flujo lateral). En todos los casos el procesamiento debe ajustarse a las instrucciones del fabricante del equipo utilizado. Los EIA de placa requieren un tiempo de procesamiento de algo más de 3 h. Se desarrollaron para la detección de TcdA. Con posterioridad se incluyó la búsqueda conjunta de TcdB con lo cual se amplió el espectro de detección ya que permitía diagnosticar casos relacionados a cepas no productoras de toxina A (A-B+). El rango de sensibilidad varía entre el 46,3 y el 99 %; el de especificidad entre el 84 y el 99 % y el correspondiente al valor predictivo negativo (VPN) entre el 77,4 y el 99 %. Estos valores cambian según la serie analizada y el método de referencia utilizado en cada caso. Entre los equipos comerciales se cuenta con Ridascreen Cd Toxin AB (R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemania). Los EIA de membrana tienen un tiempo de procesamiento menor (20 a 30 minutos). Su sensibilidad es del 43 al 96 %, su especificidad, del 83,3 al 99 %, y su VPN es del 76 al 99 %. Algunos equipos de EIA de membrana incorporan la detección del antígeno común GDH (C.DIFF QUIK CHEK COMPLETE®. TECHLAB®. Alere International Limited, Ballybrit, Galway, Irlanda), otros, solo detectan las toxinas (C.DIFF QUIK

CHEK. TECHLAB®) y Xpect® Clostridium difficile Toxin A/B (Remel, Inc., Lenexa, KS, EE.UU.)^{10,57,83}. En un trabajo realizado por la Subcomisión de Bacterias Anaerobias-SADEBAC-AAM, para comparar distintas técnicas diagnósticas de ICD, se evaluaron diferentes equipos comerciales, uno EIA de placa (Ridascreen Cd Toxin AB, R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemania) y otro de membrana (C DIFF QUIK CHEK COMPLETE®. TECHLAB®. Alere International Limited, Ballybrit, Galway, Irlanda). Se encontró que la sensibilidad de este último fue 6,1 % mayor que la correspondiente al equipo de policubeta ($p < 0,01$)⁵⁷.

Existe también un inmunoensayo de fluorescencia para el diagnóstico de la ICD (VIDAS® C. difficile Toxin A&B, bioMérieux, Marcy, l'Etoile, Francia). Detecta TcdA y TcdB en las muestras de heces y por ser una prueba automatizada reduce el tiempo de trabajo con respecto a los EIA de placa. Al comparar con el cultivo toxigénico, sus respectivos valores de sensibilidad y especificidad fueron del 63,3 y 96,7 %³.

Glutamato deshidrogenasa (GDH)

La detección de la enzima GDH para el diagnóstico de la ICD presenta un elevado nivel de sensibilidad ya que se encuentra en todos los aislamientos de *C. difficile* productores o no de toxinas. Este hecho junto a su reactividad antigénica cruzada con la GDH de *C. sordelli* afectan a la especificidad del diagnóstico, por lo cual un resultado positivo se debe confirmar con una prueba específica. No obstante debido a su elevado VPN es una determinación adecuada para descartar las muestras de pacientes sin ICD y así evitar procesamientos y tratamientos innecesarios. Se utiliza para tamizaje y está

incorporada a los algoritmos diagnósticos. La prueba se realiza con equipos comerciales, los cuales dan resultados en pocos minutos.

En la actualidad, en nuestro país se dispone de un equipo de enzimoimmunoanálisis de membrana (C.DIFF QUIK CHEK COMPLETE®. TECHLAB®. Alere International Limited, Ballybrit, Galway, Irlanda), el cual detecta en forma simultánea GDH, TcdA y TcdB. Existen otros equipos comerciales para la sola detección de GDH, entre ellos uno de EIA que aplica fluorescencia (VIDAS® C. difficile GDH. bioMérieux, Marcy, l'Étoile, Francia), o un EIA de membrana (C.DIFF QUIK CHEK). EIA en placa con policubetas (C.DIFF CHEK-60TECHLAB®. Alere International Limited, Ballybrit, Galway, Irlanda). Los equipos de EIA son similares en sensibilidad y VPN por lo cual se podrían aplicar a los algoritmos diagnósticos con eficacia equivalente ^{22,25,57,95}.

Cultivo

La metodología y los medios requeridos para el cultivo de *C. difficile* se trataron con anterioridad en este capítulo. El aislamiento de *C. difficile* es un método muy sensible, pero muy laborioso y requiere personal entrenado. Además, el aislamiento y la identificación no diferencian cepas productoras de no productoras de toxinas, por lo cual la especificidad del cultivo solamente es muy baja y no resulta adecuado para el diagnóstico de la ICD.

Cultivo toxigénico

El cultivo toxigénico se considera en la actualidad el método de referencia. Se basa en el aislamiento del microorganismo y la determinación de su toxigenicidad, hecho que incrementa la especificidad diagnóstica del cultivo. Alcanza una sensibilidad del 89-100 % y una especificidad del 84-99 %.

Sus desventajas son la necesidad de personal entrenado y de un tiempo de procesamiento prolongado, nunca menor de 48-72 h, por lo cual no se recomienda para el diagnóstico clínico de rutina. Además, aún no se estableció cuál es el mejor método para detectar las toxinas en los aislamientos. A pesar de estos inconvenientes es indispensable para estudios epidemiológicos y de sensibilidad a los antibióticos; además, ante casos de pacientes con clínica y antecedentes epidemiológicos compatibles con ICD pero, sin diagnóstico a través de las pruebas rápidas, este método resulta una herramienta útil^{10,17,20,30,83}.

Métodos moleculares

Las técnicas moleculares, esenciales para los estudios epidemiológicos, son también herramientas importantes para el diagnóstico.

La detección del gen *tcdB* en materia fecal es útil para el diagnóstico de la ICD. Es una técnica rápida (2 horas), sensible y puede ayudar a definir algunos diagnósticos. La amplificación de ácidos nucleicos aplicada al diagnóstico de la ICD busca identificar cepas de *C. difficile* toxigénico. Se basa en la detección de genes presentes en el PaLoc (*tcdA*, *tcdB*, *tcdC*) y se puede incluir otro gen cromosómico externo. Si bien son protocolos de rápida resolución y buena sensibilidad, no diferencian infección de colonización ya que detectan los genes y no las toxinas liberadas. Ante la falta de especificidad surgen problemas relacionados con la necesidad de tratamiento y el aislamiento de los pacientes. Este inconveniente se plantea con mayor énfasis en la población pediátrica, en la cual la tasa de colonización asintomática es alta⁶⁰. Con el fin de mejorar la especificidad se deben utilizar en conjunto con un EIA para detectar toxinas en materia fecal. Su incorporación a los

algoritmos puede mejorar la sensibilidad diagnóstica, en particular en los casos de muestras con GDH positiva, pero sin toxinas detectadas.

La amplificación de ácidos nucleicos directa sobre materia fecal se puede realizar con métodos artesanales o comerciales.

Las técnicas de PCR *in house* aplicadas a muestras fecales presentan una buena sensibilidad y especificidad y en general, tienen al gen *tcdB* como blanco de amplificación. No obstante, hay resultados contrapuestos en referencia a la sensibilidad, la cual varía entre el 63 y el 100 %⁵⁷ según el método de extracción de ADN empleado. La presencia de nucleasas en las muestras fecales, así como la variabilidad del gen *tcdB* también pueden afectar la sensibilidad de la prueba. Es por eso que se deberían agregar la búsqueda de *gluD* y de otros genes conservados, además de métodos complementarios para aumentar la especificidad. Los métodos artesanales tienen como inconveniente adicional su falta de estandarización^{10,52,57,94}.

Los métodos comerciales se desarrollaron para salvar este inconveniente. Existe una variedad de productos de diferentes marcas con elevados valores de sensibilidad y especificidad. Entre ellos se puede destacar el equipo Xpert *C. difficile* Epi assay (Cepheid Inc., Sunnyvale, EE.UU.) Esta PCR en tiempo real detecta *tcdB*, los genes que codifican la toxina binaria (*cdt*) y también una delección del nucleótido 117 del gen *tcdC* (Δ 117). Todos estos datos se pueden emplear como marcadores en la identificación presuntiva de las cepas hipervirulentas de *C. difficile* pertenecientes al RT 027 (toxinotipo III, ST-1, BI/NAP1). Su rango de sensibilidad es del 94,4 al 100 %, la especificidad varía entre el 93 y el 99 %, el VPN entre el 99,3 y el 100 %, y el VPP entre el 78,9 y el 94,7 %. También se encuentran disponibles Gene Ohm y Max (Becton

Dickinson, Sparks, MD, EE.UU.), Illumigene (Meridian Bioscience, Inc., Cincinnati, EE.UU.) y ProDesse ProGastro CD (Hologic, Inc. San Diego, EE.UU.), entre otros^{10,21,52}.

La heterogeneidad genética de este microorganismo es de gran utilidad para los estudios epidemiológicos. Dentro de los métodos más utilizados se mencionan: ribotipificación, electroforesis de campos pulsados [*pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE)], REA, toxintipificación, análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados [*Amplified fragment length polymorphism* (AFLP)] y análisis de repeticiones en tándem de número variable en múltiples locus [*Multiple locus variable-number tandem repeat analysis* (MLVA)]³⁶.

Algoritmos

Los diagramas de flujo aplicados al diagnóstico de la ICD combinan en forma secuencial las distintas metodologías aplicadas a fin de optimizar la combinación de los resultados. Con el fin de lograr una adecuada sensibilidad y especificidad global se recomienda el empleo de al menos dos metodologías. En las figuras 6 y 7 se muestran diagramas de flujo con los métodos diagnósticos descritos con anterioridad^{4,109,110}.

Sensibilidad a los antimicrobianos

Clostridium spp. son sensibles a cloranfenicol y a los β -lactámicos combinados con inhibidores de β -lactamasas. La resistencia a imipenem (IMI), MTZ y vancomicina (VAN) es excepcional, mientras que la actividad de cefalosporinas, tetraciclinas y CLI es variable.

La penicilina (PEN) es activa frente a la mayoría de las cepas⁸, pero *C. ramosum*, *C. butyricum* y *C. clostridioforme* pueden producir β -lactamasas inducibles y los aislamientos que lo hagan deben ser considerados resistentes

a PEN y ampicilina. En el caso de *C. butyricum* se trata de una penicilinasas, mientras que *C. clostridioforme* y *C. ramosum* producen β -lactamasas de amplio espectro²⁴. La cefoxitina, cefalosporina con actividad frente a anaerobios, es relativamente inactiva frente a la mayoría de los clostridios con excepción de *C. perfringens*⁴⁰.

Varias especies de *Clostridium* son resistentes a CLI, en especial *C. difficile*, alrededor del 20 % de *C. ramosum* y un pequeño porcentaje de *C. perfringens*^{8,53}. Otras especies que pueden presentar resistencia a CLI son *C. tertium*, *C. subterminale*, *C. butyricum*, *C. sporogenes* y *C. innocuum*²⁴.

Entre las especies de *Clostridium*, un mecanismo poco conocido o subestimado es la emergencia de resistencia a glucopéptidos y antibióticos relacionados, así como a MTZ²⁴. La resistencia a MTZ se detectó en algunas cepas de *C. perfringens* y *C. difficile*. En esta última especie reviste carácter de transitoria y heterogénea y podría revertir con los sucesivos repiques y la conservación⁷¹. En un hospital de Buenos Aires se detectó sensibilidad disminuida a MTZ en dos aislamientos de *C. difficile* los cuales habían sido conservados a -20 °C, pero los mismos no fueron toxigénicos¹⁰⁴. La presencia del gen *nimB* en bacterias anaerobias se asocia a la resistencia a MTZ y se encontró en aislamientos de *C. bifermentans*²⁴. Este gen puede estar presente en cepas sensibles a MTZ, por lo cual éstas podrían actuar como un reservorio para la transmisión del mismo.

C. ramosum y *C. innocuum* presentan resistencia natural a VAN. *C. clostridioforme* expresa resistencia a teicoplanina en bajo nivel y la mayoría de las cepas son resistentes a daptomicina, pero VAN mantiene un elevado nivel de actividad⁶⁴.

C. perfringens en general es sensible a la mayoría de los antibióticos^{8,53}.

C. difficile presenta un elevado nivel de resistencia a los antibióticos. La actividad de PEN y otras cefalosporinas es muy variable; se describe resistencia o sensibilidad disminuida a IMI y más de la mitad de los aislamientos son resistentes a CLI^{29,59,104}. Las cepas hipervirulentas de *C. difficile* B1/NAP1/027 son resistentes a moxifloxacina, aunque esta característica también se halló en cepas de otros ribotipos⁹⁶.

Bibliografía

1. Acosta MV, Greco GS, Nardi MA, Barcan L, Staneloni MI, Callejo R, De Cristofano MA, Oyhamburu JM. Presentación de un caso clínico de infección por *Clostridium difficile* presuntamente B1/NAP1/027 en un hospital de comunidad. Rev Argent Microbiol. 2013;45(Supl.1):40.
2. Albuquerque A, Macedo G. Empiema bacteriano espontáneo por *Clostridium perfringens* en un paciente cirrótico: informe de caso y revisión de literatura. Gastroenterol Hepatol. 2013;36:69-71.
3. Alcalá L, Marín M, Madrid M, Domínguez-García E, Catalán P, Peláez MT, Sánchez-Somolinos M, Bouza E. Comparison of ImmunoCard Toxins A&B and the new semiautomated Vidas *Clostridium difficile* Toxin A&B tests for diagnosis of *C. difficile* infection. J Clin Microbiol. 2010;48:1014-5.
4. American Society for Microbiology. A practical guidance document for the laboratory detection of toxigenic *Clostridium difficile*. 2010. Disponible en: <http://www.asm.org/images/pdf/Clinical/clostridiumdifficile9-21.pdf>.
5. Bentancor L, Bentancor AM, Carloni G. Elisa para medición de anticuerpos contra *Clostridium chauvoei*. Rev Med Vet. 2007;88:202-5.
6. Bhatnagar J, DeLeon-Carnes M, Kellar K, Bandyopadhyay K, Antoniadou Z, Shieh W. Rapid, simultaneous detection of *Clostridium sordellii* and *Clostridium perfringens* in archived tissues by a novel PCR-based microsphere assay: diagnostic implications for pregnancy-associated toxic shock syndrome cases. Infect Dis Obstet Gynecol. 2012; ID 972845. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155>.
7. Bianchini H, Castello L, Fernández M, Fernández Canigia L, Greco G, Hardie N, Litterio M, Di Martino A, Predari S, Rollet R. Bacterias Anaerobias. Guía práctica para el procesamiento de muestras clínicas. Subcomisión de Bacterias Anaerobias. SADEBAC, AAM, 1995.
8. Brook I, Wexler H, Goldstein E. Antianaerobic antimicrobials: spectrum and susceptibility testing. Clin Microbiol Rev. 2013;26:526-46.

9. Brown K, Khanafer N, Daneman N, Fisman D. Meta-analysis of antibiotics and the risk of community-associated *Clostridium difficile* infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57:2326-32.
10. Burnham C, Carroll K. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection: an ongoing conundrum for clinicians and for clinical laboratories. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26:604-30.
11. Cairns MD, Preston MD, Lawley TD, Clark TG, Stabler RA, Wren BW. Genomic epidemiology of a protracted hospital outbreak caused by a toxin A negative *Clostridium difficile* sublineage PCR ribotype 017 strain in London, England. *J Clin Microbiol.* 2015;53:3141-7.
12. Callejo R, Rollet R, Hardie N, Couto E. *Clostridium difficile* associated diarrhoea in HIV-AIDS hospitalized patients. *Anaerobe* 2000. An International Congress of the Confederation of Anaerobe Societies. Abstract Book VIII P2: 168. Manchester, Inglaterra.
13. Carlier J, Manich M, Loïez C, Migaud H, Courcol R. First isolation of *Clostridium amygdalinum* from a patient with chronic osteitis. *J Clin Microbiol.* 2006;44:3842-4.
14. Carloni G, Bentancor L, Cairó F, de Torres R. Variaciones en la producción de hemolisinas en cepas de *Clostridium chauvoei*. *Rev Med Vet.* 2005;86:144-9.
15. Carloni G, Bentancor L, De Torres R. Detección de la actividad de desoxiribonucleasa (DNasa) en cepas de *Clostridium chauvoei*. *Rev Argent Microbiol.* 2005;37:87-8.
16. Carloni G. El género *Clostridium*. En: Stanchi N, editor. *Microbiología Veterinaria*, 1º edición. Buenos Aires, Inter-Médica, 2007, p. 347-55.
17. Cohen S, Gerding D, Johnson S, Kelly C, Loo V, McDonald L, Pepin J, Wilcox M. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010;31:431-55.
18. Collins DA, Hawkey PM, Riley TV. Epidemiology of *Clostridium difficile* infection in Asia. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2013;2:21. doi: 10.1186/2047-2994-2-21.

19. Corti M, Metha H, Rollet R. Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos de la enfermedad asociada a *Clostridium difficile*. En: Seijo A, de Vedia L, Corti M, Metta H, editores. Clínicas Infectológicas del Hospital Muñiz. Buenos Aires, 2009, p. 265-71.
20. Crobach M, Dekkers O, Wilcox M, Kuijper E. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): Data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). Clin Microbiol Infect. 2009;15:1053-66.
21. Deak E, Miller S, Humphries R. Comparison of Illumigene, Simplexa, and AmpliVue *Clostridium difficile* molecular assays for diagnosis of *C. difficile* infection. J Clin Microbiol. 2014;52:960-3.
22. Debast S, Bauer M, Kuijper E. on behalf of the Committee. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect. 2014;20:2-26.
23. Dongneng J, Pu X, Wu J, Li M, Liu P. Rapid, sensitive and specific detection of *Clostridium tetani* by loop-mediated isothermal amplification assay. J Microbiol Biotechnol. 2013;23:1-6.
24. Dubreuil L, Odou F. Anaerobic bacteria and antibiotics: what kind of unexpected resistance could I find in my laboratory tomorrow? Anaerobe 2010;16:555-9.
25. Eckert C, Said O, Rambaud C, Poccardi N, Burghoffer B, Lalande V, Barbut F. Comparison of the VIDAS® *C. difficile* GDH and the GDH component of the *C. diff* Quik Chek Complete for detection of *Clostridium difficile* in stools. 23^o ECCMID 2013, Berlin, Germany. Disponible en: https://www.escmid.org/escmid_library/online_lecture_library/.
26. Elsayed S, Zhang K. *Clostridium glycolicum* bacteremia in a bone marrow transplant patient. J Clin Microbiol. 2007;45:1652-4.
27. España Fuente L, Soto Mesa D, Fernández Díez A. Colectitis enfisematosa debida a *Clostridium perfringens*. Rev Esp Anestesiología Reanim. 2011;58:128-33.
28. Fedorko D, Drake S, Stock F, Murray P. Identification of clinical isolates of anaerobic bacteria using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. doi: 10.1007/s10096-012-1563-4.

29. Fernández Canigia L, Litterio M, Rossetti A, Legaria MC, Castello L, Rollet R, Di Martino A, Greco G, Carloni G, Bianchini H, Predari SC. Sensibilidad *in vitro* de *Clostridium difficile* frente a diferentes antimicrobianos e inhibidores de β -lactamasas. Congreso SADEBAC 2006, 25º Aniversario. Asociación Argentina de Microbiología. Póster. Libro de resúmenes edición electrónica - Antimicrobianos Nro. 15487. Buenos Aires, Argentina.
30. Fernández Canigia L. Diagnóstico de infección por *Clostridium difficile*. Boletín de Epidemiología Hospitalaria y Control de Infecciones del Hospital Alemán. Buenos Aires, Argentina 2013;14:15-8.
31. Finegold S, Song Y, Liu C, Hecht D, Summanen P, Könönen E, Allen S. *Clostridium clostridioforme*: a mixture of three clinically important species. European J Clin Microbiol Infect Dis. 2005;24:319-24.
32. Finsterer J, Hess B. Neuromuscular and central nervous system manifestations of *Clostridium perfringens* infections. Infection 2007;35:396-405.
33. García J, Li J, Sheresta A, Freedman J, Beingesser J, Mc Clane B, Uzal F. *Clostridium perfringens* Type A enterotoxin damages the rabbit colon. Infect Immun. IAI.01659-14; published ahead of print 18 March 2014. doi: 10.1128/IAI.01659-14.
34. García Sánchez J, García Sánchez E, del Rey A, García Merino E. Las bacterias anaerobias 150 años después de su descubrimiento por Pasteur. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013. Disponible en : <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2013.03.012>.
35. Goorhuis A, Bakker D, Corver J, Debast S, Harmanus C, Notermans D, Bergwerff A, Dekker FW, Kuijper E. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. Clin Infect Dis. 2008;47:1162-70.
36. Goorhuis A, Legaria MC, van den Berg RJ, Harmanus C, Klaassen CH, Brazier JS, Lumelsky G, Kuijper EJ. Application of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis to determine clonal spread of toxin A-negative *Clostridium difficile* in a general hospital in Buenos Aires, Argentina. Clin Microbiol Infect. 2009;15:1080-6.

37. Halm A, Wagner M, Köfer J, Hein I. Novel real-time PCR assay for simultaneous detection and differentiation of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* in clostridial myonecrosis. J Clin Microbiol. 2010;48:1093-8.
38. Hauer P, Yeary T, Rosenbusch R. Cloning and molecular characterization of the beta toxin gene of *Clostridium haemolyticum*. Anaerobe 2000;10:243-54.
39. Hayashida K, Murakami Ch, Fujioka M. Tetanus following replantation of an amputated finger: a case report. J Med Case Rep. 2012;6:343.
40. Hecht D, Galang M, Sambol S, Osmolski J, Johnson S, Gerding D. *In vitro* activities of 15 antimicrobial agents against 110 toxigenic *Clostridium difficile* clinical isolates collected from 1983 to 2004. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51:2716-9.
41. Janvilisri T, Scaria J, Gleed R, Fubini S, Bonkosky M, Gröhn Y, Chang YI. Development of a microarray for identification of pathogenic *Clostridium* species. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010;66:140-7.
42. Jousimies-Somer HR, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler HM, Finegold SM. Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual, 6th edition. Belmont, California, Star Publishing, 2002, p. 23-74.
43. Jousimies-Somer HR, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler HM, Finegold SM. Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual, 6th edition. Belmont, California, Star Publishing, 2002, p. 81-141.
44. Justesen U, Holm A, Knudsen E, Andersen L, Jensen T, Kemp M, Skov M, Gahrn-Hansen B, Kjølseth Møller J. Species identification of clinical isolates of anaerobic bacteria: a comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems. J Clin Microbiol. 2011;49:4314-8.
45. Kaneko I, Miyamoto K, Minura N, Yumine H, Utsunomiya S, Akimoto S, McClane B. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meat samples by using molecular methods. Appl Environ Microbiol. 2011;77:7526-32.
46. Kelly C, Kyne L. The host immune response to *Clostridium difficile*. J Med Microbiol. 2011;60:1070-9.
47. Kelly C. Can we identify patients at high risk of recurrent *Clostridium difficile* infection? Clin Microbiol Infect. 2012;18:21-7.

48. Kennedy C, Lyras D, Cordner L, Jody Melton-Witt J, Emmins J, Tweten R, Rood J. Pore-forming activity of alpha-toxin is essential for *Clostridium septicum*-mediated myonecrosis. *Infect Immun*. 2009;77:943-71.
49. Kircanski J, Hodgins D, Soltes G, Pei Y, Parreira V, Glenn Songer J. Development of an antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for *Clostridium perfringens* beta 2-toxin in porcine feces and the neonatal piglet intestine. *J Vet Diagn Invest*. 2012;24:895-902.
50. Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly C. Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. *N Engl J Med*. 2001;342:390-7.
51. Lahti P, Heikinheimo A, Johansson T, Korkeala H. *Clostridium perfringens* type A strains carrying a plasmid-borne enterotoxin gene (Genotype IS1151-cpe or IS1470-like-cpe) as a common cause of food poisoning. *J Clin Microbiol*. 2008;46:371-3.
52. Le Guern R, Herwegh S, Courcol R, Wallet F. Molecular methods in the diagnosis of *Clostridium difficile* infections: an update. *Expert Rev Mol Diagn*. 2013;3:681-92.
53. Lee Y, Park Y, Sook Kim M, Yong D, Hoon Jeong S, Lee K, Chong Y. Antimicrobial susceptibility patterns for recent clinical isolates of anaerobic bacteria in South Korea. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:3993-7.
54. Legaria MC, Lumelsky G, Rosetti S. *Clostridium difficile*-associated diarrhea from a general hospital in Argentina. *Anaerobe*. 2003;9:113-6.
55. Legaria MC, Lumelsky G, van den Berg RJ, van der Vorm ER, Brazier JS, Kuijper EJ. Recognition of TcdA-negative *Clostridium difficile* as an important cause of hospital-acquired diarrhea in a general hospital in Argentina. The 45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), 2005. Resumen K-1273-2005. Washington D.C., EE.UU.
56. Legaria M, Anchart E, Rollet R, Di Martino A, Castello L, Barberis C, Rossetti A, Guardati M, Fernández Canigia L, Carloni G, Litterio M, Rocchi M, Cicchino M, Diaz M, Klajn D, Predari SC. Utilidad de la PCR para el diagnóstico de la infección causada por *Clostridium difficile*. Diferencias obtenidas según los cebadores utilizados. XIII Congreso Argentino de Microbiología 2013. II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental 2013. Resumen P-345. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

57. Legaria M, Rollet R, Di Martino A, Castello L, Barberis C, Rossetti A, Guardati M, Fernández Canigia L, Carloni G, Litterio M, Rocchi M, Zamboni M, Cicchino M, Diaz M, Klajn D, Predari SC. Evaluación de cuatro métodos para el diagnóstico de laboratorio de la infección causada por *C. difficile*. Rev Argent Microbiol. 2012;44:79.
58. Li J, Bannam T, Miyamoto K, Garcia J, Uzal F, Rood J. Toxin plasmids of *Clostridium perfringens*. Microbiol Mol Biol Rev. 2013;77:208-33.
59. Litterio M, Roldán C, Angeloff M, D'Amore V, Hernández C. Sensibilidad antibiótica de *Clostridium difficile* aislados en un hospital pediátrico. Congreso Internacional de Infectología Pediátrica y vacunas- SADIP. 2014. Buenos Aires, Argentina.
60. Litterio M, Roldán C, Rosanova M, Berberian G, Lopardo H. Diarrea asociada a *Clostridium difficile*. Experiencia en un hospital pediátrico. XI Congreso Argentino de Microbiología - Asociación Argentina de Microbiología. 2007. Resumen P-20721. Córdoba, Argentina.
61. Logan N, De Vos P. Genus I *Clostridium*, Praznowski 1880. En: De Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg N, Ludwig F, Rainey F, Schleifer K, Whitman W, eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, volume 3. The Firmicutes, Springer, 2009, p. 738-828.
62. Lopardo G, Rayo Morfin-Otero, Moran-Vazquez LI, Noriega F, Zambrano B, Luxemburger C, Foglia G, Rivas EE. Epidemiology of *Clostridium difficile*: a hospital-based descriptive study in Argentina and Mexico. Braz Infect Dis. 2015;19:8-14.
63. Marotoa F, Jarab I, Barreroa A. Crisis hemolítica severa y fallo multiorgánico secundario a infección por *Clostridium perfringens*. J Medin. 2011.doi: 10.1016/j.medin.2011.06.002.
64. Marvaud J, Mory F, Lambert T. *Clostridium clostridioforme* and *Atopobium minutum* clinical isolates with VanB-type resistance in France. J Clin Microbiol, 2011;49:343-68.
65. Mattila E, Arkkila P, Mattila P, Tarkka E, Tissari P, Anttila V. Extraintestinal *Clostridium difficile* infections. Clin Infect Dis. 2013;57:148-53.
66. Meeting of Bergey's International Society for Microbial Systematics. Defining microbial diversity in the genomic era. Edinburgh, Scotland 2014. Disponible en:<http://www.bacterio.net/clostridium.html>.

67. Miki Y, Miyamoto K, Kaneko-Hirano I, Fujiuchi K, Akimoto S. Prevalence and characterization of enterotoxin gene-carrying *Clostridium perfringens* isolates from retail meat products in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:5366-72.
68. Miyamoto K, Li J, McClane B. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens*: detection and identification. *Microbes Environ.* 2012;27:343-9.
69. Morrison R, Hall N, Said M, Rice T, Groff H, Brodine S, Slymen D, Lederman E. Risk factors associated with complications and mortality in patients with *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis.* 2011;53:1173-8.
70. Nagahama M, Umezaki M, Oda M, Kobayashi K, Tone S, Suda T, Ishidoh K, Sakurai J. *Clostridium perfringens* iota-toxin b induces rapid cell necrosis. *Infect Immun.* 2011;79:4353-60.
71. Pelaez T, Cercenado E, Alcalá L, Marin M, Martín-López A, Martínez-Alarcón J, Catalán P, Sánchez-Somolinos M, Bouza E. Metronidazole resistance in *Clostridium difficile* is heterogeneous. *J Clin Microbiol.* 2008;46:3028-32.
72. Pérez M, Hurtado A, Couto I, Gutiérrez J, Seoane L, Suárez J, Galeiras R. Abordaje multidisciplinario de la infección por *Clostridium difficile*. *Rev Chilena Infectol.* 2013;30:165-85.
73. Planche T, Wilcox M. Reference assays for *Clostridium difficile* infection: one or two gold standards? *J Clin Pathol.* 2011;64:1-5.
74. Popoff M, Bouvet P. Clostridial toxins. *Future Microbiol.* 2009;4:1021-64.
75. Popoff M, Poulain B. Bacterial toxins and the nervous system: neurotoxins and multipotential toxins interacting with neuronal cells. *Toxins.* 2010;2:683-737.
76. Ribeiro M, Silva R, Pires P, Martinho A, Lucas T, Teixeira A, Paes A, Barros CB, Lobato FC. Myonecrosis by *Clostridium septicum* in a dog, diagnosed by a new multiplex-PCR. *Anaerobe.* 2012;18:504-7.
77. Rodríguez Pardo D, Mirelis B, Navarro F. Infecciones producidas por *Clostridium difficile*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31:254-63.
78. Rodríguez Pardo D, Almirante B, Bartolomé R, Pomar V, Mirelis B, Navarro F, Soriano A, Sorlí L, Martínez Montauti J, Molins M, Lung M, Vila J, Pahissa A. Epidemiology of

- Clostridium difficile* hospital-based study in Barcelona, Spain. Clinical outcomes: results of an infection and risk factors for unfavorable. J Clin Microbiol. 2013;51:1465-73.
79. Rollet R, Cabrera R, Chianea E, Costa N, Erdoiz J, Hardie N. Bacterias anaerobias como agentes etiológicos de fascitis necrotizantes. XI Congreso Argentino de Microbiología. Rev Argent Microbiol. 2007;39:74.
80. Rollet R, Cabrera R, Chianea E, Iriarte A, Couto E, Hardie N. Bacterias anaerobias causantes de empiemas pleurales. VII Congreso SADI 2007. Mar del Plata, Argentina.
81. Rollet R, Cabrera R, Hardie N. *Clostridium difficile*. La bacteria y sus factores de patogenicidad. En: Seijo A, de Vedia L, Corti M, Metta H, editores. Clínicas Infectológicas del Hospital Muñiz. Buenos Aires 2009, p. 253-8.
82. Rollet R, Fernández J, Costa N, Erdoiz J, Mortarini M, Chianea E. *Clostridium septicum* como causa de gangrena gaseosa con bacteriemia. IX Jornadas Argentinas de Microbiología. Actualización en Microbiología Clínica, 2002, Córdoba, Argentina.
83. Rollet R, Vaustat D, Callejo R, Cabrera R, Hardie N. Glutamato deshidrogenasa su valor diagnóstico en la diarrea por *Clostridium difficile*. VII Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas. SADEBAC – AAM. 2012. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Rev Argent Microbiol. 2012;44:42-3.
84. Rollet R. Tétanos. Boletín de la Asociación Argentina de Microbiología. 2005;169:12-3.
85. Ruiz Ruiz F, de Benito Arévalo J, Saenz Abad D, Sierra Bergua B. Fiebre y dolor abdominal en paciente con múltiples lesiones hepáticas. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009;27:481-2.
86. Sanz J, Fernández M, Herranz N, Ramos B. Evaluación de dos técnicas de detección de enterotoxina de *Clostridium perfringens* en muestras de heces. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29:313-9.
87. Savic B, Prodanovic R, Ivetic V, Radanovic O, Bojkovski J. Enteritis associated with *Clostridium perfringens* type A in 9-month-old calves. Can Vet J. 2012;53:174-6.
88. Schwan C, Stecher B, Tzivelekidis T, van Ham M, Rohde M, Hardt WD, Wehland J, Aktories K. *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. PLoS Pathog. 2009;5:e1000626.
89. Shen A. Autoproteolytic activation of bacterial toxins. Toxins. 2010;2:963-77.

90. Shrestha A, McClane B. Human claudin-8 and -14 are receptors capable of conveying the cytotoxic effects of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *mBio*. 2013;4:e00594-12.
91. Simor A, Bradley S, Strausbaugh L, Crossley K, Nicolle L. *Clostridium difficile* in long-term-care facilities for the elderly. *Infect Control Hosp Epidemiol*.2002;23:696-703.
92. Smits W. Hype or hypervirulence. A reflection on problematic *Clostridium difficile* strains. *Virulence*. 2013;4:592-6.
93. Song Y, Liu C, McTeague M, Summanen P, Finegold S. *Clostridium bartlettii* sp. nov., isolated from human faeces. *Anaerobe*. 2004;10:179-84.
94. Stevens D, Bryant A, Berger A, von Eichel-Streiber C. *Clostridium*. En: Versalovic J, Carroll, K, Funke G, Jorgensen, J, Landry ML, Warnock D, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. WashingtonD.C., ASM Press, 2011, Vol 1, p. 834-57.
95. Subcomisión de Bacterias Anaerobias, SADEBAC, AAM. Diagnóstico de Diarrea Asociada a *Clostridium difficile*. Conclusiones del Taller Precongreso SADEBAC 2006, 25º Aniversario. Disponible en: http://www.aam.org.ar/archivos/175_conclusiones.pdf.
96. Tenover F, Tickler I, Persing D. Antimicrobial-resistant strains of *Clostridium difficile* from North America. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:2929-32.
97. Torremadé Barreda J, Scheiding M, Suárez Fernández C, Cuadrado Campaña J, Rodríguez Aguilera J, Franco Miranda E. Gangrena de Fournier: estudio retrospectivo de 41 casos. *Cir Esp*. 2010;87:218-23.
98. Torres del Pliego E, Rey Pérez A, Alentorn Geli E, Sorli Redo M. Shock séptico y artritis séptica por *Clostridium perfringens*. *Rev Clin Esp*. 2012;11:557.
99. Trejo M, Rusconi M, GuzzettiL, Zamboni M, Guardati M, Lejona S, Pérez P. Comparación de métodos diagnósticos de diarreas asociadas a *Clostridium difficile*. *Rev Argent Microbiol*. 2010;42:165-71.
100. Tyrrell KL, Citron DM, Leoncio ES, Merriam CV, Goldstein EJ. Evaluation of cycloserine-cefoxitin fructose agar (ccfa), ccfa with horse blood and taurocholate, and cycloserine-cefoxitin mannitol broth with taurocholate and lysozyme for recovery of *Clostridium difficile* isolates from fecal samples. *J Clin Microbiol*. 2013;51:3094-96.
101. Valour F, Boisset S, Lebras L, Martha B, Boibieux A, Perpoint T, Chidiac C, Ferry T, Peyramond D. *Clostridium sordellii* brain abscess diagnosed by 16S rRNA gene

- sequencing. J Clin Microbiol. 2010;48:3443-4.
102. van Asten A, van der Wiel C, Nikolaou G, Houwers D, Grone A. A multiple PCR for toxins of *Clostridium perfringens* isolates. Vet Microbiol. 2009;136:411-2.
 103. van den Berg RJ, Legaria MC, de Breij A, van der Vorm ER, Brazier JS, Kuijper EJ. Introduction and setting of toxin A negative *Clostridium difficile* in a general hospital in Argentina. 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2005. Copenhagen, Dinamarca.
 104. Vaustat D, Cabrera R, Callejo R, Menéndez B, Hardie N, Rollet R. Sensibilidad a vancomicina y metronidazol de aislamientos de *C. difficile* procedentes de pacientes asistidos en el hospital F.J. Muñiz. 3º Congreso de Enfermedades Endemoepidémicas. Hospital de Infecciosas "F.J. Muñiz". 2011. Presentacion oral. El Muñiz Hoy. Año 14 - Supl. 1: 13. ISSN 032 9-7357.
 105. Vedantam G, Clark A, Chu M, McQuade R, Mallozzi M, Viswanathan V. *Clostridium difficile* infection. Toxins and non-toxin virulence factors, and their contributions to disease establishment and host response. Gut Microbes. 2012;3:121-34.
 106. Veloo A, Knoester M, Degener J, Kuijper E. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry methods for the identification of clinically relevant anaerobic bacteria. Clin Microbiol Infect. 2011;17:1501-6.
 107. Vidal J, Bruce A, Mc Clane, Saputo J, Parker J, Uzal F. Effects of *Clostridium perfringens* beta-toxin on the rabbit small intestine and colon. Infect Immun. 2008;76:4396-404.
 108. Voth D, Ballard J. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. Clin Microbiol Rev. 2005;18:247.
 109. Walkty A, Lagacé-Wiens P, Manickam K, Adam H, Pieroni P, Hoban D, Karlowsky J, Alfa M. Evaluation of an algorithmic approach in comparison with the illumigene assay for laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. J Clin Microbiol. 2013;5:1152-7.
 110. Wilcox M, Planche T, Fang F, Gilligan P. What is the current role of algorithmic approaches for diagnosis of *Clostridium difficile* infection? J Clin Microbiol. 2010;48:4347-53.

111. Williams M, Brazier J, Peraino V, Goldstein E. A review of three cases of *Clostridium aldenense* bacteremia. *Anaerobe* 2010;16:475-7.
112. Wullt M, Noren T, Ljungh A, Akerlund T. IgG antibody response to toxins A and B in patients with *Clostridium difficile* infection. *Clin Vaccine Immunol.* 2012;9:1552-4.
113. Yan X, Porter C, Hardy S, Steer D, Smith A, Quinsey N, Hughes V, Cheung J, Keyburn A, Kaldhusdal M, Moore R, Bannam T, Whisstock J, Rood J. Structural and functional analysis of the pore-forming toxin NetB from *Clostridium perfringens*. *mBio.* 2013 4:e00019-13. doi: 10.1128/mBio.00019-13.
114. Zárate MS, Romano V, Nieves J, Smayevsky J. Utilidad de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la identificación de bacterias anaerobias. *Rev Argent Microbiol.* 2014;46:98-102.
115. Zhang J, Sun L, Nie Q. Botulism, where are we now? *Clin Toxicol.* 2010;48:867-79.

Tabla 1. Toxinotipos de *Clostridium perfringens* según la toxina mayor secretada

Tipo	Toxina mayor			
	Alfa	Beta	Epsilon	Iota
A	+	-	-	-
B	+	+	+	-
C	+	+	-	-
D	+	-	+	-
E	+	-	-	+

Tabla 2. Toxinas menores de *Clostridium perfringens* y su actividad enzimática

Toxina	Actividad
Theta	Hemolisina
Kappa	Colagenasa, gelatinasa
Mu	Hialuronidasa
Nu	DNasa
Lambda	Proteasa
Neuraminidasas	Sialidasas
Gamma	Hemolisina

Tabla 3. Toxinas de *Clostridium novyi* y *Clostridium haemolyticum*

Microorganismo	Toxinas	
	Alfa	Beta
<i>C. novyi</i> tipo A	+	+
<i>C. novyi</i> tipo B	+	-
<i>C. novyi</i> tipo C	-	-
<i>C. haemolyticum</i>	-	+++

Tabla 4. Toxinas producidas por *Clostridium perfringens*. Genes codificantes y su ubicación

Toxina	Gen	Ubicación
Alfa	<i>plc</i>	Cromosoma
Beta 1	<i>cpb1</i>	Plásmido
Beta2	<i>cpb2</i>	Plásmido
Epsilon	<i>etx</i>	Plásmido
Iota (Ia)	<i>lap</i>	Plásmido
Iota (Ib)	<i>lbp</i>	Plásmido
Enterotoxina	<i>cpe</i>	Cromosoma/plásmido
Gamma	-	-
Theta	<i>pfoA</i>	Cromosoma
Lambda	<i>lam</i>	Plásmido
Mu	<i>nagh</i>	Cromosoma
Nu	-	-
Kappa	<i>colA</i>	Cromosoma
Neuraminidasa	<i>nanH, nanI</i>	Cromosoma

Tabla 5. Características de los grupos de *Clostridium botulinum*

Grupo	Toxinas	Actividad proteolítica	Temperatura óptima de desarrollo (°C)	Producción de lipasa	Fermentación de glucosa
I	A,B,F	+	35- 40	+	+
II	B,E,F	-	18- 25	+	+
III	C,D	-	40	+	+
IV	G	+	37	-	-

Tabla 6. Características de las especies de *Clostridium* de importancia clínica

Especie	Esporos		Fermentación de																				
	Forma	Ubicación	Crecimiento aeróbico	Hidrólisis de gelatina	Lecitinasa	Lipasa	Indol	Hidrólisis de esculina	Reducción de nitrato	Glucosa	Arabinosa	Celobiosa	Fructosa	Lactosa	Maltosa	Manitol	Manosa	Melibiososa	Ribosa	Salicina	Sacarosa	Xilosa	Otras
<i>C. aldenense</i>	*		-	-	-	-	+	V	-	+	V	-		V	+	-	+	SD	SD	V	+	+	α-Gal+ βGal+ Rham-
<i>C. argentinense</i>	SD	ST	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. baratii</i>	SD	ST	-	-	+	-	-	+	+ ⁻	+	-	+	+	w ⁺	w ⁺	-	+	- ^w	w ⁻	+ ⁻	+	-	
<i>C. bifermentans</i>	O	ST	-	+	+	-	+	+ ⁻	-	+	-	-	- ^w	-	w ⁻	-	- ^w	-	-	-	-	-	U -
<i>C. bolteae</i>	SD	ST	-	-	-	-	-	- ⁺	-	+	+	SD	+	-	+	-	+	SD	-	- ⁺	+	+	βNag -
<i>C. botulinum</i>																							
Tipo A, B, F	O	ST	-	+	-	+	-	+	-	+ ⁻	-	-	- ^w	-	- ^w	-	-	-	-	-	-	-	
Tipo B, E, F	O	ST	-	+	-	+	-	-	-	+	w ⁻	-	+ ^w	-	+ ⁻	- ^w	+ ^w	- ^w	v	-	+ ^w	-	
Tipo C, D	O	T	-	+	- ⁺	+	- ⁺	-	-	+	-	-	v	-	v	-	v	- ^w	v	-	-	-	
<i>C. butyricum</i>	O	ST	-	-	-	-	-	+	-	+	+ ⁻	+	+	+	+	- ^w	+	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+	+	

Tabla 6. Continuación

<i>C. cadaveris</i>	O	T	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	v	-	-	-	- ^w	-	-	-	-	-	
<i>C. carnis</i>	SD	ST	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+ ^w	v	v	w ⁺	-	w ⁺	-	-	w	w ⁺	-	
<i>C. chauvoei</i>	O	ST	-	+ ⁻	-	-	-	+	v	+	-	-	- ^w	+	+	-	+ ^w	-	v	-	+	v	
<i>C. citroniae</i>	*		-	-	-	-	+	-	-	+	V	-	SD	V	+	-	+	SD	SD	-	+	+	α-Gal- βGal- Rha+
<i>C. clostridioforme</i>	O	ST	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+ ^w	+	+	-	+	v	v	+	+ ^w	+ ^w	α-Gal+ βGal+ βNag- Pro +
<i>C. difficile</i>	O	ST ^T	-	+	-	-	-	+	-	+ ^w	-	v	+ ^w	-	-	w ⁺	v	-	- ^w	- ^w	-	- ^w	
<i>C. glycolicum</i>	SD	ST	-	-	-	-	-	- ⁺	-	+	-	-	+ ^w	-	v	-	-	-	-	-	-	-	+ ⁻
<i>C. haemolyticum</i>	O	ST	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+ ^w	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. hastiforme</i> **	SD	T	-	+	-	-	-	-	- ⁺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. hathewayi</i> ***	SD	ST	-	-	-	-	-	+ ^w	-	+	v	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	βNag -
<i>C. histolyticum</i>	O	ST	+ ⁻	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. indolis</i>	SD	T	-	-	-	-	+	+	+ ⁻	+	w ⁻	+ ^w	v ⁺	w ⁺	w ⁺	- ^w	- ^w	- ^w	- ^w	w ⁻	v	v	

Tabla 6. Continuación

<i>C. innocuum</i>	O	T	-	-	-	-	-	+	-	+	- ⁺	+	+	- ^w	-	+ ^w	+	-	V	+ ^w	+ ^w	- ^w	Pro-
<i>C. limosum</i>	O	ST	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. novyi A</i>	O	ST	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	- ^w	-	V	-	-	- ^w	V	- ^w	-	-	
<i>C. novyi B</i>	O	ST	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-		V	-	-	-	
<i>C. paraputrificum</i>	SD	T ST	-	- ^w	-	-	-	+	- ⁺	+	-	+	+ ^w	+	+	-	+	-	W ⁻	+	+	-	
<i>C. perfringens</i>	O	ST	-	+	+	-	-	V	V	+	-	-	+	+	+	-	+	V	V	- ⁺	+	-	
<i>C. putrificum</i>	O	T ST	-	+	-	-	-	- ⁺	-	+ ^w	-	- ^w	- ^w	-	- ^w	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. ramosum</i>	O	T	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+ ⁻	+	+ ⁻	V	+	+	- ^w	
<i>C. septicum</i>	O	ST	-	+	-	-	-	+	V	+	-	+ ^w	+	+	+	-	+	-	V	V	-	-	
<i>C. sordellii</i>	O	ST	-	+	+	-	+	- ⁺	-	+	-	-	V	-	W	-	- ^w	-	- ^w	-	-	-	U+
<i>C. sphenoides</i>	R	ST ^T	-	-	-	-	+	+	+ ⁻	+	- ^w	+ ^w	+ ^w	W ⁺	+ ^w	W ⁺	+ ^w	V	- ^w	V	W ⁻	V	ADNsa+
<i>C. sporogenes</i>	O	ST	-	+	-	+	-	+	-	+	-	- ^w	-	-	- ^w	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. subterminale</i>	O	ST	-	+	- ⁺	-	-	- ⁺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. symbiosum</i>	SD	ST		- ^w	-	-	-	-	-	+ ^w	V	-	+	- ⁺	-	-	V	-	-	-	-	-	
<i>C. tertium</i>	O	T	+	-	-	-	-	+	+ ⁻	+	-	+ ^w	+	+	+	W ⁺	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+	V

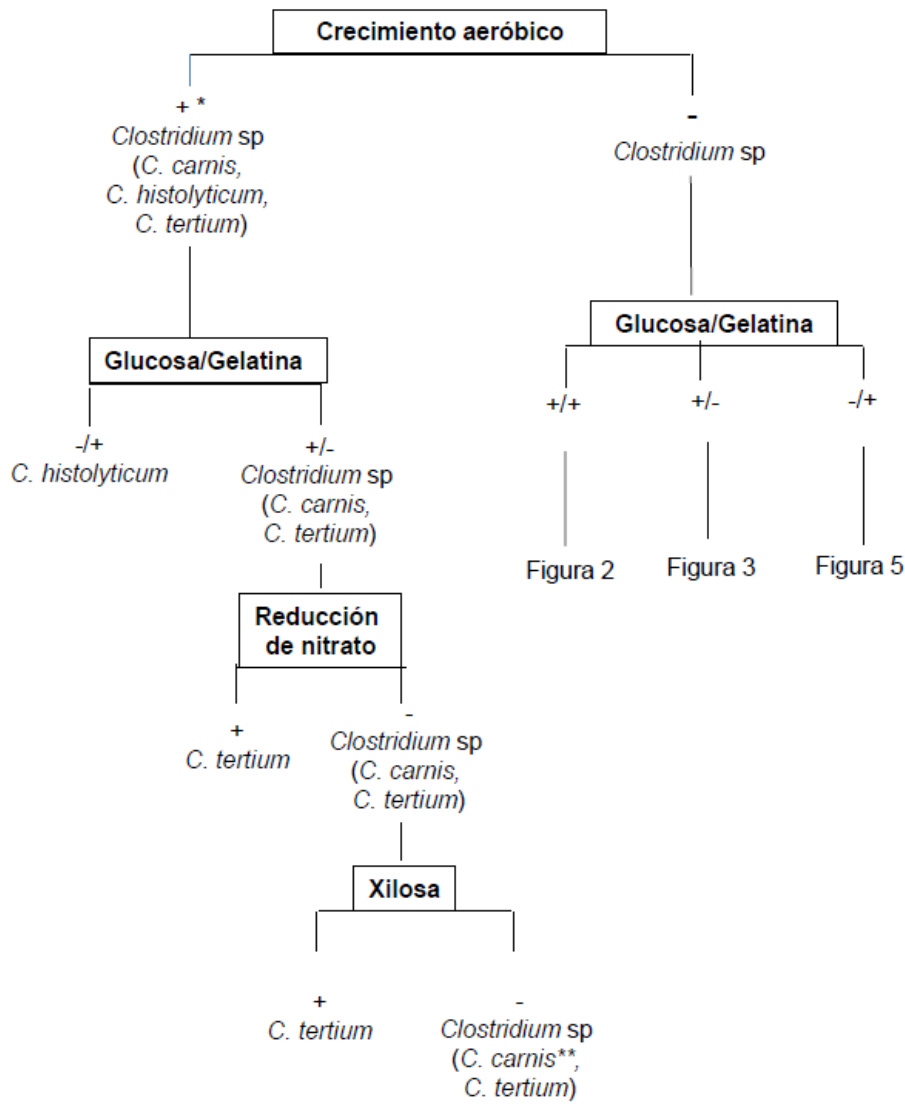
Tabla 6. Continuación

<i>C. tetani</i>	R	T	-	+	-	- ^w	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
------------------	---	---	---	---	---	----------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

O: ovalado; T: terminal; ST: subterminal; +: reacción positiva; -: reacción negativa; v: variable; w: débil; SD: sin dato. U: ureasa; Pro: prolina aminopeptidasa; L: lactosa; β -NAG: beta-N-acetilglucosaminidasa.

