

00544

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
FACULTAD DE QUÍMICA.
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO.
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO
"FEDERICO GÓMEZ".

AISLAMIENTO DE ACTINOMICETOS EN MUESTRAS
CLÍNICAS DEL HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO.

TESIS.

Que para obtener el grado de:

ESPECIALIDAD EN BIOQUÍMICA CLÍNICA

280730

PRESENTA:

Biol. Exp. GUADALUPE YOLANDA MARÍN LÓPEZ.

Asesor:

DR. ADOLFO PÉREZ MIRAVETE.
PROFESORA QBP. ELSA GARCÍA-C RAMOS.

MÉXICO, D. F.

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TUTOR DE TESIS.

DOCTOR ADOLFO PEREZ MIRAVETE

ASESOR DE TESIS.

PROFESORA QBP. ELSA GARCIA-CANO RAMOS.

JURADO.

PRESIDENTE

DR. ANGEL HORACIO SANDOVAL Y TRUJILLO (UAM-X)

PRIMER VOCAL

Q.B.P. ELSA GARCIA CANO RAMOS (ENCB-IPN)

SECRETARIO

ESP. B. C. ROMELIA VELASCO ORTÍZ (INP)

PRIMER SUPLENTE

DRA. REBECCA FRANCO BOURLAND (INN)

SEGUNDO SUPLENTE

M. en C. LEOPOLDO VALIENTE BANUET (UNAM)

AGRADECIMIENTOS...

Hospital Regional 1º de Octubre -ISSSTE: Por otorgarme la beca y darme la oportunidad de realizar la Especialidad en Bioquímica Clínica.

Hospital Infantil de México “Federico Gómez”: Por permitirme la estancia para realizar esta investigación.

Facultad de química - UNAM: Por brindarme la oportunidad de adquirir los conocimientos dentro de sus aulas.

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas - IPN y Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Xochimilco: Por el apoyo brindado para la realización de la presente tesis.

*A través de este documento expreso mi agradecimiento al **Dr. Adolfo Pérez Miravete**, por su apoyo, orientación y atención de permitirme realizar mi trabajo en el Laboratorio de Bacteriología del Hospital Infantil de México.*

Con admiración y respeto porque con su ejemplo, aprendí que la disciplina, la honestidad, el amor al trabajo y la fuerza de voluntad, son valores que nos ayudan a cumplir los propósitos que se deseen en la vida

*Deseo expresar mi agradecimiento a la profesora **Q.B.P. Elsa García Cano Ramos**, por compartir sus conocimientos y experiencias, su desinteresado apoyo, dedicación y paciencia en la confección y transcripción de la presente tesis*

*Agradezco al **Dr. Horacio Sandoval y Trujillo**, el apoyo que me brindo en la realización de las pruebas bioquímicas de los actinomicetos aerobios. Así como sus observaciones oportunas, sus conocimientos compartidos y la revisión detallada de esta trabajo.*

*A la **Q.F.B. Yolanda Jiménez Tapia, Virginia Alcázar López y Verónica Rodríguez Nava**, por su disposición a la enseñanza, cooperación y apoyo incondicional, que hicieron posible la realización de este documento.*

*Al **personal del Laboratorio de bacteriología**, con quien tuve la oportunidad de trabajar y convivir en un ambiente de cordialidad, mi agradecimiento por sus enseñanzas y su amistad brindada*

*Al **Q.F.B. Jesús Resendíz Sánchez**, por su gran calidad humana, amistad y por su afán indomable de compartir sus conocimientos.*

*A **Jorge**, por compartir su valiosa amistad, tiempo, creatividad, entusiasmo y esfuerzo en la presentación de las fotografías de la presente tesis.*

*A **Marlen**, por ayudarme a producir dichas páginas a tiempo y las sugerencias útiles que apporto en el desarrollo de este manuscrito.*

*A **Ma. Elena Várela C.** por su apoyo que siempre me ha brindado y su amistad incondicional.*

*A **Luz Ma. Barrera**, por escucharme, guiarme y enseñarme a romper las barreras de la incapacidad, para poder continuar mi camino y aceptar las enseñanzas que proporcionan los errores cometidos. Gracias por su sabiduría y fortaleza.*

*A mi hermana **Rosa María**, por haber sido mi apoyo en los momentos difíciles y por creer en mi.*

*A mis **padres** y en especial a mi **madre**, les agradezco su esfuerzo, apoyo y su amor humilde y bondadoso que me han brindado. Con todo cariño **Gracias**.*

RESUMEN

INTRODUCCION. Los actinomicetos son microorganismos oportunistas y generalmente producen enfermedades crónicas con una sintomatología poco característica, constituyen un grupo de bacterias filamentosas, Gram positivas. En la actualidad se consideran auténticas bacterias por el análisis de su pared celular que muestra la presencia de ácido murámico, típico de este grupo, por la ausencia de un núcleo estructural, la falta de mitocondrias, la susceptibilidad a los agentes antibacterianos y resistencia a los antifúngicos. Los actinomicetos no son frecuentemente aislados en los laboratorios clínicos por la dificultad que presentan para identificarlos, pluralidad etiológica, En cuanto a las infecciones causadas por actinomicetos aerobios (*Nocardia*, *Streptomyces*, *Actinomadura*, *Rhodococcus*, etc.) y anaerobios (*Actinomyces*), se ha establecido que responden mejor a la terapia si se tratan tempranamente, el diagnóstico a tiempo es crítico para que el tratamiento sea exitoso.

OBJETIVO. Aislar e identificar de las muestras clínicas del Hospital Infantil de México actinomicetos.

METODOLOGÍA. Se realizó un estudio experimental, prospectivo, transversal, descriptivo y abierto, con muestras clínicas del Hospital Infantil de México, empleando dos condiciones:

- 1) Aerobiosis: se empleo el medio bifásico Columbia y el medio de tioglicolato líquido para primoaislamiento a 37°C de 24 Hrs.-15 días. Los medios en que se obtuvo un buen crecimiento fueron gelosa sangre, gelosa chocolate, BHI y avena.
- 2) Anaerobiosis: se utilizó el sistema Anaerocult ® A, a 37°C, durante 48 hrs. La muestra se sembró en caldo tioglicolato, con carne cocida y gelosa sangre hemina menadiona (GSHM), y en gelosa sangre alcohol fenil etílico (GSAFE) como medio selectivo para aislar *Actinomyces* sp.

Para identificar a los *Actinomyces* se utilizó el microsistema API-20A.

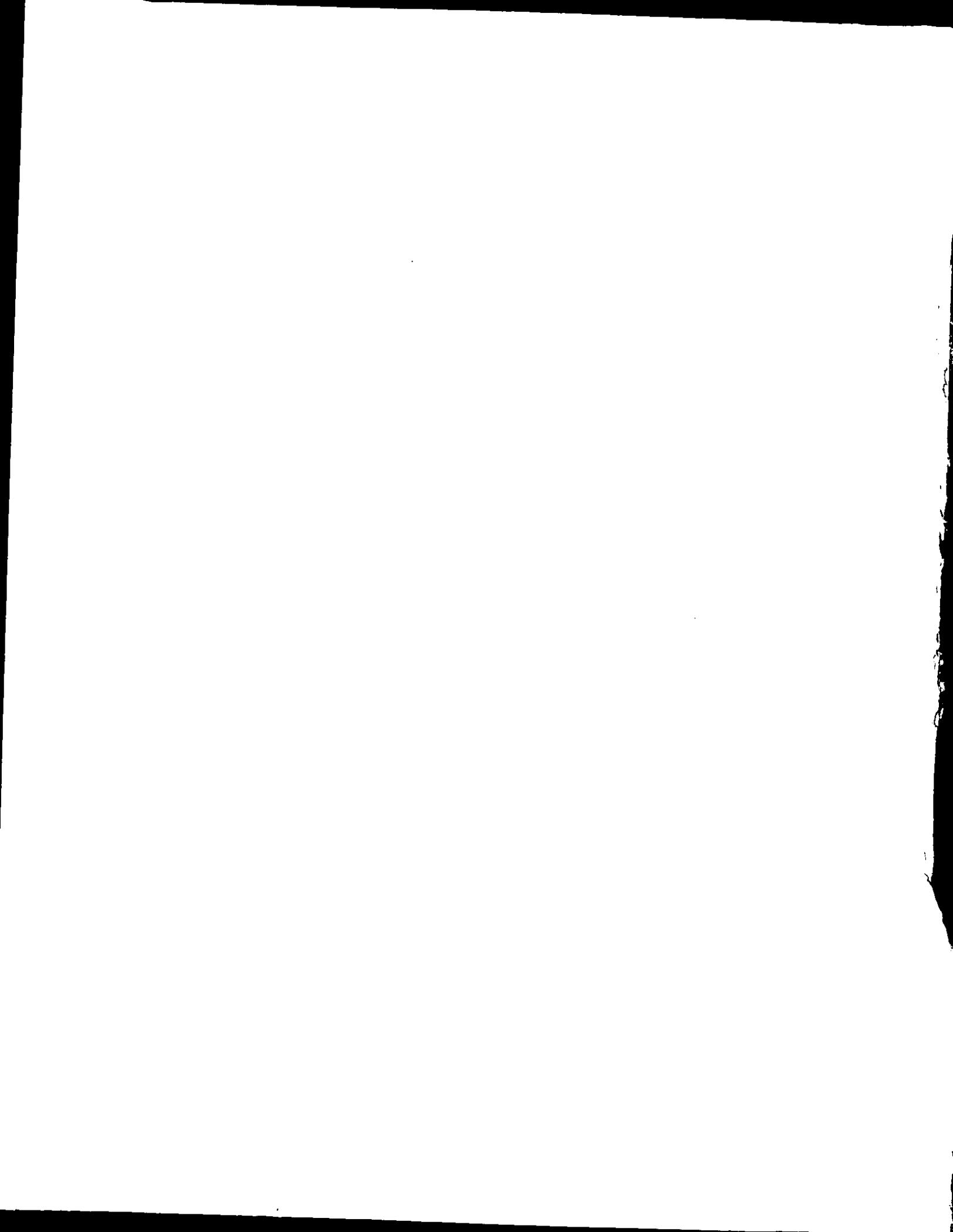
En la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (UAM-X) las pruebas realizadas, fueron: hipoxantina, xantina, tirosina, API-20E, API-ZYM, API-50CH y en el Hospital Infantil se hicieron: hidrólisis de caseína, licuefacción de la gelatina, peptonización y urea, con lo que se logró identificar *Streptomyces* sp. y *Nocardia* sp. principalmente.

