

Identificación de bacilos gram positivos que desarrollan en presencia de oxígeno. Propuesta metodológica

Cuestas, Verónica; Lurá, María C.

Sección Microbiología. Hospital J. B. Iturraspe. Santa Fe

RESUMEN: Los bacilos Gram (+) son numerosos. Sus características biológicas, los requerimientos nutricionales y las condiciones necesarias para su desarrollo son muy variadas. Algunos son extremadamente patógenos. Sin embargo, la mayoría son considerados saprófitos y muchos forman parte de la flora microbiana habitual del hombre.

El avance en los métodos de diagnóstico y la frecuente utilización de técnicas invasivas y de agentes inmunosupresores, condicionan que estos microorganismos saprófitos puedan transformarse en patógenos oportunistas.

Si bien no es imprescindible identificar las especies que forman parte de la flora normal de un huésped normoinmune, sí lo es cuando se aíslan de muestras clínicas obtenidas de pacientes inmunocomprometidos.

El objetivo del presente trabajo fue implementar una metodología sencilla y de fácil aplicación en un laboratorio de análisis clínicos de mediana complejidad, y que permita identificar en un corto período de tiempo, bacilos Gram (+) que desarrollan en presencia de oxígeno.

Se identificaron 32 especies de Bacilos Gram (+), aislados en su mayor parte de sangre y tracto genitourinario.

Las especies identificadas con mayor frecuencia fueron: *Corynebacterium minutissimum*, *Corynebacterium xerosis*, y *Rhodococcus equi*.

SUMMARY: There are plenty of gram-positive bacillus. Their biological characteristics, nourishing requirements and necessary development conditions vary.

Although some bacillus are extremely pathogenic, most of them are considered saprophyte being many of them part of the normal human microbial flora.

The advanced diagnostic methods, the frequent use of invasive techniques and the immunosuppressor agents help these saprophyte microorganisms to become opportunist pathogens.

While it is not necessary to identify the species belonging to the normal flora of normal immune host, it is so when they are insulated from clinical samples of immune-depressed patients.

The aim of this work was to establish a simple methodology to be easily applied in a lab of average complexity clinical analysis which makes it possible to shortly identify gram-positive bacillus that are able to grow in the presence of oxygen.

32 species of gram-positive bacillus mostly insulated from blood and genitourinary tract were identify.

Corynebacterium minutissimum, *Corynebacterium xerosis*, y *Rhodococcus equi* were the most frequently identify species.

Introducción

Desde que los microorganismos fueron observados por primera vez, se ha avanzado mucho en relación a su conocimiento. Se sabe que se encuentran en todos los ambientes, que participan en todos los ciclos de la vida y que, por ende, se los encuentra en diferentes sitios y asociados con algún tipo de simbiosis con diferentes seres vivos (1-3).

Teniendo en cuenta la capacidad que tienen de producir enfermedad (poder patógeno o patogenicidad), se pueden clasificar en patógenos verdaderos o estrictos (que producen los cuadros clínicos al superar las defensas normales del huésped), saprófitos (que no producen enfermedad en huéspedes inmunológicamente normales) y los llamados patógenos facultativos (que son capaces de

producir enfermedad sólo cuando se modifican los mecanismos de defensa del organismo) (2-4).

El avance en los métodos de diagnóstico, con la incorporación cada vez mayor de técnicas invasivas, así como la utilización frecuente de agentes inmunosupresores, condicionan que prácticamente todos los microorganismos que se conocen como saprófitos sean considerados como patógenos oportunistas.

La virulencia de los Bacilos Gram (+) es muy variada. Se encuentran desde los altamente patógenos (como por ejemplo *Bacillus anthracis*) hasta aquellos considerados saprófitos por convivir en nuestra piel. La mayoría de los aislamientos de Bacilos Gram (+) en laboratorio son contaminantes. Si bien no es imprescindible identificar las especies que forman parte de la flora normal de un huésped normoinmune, sí lo es cuando se aíslan de

especímenes obtenidos de pacientes inmunocomprometidos (1).