*: bacilos gram negativos en general no esporulados; **: en la actualidad, *Tissierella praeacuta*; ***: en la actualidad, *Hungatella hathewayi*.

Figura 1. Bacilos Gram positivos esporulados. *Clostridium* spp.

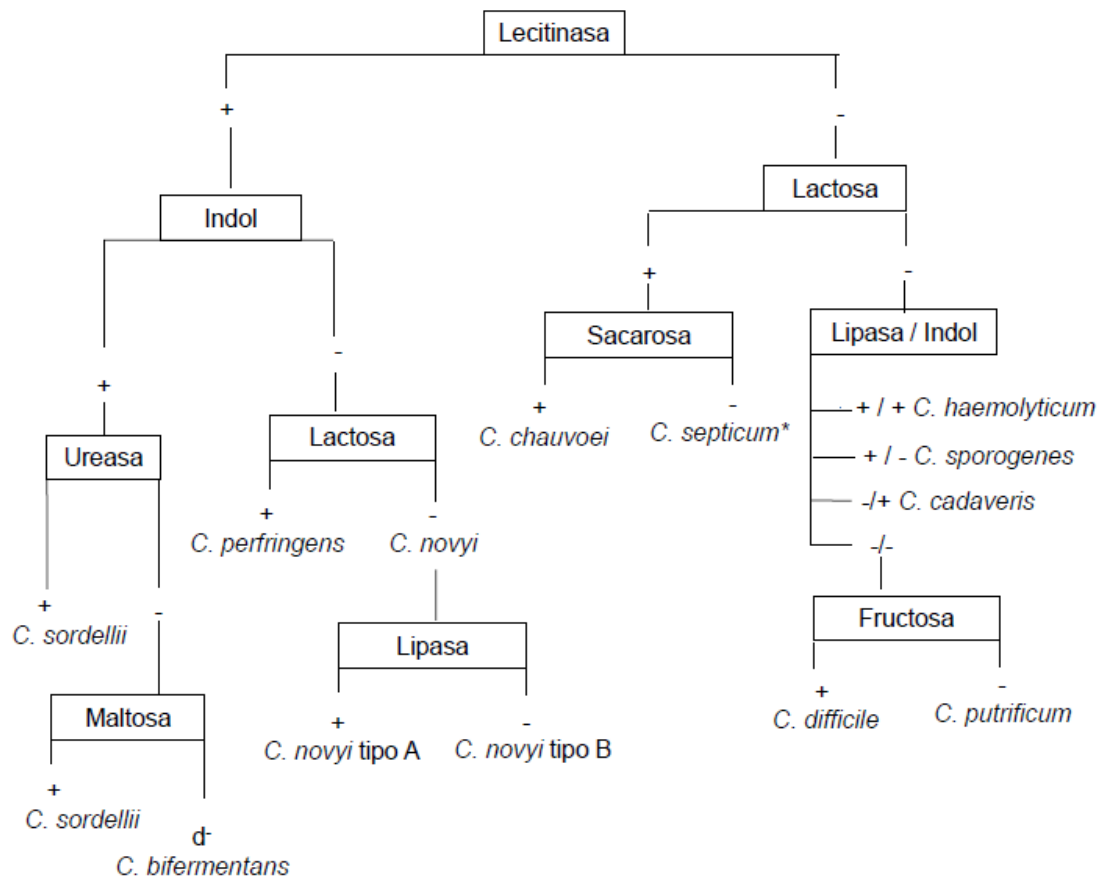


Referencias:

*: Desarrollo de colonias más pequeñas que en anaerobiosis y catalasa negativa.

** : Infrecuente en materiales clínicos.

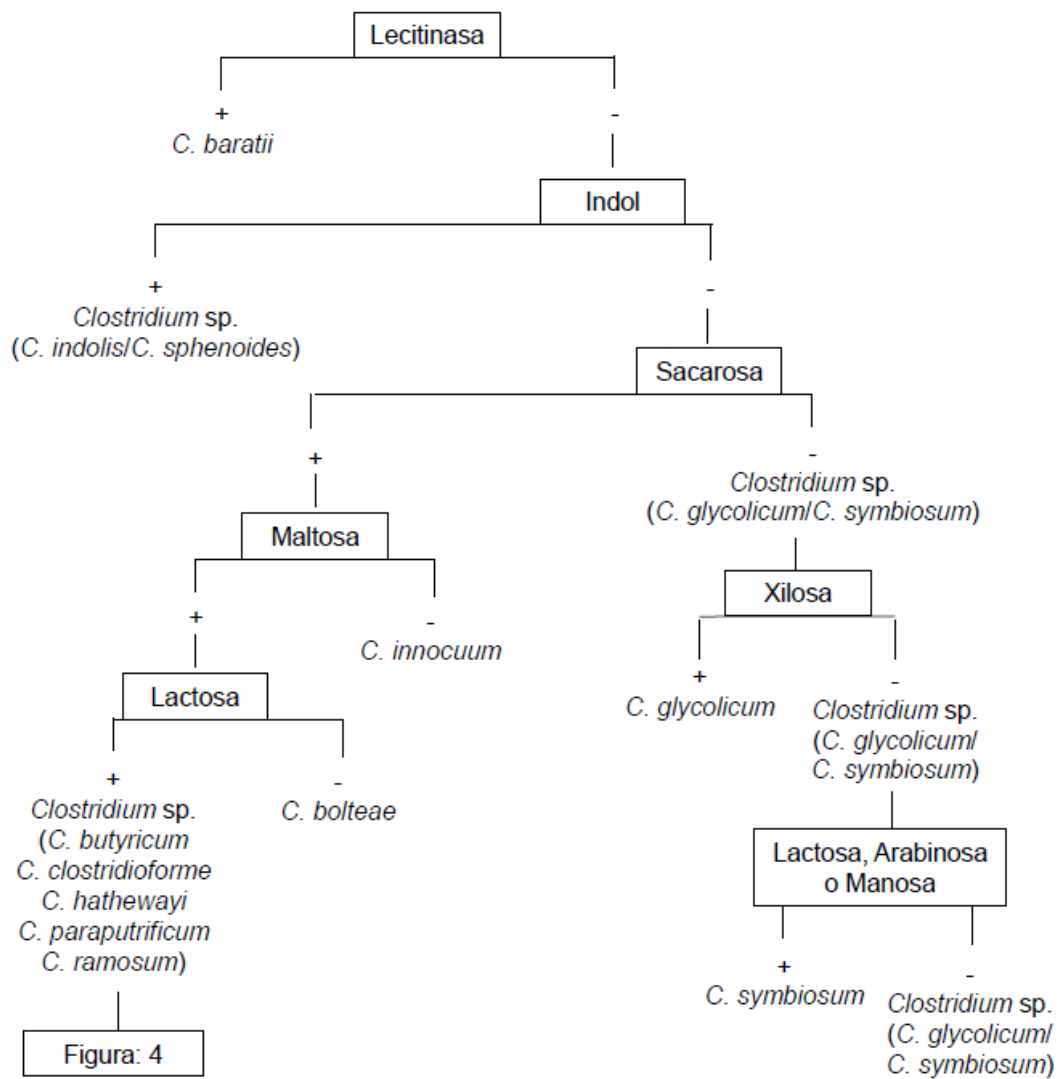
Figura 2. *Clostridium* spp. sacarolíticos y proteolíticos.



Referencias:

Indol: producción de indol. Lactosa, Maltosa, Sacarosa y Fructosa: reacción de fermentación del carbohidrato correspondiente. d-: débil o negativo. *: *C. septicum* con frecuencia forma "swarming" sobre los medios de cultivo sólidos.

Figura 3. *Clostridium* spp. Sacarolíticos, no proteolíticos.

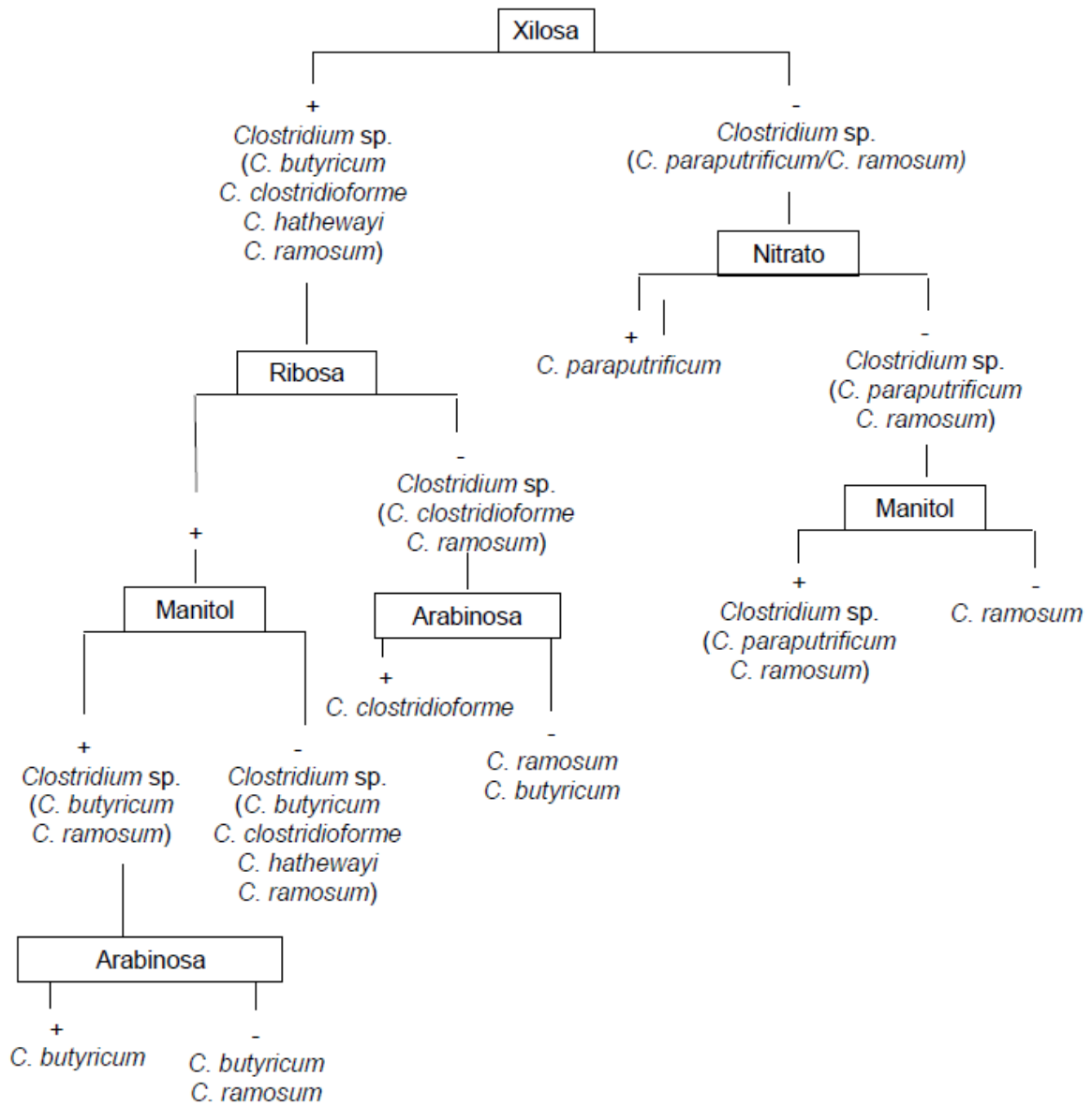


Referencias:

Indol: producción de indol.

Sacarosa, Maltosa, Xilosa, Lactosa, Arabinosa, Manosa: reacción de fermentación del carbohidrato correspondiente.

Figura 4. *Clostridium* spp. sacarolíticos, no proteolíticos. Lecitinasa e indol negativos, fermentadores de sacarosa, maltosa y lactosa.

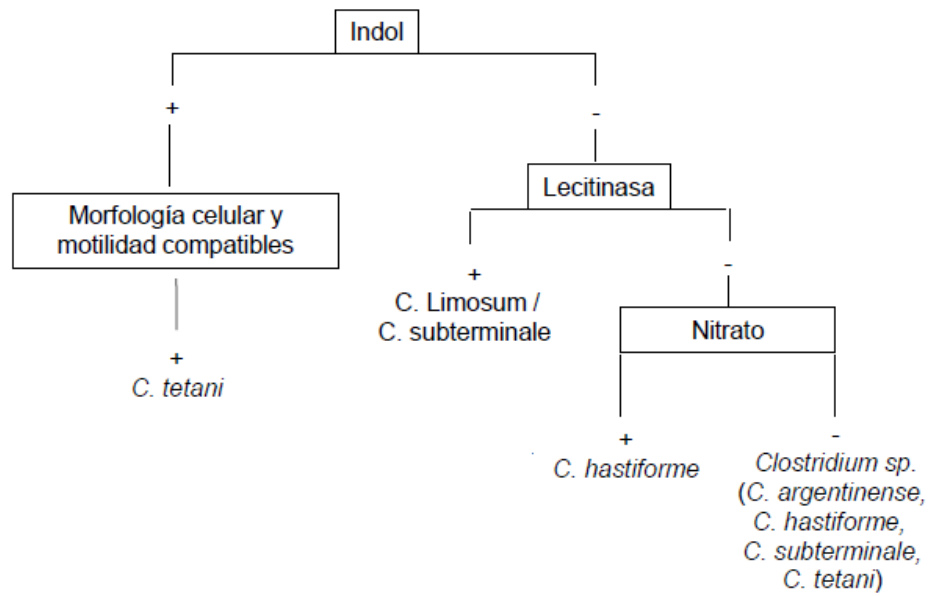


Referencias:

Indol: producción de indol. Nitrato: reducción de nitrato a nitrito.

Ribosa, Manitol, Arabinosa: reacción de fermentación del carbohidrato correspondiente.

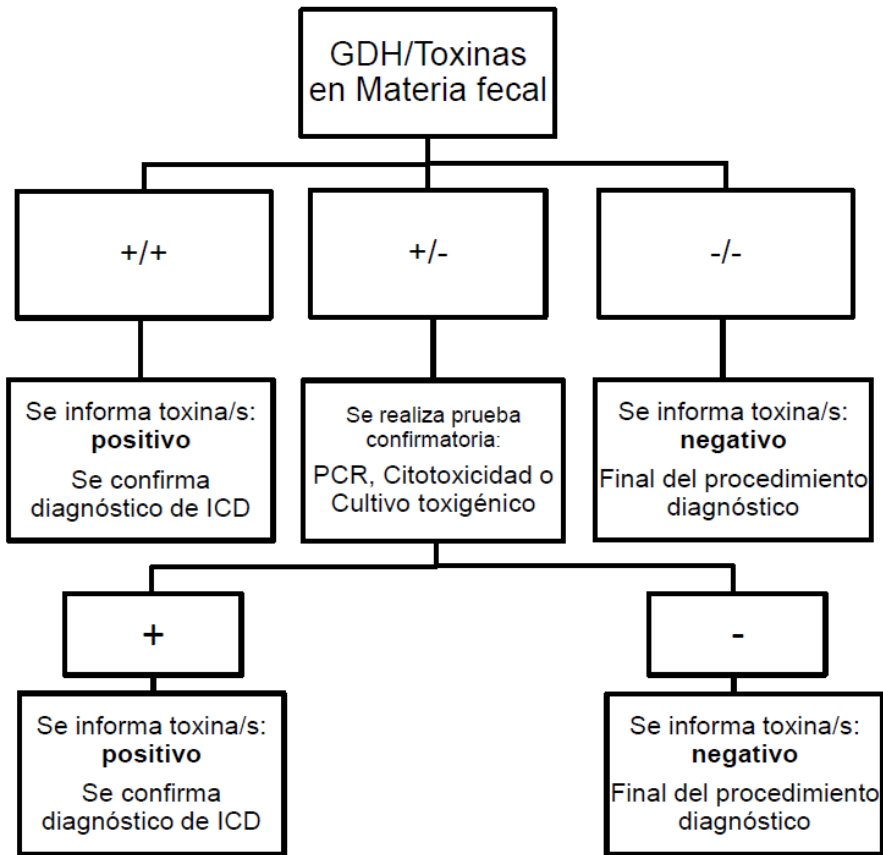
Figura 5. *Clostridium* spp. proteolíticos, no sacarolíticos.



Referencias:

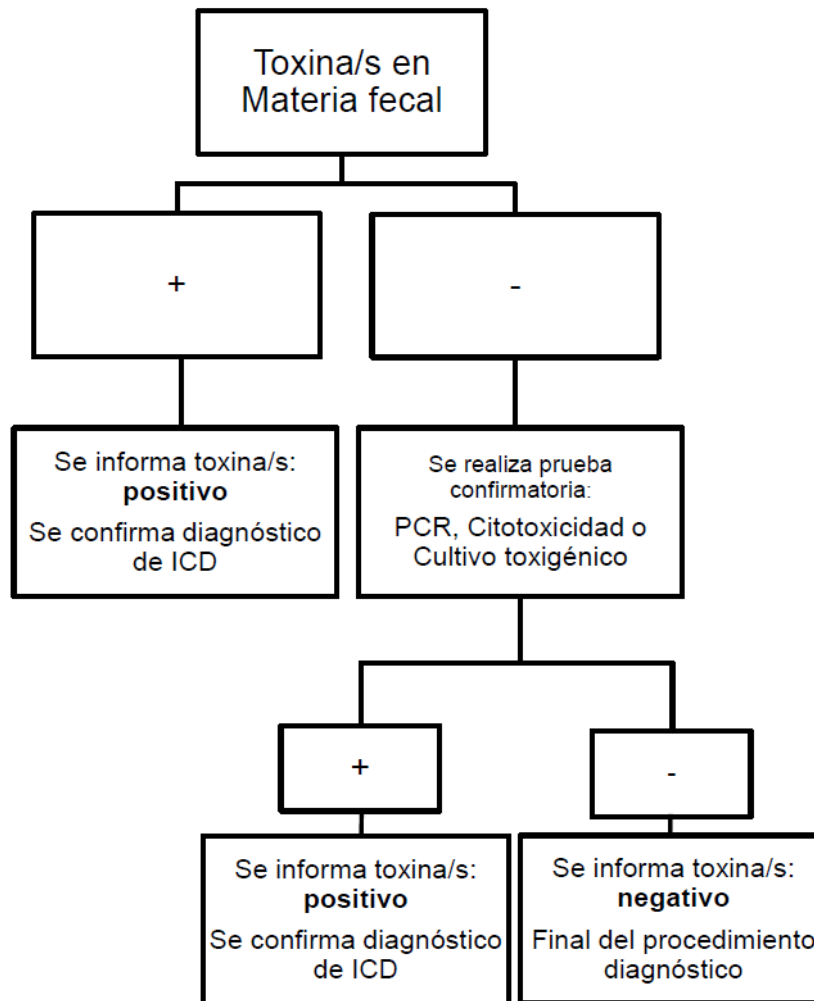
Indol: producción de indol. Nitrato: reducción de nitrato a nitrito. Morfología celular compatible con *C. tetani*: bacilo grampositivo con esporas redondas, terminales deformantes, aspecto de palillo de fósforo o de tambor. Motilidad tipo "swarming" que cubre la placa con homogeneidad.

Figura 6. Diagrama de flujo para el diagnóstico de *Clostridium difficile* I



Referencias. GDH: glutamato deshidrogenasa, +: reacción positiva, -: reacción negativa, ICD: infección por *Clostridium difficile*.

Figura 7. Diagrama de flujo para el diagnóstico de *Clostridium difficile* II



Referencias.+ : reacción positiva, - : reacción negativa, ICD: Infección por *Clostridium difficile*.

IIIId. BACILOS GRAM POSITIVOS ANAEROBIOS NO ESPORULADOS

LILIANA CASTELLO

Bioquímica de planta a cargo de la Sección Bacterias Anaerobias y Microorganismos Relacionados del Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Universidad de Buenos Aires.
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Miembro de la Subcomisión de Bacterias Anaerobias -Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas (SADEBAC)-Asociación Argentina de Microbiología (AAM). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

SILVIA C. PREDARI

Jefa del Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Coordinadora del Comité de Emergencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Miembro del Comité Científico Asesor de la Revista Argentina de Microbiología, publicación científica oficial de la Asociación Argentina de Microbiología.
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Miembro de la Subcomisión de Bacterias Anaerobias -Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas (SADEBAC)-Asociación Argentina de Microbiología (AAM). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Aspectos taxonómicos

Los bacilos gram positivos anaerobios no esporulados (BGPANE) comprenden múltiples géneros ubicados taxonómicamente en los *phyla* *Actinobacteria* y *Firmicutes*¹⁶⁹. El *phylum* *Actinobacteria* incluye a las familias *Actinomycetaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Coriobacteriaceae* y *Propionibacteriaceae*¹⁰⁸.

La familia *Actinomycetaceae* está compuesta por el género *Actinomyces* y otros tres géneros clínicamente relevantes: *Actinobaculum*, *Mobiluncus* y *Varibaculum*. Los organismos que los constituyen son de morfología variable, anaerobios estrictos y aerotolerantes.

Actinomyces incluye especies clásicamente asociadas a procesos infecciosos. En la actualidad (julio 2014), el género cuenta con 42 especies de las cuales 25 son de interés clínico en humanos¹⁰⁸. Solamente *Actinomyces dentalis*, *Actinomyces hongkongensis* y *Actinomyces israelii* son especies anaerobias estrictas; *Actinomyces cardiffensis*, *Actinomyces meyeri* y *Actinomyces nasicola* son especies aerotolerantes que desarrollan mucho mejor en anaerobiosis y, por lo tanto, se estudian en esas condiciones^{18, 63, 65, 66, 147,175}. El resto de las especies son anaerobias facultativas y se estudian como tales (tabla 3). *Actinomyces massiliensis* es una de las nuevas especies descritas del género, junto a *Actinomyces johnsonii* y *Actinomyces oris*; estas últimas, previamente identificadas como genoespecies de *Actinomyces naeslundii*, habitan la cavidad oral. *Actinomyces neuui*, una especie poco relacionada con *Actinomyces sensu stricto*, se propondría para un nuevo género^{143, 169}.

El género *Actinobaculum* incluye a las especies *Actinobaculum massiliense*, *Actinobaculum schaalii* y *Actinobaculum urinale*, todas de interés clínico en humanos, y a *Actinobaculum suis* -especie tipo- de interés veterinario. Son organismos anaerobios facultativos, con la excepción de *A. urinale*, que requiere de atmósfera anaerobia, pero solamente para el aislamiento primario; luego, con los repiques sucesivos se lo puede seguir estudiando en atmósfera enriquecida en CO₂ (tabla 1)^{64, 101}.

El género *Mobiluncus* contiene a las especies *Mobiluncus curtisii* (*M. curtisii* subsp. *curtisii* y *M. curtisii* subsp. *holmesii*) y *Mobiluncus mulieris*; son bacilos anaerobios estrictos y móviles¹⁵².

Varibaculum posee una sola especie, *Varibaculum cambriense*, y está filogenéticamente relacionado con *Mobiluncus*⁶⁷.

Bifidobacterium incluye 42 especies de las cuales 12 son de interés en humanos; junto con los géneros relacionados *Alloscardovia*, *Parascardovia* y *Scardovia* son bacilos gram positivos pleomórficos, anaerobios y microaerófilos que pertenecen a la familia *Bifidobacteriaceae*^{80, 83, 108}.

En la familia *Coriobacteriaceae* se encuentran los siguientes géneros de interés clínico en humanos: *Atopobium*, *Olsenella*, *Eggerthella*, *Collinsella*, *Slackia*, *Cryptobacterium*, *Adlercreutzia* y *Gordonibacter*^{27, 32, 84, 86, 87, 89, 114, 120, 167, 177}.

El género *Atopobium* está constituido por cinco especies. *Atopobium minutum* (anteriormente *Lactobacillus minutus*), *Atopobium parvulum* (*Streptococcus parvulus*) y *Atopobium rimae* (*Latobacillus rimae*) son especies de interés clínico en humanos y anaerobias estrictas. *Atopobium vaginae* es la especie capnófila aislada de la vagina humana y *Atopobium fossor*

(*Eubacterium fossor*) es anaerobia estricta, pero asociada a patología veterinaria^{27, 138}.

Olsenella es microbiota residente de la cavidad oral. Las dos especies clínicamente significativas son *Olsenella uli* (anteriormente *Lactobacillus uli*) y *Olsenella profusa*; *Olsenella umbonata* es de interés veterinario³².

El género *Eggerthella* incluye solo dos especies que son anaerobias estrictas, *Eggerthella lenta* y *Eggerthella sinensis*⁹⁸; la especie *Eggerthella hongkongensis* fue clasificada en un nuevo género, *Paraeggerthella*¹⁷⁷. *E. lenta*, *Collinsella aerofaciens* y *Slackia exigua* pertenecían al género *Eubacterium* (ubicado dentro del *phylum Firmicutes*), como *Eubacterium lentum*, *Eubacterium aerofaciens* y *Eubacterium exiguum*, respectivamente^{86, 167}.

Adlercreutzia equolifaciens -única especie- fue aislada de heces de humanos (9 cepas) y descrita en 2008 por Maruo *et al.* Está filogenéticamente relacionada con *E. sinensis* en la secuencia del gen 16S ARNr con un 93 % de similitud. Son cocobacilos gram positivos dispuestos en cadenas, anaerobios estrictos e inmóviles¹¹⁴.

Gordonibacter pamelaee, también única especie, fue aislada del colon de un paciente con enfermedad de Crohn (una cepa) y descrita por Würdemann *et al.* en 2009. Está filogenéticamente relacionada con *Paraeggerthella hongkongensis*, con quien comparte un 94,6 % de identidad. Son cocobacilos gram positivos, anaerobios estrictos y móviles¹⁷⁷.

La familia *Propionibacteriaceae* está constituida por los géneros *Propionibacterium*, *Propioniferax* y *Propionimicrobium*^{130, 154, 178}.

Propionibacterium comprende a las especies *Propionibacterium acidifaciens* -la especie más reciente- *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium avidum*, *Propionibacterium granulosum* y *Propionibacterium propionicum*. Las cinco especies son bacilos gram positivos pleomórficos, anaerobios y aerotolerantes, aislados de materiales clínicos^{38, 169}.

Propioniferax innocua -única especie- es parte de la microbiota de la piel, y *Propionimicrobium lymphophilum*, también única especie y anteriormente denominada *Propionibacterium*, se aisló de materiales clínicos^{154, 178}.

Por otra parte, el *phylum Firmicutes* incluye a las familias *Erysipelotrichaceae*, *Eubacteriaceae*, *Lachnospiraceae*, *Lactobacillaceae*, *Peptostreptococcaceae* y *Ruminococcaceae*¹⁰⁸.

La familia *Erysipelotrichaceae* está constituida por los siguientes géneros y especies: *Bulleidia extracta*, *Catenibacterium mitsuokai*, *Eggerthia catenaformis* (anteriormente *Lactobacillus catenaformis*), *Holdemania filiformis*, *Solobacterium moorei* y *Turicibacter sanguinis*, todos de interés clínico en humanos^{9, 37, 142, 172, 181}.

Los géneros *Anaerofustis* (*Anaerofustis stercorihominis*, única especie), *Eubacterium* (42 especies, 26 de interés clínico) y *Pseudoramibacter* (*Pseudoramibacter alactolyticus*, única especie) forman parte de la familia *Eubacteriaceae*^{46, 108, 171}. Se destaca a *Eubacterium* como un género muy heterogéneo, objeto de uno de los mayores cambios taxonómicos. Los BGPANE no diferenciados por sus productos metabólicos finales y pruebas bioquímicas fueron asignados a este género. Con las técnicas de secuenciación del gen 16S ARNr, las especies de *Eubacterium* filogenéticamente distintas de la especie tipo, *Eubacterium limosum*, se

reclasificaron en nuevos géneros y especies. Sobre la base de esto, *Eubacterium alactolyticum* actualmente se denomina *Pseudoramibacter alactolyticus*¹⁷¹. Algunas especies de *Eubacterium* están filogenéticamente relacionadas con el género *Clostridium*. Así, *Eubacterium siraeum* pertenece a un grupo compartido con *Clostridium leptum* y *Anaerotruncus colihominis*, esta última especie junto con *Faecalibacterium prausnitzii* (anteriormente *Fusobacterium prausnitzii*) pertenecen a la familia *Ruminococcaceae*^{40, 100}. Esta familia incluye 14 géneros de los cuales solamente dos, *Anaerotruncus* y *Faecalibacterium* (con *A. colihominis* y *F. prausnitzii* como únicas especies, respectivamente), colonizan el colon humano¹⁰⁸.

Eubacterium tenue y *Eubacterium yurii* pertenecen a uno de los *clusters* clostridiales. A su vez, *E. yurii* está relacionado con el género *Filifactor*, cuya especie *Filifactor alocis* (previamente *Fusobacterium alocis*) pertenece a la familia *Peptostreptococcaceae*. Esta última familia está constituida por cinco géneros. Solo *Filifactor* es un BGPANE relacionado con patología en humanos que comprende a dos especies, y una de ellas, *Filifactor alocis*, está asociada a abscesos por mordeduras de gatos y a casos de gingivitis y periodontitis^{36, 82, 108, 168}.

Recientemente, *Eubacterium hadrum* fue reclasificado como *Anaerostipes hadrus*. Junto con *Anaerostipes caccae* forman parte de la familia *Lachnospiraceae*^{3, 145}. La misma familia incluye, además, a los géneros *Dorea*, *Lactonifactor*, *Marvinbryantia* (anteriormente *Bryantella*), *Moryella*, *Oribacterium*, *Roseburia*, *Shuttleworthia* y *Stomatobaculum* - la inclusión más reciente - todos microorganismos de interés en humanos^{16, 17, 22, 35, 39, 146, 159, 174}.

El género *Lactobacillus* pertenece a la familia *Lactobacillaceae* y comprende más de 150 especies de bacilos gram positivos no esporulados, sacarolíticos, que presentan distintas vías metabólicas. Parte de los cambios taxonómicos dentro de este género que operaron a partir de los análisis de secuenciación del gen 16S ARNr fueron enunciados en los párrafos anteriores^{69, 108}.

Hasta el momento, tres géneros de los BGPANE se encuentran fuera de las familias consideradas en el *phylum Firmicutes*. *Catabacter hongkongensis* - única especie- ha sido aislada de hemocultivos y está propuesta para la familia *Catabacteriaceae* (nombre aún no validado)⁹⁶. *Flavonifractor plautii* proviene de la combinación de *Eubacterium plautii* y *Clostridium orbiscindens*¹⁵. Por último, el género *Mogibacterium* está constituido por cinco especies asociadas a infecciones orales; estas son difíciles de diferenciar por los métodos fenotípicos convencionales¹²¹. Una de las especies, *Mogibacterium timidum*, anteriormente se denominaba *Eubacterium timidum*¹²².

Para una descripción taxonómica más exhaustiva se sugiere consultar la *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature* (LPSN) disponible en <http://www.bacterio.net>¹⁰⁸. Las especies de BGPANE de interés clínico se enumeran en el capítulo "Cultivo e identificación de microorganismos anaerobios" (tabla 2) y en las tablas 1 a 7 de este capítulo.

Hábitat

Los organismos pertenecientes a este grupo de bacterias anaerobias son, principalmente, parte de la microbiota comensal de la piel, de la cavidad

oral, de las mucosas del tracto digestivo humano y animal y del tracto urogenital¹⁶⁹.

Algunos miembros del grupo también residen fuera de estos hábitats biológicos; tal es el caso de las especies del género *Bifidobacterium* que están asociadas a productos lácteos fermentados promotores de la salud, también se encuentran en el intestino de las abejas relacionadas con la producción de la miel y en aguas residuales^{8, 19}. En *Lactobacillus* existen especies relacionadas tanto con productos benéficos para la salud como con carnes, bebidas, masas y vegetales fermentados, alimentación animal y también con aguas y suelos⁶⁹.

A diferencia de las especies residentes en piel y en mucosas, las especies clásicas de *Propionibacterium*, también llamadas lácticas, se relacionan con la manufactura de quesos y probióticos^{130, 132, 133}.

El hábitat es desconocido en *Actinobaculum* spp., *Varibaculum cambriense*, *Atopobium vaginae*, *Anaerofustis stercorihominis* y *Moryella indoligenes*, sin embargo, por haber sido especies aisladas de diferentes procesos infecciosos, probablemente se trate de residentes del tracto digestivo o genitourinario humano^{16, 46, 64, 67, 99, 138}.

Factores de virulencia

Las infecciones causadas por bacterias anaerobias son generalmente polimicrobianas e involucran a anaerobios estrictos, anaerobios facultativos y aerobios estrictos. Esta condición es propia de los BGPANE, que raramente causan infecciones por sí mismos, sino como parte de procesos mixtos. A consecuencia de esto, la epidemiología y el potencial patogénico de los distintos géneros de este grupo están evaluados parcialmente. Esto se

complejiza aún más si sumamos el hecho de que son organismos de la microbiota normal. En algunas especies se han detectado sustancias y estructuras que evaden los mecanismos de defensa del huésped, las cuales están relacionados principalmente con la adherencia.

Las especies de *Actinomyces* cuyo hábitat principal es la cavidad oral y se relacionan con infecciones odontogénicas producen polímeros extracelulares, como dextrano, levano, glucógeno y polisacáridos del *slime* ricos en *N*-acetilglucosamina, que capacitan a la bacteria para adherirse directamente a la superficie dental. La producción de dichos polímeros fue observada en *Actinomyces viscosus sensu stricto* y *Actinomyces naeslundii sensu lato*¹⁴³. Las fimbrias, también producidas por especies de este género, intervienen en procesos de fijación y coagregación interbacteriana. Estos mecanismos fueron observados entre especies orales de *Actinomyces*, como *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Actinomyces odontolyticus* o *A. viscosus*, y en otras especies de la cavidad oral como *Streptococcus sanguinis*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Prevotella loescheii*¹⁴³.

La adherencia como primer paso en la infección también fue observada en *Mobiluncus*. La producción de glicocálix sería responsable de la adhesión de *Mobiluncus* a las células epiteliales vaginales; la adherencia de las dos especies del género se incrementa con el aumento del pH¹⁵³.

Las infecciones debidas a *Propionibacterium acnes* relacionadas con dispositivos médicos como prótesis articulares, válvulas cardíacas, catéteres intravasculares y derivaciones del sistema nervioso central (SNC) están ligadas a la capacidad de formación de *biofilm*. A su vez, se observó que las células

sésiles –organismos crecidos en la intimidad del *biofilm*– eran más resistentes que las células planctónicas frente a la acción de los antimicrobianos^{25, 103, 135}. En los distintos aislamientos de *P. acnes* debe considerarse, además, la capacidad de este microorganismo de producir factores de virulencia probables. Estos factores están asociados con la expresión de proteínas de superficie inmunogénicas y el consiguiente rol del organismo en la respuesta inflamatoria¹⁰⁹. *P. acnes* es el microorganismo prevalente asociado al acné juvenil o acné vulgaris, que afecta hasta el 85 % de los adolescentes. Se ha visto que estas cepas producen sialidasas, neuraminidasas, lipasas y endoglucoceramidasa, factores que contribuyen a la formación de poros, etc., es decir, productos involucrados en la degradación de las células del hospedero¹⁶².

Los flagelos –estructuras proteicas globulares de flagelina presentes en las bacterias móviles en general– constituyen elementos de locomoción que les permiten a los organismos desplazarse por superficies húmedas y secas. La naturaleza proteica confiere a los flagelos un carácter inmunogénico importante; estos contribuyen a la capacidad invasora de las bacterias móviles. Se recuerda que entre los BGPANE son móviles los géneros *Catabacter*, *Gordonibacter*, *Mobiluncus*, *Oribacterium* y *Roseburia*; también lo son la especie *E. yurii*, cepas de *E. rectale* y *E. tenue*, cepas de *Flavonifractor plautii* y especies de *Lactobacillus*^{15, 17, 69, 78, 96, 155, 168, 177}.

Los BGPANE participan, mayormente, de procesos infecciosos polimicrobianos. La coexistencia con la microflora aerobia conlleva una situación de sinergismo: en el sitio de la infección las bacterias aerobias consumen el oxígeno, es decir, se promueven condiciones apropiadas para el

desarrollo de los anaerobios, los cuales a su vez, expresan las sustancias que funcionan como factores de virulencia⁴⁸.

Impacto clínico

Los BGPANE incluyen a bacterias anaerobias estrictas y aerotolerantes que forman parte de la microbiota habitual de las superficies mucosas de la cavidad oral, tractos digestivo y urogenital y de la piel. Los miembros de este grupo tan diverso comparten la característica de ser poco virulentos, de tener escaso poder patogénico y de producir infecciones oportunistas. Cuando son agentes causales rara vez actúan solos, sino como parte de infecciones polimicrobianas. En estos casos, la propia microflora del hospedero es el origen más frecuente, por lo tanto, los roles de las especies individuales y su papel específico en la enfermedad son difíciles de determinar^{36, 98, 169}.

Actinomyces y organismos relacionados

La actinomicosis es una infección endógena granulomatosa crónica producida por especies de *Actinomyces* (especialmente *Actinomyces israelii*, *Actinomyces gerencseriae* y *Actinomyces gravenitzi*) y por *Propionibacterium propionicum*. Se caracteriza por la formación de lesiones granulomatosas y, según los órganos que estas afectan, se clasifica en cervicofacial, torácica y abdomino-pélvica, estas tres formas de actinomicosis representan la mayoría de los casos⁴⁹. La actinomicosis cervicofacial se presenta en los individuos que fueron sometidos a algún procedimiento dental invasivo no tratado o a un traumatismo bucal. En las secreciones de la lesión actinomicótica, que puede fistulizar y comprometer la mucosa yugal y la mandíbula, se observan partículas macroscópicas llamadas “gránulos de azufre” por su aspecto

amarillento; están formadas por acúmulos de *Actinomyces* –bacilos ramificados– y distintas especies de la cavidad oral¹³⁴. La actinomicosis torácica se produce por aspiración de los microorganismos del tracto respiratorio superior y de la boca y afecta principalmente a los pulmones; la abdominal tiene lugar en pacientes sometidos a cirugía digestiva o por perforación intestinal y la pélvica es una variante poco frecuente de la enfermedad que se presenta en mujeres que utilizan dispositivo intrauterino (DIU)^{81, 170}. *Varibaculum cambriense* –única especie del género– también se ha aislado de infecciones genitales asociadas con DIU⁶⁷.

Las actinomicosis del SNC son infrecuentes y se desarrollan por diseminación hematógena desde tejidos distales o por lesiones contiguas cervicofaciales.

Otras infecciones que caracterizan a las especies de *Actinomyces* se vinculan con su hábitat natural, la cavidad oral, donde colonizan la superficie de los dientes y de la mucosa, interaccionan con otros organismos y forman la placa dental. Los procesos asociados con esta dinámica son caries dentales, infecciones endodónticas, infecciones asociadas a implantes y abscesos odontogénicos, entre otras, así como lesiones por osteorradionecrosis^{10, 65, 163}. En un estudio sobre la etiología de las caries dentales en niños y adultos jóvenes, Aas *et al.* detectaron 197 especies, de las cuales el 60 % eran no cultivables. En los individuos con *Streptococcus mutans*, las especies acompañantes prevalentes eran *Atopobium*, *Propionibacterium* y *Lactobacillus*. En los sujetos sin *S. mutans* predominaron *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium dentium*. Las especies de *Actinomyces* y estreptococos no *S. mutans*

predominaron en los estadios iniciales de formación de las caries, mientras que *S. mutans*, durante la etapa de cronicidad¹.