RESULTADOS. De 4109 hemocultivos se encontraron 15 actinomicetos, en dos de ellos no se logró la identificación por la contaminación que existía con otros microorganismos, 1 fue *Nocardia asteroides*, 12 *Streptomyces* sp. en la unidad de transplante de Médula Osea se obtuvo un caso con *Streptomyces* sp.. De un fragmento de hueso de peroné izquierdo se identificó *Nocardia brasiliensis*.

De las muestras clínicas en que se buscó *Actinomyces*, se encontraron: dos cepas de *Actinomyces naeslundii*, una de *Actinomyces meyeri* y otra de *Actinomyces israelii*.

ÍNDICE.

	Página
Introducción	1
Actinomicetos	3
Diagnóstico de laboratorio	10
Métodos de detección directa	10
Cultivos	11
Morfología de las especies del grupo nocardioforme	11
Inmunidad	15
Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y terapia	16
<i>Actinomyces</i>	17
Actinomicosis	18
Actinomicosis cervicofacial	19
Actinomicosis torácica	20
Actinomicosis abdominal	21
Actinomicosis pélvica	21
Formas menos frecuentes	24
Morfología e identificación de los <i>Actinomyces</i>	24
Patogénesis	25
Patogenicidad en animales de experimentación	26
Datos Clínicos	26
Diagnóstico	27
Colección y transporte de las muestras	27
Biopsias	29
Examen microscópico	29
Cultivos	29
Identificación	30
Serología	32
Inmunidad	32
Tratamiento	33
Justificación	34
Planteamiento del problema	35
Hipótesis	35
Objetivos	35
Diseño de la investigación	36
Población	36
Criterios de inclusión	36
Criterios de exclusión	36
Criterios de eliminación	36
Metodología	37
Aislamiento de actinomicetos anaerobios (<i>Actinomyces sp.</i>) de diversas muestras clínicas	38
Aislamiento de actinomicetos aerobios en hemocultivos	42
Aislamiento de actinomicetos de tejido óseo o pulmonar	45



	Página
Resultados	46
Análisis de Resultados	53
Conclusión	54
Recomendación	55
Apéndice	56
Formato que se utilizó para asentar los datos Microbiológicos	57
Conservación de cepas	60
Medios de cultivo	61
Siembra y lectura de las pruebas metabólicas	67
Técnica de Gram	70
Técnica de tinción ácido resistente (Método Zihel-Neelsen)	71
Preparación de indicadores y reactivos	72
Material y Equipo	73
Referencias	75

ÍNDICE DE CUADROS.

	Página
1. Algunas características de la familia <i>Actinomycetales</i>	3
2. Principales componentes de la pared celular de los actinomicetos, excluyendo los lípidos	4
3. Características diferenciales de los <i>Actinomyces</i> , <i>Nocardia</i> y de los hongos	6
4. Actinomicetos aerobios clínicamente relevantes	7
5. Diferenciación de los bacilos anaerobios Gram-positivos	17
6. Actinomicetos aislados de las lesiones actinomicóticas en humanos	19
7. Frotis cervical positivo para <i>Actinomyces</i> en relación a la duración del uso y tipo de DIU.	23
8. Agrupación de las bacterias en relación con los potenciales de óxidorreducción	26
9. Pruebas presuntivas para algunos grupos de <i>Actinomyces</i> de acuerdo a la metodología de Lombard y Dowell	31
10. Características diferenciales de tres especies de <i>Actinomyces</i> .	32
11. Frecuencia de actinomicetos aerobios aislados de muestras clínicas en el Hospital Infantil de México "Federico Gómez"	48
12. Aislamiento de anaerobios (<i>Actinomyces sp.</i>) y otras bacterias de diversas muestras	49

ÍNDICE DE FIGURAS.

	Página
1. <i>Geotrichum</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp., <i>N. otitidiscaviarum</i> , <i>N. asteroides</i>	5
2. <i>Nocardia asteroides</i> y <i>N. farcinica</i>	8
3. <i>Nocardia brasiliensis</i> y <i>Rhodococcus</i> sp.	14
4. Aislamiento de actinomicetos anaerobios	40
5. Frote de líquido peritoneal	41
6. Aislamiento de actinomicetos aerobios en hemocultivos	43
7. Agar de avena para corroborar la esporulación de los actinomicetos	44
8. Aislamiento de actinomicetos aerobios en tejido óseo	45
9. Frote de <i>Nocardia brasiliensis</i> (785)	47
10. Colonias y frote de <i>Streptomyces</i> sp.	50
11 <i>Actinomyces naeslundii</i>	51
12 <i>Actinomyces meyeri</i>	52
13. Aislamiento de actinomicetos anaerobios (<i>Actinomyces</i>) de diversas muestras	58
14. Aislamiento de actinomicetos aerobios en hemocultivos	59

INTRODUCCION

Aunque los actinomicetos se han asociado con países subdesarrollados del área tropical y subtropical del mundo, con frecuencia también se han encontrado muestras clínicas en países desarrollados como Estados Unidos y países de Europa ^{43,49}

Por otro lado, los actinomicetos aerobios se trabajan poco en los laboratorios clínicos por su dificultad para identificarlos, clasificarlos y poder determinar la susceptibilidad a los antibióticos. ^{7,33}

En México los micetomas causados por *N. brasiliensis* representa serios problemas de salud pública que requiere de atención por parte de las autoridades sanitarias.

La actinomicosis es una enfermedad producida por actinomicetos anaerobios, es crónica granulomatosa, progresiva, supurativa, con formación de múltiples abscesos que drenan por fistulas, las cuales contienen gránulos lobulados firmes (gránulos de azufre) o microcolonias del agente etiológico. ^{11,29,34,44}

Desde hace mucho tiempo se conocen diferentes especies de *Actinomyces* que producen actinomicosis tanto en el hombre como en determinados animales. ¹¹ Estos microorganismos forman parte de la flora normal de la cavidad oral y del intestino de los huéspedes anteriores. ^{11,29,34,44} Se aislan a partir de los dientes, placa dental y criptas amigdalinas cuando existen factores predisponentes como pueden ser, un traumatismo, extracción de una pieza dentaria o cuando hay una obstrucción con amalgama, sin haber eliminado completamente la caries; se favorecen las condiciones para su multiplicación y diseminación, dando como resultado, infecciones agudas o crónicas que en ocasiones pueden ser graves dependiendo del huésped y del tratamiento. ¹¹

Cuando se hacen estudios histológicos del sitio infectado, se ha observado una relación inflamatorio supurativa que varía desde un absceso agudo con leucocitos, polimorfonucleares, linfocitos, células plasmáticas y macrófagos espumosos. Los "gránulos de azufre" están embebidos en las áreas purulentas de la lesión con una masa central de filamentos entrelazados y masas o clavaz radiadas periféricas. ¹¹

Actinomyces israelii, *A. naeslundii*, *A. viscosus*, *A. odontolyticus*, *A. pyogenes*, y *A. meyeri* son los agentes causales de la actinomicosis en humanos, ³⁴ son bacterias oportunistas, anaerobias o microaerófilas, Gram positivas, que en condiciones de estricta anaerobiosis, no forman cápsula, ni esporas, son inmóviles y no presentan ácido alcohol resistencia ^{20,34}

Actinomyces israelii es el agente causal más común que produce actinomicosis en humanos, los sitios principales que involucra son el área cervicofacial, el tórax, abdomen, pelvis y raramente, el hígado es afectado. ^{34,44}

Las enfermedades respiratorias, y entre ellas la neumonía, ocupan los primeros lugares como causa de morbilidad y mortalidad en México. Descartando la etiología viral se considera que la etiología bacteriana sigue siendo importante sobretudo en la población anciana e infantil propiciado por la contaminación ambiental, estado nutricional de la persona, hacinamiento, promiscuidad y el uso indiscriminado de tratamiento con antimicrobianos. ¹⁹

Las infecciones de las vías respiratorias bajas como la neumonía o bronconeumonías, son causadas por bacterias como *Streptococcus pneumoniae* y *Klebsiella pneumoniae*, sin embargo, en los últimos años se han reportado otras bacterias como *Staphylococcus aureus*,

enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosas* y anaerobios obligados entre ellos: *Prevotella* sp., *Bacteroides melaninogenicus* y *Peptococcus* sp., involucradas principalmente en abscesos pulmonares, empiema y neumonías por aspiración.²¹

La importancia clínica de las bacterias anaerobias, particularmente los clostridia toxigénicos es bien conocida; sin embargo, un conocimiento más completo que incluyera otros géneros de bacterias y su papel en las infecciones humanas estuvo limitado por mucho tiempo.¹⁹

Afortunadamente el interés por los microorganismos anaerobios ha aumentado y ya existen diferentes grupos que los trabajan en el país.

En la literatura se encontró que *A. israelii* causa enfermedades toracopulmonares como la actinomicosis pulmonar.⁵

En pacientes con problemas pulmonares como la neumonía, abscesos u otras infecciones, es difícil tomar una muestra adecuada para la investigación, ya que se puede arrastrar flora normal de la cavidad oral¹⁹ por lo que se recomiendan las técnicas invasivas como la aspiración transcricotiroidea o la punción directa del pulmón y las biopsias. Estas técnicas invasivas pueden causar efectos colaterales, que en ocasiones llegan a poner en peligro la vida del paciente, por esta razón es necesario que esas técnicas las realice un profesionalista con experiencia.²¹

Debido a la pluralidad etiológica, dificultad de obtener una muestra adecuada, a que la actinomicosis es una enfermedad crónica y con una sintomatología poco característica, es difícil establecer un diagnóstico clínico preciso.

