

Bacterias anaerobias aisladas en muestras clínicas de pacientes de un hospital regional de adultos de Costa Rica

Carlos Quesada-Gómez, Evelyn Rodríguez-Cavallini, María del Mar Gamboa-Coronado

Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia y Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

RESUMEN

Introducción. Las bacterias anaerobias se han implicado en algunos procesos infecciosos que son causa importante de morbilidad y mortalidad en el humano. Sin embargo, el limitado desarrollo de la bacteriología anaerobia en algunos centros médicos de Costa Rica no permite obtener datos precisos sobre su prevalencia.

Objetivo. Evaluar la presencia de bacterias anaerobias en muestras clínicas de pacientes en un hospital regional de adultos en Costa Rica.

Material y Métodos. Durante 18 meses se recolectaron, por aspiración, 46 muestras provenientes de diferentes sitios anatómicos. Se implementó un protocolo de toma de muestra en el hospital y de aislamiento en el laboratorio.

Resultados. De las 46 muestras recibidas 22 (48%) fueron positivas para bacterias anaerobias, a partir de las cuales se aislaron 47 cepas: 25 (53%) Gram negativas y 22 (47%) Gram positivas. *Bacteroides* fue el género más frecuente (42%), seguido de *Eggerthella* (13%) y *Propionibacterium* (11%) en tanto que *Prevotella*, *Bifidobacterium*, *Porphyromonas* y *Fusobacterium* fueron los menos frecuentes.

Discusión. Los procedimientos de toma de muestra y aislamiento en bacteriología anaerobia siempre van a ser difíciles de realizar; sin embargo, en el presente estudio se aislaron una diversidad de especies e incluso anaerobios considerados

como muy estrictos y exigentes. Lo anterior respalda los protocolos implementados, por lo que consideramos importante aplicarlos en otros centros médicos en Costa Rica, a fin de obtener un conocimiento más preciso acerca de los agentes anaerobios de mayor importancia.

Palabras clave: infección, anaerobios, *Bacteroides*.

SUMMARY

Anaerobic bacteria in clinical samples from adult patients treated in a regional hospital in Costa Rica

Introduction. Anaerobic bacteria are important etiological agents of infections linked to human morbidity and mortality. Nevertheless, the limited development of most Costa Rican health care facilities with respect to the isolation and manipulation of anaerobic bacteria prevents the compilation of precise data on the prevalence of this sort of bacteria in the country.

Objective. To assess the occurrence of anaerobic bacteria in clinical samples collected in a regional hospital in Costa Rica.

Material and Methods. During 18 months, anaerobic bacteria were cultivated from diverse aspirates following a standardized protocol for sample collection and isolation developed for this study.

Solicitud de sobretiros: Carlos Quesada Gómez, Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. 2060, San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica. Correo electrónico: cquesadag@cariari.ucr.ac.cr

Recibido: el 5 de marzo de 2007. **Aceptado para publicación:** el 25 de mayo de 2007.

Este artículo está disponible en <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb071823.pdf>

Results. Forty seven anaerobic bacteria were isolated from 22 of 46 samples analyzed (48% of prevalence). While 25 of these organisms exhibited Gram-negative staining (53%), 22 isolates were characterized as Gram-positive (47%). Most bacteria were allocated to the genus *Bacteroides* (42%), followed by *Eggerthella* (13%) and *Propionibacterium* (11%). A limited number of isolates was identified as *Prevotella* sp., *Bifidobacterium* sp., *Porphyromonas* sp., or *Fusobacterium* sp.

Discussion. Although traditional procedures for sample collection and isolation of anaerobic bacteria are painstaking, a diversity of anaerobic species, including very strict and fastidious species, was isolated with the practical method applied in the current investigation. On account of this remark, we urge others to implement our protocol in their health care facilities, as this would likely help to define more precisely the role that anaerobic bacteria play in clinical infections.