Las especies orales de *Actinomyces*, a su vez, pueden ser la causa de bacteriemias asociadas a procedimientos dentarios¹⁵¹.

En los pacientes con pericarditis, *Actinomyces* spp. son las bacterias anaerobias predominantes; *A. israelii* y *A. meyeri* fueron las especies prevalentes en los casos estudiados¹².

En las infecciones por mordeduras de humanos o animales se aíslan distintos organismos, tanto aerobios como anaerobios provenientes de la cavidad oral, y los agentes responsables, a diferencia de lo que ocurre en otros procesos, son parte de la microbiota comensal de otros individuos, no de la propia. *A. israelii*, *A. meyeri*, *A. naeslundii* y *A. viscosus* son las especies encontradas con mayor frecuencia^{55, 156, 169}.

A partir de la herida infectada se pueden producir complicaciones infrecuentes, pero de gravedad, como infecciones óseas y articulares⁹¹. Una especie aislada con muy poca frecuencia, tal vez subdiagnosticada, es *A. hongkongensis*. Ha sido asociada a actinomicosis pélvica en dos mujeres adultas con antecedentes de uso de DIU y sin este^{50, 175}.

Mobiluncus

Las especies de *Mobiluncus* constituyen parte de la microbiota de la vagina humana y están significativamente asociadas a la vaginosis bacteriana (VB), aunque su rol preciso en la etiopatogenia de esta entidad no ha sido determinado aún. La observación microscópica en los exudados vaginales de bacilos curvos y móviles atribuibles a *Mobiluncus* spp. se considera uno de los

marcadores de la enfermedad^{113, 124}. Tanto en las mujeres sanas como en las afectadas por VB han sido identificadas distintas especies de *Mobiluncus*. *Mobiluncus curtisii* aparece como la especie prevalente en las mujeres con VB con respecto a las sanas, lo cual sugiere que la especie *M. curtisii* puede ser más patogénica que *Mobiluncus mulieris*¹⁴⁴. Asimismo, en otro estudio se observó que la persistencia de *M. curtisii* en el ecosistema vaginal estuvo altamente relacionada con la recurrencia de la VB posfinalización de la terapia antibiótica con metronidazol, aunque se debe considerar que *M. curtisii* es resistente *in vitro* a este antimicrobiano¹¹⁷. La presencia de VB y los múltiples microorganismos relacionados (hasta 35 especies) influyeron significativamente en el parto prematuro de 499 gestantes estudiadas entre las semanas 17 a 23. Las especies de *Mobiluncus*, *Atopobium* y *Mycoplasma*, entre otras, estuvieron significativamente relacionadas con los partos prematuros⁵¹.

En los últimos años se han informado casos relacionados con enfermedades extragenitales que involucran a las especies del género *Mobiluncus*. *M. curtisii* fue aislado a partir de una botella anaeróbica de hemocultivo en el quinto día de incubación, de un paciente con antecedentes de colitis ulcerosa y diagnóstico de hemorragia cerebral¹⁴⁰.

Propionibacterium

Los miembros de este género están presentes en la piel humana y colonizan áreas como la boca, el tracto genitourinario y el intestino grueso; por esta distribución pueden ocasionar infecciones oportunistas en distintas zonas del cuerpo. La especie más reciente, *P. acidifaciens*, ha sido aislada de la cavidad oral y está asociada a caries dentales en humanos³⁸. *P. acnes* es el

principal comensal de la piel humana y juega un rol importante en el mantenimiento de su salud, dado que inhibe la colonización e invasión de microorganismos de patogenicidad reconocida como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, entre otros. Es responsable de la hidrólisis de los triglicéridos presentes en el sebo que lubrica la piel y los pelos, con la consiguiente liberación de ácidos grasos, los que contribuyen con la disminución del pH. *P. acnes* se adhiere a los ácidos grasos libres y esto, probablemente, le permita colonizar la glándula sebácea. *Propionibacterium* spp. son los residentes lipofílicos de la unidad pilo-sebácea⁶¹. Pueden estar presentes en distintos materiales clínicos y ser descartados del diagnóstico al ser considerados contaminantes o sin relevancia clínica. Esta actitud frente a las bacterias propiónicas se observa generalmente cuando se trata de aislamientos que provienen de sangre o heridas; sin embargo, estos agentes pueden ser causa de infecciones graves como endocarditis u osteomielitis, sobre todo en los pacientes inmunocomprometidos^{53, 74, 150}. *P. acnes* está relacionado con otras infecciones y se recuperó de comedones de acné vulgaris, abscesos de partes blandas, infecciones oculares, y por su capacidad de formar *biofilms*, también se aisló de la superficie de dispositivos médicos⁷⁷.

Mediante el método de tipificación de secuencias de *loci* múltiples [*multilocus sequence typing* (MLST)], McDowell *et al.* estudiaron cepas de *P. acnes* provenientes de la piel de sujetos normales y de estados de enfermedad. Estos autores observaron que existían diferentes linajes, clados y *clusters* primariamente asociados a una y a otra condición clínica. Así, *P. acnes* tipo IA₁ se recupera principalmente de las pieles con acné; de las infecciones oftálmicas se aíslan los tipos IA₁ y IA₂, las cepas tipo IB y II están asociadas a

las infecciones del tejido celular subcutáneo y a los dispositivos biomédicos, mientras que el linaje tipo III estaría principalmente asociado a las pieles sanas. Además, se detectaron mutaciones en el ARNr que conferirían resistencia a antibióticos como eritromicina, clindamicina y tetraciclinas, frecuentemente utilizados en el tratamiento de las cepas asociadas al acné juvenil, con evidencias de diseminación intercontinental¹¹⁶.

P. propionicum, que es parte de la microbiota oral, fue aislado de infecciones oculares como la canaliculitis lagrimal. Está reconocido, además, como causa de la actinomicosis, etiología compartida con *Actinomyces* spp., y en ocasiones, se asoció con el uso de DIU^{68, 176}.

Atopobium y *Olsenella*

De las cuatro especies del género *Atopobium* de interés clínico, las especies *A. parvulum* (previamente *Streptococcus parvulus*) y *A. rimae* (*Lactobacillus rimae*) son parte de la microbiota gingival humana saludable en algunos individuos, pero además, se aislaron de ciertos procesos infecciosos odontogénicos^{94, 126}. *A. rimae* se reconoció como agente responsable de un caso de bacteriemia seguido de sepsis en humano⁵. *A. minutum* (*Lactobacillus minutus*) ha sido aislado de sangre, heridas abdominales, abscesos pélvicos y perineales; además, se ha comunicado en Francia en 2011 el aislamiento de una cepa de *A. minutum* a partir del debridamiento de una úlcera sacra profunda necrosada, con resistencia a la vancomicina y sensibilidad a la teicoplanina a expensas de la presencia del gen *vanB*. El cultivo era mixto e incluía a *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus* sensibles a la vancomicina¹¹⁵. *A. vaginae* es la especie aerotolerante del género y como

parte de la ecología vaginal está asociada, principalmente, con vaginosis bacteriana, aunque Knoester *et al.* comunicaron un caso de sepsis asociada a muerte fetal y aborto en una paciente en el tercer mes de embarazo, luego de una biopsia de las vellosidades coriónicas^{92, 166}.

Las especies de *Olsenella* también se encuentran principalmente asociadas a infecciones de la cavidad oral y se detectaron en muestras subgingivales de pacientes con enfermedad periodontal^{32, 126}. *Olsenella profusa* se aisló en forma predominante de caries dentales, mientras que *Olsenella uli*, de infecciones endodónticas^{118, 137}. Esta última especie fue informada como causa de un episodio de bacteriemia clínicamente significativa en un paciente con enfermedad del tracto gastrointestinal⁹⁷.

Eubacterium y organismos relacionados

Antes del empleo de las técnicas moleculares para la identificación de los microorganismos, el género *Eubacterium* albergó una gran variedad de especies fenotípicamente heterogéneas, que después fueron reclasificadas y transferidas a distintos géneros. En la actualidad, el género incluye 42 especies de las cuales 26 son de interés clínico. Estos microorganismos forman parte de la microbiota de la cavidad oral y son, en su mayoría, agentes responsables de infecciones odontogénicas.

Mediante la identificación molecular se logró diferenciar a las distintas especies intervinientes en infecciones orales que habían sido asignadas previamente a *Eubacterium*. Los resultados mostraron una gran diversidad bacteriana, *Mogibacterium timidum* (previamente *Eubacterium timidum*) fue una de las especies más frecuentes; otros aislamientos fueron identificados como

Mogibacterium vescum, *Bulleidia extracta*, *Filifactor alocis* (*Fusobacterium alocis*), *Pseudoramibacter alactolyticus* (*Eubacterium alactolyticum*), *Eubacterium sulci* (*Fusobacterium sulci*), *Eubacterium saburreum* y *Eubacterium yurii*³⁶. *M. timidum* y *Eubacterium saphenum* fueron aislados de infecciones endodónticas; la última especie nombrada y *F. alocis* se encontraron involucradas en la periodontitis crónica^{70, 94, 128}.

La mayoría de los organismos de este grupo, comensales de la cavidad oral humana y de otros animales, se aíslan generalmente en cultivo polimicrobiano aerobio y anaerobio, a partir de heridas por mordeduras infectadas^{156, 157}.

Eubacterium nodatum fue descrito como uno de los agentes de la enfermedad periodontal. La morfología celular y colonial de esta especie es similar a la de *Actinomyces israelii*; comparte además con este microorganismo su aislamiento del tracto genital femenino en infecciones asociadas al DIU^{72, 73}. *Eubacterium tenue* fue aislado en un caso de bacteriemia clínicamente significativa en cultivo monomicrobiano en una paciente con carcinoma de recto⁹⁷.

Eggerthella y organismos relacionados

El género *Eggerthella* está constituido por solo dos especies que son anaerobias estrictas: *Eggerthella lenta* (anteriormente *Eubacterium lentum*) y *Eggerthella sinensis*. *Eggerthella lenta* forma parte de la microbiota endógena del intestino humano; es un patógeno reconocido de la cavidad abdominal y fue aislado de distintos materiales provenientes de ese sitio anatómico^{60, 165}. *E. lenta*, *E. sinensis* y *Paraeggerthella hongkongensis* (anteriormente *Eggerthella*

hongkongensis), especies aisladas de hemocultivos, demostraron ser agentes etiológicos de bacteriemias clínicamente significativas con una mortalidad relativamente elevada. La prevalencia de *E. lenta* y *P. hongkongensis* fue similar, la edad avanzada y las enfermedades de base fueron los factores de riesgo para la bacteriemia^{97, 98, 107, 165}.

Las especies *Cryptobacterium curtum* y *Slackia exigua* (previamente *Eubacterium exiguum*) están vinculadas a infecciones orales como la periodontitis crónica⁹⁴; *S. exigua*, a su vez, es agente etiológico de infecciones endodónticas⁷⁰.

Lactobacillus

Los lactobacilos (el género está constituido por más de 150 especies) son una parte importante de la microbiota normal de la boca y de los tractos gastrointestinal y genitourinario. Si bien son considerados organismos protectores, en determinadas circunstancias pueden ser causa de enfermedad¹⁴⁸. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus ultunensis* son las especies prevalentes en infecciones en humanos¹⁴. *Lactobacillus* se asocia con la caries dental avanzada, pero también produce infecciones de mayor gravedad como bacteriemia y endocarditis, que son las más comúnmente atribuidas al género. *L. casei* y *L. rhamnosus* son las especies más frecuentemente asociadas a endocarditis, suelen ser sensibles a la eritromicina y clindamicina, pero resistentes a la vancomicina^{2, 13, 14, 180}. *Lactobacillus paracasei* resistente a la vancomicina fue agente causal de peritonitis asociada a la diálisis peritoneal

continua ambulatoria en un paciente con tratamiento prolongado con dicha droga, por lo cual se advierte acerca de la importancia de su búsqueda. Como así también la de otros microorganismos resistentes a la vancomicina en las peritonitis recurrentes y las refractarias al tratamiento con vancomicina¹²³.

En las últimas dos décadas se observó un interés creciente en el consumo de productos suplementados con especies de *Lactobacillus* u otros organismos genéricamente nombrados como probióticos. Su uso provee efectos benéficos para la salud con respecto a la reconstitución de la flora intestinal y en la prevención o tratamiento de enfermedades, sobre todo las gastrointestinales^{33, 148}. Gaón *et al.* demostraron que *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* cepas CERELA contribuyeron a reducir en forma significativa el número de deposiciones y vómitos en niños con diarrea persistente⁵². También, de Moreno de LeBlanc *et al.* demostraron en un modelo murino la disminución de la inflamación intestinal, el incremento de la actividad fagocítica de los macrófagos en distintos órganos (bazo, peritoneo) y en las placas de Peyer y un aumento en la liberación de la IgA a nivel de la lámina propia, lo cual se correlacionó con un aumento de la IgA específica contra *Salmonella Typhimurium* en los fluidos intestinales³¹.

Sin embargo, las bacterias lácticas no estarían indicadas en los pacientes inmunosuprimidos, con deficiencias en las barreras anatómicas o gravemente enfermos, quienes quedarían expuestos a adquirir infecciones por los lactobacilos^{93, 148, 164, 180}.

Bifidobacterium y organismos relacionados

Las bifidobacterias (el género está constituido por algo más de 40 especies, de las cuales solo 12 son de interés en humanos) actúan como protectoras de la salud del ecosistema intestinal y son consideradas, primariamente, no patógenas^{4, 62, 158}. No obstante, se aíslan de infecciones polimicrobianas principalmente de la caries dental, donde pueden ser agentes etiológicos al igual que *Parascardovia denticolens* y *Scardovia inopinata*^{7,83}. Otras infecciones por *Bifidobacterium* spp. son inusuales y ocurren en pacientes inmunocomprometidos, o con factores predisponentes médicos o quirúrgicos. Las especies más frecuentemente involucradas son *Bifidobacterium adolescentis* y *Bifidobacterium scardovii* –especies anaerobias facultativas y capnófilas– y *Bifidobacterium dentium*, las cuales se han descrito asociadas a otitis media crónica, abscesos, peritonitis, colesteatomas y neumonías aspirativas en pediatría y a infecciones urinarias en adultos^{6, 11, 12, 111}.

Se obtuvieron aislamientos de *Alloscardovia omnicoles* a partir de diversos materiales clínicos, que incluyen el tracto genitourinario, la cavidad oral, los abscesos de pulmón y de válvula aórtica y la sangre^{80, 111}.

Diagnóstico microbiológico

Identificación a nivel de género y especie

La morfología celular de los BGPANE es muy variable; muchos de ellos son de lento crecimiento y generalmente poco reactivos en las pruebas bioquímicas convencionales. Estos factores en conjunto contribuyen a que su identificación sea dificultosa. Otras metodologías más complejas como el análisis de los peptidoglicanos de la pared celular, de los productos

metabólicos finales a través de la cromatografía gaseosa, el perfil proteico a través de la espectrometría de masa y la secuenciación del gen 16S ARNr – *goldstandard* para la identificación bacteriana– entre otros, requieren de equipamiento y experiencia, no siempre disponibles. Por ello, cada laboratorio deberá establecer los criterios propios con respecto a la complejidad a alcanzar en la identificación de los aislados que involucren a los miembros de este grupo anaerobio.

Para la identificación preliminar de un aislamiento en cultivo puro que se presume BGPANE, primero se debe subcultivar en atmósfera de aire y en aire más CO₂ al 5 % para determinar la aerotolerancia o el carácter de anaerobio estricto. Al examinar la morfología celular con la coloración de Gram, la observación de BGPANE ramificados, difteroides o largos podría corresponder a *Actinomyces*, *Propionibacterium* o *Lactobacillus*, respectivamente, mientras que los bacilos cortos, curvos, pleomórficos o con extremos bifurcados sugerirían *Eggerthella*, *Mobiluncus*, *Eubacterium* y bacterias relacionadas o *Bifidobacterium*, respectivamente.

Bulleidia, *Cryptobacterium*, *Filifactor*, *Flavonifractor*, *Holdemania*, *Mobiluncus*, *Propionibacterium* y *Slackia* se tiñen como gram negativos o son gram variables.

La confirmación de la coloración de Gram en forma rápida puede realizarse mediante la solución de hidróxido de potasio al 3 % y la confirmación de la ausencia de esporas, mediante la prueba de esporulación (ver Anexo de Medios de cultivo y reactivos).

La siembra masiva en el agar sangre formulado para anaerobios (ver Anexo de Medios de cultivo y reactivos) e incubado en anaerobiosis para

determinar los patrones de sensibilidad frente a los discos de potencia especial [vancomicina (5 µg), colistina (10 µg) y kanamicina (1 mg)] contribuye a definir la coloración de Gram. El perfil característico de un BGPANE muestra sensibilidad a vancomicina (halo de inhibición ≥ 10 mm), resistencia a colistina y sensibilidad variable a kanamicina. Como excepciones, algunas especies del género *Lactobacillus* y *Holdemania filiformis* –única especie– muestran resistencia a vancomicina, y *Moryella indoligenes* –única especie– muestra sensibilidad a los tres antibióticos. El género *Bifidobacterium* es intrínsecamente resistente a kanamicina y a todos los aminoglucósidos.

La morfología colonial de ciertas especies y cepas adquiere características particulares. *A. israelii* y *P. propionicum* son semejantes en cuanto a las morfologías celular y colonial; se presentan generalmente como bacilos ramificados y filamentosos y las colonias en forma de muela. En otras especies de *Actinomyces* y *Propionibacterium*, las colonias son de aspecto liso. Las colonias de *P. acnes* inicialmente son pequeñas, redondas y blancas; a medida que envejecen se tornan más grandes y amarillentas. Estudios más exhaustivos en esta especie demostraron diferencias en las morfologías coloniales según los linajes, los cuales, a su vez, están asociados a los procesos infecciosos (por lo común los tipos I y II) o a la piel sana (mayormente el tipo III). Las colonias pertenecientes a los tipos I y II son circulares, de 1-2 mm de diámetro, convexas, brillantes u opacas, mientras que las del tipo III forman colonias muy pequeñas, puntiformes a 0,5 mm de diámetro, chatas y secas. En medios líquidos como el caldo infusión de cerebro y corazón (BHI), *P. acnes* tipo IA muestra un sedimento granular debido a la agregación celular

con la solución clara; los tipos IB y II han mostrado la formación de un delicado sedimento con la solución turbia por las células en suspensión^{116, 130, 162}.

Bacilos ramificados y colonias de 0,5-2 mm de diámetro, generalmente circulares, en forma de baya o de muela, se observan en *E. nodatum*. Las colonias de *E. limosum* son puntiformes a 2 mm de diámetro, circulares, traslúcidas a opacas. *E. lenta* forma colonias de aproximadamente 0,5 mm de diámetro, circulares o moteadas^{72, 85, 168}.

Por lo general, estos microorganismos son de lento crecimiento y requieren de suplementos en el medio de cultivo que mejoran la recuperación, tales como arginina, tween 80, suero, etc. (ver Anexo de medios de cultivo). Para minimizar las dificultades en la lectura de las pruebas de identificación, los inóculos deben ser compatibles con el estándar N.º 2 de la escala de Mac Farland y provenientes de cultivos jóvenes (72-96 horas). La incubación se debe extender hasta lograr un crecimiento óptimo; se recomienda no abrir los sistemas de incubación antes de las 48 horas y dejar aun hasta 7 días.

La producción de catalasa e indol, la reducción de los nitratos, la movilidad, la hidrólisis de la esculina, la fermentación de los hidratos de carbono y los perfiles enzimáticos detectados por los equipos comerciales o tabletas individuales proveen una identificación tentativa, al menos a nivel de género¹⁶⁹.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se presentan las características fenotípicas diferenciales de los géneros pertenecientes a los *phyla Actinobacteria* (tabla 1) y *Firmicutes* (tabla 2) basadas en la descripción celular, las pruebas bioquímicas convencionales y los perfiles enzimáticos. Asimismo, se muestran las características útiles para la identificación de las

especies anaerobias y aerotolerantes que crecen mejor en anaerobiosis más comúnmente aisladas y/o de probada importancia clínica de los géneros: *Actinomyces*, *Varibaculum* y *Mobiluncus* (tabla 3), *Propionibacterium*, *Propioniferax* y *Propionimicrobium* (tabla 4), *Atopobium* y *Olsenella* (tabla 5), *Eubacterium* y especies relacionadas (tabla 6), y *Lactobacillus* (tabla 7).

Consideraciones prácticas en la identificación fenotípica

Frente a un aislamiento que se presenta como bacilos cortos en cadenas o cocobacilos gram positivos no esporulados, anaerobios obligados y asacarolíticos, catalasa positivos, se debe pensar en *Eggerthella*, *Gordonibacter* o *Paraeggerthella*. Solamente el género *Gordonibacter* es móvil, *Eggerthella* es β -glucosidasa negativa y *Paraeggerthella* es β -glucosidasa positiva (tablas 1 y 6). Si los cocobacilos fueran sacarolíticos y móviles, probablemente se trate de *Catabacter* sp. (tabla 2).

Ante BGPANE difteromorfos, aerotolerantes, catalasa positivos, sacarolíticos e inmóviles, se debe pensar en *Propionibacterium acnes* si las pruebas de indol y la reducción de nitratos son positivas (tablas 1 y 4).

Si los bacilos son difteromorfos, pero con tendencia a formar filamentos que se ramifican, con tolerancia variable frente al oxígeno y catalasa negativos, sacarolíticos, inmóviles y con las pruebas de nitratos e indol negativas, probablemente se trate de *Actinomyces* spp. (tablas 1 y 3).

La observación de bacilos largos y rectos, o de bacilos cortos que forman cadenas, es característica de *Lactobacillus* spp., cuyo metabolismo es fermentador. La mayoría de las cepas pueden crecer en condiciones de

aerotolerancia, con hemólisis parcial del AS formulado para anaerobios, y ser resistentes a la vancomicina (tablas 2 y 7).

En *Holdemania filiformis* también se observan bacilos cortos que se disponen en cadenas, sacarolíticos y resistentes a la vancomicina, pero se trata de anaerobios obligados (tablas 2 y 6).

Frente a BGPANE muy pleomórficos, anaerobios obligados, de muy lento crecimiento, catalasa negativos, asacarolíticos e inertes a la mayoría de las pruebas bioquímicas descritas, pensar en *Eubacterium* spp. como *E. brachy*, *E. minutum*, *E. nodatum* (ADH +), *E. saphenum* y *E. sulci*, entre las especies de interés clínico en humanos. *E. limosum*, *E. rectale* y *E. saburreum* fermentan la glucosa e hidrolizan la esculina; *E. tenue* fermenta la glucosa débilmente y *E. yurii* lo hace en forma variable según los aislamientos (tablas 2 y 6).

En la familia *Eubacteriaceae* se encuentra también *Pseudoramibacter alactolyticus*, bioquímicamente muy inerte, ya que solo puede fermentar a la glucosa de forma muy débil. Se caracteriza por su morfología celular compatible con el “vuelo de las aves” (tablas 2 y 6).

La observación de bacilos gram positivos cortos y elípticos, anaerobios obligados, sacarolíticos, inmóviles y negativos frente a las pruebas de catalasa, indol y nitratos induce a pensar en los géneros *Atopobium* y *Olsenella*. Solamente la especie *A. vaginae* es aerotolerante y asacarolítica, pero produce actividad de arginina dihidrolasa y prolina arilamidasa (tablas 1 y 5).

De todos modos, la identificación definitiva de la mayoría de los BGPANE requiere de la confirmación mediante métodos moleculares.

Cromatografía gas-líquido

La detección de alcoholes y ácidos grasos de cadena corta como productos finales del metabolismo bacteriano por cromatografía gas-líquido (CGL) es un procedimiento que fue implementado y muy utilizado en las décadas de los 70 y 80 como procedimiento complementario para la identificación de las bacterias anaerobias^{136, 161}. En nuestro medio, en los años ochenta, Larrinaga A, Predari SC y Frade AH desarrollaron un método rápido y sensible para la identificación de los ácidos grasos libres de cadena lineal o ramificada con dos a siete átomos de carbono mediante el uso de una fase líquida fácilmente obtenible en el país, el ácido sebácico, que hasta ese momento no había sido empleado para estos fines⁹⁵.

Las distintas cepas de una misma especie produjeron idénticos metabolitos principales y secundarios. Así por ejemplo, todos los aislamientos de *Clostridium perfringens* produjeron los ácidos acético y butírico como metabolitos principales y ácido propiónico como metabolito secundario. Las cepas de *Propionibacterium acnes* produjeron grandes cantidades de los ácidos acético y propiónico y no se detectaron metabolitos secundarios. Esto se pudo observar como picos claramente visibles en los cromatogramas respectivos. Si bien es una metodología altamente sensible, específica y rápida, y continúa realizándose con fines de investigación, ha dejado de utilizarse en los laboratorios clínicos por requerir equipamiento e insumos que en nuestro medio son extremadamente costosos.

Sistemas miniaturizados, automatizados y moleculares

Los sistemas miniaturizados de identificación microbiana se basan en el metabolismo de sustratos específicos para la detección de enzimas preformadas y la fermentación de hidratos de carbono; los resultados de las pruebas se obtienen a través de la lectura directa o mediante el uso de reactivos reveladores.

El equipo comercial Rapid ID 32A (API bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francia) para la identificación de bacterias anaerobias consta de una galería multipuebas cuyos resultados se expresan en forma de código numérico de 10 dígitos; cada perfil numérico define una especie determinada. Con este sistema junto a algunas pruebas fenotípicas y a la determinación de los productos metabólicos finales por cromatografía gaseosa se identificaron a nivel de género y especie cepas de origen oral asignadas previamente a *Eubacterium*³⁶. Tanto el equipo nombrado como los similares que existen en el mercado tienen el inconveniente de que las bases de datos son incompletas, inexactas o taxonómicamente no actualizadas; no obstante, son muy útiles como pruebas accesorias para la identificación, sobre todo de microorganismos inertes o poco reactivos a las pruebas convencionales.

En ciertas situaciones, para un bajo número de pruebas enzimáticas pueden usarse tabletas individuales (Rosco Diagnostic Tablets, Dinamarca) en lugar de los equipos comerciales⁸⁵.

Como variante de las galerías multipuebas descritas, se cuenta en el mercado con paneles para la identificación y con otros sistemas que suman la

prueba de sensibilidad, en los cuales la inoculación, incubación y lectura se efectúan de modo automatizado (ej. Vitek-2 ANC de bioMérieux)¹⁰⁶.

Dentro de los métodos proteómicos de identificación bacteriana que abordan el estudio y la caracterización de proteínas, la espectrometría de masa [*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS)] de Bruker Daltonik®, Bremer, Alemania es uno de los más usados. En un estudio local sobre un total de 106 cepas de bacterias anaerobias, Zárate *et al.* obtuvieron una coincidencia global de 95,3 % entre el método convencional y el MALDI-TOF MS, con *scores* > 2 a nivel de género y especie y una concordancia de 100 % para las 37 cepas de bacilos gram positivos anaerobios (esporulados y no esporulados)¹⁷⁹. Hsu *et al.* identificaron 101 aislados anaerobios con una precisión del 99 % a nivel de género y especie, con un *score* ≥ 1,7 y con modificaciones pre y posanalíticas que incluyeron la preparación de la muestra con formol al 100 %⁷⁹. Li *et al.* estudiaron 55 aislados de bacterias anaerobias y compararon las tarjetas del Vitek-2 para corinebacterias y anaerobios con la plataforma MALDI-TOF MS; el método de referencia fue la secuenciación del gen 16S ARNr. Ambos métodos coincidieron en la identificación a nivel de género en un 94 % y en las identificaciones erróneas en un 2 %. Con el Vitek-2 se logró un 86 % en la identificación a nivel de especies versus un 92 % con la plataforma MALDI-TOF MS. No hubo identificación en un 6 % de los aislados con las tarjetas Vitek y en un 4 % con MALDI-TOF MS¹⁰⁶. Los dos aislados clínicos de BGPANE (*C. aerofaciens* y *P. acnes*) fueron correctamente identificados por ambos métodos; una de las cepas control de *L. acidophilus* fue correctamente identificada por la tarjeta Vitek, mientras que solo lo fue a nivel de género con

el método MALDI-TOF. Coltella *et al.* estudiaron 484 aislamientos de bacterias anaerobias de materiales clínicos correspondientes a 318 pacientes pediátricos. La concordancia y sensibilidad determinadas por MALDI-TOF MS para *C. difficile* fue 94,08 % y la especificidad 100 %. Para los otros anaerobios, la sensibilidad y la especificidad fueron de 94,07 % y 81,82 %, respectivamente, con una concordancia de 93,15 %²⁸.

Los sistemas automatizados aportan rapidez y costo-beneficio en el trabajo diario de un laboratorio, pero se debe considerar el costo inicial del equipo. Con respecto a la precisión y, por lo tanto, a la confiabilidad de los resultados (en este caso, las identificaciones), depende de las bases de datos de las cuales dispongan, las que se van enriqueciendo a medida que pasa el tiempo.

Los métodos moleculares se convirtieron en la alternativa de identificación más precisa e incluso el método de referencia para los métodos fenotípicos. Las identificaciones erróneas que se generan por los métodos convencionales en virtud de la diversidad bacteriana son subsanadas por esta metodología.

La dificultad en el aislamiento, el crecimiento lento y la escasa actividad en las pruebas bioquímicas son situaciones en las que está indicado y es particularmente útil recurrir a la identificación mediante los métodos moleculares.

La identificación se basa, fundamentalmente, en el análisis de la secuencia del gen 16S ARNr presente en todas las bacterias y es esta la herramienta más ampliamente utilizada con este tipo de microorganismos.

Las aplicaciones más importantes de las técnicas moleculares se hallan en la identificación de los microorganismos de muy lento desarrollo y de los no cultivables -que constituyen la microbiota normal de las diferentes cavidades/mucosas- así como de los asociados a las infecciones polimicrobianas. Se pueden detectar también factores de virulencia, mecanismos de resistencia y, desde un punto de vista epidemiológico, brotes. Entre las limitaciones se incluye la detección de microorganismos vivos y muertos y que no se puede realizar una prueba de sensibilidad.

Basados en la secuenciación del gen 16S ARNr se han descrito 700 especies bacterianas en la cavidad oral, de las cuales casi un 50 % aún no han sido cultivadas. El *Human Oral Microbe Identification Microarray*, también conocido como HOMIM (disponible en: <http://mim.forsyth.org>) permite la identificación simultánea y rápida de las 400 especies bacterianas prevalentes en las caries y en la enfermedad periodontal¹²⁹.

Mediante la identificación molecular basada en la secuenciación del 16S ADNr, Becker *et al.* detectaron 10 nuevas especies en las caries dentales en niños. Observaron que el hallazgo de *Streptococcus sanguinis* estaba asociado al estado de salud, mientras que la presencia de *Actinomyces gerencseriae*, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus fermentum*, *Streptococcus mutans* y otras especies de estreptococos estaban asociados a las caries⁷.

Los métodos moleculares no solo permiten confirmar la identificación fenotípica de un microorganismo, o detectar parte del genoma de aquellos no cultivables, sino también caracterizar cepas en múltiples aspectos. Así, Tomida *et al.* realizaron el análisis comparativo del genoma de 82 cepas de *P. acnes* que cubrían todos los linajes de la especie, con la inclusión de los tipos IA, IB, II

y III. Las cepas provenían de piel sana, de pieles con acné y de lesiones endodónticas. A partir del análisis del genoma de las cepas realizado por la secuenciación del gen 16S ARNr, se determinó que existe una zona *core* que representa el 88 % de aquel y que es compartido por todas las cepas; el 12 % remanente corresponde a la zona *noncore*, que es variable e involucra a los genes propios y específicos de cada linaje, junto con los genes que codifican factores de virulencia (múltiples lipasas, etc.) y mutaciones que codifican resistencia a los antimicrobianos. De esta manera se pudieron tipificar las cepas asociadas a los estados de enfermedad y de salud, lo cual permitirá en un futuro una terapia adecuada y personalizada¹⁶².

Si el objetivo es alcanzar la identificación de una especie bacteriana de la que no se tiene conocimiento previo y, en última instancia, identificar un nuevo patógeno, el análisis del gen 16S ARNr es la elección más acertada. En la práctica clínica aventaja a una serie de sistemas, como el perfil proteico y de los ácidos grasos celulares, la fermentación de los hidratos de carbono y otras pruebas convencionales, por la rapidez y la mayor precisión. Así, Nakazawa *et al.* realizaron la caracterización de dos nuevos aislados provenientes de la cavidad oral; los organismos eran BGPANE asacarolíticos, inertes a la mayoría de las pruebas bioquímicas y fenotípicamente semejantes a las especies de *Mogibacterium* y *Eubacterium* asacarolíticas. Los estudios de hibridación de ADN-ADN demostraron que los aislados podrían pertenecer a *Mogibacterium*, aunque no se trataba de las tres especies ya validadas, también indistinguibles fenotípicamente¹²². Se propuso a *M. diversum* y a *M. neglectum* como las nuevas especies sobre la base de los datos de las características morfológicas

y de los análisis fenotípicos, genotípicos y filogenéticos, estos últimos determinados a través de la secuenciación del gen 16S ARNr¹²¹.

Sensibilidad a los antimicrobianos

La escasa información que existe en el tema para los bacilos de este grupo podría atribuirse a su baja a moderada patogenicidad, a que son integrantes de la microbiota normal de cavidades y mucosas, a que frecuentemente se recuperan de cultivos mixtos y a que muchos de ellos son de lento crecimiento. Los cambios taxonómicos periódicos promueven, asimismo, cambios en los perfiles de sensibilidad.

Tradicionalmente el metronidazol es considerado el antimicrobiano de elección para el tratamiento de las infecciones por bacterias anaerobias; sin embargo, es inactivo para la mayoría de los BGPANE. La emergencia de sensibilidad disminuida o resistencia a esta droga también ha sido documentada en los anaerobios gram negativos y en los cocos y bacilos gram positivos esporulados^{71, 110, 131, 160}. Las especies anaerobias facultativas de *Actinobaculum*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Propionibacterium* son intrínsecamente resistentes al metronidazol y también presentan resistencia a esta droga algunas cepas de los géneros anaerobios estrictos *Atopobium*, *Collinsella*, *Eggerthella* y *Mobiluncus*. *Actinomyces israelii* y *Actinomyces hongkongensis* muestran CIM de metronidazol > 256 µg/ml^{20, 44, 50, 75, 104, 112, 117}.

La actividad de los β-lactámicos, las combinaciones de los β-lactámicos con inhibidores de β-lactamasas y los carbapenems está conservada frente a la mayoría de los BGPANE^{54, 56, 58, 71, 75}. Para ciertos géneros como *Actinomyces* y

Propionibacterium, los β -lactámicos solos o combinados con los inhibidores de β -lactamasas constituyen el tratamiento de primera elección^{112, 149}. Se ha descrito resistencia a penicilina en algunos géneros: hasta un 5 % en *Collinsella*, 7 % en *Bifidobacterium*, 14,3 % en *Eubacterium* y 46,7 % en *Eggerthella*¹¹².

La vancomicina, pese a ser uniformemente activa frente a la mayoría de los microorganismos gram positivos, es inactiva frente a algunas especies de *Lactobacillus*; el principal interés de la resistencia a vancomicina se focaliza en *Lactobacillus rhamnosus*, ya que es una de las especies más frecuentemente aisladas, y en *L. rhamnosus* GG, utilizado como probiótico^{14, 43, 141}. Otro de los antimicrobianos históricamente administrado para el tratamiento de procesos infecciosos por anaerobios es la clindamicina. Al menos en este grupo de organismos, la resistencia es poco frecuente, con valores que alcanzan el 12,2 % y 17,8 % en *Propionibacterium* spp. y *Actinomyces* spp., respectivamente^{20, 41, 45, 112, 127}.

Entre las fluoroquinolonas, la moxifloxacinina comparada con la ciprofloxacina y la levofloxacina es la que posee mayor actividad frente a las bacterias anaerobias; su amplio espectro de acción indica que puede ser efectiva para el tratamiento de infecciones polimicrobianas^{41, 59}. En *A. israelii* y otras *Actinomyces* spp. provenientes de infecciones endodónticas se determinó una CIM₉₀ de moxifloxacina = 0,5 $\mu\text{g/ml}$ ¹⁰⁴.

La ramoplanina y la telavancina, nuevos agentes alternativos para microorganismos resistentes a la vancomicina, mostraron mejor actividad frente a los lactobacilos comparadas con esta última. La telavancina demostró ser muy activa frente a varios géneros de BGPANE con la excepción de

Lactobacillus casei^{20, 45, 47, 54}. Contrariamente, con linezolid se observó una actividad variable y la ranbezolida tuvo una mejor actividad antianaerobia *in vitro*^{20, 42}. La pristinamicina y la quinupristina-dalfopristina también exhiben buena actividad frente a la mayoría de los miembros del grupo⁵⁶.

La tigeciclina mostró muy buena actividad *in vitro* en un estudio comparativo que incluyó cepas de *Actinomyces* y de *Lactobacillus*⁵⁷.

Frente a un BGPANE clínicamente significativo que se aísla en flora pura, o cuando proviene de un cultivo mixto, pero de un proceso grave y que requiere largo tratamiento, en principio es importante lograr una identificación confiable. Si el proceso compromete localizaciones normalmente estériles como sangre y LCR, o existen abscesos de cerebro, pulmón, hígado, etc., se recomienda la realización de alguna prueba de sensibilidad a los antibióticos considerados de elección, como por ejemplo, mediante las tiras con gradiente de concentración (Etest o similares) o el método de elución con discos. Los antibióticos primariamente útiles que deberán probarse son penicilina, clindamicina y vancomicina. Otros antimicrobianos como tigeciclina, moxifloxacina y combinaciones de β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas deberán ser tenidos en cuenta frente a los microorganismos anteriormente descritos y, sobre todo, en infecciones mixtas^{21, 23, 71, 105}.

Cuando se realizan estudios de vigilancia de los perfiles de sensibilidad de un cierto número de cepas de BGPANE, el método de elección y de referencia es la dilución en agar que utiliza agar Brucella adicionado de vitamina K1 (1 μ g/ml), hemina (5 μ g/ml) y sangre lacada de oveja al 5 % v/v. El inóculo es de 10^5 UFC/ml y la incubación es a $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 horas. Cepas controles: *Clostridium difficile* ATCC® 700057 o *Eubacterium lentum* ATCC®

43055 (actualmente *Eggerthella lenta*). Mínimamente, los antimicrobianos que se deben ensayar son los siguientes: penicilina o ampicilina, ampicilina-sulbactama, piperacilina-tazobactama, ertapenem, imipenem, meropenem, clindamicina, metronidazol y moxifloxacina²⁴.

Bibliografía

1. Aas JA, Dardis SR, Griffen AL, Stokes LN, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, Leys EJ, Paster BJ. Most of the microbiota in caries has not yet been cultivated. *J Dent Res*. 2005;84(Supl A):resumen 2805.
2. Abgrall S, Joly V, Derkinderen P, Decre D, Carbon C, Yeni P. *Lactobacillus casei* infection in an AIDS patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1997;16:180-2.
3. Allen-Vercoe E, Daigneault M, White A, Panaccione R, Duncan SH, Flint HJ, O'Neal L, Lawson PA. *Anaerostipes hadrus* comb. nov., a dominant species within the human colonic microbiota; reclassification of *Eubacterium hadrum* Moore et al. 1976. *Anaerobe*. 2012;18:523-9.
4. An HM, Lee DK, Kim JR, Lee SW, Cha MK, Lee KO, Ha NJ. Antiviral activity of *Bifidobacterium adolescentis* SPM 0214 against Herpes Simplex Virus Type 1. *Arch Pharm Res*. 2012;35:1665-71.
5. Angelakis E, Roux V, Raoult D, Drancourt M. Human case of *Atopobium rimaе* bacteremia. *Emerg Infect Dis*. 2009;15:354-5.
6. Barberis CM, Cittadini RM, Almuzara MN, Feinsilberg A, Famiglietti AM, Ramírez MS, Vay CA. Recurrent urinary infection with *Bifidobacterium scardovii*. *J Clin Microbiol*. 2012;50:1086-8.
7. Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, BochesSK, Dewhirst FE, Griffen AL. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol*. 2002;40:1001-9.
8. Biavati B, Mattarelli P. Genus *Bifidobacterium*. En: Whitman W, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Ludwig W, Suzuki K-i, editores. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition, volume 5. The *Actinobacteria*, Part A. New York, Springer, 2012, p. 171-206.
9. Bosshard PP, Zbinden R, Altwegg M. *Turicibacter sanguinis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, gram-positive bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2002;52:1263-6.

10. Brailsford SR, Tregaskis RB, Leftwich HS, Beighton D. The predominant *Actinomyces* spp. isolated from infected dentin of active root caries lesions. *J Dent Res.* 1999;78:1525-34.
11. Brook I. Isolation of non-sporing anaerobic rods from infections in children. *J Med Microbiol.* 1996;45:21-6.
12. Brook I. Pericarditis caused by anaerobic bacteria. *Int J Antimicrob Agents.* 2009;33:297-300.
13. Byun R, Nadkarni MA, Chhour K-L, Martin FE, Jacques NJ, Hunter N. Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. *J Clin Microbiol.* 2004;42:3128-36.
14. Cannon JP, Lee TA, Bolanos JT, Danziger LH. Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005;24:31-40.
15. Carlier JP, Bedora-Faure M, K'ouas G, Alauzet C, Mory F. Proposal to unify *Clostridium orbiscindens* Winter et al. 1991 and *Eubacterium plautii* (Seguin 1928) Hofstad and Aasjord 1982, with description of *Flavonifractor plautii* gen. nov., comb. nov., and reassignment of *Bacteroides capillosus* to *Pseudoflavonifractor capillosus* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010;60:585-90.
16. Carlier JP, K'ouas G, Bonne I, Lozniewski A, Mory F. *Oribacterium sinus* gen. nov., sp. nov., within the family 'Lachnospiraceae' (phylum Firmicutes). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004;54:1611-5.
17. Carlier JP, K'ouas G, Han XY. *Moryella indoligenes* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium isolated from clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007;57:725-9.
18. Cato EP, Moore WEC, Nygaard G, Holdeman LV. *Actinomyces meyeri* sp. nov. specific epithet rev. *Int J Syst Bacteriol.* 1984;34:487-9.
19. Chenoll E, Casinos B, Bataller E, Astals P, Echevarría J, Iglesias JR, Balbarie P, Ramón D, Genové S. Novel probiotic *Bifidobacterium bifidum* CECT 7366 strain active against the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77:1335-43.
20. Citron DM, Merriam CV, Tyrrell KL, Warren YA, Fernandez H, Goldstein EJC. *In vitro* activities of ramoplanin, teicoplanin, vancomycin, linezolid, bacitracin, and four other

- antimicrobials against intestinal anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:2334-8.
21. Citron DM, Ostovari MI, Karlson A, Goldstein EJC. Evaluation of the Etest for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol.* 1991;29:2197-203.
 22. Clavel T, Lippman R, Gavini F, Dore J, Blaut M. *Clostridium saccharogumia* sp. nov. and *Lactonifactor longoviformis* gen. nov., sp. nov., two novel human faecal bacteria involved in the conversion of the dietary phytoestrogen secoisolariciresinol diglucoside. *Syst Appl Microbiol.* 2007;30:16-26.
 23. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria.* 7th ed. Approved Standard, 2007; M11-A7. Wayne, PA, EE.UU.
 24. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 24th Informational Supplement,* 2014; M100-S24. Wayne, PA, EE.UU.
 25. Coenye T, Peeters E, Nelis HJ. Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is associated with increased resistance to antimicrobial agents and increased production of putative virulence factors. *Res Microbiol.* 2007;158:386-92.
 26. Collins MD, Phillips BA, Zannoni P. Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1989;39:105-8.
 27. Collins MD, Wallbanks S. Comparative sequence analyses of the 16S rRNA genes of *Lactobacillus minutus*, *Lactobacillus rimae* and *Streptococcus parvulus*" Proposal for the creation of a new genus *Atopobium*. *FEMS Microbiol Lett.* 1992; 95:235-40.
 28. Coltella L, Mancinelli L, Onori M, Lucignano B, Menichella D, Sorge R, Raponi M, Mancini R, Russo C. Advancement in the routine identification of anaerobic bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013;32:1183-92.
 29. Crociani F, Biavati B, Alessandrini A, Chiarini C, Scardovi V. *Bifidobacterium inopinatum* sp.nov., and *Bifidobacterium denticolens* sp.nov., two new species isolated from human dental caries. *Int J Syst Bacteriol.* 1996;46:564-71.