Una de las funciones más importantes del laboratorio de microbiología clínica es examinar, cultivar y asegurar la identificación exacta de las especies que se aíslan de las distintas muestras procesadas y que tienen significación clínica. Los resultados que obtenga, no sólo deben facilitar la implementación precoz del tratamiento correspondiente, sino que deben permitir el monitoreo apropiado de la medicación antimicrobiana aplicada, y proveer información epidemiológica para definir las fuentes más comunes de infección. (1,4,5)

El Hospital Iturraspe de la ciudad de Santa Fe, es el único centro de derivación de pacientes oncológicos existente en la zona centro-norte de la provincia, y su área de influencia incluye provincias vecinas tales como Entre Ríos y la zona oeste de Córdoba.

El objetivo del presente trabajo fue implementar una metodología sencilla, de fácil aplicación en un laboratorio de mediana complejidad, que no cuenta con métodos automatizados, que permitiera arribar a un diagnóstico rápido del agente etiológico en infecciones producidas por Bacilos Gram (+) que desarrollan en presencia de oxígeno.

Materiales y Métodos

Se trabajó con cepas de Bacilos Gram (+) aislados de diferentes muestras de origen clínico: hemocultivos, líquidos de punción, secreción de herida, tracto respiratorio superior, tracto genito-urinario, catéteres y dispositivo intrauterino (DIU).

Se contó además, con cepas controles de *Lactobacillus plantarum* y *L. casei*.

Para la implementación de las diferentes pruebas bioquímicas se utilizaron los fundamentos, medios de cultivo y condiciones de incubación que aconseja la bibliografía consultada (7-11) y que, en su mayoría, son de práctica rutinaria en un laboratorio de microbiología.

La verificación de la β -hemólisis y la intensificación de la actividad hemolítica de la β -lisina estafilocócica (prueba de CAMP), se llevaron a cabo en Agar Sangre Ovina (5%). (7, 9-11)

La prueba de la catalasa se llevó a cabo por el método en tubo de ensayo, utilizando H_2O_2 al 3%; para la determinación de la motilidad y producción de indol, se trabajó con el medio de cultivo semisólido SIM; para la prueba del citrato, el medio de cultivo utilizado fue Citrato de Simmons; para veri-

ficar la producción de ureasa, se usó el Agar Urea de Christensen y para la oxidasa el método del disco de oxidasa (la suspensión bacteriana se llevó a cabo con un capilar de vidrio estéril) (7-11).

Para la prueba de TSI y verificación de la producción de SH_2 se utilizó el agar triple azúcar y el medio de Hugh-Leifson fue el utilizado para la prueba de oxidación-fermentación (O - F) (8-10).

Los crecimientos a distintas temperaturas se llevaron a cabo cultivando cada cepa incógnita en caldos nutritivos (11). Para el desarrollo en CINA 7%, el caldo nutritivo fue suplementado con dicha sal hasta alcanzar la concentración requerida.

El medio RM/VP, inoculado e incubado 48-72hs. a 35°C, fue utilizado para la determinación de las pruebas de Rojo de Metilo (RM) y Voges Proskauer (VP). Los reactivos reveladores fueron una solución al 0,02% (en solución hidroalcohólica) del indicador rojo de metilo para la primera, y α -naftol (5% en alcohol etílico absoluto) e hidróxido de potasio (40% en agua), para la segunda (8-11).

Las pruebas de fermentación de los hidratos de carbono: glucosa, lactosa, maltosa, sacarosa, trehalosa, xilosa, rafinosa, ramnosa, manitol y salicina se llevaron a cabo utilizando el medio básico semisólido con rojo fenol (pH 7,5) al que se le adicionó el azúcar en estudio en una concentración final del 1% (con excepción de la salicina cuya concentración final en el medio de cultivo fue de 0,5%). (8, 10, 11)

La decarboxilación de la Arginina se verificó utilizando como base el caldo Decarboxilasa de Moeller con el agregado de l-arginina, de modo que la concentración final alcanzada fuera de 1%. Para cada bacteria en estudio se inocularon dos tubos: uno con el aminoácido por ensayar y el otro sin el aminoácido (control). (8, 9, 11)

Para la realización de la prueba de la esculina en medio con bilis (BE), se utilizó el medio de cultivo que lleva el nombre de Agar Bilis-Esculina que permite leer la hidrólisis de la esculina por la presencia de un color negro o castaño oscuro en la mitad o más de la superficie del medio. (8-11)

La verificación del crecimiento y licuefacción de la gelatina se realizó con el Medio de Gelatina Nutritiva para punción (pH 6,8), incubándose a 22-25°C, durante 15 días. Diariamente se observó si había crecimiento y licuefacción. Previo a la lectura, los tubos eran colocados en un baño de hielo o refrigerador durante dos horas, evitando su agitación a fin de lograr que el medio solidifique en aquellos casos en que no hubo digestión de la gelatina. (8, 10)

La prueba de reducción del nitrato se llevó a cabo con el medio semisólido M-N que permitió determinar simultáneamente movilidad y reducción de nitratos. Los reactivos reveladores fueron: α -naf-til amina (0,5% en Acido Acético 5N) y ácido sulfanílico (0,8% en Acido Acético 5N). Para la verificación de la reducción hasta N_2 , se agregó una pizca de polvo de Zn (8-11).