Se ha establecido que las infecciones causadas por actinomicetos aerobios y anaerobios responden mejor a la terapia si se tratan tempranamente de donde se desprende que el diagnóstico a tiempo es crítico para que el tratamiento sea exitoso.²⁵

ACTINOMICETOS

Los actinomicetos, constituyen un grupo de bacterias filamentosas que están relacionadas con corinebacterias y micobacterias²⁸ (Cuadro 1), (Fig. 1. A,B y C). Durante mucho tiempo estuvieron considerados como hongos, por formar filamentos delgados o hifas parecidos a los hongos,²² por esta razón se estudiaron en los tratados de micología.^{40, 33} Se les asignó el nombre de actinomicetos que deriva del griego *actis* (rayo) y *mycetis* (hongo) "hongo del rayo de sol".⁵¹ En la actualidad se consideran auténticas bacterias.^{40, 33}

CUADRO 1 Algunas características de la familia Actinomycetales

Género	Ramificación verdadera	Acido-resistencia	Acido-resistencia débil ^a	Crecimiento aerobio	Sensibilidad a la penicilina
<i>Mycobacterium</i>	-	+ ^c	+	+	-
<i>Actinomyces</i>	+	-	-	-	+
<i>Nocardia</i>	+	-	+ ^b	+	-
<i>Streptomyces</i>	+	-	Rara	+	-

^a Usando un decolorante débil (H₂SO₄ al 1%).

^b Sólo se aplica a *N. asteroides* y *N. brasiliensis*.

^c Método de Zeihl-Neelsen para *M. tuberculosis*.

Champoux, J. J. y col. 1993.¹⁴

Los actinomicetos son un grupo de microorganismos que crecen en algún momento de su ciclo en forma de filamentos delgados u ondulados o hifas con un diámetro de 0.5 a 0.8 µm que presentan ramificaciones laterales y dicótomas, y algunos géneros pueden crecer fuera del medio formando micelos aéreos.^{33, 50} En medios sólidos, los filamentos aparecen en forma de clavos enmarañados, mientras que los medios líquidos tienen tendencia a crecer en bloques o en centros, y llegan a fragmentar en elementos cocoides y/o bacilares. Los géneros de interés clínico son: *Actinomyces*, *Propionibacterium* (*Arachnia*) y *Rothia* que son anaerobios obligados y/o facultativos y los aerobios llamados corineformes y nocardioformes son: *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, *Actinomadura*, *Streptomyces* y *Dermatophilus*.^{17, 33}

Los actinomicetos son bacterias, gram-positivas, no esporulados y muestran con frecuencia una tinción irregular.^{14, 22} Con respecto a su morfología, variedad química y fisiología, presentan una diversidad sorprendente: por ejemplo por la composición de la pared celular los actinomicetos se agrupan en ocho tipos diferentes (I-VIII), en los que el ácido muránico está acetilado y la lisina está presente en varios de los quimiotipos V y VI y en el género *Arachnia* el quimiotipo I²² (Cuadro 2).

CUADRO 2 Principales componentes de la pared celular de los actinomicetos, excluyendo los lípidos (según Lechevalier et al)

Género de actinobacterias	Pared	Tipo	Principales componentes Aminoácidos	Otros	Moles % G + C
<i>Streptomyces Intrasporangium</i>	I	A3 γ	L-DAP	glicina	68-69
<i>Arachnia</i>			L-DAP	galactosa	63-65
<i>Actinoplanes</i>	II	A1 γ	meso-DAP; Hidroxi-DAP	glicina	72-73
<i>Micromonospora</i>					71-73
<i>Actinomadura madurae</i>	III	A1 γ	meso-DAP	madurosa	66-69
<i>Dermatophilus</i>					57-59
<i>Microbispora</i>					67-74
<i>Brevibacterium</i>				Galactosa, ácido teicoico, glucosa glicerol	60-64
<i>Corynebacterium tipo diphtheriae</i>	IV	A1 γ	meso-DAP	arabinosa, galactosa	51-63
<i>Mycobacterium</i>					62-69
<i>Nocardia</i>					64-72
<i>Rhodococcus</i>					63-72
<i>Oerskovia turbata</i>	V	A4 α	Lisina,	galactosa, aspártico, serina	
<i>Actinomyces israelii</i>	V,VI		Lisina, ornitina	ácido aspártico	60-73
<i>Arcanobacterium</i>	VI	A5 α	Lisina	ramnosa	50-52
<i>Arthrobacter</i>	VI	A3 α	Lisina	galactosa, licina, ácido aspartico	59-62
<i>Rothia</i>				fructosa, glucosa, galactosa ribitol	65-70
<i>Cellulomonas</i>		A4 β	Ornitina	Aspártico, glutámico	71-76
<i>Oerskovia</i>	VI+Gal		Lisina	Galactosa, ác.	70-75
<i>Agromyces</i>	VII	B2 α	DAB	Aspártico glicina	71-72

DBA = Acido diaminobutírico ; LL DAP = Acido diaminopimélico ; G + C = Guanina + Citosina

Tomado de García-Ramos ⁽²²⁾, Sandoval y Trujillo ⁽⁴³⁾

1. Otros datos importantes para considerar a los actinomicetos como bacterias, es mediante el análisis de su pared celular que muestra la presencia del ácido murámico, típico de este grupo, que junto con la ausencia de un núcleo estructural, membrana celular, ⁴⁰ tamaño de sus células, la susceptibilidad a los agentes antibacterianos y la resistencia a los antifúngicos ⁴⁰ define a estos organismos como bacterias, y no como hongos ^{17, 40, 33} (Cuadro 3).

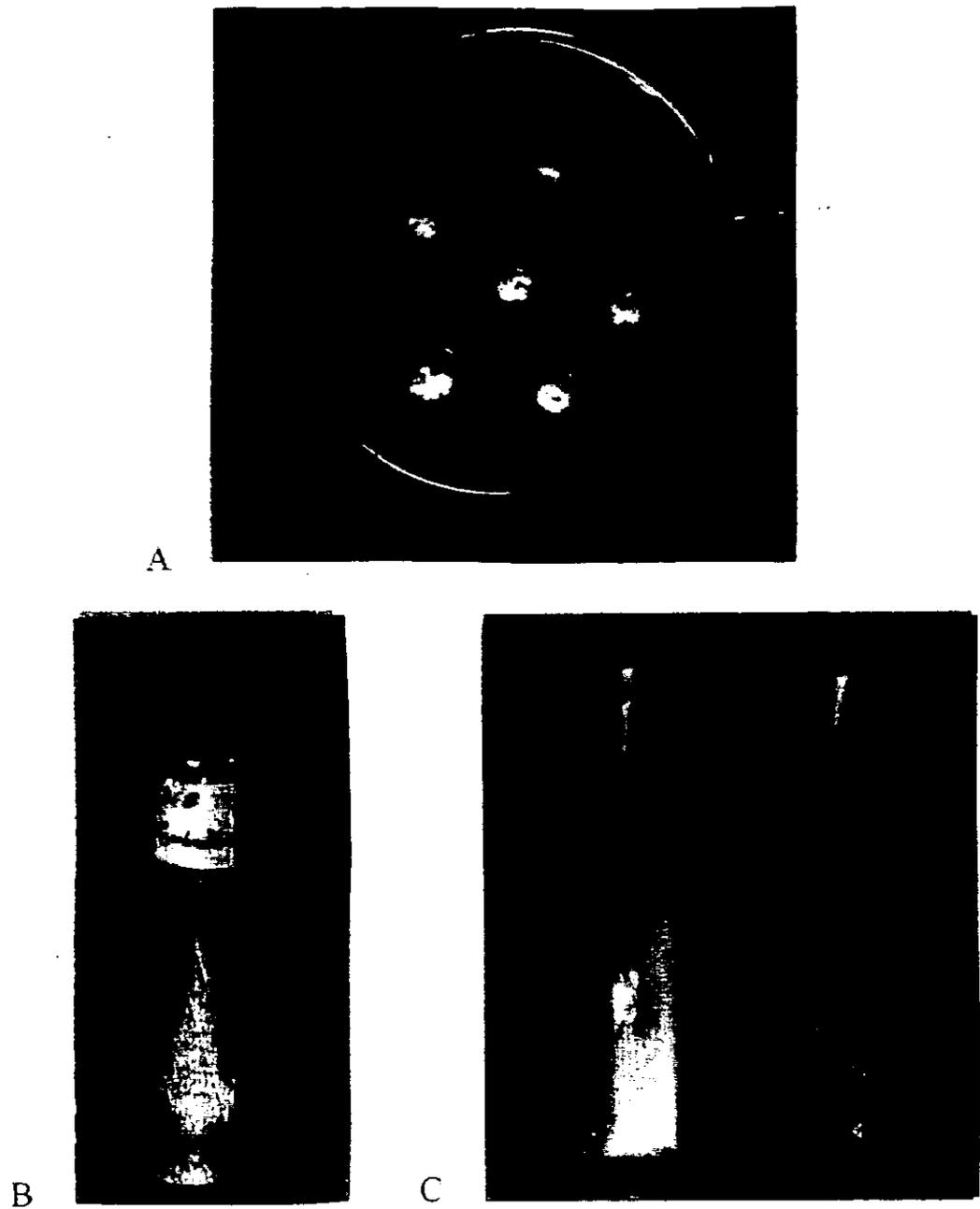


Fig.1. A. Placa de agar sabouraud. muestra el crecimiento de colonias blancas del hongos *Geotrichum* sp.
B. Löwenstein-Jensen con colonias blancas de *Mycobacterium* sp. aislado de una biosia de pulmón.
C. Medio de Löwenstein-Jensen, el tubo de la izquierda, muestra la colonia blanca de *Nocardia oitfidiscaviarum*, en el de la derecha se observa una colonia de color naranja de *Nocardia asteroides*. Las dos cepas fueron proporcionadas por la ENCB-IPN Laboratorio de Micología.

CUADRO 3 Características diferenciales de los *Actinomyces*, *Nocardia* y de los hongos.