30. Curk M-C, Hubert J-C, Bringel F. *Lactobacillus paraplantarum* sp. nov., a new species related to *Lactobacillus plantarum*. Int J Syst Bacteriol. 1996;46:595-8.
31. de Moreno de LeBlanc A, Castillo NA, Perdigón G. Anti-infective mechanisms induced by a probiotic *Lactobacillus* strain against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. Int J Food Microbiol. 2010;138:223-31.
32. Dewhirst FE, Paster BJ, Tzellas N, Coleman B, Downes J, Spratt DA, Wade WG. Characterization of novel human oral isolates and cloned 16S rDNA sequences that fall in the family *Coriobacteriaceae*: description of *Olsenella* gen. nov., reclassification of *Lactobacillus uli* as *Olsenella uli* comb. nov. and description of *Olsenella profusa* sp. nov.. Int J Syst Evol Microbiol. 2001;51:1797-804.
33. Domínguez González KN, Cruz Guerrero AE, González Márquez H, Gómez Ruiz LC, García-Garibay M, Rodríguez Serrano GM. El efecto antihipertensivo de las leches fermentadas. Rev Argent Microbiol. 2014;46:58-65.
34. Downes J, Mantzourani M, Beighton D, Hooper S, Wilson MJ, Nicholson A, Wade WG. *Scardovia wiggisiae* sp. nov., isolated from the human oral cavity and clinical material, and emended descriptions of the genus *Scardovia* and *Scardovia inopinata*. Int J Syst Evol Microbiol. 2011;61:25-9.
35. Downes J, Munson MA, Radford DR, Spratt DA, Wade WG. *Shuttleworthia satelles* gen. nov., sp. nov., isolated from the human oral cavity. Int J Syst Evol Microbiol. 2002;52:1469-75.
36. Downes J, Munson MA, Spratt DA, Kononen E, Tarkka E, Jousimies-Somer H, Wade WG. Characterisation of *Eubacterium*-like strains isolated from oral infections. J Med Microbiol. 2001;50:947-51.
37. Downes J, Olsvik B, Hiom SJ, Spratt DA, Cheeseman SL, Olsen I, Weightman AJ, Wade WG. *Bulleidia extracta* gen. nov., sp. nov., isolated from the oral cavity. Int J Syst Evol Microbiol. 2000;50:979-83.
38. Downes J, Wade WG. *Propionibacterium acidifaciens* sp. nov., isolated from the human mouth. Int J Syst Evol Microbiol. 2009;59:2778-81.

39. Duncan SH, Hold GL, Barcenilla A, Stewart CS, Flint HJ. *Roseburia intestinalis* sp. nov., a novel saccharolytic, butyrate-producing bacterium from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002;52:1615-20.
40. Duncan SH, Hold GL, Harmsen HJM, Stewart CS, Flint HJ. Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002;52:2141-6.
41. Edmiston CE, Krepel CJ, Seabrook GR, Somberg LR, Nakeeb A, Cambria RA, Towne JB. *In vitro* activities of moxifloxacin against 900 aerobic and anaerobic surgical isolates from patients with intra-abdominal and diabetic foot infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:1012-6.
42. Ednie LM, Rattan A, Jacobs MR, Appelbaum PC. Antianaerobe activity of RBX 7644 (ranbezolid), a new oxazolidinone, compared with those of eight other agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:1143-7.
43. Felten A, Barreau C, Bizet C, Lagrange PH, Philippon A. *Lactobacillus* species identification, H₂O₂ production, and antibiotic resistance and correlation with human clinical status. *J Clin Microbiol.* 1999;37:729-33.
44. Ferris MJ, Maszta A, Aldridge KE, Fortenberry J, Fidel Jr PL, Martin DH. Association of *Atopobium vaginae*, a recently described metronidazole resistant anaerobe, with bacterial vaginosis. *BMC Infect Dis.* 2004;4:5.
45. Finegold SM, Bolanos M, Sumannen PH, Molitoris DR. *In vitro* activities of telavancin and six comparator agents against anaerobic bacterial isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:3996-4001.
46. Finegold SM, George WL, Mulligan ME. Anaerobic Infections Part I. *Dis Mon.* 1985;31(10):1-77.
47. Finegold SM, George WL, Mulligan ME. Anaerobic Infections Part II. *Dis Mon.* 1985;31(11):1-97.
48. Finegold SM, Lawson PA, Vaisanen M-L, Molitoris DR, Song Y, Liu C, Collins MD. *Anaerofustis stercorihominis* gen. nov., sp. nov., from human feces. *Anaerobe.* 2004;10:41-5.

49. Finegold SM, St. John S, Vu AW, Li CM, Molitoris D, Song Y, Liu C, Wexler HM. *In vitro* activity of ramoplanin and comparator drugs against anaerobic intestinal bacteria from the perspective of potential utility in pathology involving bowel flora. *Anaerobe*. 2004;10:205-11.
50. Flynn AN, Lyndon CA, Church DL. Identification by 16S rRNA gene sequencing of an *Actinomyces hongkongensis* isolate recovered from a patient with pelvic actinomycosis. *J Clin Microbiol*. 2013;51:2721-3.
51. Foxman B, Wen A, Srinivasan U, Goldberg D, Marrs CF, Owen J, Wing DA, Misra D. *Mycoplasma*, bacterial vaginosis-associated bacteria BVAB3, race, and risk of preterm birth in a high-risk cohort. *Am J Obstet Gynecol*. 2014;210:226.e1-7.
52. Gaón D, García H, Winter L, Rodríguez N, Quintás R, González SN, Oliver G. Effect of *Lactobacillus* strains and *Saccharomyces boulardii* on persistent diarrhea in children. *Medicina*. 2003;63:293-8.
53. Ghosh M, Talwani R, Gillian BL. *Propionibacterium* skull osteomyelitis treated with daptomycin. *Clin Neurol Neurosurg*. 2009;111:610-2.
54. Goldstein EJC, Citron DM, Merriam CV, Warren YA, Fernandez HT. *In vitro* activities of the new semisynthetic glycopeptide telavancin (TD-6424), vancomycin, daptomycin, linezolid, and four comparator agents against anaerobic gram-positive species and *Corynebacterium* spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:2149-52.
55. Goldstein EJC, Citron DM, Merriam CV, Warren YA, Tyrrell KL, Fernandez H. Comparative *in vitro* activity of ertapenem and 11 other antimicrobial agents against aerobic and anaerobic pathogens isolated from skin and soft tissue animal and human bite wound infections. *J Antimicrob Chemother*. 2001;48:641-51.
56. Goldstein EJC, Citron DM, Merriam CV, Warren YA, Tyrrell KL, Fernandez HT, Bryskier A. Comparative *in vitro* activities of XRP 2868, pristinamycin, quinupristin-dalfopristin, vancomycin, daptomycin, linezolid, clarithromycin, telithromycin, clindamycin, and ampicillin against anaerobic gram-positive species, actinomycetes, and lactobacilli. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:408-13.

57. Goldstein EJC, Citron DM, Merriam CV, Warren YA, Tyrrell KL, Fernandez HT. Comparative *in vitro* susceptibilities of 396 unusual anaerobic strains to tigecycline and eight other antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:3507-13.
58. Goldstein EJC, Citron DM, Tyrrell KL, Merriam CV. *In vitro* activity of biapenem plus RPX7009, a carbapenem combined with a serine β -lactamase inhibitor, against anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:2620-30.
59. Goldstein EJC, Citron DM, Warren YA, Tyrrell KL, Merriam CV, Fernandez H. *In vitro* activity of moxifloxacin against 923 anaerobes isolated from human intra-abdominal infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:148-55.
60. Goupil R, Nadeau-Fredette AC, Tennankore KK, Bargman JM. Peritonitis caused by *Veillonella* species and *Eggerthella lentain* peritoneal dialysis. *Perit Dial Int.* 2014;34:245-7.
61. Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9:244-53. doi:10.1038/nrmicro2537.
62. Gueimonde M, Ouwehand A, Huhtinen H, Salminen E, Salminen S. Qualitative and quantitative analyses of the bifidobacterial microbiota in the colonic mucosa of patients with colorectal cancer, diverticulitis and inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2007;13:3985-9.
63. Hall V, Collins MD, Hutson R, Falsen E, Duerden BI. *Actinomyces cardiffensis* sp. nov. from human clinical sources *J Clin Microbiol.* 2002;40: 3427–31.
64. Hall V, Collins MD, Hutson RA, Falsen E, Inganas E, Duerden BI. *Actinobaculum urinale* sp. nov., from human urine. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003;53:679-82.
65. Hall V, Collins MD, Lawson PA, Falsen E, Duerden BI. *Actinomyces dentalis* sp. nov., from a human dental abscess. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2005;55:427-31.
66. Hall V, Collins MD, Lawson PA, Falsen E, Duerden BI. *Actinomyces nasicola* sp. nov., isolated from a human nose. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003;53:1445-8.
67. Hall V, Collins MD, Lawson PA, Hutson RA, Falsen E, Inganas E, Duerden B. Characterization of some *Actinomyces*-like isolates from human clinical sources: description of *Varibaculum cambriensis* gen. nov., sp. nov. *J Clin Microbiol.* 2003;41:640-4.

68. Hall V. *Actinomyces*-Gathering evidence of human colonization and infection. *Anaerobe*. 2008;14:1-7.
69. Hammes WP, Hertel C. Genus *Lactobacillus*. En: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K-H, Whitman WB, editores. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition, volume 3. The *Firmicutes*. New York, Springer, 2009, p. 465-511.
70. Hashimura T, Sato M, Hoshino E. Detection of *Slackia exigua*, *Mogibacterium timidum*, and *Eubacterium saphenum* from pulpal and periradicular samples using the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. *Int Endod J*. 2001;34:463-70.
71. Hecht DW. Anaerobes: Antibiotic resistance, clinical significance, and the role of susceptibility testing. *Anaerobe*. 2006;12:115-21.
72. Hill GB, Ayers OM, Kohan AP. Characteristics and sites of infection of *Eubacterium nodatum*, *Eubacterium timidum*, *Eubacterium brachy*, and other asaccharolytic eubacteria. *J Clin Microbiol*. 1987;25:1540-5.
73. Hill GB. *Eubacterium nodatum* mimics *Actinomyces* in intrauterine device associated-infections and other settings within the female genital tract. *Obstet Gynecol*. 1992;79:534-8.
74. Hineostroza F, Djurkovic S, Bourbeau PP, Foltzer MA. *Propionibacterium acnes* as a cause of prosthetic valve aortic root abscess. *J Clin Microbiol*. 2007; 45:259-61.
75. Hoellman DB, Kelly LM, Credito K, Anthony L, Ednie LM, Jacobs MR, Appelbaum PC. *In vitro* antianaerobic activity of ertapenem (MK-0826) compared to seven other compounds. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:220-4.
76. Holdeman LV, Cato EP, Moore WEC, editores. *Anaerobe Laboratory Manual*, 4th edition. Blacksburg, Virginia Polytechnic Institute and State University, 1977, p. 63-7.
77. Holmberg A, Lood R, Morgelin M, Soderquist B, Holst E, Collin M, Christensson B, Rasmussen M. Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is a characteristic of invasive isolates. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15:787-95.
78. Hoyles L, McCartney AL. Genus *Mobiluncus*. En: Whitman W, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Ludwig W, Suzuki K-i, editores. *Bergey's Manual of Systematic*

- Bacteriology, 2nd edition, volume 5. The *Actinobacteria*, Part A. New York, Springer, 2012, p. 126-38.
79. Hsu Y-M S, Burnham C-A D. MALDI-TOF MS identification of anaerobic bacteria: assessment of pre-analytical variables and specimen preparation techniques. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;79:144-8.
80. Huys G, Vancanneyt M, D'Haene K, Falsen E, Wauters G, Vandamme P. *Alloscardovia omnicolens* gen. nov., sp. nov., from human clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2007;57:1442-6.
81. Jabib A, Ferreiro J, Chappe M, Albin M. Actinomycosis pélvica: dificultades diagnósticas. *Arch Gin Obstet*. 2008; 46: 69-99.
82. Jalava J, Eerola E. Phylogenetic analysis of *Fusobacterium alocis* and *Fusobacterium sulci* based on 16s rRNA gene sequences: proposal of *Filifactor alocis* (Cato, Moore and Moore) comb. nov. and *Eubacterium sulci* (Cato, Moore and Moore) comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1999;49:1375-9.
83. Jian W, Dong X. Transfer of *Bifidobacterium inopinatum* and *Bifidobacterium denticolens* to *Scardovia inopinata* gen. nov., comb. nov., and *Parascardovia denticolens* gen. nov., comb. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2002;52:809-12.
84. Jin J-S, Kitahara M, Sakamoto M, Hattori M, Benno Y. *Slackia equolifaciens* sp. nov., a human intestinal bacterium capable of producing equol. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010;60:1721-4.
85. Jousimies-Somer HR, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler HM, Finegold SM. *Wadsworth-KTL Anaerobic Bacteriology Manual*, 6th edition. Star Publishing, Belmont, California, 2002, p. 114-27.
86. Kageyama A, Benno Y, Nakase T. Phylogenetic and phenotypic evidence for the transfer of *Eubacterium aerofaciens* to the genus *Collinsella* as *Collinsella aerofaciens* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1999;49:557-65.
87. Kageyama A, Benno Y, Nakase T. Phylogenetic evidence for the transfer of *Eubacterium lentum* to the genus *Eggerthella* as *Eggerthella lenta* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1999;49:1725-32.

88. Kageyama A, Benno Y. *Catenibacterium mitsuokai* gen. nov., sp. nov., a gram-positive anaerobic bacterium isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000;50:1595-9.
89. Kageyama A, Benno Y. Emendation of genus *Collinsella* and proposal of *Collinsella stercoris* sp. nov. and *Collinsella intestinalis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000;50:1767-74.
90. Kageyama A, Benno Y. Phylogenic and phenotypic characterization of some *Eubacterium*-like isolates from human feces: description of *Solobacterium moorei* gen. nov., sp. nov. *Microbiol Immunol.* 2000;44:223-7.
91. Kelleher AT, Gordon SM. Management of bite wounds and infection in primary care. *Cleve Clin J Med.* 1997;64:137-41.
92. Knoester M, Lashley LELO, Wessels E, Oepkes D, Kuijper EJ. First report of *Atopobium vaginae* bacteremia with fetal loss after chorionic villus sampling. *J Clin Microbiol.* 2011;49:1684-6.
93. Kochan P, Chmielarczyk A, Szymaniak L, Brykczynski M, Galant K, Zych A, Pakosz K, Giedrys-Kalemba S, Lenouvel E, Heczko PB. *Lactobacillus rhamnosus* administration causes sepsis in a cardiosurgical patient-is the time right to revise probiotic safety guidelines? *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:1589-92.
94. Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. New Bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res.* 2003;82:338-44.
95. Larrinaga A, Predari SC, Frade AH. Uso del ácido sebáico en la identificación de bacterias anaerobias por cromatografía en fase gaseosa (CGL). *Rev Argent Microbiol.* 1989;21:55-61.
96. Lau SKP, McNabb A, Woo GKS, Hoang L, Fung AMY, Chung LMW, Woo PCY, Yuen K-Y. *Catabacter hongkongensis* gen. nov., sp. nov., isolated from blood cultures of patients from Hong Kong and Canada. *J Clin Microbiol.* 2007;45:395-401.
97. Lau SKP, Woo PCY, Fung AMY, Chan K-M, Woo GKS, Yuen K-Y. Anaerobic, non-sporulating, gram-positive bacilli bacteraemia characterized by 16S rRNA gene sequencing. *J Med Microbiol.* 2004;53:1247-53.

98. Lau SKP, Woo PCY, Woo GKS, Fung AMY, Wong MKM, Chan K-M, Tam DMW, Yuen K-Y. *Eggerthella hongkongensis* sp. nov. and *Eggerthella sinensis* sp. nov., two novel *Eggerthella* species, account for half of the cases of *Eggerthella* bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004;49:255-63.
99. Lawson PA, Falsen E, Kervall E, Vandamme P, Collins MD. Characterization of some *Actinomyces*-like isolates from human clinical specimens: reclassification of *Actinomyces suis* (Soltys and Spratling) as *Actinobaculum suis* comb. nov. and description of *Actinobaculum schaalii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1997;47:899-903.
100. Lawson PA, Song Y, Liu C, Molitoris DR, Vaisanen M-L, Collins MD, Finegold SM. *Anaerotruncus colihominis* gen. nov., sp. nov., from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004;54:413-7.
101. Lawson PA. Genus *Actinobaculum*. En: Whitman W, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Ludwig W, Suzuki K-i, editores. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition, volume 5. *The Actinobacteria*, Part A. New York, Springer, 2012, p. 109-14.
102. Lawson PA. Genus *Anaerotruncus*. En: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K-H, Whitman WB, editores. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition, volume 3. *The Firmicutes*. New York, Springer, 2009, p. 1023-5.
103. Lazar V. Quorum sensing in biofilms - How to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power? *Anaerobe*. 2011;17:280-5.
104. LeCorn DW, Vertucci FJ, Rojas MF, Progulsk-Fox A, Bélanger M. *In vitro* activity of amoxicillin, clindamycin, doxycycline, metronidazole, and moxifloxacin against oral *Actinomyces*. *J Endod*. 2007;33:557-60.
105. Legaria MC, Bianchini HM, Castello L, Carloni G, Di Martino A, Fernández Canigia L, Litterio Mirta, Rollet R, Rossetti A, Predari SC. Primer consenso argentino para el estudio de la sensibilidad *in vitro* a los antimicrobianos de las bacterias anaerobias de importancia clínica en humanos. *Rev Argent Microbiol*. 2011;43:51-66.
106. Li Y, Gu B, Liu G, Xia W, Fan K, Mei Y, Huang P, Pan S. MALDI-TOF MS versus VITEK 2 ANC card for identification of anaerobic bacteria. *J Thorac Dis*. 2014;6:517-23.

107. Liderot K, Larsson M, Borang S, Ozenci V. Polymicrobial bloodstream infection with *Eggerthella lenta* and *Desulfovibrio desulfuricans*. J Clin Microbiol. 2010;48:3810-12.
108. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. LPSN bacterio.net. [On-line]<http://www.bacterio.net> . Última consulta, 31 de julio de 2014.
109. Lodes MJ, Secrist H, Benson DR, Jen S, Shanebeck KD, Guderian J, Maisonneuve J-F, Bhatia A, Persing D, Patrick S, Skeiky YAW. Variable expression of immunoreactive surface proteins of *Propionibacterium acnes*. Microbiology. 2006;152:3667-81.
110. Lofmark S, Fang H, Hedberg M, Edlund C. Inducible metronidazole resistance and *nim* genes in clinical *Bacteroides fragilis* group isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:1253-6.
111. Mahlen SD, Clarridge III JE. Site and clinical significance of *Alloscardovia omnicoles* and *Bifidobacterium* species isolated in the clinical laboratory. J Clin Microbiol. 2009;47:3289-93.
112. Marchand-Austin A, Rawte P, Toye B, Jamieson FB, Farrell DJ, Patel SN. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of anaerobic bacteria in Ontario, 2010-2011. Anaerobe. 2014;28:120-5.
113. Maritato A, Basso B, Belchior S, Castillo M C, De Mier C, Di Bartolomeo S, Fornaris M, Fosch S, Hasuoka R, Hug S, Lorenzón M Á, Mónaco L, Morales A, Perazzi B, Picoli L I, Ruiz Holgado A, Roldán L, Salomón C, Santanatoglia S, Sparo M, Sutich E, Valentini P, Varone A. Manual de procedimiento BACOVA 2012. [On-line] <http://www.abonline.org.ar/2012%20Manual%20Procedimiento%20BACOVA.pdf>. Consultado en junio 2014.
114. Maruo T, Sakamoto M, Ito C, Toda T, Benno Y. *Adlercreutzia equolifaciens* gen. nov., sp. nov., an equol-producing bacterium isolated from human faeces, and emended description of the genus *Eggerthella*. Int J Syst Evol Microbiol. 2008;58:1221-7.
115. Marvaud J-C, Mory F, Lambert T. *Clostridium clostridioforme* and *Atopobium minutum* clinical isolates with VanB-type resistance in France. J Clin Microbiol. 2011;49:3436-8.
116. McDowell A, Barnard E, Nagy I, Gao A, Tomida S, Li H, Eady A, Cove J, Nord CE, Patrick S. An expanded multilocus sequence typing scheme for *Propionibacterium*

- acnes*: investigation of 'pathogenic', 'commensal' and antibiotic resistant strains. 2012. PLoS ONE 7(7): e41480. doi:10.1371/journal.pone.0041480.
117. Meltzer MC, Desmond RA, Schwebke JR. Association of *Mobiluncus curtisii* with recurrence of bacterial vaginosis. Sex Transm Dis. 2008;35:611-3.
118. Munson MA, Banerjee A, Watson TF, Wade WG. Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. J Clin Microbiol. 2004;42:3023-9.
119. Nagai F, Watanabe Y, Morotomi M. *Slackia piriformis* sp. nov. and *Collinsella tanakaei* sp. nov., new members of the family *Coriobacteriaceae*, isolated from human faeces. Int J Syst Evol Microbiol. 2010;60:2639-46.
120. Nakazawa F, Poco SE, Ikeda T, Sato M, Kalfas S, Sundqvist G, Hoshino E. *Cryptobacterium curtum* gen. nov., sp. nov., a new genus of gram-positive anaerobic rod isolated from human oral cavities. Int J Syst Bacteriol. 1999;49:193-200.
121. Nakazawa F, Poco SE, Sato M, Ikeda T, Kalfas S, Sundqvist G, Hoshino E. Taxonomic characterization of *Mogibacterium diversum* sp. nov. and *Mogibacterium neglectum* sp. nov., isolated from human oral cavities. Int J Syst Evol Microbiol. 2002;52:115-22.
122. Nakazawa F, Sato M, Poco SE, Hashimura T, Ikeda T, Kalfas S, Sundqvist G, Hoshino E. Description of *Mogibacterium pumilum* gen. nov., sp. nov. and *Mogibacterium vescum* gen. nov., sp. nov., and reclassification of *Eubacterium timidum* (Holdeman et al. 1980) as *Mogibacterium timidum* gen. nov., comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2000; 50:679-88.
123. Neef PA, Polenakovik H, Clarridge JE, Saklayen M, Bogard L, Bernstein JM. *Lactobacillus paracasei* continuous ambulatory peritoneal dialysis-related peritonitis and review of the literature. J Clin Microbiol. 2003;41:2783-4.
124. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. J Clin Microbiol. 1991;29:297-301.
125. Oki K, Kudo Y, Watanabe K. *Lactobacillus saniviri* sp. nov. and *Lactobacillus senioris* sp. nov., isolated from human faeces. Int J Syst Evol Microbiol. 2012;62:601-7.
126. Olsen I, Johnson JL, Moore LVH, Moore WEC. *Lactobacillus uli* sp. nov. and *Lactobacillus rimae* sp. nov. from the human gingival crevice and emended descriptions

- of *Lactobacillus minutus* and *Streptococcus parvulus*. Int J Syst Bacteriol. 1991;41:261-6.
127. Pankuch GA, Appelbaum PC. Activities of tizoxanide and nitazoxanide compared to those of five other thiazolides and three other agents against anaerobic species. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:1112-7.
128. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Plaque bacterial diversity in human subgingival. J Bacteriol. 2001;183:3770-83.
129. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. Periodontol 2000. 2006;42:80-7.
130. Patrick S, McDowell A. Genus *Propionibacterium*. En: Whitman W, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Ludwig W, Suzuki K-i, editores. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition, volume 5. The *Actinobacteria*, Part B. New York, Springer, 2012, p. 1138-5.
131. Peláez T, Alcalá L, Alonso R, Martín-López A, García-Arias V, Marín M, Bouza E. *In vitro* activity of ramoplanin against *Clostridium difficile*, including strains with reduced susceptibility to vancomycin or with resistance to metronidazole. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:1157-9.
132. Pérez Chaia A, Zárate G, Oliver G. The probiotic properties of propionibacteria. *Lait*. 1999;79:175-85.
133. Poonam, Pophaly SD, De S, Singh R, Tomar SK. Multifaceted attributes of dairy propionibacteria: a review. World J Microbiol Biotechnol. 2012. DOI 10.1007/s11274-012-1117-z.
134. Pulverer G, Schutt-Gerowitt H, Schaal K. Human cervicofacial actinomycoses: microbiological data for 1997 cases. Clin Infect Dis. 2003;37:490-7.
135. Ramage G, Tunney MM, Patrick S, Gorman SP, Nixon JR. Formation of *Propionibacterium acnes* biofilms on orthopaedic biomaterials and their susceptibility to antimicrobials. Biomaterials. 2003;24:3221-7.
136. Rizzo AF. Rapid gas-chromatographic method for identification of metabolic products of anaerobic bacteria. J Clin Microbiol. 1980;11:418-21.

137. Roças IN, Siqueira Jr JF. Species-directed 16S rRNA gene nested PCR detection of *Olsenella* species in association with endodontic diseases. *Lett Appl Microbiol.* 2005;41:12-6.
138. Rodriguez Jovita M, Collins MD, Sjoden B, Falsen E. Characterization of a novel *Atopobium* isolate from the human vagina: description of *Atopobium vaginae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1999;49:1573-6.
139. Roos S, Engstrand L, Jonsson H. *Lactobacillus gastricus* sp. nov., *Lactobacillus antri* sp. nov., *Lactobacillus kalixensis* sp. nov. and *Lactobacillus ultunensis* sp. nov., isolated from human stomach mucosa. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2005;55:77-82.
140. Sahuquillo-Arce JM, Ramirez-Galleymore P, Garcia J, Marti V, Arizo D. *Mobiluncus curtisii* bacteremia. *Anaerobe.* 2008;14:123-4.
141. Salminen MK, Rautelin H, Tynkkynen S, Poussa T, Saxelin M, Valtonen V, Jarvinen A. *Lactobacillus* bacteremia, clinical significance, and patient outcome, with special focus on probiotic *L. rhamnosus* GG. *Clin Infect Dis.* 2004;38:62-9.
142. Salvetti E, Felis GE, Dellaglio F, Castioni A, Torriani S, Lawson PA. Reclassification of *Lactobacillus catenaformis* (Eggerth 1935) Moore and Holdeman 1970 and *Lactobacillus vitulinus* Sharpe et al. 1973 as *Eggerthia catenaformis* gen. nov., comb. nov. and *Kandleria vitulina* gen. nov., comb. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2011;61:2520-4.
143. Schaal KP, Yassin AA. Genus *Actinomyces*. En: Whitman W, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Ludwig W, Suzuki K-i, editores. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition, volume 5. The *Actinobacteria*, Part A. New York, Springer, 2012, p. 42-109.
144. Schwebke JR, Lawing LF. Prevalence of *Mobiluncus* spp. among women with and without bacterial vaginosis as detected by polymerase chain reaction. *Sex Transm Dis.* 2001;28:195-9.
145. Schwiertz A, Hold GL, Duncan SH, Gruhl B, Collins MD, Lawson PA, Flint HJ, Blaut M. *Anaerostipes caccae* gen. nov., sp. nov., a new saccharolytic, acetate-utilising, butyrate-producing bacterium from human faeces. *Syst Appl Microbiol.* 2002;25:46-51.

146. Sizova MV, Muller P, Panikov N, Mandalakis M, Hohmann T, Hazen A, Fowle W, Prozorov T, Bazylini DA, Epstein SS. *Stomatobaculum longum* gen. nov., sp. nov., an obligately anaerobic bacterium from the human oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013;63:1450-6.
147. Slack JM, Gerencser MA. Proposal and description of ATCC 13683 and ATCC 12102 as neotype strains of *Actinomyces bovis* Harz 1877 and *Actinomyces israelii* (Kruse), Lachner-Sandoval. *Int J Syst Bacteriol.* 1976;26:85-7.
148. Slover CM. *Lactobacillus*: a review. *Clin Microbiol Newsl.* 2008;30:23-7.
149. Smith AJ, Hall V, Thakker B, Gemmell CG. Antimicrobial susceptibility testing of *Actinomyces* species with 12 antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56:407-9.
150. Sohail MR, Gray AL, Baddour LM, Tleyeh IM, Virk A. Infective endocarditis due to *Propionibacterium* species. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15:387-94.
151. Sonbol H, Spratt D, Roberts GJ, Lucas VS. Prevalence, intensity and identity of bacteraemia following conservative dental procedures in children. *Oral Microbiol Immunol.* 2009;24:177-82.
152. Spiegel CA, Roberts M. *Mobiluncus* gen. nov. *Mobiluncus curtisii* subsp. *curtisii* sp. nov. *Mobiluncus curtisii* subsp. *holmesii* subsp. nov. and *Mobiluncus mulieris* sp. nov., curved rods from the human vagina. *Int J Syst Bacteriol.* 1984;34:177-84.
153. Spiegel CA. Bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Rev.* 1991;4:485-502.
154. Stackebrandt E, Schumann P, Schaal KP, Weiss N. *Propionimicrobium* gen. nov., a new genus to accommodate *Propionibacterium lymphophilum* (Torrey 1916) Johnson and Cummins 1972, 1057^{AL} as *Propionimicrobium lymphophilum* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002;52:1925-7.
155. Stanton TB, Savage DC. Colonization of gnotobiotic mice by *Roseburia cecicola*, a motile, obligately anaerobic bacterium from murine ceca. *Appl Environ Microbiol.* 1983;45:1677-84.
156. Talan DA, Abrahamian FM, Moran GJ, Citron DM, Tan JO, Goldstein EJC. Clinical presentation and bacteriologic analysis of infected human bites in patients presenting to emergency departments. *Clin Infect Dis.* 2003;37:1481-9.

157. Talan DA, Citron DM, Abrahamian FM, Moran GJ, Goldstein EJC. Bacteriologic analysis of infected dog and cat bites. *N Eng J Med.* 1999;340:85-92.
158. Taniguchi S, Fujimori M, Sasaki T, Tsutsui H, Shimatani Y, Seki K, Amano J. Targeting solid tumors with non-pathogenic obligate anaerobic bacteria. *Cancer Sci.* 2010;101:1925-32.
159. Taras D, Simmering R, Collins MD, Lawson PA, Blaut M. Reclassification of *Eubacterium formicigenerans* Holdeman and Moore 1974 as *Doreaformicigenerans* gen. nov., comb. nov., and description of *Dorea longicatena* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002;52:423-8.
160. Theron MM, Janse van Rensburg MN, Chalkley LJ. Nitroimidazole resistance genes (*nimB*) in anaerobic gram-positive cocci (previously *Peptostreptococcus* spp.) *J Antimicrob Chemother.* 2004;54:240-2.
161. Thomann WR, Hill GB. Modified extraction for gas-liquid chromatography applied to the identification of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol.* 1984;23:392-4.
162. Tomida S, Nguyen L, Chiu B-H, Liu J, Sodergren E, Weinstock GM, Li H. Pan-genome and comparative genome analyses of *Propionibacterium acnes* reveal its genomic diversity in the healthy and diseased human skin microbiome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013; *mBio* 4(3):e00003-13. doi:10.1128/mBio.00003-13.
163. Torsten H, Kunkel M, Kirkpatrick CJ, Weber A. *Actinomyces* in infected osteoradionecrosis-underestimated? *Hum Pathol.* 2006;37:61-7.
164. Vahabnezhad E, Mochon AB, Wozniak LJ, Ziring DA. *Lactobacillus* bacteremia associated with probiotic use in a pediatric patient with ulcerative colitis. *J Clin Gastroenterol.* 2013;47:437-9.
165. Venugopal AA, Szpunar S, Johnson LB. Risk and prognostic factors among patients with bacteremia due to *Eggerthella lenta*. *Anaerobe.* 2012;18:475-8.
166. Verhelst R, Verstraelen H, Verschraegen G, Delanghe J, Van Simaey L, De Ganck C, Temmerman M, Vanechoutte M. Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis. *BMC Microbiol.* 2004;4:16.

167. Wade WG, Downes J, Dymock D, Hiom SJ, Weightman AJ, Dewhurst FE, Paster BJ, Tzellas N, Coleman B. The family *Coriobacteriaceae*: reclassification of *Eubacterium exiguum* (Poco *et al.* 1996) and *Peptostreptococcus heliotrinreducens* (Lanigan 1976) as *Slackia exigua* gen. nov., comb. nov. and *Slackia heliotrinireducens* gen. nov., comb. nov., and *Eubacterium lentum* (Prevot 1938) as *Eggerthella lenta* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1999;49:595-600.
168. Wade WG, Kononen E. *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, and other non-spore-forming anaerobic gram-positive rods. En: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editores. *Manual of Clinical Microbiology*, 10th edition. Washington DC, ASM Press, 2011, p. 817-33.
169. Wade WG. Genus *Eubacterium*. En: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K-H, Whitman WB, editores. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition, volume 3. The *Firmicutes*. New York, Springer, 2009, p. 865-91.
170. Wagenlehner FME, Mohren B, Naber KG, Männl HFK. Abdominal actinomycosis. *Clin Microbiol Infect.* 2003;9:881-5.
171. Willems A, Collins MD. Phylogenetic relationships of the genera *Acetobacterium* and *Eubacterium* sensu stricto and reclassification of *Eubacterium alactolyticum* as *Pseudoramibacter alactolyticus* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1996;46:1083-7.
172. Willems A, Moore WEC, Weiss N, Collins MD. Phenotypic and phylogenetic characterization of some *Eubacterium*-like isolates containing a novel type B wall murein from human feces: description of *Holdemanina filiformis* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1997;47:1201-4.
173. Wolin MJ, Miller TL, Collins MD, Lawson PA. Formate-dependent growth and homoacetogenic fermentation by a bacterium from human feces: description of *Bryantella formatexigens* gen. nov., sp. nov. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:6321-6.
174. Wolin MJ, Miller TL, Lawson PA. Proposal to replace the illegitimate genus name *Bryantella* Wolin *et al.* 2004 VP with the genus name *Marvinbryantia* gen. nov. and to

- replace the illegitimate combination *Bryantella formatexigens* Wolin et al. 2004 VP with *Marvinbryantia formatexigens* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2008;58:742-4.
175. Woo PCY, Fung AMY, Lau SKP, Teng JLL, Wong BHL, Wong MKM, Hon E, Tang GWK, Yuen K-Y. *Actinomyces hongkongensis* sp. nov. a novel *Actinomyces* species isolated from a patient with pelvic actinomycosis. Syst Appl Microbiol. 2003;26:518-22.
176. Wunderink HF, Lashley EELO, van Poelgeest MIE, Gaarenstroom KN, Claas ECJ, Kuijper EJ. Pelvic actinomycosis-like disease due to *Propionibacterium propionicum* after hysteroscopic removal of an intrauterine device. J Clin Microbiol. 2011;49:466-8.
177. Würdemann D, Tindall BJ, Pukall R, Lünsdorf H, Strömpl C, Namuth T, Nahrstedt H, Wos-Oxley M, Ott S, Schreiber S, Timmis KN, Oxley APA. *Gordonibacter pamelaee* gen. nov., sp. nov., a new member of the *Coriobacteriaceae* isolated from a patient with Crohn's disease, and reclassification of *Eggerthella hongkongensis* Lau et al. 2006 as *Paraeggerthella hongkongensis* gen. nov., comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2009;59:1405-15.
178. Yokota A, Tamura T, Takeuchi M, Weiss N, Stackebrandt E. Transfer of *Propionibacterium innocuum* Pitcher and Collins 1991 to *Propioniferax* gen. nov. as *Propioniferax innocua* comb. nov. Int J Syst Bacteriol. 1994;44:579-82.
179. Zárata MS, Romano V, Nievas J, Smayevsky J. Utilidad de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la identificación de bacterias anaerobias. Rev Argent Microbiol. 2014;46:98-102.
180. Zé-Zé L, Tenreiro R, Duarte A, Salgado MJ, Melo-Cristino J, Lito L, Carmo MM, Felisberto S, Carmo G. Case of aortic endocarditis caused by *Lactobacillus casei*. J Med Microbiol. 2004;53:451-3.
181. Zheng G, Summanen PH, Talan D, Bennion R, Rowlinson M-C, Finegold SM. Phenotypic and molecular characterization of *Solobacterium moorei* isolates from patients with wound infection. J Clin Microbiol. 2010;48:873-6.

Tabla 1. *Actinobacteria*: características fenotípicas diferenciales de los bacilos gram positivos anaerobios no esporulados^a

Familia y género	Morfología celular	Metabolismo	Relación con el O ₂	Producción de			Reducción de NO ₃ ⁻	Movilidad	Hidrólisis de esculina	Actividad de ADH	Otras características
				catalasa	indol	ureasa					
ACTINOMYCETACEAE											
<i>Actinobaculum</i>	Bacilos rectos o lig curvados; ramificados	sacarolítico	AF, AO ^b	-	-	D	-	-	-	-	Gram +/-
<i>Actinomyces</i>	Filamentos delgados, ramificados, difteroides o cocobacilares	sacarolítico ^c	AF, CAP, AO	D	-	D	D	-	D	D	Pigmento -/+; Gel -/+; CAMP -/+; ver tabla 3
<i>Mobiluncus</i>	Bacilos curvados, extremos agudos	sacarolítico	AO	-	-	-	D	+	-	D	Gram -/V; Alm +; Hip D; ver tabla 3
<i>Varibaculum</i>	Bacilos cortos, rectos o curvados, difteroides	sacarolítico	AO, MA	-	-	-	+/-	-	-	-	Hip +; ver tabla 3
BIFIDOBACTERIACEAE											
<i>Alloscardovia</i>	Bacilos cortos, irregulares	sacarolítico	AO, MA	-	-	-	-	-	+	-	β-glu +; ProAA +
<i>Bifidobacterium</i>	Bacilos irregulares, ramificados; cadenas de varios elementos; extremos lig bifurcados	sacarolítico	AO, AF, CAP	-	-	+/-	-	-	D	nd	Leche c/-; bilis 20 % +/-
<i>Parascardovia</i>	Bacilos pequeños, delgados; formas variables	sacarolítico	AO	-	-	-	-	-	nd	-	Celobiosa y galactosa +; leche c; VP +; H ₂ S -; Gel -
<i>Scardovia</i>	Bacilos pequeños, delgados; formas variables	sacarolítico	AO	-	-	-	-	-	D	-	Celobiosa y galactosa -; leche c; VP +; H ₂ S -; Gel -
CORIOBACTERIACEAE											
<i>Adlercreutzia</i>	Cocobacilos	asacarolítico	AO	nd	nd	-	-	-	nd	+	Crecimiento estimulado por Arg 0,5 %; bilis 20 % -
<i>Atopobium</i>	Bacilos cortos; elípticos	sacarolítico	AO, AF ^d	-	-	- ^d	-	-	D	D	Crecimiento estimulado por Tween 80 0,5 %; bilis 20 % -; ver tabla 5
<i>Collinsella</i>	Bacilos cortos, en cadenas	sacarolítico	AO	- ^e	- ^e	-	- ^e	-	D ^e	+	Crecimiento estimulado por Tween 80 0,5 %; ver tabla 6
<i>Cryptobacterium</i>	Bacilos cortos	asacarolítico	AO	-	-	-	-	-	-	+	Gram +/-; ver tabla 6
<i>Eggerthella</i>	Cocobacilos o bacilos cortos	asacarolítico	AO	+/-	-	-	-/+	-	- ^f	+	Crecimiento estimulado por Arg 0,5 %; H ₂ S + ^f ; bilis 20 % + ^f ; ver tabla 6
<i>Gordonibacter</i>	Cocobacilos	asacarolítico	AO	+	nd	nd	-	+	nd	+	Crecimiento estimulado por Arg 0,5 %
<i>Olsenella</i>	Bacilos cortos, elípticos	sacarolítico	AO	-	-	-	-	-	+	D	Crecimiento estimulado por Tween 80 0,5 %; bilis 20 % D; ver tabla 5
<i>Paraeggerthella</i>	Cocobacilos en cadenas	asacarolítico	AO	+	-	-	-	-	nd	+	β-glu +; ver tabla 6
<i>Slackia</i>	Cocos, cocobacilos o bacilos cortos	asacarolítico	AO	-	-	-	D	-	-	+	Gram V; crecimiento estimulado por Arg 0,5 %; bilis 20 % -; ver tabla 6
PROPIONIBACTERIACEAE											
<i>Propionibacterium</i>	Bacilos pleomórficos, difteroides, ramificados, dispuestos en V o Y, letras chinas	sacarolítico	AO/MA/AF	D	-/+	-	D	-	D	nd	Gel D; leche D; bilis 20 % D; Alm D; ver tabla 4
<i>Propioniferax</i>	Bacilos pleomórficos, en grupos o en V	sacarolítico	AF	+	-	+	+	-	-	-	Oxi +; Gel +; Alm +; ver tabla 4
<i>Propionimicrobium</i>	Bacilos pleomórficos, cocoides, cadenas cortas en V o Y	sacarolítico	AO	V	-	nd	V	-	-	nd	Bilis 20 % W; Oxi -; ver tabla 4

^aDatos bioquímicos obtenidos de las referencias 8, 27, 29, 32, 36, 34, 64, 67, 78, 80, 83, 84, 85, 86, 89, 98, 99, 101, 114, 119, 120, 130, 138, 143, 154, 167, 169, 177 y 178

^b*Actinobaculum urinale* requiere de atmósfera anaerobia solamente para el aislamiento primario

^c*Actinomyces hongkongensis* es asacarolítico

^dResultados definidos para *Atopobium vaginae*, especie AF y CAP

^eResultados definidos para *Collinsella aerofaciens* y *Collinsella tanakaei*

^fResultados definidos para *Eggerthella lenta*

Símbolos y abreviaturas: +, positivo; -, negativo; D, diferencia entre las especies; V, variable; W, positivo débil; resultado/resultado, el primero es el más frecuente; ADH, arginina deshidrolasa; AO, anaerobio obligado; AF, anaerobio facultativo; CAP, capnoico; MA, microaerófilo; c, coagulación; Lecit, lecitinasa; VP, Voges-Proskauer; Alm, almidón; Gel, gelatina; Hip, hipurato; β-glu, β-glucosidasa; ProAA, prolina arilamidasa; Oxi, oxidasa; nd, dato no disponible.