Key words: infection, anaerobes, *Bacteroides*.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias anaerobias forman parte de la microbiota natural en la superficie de las mucosas humanas y animales; sus reservorios principales son la boca, el tubo digestivo, la piel y el aparato genital. Son importantes causas de morbilidad y mortalidad, pues participan en infecciones, la mayoría endógenas, que se producen generalmente cuando se rompe el equilibrio homeostático entre el hospedero y dichos microorganismos. Por ello, las especies de anaerobios que se encuentren en un proceso infeccioso, generalmente, van a correlacionar con las bacterias que son microbiota del área anatómica más cercana en la cual se rompió dicho equilibrio (1).

Sin embargo, el poco desarrollo de la bacteriología anaerobia en Costa Rica no permite tener datos precisos sobre la prevalencia de estas infecciones. Afortunadamente, el interés por

las bacterias anaerobias ha aumentado en años recientes y algunos laboratorios hospitalarios en conjunto con el Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia (LIBA) de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, han iniciado el trabajo con estos microorganismos. Con esta investigación se pretende llevar a cabo el estudio en un hospital regional de Costa Rica, a fin de conocer los principales agentes anaerobios involucrados en infecciones en las que se sospecha su presencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Durante 18 meses se tomaron 46 muestras clínicas de infecciones sospechosas de ser causadas por bacterias anaerobias provenientes de pacientes de un hospital regional (Hospital Monseñor Sanabria de Puntarenas, Costa Rica). El desglose de las muestras por sitio anatómico fue el siguiente: 24 de cavidad abdominal, 13 de úlceras o lesiones superficiales en piel, 3 de lechos de amputación, 2 de cavidad oral, 2 gineco-obstétricas y 2 viscerales de hígado y riñón.

Las muestras fueron tomadas por el personal médico del hospital, debido a que la mayoría requieren de procedimientos quirúrgicos e invasivos. Se rechazaron las muestras tomadas con torundas, muestras de esputo expectorado, de contenido gástrico, de lavados bronquiales y de heces, según lo recomendado (2). Todas las muestras fueron tomadas por aspiración en zonas profundas de la lesión. Con aguja y jeringa, inmediatamente, se inocularon en tubos con tapón de hule que contenían caldo de carne picada prerreducido (CCPP) (3), tomando de 0.1 a 0.3 mL del material purulento aspirado. Las muestras inoculadas fueron llevadas al laboratorio clínico del hospital e incubadas a 35 °C por un máximo de 48 horas y trasladadas hasta el LIBA, protegidas de la luz y a temperatura ambiente.

Los tubos CCPP sin turbiedad fueron incubados por un período de 72 horas y hasta por una semana a 35°C. Si después de este período los tubos permanecían sin turbiedad, las muestras se

Bacterias anaerobias de pacientes hospitalizados en Costa Rica

consideraron negativas para bacterias anaerobias. A partir de los tubos turbios, después de completar el período de incubación a 35°C, nuevamente con aguja y jeringa, se tomó 0.1 mL de medio CCPP y se estrió en Agar Sangre suplementado con vitamina K y hemina (ASS) (2) que se incubó en jarras de anaerobiosis (Anaerogen, Oxoid[®]) por 48 horas a 35°C. Cada uno de los morfotipos coloniales obtenidos se subcultivó en dos placas de ASS (a partir de una misma colonia). Una de las cajas se incubó nuevamente en anaerobiosis y la otra caja se incubó en una jarra con vela (atmósfera de CO₂ aumentada), ambas por 48 horas a 35°C.

Se consideraron como bacterias anaerobias aquellas que crecieron mejor o únicamente en anaerobiosis y se subcultivaron nuevamente en ASS para su respectiva identificación. Se realizó tinción de Gram y morfología microscópica, se determinó la capacidad de uorescencia ante la exposición a la luz ultravioleta y se observó la producción de pigmento para la identificación presuntiva

de los géneros *Prevotella* y *Porphyromonas* y la morfología colonial y el tipo de crecimiento en agar. La identificación definitiva se completó utilizando el sistema API 20A (bioMérieux[®]) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

RESULTADOS

De las 46 muestras recibidas 22 (48%) fueron positivas para bacterias anaerobias, a partir de las cuales se aislaron 47 cepas: 25 (53%) Gram negativas y 22 (47%) Gram positivas. *Bacteroides* fue el género más frecuente (42%), seguido de *Eggerthella* (13%) y *Propionibacterium* (11%) en tanto que *Prevotella*, *Bifidobacterium*, *Porphyromonas* y *Fusobacterium* fueron los menos frecuentes (figura 1).