La susceptibilidad a la vancomicina (S a Vanco), se determinó utilizando el método por difusión propuesto por Kirby-Bauer. (9, 10)

La fórmula del medio jugo de tomate con pH bajo (pH = 5) aconsejado para *Lactobacillus*, propuesta por Jay, es la siguiente: 20 g de Jugo de tomate (400 ml), 10 g de peptona, 10 g de leche peptonizada, 20 g de Agar-agar y agua destilada c.s.p.: 1 litro. (12)

En todos los casos se llevó a cabo el control de calidad de los medios de cultivo y reactivos, así como el control de crecimiento de las cepas utilizadas.

Los esquemas de identificación propuestos se observan en los Diagramas 1, 2, 3 y 4 y las Tablas 1, 2, 3, 4 y 5.

Resultados y discusión.

Los Bacilos Gram (+) son numerosos y sus características biológicas, así como sus requerimientos nutricionales y las condiciones necesarias para su desarrollo, son muy variadas. (1, 6-11, 13)

El género *Corynebacterium*, que incluye patógenos importantes para el hombre y los animales, así como saprófitos, está bien definido sobre la base de similitudes químicas de su pared celular y componentes lipídicos. Además está muy relacionado con los géneros *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*. (11, 13)

Algunos de los géneros que tradicionalmente se clasifican entre los anaerobios estrictos, también son considerados en los grupos que incluyen aquellos capaces de desarrollar como anaerobios aerotolerantes y anaerobios facultativos.

Así, por ejemplo, aquellos clasificados como grupos corineformes 1 y 2 por el CDC, en la actualidad han sido reclasificados como diferentes especies dentro de *Actinomycetes*. Del mismo modo, las especies aerotolerantes de *Clostridium*, podrían ser confundidas con algunos *Bacillus* (1). Lo mismo sucede con algunas especies de *Lactobacillus*, etc.

Por otra parte, a medida que avanzan los estudios genéticos, las bacterias, al igual que otros

microorganismos, son "reubicadas" en otros géneros o grupos. Un ejemplo de ello es *Arcanobacterium haemolyticum*, que en 1946 había sido clasificado como *Corynebacterium haemolyticum* y del que, además, algunos investigadores sugirieron que es una mutante del *Corynebacterium pyogenes*. (13).

En nuestro trabajo, se aislaron e identificaron 32 especies de Bacilos Gram (+). Los resultados obtenidos, así como su frecuencia y el tipo de muestra de la que fueron recuperados, se pueden observar en la Tabla 6.

Conclusiones

Consideramos que la metodología de trabajo propuesta es sencilla y de fácil aplicación e interpretación para los laboratorios microbiológicos, permitiendo la rápida identificación de Bacilos Gram (+) que desarrollan en presencia de oxígeno y que se encuentran a menudo en muestras clínicas.

Agradecimientos

Al Dr. Arturo Simonetta, Profesor Asociado de la Cátedra de Microbiología Industrial, Dpto. de Biotecnología, F. de Ingeniería Química, U.N.L., por suministrarlos desinteresadamente las cepas controladas de *Lactobacillus plantarum* y *L. casei*.

A la Bqca. Fernanda Argañar, por orientarnos en el diagrama de trabajo para la identificación de *Bacillus*.