Tabla 2. Firmicutes: características fenotípicas diferenciales de los bacilos gram positivos anaerobios no esporulados^a

Familia y género	Morfología celular	Metabolismo	Relación con el O ₂	Producción de			Reducción de NO ₃ ⁻	Movilidad	Hidrólisis de esculina	Actividad de ADH	Otras características
				catalasa	indol	ureasa					
ERYSIPELOTRICHACEAE											
<i>Bulleidia</i>	Bacilos cortos, rectos o lig curvados	sacarolítico	AO	-	-	-	-	-	-	+	Gram V; ver tabla 6
<i>Catenibacterium</i>	Bacilos cortos, cadenas enroscadas	sacarolítico	AO	-	-	nd	-	-	-	nd	Alm +; ver tabla 6
<i>Eggerthia</i>	Bacilos pleomórficos, en cadenas cortas	sacarolítico	AO	-	-	nd	-	-	+	-	Leche -/c; bilis 20 % -/W; VP -; Hip -
<i>Holdemania</i>	Bacilos cortos, cadenas cortas	sacarolítico	AO	-	-	-	-	nd	+	-	Gram +/-; VAN (5 µg): R; H ₂ S W; bilis 20 % W; ver tabla 6
<i>Solobacterium</i>	Bacilos cortos, lig curvados	sacarolítico	AO	-	-	-	-	-	+	+	Ver tabla 6
<i>Turicibacter</i>	Bacilos largos irregulares, en cadenas	sacarolítico	AO	-	-	nd	-	nd	nd	nd	α-glu, α-gal, β-gal: +
EUBACTERIACEAE											
<i>Anaerofustis</i>	Bacilos finos	sacarolítico débil	AO	-	-	-	-	nd	-	nd	Fluorescencia amarillo claro; bilis 20 % +; crecimiento estimulado por hidratos de carbono fermentescibles 1 %
<i>Eubacterium</i>	Bacilos uniformes o pleomórficos ^b	sacarolítico/asacarolítico	AO	-/W	D	-	D	D	D	D	Gram V; Gel V; Leche V; Hip -/+; ver tabla 6
<i>Pseudoramibacter</i>	Bacilos en vuelo de aves, letras chinas	sacarolítico	AO	-	-	nd	-	-	-	-	Ver tabla 6
LACHNOSPIRACEAE											
<i>Anaerostipes</i>	Bacilos delgados, cadenas cortas	sacarolítico	AO	-	D	-	+	-	D	D	Gram V; α-gal, α-glu, β-gal V
<i>Dorea</i>	Bacilos cortos o largos	sacarolítico	AO	-	-	nd	-	-	nd	nd	Hip V
<i>Lactonifactor</i>	Bacilos largos, fusiformes	sacarolítico	AO	-	-	nd	nd	-	nd	nd	Gram +/V; α-ara, α-gal, α-glu: +
<i>Marvinbryantia</i>	Bacilos cortos, cadenas cortas	sacarolítico	AO	-	-	-	-	-	nd	-	α-gal, α-glu, β-gal, β-glu, β-GUR, β-NAG: +
<i>Moryella</i>	Bacilos largos, extremos aguzados	sacarolítico débil	AO	-	+	-	-	-	-	nd	Gram V; KAN (1 mg), VAN (5 µg), COL (10 µg), MTZ (4 µg), bilis 20 %-S
<i>Oribacterium</i>	Bacilos alargados, ovoides, cadenas cortas	sacarolítico débil	AO	-	+	-	-	+	-	-	Gram V; α-gal, α-glu, β-gal, ProAA: +; [4 5 0 0 - 2 7 2 6 - 0 4] ^c
<i>Roseburia</i>	Bacilos pleomórficos	sacarolítico	AO	-	^d	^d	nd	+	D	nd	Gram -/V; Alm +
<i>Shuttleworthia</i>	Bacilos cortos, lig curvados, cadenas cortas	sacarolítico	AO	-	+	-	-	-	+	-	Satelitismo colonial; ver tabla 6
<i>Stomatobaculum</i>	Bacilos largos, en cadenas o filamentos curvado:	sacarolítico	AO	-	-	-	-	-	-	nd	Gram V; pigm negro en medio suplementado con citrato de sodio 0,2 %
LACTOBACILLACEAE											
<i>Lactobacillus</i>	Bacilos largos, cortos, en cadenas	sacarolítico	AO, MA, CAP	-/W	-	-/+	-/+	D	D	D	Pigm, raro; VAN: D; Gel -/w; leche c/-; bilis 20 % V; VP -/+; Hip -/+; H ₂ S -; ver tabla 7
PEPTOSTREPTOCOCCACEAE											
<i>Filifactor</i>	Bacilos cortos, extremos redondos o aguzados	asacarolítico	AO	-	-	-	-	-/twitching	-	+ ^e	Gram V; esporas D; Gel W/-; ver tabla 6
RUMINOCOCCACEAE											
<i>Anaerotruncus</i>	Bacilos delgados	sacarolítico	AO	-	+	-	-	-	-	-	Esporas (ovaladas, terminales), ocasional
<i>Faecalibacterium</i>	Bacilos pleomórficos	sacarolítico	AO	-	-	-	-	-	+	-	Gram -/+; α-gal V; α-glu, β-gal: +; Alm +
SIN FAMILIA											
<i>Catabacter</i>	Cocobacilos, bacilos cortos	sacarolítico	AO	+	-	-	-	+	-	-	β-glu +; [0 0 1 2 - 0 0 0 0 - 1 0] ^c
<i>Flavonifractor</i>	Bacilos rectos; lig curvados; algunos fusiformes	asacarolítico/sacarolítico débil	AO	nd	V	^f	-	V	-	nd	Gram V; esporas V; H ₂ S V; bilis 20 % ^f ; ver tabla 6
<i>Mogibacterium</i>	Bacilos cortos, solos, pares, cadenas o grupos	asacarolítico	AO	-	-	-	-	-	-	-	ProAA V; ver tabla 6

^aDatos bioquímicos obtenidos de las referencias 3, 9, 15, 16, 17, 22, 35, 36, 37, 39, 40, 46, 69, 76, 82, 88, 90, 96, 102, 121, 122, 142, 145, 146, 159, 168, 169, 171, 172, 173 y 174

^b*Eubacterium nodatum* puede ser ramificado

^c[Perfil Rapid ID 32A (bioMérieux, Francia)]

^dResultados definidos para *Roseburia intestinalis*

^eResultado definido para *Filifactor alocis*

^fResultados definidos para *Clostridium orbiscindens*

Símbolos y abreviaturas: +, positivo; -, negativo; D, diferencia entre las especies; V, variable; W, positivo débil; resultado/resultado, el primero es el más frecuente; ADH, arginina deshidrolasa; AO, anaerobio obligado; MA, microaerófilo; CAP, capnoico; α-gal, α-galactosidasa; α-glu, α-glucosidasa; α-ara, α-arabinosidasa; β-gal, β-galactosidasa; β-glu, β-glucosidasa; β-GUR, β-glucuronidasa; β-NAG, N-acetil-β-glucosaminidasa; ProAA, prolina arilamidasa; VP, Voges-Proskauer; nd, dato no disponible.

Tabla 3. Características bioquímicas diferenciales de las especies anaerobias y aerotolerantes de los géneros *Actinomyces*, *Mobiluncus* y *Varibaculum*^a

Género y especie	Aerotolerancia	Reducción de NO ₃ ⁻	Movilidad	Hidrólisis de esculina	Fermentación de					Prueba de CAMP	Actividad de				Otras características		
					Ara	Glu	Mal	Man	Raf		Tre	α-glu	β-gal	β-glu		β-NAG	ADH
<i>ACTINOMYCES</i>																	
<i>Actinomyces cardiffensis</i>	-/+	V	-	-	-	+	V	V	V	-	-	+	-	-	-	-	FA -; ProAA +
<i>Actinomyces dentalis</i>	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	V	+	-	-	FA -; ProAA +
<i>Actinomyces hongkongensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	FA +; ProAA +; Hip +
<i>Actinomyces israelii</i>	-	+/-	-	+	+/-	+	+	+	+	+/-	-	+	+	+	-	+	FA -
<i>Actinomyces meyeri</i>	-/+	-	-	-/+	V	+	V	-	-	-	V	+	+ ^b - ^c	-	+ ^b - ^c	-	FA -
<i>Actinomyces nasicola</i>	-/+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	V	+	V	FA -; ProAA +
<i>MOBILUNCUS</i>																	
<i>Mobiluncus curtisii</i>	-	-/+	+	-/+	-	V	V	-/W	-/W	-	W	V	+/-	-	-	+	Gram -/V; Alm +; Hip +/-; FA -
<i>Mobiluncus mulieris</i>	-	-	+	-	-/W	+/-	+	V	-	V	+	+	-	-	-	-	Gram -/V; Alm +; Hip -; FA -
<i>VARIBACULUM</i>																	
<i>Varibaculum cambriense</i>	-/+	+/-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+/W	V	-	-	-	Alm -; Gel -; Hip +; ProAA +; FA -

Todas las especies consideradas no producen catalasa, indol ni ureasa, a excepción de esta última que es V para *A. meyeri*

Son incluidas en la tabla las especies anaerobias estrictas y las aerotolerantes que desarrollan mejor en anaerobiosis

^aDatos bioquímicos obtenidos de las referencias 85, 99, 143, 152 y 169

^bReferencia 85

^cReferencias 99 y 143

Símbolos y abreviaturas: +, positivo; -, negativo; resultado/resultado, el primero es el más frecuente; V, variable; W, positivo débil; Ara, arabinosa; Glu, glucosa; Mal, maltosa; Man, manosa; Tre, trehalosa; α-glu, α-glucosidasa; β-gal, β-galactosidasa; β-glu, β-glucosidasa; β-NAG, N-acetil-β-glucosaminidasa; ADH, arginina deshidrolasa; FA, fosfatasa alcalina; ProAA, prolina arilamidasa; Alm, almidón; Hip, hipurato.

Tabla 4. Características bioquímicas diferenciales de las propionibacterias relacionadas con infecciones en humanos^a

Género y especie	Aerotolerancia	Producción de		Reducción de NO ₃ ⁻	Hidrólisis de		Crecimiento en bilis 20 %	Fermentación de	
		catalasa	indol		esculina	gelatina		Man	Raf
<i>PROPIONIBACTERIUM</i>									
<i>Propionibacterium acidifaciens</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Propionibacterium acnes</i>	+	+/-	+/-	+/-	-	+	+	+/-	-
<i>Propionibacterium avidum</i>	+	+	-	-	+	+	+	+	+/-
<i>Propionibacterium granulosum</i>	+	+	-	-	-	-/+	-	+	+/-
<i>Propionibacterium propionicum</i>	-	-	-	+	-	d	-	d	+
<i>PROPIONIFERAX</i>									
<i>Propioniferax innocua</i>	+	+	-	+	-	+	nd	+	-
<i>PROPIONIMICROBIUM</i>									
<i>Propionimicrobium lymphophilum</i>	-	V	-	V	-	-	W	-	-

Todas las especies consideradas fermentan la glucosa (*P. acnes* +/-) y son inmóviles

^aDatos bioquímicos obtenidos de las referencias 130, 154 y 178

Símbolos y abreviaturas: +, positivo; -, negativo; resultado/resultados, el primero es el más frecuente; d, + 11-89 % de los aislamientos; V, variable; W, positivo débil; Man, manosa; Raf, rafinosa; nd, dato no disponible.

Tabla 5. Características bioquímicas diferenciales de las especies de los géneros *Atopobium* y *Olsenella*^a

Género y especie	Aerotolerancia	Fermentación de					Hidrólisis de esculina	Actividad de			Perfil enzimático
		Glu	Man	Raf	Rib	Sac		β-gal	ADH	ProAA	
<i>ATOPOBIUM</i>											
<i>Atopobium minutum</i>	-	+	+	-	-	-	-/+	-	+	+	
<i>Atopobium parvulum</i>	-	+	+	-	-	+	+/-	+	-	-	[0 1/5 0 2 - 0 1/5 3 7 - 0 5] ^b
<i>Atopobium rimae</i>	-	+	+	-	+	+	+/-	-	V	-	[2/0 0/4 0/1 0/1/3 - 0 1/5/0 7/6 7/1/3 -0 5] ^b
<i>Atopobium vaginae</i>	-/+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
<i>OLSENELLA</i>											
<i>Olsenella profusa</i>	-	+	+	+	nd	+	+	+	-	-	[4 5 1 6 - 0 5 3 7 - 0 5] ^b
<i>Olsenella uli</i>	-	+	+	-	-	+	+	-	+	V	[2 0 1 2 - 0 3 3 7 - 0 5] ^b o [2 0 0 2 - 0 1 2 7 - 0 5] ^b

Todas las especies consideradas no producen catalasa ni indol, no reducen el nitrato y son inmóviles. *A. rimae* es oxidasa +

^aDatos bioquímicos obtenidos de las referencias 5, 27, 32, 36, 85, 138 y 169

^b[Perfil Rapid ID32A (bioMérieux, Francia)]: *n/n*, código variable

Símbolos y abreviaturas: +, positivo; -, negativo; resultado/resultados, el primero es el más frecuente; V, variable; Glu, glucosa; Man, manosa; Raf, rafinosa; Rib, ribosa; Sac, sacarosa; β-gal, β-galactosidasa; ADH, arginina deshidrolasa; ProAA, prolina arilamidasa; nd, dato no disponible.

Tabla 6. Características bioquímicas diferenciales de *Eubacterium* spp. y organismos relacionados más frecuentes y de importancia clínica en humanos^a

Phylum y especie	Producción de		Reducción de NO ₃ ⁻	Hidrólisis de esculina	Fermentación de					Movilidad	Actividad de			Otras características
	catalasa	indol			Glu	Lac	Mal	Man	Raf		β-glu	β-NAG	ADH	
ACTINOBACTERIA														
<i>Collinsella aerofaciens</i>	-	-	-	V	+	+	+	+	-/+	-	-	-	+	ProAA +
<i>Collinsella intestinalis</i>	nd	nd	nd	nd	+	-	-	+	-	-	V	+	+	ProAA -
<i>Collinsella stercoris</i>	nd	nd	nd	nd	+	+	+	+	-	-	+	+	+	ProAA -
<i>Collinsella tanakaei</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	Bilis 20 % +; Gel -; ProAA +
<i>Cryptobacterium curtum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Gram+/-; Gel -; Alm -; [2 0 0 0 - 0 1 2 4 - 0 0] ^b
<i>Eggerthella lenta</i>	V	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Bilis 20 % +; H ₂ S +; Hip -; Gel -; α-fuc V [2 0 0 0 - 0 0 0 0 - 0 0] ^b
<i>Eggerthella sinensis</i>	+	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	+	α-fuc -
<i>Paraeggerthella hongkongensis</i>	+	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	+	-	+	α-fuc -
<i>Slackia exigua</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Alm -; Gel -; [2 0 0 0 - 0 2/3/7 3 7 - 0 5] ^b
FIRMICUTES														
<i>Bulleidia extracta</i>	-	-	-	-	+	nd	+	-	-	-	-	-	+	Crecimiento estimulado por Tween 80 0,5 % y Glu/Mal/Fru 1 %; bilis 20 % -; H ₂ S -; Gel -; [2 0 0 0 - 0 1 2 0 - 0 0] ^b
<i>Catenibacterium mitsuokai</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	nd	nd	nd	Bilis 20 % -; H ₂ S -; Gel -; Alm +
<i>Eubacterium brachy</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	-	Semejante a <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> , pero es SPS-R; bilis 20 % W; Gel -; Alm -; Lecit -; leche -
<i>Eubacterium limosum</i>	-	-	-	+	+	-	-/W	-/W	-	-	nd	nd	V	H ₂ S V; Gel V; Alm, -/+; VP +/-; Hip -; leche -
<i>Eubacterium minutum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	-	Gel -; Alm -; ureasa -
<i>Eubacterium nodatum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	V	Crecimiento estimulado por Arg 0,5 %; no desarrolla en AYH; bilis 20 % -; H ₂ S -; Gel -; Alm -; leche -
<i>Eubacterium rectale</i>	-	-	-	+	+	+/-	+	-/+	+	V	nd	nd	-	Gram V; bilis 20 % -; H ₂ S -; Gel -; Alm +; VP -/+; Hip -; leche -/c

<i>Eubacterium saburreum</i>	-	+	-	+	+/W	V	V	-/+	V	-	+	V	+ ^c	H ₂ S -; Gel -; Alm -; leche c/-; VP -; Hip -;
													- ^d	[5 5 1 0/5 - 2 0 4 0 - 0/2 0] ^b
<i>Eubacterium saphenum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	-	Gel -; Alm -; ureasa -
<i>Eubacterium sulci</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H ₂ S -; Gel -; Alm -; Hip -; Lecit -; leche -;
														[0 0 0 0 - 0 4 0 0 - 0 0] ^b
<i>Eubacterium tenue</i>	-	+	-	-	W/-	-	W/-	-	-	V	nd	nd	nd	H ₂ S +; Gel +; Alm -; VP -; Hip -; Lecit +; leche d/c
<i>Eubacterium yurii</i>	-	+	-	-	-/W	-	-/W	-	-	+	-	-	-	Gel -; H ₂ S +; Alm -; VP -; Hip -;
														[0 0 0 0 - 2 1 0 0 - 0 0] ^b para <i>E. yurii</i> subsp. <i>yurii</i>
<i>Filifactor alocis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Gram -; Gel -; Alm -; Hip -; Lecit -;
														[0/2 0 0 0 - 0 1 2/0 0 - 0 0] ^b
<i>Flavonifractor plautii</i>	nd	V	-	-	-/W	nd	nd	nd	nd	V	nd	nd	nd	Gram V; esporas V; H ₂ S V; ; Gel -; Lecit -
<i>Holdemania filiformis</i>	-	-	-	+	+	nd	-	-	-	nd	-	-	-	VAN (5 µg)-R; Gel -; H ₂ S W; leche -;
														[0 5 0 0 - 0 0 4 1 - 2 0] ^b
<i>Mogibacterium</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Gel -; Alm -; [0 0 0 0 - 0 2/0 0 0 - 0 0] ^b con incubación en anaerobiosis
<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Bilis 20 % -; H ₂ S -; Gel -; Alm -; Hip -; leche -; VP -;
														[0 0 0 0 - 0 0 0 0 - 0 0] ^b
<i>Shuttleworthia sattles</i>	-	+	-	+	+	V	+	-	-	-	+	-	-	Bilis 20 % -; H ₂ S -; Gel -; [4 5 1/5 0 - 2 0 0 0 - 0 0] ^b
<i>Solobacterium moorei</i>	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	V	-	+	Bilis 20 % -; H ₂ S -; Gel -; Alm -;
														[6 5 0/1 0 - 0 1 2 0 - 0 0/1] ^b

^aDatos bioquímicos obtenidos de las referencias 15, 35, 36, 37, 72, 82, 86, 88, 89, 90, 98, 119, 120, 121, 122, 167, 168, 169, 171, 172 y 177

^b[Perfil Rapid ID 32A (bioMérieux, Francia)]: n/n, código variable

^c Referencia 169

^dReferencia 36

Símbolos y abreviaturas: +, positivo; -, negativo; resultado/resultados, el primero es el más frecuente; V, variable; W, positivo débil; Fru, fructosa; Glu, glucosa; Lac, lactosa; Mal, maltosa; Man, manosa; Raf, rafinosa; β-glu, β-glucosidasa; β-NAG, N-acetil-β-glucosaminidasa; α-fuc, α-fucosidasa; ADH, arginina deshidrolasa; ProAA, arginina arilamidasa; Lecit, lecitinasa; d, digestión (leche); c, coagulación (leche); Alm, almidón; Gel, gelatina; Hip, hipurato; VP, Voges-Proskauer; SPS, polianetol sulfonato de sodio; AYH, agar yema de huevo; nd, dato no disponible.

Tabla 7. Características bioquímicas diferenciales de *Lactobacillus* spp. anaerobias y aerotolerantes más frecuentes asociadas a infecciones en humanos^a

Especie	Aerotolerancia	Producción de catalasa	Reducción de NO ₃ ⁻	Fermentación de								Crecimiento a 45 °C	Actividad de ADH	Otras características
				Lac	Mnt	Raf	Ram	Sac	Sal	Tre	Xil			
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-/+	-	-	+	-	+/-	-	+	+	+/-	-	+	-	Alm V; Gel -; leche c
<i>Lactobacillus casei</i>	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	Bilis 20 % +; leche c
<i>Lactobacillus fermentum</i>	+	-	-/+	+	-	+	-	+	-	+/-	+/-	+	+	Bilis 20 % +; leche c/-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	+	-	-	+/-	-	+/-	-	+	+	+/-	-	+	-	Alm +/-
<i>Lactobacillus paracasei</i>	+	-	-	+/-	+	-	-	+	+	+	-	+/-	-	Ureasa -
<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-/W	-/+	+	+	+	V	+	+	+	+/-	-	-	Gel -/W; leche c
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	+	-	-	+ ^b	+	-	+	+	+	+	-	+	-	Leche c; ureasa -
<i>Lactobacillus ultunensis</i>	-/W	-	-	+	-	+/-	-	+	+	+	-	-	nd	

Todas las especies consideradas son inmóviles, no producen indol, hidrolizan la esculina y fermentan a la glucosa, la fructosa y la manosa (*L. fermentum* W)

^aDatos bioquímicos obtenidos de las referencias 26, 30, 69, 76, 85, 125 y 139

^b*L. rhamnosus* GG es Lac -

Símbolos y abreviaturas: +, positivo; -, negativo; resultado/resultados, el primero es el más frecuente; V, variable; W, positivo débil; Lac, lactosa; Mnt, manitol; Raf, rafinosa; Ram, ramnosa; Sac, sacarosa; Sal, salicina; Tre, trehalosa; Xil, xilosa; ADH, arginina deshidrolasa; Alm, almidón; Gel, gelatina; c, coagulación (leche); nd, dato no disponible.

IIIe. BACILOS GRAM NEGATIVOS ANAEROBIOS

Ana Di Martino

Bioquímica a cargo del Laboratorio de Bacteriología en el Laboratorio Bioquímico en Pediatría Dr. N. Litwin. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Miembro de la Subcomisión de Bacterias Anaerobias -Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas (SADEBAC)- Asociación Argentina de Microbiología (AAM). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Liliana FernándezCanigia

Jefa de la Sección Microbiología, Laboratorio Central del Hospital Alemán, Lab. Domecq y Lafage. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Miembro de la Subcomisión de Bacterias Anaerobias -Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas (SADEBAC)- Asociación Argentina de Microbiología (AAM). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Laura Gliosca

Profesora Adjunta de la Cátedra de Microbiología y Parasitología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Directora del Servicio de Diagnóstico Microbiológico y Molecular de la Cátedra de Microbiología y Parasitología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Miembro de la Subcomisión de Bacterias Anaerobias -Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas (SADEBAC)- Asociación Argentina de Microbiología (AAM). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

María Cristina Legaria

Bioquímica de planta en el Laboratorio de Bacterias Anaerobias del Hospital General de Agudos Dr. Enrique Tornú. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Miembro de la Subcomisión de Bacterias Anaerobias -Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas (SADEBAC)- Asociación Argentina de Microbiología (AAM). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Aspectos taxonómicos

La taxonomía de los bacilos gram negativos anaerobios (BGNA) presentó múltiples cambios en la última década, debido al advenimiento de las nuevas técnicas moleculares y de metagenómica. Teniendo en cuenta estas consideraciones y a los fines de unificar criterios taxonómicos nos hemos basado en la nomenclatura y clasificación presentes en el sitio: www.bacterio.net (*List of prokaryotic names with standing in nomenclature*)⁴⁹.

Los BGNA, pertenecen al dominio Bacteria, *phylum Bacteroidetes*, clase *Bacteroidia*, orden *Bacteroidales*, e incluyen a las siguientes familias de interés clínico: *Bacteroidaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae* y *Rikenellaceae*; y al *phylum Fusobacteria*, clase *Fusobacteriia*, orden *Fusobacteriales* que incluye a las familias: *Fusobacteriaceae* y *Leptotrichiaceae*. Además, se pueden encontrar BGNA en otros *phyla* como *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Synergistetes*⁸⁸. A los fines del presente manual, haremos referencia solamente a las especies de relevancia en clínica humana.

La familia *Bacteroidaceae*, está compuesta por los géneros: *Acetofilamentum*, *Acetomicrobium*, *Acetothermus*, *Anaerorhabdus*, *Bacteroides* y *Capsularis*⁴⁹. El género *Bacteroides* es el de mayor importancia clínica, sus integrantes se caracterizan por ser sacarolíticos, resistentes a la bilis y no pigmentados. Está compuesto por las especies: *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides stercoris*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides eggerthii*, *Bacteroides caccae*, *Bacteroides galacturonicus*, *Bacteroides pectinophilus* y numerosas especies descritas en los últimos 10 años: *Bacteroides cellulosilyticus*¹⁵¹,

*Bacteroides clarus*²¹⁴, *Bacteroides coprocola*⁹⁹, *Bacteroides coprophilus*⁷⁶, *Bacteroides dorei*¹², *Bacteroides faecis*⁹⁸, *Bacteroides fingoldii*¹⁰, *Bacteroides fluxus*²¹⁴, *Bacteroides intestinalis*¹¹, *Bacteroides luti*⁷⁵, *Bacteroides massiliensis*⁵¹, *Bacteroides nordii*¹⁹³, *Bacteroides oleiciplenus*²¹⁴, *Bacteroides plebeius*⁹⁹, *Bacteroides pyogenes*¹⁶⁵, *Bacteroides salyersiae*¹⁹³, *Bacteroides xylanisolvens*³⁹ (Tabla 3).

La familia *Porphyromonadaceae* comprende los siguientes géneros vinculados a infecciones humanas: *Barnesiella*, *Odoribacter*, *Parabacteroides*¹⁵⁶, *Porphyromonas*²¹⁷ y *Tannerella*¹⁶⁴. El género *Porphyromonas* es el de mayor relevancia clínica y está compuesto por BGNA asacarolíticos que presentan pigmento marrón claro a negro, con excepción de la especie *Porphyromonas catoniae*. Las especies de mayor importancia son: *Porphyromonas asaccharolytica*³⁷, *Porphyromonas bennonis*¹⁹⁷, *Porphyromonas endodontalis*¹²², *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas somerae*¹⁹⁶, *Porphyromonas uenonis*⁵⁶ y *Porphyromonas crevioricanis*¹⁵⁹ (Tabla 4). La única especie del género *Barnesiella* relacionada con el hombre es *Barnesiella intestinhominis*¹²⁹. El género *Odoribacter* está compuesto por las especies: *Odoribacter denticanis*⁷³, *Odoribacter laneus*¹³³ y *Odoribacter splanchnicus*⁷³. El género *Parabacteroides* es sacarolítico, resistente a la bilis y está compuesto por las especies: *Parabacteroides distasonis*, *Parabacteroides goldsteini*, *Parabacteroides merdae*¹⁵⁶, *Parabacteroides gordonii*¹⁶⁶ (antes pertenecientes al género *Bacteroides*) y *Parabacteroides johnsonii*¹⁵⁷. El género *Tannerella*, posee una única especie, *Tannerella forsythia*¹¹⁹ que se caracteriza por ser auxótrofa para el ácido N-acetilmurámico, propiedad que marca la necesidad de una vida simbiótica con otros microorganismos.

La familia *Prevotellaceae* está integrada por los géneros *Alloprevotella*, *Hallella*, *Paraprevotella* y *Prevotella*. El género *Prevotella* es el de mayor interés clínico y el más numeroso en especies dentro de los BGNA. Hasta el momento se han descrito cuarenta y nueve especies en humanos y animales, y la mayoría de ellas habitan en la cavidad bucal^{42, 49, 158, 163, 167}. Incluye especies moderadamente sacarolíticas, que las ubica en un lugar intermedio entre las especies de *Bacteroides*, que son fuertemente sacarolíticas y las especies de *Porphyromonas* spp., que son inactivas; presentan sensibilidad a la bilis y pueden ser o no pigmentadas¹⁷⁷. La inclusión de *Prevotella massiliensis* y *Prevotella paludivivens* en este género se encuentra en revisión, porque si bien son compatibles por análisis del gen ARNr 16S, se observan discordancias en su comportamiento bioquímico y biológico¹⁸. Entre las especies más frecuentes en infecciones humanas se encuentran: *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella bivia*, *Prevotella disiens* y *Prevotella buccae* (Tabla 4).

Rikenellaceae es una nueva familia compuesta por los géneros *Alistipes* y *Rikenella*. El género *Alistipes*¹²⁴ incluye las siguientes especies: *Alistipes finegoldii*, *Alistipes putredinis*¹⁴⁷, *Alistipes onderdonkii*, *Alistipes shahii*¹⁹⁰ y *Alistipes indistinctus*¹³³. El género *Rikenella* contiene una especie, *Rikenella microfus*⁴⁹.

La familia *Fusobacteriaceae* está compuesta por los géneros *Cetobacterium*, *Fusobacterium*, *Ilyobacter*, *Propionigenium* y *Psychrilyobacter*. Por su parte la familia *Leptotrichiaceae* incluye los géneros: *Leptotrichia*, *Sebaldella*, *Sneathia* y *Streptobacillus*. Se caracterizan por ser un grupo heterogéneo constituido por bacilos pleomórficos, inmóviles. El género

Fusobacterium incluye 8 especies de interés en clínica médica: *Fusobacterium nucleatum* con 5 subespecies⁶ (*F. nucleatum* subsp. *nucleatum*, *F. nucleatum* subsp. *polymorphum*, *F. nucleatum* subsp. *animalis*, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* y *F. nucleatum* subsp. *vincentii*), *Fusobacterium naviforme*, *Fusobacterium periodonticum*, *Fusobacterium varium*, *Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium ulcerans*, *Fusobacterium perfoetens*, *Fusobacterium rusii*, *Fusobacterium gonidiaformans*, *Fusobacterium necrogenes* y *Fusobacterium mortiferum*. *F. necrophorum* presenta dos subespecies, *F. necrophorum* subsp. *funduliforme* y *F. necrophorum* subsp. *necrophorum*, pero solo la primera ha sido aislada de infecciones humanas¹⁰².

El género *Leptotrichia*⁴⁸ está constituido por bacilos largos inmóviles, fuertemente sacarolíticos que dan como producto de su metabolismo ácido láctico. Este género está compuesto por las especies: *Leptotrichia buccalis*, *Leptotrichia goodfellowii*, *Leptotrichia hofstadii*, *Leptotrichia shaii*, *Leptotrichia trevisanii*, *Leptotrichia wadeii*, *Leptotrichia hongkongensis*²¹⁸ y *Leptotrichia amnionii*⁴¹. La especie *Leptotrichia sanguinegens* fue reclasificada como *Sneathia sanguinegens*³⁶.

Dentro del *phylum Proteobacteria*, clase *Epsilonproteobacteria*, orden *Campylobacterales*, familia *Campylobactereaceae*, se encuentra el género *Campylobacter*, el cual está compuesto por bacilos curvos y móviles. La mayoría de las especies desarrollan en microaerobiosis; algunas de ellas como: *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter curvus*, *Campylobacter rectus* y *Campylobacter concisus*, desarrollan mejor en anaerobiosis y *Campylobacter ureolyticus* y *Campylobacter hominis*^{110, 155}, son anaerobias estrictas.

En el mismo *phylum Proteobacteria*, clase *Betaproteobacteria*, orden *Burkholderiales*, familia *Sutterellaceae*, se encuentran los géneros *Sutterella* y *Parasutterella*. El género *Sutterella* está compuesto por las especies: *Sutterella parvirubra*¹⁶⁸ y *Sutterella wadsworthensis*. Por su parte, el género *Parasutterella* está compuesto por las especies *Parasutterella excrementihominis*¹³² y *Parasutterella secunda*¹³⁰.

El *phylum Firmicutes*, característico de gram positivos, clase *Negativicutes*, orden *Selenomonadales*, familia *Veillonellaceae* incluye los siguientes géneros de BGNA: *Dialister*, *Megamonas*, *Selenomonas*, *Centipeda* y *Mitsuokella*. El género *Dialister* se observa como cocobacilos gram negativos asacarolíticos, metabólicamente inertes y presenta las especies, *Dialister invisus*⁴³, *Dialister microaerophilus*, *Dialister propionificiens*⁸⁷, *Dialister succinatiphilus*¹²⁹ y *Dialister pneumosintes*. El género *Megamonas*¹³¹ se presenta como bacilos largos e incluye las especies, *Megamonas funiformis* y *Megamonas hypermegale*. El género *Selenomonas*, se observa como bacilos curvos móviles e incluye las especies, *Selenomonas sputigena*, *Selenomonas artemidis*, *Selenomonas diana*, *Selenomonas flueggei*, *Selenomonas infelix*, *Selenomona noxia*. El género *Centipeda* se presenta como bacilos móviles y contiene la especie *Centipeda periodontii*. El género *Mitsuokella* se observa como bacilos ovoides o regulares y contiene la especie *Mitsuokella multiacida*⁸⁵.

En este mismo *phylum*, clase *Clostridia*, orden *Clostridiales*, se encuentran los géneros *Pseudoflavonifractor* y *Tissierella*. En el género, *Pseudoflavonifractor* la especie relevante es *Pseudoflavonifractor capillosus*²⁵,

anteriormente clasificado como *Bacteroides capillosus*. El género *Tissierella* se compone de dos especies *Tissierella praeacuta*⁹ y *Tissierella creatinini*.

En el *phylum Proteobacteria*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Aeromonadales*, familia *Succinivibrionaceae* se encuentran los géneros *Anaerobiospirillum* (especies *Anaerobiospirillum succiniciproducens*⁸³ y *Anaerobiospirillum thomasi*¹⁵⁴), *Ruminobacter*; *Succinirmonas*, *Succinatimonas* y *Succinivibrio* que fueron aislados de distintos hábitats humanos y animales.

La familia *Desulfovibrionaceae* incluida en el *phylum Proteobacteria*, clase *Deltaproteobacteria*, orden *Desulfovibrionales*, contiene dos géneros de importancia clínica: *Bilophila*, con una sola especie *Bilophila wadsworthia*, que es asacarolítica y resistente a la bilis y *Desulfovibrio* que contiene más de treinta especies y presenta baja patogenicidad en el hombre¹⁰².

La familia *Desulfomicrobiaceae*, incluida en el mismo *phylum*, clase y orden que la anterior, contiene el género *Desulfomicrobium*, cuyas especies se relacionan a la enfermedad periodontal¹⁰⁷.

El *phylum Synergistetes*, orden *Synergistales*, clase *Synergistia*, familia *Synergistaceae*, recientemente descritos, incluye dos géneros, cada uno con una sola especie de BGNA inmóviles, *Jonquetella anthropi*⁸⁶ y *Pyramidobacter piscolens*⁴⁵.

Hábitat

Los BGNA forman parte de la microbiota de las mucosas oral, gastrointestinal y genital, tanto del ser humano como de los animales. La colonización con bacterias anaerobias comienza luego del nacimiento y se incrementa en cantidad y diversidad a través del tiempo¹⁴⁹. Su rol consiste en

mantener el balance ecológico, prevenir la instalación de agentes patógenos y contribuir al desarrollo de la respuesta inmune²⁰⁴. Esta protección se ve seriamente comprometida en procesos erosivos de las mucosas; en procesos obstructivos y en tratamientos antimicrobianos prolongados²¹⁵.

En la cavidad bucal, podemos encontrar distintos BGNA, que corresponden a la microbiota indígena accesoria (menos del 1 % del microbioma bucal), dentro de los que se destacan *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Fusobacterium* spp., *Campylobacter* spp., *Leptotrichia* spp. y *Selenomonas* spp. Los BGNA en la cavidad bucal están relacionados al desarrollo de infecciones odontógenas^{1, 16, 85}.

Con respecto al tracto gastrointestinal superior, la concentración de bacterias es menor a 100 microorganismos/ml de jugo gástrico y provienen generalmente de las secreciones orales, sin embargo en pacientes con aclorhidria o pH elevados se puede alcanzar 10^7 UFC/ml. En ciertas situaciones clínicas (úlceras, carcinoma gástrico, terapia con antiácidos) puede sobrevenir la colonización con *Bacteroides* spp. En el íleon distal se observan coliformes y anaerobios en recuentos de 10^4 - 10^6 UFC/ml, en cambio en el colon distal el recuento promedio es del orden de 10^{11} - 10^{12} UFC/gramo de heces superando los anaerobios a los aerobios en una proporción de 1000 a 1¹⁶⁹. En el colon las especies del género *Bacteroides* son dominantes junto con las especies de *Parabacteroides*, *Fusobacterium*, *Alistipes*, *Anaerobiospirillum*, *Desulfovibrio* y *Odoribacter*, entre los BGNA; y *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus*, *Coprococcus* y *Ruminococcus* entre los organismos anaerobios y anaerobios facultativos gram positivos. También se pueden

encontrar en menor proporción algunas especies de *Campylobacter* spp. y *Prevotella*⁷⁷

El rol principal de *Bacteroides* reside en la función mutualista del metabolismo. La propiedad sacarolítica de *Bacteroides*, especialmente de *B. thetaiotaomicron*, un habitante profuso de la microbiota intestinal, le permite procesar diversos polisacáridos del hospedero y de la dieta para satisfacer sus propias necesidades metabólicas, facilitando la digestión y la liberación de nutrientes para su hospedero y bacterias comensales²²¹. *B. fragilis* y *B. thetaiotaomicron* muestran efectos inmunomoduladores que promueven la homeostasis de la microbiota intestinal⁹².

En el tracto genital femenino la microbiota indígena dominante está compuesta por especies de *Lactobacillus* y anaerobios gram positivos y en menor proporción se encuentran los BGNA. La colonización vaginal es dinámica, con variaciones intrínsecas al ciclo vital reproductor desde la premenarca hasta la menopausia, el embarazo y diferentes situaciones clínicas que presente el huésped. Los BGNA más frecuentes son las especies de *Prevotella*, entre ellas *P. bivia* y *P. disiens*; *Leptotrichia* spp., *S. sanguinegens* y *P. asaccharolytica*. *Bacteroides* spp. pueden encontrarse pero en menor proporción. El sobrecrecimiento de los BGNA lleva a situaciones patológicas como la vaginosis bacteriana y otras infecciones del tracto genital femenino⁴⁰,

143, 171 .

Factores de virulencia

Los BGNA poseen factores de virulencia que le permiten adherirse, invadir y constituirse en *biofilms*. La formación de abscesos y la destrucción tisular son presentaciones características de estas bacterias.

- Adhesinas: son proteínas especializadas de la pared bacteriana, similares a las lectinas, que se adhieren a receptores de las células del hospedero. También permiten la unión entre células bacterianas, fenómeno que se denomina coagregación y es fundamental en la consolidación del *biofilm*¹⁰⁰. Estructuras proteicas como las fimbrias y los *pili* también poseen adhesinas en sus extremos^{74, 135, 145, 211}. Otras estructuras similares son las denominadas hemaglutininas que reconocen glúcidos de la membrana celular de los eritrocitos^{20, 140}.
- Cápsula: es una cubierta externa de composición variable (polímeros: heteropolisacáridos aniónicos u homopolisacáridos neutros y/o polipéptidos), también conocida como antígeno K, con capacidad de inhibir la fagocitosis mediada por el complemento (opsonización) y promover la formación de abscesos (por ej.: *B. fragilis*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*)^{91, 142, 144, 183}.
- Producción de microvesículas: constituyen fracciones de la membrana externa de los BGNA (OMV) que concentran múltiples factores de virulencia: proteasas (gingipainas), LPS, hemaglutininas, fimbrias (FimA), *pili* y adhesinas; pero carecen de material genético. Estas son liberadas al medio y participan en diferentes situaciones fisiológicas tales como: mantenimiento de la homeostasis de la microbiota intestinal, adherencia, penetración y resorción ósea (por ej.: *P. gingivalis*)^{47, 68, 136, 170}.
- Producción de ácidos grasos de cadena corta: los ácidos succínico, propiónico, butírico, acético, valérico, isobutírico, caproico e isovalérico, son productos finales del metabolismo de las bacterias anaerobias. Estos

compuestos provocan necrosis tisular, resistencia a la muerte intrafagocitaria y descenso del pH en el interior de los abscesos que favorece la inhibición de la fagocitosis⁶³.

- Lipopolisacárido (LPS): es un componente importante de la membrana externa de todas las bacterias gram negativas. La porción del LPS, denominada lípido A, es una endotoxina que estimula la respuesta inmune innata y es mediador de shock séptico. La potencia endotóxica en los BGNA varía de acuerdo a la estructura del lípido A³¹. El LPS de *Bacteroides* spp. desencadena una respuesta inflamatoria débil en el huésped, en particular la endotoxina de *B. fragilis* es 10 y 1000 veces menos tóxica que la de *Escherichia coli*²¹⁵. Por el contrario, el LPS de *P. gingivalis*^{32, 146} es un factor de virulencia importante por su actividad proinflamatoria y por estimular en forma directa la activación de los osteoclastos, induciendo la resorción ósea³⁴. Los LPS de *F. nucleatum* y *F. necrophorum* son los inductores más potentes de respuesta inflamatoria sistémica entre los BGNA. En *F. nucleatum* interviene en la reacción inflamatoria de la enfermedad periodontal y en el caso de *F. necrophorum*, en el desarrollo de la tromboflebitis séptica y de las manifestaciones necróticas del síndrome de Lemierre¹²³ y de la necrosis orofacial grave (NOMA)¹⁹⁴.

- Enzimas hidrolíticas: son enzimas que ejercen una acción nociva sobre moléculas y/o estructuras celulares del hospedero. Pueden encontrarse asociadas al espacio periplásmico, a la pared bacteriana o bien liberarse al medio, estas últimas se denominan “de secreción”.

- Hemolisinas: generalmente se encuentran asociadas a otras enzimas como proteasas y adhesinas que permiten la adhesión y ruptura de la membrana eritrocitaria para la obtención del grupo hemo^{114, 125, 152, 198},

- Proteasas: poseen la capacidad de degradar distintas proteínas, entre las cuales se encuentran las inmunoglobulinas (IgA, IgM e IgG), los factores del complemento (C₃, C₄ y C₅) y otras proteínas plasmáticas de la respuesta inflamatoria⁸⁹.

- Colagenasas, hialuronidasas, condroitin sulfatasa, heparinasa, β -glucosidasa y N-acetilglucosaminidasa, ocasionan destrucción de la matriz extracelular y por lo tanto favorecen la invasión y diseminación a través de estructuras contiguas¹⁰⁵.

- Neuraminidasas: enzimas que desdoblan el ácido siálico subterminal de los polisacáridos de las células del hospedero incrementando la capacidad de adherencia, invasión y destrucción de las mucosas^{215, 216}.

- Lipasa: es una enzima que produce la ruptura de proteínas del glicosilfosfatidil inositol en las membranas plasmáticas⁸⁴. Las lipoprotein lipasas hidrolizan uniones éster de los ácidos grasos y modifican la estructura del lípido A de los LPS.

- Enterotoxina: es una poderosa metaloproteasa descrita en las especies enterotoxigénicas de *B. fragilis* codificada en un transposón. La toxina se une al receptor específico en el epitelio intestinal y provoca la desorganización del citoesqueleto de actina de las células y pérdida de las uniones estrechas. Este daño produce una diarrea de tipo acuoso debido a la pérdida de líquidos y electrolitos. Se describen al momento tres enterotoxinas diferentes que presentan variaciones en cuanto a la patogenicidad y distribución¹⁷⁶.

-Leucotoxina: es una exoenzima característica de *F. necrophorum* de importancia en la patogenia del síndrome de Lemierre. Presenta sinergismo con los LPS tanto en la patogenia del síndrome de Lemierre como en la NOMA, favoreciendo la necrosis tisular y la formación de trombos¹⁹⁹.

-Enzimas y otras moléculas que confieren resistencia al estrés oxidativo: incluye varias enzimas como la superóxido dismutasa, que elimina los radicales del oxígeno, la catalasa que destruye el peróxido de hidrógeno y otras proteínas que le confieren a algunos anaerobios la característica de ser aerotolerantes. No están presentes en los anaerobios estrictos y si bien no son factores de virulencia tradicionales, se los considera como tales porque les permiten a estas bacterias sobrevivir a pequeñas concentraciones de oxígeno (nanomolares) presentes en los tejidos. Por ejemplo, *B. fragilis* es capaz de inducir la producción de más de 20 proteínas para responder al estrés oxidativo, que le permiten sobrevivir por largos períodos de tiempo (24 h) a la exposición de O₂^{153, 215} y el pigmento de las especies de *Porphyromonas* y *Prevotella* tiene la función de remover el oxígeno superficial.

Además de los factores de virulencia mencionados, hay dos conceptos ecológicos importantes: el mutualismo y el sinergismo que se basan en la colaboración nutricional y la potenciación de los efectos entre las especies para la instalación de la infección. La capacidad de formar abscesos por parte de estas bacterias y la sucesión microbiana autogénica en el *biofilm* subgingival de la enfermedad periodontal son ejemplos de este comportamiento.

Impacto clínico

Las infecciones por BGNA son en su gran mayoría polimicrobianas, piogénicas, de origen endógeno y se localizan en la proximidad de las superficies mucosas, donde las bacterias anaerobias se encuentran en una proporción 10 a 1000 veces mayor que las aerobias y las facultativas.

Una minoría de las infecciones causadas por estos microorganismos son adquiridas por vía exógena, como las producidas por mordeduras de animales²⁹ y humanos; las ocasionadas por heridas de golpes de puño u otras de origen zoonótico, observadas en huéspedes inmunocomprometidos, tales como diarrea y bacteriemia^{5, 118, 121}.

Los BGNA se aíslan principalmente de infecciones intraabdominales, odontógenas, del tracto genitourinario, de piel y partes blandas y de bacteriemias³³. Los géneros que se aíslan con más frecuencia según el sitio de la infección se detallan en la tabla 1.

Infecciones asociadas a los géneros *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Alistipes* y *Odoribacter*

Bacteroides y *Parabacteroides* son los géneros más frecuentes en las infecciones intraabdominales; son los que despliegan mayor proporción de factores de virulencia y presentan mayor nivel de resistencia a los antimicrobianos¹¹¹.

Las especies que se aíslan, en orden de frecuencia, de muestras clínicas tales como sangre, úlceras, abscesos, hueso o muestras intraabdominales son: *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus* y *P. distasonis*. Si bien *B. fragilis* es la especie menos prevalente en la microbiota intestinal es la que predomina en los aislamientos clínicamente significativos y es el agente

etiológico más frecuente en bacteriemias causadas por anaerobios¹⁰⁸. En esta última entidad, también pueden aislarse *B. thetaiotaomicron* y *P. distasonis*, que junto a *B. fragilis* se asocian con una elevada mortalidad, probablemente vinculada a la presencia de cápsula, a la producción de endotoxinas y a la resistencia a los antibióticos antianaeróbicos. Si bien *B. fragilis* y las especies relacionadas son componentes minoritarios de la microbiota de la mucosa bucal, estos pueden producir infecciones pulmonares en menos del 10 % de los pacientes^{15, 21, 215}. En los últimos años se ha descrito un número importante de especies del género *Bacteroides* provenientes de muestras de materia fecal que forman parte de la microbiota comensal y no se han aislado de muestras clínicas.

Los aislamientos de *B. fragilis* productores de enterotoxina (BFET) se han aislado de materia fecal de animales jóvenes de granja y humanos con diarrea. La población más afectada son los niños mayores de un año y adultos mayores de 60 años o que presentan enfermedades debilitantes. Sin embargo, también se aíslan del intestino de niños menores de un año y adultos jóvenes asintomáticos, así como del tracto vaginal de mujeres durante el embarazo¹⁷⁶. La presencia de enterotoxina también se asocia a aislamientos con capacidad de producir infecciones sistémicas y colecciones purulentas. Si bien el rol de este factor de virulencia aún no está totalmente dilucidado, las cepas que lo poseen parecerían producir infecciones más graves⁹³.