El desglose de las especies de bacterias anaerobias aisladas en las muestras positivas se aprecia en el cuadro 1 donde se observa que *Bacteroides ovatus/thetaiotaomicron* fue la especie que se aisló con mayor frecuencia, siempre de

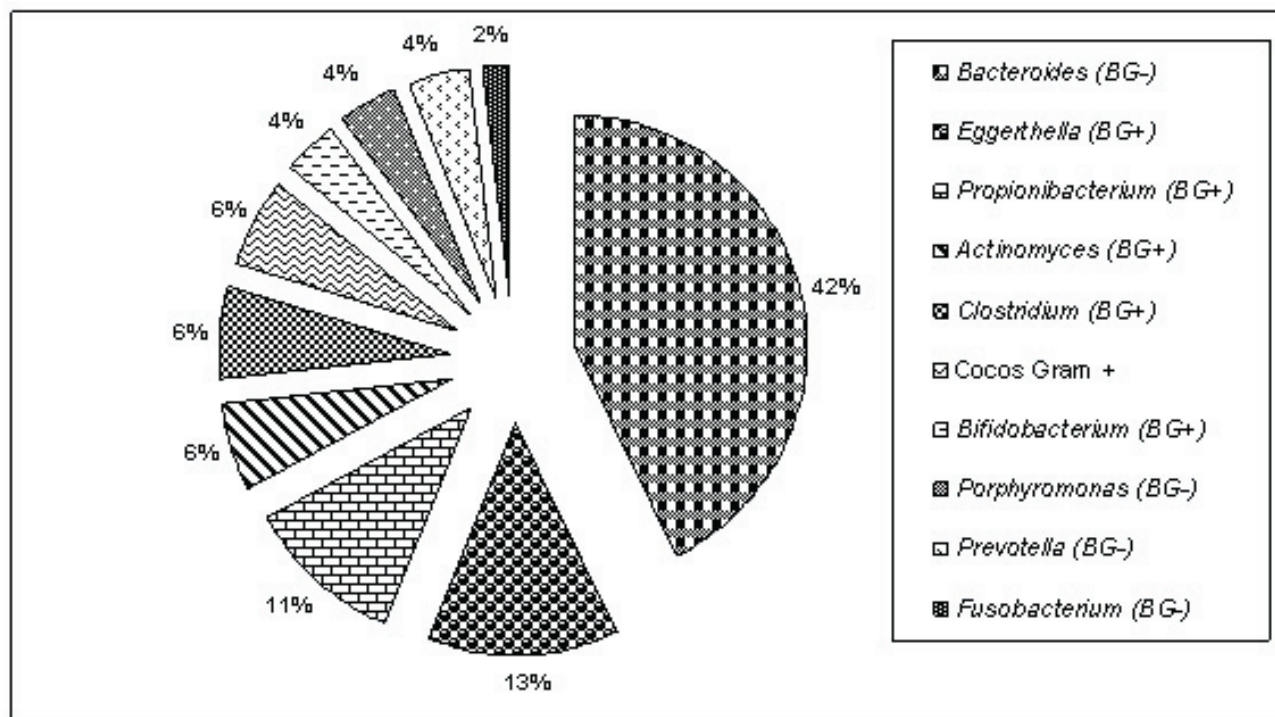


Figura 1. Porcentajes de aislamiento de bacterias anaerobias en muestras clínicas del Hospital Monseñor Sanabria (n=47)

C Quesada-Gómez, E Rodríguez-Cavallini, MM Gamboa-Coronado

cavidad abdominal.