Características	<i>Actinomyces</i>	<i>Nocardia</i>	Hongos
Propiedades estructurales:			
Membrana nuclear	Ausente	Ausente	Presente
Mitocondrias	Ausente	Ausente	Presente
Quitina en la pared	Ausente	Ausente	Presente
Reproducción:			
Fisión binaria	Sí	Sí	No
Germinación	No	No	Sí
Formación de esporas	No	No	Sí
Inhibición por antibióticos:			
Penicilina	Sí	No	No
Sulfonamidas	No	Sí	No
Antimicóticos	No	No	Sí
Características de tinción:			
Tinción de Gram	Positiva	Positiva	Positiva
Tinción ácidos resistente	Negativa	Positiva	Negativa
Ambiente de crecimiento:			
Aerobio	No	Sí	Sí
Anaerobio	Sí	No	Sí

Tomado de García-Ramos.²²

Entre los actinomicetos aerobios es frecuente la formación de pigmentos, como reacciones de color dentro de todo el espectro, y suele realizarse la diferenciación entre la pigmentación del micelo vegetativo y el micelio aéreo formado de esporas, así como el pigmento que difunde al medio. Suelen observarse pigmentos solubles de color púrpura y pardo en los medios que contienen proteínas. Los actinomicetos, en especial las formas saprófitas, son fisiológicamente activas, utilizando diversos compuestos carbonados y generalmente son proteolíticos. Muchas especies producen un olor a tierra o a rancio, similar al del suelo recién removido o al de los sótanos húmedos. La temperatura óptima de crecimiento suele ser de 20 a 30°C, aunque algunas de las especies patógenas crecen a 37°C y se conocen especies termófilas análogas a las bacterias termófilas. La gran mayoría de los actinomicetos son aerobios o, al menos, han de cultivarse a tensiones bajas de oxígeno, tanto *in vitro* como *in vivo*, y requieren incubación prolongada (4-10 días).^{14, 17}

El género de actinomicetos aerobios se ha dividido en dos grandes grupos (Cuadro 4):

- Los que contienen ácido micólico en la pared celular y por lo tanto son parcialmente ácido resistentes.⁴⁶
- Los que no contienen ácido micólico en la pared celular, no son ácido resistentes.

Los ácidos micólicos son ácidos grasos alfa-aquil-beta-hidroxiácidos de peso molecular elevado, que se presentan en las corinebacterias, rodococos, nocardias y micobacterias. Tienen la particularidad de sufrir fragmentación por pirólisis.

Los perfiles de ácido micólico se utilizan para diferenciar la estructura de cada especie. *Nocardia asteroides* y *Nocardia farcinica* (Fig. 2. A y B) tienen 51.9-53.7 de átomos de carbono en promedio, pero con diferente composición de ácidos insaturados. El ácido micólico de *N. asteroides* está compuesto de abundantes ácidos saturados y \pm 1% de ácido tetraicoico; los ácidos micólicos de la *N. farcinica* están compuestos de ácidos insaturados: abundantes ácidos dinoicos, 2-12 % ac. tetraicoicos y trazas de ácido pentanoico. En contraste con el número promedio de carbonos del ácido micólico de *N. nova* es de 55.7-56.3 son relativamente más largos que *N. asteroides*, *N. farcinica*. En la ramificación alfa de *N. asteroides* 23 206T sus principales componentes son C 16:0, C 18:0 y C 16:0, C 14:0 para *N. farcinica* 23 157T. La presencia de la ramificación alfa monoinsaturada (C 18:1 y C 16:1) es característica de *N. nova*.³⁵

CUADRO 4 Actinomicetos aerobios clínicamente relevantes

Ácido micólico en la pared celular	Organismos
Presente	<i>Nocardia</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Gordonia</i> <i>Tsukamurella</i> <i>Corynebacterium</i>
Ausente	<i>Streptomyces</i> <i>Actinomadura</i> <i>Dermatophilus</i> <i>Nocardiopsis</i> <i>Oerskovia</i> <i>Rothia</i>

Tomado de Bailey et al; 1998⁽⁷⁾

El género *Nocardia* es un habitante del suelo y del agua y son responsables primarios de la descomposición del material vegetal³⁹. Las infecciones causadas por *Nocardia ssp.* son encontradas por todo el mundo. El aislamiento de estos organismos de muestras clínicas en humanos no siempre indica infección; puede sugerir colonización de la piel y del aparato respiratorio superior o en ocasiones puede tratarse de una contaminación del propio laboratorio donde se labora.⁷

La infección por nocardia (nocardiosis) puede adquirirse por inoculación traumática o inhalación,³⁹ también puede presentarse en pacientes inmunocomprometidos, inmunocompetentes (abuso de drogas) o inmunosuprimidos (receptores de transplantes),

causando infecciones invasivas y diseminadas hematógicamente a partir de una infección primaria pulmonar. La infección diseminada puede dar como resultado lesiones en el cerebro, hueso y piel. En el sistema nervioso central la diseminación se presenta en un 30 % de los pacientes, teniendo un pronóstico pobre. ^{7, 10}

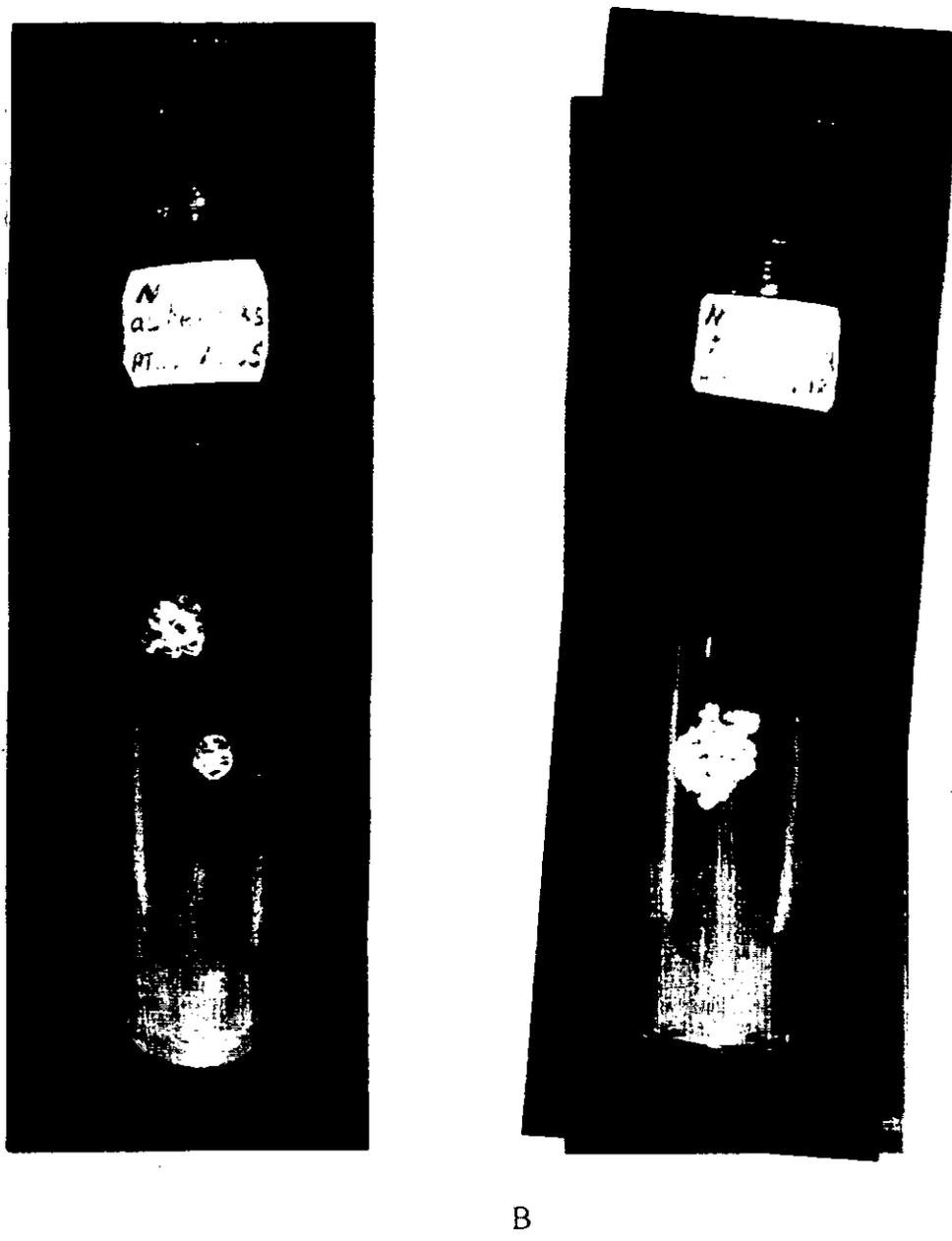


Fig. 2. Medio sabouraud colonias de:
A. *Nocardia asteroides* ATCC 10905.
B. *Nocardia farcinica* ATCC 3318. (Proporcionadas por la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco).
Se observa en ambas colonias el aspecto rugoso, seco, de borde irregular, con prolongaciones periféricas y consistencia de cartilago.

Los pacientes con infecciones pulmonares causados por nocardia, pueden presentar un amplio rango de síntomas de una fase aguda a una crónica, desafortunadamente no existen signos característicos que determinen estas infecciones. Generalmente presentan fiebre, diaforesis nocturna, pérdida de peso y tos productiva que puede ser sanguinolenta. Las complicaciones pueden ser empiema y mediastinitis ⁷.

Bhave describe un caso de nocardiosis diseminada en un paciente de 53 años, 15 años después de haber sido transplantado de la médula ósea. Fue tratado con corticoesteroides 6 meses antes. Presentó fiebre, anorexia, pérdida de peso, tos productiva, disnea progresiva, múltiples lesiones nodulares en el pecho. Se logró aislar en el medio de agar sangre *N. farcinica* y fue tratado con trimetoprin-sulfametoxazol.

Nocardia asteroides, patógeno intracelular que puede crecer en varias células humanas. Causa más del 80 % de las infecciones. Los mecanismos de patogénesis son complejos y no son entendidos completamente. Sin embargo, la virulencia de *N. asteroides* parece estar asociada a varios factores, como su estado de crecimiento, resistencia o muerte intracelular, tropismo hacia el tejido neuronal, capacidad de inhibir la fusión fagosoma –lisosoma y a la producción de grandes cantidades de catalasa y de hemolisina.⁷

Generalmente se presenta como una infección pulmonar primaria, seguida por una diseminación del patógeno al SNC y tejidos blandos. En 1993 y 1999 reportan que el agente causal productor de abscesos en la glándula tiroides es *N. asteroides*.¹²

Nocardia brasiliensis, causa principalmente infecciones en la piel.