Bibliografía

- 1- Konemam, E.W.; Allen, S.D.; Jands, W.; Schreckenberger, P.C.; Winn, W.C. 1997. "Diagnostic Microbiology. Color Atlas and Text Book". Lippincott-Raven Publishers. (Philadelphia).
- 2- Brock, T.D.; Madigan, M.T.- 1993. "Microbiología". Prentice Hall Hispanoamericana S.A. (Mexico).
- 3- Stanier, R.Y.; Ingraham, J.L.; Wheelis, M.L.; Painter, P.R.- 1989. "Microbiología". Editorial Reverté S.A. (Barcelona).
- 4- Antimicrobianos. Bases para una terapéutica racional. Curso de educación a distancia. 1991. Colegio de farmacéuticos de la Pcia. de Santa Fe. 1º circunscripción.
- 5- Glen Mayhall, C. 1996. "Hospital Epidemiology and Infection Control". Williams & Wilkins (Baltimore).
- 6- Mandell, G.L.; Gordon Douglas, R.; Bennett, J.E.-1991. "Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica". Editorial Médica Panamericana. (Buenos Aires)

7- Lennette, E.H; Balows, A.; Hausler,W.J.; Shadomy, H.J.-1985. "Manual of Clinical Microbiology". American Society for Microbiology. (Washington).
 8- Mac Faddin, J.F.-1980. "Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacterias de importancia clínica". Editorial Médica Panamericana S.A. (Buenos Aires).
 9- Bayley/ Scott; Finegold, S.M; Baron, E.J.- 1989. "Diagnóstico Microbiológico". Editorial Médica Panamericana. (Buenos Aires).
 10- Quinteros, M.- 1995. "Corynebacterium". - Publicación del Programa de Control de calidad en bacteriología .M. de Salud y

Acción Social de la Prov. de Bs. As. e Instituto Nacional de Microbiología C. Malbrán. (Buenos Aires).
 11- Leardini,N. 1996. "Listeria" Publicación del Programa de Control de calidad en bacteriología .M. de Salud y Acción Social de la Prov. de Bs. As. e Instituto Nacional de Microbiología C. Malbrán. (Buenos Aires).
 12- Manual Difco. 1984. "Medios de cultivo deshidratados y reactivos para microbiología". Difco Laboratories (Detroit).
 13- Bergeys.- 1986.- "Manual of Systematic Bacteriology" Williams & Wilkins. (Baltimore).