De acuerdo con el sitio anatómico, las bacterias Gram negativas fueron las más

frecuentes en cavidad abdominal (19%) y *B. ovatus/thetaiotaomicron* la especie más común.

Por otro lado, las bacterias Gram positivas

Cuadro 1
Géneros y especies de bacterias anaerobias aisladas (n=47) de muestras clínicas de un hospital regional de Costa Rica, según el sitio anatómico de la muestra.

Bacterias anaerobias aisladas	CA	ULS	LA	CO	VIS	GO	Aislamientos	Porcentaje según el total de cepas (%)
<i>Bacteroides ovatus/thetaiotaomicron</i>	9	0	0	0	0	0	9	19
<i>B. stercoris/eggerthii</i>	3	0	1	0	0	0	4	8
<i>B. distasonis</i>	2	0	2	0	0	0	4	8
<i>B. fragilis</i>	2	0	0	0	0	0	2	4
<i>B. uniformis</i>	1	0	0	0	0	0	1	2
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	1	0	1	0	0	0	2	4
<i>Prevotella intermedia/disiens</i>	0	1	0	0	0	0	1	2
<i>P. oralis</i>	0	0	0	1	0	0	1	2
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1	0	0	0	0	0	1	2
<i>Eggerthella lenta</i>	4	2	0	0	0	0	6	13
<i>Propionibacterium acnes</i>	0	0	0	2	0	1	3	6
<i>P. propionicum/avidum</i>	1	1	0	0	0	0	2	4
<i>Actinomyces viscosus</i>	0	2	0	0	0	0	2	4
<i>A. naeslundii</i>	1	0	0	0	0	0	1	2
<i>Clostridium perfringens</i>	1	0	0	0	0	0	1	2
<i>C. clostridioforme</i>	1	0	0	0	0	0	1	2
<i>C. beijerinckii/butyricum</i>	1	0	0	0	0	0	1	2
<i>Bifidobacterium</i> sp.	1	1	0	0	0	0	2	4
<i>Fingoldia magna</i>	1	1	0	0	0	0	2	4
<i>Gemella morbillorum</i>	1	0	0	0	0	0	1	2
Gram negativos	19	1	4	1	0	0	25	53
Gram positivos	12	7	0	2	0	1	22	47

CA: cavidad abdominal; ULS: úlceras o lesiones superficiales en piel; LA: lechos de amputación; CO: cavidad oral; VIS: muestras viscerales; GO: muestras gineco-obstétricas

Bacterias anaerobias de pacientes hospitalizados en Costa Rica

fueron más frecuentes en úlceras o lesiones superficiales en piel y *Actinomyces viscosus* y *Eggerthella lenta* las dos especies más comunes. No se consideró el análisis de los otros sitios anatómicos, debido al bajo número de muestras de cada uno.

Al analizar en conjunto todas las muestras positivas se observó que la mayoría de infecciones fueron mixtas (40%), correspondiendo a cultivos anaerobios acompañados por bacterias aerobias o facultativas (aislamientos realizados por el laboratorio clínico del hospital) en el mismo sitio de la infección, un 34% sólo por bacterias aerobias y un 26% sólo por bacterias anaerobias.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se obtuvo un 48% de muestras positivas por bacterias anaerobias, lo cual es similar al 46% informado en una investigación previa en un hospital nacional de Costa Rica (4). Es inferior al 72% informado por Durmaz y colaboradores en Turquía (5), pero superior a muchos de los porcentajes de aislamiento a que hacen referencia Ueno y colaboradores en Japón (6) en diversos tipos de muestras (entre 10 y 47.6%). Estas variaciones pueden deberse no sólo a los diferentes procedimientos de aislamiento, sino también a los diferentes tipos de muestras a considerar. Además, un estudio retrospectivo de los expedientes, demostró que el 50% de los pacientes cuyas muestras fueron negativas en este estudio, estaban recibiendo tratamiento antimicrobiano, principalmente clindamicina, gentamicina, metronidazole y antibióticos beta lactámicos.