El actinomicetoma es una infección crónica de tejido subcutáneo, muscular, conjuntivo y óseo provoca hinchazón del tejido, deformación del área afectada, lesiones de aspecto nodular y de drenaje tortuoso. Estas infecciones son adquiridas por inoculación traumática (espinas, astillas de madera, clavos, piedras, patadas de animales, mordeduras de reptiles), generalmente ocurre en los miembros inferiores (50%), en la espalda y nuca (15%) en los leñadores y cargadores de caña y son usualmente causados por actinomicetos en un 80%. También se presenta en región anal por realizar la limpieza de este sitio con vegetales.^{9, 10, 43}

Actinomicetos productores de micetoma:

Nocardia asteroides

N. brasiliensis (85%)

N. otitidiscaviarum (caviae)

Actinomadura madurae (10%)

A. pelleteri (0.5%)

Streptomyces somaliensis

S. paraguayensis

El micetoma es frecuente en el área del Trópico de Cáncer. En nuestro país se presenta de Guerrero a Morelos, norte de Veracruz, sur de Nuevo León y sur de Sinaloa. No se transmite de hombre a hombre. Produce una reacción inflamatoria compuesta por PMN y fibrosis, es rara por vía linfática y hemática.⁹ El término micetoma se utilizó en 1860 por Vandyke Carter y Cicero en 1912 (primer médico mexicano) la describió en México.⁴³

Actinomadura madurae es más frecuente en mujeres que trabajan en condiciones rudimentarias (campesinas) de la 3ª.- 5ª. Década.⁹

Taniguchi y col., en 1998 publicaron un caso de *N. otitidiscaviarum* en un paciente con infección respiratoria.⁴⁷

Rhodococcus, *Gordonia* y *Tsukamurella* se aíslan principalmente de animales de granja y suelo, también de aguas saladas. Se adquiere primariamente por inhalación, y con poca frecuencia se aísla de muestras clínicas.^{7, 34, 43}

Rhodococcus equi es el más asociado con la enfermedad en humanos, principalmente en pacientes inmunocomprometidos, como los infectados con el virus de inmunodeficiencia (HIV). Es un organismo intracelular facultativo que puede persistir y replicarse dentro de los macrófagos.

Ellerbrock, reportó el primer caso de endocarditis de la válvula tricúspide causado por *Oerskovia xanthinolytica* en una paciente de 53 años, transplantada de médula ósea, por padecer de linfoma no Hodgkin.¹⁵

Los actinomicetos termofilicos son responsables de la neumonitis hipersensible, es una reacción alérgica a estos agentes y afecta principalmente a los granjeros. Se presenta en forma aguda y crónica y se caracteriza por diaforésis, escalofrío, pérdida de apetito, tensión o sensación de estrechés en el pecho, tos y fiebre, después de 4 a 6 horas de la exposición; estos síntomas frecuentemente se resuelven en un día.⁷

Diagnóstico de laboratorio.

Cuando se sospecha clínicamente de nocardiosis, los especímenes múltiples, serán sometidos a cultivo. Solo la tercera parte se detecta en la tinción y en los cultivos, porque en la mayoría de los laboratorios clínicos no se trabajan. Algunos actinomicetos tienden a crecer como en una microcolonia en los tejidos, lo que da origen a la formación de gránulos.^{7, 43}

Métodos de detección directa.

El examen directo al microscopio de las preparaciones teñidas por la técnica de Gram y Ziehl-Neelsen es muy importante en el diagnóstico. Frecuentemente la demostración de que son Gram positivos, filamentos ramificados, proporcionan el primer indicio de la presencia de un actinomiceto aerobio. Desafortunadamente, los actinomicetos no siempre presentan tales características morfológicas, pueden aparecer como cocos positivos, bacilos o filamentos cortos.

En las biopsias o material de drenaje que se sospeche clínicamente que es producido por actinomicetos se buscará la presencia de gránulos.^{7, 9, 33}

Los gránulos por lo regular se presentan en el centro de los microabscesos; excepcionalmente se puede ver una imagen de granuloma tuberculoide. La importancia de la biopsia está en determinar las características tintoriales y formas de los granos porque nos ayuda en la identificación y tipificación de los agentes causales.⁹

Descripción de los granos:

- **Grano de *Nocardia*:** las tres especies se manifiestan de la misma manera, es decir, los granos son multilobulados, se tiñen ligeramente en la periferia con hematoxilina (lila) y en el centro se tiñe con eosina (rosa).

- Grano de *A. madurae*: es grande, tiene gran afinidad por la hematoxilina, por lo tanto queda de color violeta o lila intenso, aunque de manera uniforme.
- Grano de *A. pelleteri*: es grande, tiene poca afinidad por la hematoxilina, en el centro queda ligeramente pálido y su disposición es característica, porque deja espacios o hendiduras, dando el aspecto de “plato roto”.
- Grano de *S. somaliensis* es grande, se tiñe poco con la hematoxilina; es de consistencia muy dura, de manera que al corte con el micrótopo, deja una imagen similar a una “rebanada de papa”.

Si compromete pulmones se realizará el examen de expectoración o lavado bronquial.

Para el examen directo se requiere de un portaobjeto y cubreobjeto, una gota de lugol o solución salina o KOH al 10%.⁹

Cultivos

La mayoría de los actinomicetos, crecen en un medio del laboratorio de rutina como agar sangre, chocolate, sabouraud, agar cerebro corazón (BHI). Sin embargo por su lento crecimiento, (la nocardia crece en un tiempo mínimo de 48-72 horas) puede desarrollar otra flora, que impide su crecimiento sobre todo cuando se trata de muestras contaminadas.

Las colonias se desarrollan entre 3-6 días y cuando provienen de medios líquidos se observan como masas micelares suspendidas, dando el aspecto de una “araña”, son de color blanco o blanco-amarillento, y cuando crecen se vuelven acuminadas, brillantes y de aspecto ceroso, son similares a los “dientes molares”.⁹

Se han propuesto varios medios selectivos para recuperar a los actinomicetos, un medio es con parafina como única fuente de carbono, ha sido efectivo para aislar *Nocardia ssp.*; Martin Lavis y el medio ácido de colistin nalidixico; el agar infusión cerebro corazón con cloranfenicol y cicloheximida, se recomienda en el agar de rutina para mejorar el aislamiento de muestras contaminadas.

El agar selectivo y no selectivo se incuban a 35°C y 30°C. Las placas se incuban por 2 a 3 semanas.⁷

La morfología de las especies incluidas en el grupo nocardioformes (se define como aquella que se reproduce por fragmentación en una o en todas las partes de su estructura en la colonia, en forma de bacilos o elementos cocoides.^{33,43}

Nocardia asteroides.

Apariencia macroscópica. El crecimiento es variable, las colonias se parecen a *Mycobacterium* o a *Streptomyces*. El crecimiento varía de plano y pobre hasta abundante y rugoso con consistencia de cartílago o cuero. La pigmentación varía de color crema hasta amarillo pálido o a beige, naranja o rosa oscuro.

El micelio aéreo invisible a simple vista es pobre o abundante y blanquecino. Muchas colonias producen un exopigmento soluble de color ámbar o café claro.⁷

Apariencia microscópica. Micelio fino y ramificado, menor de 1 µm de diámetro, frecuentemente fragmenta a cocos y bacilos.^{7, 10, 33} Las células son usualmente de ovals a cilíndricas, variando en longitud de acuerdo a la cepa, y algunas veces permanecen intactas.

La cantidad de micelio aéreo puede variar cambiando el medio o la temperatura de incubación y también algunas veces la división de las hifas en cadenas de esporas en forma de rosario.

La ácido resistencia es variable.^{10, 33} Cerca del 70% de los aislamientos son parcialmente ácido resistentes. El número de células que retienen la fucsina fenicada varía del 10% al 80%.

Presentan gránulos metacromáticos, pero al microscopio de luz no se han visto los glóbulos de lípidos observados en microscopía electrónica.

Morfología en el material clínico. No se observan gránulos, pero se ven hifas ramificadas y algunas veces con fragmentación.

Las hifas tienen 0.5 a 1 μm de diámetro con ramificaciones en ángulo recto pero en ocasiones se ven cúmulos de hifas cuya distribución es generalmente difusa.

Nocardia brasiliensis.

Apariencia macroscópica. Las colonias son planas y extendidas o rugosas y elevadas en agar glucosa extracto de levadura, de consistencia suave a membranosa, de color beige o amarillo pálido a naranja. Crece bien en gelatina formando colonias redondas que dan una película que se adhiere a la pared del tubo o forman un sedimento. Es inhibido su crecimiento con cloranfenicol (micosele) (Fig. 3-A).

Apariencia microscópica. Células largas cilíndricas, generalmente permanecen en cadenas intactas. El micelio aéreo es de rudimentario a corto, recto u ondulado o largo y ramificado. Algunas hifas forman espirales en sus puntas. La esporulación es rara. La ácido resistencia es parcial.⁷

Morfología en material clínico. Cuando se tiene pus proveniente de una infección por *N. brasiliensis* se observan gránulos irregulares esféricos y lobulados de menos de 1 mm de diámetro. Pueden ser de color blanco amarillo, el centro de los gránulos está compuesto de una masa apretada de filamentos finos, pero alrededor de estos se encuentran estructuras gruesas conocidas como clavos rodeadas de polimorfonucleares.⁷

Nocardia otitidiscaviarum, (N. caviae).

Apariencia macroscópica. Las colonias son de color blanco cremoso o de crema a durazno o de amarillo o naranja, dependiendo del medio presentan micelio aéreo corto. A veces produce un pigmento café.

Apariencia microscópica. Células ovales y esféricas a cilíndricas, a menudo están acompañadas por hifas intactas no fragmentadas. El micelio aéreo es recto y ramificado y las hifas ocasionalmente terminan en espiral dividida en conidias cilíndricas. La ácido resistencia es variable.⁷

Morfología en material clínico. Se producen gránulos en las infecciones experimentales en ratón, los gránulos son redondos u ovalados, alargados o irregulares, de 100 a 300 μm de diámetro, no poseen clavos.

Rhodococcus rhodochrous.