Diagrama 1. Bacilos Gram positivos que desarrollan en presencia de oxígeno

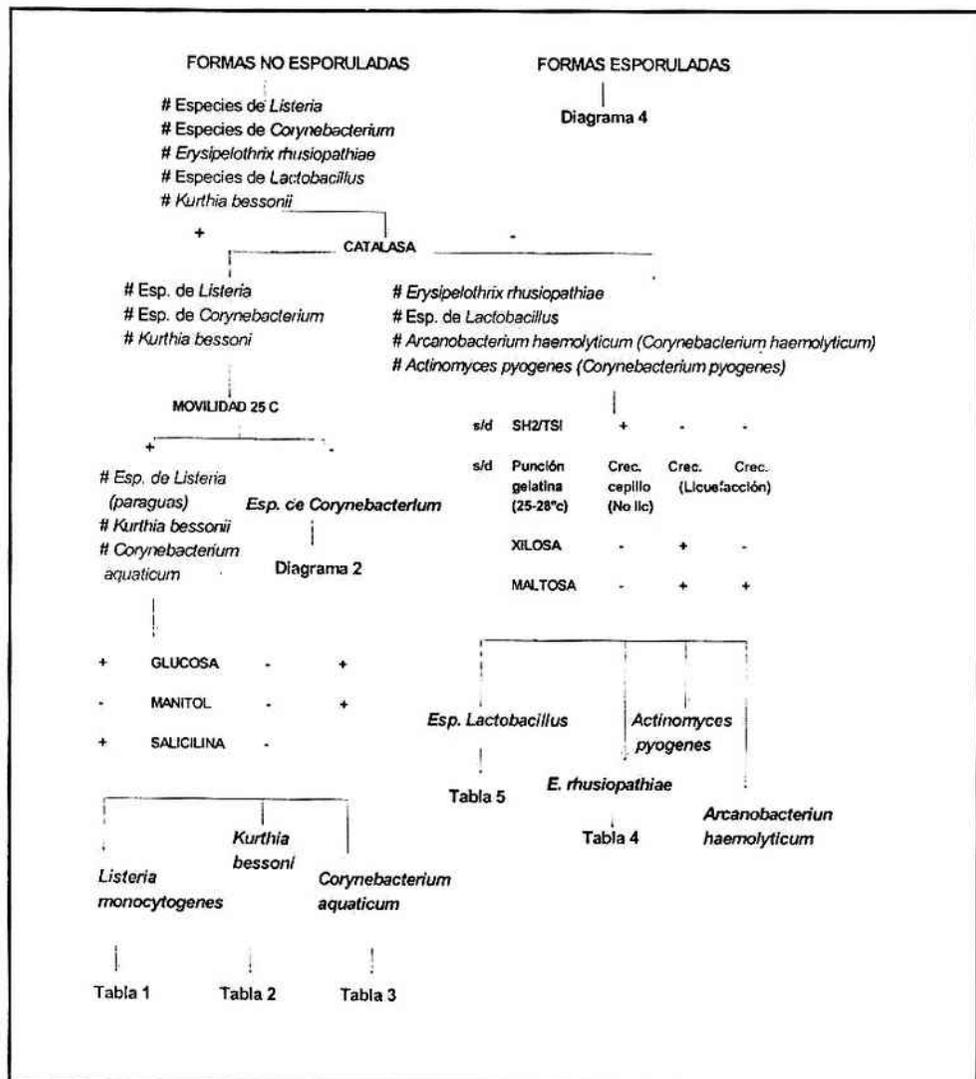


Diagrama 2. Diferenciación entre las especies de *Corynebacterium* inmóviles catalasa positiva halladas con mayor frecuencia en un laboratorio clínico