Bacteroides fue el género que se aisló más frecuentemente (42%) lo que concuerda con el informe previo del hospital nacional de Costa Rica (40%) (4), con los datos de Nueva Zelanda (35%) (7) y los de Estonia (40%) (8).

Las especies del género *Bacteroides* que se aislaron de manera más frecuente (indistintamente del sitio anatómico) fueron: *B. ovatus/thetaiotaomicron* (19%), *B. stercoris/*

eggerthii (8%), *B. distasonis* (8%), *B. fragilis* (4%) y *B. uniformis* (2%). Estos resultados difieren moderadamente de otros estudios que señalan a *B. fragilis* como la especie más frecuente, con porcentajes del 30% en Kuwait (9), 43% en Francia (10) y 40% en Costa Rica (4). No obstante, muchos estudios documentan que las especies del grupo *B. fragilis* son los anaerobios que se aíslan con mayor frecuencia de muestras clínicas, siendo *B. ovatus/thetaiotaomicron* la más común luego de *B. fragilis* (7, 10).

Por otra parte, en las muestras clínicas analizadas se obtuvo un aislamiento importante de *Eggerthella lenta* (13%), lo cual difiere de otras investigaciones que señalan que es poco frecuente (8,11). Dicha diferencia se puede deber al lento crecimiento de esta bacteria, a la dificultad para su aislamiento y a los cambios de nomenclatura del género *Eggerthella* (antes *Eubacterium*).

En las muestras analizadas se obtuvo un porcentaje de aislamiento de *Clostridium* del 6%, mientras que en Costa Rica anteriormente se encontró un 12% (4) y en otros países europeos un 1% (8); esto podría revelar diferencias regionales en cuanto a la importancia de *Clostridium* como agente etiológico.

Con respecto a los bacilos Gram negativos, se aislaron *Porphyromonas*, *Prevotella* y *Fusobacterium* en porcentajes de 4%, 6% y 2%, respectivamente. Estos resultados mantienen diferencias y semejanzas con los obtenidos en otras investigaciones, por ejemplo: 4%, 14% y 6% (8); 2%, 23% y 6% (9), y 1%, 1% y 0.5% (10), respectivamente. Las diferencias en los porcentajes de aislamiento pueden estar relacionadas con el hecho de que la presencia de esos géneros está muy asociada al sitio anatómico, el tipo de muestra y el cuadro clínico que presenta el paciente (12, 13). Además, las cepas de estos géneros son muy susceptibles a la exposición al oxígeno, presentan un escaso y lento crecimiento; así, según el procedimiento de aislamiento pueden obtenerse variaciones en su frecuencia (2).

Por otro lado, de las 24 muestras de la cavi-

C Quesada-Gómez, E Rodríguez-Cavallini, MM Gamboa-Coronado

abdominal se aislaron bacterias anaerobias en 14 (58%), que es superior a lo informado en otro estudio en donde un 42% de las muestras de abdomen fueron positivas (9).

El escaso número de aislamientos de lechos de amputación y muestras viscerales no permite llegar a conclusiones contundentes. Por otro lado, las tres cepas de *P. acnes* que se aislaron de la cavidad oral y de muestras gineco-obstétricas podrían corresponder a contaminantes, ya que la frecuencia de infección, por este agente, en estos sitios anatómicos es baja (2).

El hallazgo del 40% de infecciones mixtas en las muestras positivas es superior al 29% encontrado por Durmaz y colaboradores (5). Los porcentajes de aislamiento en los que exclusivamente se obtuvieron anaerobios es similar en ambos estudios (26 y 28%).

Los procedimientos de toma de muestras y aislamientos en bacteriología anaerobia siempre van a ser difíciles de realizar (14). Sin embargo, en el presente estudio se aisló una considerable diversidad de géneros y especies, e incluso anaerobios considerados en la literatura como muy estrictos y exigentes (2), tales como las especies de *Fusobacterium*, *Prevotella* y *Porphyromonas*. Además, se aislaron anaerobios de muy lento crecimiento como *Eggerthella lenta*, *Bifidobacterium* y *Porphyromonas* y se lograron identificar bacterias pleomórficas de difícil diferenciación morfológica e identificación bioquímica como *Propionibacterium*, *Actinomyces* y *Bifidobacterium*.