Apariencia macroscópica. Las colonias son usualmente densas con márgenes lisos pero pueden estar acompañadas por colonias densas con proyecciones o halos de cocos o filamentos o también colonias filamentosas. El crecimiento varía desde húmedo, butiroso y brillante a opaco, ceroso y fino o toscamente rugoso. El color varía del beige o crema al naranja, coral o rosa oscuro. Algunas veces son producidos pigmentos que varían del ámbar al café claro (Fig. 3-B).

Apariencia microscópica. El micelio primario fragmenta rápidamente en cocos y bacilos. Las células, miden de 3 a 1 μm , a veces unidas por filamentos semejantes a plasmodios o capa mucoide. Algunas cepas son ligeramente ácido resistentes.⁷ El citoplasma de organismos jóvenes es comúnmente homogéneo pero en ocasiones aparecen áreas altamente refractarias. Los gránulos metacromáticos se tiñen fuertemente con colorantes básicos de anilina y presentan glóbulos de lípidos.

Actinomadura madurae.

Apariencia macroscópica. El crecimiento es lento, las colonias son brillantes, esparcidas, planas o toscamente arrugadas, o ceráceas y cerebriformes en el centro con una zona periférica plana, membranosa y resistentes al calor. Las cepas aisladas presentan pigmento beige, amarillo, rosa o rojo. Algunas cepas producen un pigmento café y un poco pigmento púrpura.

Apariencia microscópica. Las colonias pobre o densamente filamentosas, están formadas por hifas de 0.5 a 1.0 μm de diámetro ramificadas. Pueden fragmentar en bacilos o cocos. El micelio aéreo es producido aproximadamente por la mitad de las cepas, pero pocas producen ramificaciones laterales enrolladas, segmentadas en cortas cadenas de esporas. Las esporas poseen un diámetro de 0.5 a 1.0 μm . Los filamentos son no ácidos resistentes.

Morfología en el material clínico. Los gránulos son generalmente blancos o amarillentos, aunque raramente pueden ser rosados. Generalmente de 1 a 5 mm de diámetro pero pueden extenderse hasta 10 mm, esféricos angulares con una superficie parecida a las moras o a veces son lobuladas, a menudo con un borde compuesto por hifas de 50 μm después continúa con una masa sólida rodeada por material eosinófilo.

Actinomadura pelleteri.

Apariencia macroscópica. En el medio de agar coco colonias redondas, acuminadas y cerebriformes, húmedas de color rojo o coral, de consistencia blanda. Desarrolla hasta 2 meses.⁹

Apariencia microscópica. Forma microsifonada 200-30 μm , septado, pocas formas cocoides y bacilares.

Streptomyces somaliensis.

Apariencia macroscópica. Colonias redondas de consistencia dura, de 0.5 a 1 mm de tamaño. El color varía de blanco a amarillento y en ocasiones toman tonalidades grisáceos o azulosas.⁹

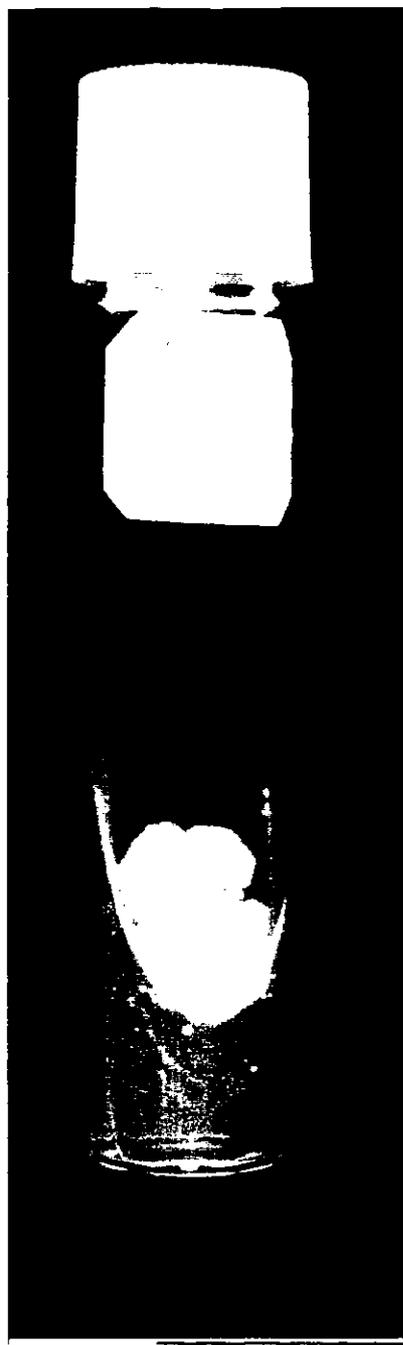
Nocardiosis dassonvillei.

Apariencia macroscópica. Colonias de crecimiento rápido y poca o densamente filamentosas, rugosas o lisas y amarillentas, amarillo verdosas o café rojizas. El micelio aéreo a menudo abundante es grisáceo, pero puede estar esparcido en parches blanquecinos o algunas veces invisible a simple vista. Un pigmento amarillento, amarillo verdoso o café pueden producir. Algunas cepas producen cristales de yodo de color púrpura en el medio.

Apariencia microscópica. Filamentos largos, ramificados que fragmentan en formas bacilares y cocoides. La hifa aérea corta y recta o enrollada. Segmenta en cadenas de esporas que son a menudo separadas por cortas hifas vacías. No ácido resistentes.⁴³



A



B

Fig. 3. Medio BHI (agar cerebro corazón)

A. *Nocardia brasiliensis*, se observan colonias, elevadas, extendidas, de consistencia dura. Cepa proporcionada por la ENCB-IPN.

B. *Rhodococcus* sp. ATCC 13808, colonia densa con márgenes filamentosos, opaca de color coral. Cepa proporcionada por la UAM-X.

Inmunidad

Entre los posibles mecanismos de defensa del huésped, están los siguientes:

- a) Acción combinada de los linfocitos, monocitos y leucocitos polimorfonucleares para inhibir y opsonizar a las nocardias;
- b) Activación y migración de los macrófagos y la acción citotóxica específica de células linfocitarias tipo T.

Según estudios de Ortiz y col. a nivel experimental, la inmunidad humoral parece no brindar efectos protectores.⁴³

Los pacientes con micetoma, presentan alteraciones en su inmunidad mediada por células. Por experimentación, los ratones deficientes de linfocitos T son más susceptibles a las nocardias que los ratones normales.

Se han descrito una serie de mecanismos y funciones de las cepas de *Nocardia* virulentas que pudieran contribuir a explicar la evasión, resistencia o neutralización de la acción bactericida de los macrófagos y neutrófilos, tales como:

- 1) La producción de altos niveles de catalasa y superóxido dismutasa las cuales reducen los productos de oxígeno tóxico generados por el fagocito.
- 2) La disminución de la actividad enzimática de las enzimas lisosomales de algunas poblaciones de macrófagos.
- 3) Bloqueo de la acidificación del fagosoma
- 4) Inhibición de la fusión lisosoma-fagosoma.

Casi todas las investigaciones se han realizado en pocos miembros del género *Nocardia*. Existe escasa información referente a los géneros *Actinomadura* y *Streptomyces*⁴³

Salinas y col. en 1999 realizaron experimentos con ratones BALB/c de 9-12 semanas de edad, inyectando 10 UFC/mL de una suspensión de *N. brasiliensis* en el cojinete plantar del ratón; 28 días después de la infección presentaron inflamación local severa, con abscesos y formación de fistulas. A los 90 días observaron reparación del tejido con la formación de cicatriz. A los 150 días la mayoría presentó completa mejoría.

Algunos animales desarrollaron destrucción del hueso en el área afectada, por histopatología observaron una respuesta inflamatoria interna, con células polimorfonucleares y material hialino alrededor de la colonia bacteriana. El suero de los animales se analizó por Western-blot y antígenos inmunodominantes P61 y P24 (principales blancos para la respuesta del anticuerpo). Se advierte la presencia de IgM a los 7 días con anticuerpos isotipos anti-inmunoglobulina M P24, el pico de IgG se presenta a los 45 días de la infección.

La proliferación de linfocitos en el bazo y células del nódulo linfoide poplíteo fue detectada con la incorporación de timidina a los 7 días de haber padecido la infección, el índice de estimulación disminuyó a los 60 días.

Los niveles de IL-4, IL-6, IL-10 aumentaron durante los 4 días de la infección y el IFN-gama aumento más de 10 veces el nivel basal de circulación en los ratones BALB/c.⁴²

Los estudios serológicos e inmunológicos tienen aún bastantes limitaciones y se requiere que se desarrollen antígenos aún más sensibles y específicos para mayor confiabilidad.

Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y terapia

Aunque existen varios métodos recomendados en la literatura como el de difusión de disco, dilución en caldo o en caja, microdilución del caldo, índice de crecimiento radiométrico etc., las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para este grupo de microorganismos son difíciles de efectuar sobre todo para *Nocardia ssp.* no existe una buena estandarización, en realizar una suspensión del microorganismo en forma uniforme para probar todas las cepas. Hay reportes de que *N. farcinica* es resistente a varios antibióticos.^{6, 39}

El tratamiento de elección es Sulfametoxazol con Trimetoprim, en algunos casos se emplea Rifampicina, Minociclina, Estreptomina, Ampicilina, Imipenem, si son casos complicados, combinaciones de Trimetoprim con Sulfametoxazol y Amikacina (controlando el funcionamiento renal y el sistema auditivo), Amoxicilina y ácido Clavulánico. Cuando se emplea Diamino Difenil Sulfona o Sulfametoxazol con Trimetoprim, deberá mantenerse seis meses después de su remisión clínica y bacteriológica.^{9, 43}

La cirugía está contraindicada en los actinomicetomas de miembros inferiores, porque en la mayoría de ellos el proceso continua en el muñón a pesar de dar un gran margen quirúrgico, o lo que es peor, provoca diseminación linfática y/o hematogena, de mal pronóstico.⁹

ACTINOMYCES

Actinomyces es un habitante normal en algunas áreas del aparato gastrointestinal del hombre y los animales, desde la orofaringe hasta la región anorectal.^{14, 16, 24} Es un microorganismo fastidioso.