Las especies de *Parabacteroides*, *P. distasonis* y *P. merdae* se asocian a infecciones intraabdominales. Dos especies de este género descritas posteriormente, *P. goldsteinii* y *P. gordonii* también fueron aisladas de muestras

clínicas, la primera de procesos intraabdominales¹⁹² y la segunda de hemocultivos¹⁶⁶.

La mayoría de las especies de *Alistipes* forman parte de la microbiota intestinal habitual. *A. finegoldii*, *A. shaii* y *A. onderdonkii* se encontraron en tejido apendicular normal de niños y adultos y en casos de apendicitis inflamatoria o gangrenosa así como también en peritonitis y abscesos abdominales^{148, 190}. Las especies descritas de *Odoribacter* son componentes de la microbiota intestinal^{124, 133}. *O. splachnicus* (previamente *Bacteroides*) es hasta el momento el único descrito como patógeno oportunista, aislado de abscesos abdominales y tejido apendicular en casos de apendicitis quirúrgicas⁶⁶.

Infecciones asociadas a los géneros *Porphyromonas* y *Tannerella*

Las tres especies principales del género *Porphyromonas* reconocidas hasta el año 2000 incluían a *P. gingivalis* y *P. endodontalis*, aisladas de la mucosa oral y fuertemente asociadas a patología gingivoperiodontal^{79, 208, 209} y *P. assacharolytica*, una única especie aislada de muestras clínicas no orales. Esta última forma parte de la microbiota del tracto genitourinario y gastrointestinal¹⁷⁸ y se aisló de infecciones intraabdominales, infecciones necrotizantes de piel y partes blandas, de vaginosis bacteriana e infecciones respiratorias^{24, 186}. Posteriormente se reclasificó en este género a *Porphyromonas catoniae*, una cuarta especie, única no pigmentada, también componente de la microbiota gingival²¹⁷.

En los últimos años, se describieron tres especies, *P. uenonis*⁵⁶, *P. somerae* (antes *P. levii-like*), y *P. bennonis* (antes *P. endodontalis-like*)¹⁹⁷, las que fueron recuperadas de infecciones intraabdominales, de piel y partes

blandas y de pie diabético²⁸. *P. gulae*, es una especie de origen animal, que puede ser transmitida al hombre desde animales domésticos como el perro²²²; *P. somerae* se aisló de pacientes con infecciones de piel y partes blandas y óseas de miembros inferiores¹⁹⁶ y *P. benonis*, de infecciones de abscesos y heridas¹⁹⁷. *Porphyromonas cangingivalis*, *Porphyromonas cansulci*, *Porphyromonas canoris* y *Porphyromonas macacae* son de origen animal y se aislaron de infecciones de heridas por mordeduras^{29, 201}.

P. gingivalis y *T. forsythia* son considerados patógenos periodontales y junto con *Treponema denticola* conforman el grupo Rojo de Sokransky¹⁸⁸. La periodontitis es una enfermedad multifactorial de etiología inmunoinfecciosa que compromete al tejido de sostén dentario (fibras periodontales y hueso alveolar). *T. forsythia* invade el tejido blando de la bolsa periodontal a través de una proteína de superficie rica en leucina (BspA) la cual se adhiere a la fibronectina y fibrinógeno. También estimula la pérdida ósea alveolar en la periodontitis mediante la modulación de la producción de citoquinas proinflamatorias¹⁸¹. Se ha propuesto que las bacterias del *biofilm* subgingival y sus productos son capaces de difundir al torrente sanguíneo desde el sitio de la infección y promover eventos tromboembólicos asociados con aterosclerosis e infarto del miocardio⁸². Trabajos de investigación básicos y clínicos ponen en evidencia la asociación directa entre periodontitis crónica con enfermedad cardiovascular y parto prematuro¹¹⁵.

Infecciones asociadas al género *Prevotella*

El género *Prevotella*¹⁷⁷ está formado por un grupo heterogéneo de especies, pigmentadas y no pigmentadas cuyo hábitat principal es la cavidad

oral y tracto respiratorio, aunque también se pueden encontrar en el tracto urogenital y en menor medida en intestino^{85, 186}. *P. intermedia* y *P. nigrescens* se asocian a gingivitis inducida por hormonas en el embarazo⁷¹; son clave en el desarrollo de la enfermedad periodontal y también se aíslan de otras infecciones orales^{127, 162}. *Prevotella* spp. se aíslan en procesos infecciosos extraorales de origen odontógeno^{90, 200} y no odontógeno tales como infecciones de cabeza y cuello, infecciones de piel y partes blandas, abscesos y empiemas pulmonares, abscesos abdominales e infecciones del tracto genitourinario^{23, 30, 57}. *P. intermedia*, *P. nigrescens* y *P. buccae* juegan un rol importante en la patogénesis del absceso periamigdalino^{64, 172}. La saliva actúa como reservorio y vehículo de transmisión de bacterias orales¹⁰¹, por esta razón *P. intermedia*, *P. melaninogenica*, *P. buccae* y otros BGNA, como *F. nucleatum*, se aíslan de heridas por mordedura²⁰¹.

Las especies de *Prevotella*, *Fusobacterium* y *Porphyromonas* se aíslan con más frecuencia en otitis supuradas crónicas²², sinusitis crónicas, abscesos cerebrales, de piso de boca, de espacios retrofaríngeos, mediastinitis e infecciones relacionadas con cirugías odontológicas como levantamiento de senos paranasales, colocación de implantes y relleno óseo en maxilares^{115, 203}.

P. bivia y *P. disiens* se asocian a la vaginosis bacteriana y a procesos infecciosos obstétricos y perinatales. *P. bivia*, habita la vagina y tiene capacidad para adherirse e invadir las células del cuello del útero. El LPS, la producción de sialidasa y otros factores de virulencia de estos microorganismos, están involucrados en la infección crónica intrauterina y en la infección fetal⁷.

Las especies de *Prevotella*, *P. denticola*, *P. oris*, *P. salivae* y *P. intermedia*, han estado asociadas a la fisiopatología de la enfermedad pulmonar de pacientes con fibrosis quística^{19, 207}.

Un número limitado de especies nuevas de *Prevotella* se describieron en procesos no odontógenos como son, *Prevotella nanceiensis*³ aislada de hemocultivo, de absceso pulmonar y de lavado broncoalveolar; *Prevotella pleuritidis*¹⁶¹, recuperada de una muestra de líquido pleural y *P. timonensis* que se cultivó de un absceso de mama⁶⁵.

Infecciones asociadas al género *Fusobacterium* y a otras bacterias fusiformes

F. nucleatum y *F. necrophorum* son las especies de mayor importancia clínica y forman parte de la microbiota bucal y orofaríngea, respectivamente. Varias especies del género *Fusobacterium* forman parte de la microbiota del surco gingival: *F. nucleatum*, *F. naviforme*, *F. periodonticum*, *F. alocis* y *F. sulci*. *F. nucleatum* está compuesto por cinco subespecies: *F. nucleatum nucleatum*, *F. nucleatum polymorphum*, *F. nucleatum fusiforme*, *F. nucleatum vincentii* y *F. nucleatum animalis*. *F. nucleatum nucleatum* junto con *P. intermedia* y *P. nigrescens* forman el grupo Naranja de Socransky de características proinflamatorias, que se relacionan con el desarrollo de la enfermedad periodontal y la gingivitis¹⁸⁸. Esta especie además, es un patógeno importante en infecciones no orales como pericarditis, infecciones óseas, bacteriemias y abscesos de diferentes localizaciones, cerebrales, hepáticos, pulmonares, abdominales, de tracto genitourinario y heridas por mordeduras humanas^{63, 102}.

F. necrophorum en asociación simbiótica con treponemas, *Borrelia vincentii* y otras bacterias anaerobias, desencadena enfermedades como la gingivitis úlcero necrotizante (GUNA)¹²⁶ y la angina de Vincent²⁶ que son más frecuentes en adultos jóvenes. Otra entidad producida por *F. necrophorum* es el síndrome de Lemierre, o sepsis posangina, complicación muy rara de la amigdalitis aguda que se caracteriza por originar una sepsis grave y una tromboflebitis de la vena yugular interna¹⁵⁰. Otra patología relacionada a este género es la angina de Ludwig. Es una celulitis bilateral, agresiva, silenciosa y rápida que se expande a los espacios sublinguales y submaxilares y que afecta el cuello y piso de la boca, hasta llegar a los pulmones. Es rara y más frecuente en niños, aunque también puede producirse en adultos inmunocomprometidos. La mayoría derivan de un foco odontogénico que puede avanzar a los tejidos más profundos, llegando a ser potencialmente mortales por su afectación a la vía aérea. También puede ocurrir después de fracturas mandibulares, laceraciones en el piso de la lengua, cuerpos extraños (*piercings*), linfadenitis y sialoadenitis submandibular⁸⁰. *F. necrophorum* se ha descrito en la necrosis orofacial grave (NOMA)¹⁹⁴, entidad clínico-quirúrgica que presenta alta tasa de destrucción del tejido óseo y colágeno.

Fusobacterium también produce bacteriemia, que aunque poco común y asociada a otras bacterias en casi la mitad de los casos, ocupa el segundo lugar dentro de los BGNA luego del género *Bacteroides*. El tracto gastrointestinal, el respiratorio y el genital son las principales fuentes de diseminación hematógica y la presencia de malignidad es el factor de riesgo predominante en los casos documentados¹¹³. Otras presentaciones clínicas

producidas por *Fusobacterium* spp. son: endocarditis¹²⁸, infección de partes blandas, meningitis, abscesos hepáticos¹³⁷ y neumonía necrotizante⁶².

Leptotrichia es un patógeno emergente. Las especies comensales de *Leptotrichia* son causantes de mucositis oral y bacteriemia en pacientes inmunocomprometidos con neutropenia, infección por HIV y leucemia^{38, 175}. Sin embargo, también se han comunicado casos de bacteriemia y endocarditis en personas inmunocompetentes. Se las relacionan con infecciones odontogénicas como gingivitis, GUNA, periodontitis refractaria y con infecciones no odontogénicas, como angina de Vincent, apendicitis aguda y celulitis, entre otras⁴⁸. *L. wadei* se asoció con neumonía grave en pacientes inmunocompetentes, *L. amnionii* con infecciones del tracto genital superior femenino y posparto y con infecciones del tracto urinario en pacientes con trasplante renal²⁰⁵ y *L. goodfellowii* con infección de herida por mordedura⁷⁰. *Leptotrichia* spp. y *S. sanguinegens* se han asociado con bacteriemia, infecciones del tracto genital femenino, posparto y perinatales^{40, 72}. Se postula a estos microorganismos como marcadores de la vaginosis bacteriana y serían útiles para evaluar la respuesta al tratamiento⁵⁹. *S. sanguinegens* también se asoció a otro tipo de infecciones como la artritis séptica⁸.

Infecciones asociadas a otros bacilos gram negativos

Desulfovibrio spp. son microorganismos reductores de sulfatos, que pueden encontrarse en el suelo, el agua de consumo, las aguas residuales y en el intestino humano y de animales. *D. piger* y *D. fairfieldensis* son habitantes normales del tracto intestinal, lugar donde abundan los sulfatos. Estos microorganismos se aislaron de abscesos cerebrales, infecciones sistémicas,

abdominales y abscesos hepáticos^{174,213}. *D. desulfuricans* se aisló de hemocultivos de pacientes inmunocomprometidos con colitis ulcerosa y trasplante hepático²¹⁰. *D. fairfieldensis*, *D. piger* y *D. vulgaris* se aislaron de infecciones abdominales. La baja tasa de recuperación de los integrantes de este género bacteriano en muestras clínicas puede deberse a su lento desarrollo y a la necesidad de contar con herramientas moleculares para su identificación.

Dentro de los BGNA reductores de sulfatos se encuentra también *Bilophila wadsworthia*, microorganismo que se considera un patógeno humano relevante. Participa de infecciones polimicrobianas intraabdominales, como apendicitis, principalmente en pacientes pediátricos; abscesos en diferentes localizaciones y bacteriemia¹⁴⁸.

Anaerobiospirillum spp. son BGNA espiralados móviles. Pueden formar parte de la microbiota gastrointestinal de humanos y animales. Se los aísla en casos de infecciones gastrointestinales y sistémicas en pacientes adultos con enfermedades de base debilitantes^{95, 121}.

Selenomonas spp. y *C. periodontii* son BGNA móviles que se aíslan del *biofilm* dental. Estas especies están asociadas con infecciones odontogénicas como periodontitis, GUNA, infecciones endodónticas y rara vez se aíslan de infecciones no orales¹⁰².

Dentro de las especies de *Campylobacter*, *C. rectus*, *C. curvus*, *C. showae*, *C. gracilis* y *C. concisus*, son importantes agentes de infección periodontal¹⁸⁴. *C. concisus* contribuye además al desarrollo de enfermedades inflamatorias intestinales como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn²²⁴, *C. showae*, se aisló de biopsias de tejido tumoral en pacientes con carcinoma

colorectal²¹², *C. rectus* se encontró en infecciones pulmonares, *C. curvus* se aisló en infecciones de cabeza y cuello, abdominales, urogenitales y neumonía y *C. gracilis* se asoció a peritonitis, apendicitis, bacteriemia, infección de tejidos blandos y pulmón⁵⁸. *C. ureolyticus* es productor de enfermedad gastrointestinal principalmente en individuos con insuficiencia renal en diálisis o con cirrosis, personas residentes en geriátricos y sus cuidadores. Se aisló además de hemocultivos, herida de la región genital en hombres¹⁰³, infección de cabeza y cuello, pulmón, abdomen, hueso y tejidos blandos¹³⁹. Por su parte *C. hominis*, es un integrante de la microbiota gastrointestinal cuyo rol en la infección es incierto¹¹⁰.

S. wadsworthensis, es un patógeno aislado predominantemente de infecciones abdominales. *S. sputigena*, *S. noxia* y otras especies no cultivables de este género pueden estar asociadas con la patogénesis y la progresión de la periodontitis agresiva⁶⁷.

Diagnóstico microbiológico

Identificación a nivel de género y especie

Los BGNA deben cultivarse en medios enriquecidos que provean nutrientes similares a los que adquieren de su ecosistema natural, como derivados de la sangre (hemina), vitamina K y aminoácidos. Algunos requieren además, suplementos específicos como por ejemplo formato, fumarato y ácido N-acetilmurámico para estimular el desarrollo de *Campylobacter* spp. y de *T. forshytia*, respectivamente⁸⁵.

El tiempo de incubación de los BGNA es variable, la mayoría de las especies de *Bacteroides* y *Parabacteroides* crecen a las 48 h de incubación;

otros como *Bilophila*, *Desulfovibrio*, *Porphyromonas* y *Dialister* requieren períodos de 5 a 7 días. Todos los BGNA necesitan de una atmósfera libre de oxígeno para desarrollar, no obstante algunas especies presentan mayor grado de aerotolerancia^{153, 185}. Los BGNA pueden identificarse presuntivamente en base a: morfotipos celulares, características de las colonias, producción de pigmentos, sensibilidad frente a discos de antibióticos de potencia especial y pruebas bioquímicas. En la mayoría de las situaciones clínicas es suficiente con arribar a la identificación del género o grupo bacteriano y en otras es necesario llegar a la identificación a nivel de especie. Esta información es de utilidad para la elección del tratamiento a implementar y para dilucidar el origen de la infección^{111, 113, 187}.

El primer paso para la identificación es la observación y registro de todos los morfotipos presentes en el cultivo primario. Algunas especies pueden pigmentar luego de varios días de incubación (5 a 7 días), otras pueden crecer en forma superpuesta o satelital a otras colonias por sus exigencias nutricionales, algunas también pueden ser demasiado pequeñas para detectarlas a simple vista y requieren magnificación (lupa).

Las características de las colonias: el tamaño, la forma, los bordes, el color, la consistencia, el aspecto y otras características particulares, como el hundimiento en el agar (*pitting*), la fluorescencia bajo luz UV de 366nm y la producción de pigmento o de hemólisis, entre otras, orientan la identificación. Las colonias pequeñas de BGNA con *pitting*, son orientadoras de *C. ureolyticus*, las que presentan pigmento marrón a negro, pueden corresponder a *Porphyromonas* spp. o *Prevotella* spp., las opalescentes con forma de miga

de pan hacen sospechar la presencia de *F. nucleatum*, las cremosas, en forma de bonete pueden asociarse a *F. necrophorum*.

Al igual que la morfología macroscópica, el micromorfotipo observado en la coloración de Gram, es muy útil en la identificación presuntiva. Las células con forma de huso nos pueden orientar a la identificación de *F. nucleatum*, los bacilos gram negativos muy largos que forman rulos pueden asociarse a la mayoría de las especies de *Leptotrichia*, mientras que los bacilos curvados cortos pueden pertenecer a los géneros *Anaerobiospirillum*, *Campylobacter* o *Desulfovibrio*.

Para la identificación inicial existen pruebas sencillas al alcance de cualquier laboratorio clínico, que adicionadas a las características mencionadas son útiles para ubicar a los BGNA dentro de los grupos mayoritarios.

El patrón de sensibilidad a los antibióticos en ensayos de difusión con discos de potencia especial: vancomicina (5 µg), kanamicina (1000 µg), colistina (10 µg) junto con pruebas simples como la inhibición del desarrollo en presencia de un disco o tableta de bilis, la producción de pigmento y/o movilidad, permiten diferenciar los principales géneros de BGNA que se describen en la tabla 2. Teniendo en cuenta estas características, estos microorganismos se pueden clasificar en cinco grupos principales que permiten resolver de un modo práctico las situaciones clínicas habituales.

Grupo I. *Bacteroides* spp., *Parabacteroides* spp., *Odoribacter* spp. y *Alistipes*: son BGNA de desarrollo rápido (24 a 48 h) con resistencia a todos los antibióticos de potencia especial y sacarolíticos. En su mayoría no son pigmentados y desarrollan en bilis al 20 %. El esquema de identificación se muestra en la tabla 3.

La mayoría de las especies de este grupo no son exigentes, pueden desarrollarse en medios elaborados con un agar base nutritivo y sangre lacada al 5-7 % como único aditivo. Se observan como bacilos gram negativos regulares; en particular *B. fragilis* forma vacuolas que pueden dar células en forma de raqueta. Las especies de *Bacteroides* y *Parabacteroides* producen colonias grandes a las 48 h de incubación, grises, convexas sobre los medios nutritivos y son fuertemente sacarolíticas. Los métodos de identificación comerciales basados en pruebas de fermentación, ej. API 20A (bioMérieux, Marcy- l'Étoile, Francia) pueden resultar de utilidad en este grupo. Sin embargo, debido a los constantes cambios taxonómicos, sus bases de datos pueden estar desactualizadas, por lo que se aconseja corroborar el resultado obtenido mediante la lectura individual de cada prueba y confirmación según la tabla 3.

Alistipes spp., previamente consideradas como integrantes del género *Bacteroides*, comparten con éste la característica de presentar el mismo patrón de resistencia a los discos de antibióticos de potencia especial. Todas las especies de este género son indol positivas. *A. finegoldii*, *A. onderdonkii* y *A. shahii* crecen bien en medios sólidos pero no en medios líquidos, son resistentes a la bilis al 20 % y producen pigmento marrón claro dependiendo del medio de cultivo empleado y el tiempo de incubación. *A. putredinis*, sin embargo, es asacarolítica, sensible a la bilis al 20 % y no es pigmentada. Las especies pigmentadas se pueden diferenciar mediante la detección de enzimas preformadas (Tabla 3)^{50, 190, 206}.

Las especies del género *Odoribacter* son bacilos gram negativos fusiformes, que forman colonias pequeñas a las 48 h de incubación y pueden

pigmentar luego de 7 días en medios nutritivos con sangre, son débilmente sacarolíticos e hidrolizan la arginina^{73, 133}.

Grupo II. *Porphyromonas* spp.: son BGNA pigmentados, asacarolíticos, que se inhiben en presencia de bilis al 20 %, sensibles a la vancomicina y resistentes a la kanamicina y a la colistina (Tabla 4).

Este grupo presenta colonias pigmentadas que varían del marrón a negro, debido a la formación de protoporfirina a partir del grupo hemo de la hemoglobina, proceso que se ve favorecido en presencia de sangre lacada o hemolizada e incubación prolongada¹⁸⁰. Son anaerobios estrictos y necesitan suplementos para su desarrollo como la vitamina K. Todas las especies de interés en clínica humana son pigmentadas con excepción de *P. bennonis* que produce pigmento débil y *P. catoniae* que no lo produce. Bajo luz UV(366 nm), las especies pigmentadas dan fluorescencia rosa-anaranjado a roja, preferentemente en cultivos jóvenes de 48 a 72h. *P. gingivalis* no fluoresce bajo luz UV. Se obtienen cultivos con colonias más grandes y cremosas si se utilizan bases con hidrolizados de proteínas como las peptonas y extracto de levadura, en lugar de hidratos de carbono que no impactan en su desarrollo. Si bien la llave de entrada para la identificación del género es sencilla, las especies de *Porphyromonas* son difíciles de diferenciar por métodos fenotípicos porque no fermentan hidratos de carbono (Tabla 4). Solo se cuenta con algunas pruebas enzimáticas y la prueba de la catalasa que permite diferenciar las especies humanas de las aisladas de animales. Las especies de origen humano que no producen indol son, *P. catoniae*, *P. bennonis* y *P. somerae*. Estas dos últimas son indistinguibles por métodos convencionales y pueden confundirse con especies de *Prevotella*¹⁰². Los métodos comerciales

como el API ZYM, Rapid ID 32^a (bioMèrieux, Marcy- l' Ètoile, Francia) y RapID ANA II (Remel, Lenxa, KS) que detectan enzimas preformadas, tienen la desventaja que son de difícil lectura debido a la interferencia del pigmento.

Grupo III. *Prevotella* spp.: son BGNA sacarolíticos, pigmentados y no pigmentados, que son inhibidos en presencia de bilis al 20 %, resistentes a kanamicina y vancomicina y comportamiento variable frente a colistina (Tabla 5).

Este grupo incluye numerosas especies del género *Prevotella*. En general las colonias son circulares y de bordes regulares, con algunas excepciones como *P. bivia* y *P. disiens* que son muy pequeñas a las 48-96 h de incubación, pueden tener bordes irregulares y mostrar distintos tamaños en el mismo cultivo. Son anaerobios estrictos y requieren para mejorar el desarrollo aditivos como hemina y vitamina K.

Las especies pigmentadas producen pigmento marrón a negro en agar con sangre preferentemente hemolizada dentro de las 48 h de incubación, sin embargo, algunas cepas pueden requerir hasta 7-14 días^{33, 180}. Al igual que en el género *Porphyromonas*, esta característica se debe a la producción de porfirinas a partir del grupo hemo de los hematíes, las cuales son utilizadas como grupo prostético de los citocromos. Si bien, *Prevotella* y *Porphyromonas* fluorescen rosadas o rojo coral bajo luz UV, se debe tener en cuenta que la intensidad de la fluorescencia disminuye a medida que aumenta el pigmento y que las especies no pigmentadas pueden fluorescer pero con menor intensidad⁸⁵.

Las pruebas de fermentación de los hidratos de carbono son útiles para la identificación de las especies no pigmentadas que desarrollan con colonias

grandes a las 48 h de incubación, como por ejemplo *P. buccae*. A la inversa ocurre con *P. bivia*, *P. disiens* y las especies pigmentadas, debido a que no son fuertemente sacarolíticas y desarrollan con dificultad en estos medios. Los métodos comerciales que detectan enzimas preformadas serían los más adecuados para la identificación de este grupo, aunque tienen la misma limitación que para *Porphyromonas* spp. en la lectura de las especies pigmentadas.^{102, 120}. El método API 20A (bioMérieux, Marcy- l' Étoile, Francia) podría ser usado en aquellas especies no pigmentadas que son fuertemente sacarolíticas.

El método más confiable para realizar la prueba de indol en las especies pigmentadas es la prueba en caldo, algunas cepas pueden requerir una incubación de hasta 96 h. La prueba de toque puede dar falsos negativos y el pigmento puede interferir en su interpretación⁵². Entre las especies pigmentadas indol positivo, *Prevotella intermedia* y *P. nigrescens* junto con las descritas posteriormente, *P. aurantiaca*¹⁶⁷ y *P. falsenii*¹⁵⁸, son indistinguibles por métodos fenotípicos. *P. pallens*, muestra características fenotípicas similares, pero puede ser diferenciada de estas especies porque el pigmento es beige a marrón claro. Para la identificación de estas especies se necesitan métodos de secuenciación del gen ARNr 16S u otros métodos moleculares^{96, 97, 167}.

Grupo IV. *Fusobacterium* spp., *Leptotrichia* spp y *S. sanguinegens*: son BGNA no pigmentados, resistentes a vancomicina y sensibles a kanamicina y colistina. En su mayoría se caracterizan por ser bacilos largos con extremos aguzados, inmóviles, no esporulados y generalmente no fermentativos (Tabla 6). Se debe tener en consideración que *Leptotrichia* spp. y *S. sanguinegens*

son sacarolíticos, de colonias pequeñas que pueden desarrollar en atmósfera con CO₂ en el cultivo primario.

Fusobacterium spp. muestra variabilidad metabólica frente a los hidratos de carbono, desarrollo relativamente rápido en medios nutritivos suplementados con sangre (48 a 72 h) y comportamiento variable con respecto al desarrollo en bilis 20 %. Las colonias de las especies integrantes del género se caracterizan por presentar aspecto de “leche cortada” cuando se las observa con lupa. Pueden observarse diferentes morfologías y tamaños de colonias: en bonete, rugosas (aspecto de migas de pan), enteras, circulares y mucosas con núcleo central. La morfología celular es muy importante para diferenciar presuntivamente las especies, no siempre se observan como bacilos fusiformes, pueden ser bacilos grandes pleomórficos o pequeños con extremos redondeados (Tabla 6). Los aislamientos más frecuentes en muestras clínicas de este género pueden ser identificados por pruebas sencillas. Por ejemplo, la observación de un morfotipo fusiforme en la coloración de Gram, que es inhibido por bilis al 20 % y produce indol por cualquiera de los métodos es distintivo de *F. nucleatum*. Las especies de *Fusobacterium* se caracterizan por metabolizar la treonina a propionato. La producción de ácido butírico como principal producto metabólico de la mayoría de las especies, le confiere un olor característico y permite diferenciar *Fusobacterium* de *Prevotella*, *Porphyromonas* y *Bacteroides*.

El género *Leptotrichia* fue en un comienzo descrito como bacilos fusiforme en la coloración de Gram, pero su morfología varía según las diferentes especies, desde bacilos grandes pleomórficos y enrulados hasta muy cortos y cocoides. En el cultivo primario son anaerobios estrictos pero en

los subcultivos pueden desarrollar en aerobiosis en presencia de CO₂, luego de 48 a 96 h de incubación⁴⁸. Esta característica puede llevar a que el aislamiento sea identificado en forma errónea como *Capnocytophaga* spp. Pueden dar colonias cerebriformes, puntiformes y a diferencia de *Fusobacterium* spp. son sacarolíticas. *S. sanguinegens* es un bacilo extremadamente exigente y se conoce poco a cerca de sus características bioquímicas (Tabla 7).

Grupo V. Bacilos gram negativos móviles: este grupo incluye géneros que muestran resistencia a vancomicina, sensibilidad a kanamicina y comportamiento variable frente a colistina y al desarrollo en bilis 20 %.

Incluye un grupo heterogéneo de microorganismos sacarolíticos y asacarolíticos de difícil aislamiento que desarrollan luego de los 4 a 7 días incubación. Las especies de *Anaerobiospirillum* se caracterizan por tener morfología de tirabuzón con movimientos espasmódicos y son fermentadores de los hidratos de carbono; *Selenomonas* spp. al igual que *C. periodonti*, son bacilos curvos flagelados y también son sacarolíticos. Las especies de *Desulfovibrio* son bacilos curvos con movilidad rápida y progresiva con excepción de *D. piger* que es inmóvil y tolera la bilis, a excepción de *D. desulfuricans*. La mayoría de las especies de este género producen un pigmento denominado desulfovirdina, cuyo cromóforo, denominado sirohidroclorina, muestra fluorescencia roja cuando se mezcla un inóculo denso de colonias con una gota de NaOH 2N y se observa bajo luz UV (366 nm). Además de tratarse de especies asacarolíticas, poseen la característica de ser reductores de los sulfatos. *Phocaeicola* es un nuevo género con una sola especie descrita *Phocaeicola abcessus*, encontrada en un absceso cerebral. La

mayoría de las células son cocoides con flagelos lofotricos, asacarolíticas, exigentes en sus requerimientos culturales² (Tabla 8).

Las especies de *Campylobacter* son bacilos cortos con penachos de flagelos que se mueven en tirabuzón, asacarolíticos, productores de ácido sulfhídrico y oxidasa positivos. Una consideración de importancia es que *C. ureolyticus* y *C. hominis* son los únicos anaerobios estrictos de este género, sin embargo, se debe tener en cuenta que *C. rectus*, *C. curvus*, *C. concisus*, *C. showae* y *C. gracilis* requieren anaerobiosis estricta para el aislamiento primario y aunque pueden llegar a desarrollar en atmósfera microaeróbica, prefieren la atmósfera anaerobia para los cultivos sucesivos. Estas especies requieren además atmósferas enriquecidas en hidrógeno (Tabla 9).

Otros géneros de BGNA, en su mayoría asacarolíticos, son: *B. wadsworthia*, sacarolítico, resistente a la bilis 20 %, catalasa positivo, productor de ureasa (75 % de las cepas) y de SH₂ que en el cultivo sobre el agar bacteroides bilis esculina (BBE) forma colonias características transparentes con el centro negro; *Sutterella* spp. y *P. excrementihominis* muestran un metabolismo extremadamente inactivo frente a la mayoría de los sustratos. *P. capillosus* es un bacilo filamentosos, que no desarrolla en presencia de bilis 20%, hidroliza la esculina y no produce indol. Una especie sumamente exigente en sus requerimientos culturales es *T. forsythia*, reconocido patógeno periodontal. Es un bacilo gram negativo fusiforme, deficiente en precursores de la pared microbiana, auxótrofo para el ácido N-acetilmurámico, que desarrolla como colonias pequeñas a las 96 horas de incubación. *Dialister* spp. son cocobacilos gram negativos que presentan colonias pequeñas en el agar

sangre y suelen confundirse con cocos gram negativos del género *Veillonella*. Son asacarolíticos y muy inactivos frente a las pruebas bioquímicas convencionales por lo que se debe recurrir a la secuenciación del gen ARNr 16S para la identificación⁸⁷.

Recientemente se describieron dentro del *phylum Synergistetes*, *J. anthropi* y *P. piscolens*. Estos microorganismos son muy exigentes e inactivos frente a la mayoría de las pruebas utilizadas para la caracterización fenotípica, razón por la cual se requieren métodos moleculares para realizar su identificación^{17, 102}.

Métodos moleculares de identificación

En la actualidad, el reconocimiento de nuevas especies se basa en la utilización de métodos moleculares. Estas técnicas permitieron identificar microorganismos que hasta el momento no habían sido identificados, debido en parte, al escaso poder discriminatorio de las pruebas fenotípicas^{44, 46, 158, 182, 202, 219}. Los métodos moleculares más utilizados son la secuenciación del gen ARNr 16S u otros genes blanco y la amplificación de porciones de genes específicos por PCR en tiempo real o PCR de punto final.

El análisis de las secuencias del gen ARNr 16S es útil para la identificación de aislamientos clínicos de *Bacteroides* spp. sin embargo su uso ha sido discutido en especies filogenéticamente muy cercanas, como es el caso de *P. johnsonii* y *P. merdae*^{157, 191}. Sakamoto y Ohkuma¹⁶⁰, propusieron la secuenciación de otros genes para la diferenciación entre especies de BGNA, como el gen *hsp60* que codifica para una proteína de membrana externa que tendría mayor poder discriminatorio entre especies, especialmente para los

géneros *Porphyromonas* y *Prevotella*. Los mismos autores observaron que los porcentajes de similitud para el gen *hsp60* y el gen ARNr 16S fueron de 73,8 % \pm 0,5 y 88,3 % \pm 0,3 para *Porphyromonas* y 77,5 % \pm 0,1 y 89,6 % \pm 0,1 para el género *Prevotella*, respectivamente. La secuenciación de otro gen blanco como el *rpoB*, resultó discriminatorio para la diferenciación entre especies del género *Fusobacterium*¹⁹⁵. Probablemente este tipo de genes puedan ser mejor blanco en el futuro, que el gen ARNr 16S para la identificación rápida de aislamientos de muestras clínicas mediante amplificación por PCR con oligonucleótidos cebadores específicos.

Actualmente existen otros métodos derivados de la proteómica y de la espectrometría de masa que son equiparables a los métodos genómicos. Shah *et al.*^{35, 179}, han mostrado que los perfiles realizados por la espectrometría de masas [*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS)] de Bruker Daltonik®, Bremer, Alemania, entre otros, permiten una excelente identificación a nivel de especie de bacterias anaerobias y presentan la ventaja de ser más rápidos, simples y económicos que la secuenciación del gen ARNr 16S. Esta metodología posee una correlación cercana al 95 % para la identificación a nivel de género, comparada con la secuenciación del ARNr 16S¹⁴. La implementación es sencilla, la capacitación es rápida y el único requisito es disponer de colonias aisladas. Las bases de datos disponibles en el mercado permiten la identificación de la mayoría de los BGNA de relevancia clínica^{109, 180, 223}, si bien los BGNA pigmentados, pueden presentar interferencias debidas al pigmento. Una ventaja adicional en el diagnóstico de infecciones por anaerobios, es que en pocas horas se puede obtener la identificación de los BGNA presentes en una

muestra polimicrobiana. Si bien esta metodología está reemplazando a los métodos de identificación fenotípica actuales¹⁴¹, el equipamiento es muy oneroso para los laboratorios de microbiología clínica.

Sensibilidad a los antimicrobianos

Las tasas de resistencia de las bacterias anaerobias a los antimicrobianos ha aumentado en los últimos años, en especial en los BGNA⁷⁸.

Las especies de *Bacteroides* (*B. fragilis*, *B. ovatus*, *B. thetaiotaomicron*)^{27, 112, 189} y de *Parabacteroides* son las que presentan las mayores tasas de resistencia, incluyendo a las drogas antianaeróbicas más activas como β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas, metronidazol y carbapenems. La producción de β -lactamasas es el mecanismo más frecuente de resistencia a antibióticos β -lactámicos en BGNA. Las enzimas descritas en este grupo son cefalosporinasas, CepA y CfxA, las cuales son inhibidas por los inhibidores de β -lactamasas, le confieren resistencia a las penicilinas y cefalosporinas y no actúan sobre las cefamicinas⁶¹. *Bacteroides* y los géneros relacionados, son habitualmente sensibles a ampicilina-sulbactama, aunque se pueden observar variaciones entre especies, y a piperacilina-tazobactama, que es uno de los antibióticos β -lactámicos más activo comparable a los carbapenems. La resistencia a estos últimos varía entre 1 y 7 %^{54, 134, 187} y se debe a la presencia de CfiA, una metalo- β -lactamasa específica de especie descrita en *B. fragilis sensu stricto*, que hidroliza a los carbapenems y a los β -lactámicos en general¹³. Cabe destacar que no se conoce el determinante de resistencia en otras especies de *Bacteroides*.

Las especies de *Prevotella* también muestran altas tasas de resistencia a los antibióticos β -lactámicos debido a la producción de una β -lactamasa, denominada CfxA2, que también se encuentra en *Bacteroides* spp. En nuestro país se confirmó la presencia de esta enzima y dos variantes alélicas, CfxA3 y CfxA6, en aislamientos de *P. intermedia*, *P. nigrescens* y *P. melaninogenica*⁵³. La prevalencia de aislamientos de *Prevotella* spp. productoras de β -lactamasas oscila entre el 50 % y el 95 %, dependiendo de la especie y el origen de la infección^{4, 117, 220}. A diferencia de *Bacteroides*, presentan excelente sensibilidad frente a la combinación de un β -lactámico con un inhibidor de las β -lactamasas. Con respecto a las especies del género *Porphyromonas*, los niveles de β -lactamasas son menores (0 a 20 %) y la mayoría corresponde a *P. assacharolytica*. La resistencia a las penicilinas en las especies de *Fusobacterium* spp. también es baja, inferior a 15 %. Sin embargo, en este género no siempre se pudo demostrar la presencia de β -lactamasas^{4, 106, 138}. Los β -lactámicos, con excepción de las penicilinas en *Prevotella* spp., tienen muy buena actividad frente a las especies de estos últimos géneros; sin embargo, se ha descrito la emergencia de resistencia a carbapenems en *Prevotella* spp. y *Fusobacterium* spp. en aislamientos provenientes de hemocultivos¹¹⁷.

Con respecto a los antibióticos no β -lactámicos, el metronidazol es uno de los más activos frente a los BGNA. Si bien en nuestro país no se han comunicado cepas resistentes^{111, 116}, hay numerosos informes de resistencia en otros países, que muestran niveles cercanos al 5 % frente a *Bacteroides* spp., *Parabacteroides* spp. y *Prevotella* spp.^{60, 81, 94}. La resistencia a este antimicrobiano se debe a la presencia de los genes *nim* que codifican para una

nitroimidazol reductasa. Estos genes pueden estar silentes y la exposición prolongada al tratamiento con metronidazol puede inducir su expresión¹⁷³. Otro antibiótico que muestra buena actividad *in vitro* es la tigeciclina. La tasa de sensibilidad a este antibiótico resultó mayor al 95 % en el último relevamiento realizado en nuestro país en aislamientos de *Bacteroides* spp. y *Parabacteroides* spp.⁵⁴ coincidente con lo observado en otros países⁶⁹.

Antibióticos como clindamicina y moxifloxacina presentan actividad variable. En nuestro medio, la resistencia a clindamicina en *Bacteroides* spp. y géneros relacionados es mayor al 40 %, por lo tanto no es recomendable utilizarla.⁵⁴ Sin embargo, es un antibiótico con muy buena actividad para los géneros *Prevotella*, *Porphyromonas* y *Fusobacterium*. Las tasas de resistencia son menores al 10 % dependiendo de la especie^{106, 113}. Con respecto a los macrólidos, la azitromicina es una droga de segunda línea para el tratamiento de infecciones odontogénicas debido a que es activa frente a *Prevotella* spp. y *Porphyromonas* spp. pero, *Fusobacterium* spp. muestran resistencia elevada (30-40 %) como para la mayoría de los macrólidos, si bien aún no hay estudios que establezcan el grupo de genes involucrados^{55, 78}.

Si bien la moxifloxacina es una nueva quinolona recomendada para el tratamiento de las infecciones por anaerobios de origen abdominal, las tasas de resistencia que presentan las especies de *Bacteroides* y *Parabacteroides*, varían entre un 10 a un 70 %, según la especie y la región geográfica en cuestión¹⁸⁷.

Los perfiles de sensibilidad de otros BGNA son menos conocidos, debido a su menor frecuencia como agentes causantes de infección o bien porque han sido recientemente descritos. Sin embargo los β -lactámicos suelen

ser los antimicrobianos de elección. En un estudio sobre diferentes especies de *Leptotrichia* aisladas de hemocultivos se observó sensibilidad a penicilina, ampicilina-sulbactama, cefoxitina, meropenem y clindamicina. El metronidazol mostró actividad variable, con un rango amplio de concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) $\leq 0,5 - \geq 32 \mu\text{g/ml}$ ³⁸. Warren *et al.* evaluaron la sensibilidad por especie del género *Desulfobrio* y de *B. wadsworthia*, si bien son pocos aislamientos, ellos muestran que todos fueron sensibles a cloranfenicol y metronidazol. La mayoría de los aislamientos fueron sensibles a imipenem, clindamicina y mostraron resistencia a penicilina y piperacilina-tazobactama. *D. fairfieldensis* fue significativamente más resistente que las otras especies. Por otra parte *B. wadsworthia* mostró resistencia variable a los antibióticos probados, con aislamientos resistentes a piperacilina-tazobactama, ceftriaxona, carbapenemes y clindamicina²¹³.

Las determinación de la sensibilidad a los antibióticos en bacterias anaerobias no se realiza de rutina debido a la complejidad que implica el cultivo de estos microorganismos, por este motivo sólo se realizarán en situaciones clínicas especiales¹¹¹. Por lo tanto, es importante conocer los perfiles de resistencia habituales de las diferentes especies para dirigir los tratamientos empíricos, así como también la detección de mecanismos de resistencia emergentes entre los BGNA.

Bibliografía

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5721-32.
2. Al Masalma M, Raoult D, Roux V. *Phocaeicola abscessus* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium isolated from a human brain abscess sample. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009;59:2232-7.
3. Alauzet C, Mory F, Carlier JP, Marchandin H, Jumas-Bilak E, Lozniewski A. *Prevotella nanceiensis* sp. nov., isolated from human clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007;57:2216-20.
4. Aldridge KE, Ashcraft D, Cambre K, Pierson CL, Jenkins SG, Rosenblatt JE. Multicenter survey of the changing *in vitro* antimicrobial susceptibilities of clinical isolates of *Bacteroides fragilis* group, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, and *Peptostreptococcus* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:1238-43.
5. Alexander CJ, Citron DM, Hunt Gerardo S, Claros MC, Talan D, Goldstein EJ. Characterization of saccharolytic *Bacteroides* and *Prevotella* isolates from infected dog and cat bite wounds in humans. *J Clin Microbiol.* 1997;35:406-11.
6. Ang MY, Dymock D, Tan JL, Thong MH, Tan QK, Wong GJ, Paterson IC, Choo SW. Genome sequence of *Fusobacterium nucleatum* strain W1481, a possible new subspecies isolated from a periodontal pocket. *Genome announcements.* 2014;2:e00009-14
7. Aroutcheva A, Ling Z, Faro S. *Prevotella bivia* as a source of lipopolysaccharide in the vagina. *Anaerobe.* 2008;14:256-60.
8. Bachy B, Bemer P, Tortellier L, Giraudeau C, Reynaud A, Corvec S. Septic arthritis due to a *Sneathia* species most closely related to *Sneathia sanguinegens*. *J Med Microbiol* 2011.60:1693-6.
9. Bae J, Park J, Chang Y, Rhee S, Kim B, Park Y. *Clostridium hastiforme* is a later synonym of *Tissierella praeacuta*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004;54:947-9.
10. Bakir MA, Kitahara M, Sakamoto M, Matsumoto M, Benno Y. *Bacteroides fingoldii* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006;56:931-5.
11. Bakir MA, Kitahara M, Sakamoto M, Matsumoto M, Benno Y. *Bacteroides intestinalis* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006;56:151-4.

12. Bakir MA, Sakamoto M, Kitahara M, Matsumoto M, Benno Y. *Bacteroides dorei* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006;56:1639-43.
13. Bando K, Muto Y, Watanabe K, Katoh N, Ueno K. Biochemical properties and purification of metallo-beta-lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991;35:371-2.
14. Barba MJ, Fernández A, Oviano M, Fernández B, Velasco D, Bou G. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of anaerobic bacteria. *Anaerobe*. 2014;30:126-8.
15. Bartlett JG. The role of anaerobic bacteria in lung abscess. *Clin Infect Dis*. 2005;40:923-5.
16. Benitez-Paez A, Belda-Ferre P, Simon-Soro A, Mira A. Microbiota diversity and gene expression dynamics in human oral biofilms. *BMC genomics*. 2014;15:311.
17. Berger MA, González Fraga S, Ibáñez ME, Sánchez Freuler AV, Fernández Canigia L. Absceso intrapélvico por *Jonquetella anthropi*. XIII Congreso Argentino de Microbiología, Resumen 069. *Rev Argent Microbiol*; 2013; 45 Supl 1:33.
18. Berger P, Adekambi T, Mallet MN, Drancourt M. *Prevotella massiliensis* sp. nov. isolated from human blood. *Res Microbiol*. 2005;156:967-73.
19. Bittar F, Richet H, Dubus JC, Reynaud-Gaubert M, Stremmer N, Sarles J, Raoult D, Rolain JM. Molecular detection of multiple emerging pathogens in sputa from cystic fibrosis patients. *PLoS One*. 2008;3:e2908.
20. Borgwardt DS, Martin AD, Van Hemert JR, Yang J, Fischer CL, Recker EN, Nair PR, Vidva R, Chandrashekariah S, Progulsk-Fox A, Drake D, Cavanaugh JE, Vali S, Zhang Y, Brogden KA. Histatin 5 binds to *Porphyromonas gingivalis* hemagglutinin B (HagB) and alters HagB-induced chemokine responses. *Scientific reports*. 2014;4:3904.
21. Brook I. Anaerobic pulmonary infections in children. *Pediatr Emerg Care*. 2004;20:636-40.
22. Brook I. The role of anaerobic bacteria in chronic suppurative otitis media in children: implications for medical therapy. *Anaerobe*. 2008;14:297-300.
23. Brook I, Frazier EH. Clinical and microbiological features of necrotizing fasciitis. *J Clin Microbiol*. 1995;33:2382-7.