Los porcentajes de aislamientos de bacterias anaerobias y los géneros más frecuentes coinciden con los obtenidos en varios trabajos y publicaciones internacionales. Todo lo anterior respalda los protocolos de toma de muestra, aislamiento e identificación llevados a cabo en el presente trabajo. De ahí la importancia de poder aplicarlos en otros centros médicos en Costa Rica, a fin de tener un conocimiento más preciso acerca de los agentes anaerobios de mayor importancia en Costa Rica, conocimiento que será de gran valor

para el establecimiento de protocolos de terapia antimicrobiana mejor dirigidos, lo que redundará en beneficio de los pacientes.

AGRADECIMIENTOS

A los doctores Mario Rivera y Ernesto Amuy, del Hospital Monseñor Sanabria, por su colaboración en la obtención y transporte de muestras. A la Vicerrectoría de Investigación y de Acción Social de la Universidad de Costa Rica por el apoyo económico (proyecto ED-239).

REFERENCIAS

1. **Brook I.** Anaerobic infections in children. *Microbes and Infection* 2002; 4: 1271-80.
2. **Jousimies-Somer HR, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler HM, Finegold SM.** *Anaerobic Bacteriology Manual*. 6th ed. CA: Star Publishing Co.; 2002. p. 287.
3. **Holdeman LV, Cato EP, Moore WEC.** *Anaerobe Laboratory Manual*. 4th ed. Blacksburg: Virginia Polytechnic Institute and State University; 1977. p. 152.
4. **Rodríguez M.** Aislamiento, identificación y prueba de susceptibilidad a los antibióticos de bacterias anaerobias aisladas de muestras clínicas de pacientes del Hospital San Juan de Dios. San José: Trabajo Final de Graduación, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica; 1998. p. 28.
5. **Durmaz B, Durmaz R, Tastekin N.** Evaluation of culture results of specimens from patients with suspected anaerobic infection. *The New Microbiol* 1999; 22: 155-9.
6. **Ueno K, Kato N, Kato H.** The status of research on anaerobes in Japan. *Clin Infec Dis* 2002; 35: S54-7.
7. **Roberts SA, Shore KP, Paviour SD, Holland D, Morris AJ.** Antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in New Zealand: 1999-2003. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57(5): 992-8.
8. **Loivukene K, Naaber P.** Antibiotic susceptibility of clinically relevant anaerobes in Estonia from 1999 to 2001. *Anaerobe* 2003; 9: 57-61.
9. **Panigrahi D, Rotimi VO, Dhar R, Chugh TD, Dhar PM, Ghali A, et al.** Anaerobic bacterial flora of intra-abdominal infections and their antimicrobial susceptibility pattern in Kuwait. *Anaerobe* 2001; 7: 291-5.
10. **Behra-Miellet J, Mory CF, Muller C, Choromarat M, Bézain MC, Bland S, et al.** Antibiotic resistance among anaerobic Gram-negative bacilli: lessons from a french multicentric survey. *Anaerobe* 2003; 9: 105-11.
11. **Forbes BA, Sahm DF, Weisfeld AS.** *Bailey & Scott's: Diagnostic Microbiology*. 11th ed. New York: Mosby Inc.; 2002. p. 511-36.

Bacterias anaerobias de pacientes hospitalizados en Costa Rica

12. **Brook I.** Anaerobic infections in childhood. USA: Hall Medical Publishers; 1983. p. 1-34, 91-280.
13. **Fauci A, Braunwald E, Watson JD, Wilson JD, Isselbacher KJ, Martin JB, et al.:** Principios de Medicina Interna. 14th ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 1998. p. 1132-41.
14. **Roberts MC.** Acquired tetracycline and/or macrolide-lincosamides-streptogramin resistance in anaerobes. *Anaerobe* 2003; 9: 161-63.