El género *Actinomyces* incluye 12 especies, de las que solamente la mitad son patógenas para el hombre. De éstas, la más importante es *A. israelii*, las otras cinco especies responsables de cuadros clínicos en el hombre son *A. naeslundii*, *A. viscosus*, *A. odontolyticus*, *A. meyeri*, *A. pyogenes* (conocido anteriormente como *Corynebacterium pyogenes*⁴⁰) y *A. bernardiae* (formalmente clasificado en la CDC de Atlanta).^{22, 26}

Actinomyces bovis y *A. israelii* son anaerobios obligados, y este último es menos aerotolerante que el primero. *Actinomyces naeslundii*, *A. viscosus* y *A. odontolyticus* son anaerobios facultativos.

Se ha comprobado que *A. bovis*, *A. israelii*, *A. naeslundii* y *A. viscosus* requieren de CO₂ para crecer en anaerobiosis. Todas las especies, excepto *A. naeslundii*, precisan de CO₂ para crecer en atmósfera de aerobiosis, *A. odontolyticus* es la única especie que no necesita de CO₂ para crecer en anaerobiosis ni en aerobiosis.⁴⁰

Los *Actinomyces* son bacilos, que pertenecen al grupo de las actinobacterias. A este grupo también pertenecen: *Rothia*, *Arachnia* (ahora es *Propionibacterium propionicus*) y *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Mobiluncus* (Cuadro 5).^{22, 34}

CUADRO 5 Diferenciación de los bacilos anaerobios Gram-positivos

Características	Reacción							
	<i>Actinomyces spp.</i>	<i>Propioni bacterium propionicus</i>	<i>Bifidobacterium spp</i>	<i>Lactobacillus spp</i>	<i>Rothia spp</i>	<i>Propionibacterium spp</i>	<i>Eubacterium spp</i>	<i>Mobiluncus spp</i>
Anaerobio estricto	V	-	+	V	-	V	+	+
Movilidad	-	-	-	-	+	V	-	-
Catalasa	± ^b	-	-	-	+	V	-	-
Product. metabólicos	S,L,A	A,P,I,S ^d	A,L	L,A,P	A,L,S,P	A,P,IV	A,B	S,L,A
Producción de indol	-	V	-	-	-	-	-	-
Reducción de nitrato	V	+	-	-	+	V	V	V
Mol % G+C	58-68	63-75	57-64	35-53	65-69	59-66	30-40	49-52

V=variable, +=positivo, -=negativo, A=ácido acético, S=ácido succínico, B=ácido butírico, L=ácido láctico, P=ácido propiónico, IV=ácido valérico, si es producido solo se presenta en trazas.

^b-*A. viscosus*, es el único miembro del género que produce catalasa.

^d-Bajo condiciones de anaerobiosis, *Propionibacterium propionicus* fermenta glucosa a CO₂.

Tomado de Murray et al, 1995⁽³⁴⁾

Los géneros *Actinomyces* y *Nocardia*, son causa de problemas clínicos de las vías respiratorias.¹¹ Son microorganismos oportunistas que en ocasiones, producen enfermedades indolentes, lentamente progresivas.¹⁴

Composición química

La diferenciación del género *Actinomyces* de otros géneros se lleva a cabo por estudios de la composición química, y se ha llegado a la conclusión de que los miembros de este género tienen un glicopéptido típico, con lisina, sin ácido diaminopimérico y sin arabinosa. Los peptidoglicanos del género *Actinomyces* pueden clasificarse en tres tipos.

El primer tipo de mureína se encuentra en una especie no patógena, en *A. bovis*. Este peptidoglicano está constituido por Lys-Lys-D-Asp con L-lisina en posición 3 del tetrapéptido y L-lisina y ácido D-aspártico en el puente interpeptídico.

El segundo tipo tiene una estructura de Lys-Ala-Lys-D-Glu con L-lisina en posición 3 del péptido y L-alanina, L-lisina y ácido D-glutámico como enlace. Este tipo de peptidoglicano es el que posee *A. pyogenes*.

A. israelii, *A. viscosus*, *A. naeslundii* y *A. odontolyticus* tiene peptidoglicano del tercer tipo. En estas especies, la composición es muy característica y no se encuentra en ningún otro tipo de bacterias: ácido murámico, glucosamina, alanina, ácido glutámico, lisina y ornitina, con la proporción molecular, 1:1:2:2:1:1, y existe un puente de unión glutamil-ornitina entre el ácido glutámico y la D-alanina.⁴⁰

Los cuadros clínicos más frecuentes producidos por estas bacterias pueden recogerse en cinco apartados: actinomycosis, infecciones oculares, enfermedad periodontal, caries e infecciones intrauterinas.⁴⁰

Actinomycosis.

La actinomycosis es una enfermedad crónica granulomatosa, con formación de abscesos múltiples que drenan por fistulas. Los abscesos contienen gránulos lobulados (gránulos de azufre) o microcolonias del agente etiológico.^{22, 40} Clínicamente esta enfermedad puede estar localizada en la región cervicofacial (75% de los casos), cavidad torácica o pulmonar (15%) y abdominal o ileocecal (10%). En ocasiones puede extenderse al sistema nervioso central, huesos y piel^{22, 45} (Cuadro 6).

La actinomycosis humana es una infección polimicrobiana en donde participan en forma sinérgica más de una bacteria, encontrándose *Actinobacillus actinomycetecomitans*, *Bacteroides*, estreptococos anaerobios, etc.²²

CUADRO 6 Actinomicetos anaerobios aislados de las lesiones actinomicóticas en humanos.

especies	Localización (%)					Total
	Cf	T	A	E	C	
<i>Actinomyces israelii</i>	838(82.0 %)	3	3	1	1	846(81.9%)
<i>Actinomyces naeslundii</i>	51(5.0%)			2		53(5.1%)
<i>Actinomyces viscosus</i>	19(1.9%)					19(1.8%)
<i>Actinomyces bovis</i>	0(0%)					0(0%)
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	4(0.4%)					4(0.4%)
<i>Arachnia propionica</i>	25(2.4%)					25(2.4%)
<i>Bifidobacterium eriksonii</i>	3(0.3%)				1	4(0.4%)
<i>Rothia dentocariosa</i>	2(0.2%)					2(0.2%)
No identificados	72(7.0%)					72(7%)
Total	1022					1022 (100%)

Cf= Cervicofacial T=Torácica A=Abdominal E= Extremidades C= Cerebro

Tomado de Ortiz-Ortiz³⁸

Actinomicosis cervicofacial.

Es un cuadro subagudo o crónico, cuyo comienzo puede pasar inadvertido hasta que se observa una lesión inflamatoria que se localiza a nivel parotídeo o en la región mandibular. Posteriormente se originan fistulas por las que se elimina exudado espeso, seroso y amarillento, en el que pueden encontrarse los típicos "gránulos de azufre".⁴⁰

La actinomicosis maxilar fue una enfermedad bastante común en el ganado y, ocasionalmente, en el hombre. En la actualidad es una infección poco frecuente, cuyo diagnóstico es casi siempre retrospectivo. Este cambio se debe en gran medida a que ha mejorado la higiene oral, ya que la enfermedad suele estar asociada con los dientes con caries y a la administración de antibióticos en diversas infecciones. Los agentes etiológicos *Actinomyces israelii*, *A. bovis*, *Bifidobacterium eriksonii* (*B. adolescentis*), y otros son bastante sensibles a la mayor parte de los antibióticos, incluyendo penicilina y sulfamidas. En un principio, la infección se asoció frecuentemente con las extracciones dentarias o con intervenciones quirúrgicas en la boca o la mandíbula, que proporcionaban los tejidos traumatizados en los que podían crecer estos microorganismos endógenos. Los antibióticos profilácticos que siguen a estas intervenciones orales han eliminado este riesgo.⁴¹

Aunque, indudablemente, la enfermedad se observó, al principio del siglo XIX, habiéndose descrito tumores actinomicóticos por Leblanc en 1826 con el nombre de osteosarcoma, fue reconocida por primera vez por Bollinger en 1877 como una enfermedad parasitaria

específica. El microorganismo lo estudió el botánico Hare, quien lo describió y lo llamó *Actinomyces* u hongo de rayos por su estructura parecida a los rayos cuando crece en los tejidos, pero no lo cultivó. En 1891 Wolff e Israel aislaron un actinomiceto microaerófilo de material patológico mediante cultivo en anaerobiosis, y en el mismo año fue aislado por Bostrem de fuentes similares un actinomiceto aerobio denominado *A. hominis* (llamado en ocasiones *A. graminis*). El organismo de Bostroem fue un contaminante y posteriormente se demostró el microorganismo aislado por Wolff e Israel era el mismo observado por Bollinger y Harz, y por consiguiente el agente etiológico de la enfermedad.

Emmons en 1938, aisló actinomicetos anaerobios a partir de las amígdalas y más tarde se identificaron *A. israelii* y *A. naeslundii* en secciones de tejido amigdalino.²² García Ramos y col., en 1984, de 40 amígdalas hipertróficas en niños, 25 fueron positivas a actinomicetos (62.5%). *Actinomyces israelii* se aisló en el 40%, y otras especies en menor proporción. Actualmente, la mayoría de los investigadores están de acuerdo en que existen dos especies frecuentemente observadas que provocan el síndrome patológico de la actinomicosis maxilar (conocida en el ganado como "quijada aterrorada"). *Actinomyces bovis* es la causa habitual de la "quijada aterrorada" y *A. israelii* es el organismo predominante de la actinomicosis maxilar humana, aunque también puede encontrarse ocasionalmente en el ganado. *Bifidobacterium adolescentis*, *A. naeslundii*, *A. viscosus* y *Propionibacterium propionicus* (anteriormente *Arachnia propionicus*) han sido también aislados de actinomicosis, y en investigaciones recientes, realizadas en Inglaterra, *A. viscosus* provocó más casos de actinomicosis que *A. israelii*.¹⁴

Rara vez existe afectación linfática regional, pero la infección puede diseminarse por contigüidad o vía hemática.