24. Caiano Gil J, Calisto R, Amado J, Barreto V. *Eikenella corrodens* and *Porphyromonas asaccharolytica* pleural empyema in a diabetic patient with obstructive sleep apnea syndrome on noninvasive ventilation. Rev Port Pneumol. 2013;19:76-9.
25. Carlier JP, Bedora-Faure M, K'Ouas G, Alauzet C, Mory F. Proposal to unify *Clostridium orbiscindens* Winter et al. 1991 and *Eubacterium plautii* (Seguin 1928) Hofstad and Aasjord 1982, with description of *Flavonifractor plautii* gen. nov., comb. nov., and reassignment of *Bacteroides capillosus* to *Pseudoflavonifractor capillosus* gen. nov., comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2010;60:585-90.
26. Carlson DS, Pfadt E. Vincent and Ludwig angina: two damaging oral infections. Nursing. 2011;41:55-8.
27. CDC. Multidrug-resistant *Bacteroides fragilis*--Seattle, Washington DC. MMWR - Centers for Disease Control and Prevention 2013;62:694-6. Disponible en <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6234a2.htm>
28. Citron DM, Goldstein EJ, Merriam CV, Lipsky BA, Abramson MA. Bacteriology of moderate-to-severe diabetic foot infections and *in vitro* activity of antimicrobial agents. J Clin Microbiol. 2007;45:2819-28.
29. Citron DM, Hunt Gerardo S, Claros MC, Abrahamian F, Talan D, Goldstein EJ. Frequency of isolation of *Porphyromonas* species from infected dog and cat bite wounds in humans and their characterization by biochemical tests and arbitrarily primed-polymerase chain reaction fingerprinting. Clin Infect Dis. 1996;23 Suppl 1:S78-82.
30. Civen R, Jousimies-Somer H, Marina M, Borenstein L, Shah H, Finegold SM. A retrospective review of cases of anaerobic empyema and update of bacteriology. Clin Infect Dis. 1995;20 Suppl 2:S224-9.
31. Coats SR, Berezow AB, To TT, Jain S, Bainbridge BW, Banani KP, Darveau RP. The lipid A phosphate position determines differential host Toll-like receptor 4 responses to phylogenetically related symbiotic and pathogenic bacteria. Infect Immun. 2011;79:203-10.

32. Coats SR, Reife RA, Bainbridge BW, Pham TT, Darveau RP. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide antagonizes *Escherichia coli* lipopolysaccharide at toll-like receptor 4 in human endothelial cells. *Infect Immun.* 2003;71:6799-807.
33. Cohen-Poradosu R, Wade WG, Kasper DL. Infecciones por anaerobios: conceptos generales. En: Mandel GL, Bennett, JE, Dolin, R, editores. *Enfermedades Infecciosas. Principios y prácticas*, 7ma. edición en español. Barcelona, Elsevier España S.L., 2012, p. 858-80.
34. Cohen N, Morisset J, Emilie D. Induction of tolerance by *Porphyromonas gingivalis* on APCS: a mechanism implicated in periodontal infection. *J Dent Res.* 2004;83:429-33.
35. Coltella L, Mancinelli L, Onori M, Lucignano B, Menichella D, Sorge R, Raponi M, Mancini R, Russo C. Advancement in the routine identification of anaerobic bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013;32:1183-92.
36. Collins MD, Hoyles L, Tornqvist E, von Essen R, Falsen E. Characterization of some strains from human clinical sources which resemble *Leptotrichia sanguinegens*: description of *Sneathia sanguinegens* sp. nov., gen. nov. *Syst Appl Microbiol.* 2001;24:358-61.
37. Conrads G, Citron DM, Tyrrell KL, Horz HP, Goldstein EJ. 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences for analysis of the phylogenetic relationships among species of the genus *Porphyromonas*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2005;55:607-13.
38. Couturier MR, Slechta ES, Goulston C, Fisher MA, Hanson KE. *Leptotrichia* bacteremia in patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Microbiol.* 2012;50:1228-32.
39. Chassard C, Delmas E, Lawson PA, Bernalier-Donadille A. *Bacteroides xylanisolvens* sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008;58:1008-13.
40. De Martino SJ, Mahoudeau I, Brettes JP, Piemont Y, Monteil H, Jaulhac B. Peripartum bacteremias due to *Leptotrichia amnionii* and *Sneathia sanguinegens*, rare causes of fever during and after delivery. *J Clin Microbiol.* 2004;42:5940-3.
41. Decroix V, Goudjil S, Kongolo G, Mammeri H. '*Leptotrichia amnionii*', a newly reported cause of early onset neonatal meningitis. *J Med Microbiol.* 2013;62:785-8.

42. Downes J, Hooper SJ, Wilson MJ, Wade WG. *Prevotella histicola* sp. nov., isolated from the human oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008;58:1788-91.
43. Downes J, Munson M, Wade WG. *Dialister invisus* sp. nov., isolated from the human oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003;53:1937-40.
44. Downes J, Sutcliffe I, Tanner AC, Wade WG. *Prevotella marshii* sp. nov. and *Prevotella baroniae* sp. nov., isolated from the human oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2005;55:1551-5.
45. Downes J, Vartoukian SR, Dewhirst FE, Izard J, Chen T, Yu WH, Sutcliffe IC, Wade WG. *Pyramidobacter piscolens* gen. nov., sp. nov., a member of the phylum *Synergistetes* isolated from the human oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2009;59:972-80.
46. Downes J, Wade WG. *Prevotella fusca* sp. nov. and *Prevotella scopos* sp. nov., isolated from the human oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2011;61:854-8.
47. Elhenawy W, Debelyy MO, Feldman MF. Preferential packing of acidic glycosidases and proteases into *Bacteroides* outer membrane vesicles. *mBio*. 2014;5:e00909-14.
48. Eribe ER, Olsen I. *Leptotrichia* species in human infections. *Anaerobe*. 2008;14:131-7.
49. Euzéby JP. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature Disponible en <http://www.bacterio.net> . Consultado el 20 de noviembre de 2014.
50. Fenner L, Roux V, Ananian P, Raoult D. *Alistipes finegoldii* in blood cultures from colon cancer patients. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:1260-2.
51. Fenner L, Roux V, Mallet MN, Raoult D. *Bacteroides massiliensis* sp. nov., isolated from blood culture of a newborn. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2005;55:1335-7.
52. Fernández-Canigia L. Detección y caracterización de beta-lactamasas en bacilos Gram negativos anaerobios pigmentados aislados de localizaciones orales. Tesis Doctoral de la Universidad de Buenos Aires- Area Microbiología 2011. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.
53. Fernández-Canigia L, Cejas D, Gutkind G, Radice M. Detection and genetic characterization of beta-lactamasas in *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolated from oral cavity infections and peritonsillar abscesses. *Anaerobe*. 2015;33C:8-13.

54. Fernández-Canigia L, Litterio M, Legaria MC, Castello L, Predari SC, Di Martino A, Rossetti A, Rollet R, Carloni G, Bianchini H, Cejas D, Radice M, Gutkind G. First national survey of antibiotic susceptibility of the *Bacteroides fragilis* group: emerging resistance to carbapenems in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:1309-14.
55. Fernández Canigia L, Di Martino A, Litterio M, Castello L, Fernández MI, Rollet R, Greco G, Predari SC, Bianchini H. Comparative *in vitro* activities of four macrolides at two pH values against gram-negative anaerobic rods other than the *Bacteroides fragilis* group. *Anaerobe.* 1999;5:451-4.
56. Finegold SM, Vaisanen ML, Rautio M, Eerola E, Summanen P, Molitoris D, Song Y, Liu C, Jousimies-Somer H. *Porphyromonas uenonis* sp. nov., a pathogen for humans distinct from *P. asaccharolytica* and *P. endodontalis*. *J Clin Microbiol.* 2004;42:5298-301.
57. Finegold SM, Wexler HM. Therapeutic implications of bacteriologic findings in mixed aerobic-anaerobic infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988;32:611-6.
58. Fitzgerald C, Nachamki I. *Campylobacter* and *Arcobacter*. En: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landy ML, Warnock D W, editors. *Manual of Clinical Microbiology*, 10th edition. Washington DC, ASM Press, 2011, p. 885-9.
59. Fredricks DN, Fiedler TL, Thomas KK, Mitchell CM, Marrazzo JM. Changes in vaginal bacterial concentrations with intravaginal metronidazole therapy for bacterial vaginosis as assessed by quantitative PCR. *J Clin Microbiol.* 2009;47:721-6.
60. Gal M, Brazier JS. Metronidazole resistance in *Bacteroides* spp. carrying *nim* genes and the selection of slow-growing metronidazole-resistant mutants. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54:109-16.
61. Garcia N, Gutiérrez G, Lorenzo M, Garcia JE, Piriz S, Quesada A. Genetic determinants for *cfxA* expression in *Bacteroides* strains isolated from human infections. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62:942-7.
62. Garimella S, Inaparthi A, Herchline T. Meningitis due to *Fusobacterium necrophorum* in an adult. *BMC infectious diseases.* 2004;4:24.

63. Garrett WS, Onderdonk AB. Géneros *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas* y *Fusobacterium* (y otros bacilos anaerobios gram negativos destacados desde el punto de vista médico). En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editores. Enfermedades Infecciosas. Principios y Prácticas. 7ma. edición en español. Barcelona, Elsevier España S.L., 2012, p. 3110-18.
64. Georgalas C, Kanagalingam J, Zainal A, Ahmed H, Singh A, Patel KS. The association between periodontal disease and peritonsillar infection: a prospective study. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002;126:91-4.
65. Glazunova OO, Launay T, Raoult D, Roux V. *Prevotella timonensis* sp. nov., isolated from a human breast abscess. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007;57:883-6.
66. Goker M, Gronow S, Zeytun A, Nolan M, Lucas S, Lapidus A, Hammon N, Deshpande S, Cheng JF, Pitluck S, Liolios K, Pagani I, Ivanova N, Mavromatis K, Ovchinnikova G, Pati A, Tapia R, Han C, Goodwin L, Chen A, Palaniappan K, Land M, Hauser L, Jeffries CD, Brambilla EM, Rohde M, Detter JC, Woyke T, Bristow J, Markowitz V, Hugenholtz P, Eisen JA, Kyrpides NC, Klenk HP. Complete genome sequence of *Odoribacter splanchnicus* type strain (1651/6). *Stand Genomic Sci.* 2011;4:200-9.
67. Goncalves LF, Fermiano D, Feres M, Figueiredo LC, Teles FR, Mayer MP, Faveri M. Levels of *Selenomonas* species in generalized aggressive periodontitis. *J Periodont Res.* 2012;47:711-8.
68. Grenier D. *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles mediate coaggregation and piggybacking of *Treponema denticola* and *Lachnoanaerobaculum saburreum*. *Int J Dent.* 2013;2013:3054-76.
69. Grisold AJ, Wendelin I, Presterl E, Raggam RB, Masoud L, Badura A, Marth E. *In vitro* activity of ten antibiotics, including tigecycline, against *Bacteroides* species in Austria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007;26:525-7.
70. Guiu A, Domingo D, Correa A, Lopez-Brea M. *Leptotrichia goodfellowii* wound infection after a dog bite. *Rev Esp Quimioter.* 2012;25:220-1.
71. Gursoy M, Haraldsson G, Hyvonen M, Sorsa T, Pajukanta R, Kononen E. Does the frequency of *Prevotella intermedia* increase during pregnancy? *Oral Microbiol Immunol.* 2009;24:299-303.

72. Han YW, Shen T, Chung P, Buhimschi IA, Buhimschi CS. Uncultivated bacteria as etiologic agents of intra-amniotic inflammation leading to preterm birth. *J Clin Microbiol.* 2009;47:38-47.
73. Hardham JM, King KW, Dreier K, Wong J, Strietzel C, Eversole RR, Sfintescu C, Evans RT. Transfer of *Bacteroides splanchnicus* to *Odoribacter* gen. nov. as *Odoribacter splanchnicus* comb. nov., and description of *Odoribacter denticanis* sp. nov., isolated from the crevicular spaces of canine periodontitis patients. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008;58:103-9.
74. Hasegawa Y, Iwami J, Sato K, Park Y, Nishikawa K, Atsumi T, Moriguchi K, Murakami Y, Lamont RJ, Nakamura H, Ohno N, Yoshimura F. Anchoring and length regulation of *Porphyromonas gingivalis* Mfa1 fimbriae by the downstream gene product Mfa2. *Microbiology.* 2009;155:3333-47.
75. Hatamoto M, Kaneshige M, Nakamura A, Yamaguchi T. *Bacteroides luti* sp. nov., an anaerobic, cellulolytic and xylanolytic bacterium isolated from methanogenic sludge. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014;64:1770-4.
76. Hayashi H, Shibata K, Bakir MA, Sakamoto M, Tomita S, Benno Y. *Bacteroides coprophilus* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007;57:1323-6.
77. Hayashi H, Shibata K, Sakamoto M, Tomita S, Benno Y. *Prevotella copri* sp. nov. and *Prevotella stercorea* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007;57:941-6.
78. Hecht DW. Prevalence of antibiotic resistance in anaerobic bacteria: worrisome developments. *Clin Infect Dis.* 2004;39:92-7.
79. Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000.* 1999;20:168-238.
80. Huang TT, Tseng FY, Yeh TH, Hsu CJ, Chen YS. Factors affecting the bacteriology of deep neck infection: a retrospective study of 128 patients. *Acta Oto-Laryngol.* 2006;126:396-401.

81. Husain F, Veeranagouda Y, Hsi J, Meggersee R, Abratt V, Wexler HM. Two multidrug-resistant clinical isolates of *Bacteroides fragilis* carry a novel metronidazole resistance *nim* gene (*nimJ*). *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:3767-74.
82. Inagaki S, Kuramitsu HK, Sharma A. Contact-dependent regulation of a *Tannerella forsythia* virulence factor, BspA, in biofilms. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;249:291-6.
83. Inokuchi R, Ishida T, Maeda J, Nakajima S, Yahagi N, Matsumoto A. *Anaerobiospirillum succiniciproducens*-induced bacteremia in a healthy man. *Am J Emerg Med.* 2014;32:812 e1-3.
84. Jain S, Coats SR, Chang AM, Darveau RP. A novel class of lipoprotein lipase-sensitive molecules mediates Toll-like receptor 2 activation by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* 2013;81:1277-86.
85. Jousimies-Somer H, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler HM, Finegold SM, editors. *Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual*. 6th edition. Belmont, Star Publishing, 2002.
86. Jumas-Bilak E, Carlier JP, Jean-Pierre H, Citron D, Bernard K, Damay A, Gay B, Teyssier C, Campos J, Marchandin H. *Jonquetella anthropi* gen. nov., sp. nov., the first member of the candidate phylum *Synergistetes* isolated from man. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007;57:2743-8.
87. Jumas-Bilak E, Jean-Pierre H, Carlier JP, Teyssier C, Bernard K, Gay B, Campos J, Morio F, Marchandin H. *Dialister micraerophilus* sp. nov. and *Dialister propionicifaciens* sp. nov., isolated from human clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2005;55:2471-8.
88. Jumas-Bilak E, Roudiere L, Marchandin H. Description of *Synergistetes* phyl. nov. and emended description of the phylum *Deferribacteres* and of the family *Syntrophomonadaceae*, phylum *Firmicutes*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009;59:1028-35.
89. Jusko M, Potempa J, Karim AY, Ksiazek M, Riesbeck K, Garred P, Eick S, Blom AM. A metalloproteinase karilysin present in the majority of *Tannerella forsythia* isolates inhibits all pathways of the complement system. *J Immunol.* 2012;188:2338-49.

90. Kajiya T, Uemura T, Kajiya M, Kaname H, Hirano R, Uemura N, Tei C. Pyogenic liver abscess related to dental disease in an immunocompetent host. *Intern Med.* 2008;47:675-8.
91. Kalka-Moll WM, Wang Y, Comstock LE, Gonzalez SE, Tzianabos AO, Kasper DL. Immunochemical and biological characterization of three capsular polysaccharides from a single *Bacteroides fragilis* strain. *Infect Immun.* 2001;69:2339-44.
92. Kamada N, Nunez G. Role of the gut microbiota in the development and function of lymphoid cells. *J immunol.* 2013;190:1389-95.
93. Kato N, Kato H, Watanabe K, Ueno K. Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* with bacteremia. *Clin Infect Dis.* 1996;23 Suppl 1:S83-6.
94. Katsandri A, Avlami A, Pantazatou A, Houhoula DP, Papaparaskevas J. Dissemination of *nim*-class genes, encoding nitroimidazole resistance, among different species of Gram-negative anaerobic bacteria isolated in Athens, Greece. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58:705-6.
95. Kelesidis T, Dien Bard J, Humphries R, Ward K, Lewinski MA, Uslan DZ. First report of treatment of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* bloodstream infection with levofloxacin. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1970-3.
96. Kim MJ, Hwang KH, Lee YS, Park JY, Kook JK. Development of *Prevotella intermedia*-specific PCR primers based on the nucleotide sequences of a DNA probe Pig27. *J Microbiol Methods.* 2011;84:394-7.
97. Kim MJ, Lee YS, Park JY, Kook JK. Development of *Prevotella nigrescens*-specific PCR primers based on the nucleotide sequence of a Pn23 DNA probe. *Anaerobe.* 2011;17:32-5.
98. Kim MS, Roh SW, Bae JW. *Bacteroides faecis* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010;60:2572-6.
99. Kitahara M, Sakamoto M, Ike M, Sakata S, Benno Y. *Bacteroides plebeius* sp. nov. and *Bacteroides coprocola* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2005;55:2143-7.

100. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Jr., Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol* 2000. 2006;42:47-79.
101. Könönen E, Saarela M, Karjalainen J, Jousimies-Somer H, Alaluusua S, Asikainen S. Transmission of oral *Prevotella melaninogenica* between a mother and her young child. *Oral Microbiol Immunol*. 1994;9:310-4.
102. Könönen E, Wade WG, Citron DM. *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, and Other anaerobic Gram-negative rods. En: Versalovic J, Carroll, K.C., Funke, G., Jorgensen, J. H., Landy M. L., Warnock, D. W., editors. *Manual of Clinical Microbiology*, 10th edition. Washington DC, ASM Press, 2011, p. 858-80.
103. Koziel M, Corcoran GD, Sleator RD, Lucey B. Detection and molecular analysis of *Campylobacter ureolyticus* in domestic animals. *Gut pathogens*. 2014;6:9.
104. Krohn MA, Hillier SL, Lee ML, Rabe LK, Eschenbach DA. Vaginal *Bacteroides* species are associated with an increased rate of preterm delivery among women in preterm labor. *J Infect Dis*. 1991;164:88-93.
105. Kumagai Y, Yagishita H, Yajima A, Okamoto T, Konishi K. Molecular mechanism for connective tissue destruction by dipeptidyl aminopeptidase IV produced by the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*. 2005;73:2655-64.
106. Kuriyama T, Karasawa T, Nakagawa K, Nakamura S, Yamamoto E. Antimicrobial susceptibility of major pathogens of orofacial odontogenic infections to 11 beta-lactam antibiotics. *Oral Microbiol Immunol*. 2002;17:285-9.
107. Langendijk PS, Kulik EM, Sandmeier H, Meyer J, van der Hoeven JS. Isolation of *Desulfomicrobium orale* sp. nov. and *Desulfovibrio* strain NY682, oral sulfate-reducing bacteria involved in human periodontal disease. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001;51:1035-44.
108. Lassmann B, Gustafson DR, Wood CM, Rosenblatt JE. Reemergence of anaerobic bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2007;44:895-900.
109. Lau SK, Tang BS, Teng JL, Chan TM, Curreem SO, Fan RY, Ng RH, Chan JF, Yuen KY, Woo PC. Matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass

- spectrometry for identification of clinically significant bacteria that are difficult to identify in clinical laboratories. *J Clin Pathol*.2014;67:361-6.
110. Lawson AJ, On SL, Logan JM, Stanley J. *Campylobacter hominis* sp. nov., from the human gastrointestinal tract. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001;51:651-60.
 111. Legaria MC, Bianchini HM, Castello L, Carloni G, Di Martino A, Fernández Canigia L, Litterio M, Rollet R, Rossetti A, Predari SC. First Argentine consensus guidelines for *in vitro* antimicrobial susceptibility testing of clinically relevant anaerobic bacteria in humans/ Anaerobic Subcommittee of the Asociacion Argentina de Microbiologia. *Rev Argent Microbiol*. 2011;43:51-66.
 112. Legaria MC, Litterio M, Bianchini H, Castello L, Carloni G, Di Martino A, Predari SC, Rossetti A, Rollet R, Rocchi M, Fernández Canigia L. *Bacteroides* grupo *fragilis* resistentes a imipenem, ertapenem, doripenem y piperacilina/tazobactama: primeros aislamientos de Argentina. X Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología, 2010, resumen p. 90, Mar del Plata, Argentina.
 113. Legaria MC, Lumelsky G, Rodriguez V, Rosetti S. Clindamycin-resistant *Fusobacterium varium* bacteremia and decubitus ulcer infection. *J Clin Microbiol*. 2005;43:4293-5.
 114. Li N, Yun P, Nadkarni MA, Ghadikolaee NB, Nguyen KA, Lee M, Hunter N, Collyer CA. Structure determination and analysis of a haemolytic gingipain adhesin domain from *Porphyromonas gingivalis*. *Mol microbiol*. 2010;76:861-73.
 115. Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13:547-58.
 116. Litterio M, Bianchini H, Carloni G, Di Martino A, Fernández Canigia L, Greco G, Legaria C, Rollet R, Rossetti A, Predari SC, Castello L. *In vitro* activity of ten antimicrobial agents against anaerobic bacteria. A collaborative study, 1999-2002. *Rev Argent Microbiol*. 2004;36:130-5.
 117. Liu CY, Huang YT, Liao CH, Yen LC, Lin HY, Hsueh PR. Increasing trends in antimicrobial resistance among clinically important anaerobes and *Bacteroides fragilis* isolates causing nosocomial infections: emerging resistance to carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:3161-8.

118. Madsen IR, Justesen US. Bacteremia with *Bacteroides pyogenes* after a cat bite. J Clin Microbiol. 2011;49:3092-3.
119. Maiden MF, Cohee P, Tanner AC. Proposal to conserve the adjectival form of the specific epithet in the reclassification of *Bacteroides forsythus* Tanner et al. 1986 to the genus *Tannerella* Sakamoto et al. 2002 as *Tannerella forsythia* corrig., gen. nov., comb. nov. Request for an opinion. Int J Syst Evol Microbiol. 2003;53:2111-2.
120. Maiden MF, Tanner A, Macuch PJ. Rapid characterization of periodontal bacterial isolates by using fluorogenic substrate tests. J Clin Microbiol. 1996;34:376-84.
121. Malnick H, Williams K, Phil-Ebosie J, Levy AS. Description of a medium for isolating *Anaerobiospirillum* spp., a possible cause of zoonotic disease, from diarrheal feces and blood of humans and use of the medium in a survey of human, canine, and feline feces. J Clin Microbiol. 1990;28:1380-4.
122. Mansfield JM, Campbell JH, Bhandari AR, Jesionowski AM, Vickerman MM. Molecular analysis of 16S rRNA genes identifies potentially periodontal pathogenic bacteria and archaea in the plaque of partially erupted third molars. J Oral Maxillofac Surg. 2012;70:1507-14 e1-6.
123. Marulasiddappa V, Tejesh CA. Lemierre's syndrome presenting with septic shock. Indian J Crit Care Med. 2013;17:382-4.
124. Mavromatis K, Stackebrandt E, Munk C, Lapidus A, Nolan M, Lucas S, Hammon N, Deshpande S, Cheng JF, Tapia R, Goodwin LA, Pitluck S, Liolios K, Pagani I, Ivanova N, Mikhailova N, Huntemann M, Pati A, Chen A, Palaniappan K, Land M, Hauser L, Rohde M, Gronow S, Goker M, Detter JC, Bristow J, Eisen JA, Markowitz V, Hugenholtz P, Kyrpides NC, Klenk HP, Woyke T. Complete genome sequence of the bile-resistant pigment-producing anaerobe *Alistipes finegoldii* type strain (AHN2437(T)). Stand Genomic Sci. 2013;8:26-36.
125. Miao L, Liu Y, Li Q, Wang Z, Li H, Zhang G. Screening and sequence analysis of the hemolysin gene of *Fusobacterium necrophorum*. Anaerobe. 2010;16:402-4.
126. Mizrahi Y. NUG--necrotizing ulcerative gingivitis: a review. Refuʾat ha-peh vaha-shinayim (1993). 2014;31:41-7, 62.

127. Mombelli A. Microbiology and antimicrobial therapy of peri-implantitis. *Periodontol* 2000. 2002;28:177-89.
128. Moore C, Addison D, Wilson JM, Zeluff B. First case of *Fusobacterium necrophorum* endocarditis to have presented after the 2nd decade of life. *Tex Heart Inst J*. 2013;40:449-52.
129. Morotomi M, Nagai F, Sakon H, Tanaka R. *Dialister succinatiphilus* sp. nov. and *Barnesiella intestinhominis* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008;58:2716-20.
130. Morotomi M, Nagai F, Watanabe Y. *Parasutterella secunda* sp. nov., isolated from human faeces and proposal of *Sutterellaceae* fam. nov. in the order *Burkholderiales*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2011;61:637-43.
131. Morotomi M NF, Sakon H. Genus *Megamonas* should be placed in the lineage of *Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Acidaminococcaceae; Megamonas*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2007;57:1673-4.
132. Nagai F, Morotomi M, Sakon H, Tanaka R. *Parasutterella excrementihominis* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Alcaligenaceae* isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2009;59:1793-7.
133. Nagai F, Morotomi M, Watanabe Y, Sakon H, Tanaka R. *Alistipes indistinctus* sp. nov. and *Odoribacter laneus* sp. nov., common members of the human intestinal microbiota isolated from faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010;60:1296-302.
134. Nagy E, Urban E. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience. *Clin Microbiol Infect*. 2010.
135. Nakagawa I, Inaba H, Yamamura T, Kato T, Kawai S, Ooshima T, Amano A. Invasion of epithelial cells and proteolysis of cellular focal adhesion components by distinct types of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *Infect Immun*. 2006;74:3773-82.
136. Nakao R, Takashiba S, Kosono S, Yoshida M, Watanabe H, Ohnishi M, Senpuku H. Effect of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles on gingipain-mediated detachment of cultured oral epithelial cells and immune responses. *Microbes infect*. 2014;16:6-16.

137. Nozawa Y, Joshita S, Fukushima M, Sugiyama Y, Ichikawa Y, Kimura T, Morita S, Kamijo A, Umemura T, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Tanaka E. A case of pyogenic liver abscess infected with *Fusobacterium necrophorum* depicted by microscopy and confirmed by tissue culture. *Intern Med.* 2011;50:1815-9.
138. Nyfors S, Könönen E, Syrjänen R, Komulainen E, Jousimies-Somer H. Emergence of penicillin resistance among *Fusobacterium nucleatum* populations of commensal oral flora during early childhood. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51:107-12.
139. O'Donovan D, Corcoran GD, Lucey B, Sleator RD. *Campylobacter ureolyticus*: a portrait of the pathogen. *Virulence.* 2014;5:498-506.
140. Otto BR, van Dooren SJ, Dozois CM, Luirink J, Oudega B. *Escherichia coli* hemoglobin protease autotransporter contributes to synergistic abscess formation and heme-dependent growth of *Bacteroides fragilis*. *Infect Immun.* 2002;70:5-10.
141. Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clin Chem.* 2015;61:100-11.
142. Patrick S, Houston S, Thacker Z, Blakely GW. Mutational analysis of genes implicated in LPS and capsular polysaccharide biosynthesis in the opportunistic pathogen *Bacteroides fragilis*. *Microbiology.* 2009;155:1039-49.
143. Persson R, Hitti J, Verhelst R, Vaneechoutte M, Hirschi R, Weibel M, Rothen M, Temmerman M, Paul K, Eschenbach D. The vaginal microflora in relation to gingivitis. *BMC Infect Dis.* 2009;9:6.
144. Posch G, Sekot G, Friedrich V, Megson ZA, Koerdt A, Messner P, Schaffer C. Glycobiology aspects of the periodontal pathogen *Tannerella forsythia*. *Biomolecules.* 2012;2:467-82.
145. Pumbwe L, Skilbeck CA, Nakano V, Avila-Campos MJ, Piazza RM, Wexler HM. Bile salts enhance bacterial co-aggregation, bacterial-intestinal epithelial cell adhesion, biofilm formation and antimicrobial resistance of *Bacteroides fragilis*. *Microb Pathog.* 2007;43:78-87.
146. Rangarajan M, Aduse-Opoku J, Paramonov N, Hashim A, Bostanci N, Fraser OP, Tarelli E, Curtis MA. Identification of a second lipopolysaccharide in *Porphyromonas gingivalis* W50. *J Bacteriol.* 2008;190:2920-32.

147. Rautio M, Eerola E, Vaisanen-Tunkelrott ML, Molitoris D, Lawson P, Collins MD, Jousimies-Somer H. Reclassification of *Bacteroides putredinis* (Weinberg et al., 1937) in a new genus *Alistipes* gen. nov., as *Alistipes putredinis* comb. nov., and description of *Alistipes finegoldii* sp. nov., from human sources. *Syst Appl Microbiol.* 2003;26:182-8.
148. Rautio M, Saxen H, Siitonen A, Nikku R, Jousimies-Somer H. Bacteriology of histopathologically defined appendicitis in children. *Pediatr Infect Dis J.* 2000;19:1078-83.
149. Reid G. When microbe meets human. *Clin Infect Dis.* 2004;39:827-30.
150. Riordan T. Human infection with *Fusobacterium necrophorum* (Necrobacillosis), with a focus on Lemierre's syndrome. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:622-59.
151. Robert C, Chassard C, Lawson PA, Bernalier-Donadille A. *Bacteroides cellulosilyticus* sp. nov., a cellulolytic bacterium from the human gut microbial community. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007;57:1516-20.
152. Robertson KP, Smith CJ, Gough AM, Rocha ER. Characterization of *Bacteroides fragilis* hemolysins and regulation and synergistic interactions of HlyA and HlyB. *Infect Immun.* 2006;74:2304-16.
153. Rocha ER, Herren CD, Smalley DJ, Smith CJ. The complex oxidative stress response of *Bacteroides fragilis*: the role of OxyR in control of gene expression. *Anaerobe.* 2003;9:165-73.
154. Rossi M, Hanninen ML, Revez J, Hannula M, Zanoni RG. Occurrence and species level diagnostics of *Campylobacter* spp., enteric *Helicobacter* spp. and *Anaerobiospirillum* spp. in healthy and diarrheic dogs and cats. *Vet microbiol.* 2008;129:304-14.
155. Sahin O, Fitzgerald C, Stroika S, Zhao S, Sippy RJ, Kwan P, Plummer PJ, Han J, Yaeger MJ, Zhang Q. Molecular evidence for zoonotic transmission of an emergent, highly pathogenic *Campylobacter jejuni* clone in the United States. *J Clin Microbiol.* 2012;50:680-7.
156. Sakamoto M, Benno Y. Reclassification of *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides goldsteinii* and *Bacteroides merdae* as *Parabacteroides distasonis* gen. nov., comb. nov., *Parabacteroides goldsteinii* comb. nov. and *Parabacteroides merdae* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006;56:1599-605.

157. Sakamoto M, Kitahara M, Benno Y. *Parabacteroides johnsonii* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007;57:293-6.
158. Sakamoto M, Kumada H, Hamada N, Takahashi Y, Okamoto M, Bakir MA, Benno Y. *Prevotella falsenii* sp. nov., a *Prevotella intermedia*-like organism isolated from monkey dental plaque. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009;59:319-22.
159. Sakamoto M, Ohkuma M. *Porphyromonas crevioricanis* is an earlier heterotypic synonym of *Porphyromonas cansulci* and has priority. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013;63:454-7.
160. Sakamoto M, Ohkuma M. Usefulness of the hsp60 gene for the identification and classification of Gram-negative anaerobic rods. *J Med Microbiol.* 2010;59:1293-302.
161. Sakamoto M, Ohkusu K, Masaki T, Kako H, Ezaki T, Benno Y. *Prevotella pleuritidis* sp. nov., isolated from pleural fluid. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007;57:1725-8.
162. Sakamoto M, Rocas IN, Siqueira JF, Jr., Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol.* 2006;21:112-22.
163. Sakamoto M, Suzuki M, Huang Y, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. *Prevotella shahii* sp. nov. and *Prevotella salivae* sp. nov., isolated from the human oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004;54:877-83.
164. Sakamoto M, Suzuki M, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner et al. 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002;52:841-9.
165. Sakamoto M, Suzuki N, Benno Y. hsp60 and 16S rRNA gene sequence relationships among species of the genus *Bacteroides* with the finding that *Bacteroides suis* and *Bacteroides tectus* are heterotypic synonyms of *Bacteroides pyogenes*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010;60:2984-90.
166. Sakamoto M, Suzuki N, Matsunaga N, Koshihara K, Seki M, Komiya H, Benno Y. *Parabacteroides gordonii* sp. nov., isolated from human blood cultures. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009;59:2843-7.
167. Sakamoto M, Suzuki N, Okamoto M. *Prevotella aurantiaca* sp. nov., isolated from the human oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010;60:500-3.

168. Sakon H, Nagai F, Morotomi M, Tanaka R. *Sutterella parvirubra* sp. nov. and *Megamonas funiformis* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008;58:970-5.
169. Salyers AA. *Bacteroides* of the human lower intestinal tract. *Annu Rev Microbiol.* 1984;38:293-313.
170. Sang SG, Rong H, Wang JB, Xie YQ. Effects of *Porphyromonas gingivalis* extracellular vesicles on human periodontal ligament fibroblasts. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7:379-83.
171. Santiago GL, Tency I, Verstraelen H, Verhelst R, Trog M, Temmerman M, Vancoillie L, Decat E, Cools P, Vaneechoutte M. Longitudinal qPCR study of the dynamics of *L. crispatus*, *L. iners*, *A. vaginae*, (sialidase positive) *G. vaginalis*, and *P. bivia* in the vagina. *PLoS One.* 2012;7:e45281.
172. Savolainen S, Jousimies-Somer HR, Makitie AA, Ylikoski JS. Peritonsillar abscess. Clinical and microbiologic aspects and treatment regimens. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1993;119:521-4.
173. Schaumann R, Petzold S, Fille M, Rodloff AC. Inducible metronidazole resistance in *nim*-positive and *nim*-negative *Bacteroides fragilis* group strains after several passages metronidazole containing columbia agar plates. *Infection.* 2005;33:368-72.
174. Schoenborn L, Abdollahi H, Tee W, Dyll-Smith M, Janssen PH. A member of the delta subgroup of proteobacteria from a pyogenic liver abscess is a typical sulfate reducer of the genus *Desulfovibrio*. *J Clin Microbiol.* 2001;39:787-90.
175. Schrimsher JM, McGuirk JP, Hinthorn DR. *Leptotrichia trevisanii* sepsis after bone marrow transplantation. *Emerg Infect Dis* 2013.19:1690-1.
176. Sears CL. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a rogue among symbiotes. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:349-69.
177. Shah HN, Collins DM. Prevotella, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. *Int J Syst Bacteriol.* 1990;40:205-8.
178. Shah HN, Collins DM. Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a new genus, *Porphyromonas*. *Int J Syst Bacteriol.* 1988;38:128-31.

179. Shah HN, Keys CJ, Schmid O, Gharbia SE. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and proteomics: a new era in anaerobic microbiology. *Clin Infect Dis*. 2002;35:S58-64.
180. Shah HN, Olsen I, Bernard K, Finegold SM, Gharbia S, Gupta RS. Approaches to the study of the systematics of anaerobic, gram-negative, non-sporeforming rods: current status and perspectives. *Anaerobe*. 2009;15:179-94.
181. Sharma A, Inagaki S, Honma K, Sfintescu C, Baker PJ, Evans RT. *Tannerella forsythia*-induced alveolar bone loss in mice involves leucine-rich-repeat BspA protein. *J Dent Res*. 2005;84:462-7.
182. Simmon K MS, Reller L, Petti C. Genotypic diversity of anaerobic isolates from bloodstream infections. *J Clin Microbiol*. 2008;46:1596-601.
183. Singh A, Wyant T, Anaya-Bergman C, Aduse-Opoku J, Brunner J, Laine ML, Curtis MA, Lewis JP. The capsule of *Porphyromonas gingivalis* leads to a reduction in the host inflammatory response, evasion of phagocytosis, and increase in virulence. *Infect Immun*. 2011;79:4533-42.
184. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. *Campylobacter gracilis* and *Campylobacter rectus* in primary endodontic infections. *Int Endod J*. 2003;36:174-80.
185. Smalley JW, Thomas MF, Birss AJ, Withnall R, Silver J. A combination of both arginine- and lysine-specific gingipain activity of *Porphyromonas gingivalis* is necessary for the generation of the micro-oxo bishaem-containing pigment from haemoglobin. *Biochem J*. 2004;379:833-40.
186. Smayevsky J, Fernández Canigia L, Lanza A, Bianchini H. Vaginal microflora associated with bacterial vaginosis in nonpregnant women: reliability of sialidase detection. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2001;9:17-22.
187. Snyderman DR, Jacobus NV, McDermott LA, Golan Y, Goldstein EJ, Harrell L, Jenkins S, Newton D, Pierson C, Rosenblatt J, Venezia R, Gorbach SL, Queenan AM, Hecht DW. Update on resistance of *Bacteroides fragilis* group and related species with special attention to carbapenems 2006-2009. *Anaerobe*. 2011;17:147-51.
188. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25:134-44.

189. Soki J, Eitel Z, Urban E, Nagy E. Molecular analysis of the carbapenem and metronidazole resistance mechanisms of *Bacteroides* strains reported in a Europe-wide antibiotic resistance survey. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;41:122-5.
190. Song Y, Kononen E, Rautio M, Liu C, Bryk A, Eerola E, Finegold SM. *Alistipes onderdonkii* sp. nov. and *Alistipes shahii* sp. nov., of human origin. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006;56:1985-90.
191. Song Y, Liu C, Bolanos M, Lee J, McTeague M, Finegold SM. Evaluation of 16S rRNA sequencing and reevaluation of a short biochemical scheme for identification of clinically significant *Bacteroides* species. *J Clin Microbiol*. 2005;43:1531-7.
192. Song Y, Liu C, Lee J, Bolanos M, Vaisanen ML, Finegold SM. *Bacteroides goldsteinii* sp. nov. isolated from clinical specimens of human intestinal origin. *J Clin Microbiol*. 2005;43:4522-7.
193. Song YL, Liu CX, McTeague M, Finegold SM. *Bacteroides nordii* sp. nov. and *Bacteroides salyersae* sp. nov. isolated from clinical specimens of human intestinal origin. *J Clin Microbiol*. 2004;42:5565-70.
194. Srour ML, Watt B, Phengdy B, Khansoulivong K, Harris J, Bennett C, Strobel M, Dupuis C, Newton PN. Noma in Laos: stigma of severe poverty in rural Asia. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;78:539-42.
195. Strauss J, White A, Ambrose C, McDonald J, Allen-Vercoe E. Phenotypic and genotypic analyses of clinical *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium periodonticum* isolates from the human gut. *Anaerobe*. 2008;14:301-9.
196. Summanen PH, Durmaz B, Vaisanen ML, Liu C, Molitoris D, Eerola E, Helander IM, Finegold SM. *Porphyromonas somerae* sp. nov., a pathogen isolated from humans and distinct from *Porphyromonas levii*. *J Clin Microbiol*. 2005;43:4455-9.
197. Summanen PH, Lawson PA, Finegold SM. *Porphyromonas bennonis* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2009;59:1727-32.
198. Suzuki N, Fukamachi H, Arimoto T, Yamamoto M, Igarashi T. Contribution of hly homologs to the hemolytic activity of *Prevotella intermedia*. *Anaerobe*. 2012;18:350-6.

199. Tadepalli S, Narayanan SK, Stewart GC, Chengappa MM, Nagaraja TG. *Fusobacterium necrophorum*: a ruminal bacterium that invades liver to cause abscesses in cattle. *Anaerobe*. 2009;15:36-43.
200. Takai S, Kuriyama T, Yanagisawa M, Nakagawa K, Karasawa T. Incidence and bacteriology of bacteremia associated with various oral and maxillofacial surgical procedures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005;99:292-8.
201. Talan DA, Citron DM, Abrahamian FM, Moran GJ, Goldstein EJ. Bacteriologic analysis of infected dog and cat bites. Emergency Medicine Animal Bite Infection Study Group. *N Engl J Med*. 1999;340:85-92.
202. Tanner A, Maiden MF, Paster BJ, Dewhirst FE. The impact of 16S ribosomal RNA-based phylogeny on the taxonomy of oral bacteria. *Periodontol 2000*. 1994;5:26-51.
203. Tanner A, Stillman N. Oral and dental infections with anaerobic bacteria: clinical features, predominant pathogens, and treatment. *Clin Infect Dis*. 1993;16 Suppl 4:S304-9.
204. Thaiss CA, Levy M, Suez J, Elinav E. The interplay between the innate immune system and the microbiota. *Curr Opin Immunol*. 2014;26:41-8.
205. Thilesen CM, Nicolaidis M, Lokebo JE, Falsen E, Jorde AT, Muller F. *Leptotrichia amnionii*, an emerging pathogen of the female urogenital tract. *J Clin Microbiol*. 2007;45:2344-7.
206. Tyrrell KL, Warren YA, Citron DM, Goldstein EJ. Re-assessment of phenotypic identifications of *Bacteroides putredinis* to *Alistipes* species using molecular methods. *Anaerobe*. 2011;17:130-4.
207. Ulrich M, Beer I, Braitmaier P, Dierkes M, Kummer F, Krismer B, Schumacher U, Grapler-Mainka U, Riethmuller J, Jensen PO, Bjarnsholt T, Hoiby N, Bellon G, Doring G. Relative contribution of *Prevotella intermedia* and *Pseudomonas aeruginosa* to lung pathology in airways of patients with cystic fibrosis. *Thorax*. 2010;65:978-84.
208. van Winkelhoff AJ, van Steenberghe TJ, de Graaff J. *Porphyromonas (Bacteroides) endodontalis*: its role in endodontal infections. *J Endod*. 1992;18:431-4.

209. van Winkelhoff AJ, van Steenberghe TJ, Kippuw N, De Graaff J. Further characterization of *Bacteroides endodontalis*, an asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species from the oral cavity. *J Clin Microbiol*. 1985;22:75-9.
210. Verstrecken I, Laleman W, Wauters G, Verhaegen J. *Desulfovibrio desulfuricans* bacteremia in an immunocompromised host with a liver graft and ulcerative colitis. *J Clin Microbiol* 2012;50:199-201.
211. Wang M, Liang S, Hosur KB, Domon H, Yoshimura F, Amano A, Hajishengallis G. Differential virulence and innate immune interactions of Type I and II fimbrial genotypes of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol*. 2009;24:478-84.
212. Warren RL, Freeman DJ, Pleasance S, Watson P, Moore RA, Cochrane K, Allen-Vercoe E, Holt RA. Co-occurrence of anaerobic bacteria in colorectal carcinomas. *Microbiome*. 2013;1:16.
213. Warren YA, Citron DM, Merriam CV, Goldstein EJ. Biochemical differentiation and comparison of *Desulfovibrio* species and other phenotypically similar genera. *J Clin Microbiol*. 2005;43:4041-5.
214. Watanabe Y, Nagai F, Morotomi M, Sakon H, Tanaka R. *Bacteroides clarus* sp. nov., *Bacteroides fluxus* sp. nov. and *Bacteroides oleiciplenus* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010;60:1864-9.
215. Wexler HM. *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20:593-621.
216. Wiggins R, Hicks SJ, Soothill PW, Millar MR, Corfield AP. Mucinases and sialidases: their role in the pathogenesis of sexually transmitted infections in the female genital tract. *Sex Transm Infect*. 2001;77:402-8.
217. Willems A, Collins MD. Reclassification of *Oribaculum cationiae* (Moore and Moore 1994) as *Porphyromonas cationiae* comb. nov. and emendation of the genus *Porphyromonas*. *Int J Syst Bacteriol*. 1995;45:578-81.
218. Woo PC, Wong SS, Teng JL, Leung KW, Ngan AH, Zhao DQ, Tse H, Lau SK, Yuen KY. *Leptotrichia hongkongensis* sp. nov., a novel *Leptotrichia* species with the oral cavity as its natural reservoir. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2010;11:391-401.