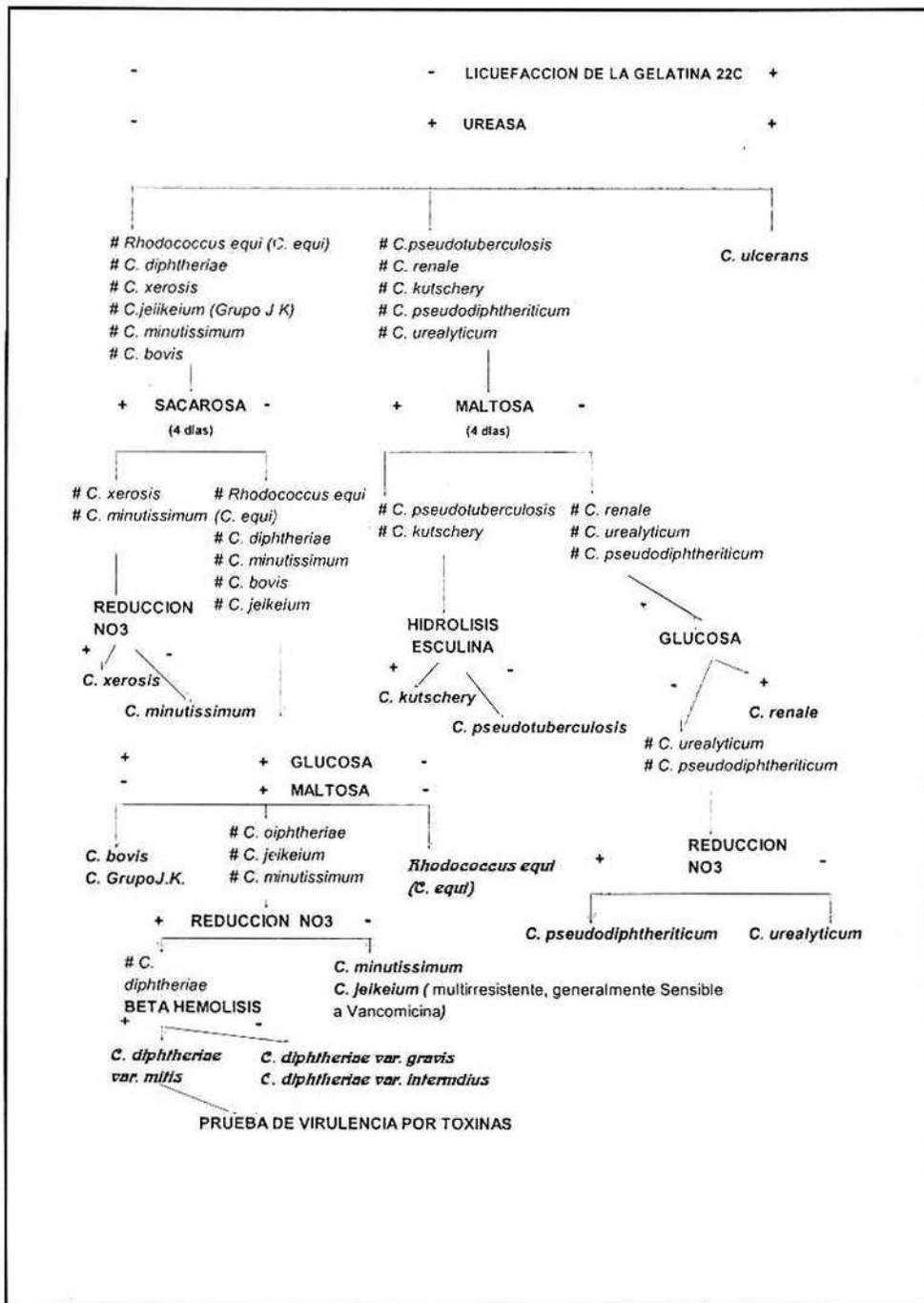


Tabla 1.
Pruebas confirmatorias para
Listeria monocytogenes

- BETA HEMOLISIS +
- OXIDASA +
- D-XILOSA -
- BILIS ESCULINA +
- ROJO DE METILO +
- VOGES PROSKAWER +
- ARGININA +
- TREHALOSA +
- CAMP TEST + (Con *S. aureus*)
- UREASA -
- REDUCCION NO₃⁻
- RAMNOSA +
- CRECIMIENTO 4°C +

Tabla 4.
Pruebas confirmatorias para
Erysipelothrix rhusiopathiae

- OXIDASA -
- MOTILIDAD -
- REDUCCION NO₃⁻
- GLUCOSA (48h) +
- XILOSA -
- MANITOL -
- LACTOSA (48h) +
- SUCROSA -
- MALTOSA -

Tabla 2.
Pruebas confirmatorias para
Kurthia bessonii

- BILIS ESCULINA -
- REDUCCION NO₃⁻
- INDOL -
- CRECIMIENTO "PLUMA DE AVE"
EN CULTIVO POR PUNCIÓN.

Tabla 3.
Pruebas confirmatorias para
C. aquaticum

- OXIDACION-FERMENTACION: OXIDATIVO
- MALTOSA +
- VOGES PROSKAWER -
- SACAROSA +

Tabla 5.
Pruebas confirmatorias para
Lactobacillus spp.

- Crecimiento en medio selectivo LBS (con jugo de tomate y pH bajo)
- Requerimiento de O₂: ANAEROBIOSIS.
- Resistente a la Vancomicina (inusual en los otros BG(+))

Diagrama 3

Diagrama 3. Identificación de las 4 especies de *Lactobacillus* más frecuentemente halladas que pueden crecer aeróbicamente