219. Wu CC, Johnson JL, Moore WE, Moore LV. Emended descriptions of *Prevotella denticola*, *Prevotella loescheii*, *Prevotella veroralis*, and *Prevotella melaninogenica*. *Int J Syst Bacteriol.* 1992;42:536-41.
220. Wybo I, Pierard D, Verschraegen I, Reynders M, Vandoorslaer K, Claeys G, Delmee M, Glupczynski Y, Gordts B, Ieven M, Melin P, Struelens M, Verhaegen J, Lauwers S. Third Belgian multicentre survey of antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59:132-9.
221. Xu J, Bjursell MK, Himrod J, Deng S, Carmichael LK, Chiang HC, Hooper LV, Gordon JI. A genomic view of the human-*Bacteroides thetaiotaomicron* symbiosis. *Science.* 2003;299:2074-6.
222. Yamasaki Y, Nomura R, Nakano K, Naka S, Matsumoto-Nakano M, Asai F, Ooshima T. Distribution of periodontopathic bacterial species in dogs and their owners. *Archives of oral biology.* 2012;57:1183-8.
223. Zárate MS, Romano V, Nievas J, Smayevsky J. Utility of MALDI-TOF MS for the identification of anaerobic bacteria. *Rev Argent Microbiol.* 2014;46:98-102.
224. Zhang L, Lee H, Grimm MC, Riordan SM, Day AS, Lemberg DA. *Campylobacter concisus* and inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20:1259-67.

Tabla 1. Distribución de los géneros que se aíslan con más frecuencia en infecciones en humanos según el sitio de infección

Sitio anatómico	Géneros bacterianos aislados
Sistema nervioso central	<i>Bacteroides, Dialister, Fusobacterium, Porphyromonas</i>
Cavidad oral	
Abscesos	<i>Dialister, Fusobacterium, Prevotella, Porphyromonas</i>
Infecciones endodontales	<i>Centipeda, Dialister, Fusobacterium, Porphyromonas,</i>
Enfermedad periodontal	<i>Prevotella, Tannerella</i>
Infecciones periimplantes	<i>Desulfomicrobium, Dialister, Fusobacterium,</i>
Infección odontogénica diseminada	<i>Porphyromonas, Prevotella, Selenomonas, Tannerella</i> <i>Fusobacterium, Porphyromonas, Prevotella, Tannerella</i>
Oído, senos paranasales y garganta	<i>Fusobacterium, Prevotella</i> <i>Fusobacterium, Prevotella</i>
Infección respiratoria baja	<i>Bacteroides, Dialister, Fusobacterium, Porphyromonas,</i> <i>Prevotella, Selenomonas</i>
Abdomen	
Abscesos e Infección apendicular	<i>Alistipes, Bacteroides, Bilophila, Fusobacterium,</i> <i>Parabacteroides, Porphyromonas, Sutterella,</i>
Peritonitis	<i>Odoribacter</i>
Diarrea	<i>Alistipes, Bacteroides, Desulfovibrio, Parabacteroides,</i> <i>Porphyromonas, Sutterella</i> <i>Anaerobiospirillum, Bacteroides, Campylobacter</i>
Tracto urogenital	
Abscesos	<i>Bacteroides, Prevotella</i>
Vaginosis bacteriana	<i>Leptotrichia, Porphyromonas, Prevotella, Sneathia,</i>
Corioamnionitis	<i>Tannerella</i>
Infecciones perinatales en nacimientos pretérmino	<i>Dialister, Fusobacterium, Leptotrichia, Porphyromonas,</i> <i>Sneathia</i>
Infecciones urinarias	<i>Fusobacterium, Leptotrichia, Sneathia</i> <i>Bacteroides, Dialister, Leptotrichia, Prevotella</i>
Piel y tejidos blandos	
Abscesos	<i>Bacteroides, Dialister, Fusobacterium, Jonquetella,</i>
Úlceras y lesiones crónicas	<i>Porphyromonas, Prevotella</i>
Mordeduras animales	<i>Bacteroides, Dialister, Porphyromonas, Prevotella</i>

Mordeduras humanas	<i>Bacteroides, Fusobacterium, Porphyromonas, Prevotella Dialister, Fusobacterium, Prevotella</i>
Hueso y articulaciones	
Artritis	<i>Bacteroides, Porphyromonas, Tannerella</i>
Osteomielitis	<i>Bacteroides, Fusobacterium, Porphyromonas</i>
Sistema cardiovascular	
Bacteriemia	<i>Alistipes, Anaerobiospirillum, Bacteroides, Bilophila,</i>
Endocarditis	<i>Desulfovibrio, Dialister, Fusobacterium, Leptotrichia,</i>
Pericarditis	<i>Odoribacter, Parabacteroides, Porphyromonas, Prevotella, Sneathia Bacteroides, Fusobacterium, Leptotrichia Bacteroides, Fusobacterium</i>

Tabla 2. Características de los géneros que representan los bacilos gram negativos anaerobios aislados de muestras clínicas

Género (especie tipo)	Morfología	Sensible a			Movilidad	Pigmento	Des. 20%bilis	Catalasa	Indol	Nitrate	Ferm. H. carbono
		Vc	Kn	Co							
<i>Bacteroides sensu stricto</i> (<i>B. fragilis</i>)	corto	R	R	R	-	-	+	-	v	-	+
<i>Alistipes</i> (<i>A. putredinis</i>)	corto	R	R	R	-	v	v	v	v	-	+
<i>Odoribacter</i> (<i>O. splanchnicus</i>)	pleom.	R	R	R	-	-	v	v	+	-	v
<i>Porphyromonas</i> (<i>P. asaccharolytica</i>)	v	S	R	R	-	+	-	v	v	-	v
<i>Parabacteroides</i> (<i>P. distasonis</i>)	corto	R	R	R	-	-	+	v	-	-	+
<i>Tannerella</i> (<i>T. forsythia</i>)	pleom.	R	S	S	-	-	-	v	-	-	-
<i>Prevotella</i> (<i>P. melaninogenica</i>)	c-b	R	v	v	-	v	-	-	v	-	+
<i>Fusobacterium</i> (<i>F. nucleatum</i>)	v	R	S	S	-	-	v	-	v	-	v
<i>Leptotrichia</i> (<i>L. buccalis</i>)	v	R	S	S	-	-	-	v	-	-	+
<i>Dialister</i> ^a (<i>D. pneumosintes</i>)	cocoide	R	S	V	-	-	-	-	-	-	-
<i>Selenomonas</i> (<i>S. sputigena</i>)	curvo	R	S	V	+	-	-	-	-	+	+
<i>Sutterella</i> ^a (<i>S. wadsworthensis</i>)	recto	R	S	S	-	-	v	-	-	v	-
<i>Bilophila</i> (<i>B. wadsworthia</i>)	recto	R	S	S	-	-	+	+	-	+	-
<i>Desulfovibrio</i> (<i>D. desulfuricans</i>)	curvo	R	S	R	+	+	v	v	-	v	-
<i>Campylobacter</i> ^a (<i>C. curvus</i>)	curvo	R	S	S	+	-	v	v	-	+	-
<i>Anaerobiospirillum</i> (<i>A. succiniproducens</i>)	espiral, largo	R	S	v	+	-	v	-	-	-	+

Pleom. : pleomórfico; c-b: cocobacilo; Vc: vancomicina (5 µg); Kn: kanamicina (1000 µg); Co: colistina (30 µg). Pigmento: varía de tostado a negro en agar sangre, puede aparecer luego de 2 semanas de

incubación. Símbolos: +, positivo; -, negativo; v, variable. ^a pueden desarrollar en atmósfera microaeróbica. Tabla adaptada de Könönen E, Wade W y Citron D.¹⁰²; Fitzgerald C y Nachamki I, Manual of Clinical Microbiology, 10th ed., 2011⁵⁸.

Tabla 3. Esquema de identificación de *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Odoribacter*^a y *Alistipes*

Especies	Producción							Fermentación							
	Indol	Catalasa	Esculina	α -fucosidasa	α -arabinosa	β -glucosidasa	β -glucuronidasa	Arabinosa	Celobiosa	Ramnosa	Salicina	Sacarosa	Trealosa	Xilano	Xilosa
<i>B. caccae</i>	-	-	+	+	+	+	-	+	v	v	v	+	+	-	+
<i>B. cellulosilyticus</i>	ND	-	w	w	+	+	-	w	w	ND	w	+	-	w	+
<i>B. clarus</i> ^b	+	-	+	-	-	ND	-	-	+	+	w	+	w	ND	+
<i>B. coprocola</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	ND	+
<i>B. coprophilus</i>	-	ND	-	+	-	+	-	-	w	-	-	+	ND	ND	-
<i>B. dorei</i>	-	ND	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	ND	+
<i>B. eggerthii</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	v	v	-	-	-	+	+
<i>B. faecis</i>	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	ND	+
<i>B. finegoldii</i>	-	ND	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	ND	+
<i>B. fluxus</i> ^b	+	-	+	+	-	ND	+	+	+	+	+	+	+	ND	+
<i>B. fragilis</i>	-	+	+	+	-	+	-	-	v	-	-	+	-	-	+
<i>B. intestinalis</i>	+	ND	+	+	+	ND	-	+	+	+	-	+	-	ND	+
<i>B. massiliensis</i>	-	-	v	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	ND	-
<i>B. nordii</i>	+	-	+	-	-	+	ND	-	+	+	-	+	-	-	+
<i>B. oleiciplenus</i> ^b	+	+	+	-	-	ND	-	+	+	+	+	+	+	ND	+
<i>B. ovatus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. plebeius</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	ND	+
<i>B. pyogenes</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	v	-	-	-
<i>B. salyersiae</i>	+	-	+	-	-	+	ND	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>B. stercoris</i>	+	v	v	v	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
<i>B. thetaiotaomicron</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	V	+	-	+	+	-	+
<i>B. uniformis</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+
<i>B. vulgatus</i>	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	v	+
<i>B. xylanisolvens</i>	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 3. continuación

Especies	Producción							Fermentación							
	Indol	Catalasa	Esculina	α -fucosidasa	α -arabinosa	β -glucosidasa	β -glucuronidasa	Arabinosa	Celobiosa	Ramnosa	Salicina	Sacarosa	Trealosa	Xylan	Xilosa
<i>O. laneus</i> ^b	+	-	+	+	-	-	w	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>O. splanchnicus</i>	+	v	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. distasonis</i>	-	+	+	-	+	+	-	-	+	v	+	+	+	-	+
<i>P. goldsteinii</i>	-	v	+	-	-	+	v	-	+	+	-	+	+	-	+
<i>P. gordonii</i>	-	v	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	ND	+
<i>P. johnsonii</i>	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	ND	+
<i>P. merdae</i>	-	-	+	-	+	-	+	-	v	v	v	+	+	-	+
<i>A. putredinis</i> ^{c,e}	+	w	-	-	-	-	ND								
<i>A. fingoldii</i> ^{d,1}	+	-	v	+	ND	-	ND								
<i>A. onderdonkii</i> ^{d,f,g}	+	-	v	-	v	-	ND								
<i>A. shahii</i> ^{d,e,f,g}	+	-	+	+	-	+	-								

^aAdaptado de Könönen E, Wade W y Citron D, Manual of Clinical Microbiology, 10th ed., 2011¹⁰², ^b Especies nuevas, resultados basados en una sola cepa. Símbolos: +, positivo; -: negativo; v: variable; w: reacción débil; ND: dato no disponible. Los resultados de las pruebas enzimáticas pueden variar de acuerdo al sustrato utilizado. ^cno pigmentada, sensible a bilis al 20% Rautio, M¹⁴⁷, ^dEspecies pigmentadas marrón claro en agar sangre, se intensifica con el tiempo de incubación ^easacarolítico. ^fdébilmente. sacarolítico. ^gfermenta rafinosa y manosa en API Rapid ID 32 A, Song, Y¹⁹⁰.

Tabla 4. Esquema de identificación por pruebas bioquímicas de las especies de *Porphyromonas*^a

Especie	Producción de							Fermentación de hidratos de carbono	Hábitat
	Pigmento	Indol	Catalasa	α -fucosidasa	β -NAG	Tripsina	Quimiotripsina		
<i>P. asaccharolytica</i>	+	+	-	+	-	-	-	-	Humana (no oral)
<i>P. bennonis</i>	w	-	v	-	+	-	+	-	Humana (no oral)
<i>P. catoniae</i>	-	-	-	+	+	v	+	w	Humana oral
<i>P. endodontalis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	Humana oral
<i>P. gingivalis</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	Humana oral
<i>P. somerae</i>	+	-	-	-	+	-	+	w	Humana (no oral)
<i>P. uenonis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	Humana (no oral)
<i>P. cangingivalis</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	Animal
<i>P. canoris</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	Animal
<i>P. cansulci</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	Animal
<i>P. circumdentaria</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	Animal
<i>P. crevioricanis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	Animal
<i>P. gingivicanis</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	Animal
<i>P. gulae</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	Animal
<i>P. levii</i>	+	-	-	-	+	-	+	w	Animal
<i>P. macacae</i>	+	+	+	-	+	+	+	w	Animal

^aAdaptado de Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual. 6th ed., 2002⁸⁵ y Könönen E, Wade W y Citron D, Manual of Clinical Microbiology, 10th ed., 2011¹⁰². Símbolos: +, positivo; - : negativo; v: variable; w: reacción débil. β -NAG: N-acetil- β -glucosaminidasa.

Tabla 5. Esquema de identificación por pruebas bioquímicas de las especies de *Prevotella*^a

Especie	Producción de								Fermentación de						Observaciones ^b		
	Pigmento	Indol	Lipasa	α -glucosidasa	α -fucosidasa	β -galactosidasa	β -NAG	Hidrólisisgelatina	Hidrólisisesculina	Celobiosa	Lactosa	Manosa	Sacarosa	Arabinosa		Rafinosa	Salicina
<i>P. aurantiaca</i> ^c	+	+	ND	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	Marrón oscuro/negro
<i>P. corporis</i>	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	Marrón
<i>P. denticola</i>	v	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	Marrón
<i>P. falseni</i> ^{c,e}	+	+	ND	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	Marrón a negro
<i>P. fusca</i> ^c	+	-	ND	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	w	Marrón-naranja central ^d
<i>P. histicola</i>	v	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	Variable, marrón rojizo ^f
<i>P. intermedia</i>	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	v	+	-	v	-	Marrón oscuro/negro
<i>P. loeschii</i>	+	-	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	Marrón
<i>P. melaninogenica</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	v	-	+	+	+	-	+	-	Marrón
<i>P. micans</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	Marrón/negro
<i>P. nigrescens</i>	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	Marrón oscuro/negro
<i>P. pallens</i>	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	Beige claro
<i>P. shahii</i>	+	-	-	+	w	w	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	Tostado a beige claro
<i>P. tanneriae</i>	v	-	-	+	+	+	+	+	-	-	v	v	v	-	v	-	Marrón
<i>P. scopos</i> ^c	+	-	ND	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	Marrón oscuro central ^d
<i>P. amnii</i>	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	ND	-	ND	ND	-	
<i>P. baroniae</i>	-	-	-	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	-	+	+	Colonias opacas, circulares y convexas

<i>P. bergensis</i>	-	-	-	+	-	+	V	-	+	+	+	+	-	+	-	+	
<i>P. bivia</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	Puede mostrar colonias amarronadas
<i>P. buccae</i>	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>P. buccalis</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	
<i>P. copri</i>	-	-	-	+	-	V	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	
<i>P. dentalis</i>	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	W	+	+	-	
<i>P. disiens</i>	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Puede mostrar colonias amarronadas
<i>P. enoeca</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	V	-	+	V	-	-	-	-	
<i>P. heparinolytica</i>	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	
<i>P. maculosa</i>	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>P. marshii</i>	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	V	-	-	-	-	
<i>P. multiformis</i>	-	-	-	+	V	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	Colonias de diferentes tamaños. Similar a <i>P. denticola</i> 95 %
<i>P. multisaccharivorax</i>	-	-	-	+	-	V	+	+	+	+	+	+	+	V	+	V	
<i>P. nanceiensis</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	+	V	+	+	+	-	+	-	Aislada de hemocultivos, absceso pulmonar y BAL
<i>P. oralis</i>	-	-	-	+	+	+	+	V	+	+	+	+	+	-	+	+	
<i>P. oris</i>	-	-	-	+	+	+	+	V	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>P. oulorum</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	
<i>P. pleuritidis</i> ^c	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	Líqu. pleural de una pleuritis supurativa
<i>P. saccharolytica</i>	-	-	ND	+	-	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>P. salivae</i>	-	-	-	+	W	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>P. stercorea</i>	-	-	-	+	+	V	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	
<i>P. timonensis</i> ^c	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	Absceso de mama

<i>P. veroralis</i>	-	-	-	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+	-	+	-
<i>P. zoogeoformans</i>	-	v	-	+	+	+	+	v	+	+	+	v	+	v	v	v

^a Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual. 6th ed., 2002⁸⁵ y Könönen E, Wade W y Citron D, Manual of Clinical Microbiology, 10th ed., 2011¹⁰². ^b Las características del pigmento son en agar sangre luego de 10 a 14 días de incubación. ^c Especies nuevas, resultados basados en una sola cepa ^{46, 65, 158, 161, 167}. ^d Se consideran pigmentadas de acuerdo a lo descrito por los autores. ^e Origen animal. ^f Pigmento en el centro de la colonia, apariencia de "ojo de buey"⁴². Símbolos: +, positivo; - : negativo; v: variable; w: reacción débil; ND: dato no disponible. β-NAG: N-acetil-β- glucosaminidasa.

Tabla 6. Esquema de identificación del género *Fusobacterium*^{a,b}

Especies	Morfortipos	Reducción del nitratos	Verde brillante	Crecimiento en bilis 20%	Producción de			Conversión a propionato de
					Indol	Lipasa	Lactato	Treonina
<i>F. gonidiaformans</i>	Forma de gonidia	-		-	+	-	-	+
<i>F. mortiferum</i>	Pleomórficos con cuerpos grandes y redondeados	-		+	-	-	-	+
<i>F. naviforme</i>	Forma de barco	-		-	+	-	-	-
<i>F. necrophorum</i> subsp. <i>funduliforme</i>	Pleomórficas/cocoides, enredados, rizados	-		v	+	+	+	+
<i>F. necrophorum</i> subsp. <i>necrophorum</i>	Pleomórficos	-		v	+	+	+	+
<i>F. nucleatum</i>	Largos, delgados con extremos fusiformes	-	R	-	+	-	-	+
<i>F. periodonticum</i>	Largos, delgados	-		-	+	-	-	+
<i>F. russi</i>	Grandes con extremos redondeados	-		-	-	-	-	-
<i>F. varium</i>	Grandes con extremos redondeados	-		+	v	v	-	+
<i>F. ulcerans</i>	Grandes con extremos redondeados	-		+	-	-	-	+

^aAdaptado de Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual. 6th ed., 2002⁸⁵ y Könönen E, Wade W y Citron D, Manual of Clinical Microbiology, 10th ed., 2011¹⁰². Símbolos: +, positivo; - : negativo; v: variable; w: reacción débil; ND: dato no disponible.

Tabla 7. Esquema de identificación por pruebas bioquímicas de las especies de *Leptotrichia*, *Sneathia sanguinegens*^a

	Reducción de nitratos	Hidrólisis de esculina	B-hemólisis	Indol	Catalasa	α -glucosidasa	β -glucosidasa	α -galactosidasa	β -galactosidasa	β -NAG	FAL
<i>Leptotrichia</i>											
<i>L. amnionii</i>	-	+	ND	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>L. buccalis</i>	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+
<i>L. goodfellowii</i>	-	w	+	-	+	-	+	-	+	+	+
<i>L. hofstadii</i>	-	w	+	-	+	+	+	-	-	-	+
<i>L. shahii</i>	-	w	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>L. trevisanii</i>	-	+	ND	-	+	+	+	-	-	+	+
<i>L. wadei</i>	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Sneathia</i>											
<i>S. sanguinegens</i>	-	+	ND	-	-	-	-	-	-	-	+

^aAdaptado de Könönen E, Wade W y Citron D, Manual of Clinical Microbiology, 10th ed., 2011¹⁰². Símbolos: +, positivo; - : negativo; v: variable; w: reacción débil. β -NAG: N-acetil- β -glucosaminidasa; FAL: fosfatasa alcalina.

Tabla 8. Esquema de identificación por pruebas bioquímicas de los bacilos gram negativos anaerobios móviles^a

Especies	Reducción de nitratos	Hidrólisis de esculina	Desarrollo en bilis 20%	Producción de								Fermentación de					
				Catalasa	Indol	Urea	α -GLU	α -GAL	β -GAL	β -NAG	α -fucosidasa	Glucosa	Manitol	Sorbitol	Trealosa	Rafinosa	Sacarosa
<i>Anaerobiospirillum</i>																	
<i>A. succiniproducens</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	ND	-	-	+	+
<i>A. thomasi</i>	-	-	v	-	-	-	-	-	-	+	-	+	ND	-	-	-	-
<i>Selenomonas</i>																	
<i>S. artemidis</i>	v	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-	+	+	v	-	-	+
<i>S. diana</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	v	+
<i>S. flueggei</i>	+	-	-	-	-	-	+	v	-	-	-	+	+	+	-	v	+
<i>S. infelix</i>	+	+	-	-	-	-	v	v	-	-	-	+	+	v	-	+	+
<i>S. noxia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w	-	-	-	-	-
<i>S. sputigena</i>	v	-	-	-	-	-	w	+	v	-	-	+	-	-	-	+	+
<i>Desulfovibrio</i> ^{b,c}																	
<i>D. desulfuricans</i>	+	ND	-	-	-	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	nc	nc	nc	nc	nc
<i>D. fairfieldensis</i>	+	ND	+	+	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	nc	nc	nc	nc	nc
<i>D. piger</i> ^d	-	ND	+	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	nc	nc	nc	nc	nc
<i>D. vulgaris</i>	-	ND	+	-	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	nc	nc	nc	nc	nc
<i>Phocaeicola</i> ^b																	
<i>P. abscessus</i>	-	-	ND	-	-	ND	w	+	+	+	+	+	nc	nc	nc	nc	nc

Símbolos: +, positivo; - : negativo; v: variable; w: reacción débil. α -GLU: α -glucosidasa; α -GAL: α -galactosidasa; β -GAL: β -galactosidasa; β -NAG: N-acetil- β -glucosaminidasa; ND: dato no disponible.

^aAdaptado de Könönen E, Wade W y Citron D, Manual of Clinical Microbiology, 10th ed., 2011¹⁰² y Warren et al²¹³. Símbolos: +, positivo; - : negativo; v: variable; w: reacción débil; ND: dato no disponible; nc: no corresponde porque son asacarolíticos. α GLU: α glucosidasa, α GAL: α galactosidasa, β -GAL: β galactosidasa, β NAG: N-acetil- β - glucosaminidasa; ^basacarolítico; ^ctodas las especies producen desulfoviridina; ^dinmóvil.

Tabla 9. Esquema de identificación por pruebas bioquímicas de *Campylobacter* spp. que desarrollan solamente en anaerobiosis^a

Especies	Catalasa	Oxidasa	Reducción de nitrato	SH ₂ TSI	Desarrollo 25 °C	Desarrollo 42 °C	Hidrólisis hipurato	Hidrólisis Ind Acet	Ác. nalidixico 30 mcg	Cefalotina 30 mcg	Formato/fumarato
<i>C. gracilis</i> ^a	v	+	+	-	+	-	-	v	R	S	+
<i>C. showae</i>	+	+	+	+	-	-	-	v	R	S	+
<i>C. concisus</i>	-	+	+	+	-	+	-	-	R	R	-
<i>C. curvus</i>	-	+	+	+	-	+	-	+	S	ND	+
<i>C. rectus</i>	-	+	+	+	-	w	-	+	S	ND	+
<i>C. hominis</i>	-	+	-	-	ND	-	-	-	S	S	ND
<i>C. ureolyticus</i> ^{a,b}	-	ND	+	-	-	-	-	-	R	S	+

Adaptado de Fitzgerald C y Nachamkin I. Manual of Clinical Microbiology, 10th ed⁵⁸ y Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual. 6th ed., 2002⁸⁵. Símbolos: +, positivo; - : negativo; v: variable; w: reacción débil; ND: dato no disponible. Hidrólisis Ind Acet: hidrólisis del indoxil acetato. Formato/fumarato: requerimiento de formato de sodio 0,2 % y ácido fumárico 0,3%. SH₂ TSI: producción de ácido sulfhídrico en el agar hierro, triple azúcar;^a: inmóvil;^b: hidroliza urea.

Apéndice X. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método

ADELAIDA ROSSETTI

Jefa de la Unidad Microbiología del Hospital Interzonal General de Agudos Presidente Perón. Avellaneda, Pcia. de Buenos Aires, Argentina.

Coordinadora de la Subcomisión de Bacterias Anaerobias -Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas (SADEBAC)-Asociación Argentina de Microbiología (AAM). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

HEBE M. BIANCHINI

Asesora del Laboratorio de Bacteriología del Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas “Norberto Quirno” (CEMIC). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Miembro de la Subcomisión de Bacterias Anaerobias -Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas (SADEBAC)-Asociación Argentina de Microbiología (AAM). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Agar bacteroides bilis esculina (ABBE)

Agar tripticasa de soja	40,0 g
Bilis de buey	20,0 g
Esculina	1,0 g
Citrato amónico férrico	0,5 g
Solución hemina (5 mg/ml)	1,0 ml
Agua destilada c.s.p.	1000,0 ml

Solución de gentamicina: 100 µg/ml concentración final

Preparación: suspender los ingredientes en el agua, ajustar a pH 7. Disolver por calentamiento. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar hasta 50 °C. Mezclar y distribuir en placas de Petri.

Interpretación

Medio selectivo y diferencial que permite el crecimiento de los microorganismos que no son inhibidos por la bilis e hidrolizan la esculina.

Control positivo: *Bacteroides fragilis* o *Enterococcus faecalis*.

Control negativo: *Clostridium novyi* o *Morganella morganii*.

Agar Brucella o agar infusión cerebro corazón (BHI) con antibiótico

Preparar agar Brucella y agregar junto con la sangre 5 ml de amicacina (10 000 µg/ml) u otro aminoglucósido. Concentración final de antibiótico 50 µg/ml.

Agar carne levadura o VL base

Peptona tripticasa	10 g
--------------------	------

Cloruro de sodio	5 g
Extracto de carne	2 g
Extracto de levadura	5 g
Solución hemina (5 mg/ml)	1 ml
Solución vitamina K1 (1 mg/ml)	1 ml
Agar	20 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml
pH final	7,4 -7,5

Preparación: suspender los ingredientes en el agua. Disolver por calentamiento. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar hasta 50 °C y agregar asépticamente sangre al 5 %. Mezclar y distribuir en placas de Petri.

Agar infusión cerebro corazón (BHI) para anaerobios

Agar BHI	52 g
Solución hemina (5 mg/ml)	1 ml
Solución vitamina K1 (1 mg/ml)	1 ml
Extracto de levadura	5 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml
Sangre lacada	50 ml

Preparación: mezclar todos los ingredientes excepto la sangre. Disolver por calentamiento. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar a 50 °C, agregar la sangre. Mezclar y distribuir en placas de Petri.

El medio estéril, sin sangre, se puede guardar hasta un año en el refrigerador.

Agar sangre Brucella

Agar Brucella	43 g
Solución hemina (5 mg/ml)	1 ml
Solución vitamina K 1(1 mg/ml)	1 ml
Agua destilada c.s.p.	1000 ml
Sangre lacada	50 ml

Preparación: mezclar todos los ingredientes excepto la sangre. Disolver por calentamiento. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar a 50 °C, agregar la sangre. Mezclar y distribuir en placas de Petri.

El medio estéril, sin sangre, se puede guardar hasta un año en el refrigerador

Bilis: capacidad para desarrollar en presencia de bilis de buey

a) Caldo con bilis

Bilis de buey	10 g
Agua destilada c.s.p.	100 ml

Preparación: se esteriliza por filtración y se guarda en heladera.

Agregar 1ml de la solución estéril a 5 ml de caldo BHI de manera de obtener una concentración de bilis al 2 %.

Sembrar 0,1 ml de la suspensión bacteriana y simultáneamente, con el mismo inóculo, un tubo (control) sin solución de bilis.

Interpretación

Sensible: menor desarrollo en el tubo que contiene bilis con respecto al tubo control (no es necesario inhibición total).

Resistente: igual o mayor desarrollo en el tubo que contiene bilis con respecto al tubo control.

b) Discos con bilis

Preparación: cargar discos estériles con 15 µl/disco con la solución de bilis de buey preparada anteriormente. Conservar en heladera.

También se pueden adquirir comercialmente.

Interpretación

Cualquier halo de inhibición del desarrollo se considera sensible.

Control positivo (cepa resistente): *Bacteroides fragilis*.

Control negativo (cepa sensible): *Prevotella melaninogenica*.

Caldo carne levadura

Peptona tripticasa	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Extracto de carne	2 g
Extracto de levadura	5 g
Solución hemina (5 mg/ml)	1 ml
Solución vitamina K1 (1 mg/ml)	1 ml
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

pH final 7,4-7,5

Preparación: mezclar los ingredientes con el agua. Disolver por calentamiento.

Fraccionar 10 ml por tubo de ensayo. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.

Caldo glicerinado al 15 % (para conservación de cepas a -70 °C)

Caldo infusión cerebro corazón	85 ml
Glicerina estéril	15 ml

Preparación: preparar caldo Infusión cerebro corazón, esterilizarlo y dejarlo enfriar. Agregar la glicerina esterilizada por tindalización o vapor fluente.

Fraccionar en forma estéril 0,5 a 1,5 ml en crioviales y suspender las colonias directamente en el medio preparado.

Caldo infusión cerebro corazón (BHI) para anaerobios

Caldo BHI	37 g
Extracto de levadura	5 g
Solución hemina (5 mg/ml)	1 ml
Solución vitamina K1 (1 mg/ml)	1 ml
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Preparación: mezclar todos los ingredientes. Disolver por calentamiento.

Fraccionar 10 ml por tubo de ensayo. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.

Hemina Solución madre (5000 µg/ml)

Hemina	0,25 g
Hidróxido de sodio (1N)	5,00 ml
Agua destilada c.s.p.	45,00 ml

Preparación: disolver la hemina en el hidróxido de sodio. Llevar a 50 ml con agua destilada. Esterilizar durante 30 minutos a media atmósfera. También puede agregarse a los medios como suplemento en concentración final de 5 µg/ml.

Hidrólisis de la esculina

a) Caldo esculina

Caldo BHI	25 g
Esculina	1 g
Agar	1 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Preparación: suspender los ingredientes en el agua, ajustar a pH 7,0. Disolver por calentamiento. Fraccionar en tubo (5 ml). Esterilizar en autoclave durante 30 minutos a media atmósfera.

Interpretación

Para revelar se agrega una gota de citrato férrico o cloruro férrico al 1 %.

Resultado positivo: color verde oscuro-negro.

Resultado negativo: color marrón claro.

La producción de H₂S por algunas bacterias interfiere con la lectura debido a la reacción con el Fe que produce un complejo de color negro. Por lo tanto, es conveniente observar los tubos que muestran oscurecimiento bajo lámpara de UV (365 nm). La esculina no hidrolizada fluoresce con color azul mientras que la hidrolizada pierde la fluorescencia.

b) Método de *spot*

- 1) Preparar solución de esculina al 0,02 %.
- 2) Humedecer con ella tiras de papel.
- 3) Hacer un toque con una colonia (inóculo pesado) sobre la tira.
- 4) Incubar 1-2 horas a 35 °C y leer con luz UV 360 nm.

Interpretación

Resultado positivo: no se observa fluorescencia.

Resultado negativo: se observa fluorescencia.

Control positivo: *Bacteroides fragilis* o *Enterococcus* spp.

Control negativo: *Clostridium novyi* o *Citrobater freundii*.

Medio base para la fermentación de hidratos de carbono

Tripteína	15,00 g
Extracto de levadura	7,00 g
Cloruro de sodio	2,50 g
Tioglicolato de sodio	0,50 g
Agar	0,75 g
Agua destilada c.s.p.	1000,00 ml
Púrpura de bromocresol (solución 1 %)	2,00 ml

Preparación: mezclar todos los ingredientes excepto el indicador. Disolver por calentamiento, autoclavar a 121°C durante 15 minutos y dejar enfriar hasta 40-50 °C. Agregar el indicador, ajustar a pH 6,8-6,9 y fraccionar 4,5 ml por tubo.

Las soluciones de hidratos de carbono se preparan al 10 % y se esterilizan por filtración; se agrega en forma estéril 0,5 ml del azúcar a cada tubo.

Interpretación

Resultado positivo: viraje del indicador al amarillo.

Resultado negativo: el medio permanece del color original.

Si el microorganismo tiene la capacidad de degradar el indicador se debe medir el pH para ver si ha fermentado o no el azúcar en estudio o, agregar un exceso de indicador.

Medio para la conservación de cepas a temperatura ambiente (Medio

tioglicolato sin glucosa)

Tripteína	15,0 g
Extracto de levadura	7,0 g
Cloruro de sodio	2,5 g
Tiglicolato de sodio	0,5 g
Agar	3,0 g
Agua destilada c.s.p.	1000,0 ml

Preparación: mezclar y disolver. Fraccionar de 10 a 15 ml por tubo. Esterilizar en autoclave durante 30 minutos a media atmósfera.

Realizar un cultivo en caldo BHI de la cepa a guardar. Incubar durante 48 h. Tomar con una pipeta aproximadamente 1 ml del cultivo e inocularlo en el medio para conservación de cepas evitando la formación de burbujas. Incubar durante 48 h, tapar con tapón de goma estéril y sellar los bordes con biofilm o similar. Conservar a temperatura ambiente.

Clostridium spp., *Bacteroides fragilis* y microorganismos relacionados: hasta 1 año.

El resto de las especies es conveniente conservarlas a -70 °C en el caldo glicerinado al 15 %.

Polietanol sulfonato de sodio (SPS). Inhibición del desarrollo

Preparación de los discos

- Preparar solución acuosa de SPS al 5 % y esterilizar por filtración.
- Impregnar discos con 20 µl de la solución, tapar y dejar secar durante 72 h a temperatura ambiente. Vencimiento 6 meses.

Interpretación

Sensible: halo de inhibición ≥ 12 mm

Resistente: halo de inhibición < 12 mm

Cepas control:

Peptostreptococcus anaerobius: sensible.

Peptoniphilus asaccharolyticus: resistente.

Producción de catalasa

Se suspende una colonia de un cultivo de 48 - 72 horas en una gota de H_2O_2 al 3 %. Se puede usar como diluyente Tween 80 al 10 % para mejorar la lectura. No introducir el ansa metálica en el H_2O_2 . Algunos autores recomiendan preparar la solución al 15 %, lo cual puede aumentar la sensibilidad de la prueba.

Evitar arrastrar agar con sangre porque la misma contiene catalasa que puede dar falsos positivos. La prueba puede ser inhibida por los hidratos de carbono.

Es conveniente airear el cultivo durante 15 a 30 minutos antes de la realización de la prueba.

Interpretación

Resultado positivo: aparición de burbujas en forma inmediata y sostenida.

Resultado negativo: no se observan burbujas.

Control positivo: *Bacteroides fragilis* o *Staphylococcus aureus*.

Control negativo: *Bacteroides vulgatus* o *Enterococcus faecalis*.

Producción de gelatinasa

a) Método de los discos de Kohn

Gelatina bacteriológica	15 g
Agua destilada fría c.s.p.	100 ml
Carbón activado	3 - 5 g

Formol 10 %:

Formaldehido 40 %	10,0 ml
Agua destilada	90,0 ml
Carbonato de calcio	1,0 g
Cloruro de sodio	0,9 g

Preparación: espolvorear la gelatina en el agua. Esperar a que se humedezca. Hervir. Agregar el carbón activado en polvo. Agitar bien y dejar enfriar hasta 48 °C. Volcar en placa de Petri previamente recubierta en piso y paredes por Vaspar (partes iguales de vaselina y parafina). Dejar enfriar bien en heladera. Despegar la lámina de gelatina y carbón y colocarlo en formol al 10 % durante 24 h. Lavar bien bajo chorro de agua durante 48 h. Cortar en cubitos y colocarlos en tubos con unas gotas de agua. Esterilizar por vapor fluente durante 1 h (para eliminar el formol). Conservar en heladera.

La prueba se realiza colocando 1 - 2 cubitos en 5 ml de caldo cerebro corazón, se hierve 5 minutos para eliminar el O₂ que queda en la gelatina, se deja enfriar y se agrega un inóculo denso de la bacteria a identificar. Se incuba durante 72 a 96 h.

Interpretación

Resultado positivo: disco desintegrado y ennegrecimiento del caldo.

Resultado negativo: disco inalterado.

b) Método de Frazier

Agar BHI	5,3 g
Gelatina bacteriológica	0,4 g
Agua destilada c.s.p.	100,0 ml

Preparación: mezclar los componentes, disolver por calentamiento y ajustar el pH = 7,0 – 7,2. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Distribuir en placas de Petri.

La prueba se realiza mediante la inoculación de una estría del microorganismo. Se incuba en anaerobiosis de 48 a 96 h. Se detecta la presencia de gelatinasa con el agregado de 4-5 ml de reactivo revelador.

Reactivo revelador

Cloruro mercuríco	15 g
Ácido clorhídrico concentrado	20 ml
Agua destilada c.s.p.	100 ml

Preparación: agregar el ácido HCl a 50 ml de agua destilada, adicionar el HgCl_2 y disolver completamente. Llevar a volumen final de 100 ml con el agua destilada.

Interpretación

El reactivo revelador precipita la gelatina no hidrolizada.

Resultado positivo (presencia de gelatinasa): halo de transparencia alrededor de la estría.

Resultado negativo (ausencia de gelatinasa): no se observa halo de transparencia.

Control positivo: *Clostridium perfringens* o *Pseudomonas fluorescens*.

Control negativo: *Clostridium ramosum* o *Pseudomonas putida*.

Producción de indol

a) En medio líquido

Tripteína	20 g
Fosfato disódico	2 g
Glucosa	1 g
Agar	1 g
Agua destilada c.s.p	1000 ml

Preparación: fraccionar en tubos de 5 ml. Esterilizar en autoclave durante 30 minutos a media atmósfera.

Lectura: extraer con 0,5 ml de xileno, agitar y después agregar reactivo de Kovacs o reactivo de Ehrlich.

Interpretación

Resultado positivo: color rojo.

Resultado negativo: color amarillo.

Control positivo: *Bacteroides thetaiotaomicron* o *Escherichia coli*.

Control negativo: *Bacteroides fragilis* o *Klebsiella pneumoniae*.

b) Prueba de toque

La cepa debe provenir de un medio rico en triptofano como el agar BHI, el agar Brucella o el agar yema de huevo.

Reactivos

Para-dimetilaminocinamaldehído (PDAC)

PDAC 1 g

HCl (10 % v/v) 100 ml

Guardar en heladera en frasco oscuro.

1) Colocar una tira de papel Whatman N.º1 en una placa de vidrio y humedecer con el reactivo (no saturar).

2) Hacer un toque de una colonia (inóculo pesado) sobre la tira.

Interpretación

Resultado positivo: color azul o verde alrededor del toque.

Resultado negativo: incoloro o ligeramente rosado.

Producción de lecitinasa - lipasa

Agar yema de huevo

Peptona o tripteína	20,0 g
Fosfato disódico	2,5 g
Cloruro de sodio	1,0 g
Sulfato de magnesio (5 % en solución)	0,1 ml
Glucosa	1,0 g
Agar	12,5 g
Agua destilada c.s.p.	500,0 ml

Preparación: disolver los ingredientes en el agua, ajustar a pH 7,3 - 7,4. Esterilizar durante 30 minutos en autoclave a media atmósfera. Enfriar a 50 °C y agregar 4,5 ml de yema de huevo cada 100 ml de medio. Distribuir en placas de Petri.

Interpretación

Lecitinasa positiva: precipitado lechoso alrededor de la colonia.

Control positivo: *Clostridium perfringens*. Control negativo: *Clostridium difficile*.

Lipasa positiva: zona perlada sobre y alrededor de la colonia.

Control positivo: *Clostridium sporogenes*. Control negativo: *Clostridium perfringens*.

Producción de ureasa

a) En medio líquido

Suspender abundantes bacterias en 0,5 ml de caldo urea. Incubar aeróbicamente y observar durante 24 h.

Interpretación

Resultado positivo: color rojo.

Resultado negativo: amarillo pálido (el color del medio).

b) En disco

Realizar una suspensión del microorganismo en estudio en 0,25 ml de solución salina, agregar el disco de urea e incubar aeróbicamente 4 a 24 h.

Interpretación

Resultado positivo: color rojo en el disco.

Resultado negativo: sin cambio o amarillo.

Control positivo: *Anaerococcus tetradius* o *Proteus mirabilis*.

Control negativo: *Eggerthella* spp. o *Escherichia coli*.

Prueba de esporulación

Se inocula el microorganismo en un caldo con carne como el Tarozzi o en el medio tioglicolato, se incuba a 35 - 37 °C durante 48 a 96 h en anaerobiosis y luego a temperatura ambiente hasta la esporulación (7 - 10 días). Se siembra una gota de este cultivo en un medio no selectivo que se incuba en anaerobiosis durante 48 a 96 h (muestra pretratada) y una gota en agar chocolate que se incuba en CO₂ (control de pureza y tolerancia al O₂).

Con posterioridad se realiza un *shock* alcohólico o térmico.

El choque con alcohol consiste en mezclar volúmenes iguales de la muestra y etanol absoluto e incubar la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente. El método térmico consiste en someter la muestra a un baño de agua a 80 °C durante 10 minutos. Luego de realizar alguno de estos procedimientos se siembra una gota de la muestra tratada sobre un medio no selectivo como un agar anaerobio o agar sangre. Se incuba en anaerobiosis a 35 - 37 °C durante 48 a 96 h.

Interpretación

Resultado positivo (el microorganismo esporula): se obtiene crecimiento tanto en la placa pretratamiento como en la postratamiento.

Resultado negativo (el microorganismo no esporula): se obtiene crecimiento solo en la placa pretratamiento.

Control positivo: *Clostridium* spp.

Control negativo: *Bacteroides fragilis* o *Escherichia coli*.

Reducción de nitrato

Tripteína	20 g
Fosfato di sódico	2 g
Glucosa	1 g
Agar	1 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml
Nitrato de potasio	1 g

Preparación: fraccionar en tubos de 5 ml. Esterilizar en autoclave durante 30 minutos a media atmósfera.

Para revelar la presencia de nitritos en el medio se emplearán dos reactivos:

- a) reactivo de Griess A (ácido sulfanílico al 0,8 % en ácido acético glacial 5N) y
- b) reactivo de Griess B (α -naftilamina al 0,5 % en ácido acético glacial 5N) que se añadirán después de la incubación.

Interpretación

Resultado positivo: desarrollo de color rosado-rojo luego del agregado de los reactivos Griess A y B. El microorganismo reduce los nitratos a nitritos.

Resultado negativo: ausencia de color rosado-rojo luego del agregado de los reactivos Griess A y B. En este caso se debe agregar unas granallas de zinc y observar el color. La ausencia del color rosado-rojo luego del agregado de zinc indica que el microorganismo redujo los nitratos a gas nitrógeno y la prueba es positiva. Desarrollo de color rosado-rojo luego del agregado de zinc significa que el microorganismo no reduce los nitratos y la prueba es negativa.

Control positivo: *Propionibacterium propionicum* o *Escherichia coli*.

Control negativo: *Clostridium difficile* o *Pseudomonas putida*.

Sangre lacada

Se obtiene sometiendo a la sangre a congelamientos por debajo de los 20 °C durante toda la noche y posterior descongelamiento a 37 °C. Si la sangre no quedó bien lacada (se observa la sangre lisada, brillante y translúcida) se debe repetir el procedimiento.

La sangre lacada mejora la visualización del pigmento.

Suplementos para prueba de estimulación de crecimiento

Eggerthella lenta requiere arginina al 0,5 %.

Campylobacter ureolyticus requiere formato-fumarato (0,3 % y 0,3 %).

Bacteroides fragilis, *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp. requieren hemina al 0,001 %.

Tannerella forsythia requiere ácido N-acetilmurámico al 0,001 %.

Bilophila sp., *Veillonella* spp. requieren piruvato al 1 %.

Desulfovibrio spp. requieren piruvato al 1 % con sulfato de magnesio al 0,25 %.

El suero al 1 % estimula el crecimiento de anaerobios gram positivos y gram negativos.

Fusobacterium spp., y otros bacilos gram negativos requieren bicarbonato de sodio al 1 %.

El tween 80 al 0,5 % estimula el crecimiento de los anaerobios gram positivos.

Controles: inocular el microorganismo en caldo suplementado y sin suplementar. Incubar 48 a 72 horas.

Interpretación

Resultado positivo: mayor turbiedad en el tubo con caldo suplementado.

Vitamina K1 (1 mg/ml). Solución madre

Vitamina K1 0,1 g

Etanol absoluto 100,0 ml

Preparación: pesar la vitamina K1 y agregarla a un envase que contenga el etanol. Guardar en heladera al abrigo de la luz. Usar para suplementar a una concentración final de 1 µg/ml.