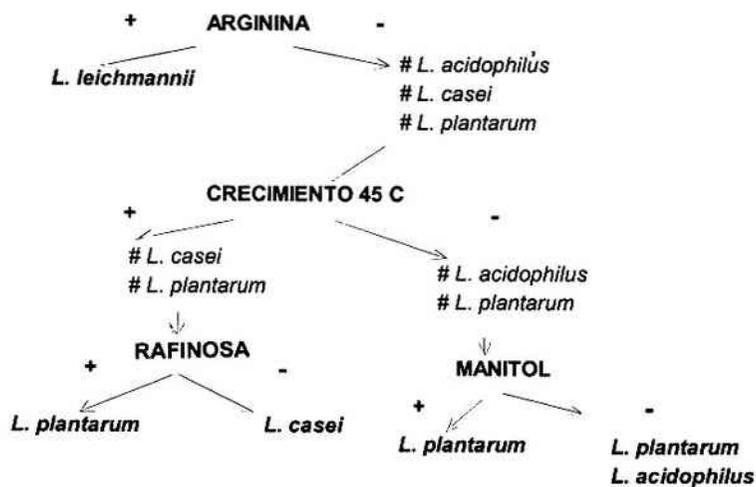


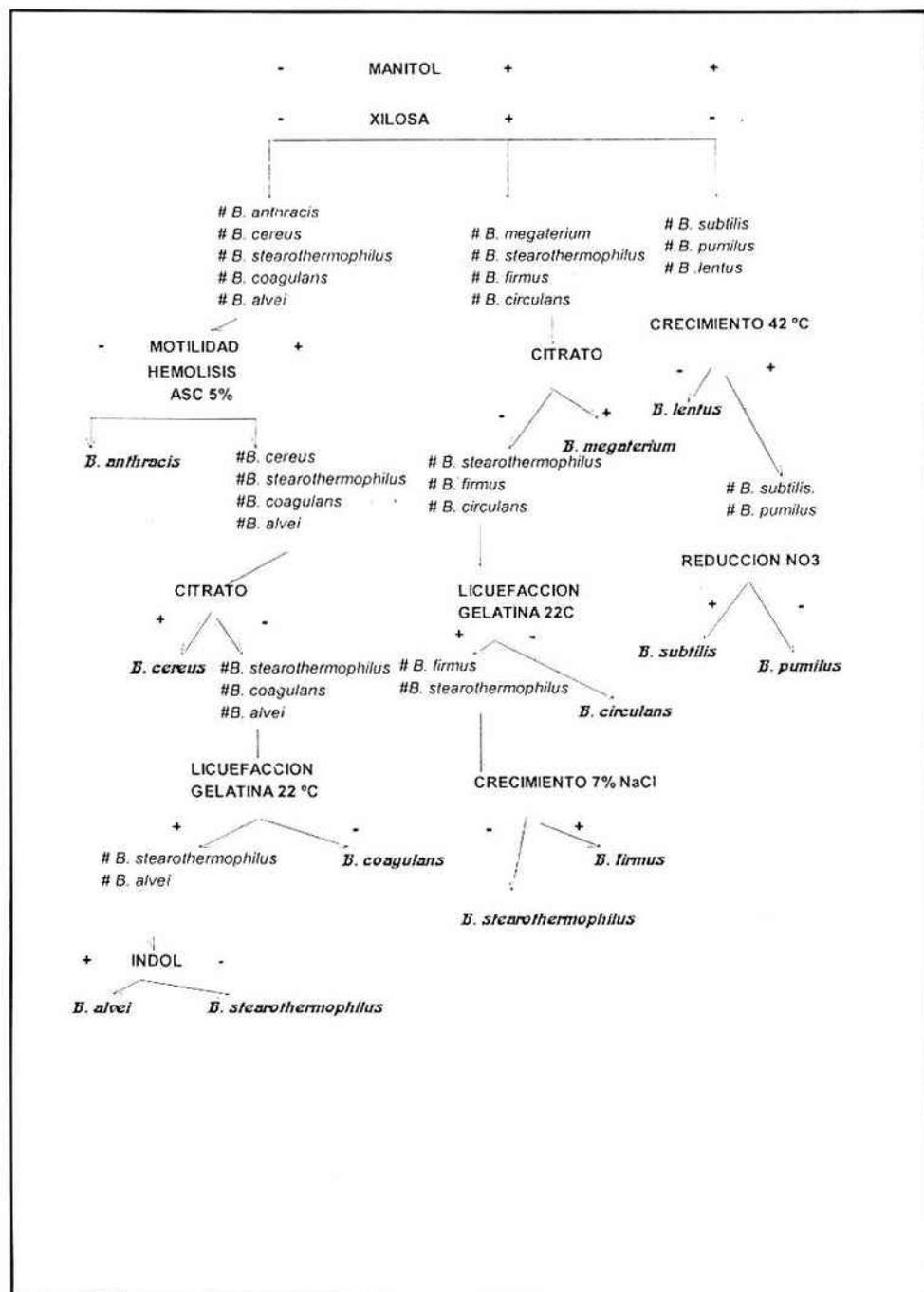
Diagrama 4. Diferenciación de especies de *Bacillus* (formas esporuladas)

Tabla 6. Bacilos Gram positivos aislados e identificados, frecuencia en relación del tipo de muestra

Especies de Bacilos Gram +	TOTAL	Hemocul-tivo	Líquidos de punción	Tracto genitouri-nario	Secreción de herida	Catéteres	Tracto respiratorio Superior	Líquido amniótico	D.I.U.	Secreción conjuntival
<i>C. xerosis</i>	8	2	2	3	-	1	-	-	-	-
<i>C. jeikeium</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. ulcerans</i>	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>C. minutissimun</i>	11	4	2	4	1	-	-	-	-	-
<i>C. urealyticum</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. pseudodiphtheri-ticum</i>	2	-	-	1	-	-	1	-	-	-
<i>R. equi</i>	5	2	-	2	-	-	-	-	-	1
<i>A. haemolyticum</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. casei</i>	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>L. leichmannii</i>	2	-	-	-	-	-	-	1	1	-
TOTAL		11	4	11	1	2	1	1	1	1