Las zonas anatómicas que se afectan de forma primaria son las siguientes: mejillas, cuello, región parotídeo-masetérica, regiones submandibular, retromandibular, hueso mastoides, senos, glándula parotídea, tiroides, lengua, labios y orejas, etc.⁴⁰

La sintomatología clínica aparece rápidamente: dolor (a veces no existe), trismus de maseteros, hinchazón, fistulas y exudado amarillento.⁴⁰

Actinomicosis torácica

La actinomicosis torácica y pulmonar es el resultado de la aspiración de *A. israelii* presente en la cavidad oral (placa dentaria, concreciones o criptas) o por extensión de una infección ya existente, como es el caso de la actinomicosis cervicofacial. También puede iniciarse a través del esófago por ataque al mediastino y de esta manera se invade la pleura; a su vez esto genera un derrame pleural temprano y más raramente, la diseminación de la enfermedad. También los microorganismos pueden llegar al pulmón, arrastrados por cuerpos extraños.^{3, 40} La infección subaguda se manifiesta con fiebre ligera y expectoración, en cambio en la fase crónica el cuadro clínico está acompañado de fiebre constante, tos con expectoración mucopurulenta o sanguinolenta, dolor pleural intenso, disnea y en raras ocasiones disfagia.²²

La primera lesión puede estar en los bronquios, en el tejido peribronquial o en el parénquima pulmonar. La enfermedad progresa por contigüidad de lóbulo a lóbulo, formando múltiples abscesos.⁴⁰

El cuadro clínico puede ser el de una neumonía severa, de absceso pulmonar, empiema, puede semejar una tuberculosis, o bien coexistir con actinomicosis cervico-facial.^{22, 48}

Actinomicosis abdominal.

La actinomicosis abdominal también es rara. Las lesiones se desarrollan fundamentalmente en la región ileocecal y con menos frecuencia en la región gástrica o anorectal.⁴⁰ Como consecuencia de las intervenciones quirúrgicas u otros traumatismos del intestino, así como a perforaciones de úlceras o divertículos. Es frecuente que el diagnóstico se retrase, debido a que el proceso sólo produce síntomas vagos o inespecíficos hasta que erosiona u obstruye un órgano vital. Las masas firmes y fibrosas a menudo se confunden inicialmente con una neoplasia maligna.

Es posible la afección pélvica por la infección originada en otros lugares, por ejemplo, las formas gastrointestinales pueden propagarse directamente al riñón (hidronefrosis, fistulas, absceso perirenal) u otros órganos pélvicos.^{26, 32, 38} Resulta particularmente difícil distinguir entre esta afección y otros procesos inflamatorios o malignos.^{30, 37}

Actinomicosis pélvica.

Evans y otros autores^{1, 16, 24} concluyen que *Actinomyces israelii* se puede considerar como parte de la flora normal de la vagina, y la presencia del DIU promueve su proliferación y este microorganismo puede detectarse en el exudado vaginal.^{4, 24} Sin embargo otros autores difieren de esta suposición,^{4, 16} porque la endometritis crónica más localizada, al parecer causada por *Actinomyces*, se relaciona con el uso de dispositivos intrauterinos.^{4, 14, 16, 28} También este tipo de infección se asocia al contacto oral y anogenital.¹⁶ En 1967, Brenner y Gehring reportaron un absceso actinomicótico en tubo ovárico asociado con un dispositivo endocervical, y Henderson en 1973, describió que los abscesos están relacionados con el uso del DIU. A partir de entonces, se han reportado varios casos de actinomicosis pélvica en pacientes con DIU; en algunos casos, *Actinomyces* únicamente causó endometritis, en otros produjo la enfermedad inflamatoria pélvica y formación con abscesos pélvicos y abdominales.^{4, 16}

Las pacientes que presentan abscesos pélvicos por *Actinomyces*, tienen una edad promedio de 37 años y 8 años de usar el DIU, aunque el 16% emplearon el DIU en menos de 3 años.^{4, 16, 24, 36} La mayoría de las pacientes referían dolor abdominal y pérdida de peso, un 85-44% de los casos reportaron flujo vaginal y el 24% de los casos presentó olor fétido en el flujo vaginal. El 60% presentó febrícula. En la muestra sanguínea, el 70% de 46 pacientes fueron anémicas y el 76% de 62 pacientes tienen una leucocitosis. El porcentaje de sedimentación de eritrocitos fue elevado en 20 de 21 casos, no es sorprendente tener estos datos debido a la naturaleza inflamatoria crónica de la infección, que en un inicio es generalmente asintomática^{4, 24} y por ello puede prevalecer la anemia. La severidad de los síntomas en estos pacientes fueron sorprendentemente moderados en relación a la extensión de la enfermedad que se encuentra frecuentemente en las cirugías. Aproximadamente el 90% de los casos revisado, presentan abscesos uni o bilateral del tubo ovárico; involucrando frecuentemente la pared del útero y a otros órganos por el proceso inflamatorio directo, o indirectamente por la adhesión o compresión, incluyendo el intestino delgado y grueso, vejiga, uréteros e hígado.³⁶ También fueron asociados con abscesos subdiafragmáticos, pulmonares, cardíacos y en muy raras ocasiones se asocia a un absceso subcostal y cerebral. En 44 casos, se llevó a cabo una histerectomía y salpingo-oferectomía

uni o bilateral por actinomicosis; además 22 salpingo-ooforectomías uni o bilateral, 16 resecciones intestinales y/o colostomías, y dos cistectomías se realizaron.¹⁶ Y se han reportado embarazos ectópicos causados por *Actinomyces*.⁴

Goodman utilizó el término "induración leñosa" para describir la inflamación fibrótica característica de la respuesta a los *Actinomyces*, por la extensión del tejido dañado, la ausencia de planos quirúrgicos.

En el tratamiento primario se administran altas dosis de penicilina y la intervención quirúrgica temprana pueden ayudar a aliviar los síntomas obstructivos (por ejemplo la estenosis uretral) y drenaje de grandes abscesos.¹⁶ El tratamiento con penicilina por más de un año puede eliminar completamente el tratamiento quirúrgico,³⁶ o al menos facilitar más el procedimiento quirúrgico conservativo al restablecer el tejido por planos. La tetraciclina, eritromicina, y clindamicina son alternativas aceptables a la penicilina; la cefalosporina, aminoglicósidos, ciprofloxacina y metronidazol (usualmente amoxicilina y metronidazol, o metronidazol o doxiciclina),²⁴ se han usado como tratamiento asociado. Hay reportes de resistencia al metronidazol y tinidazole.²⁷ Sin embargo, si no presenta una reacción adversa a la penicilina, no hay razón para desviar el tratamiento con altas dosis de penicilina (durante 4 semanas, 18 millones U/por día y por vía intravenosa, seguido por 6 meses a 1 año con penicilina oral, particularmente porque no se ha estudiado el régimen de antibióticos en el tratamiento de actinomicosis pélvica.

En el cultivo del aspirado de absceso pélvico frecuentemente crece uno o más microorganismos, incluyendo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus agalactiae*, *Haemophilus sp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* y *Chlamydia trachomatis*.^{16,24}

La presencia de *Actinomyces* puede promover la invasión de otros patógenos, como *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae* o estreptococos anaerobios.⁴ En este trabajo el diagnóstico de actinomicosis pélvica se realizó preoperatoriamente en 17% de los casos revisados, a través de drenaje y aspiración de aguja fina de abscesos, frotis de Papanicolaou, cultivos, biopsias de tejido inflamado, y sospecha clínica. En muchos de estos casos, el diagnóstico de actinomicosis dio lugar a un tratamiento con antibióticos, que impidió la intervención quirúrgica.

En otros casos, la actinomicosis no se sospechó inicialmente, pero se determinó por una biopsia o en otros casos se encontraron abscesos por laparatomía, para continuar con un tratamiento conservativo, sin tener que llegar a la histerectomía o salpingo-ooforectomía. Aunque algunos casos requieren de un tratamiento quirúrgico extenso, un gran porcentaje de mujeres que presentan abscesos pélvicos secundarios a actinomicosis por el uso del DIU son de 40 años o más jóvenes (65% de los casos revisados), y el tratamiento quirúrgico en estos casos, es la histerectomía y salpingo-ooforectomía, quedando estas pacientes impedidas para procrear.¹⁶

Un diagnóstico definitivo no puede realizarse exclusivamente en base a los datos clínicos, pero el microorganismo puede ser detectado por muestras histopatológicas al extraer el DIU o de aspiración de abscesos. Después de haber obtenido la muestra, se examina por estándares histológicos, cultivos anaerobios durante dos semanas, e inmunofluorescencia si es posible.¹⁶ La inmunofluorescencia (IF) con frotis directos de la vía vaginal proporciona un método rápido para la identificación de *Actinomyces israelii* por morfología y

característica inmunológica. En 1991 fue comparado con un método de cultivo tradicional para la detección de *Actinomyces israelii* (Agar con sangre de caballo, HBA), y se encontró que 11 muestras fueron positivas por inmunofluorescencia y únicamente una muestra se detectó a través del cultivo. De los 10 pacientes con IF positiva, tres presentaron signos y síntomas sugestivos de infección pélvica y no se detectaron otros patógenos²⁴. Algunos autores mencionan que el cultivo es el método menos confiable para verificar la infección causada por *Actinomyces*; mencionan que de los casos reportados, solo el 35% de los cultivos fueron positivos, aunque un 86% de los sucesos reportados ha sido por medio de las muestras cultivadas con metronidazol, éste antimicrobiano^{16, 24} tiene la función de inhibir el crecimiento de otros anaerobios.¹⁶

La búsqueda de *Actinomyces* por el método de tinción de Papanicolaou, puede confundirse con *Candida*, *Aspergillus*, *Nocardia*, *Leptothrix*, fibrina, moco, cocobacilos, lactobacilos, algodón o fibras sintéticas, u otros materiales extraños.¹⁶

De 108 pacientes que se les retiró el DIU, 10 cultivos fueron positivos y el agente causal fue *Actinomyces israelii* (principal patógeno).^{16, 24}

Algunos estudios sugieren que hay un alto porcentaje de infecciones causadas por *Actinomyces* en mujeres que utilizan DIU de plástico (Lippes loop) que la que usan el de cobre (T-200L)^{4, 16, 24} (Cuadro 7). También se observa una incidencia elevada en pacientes que pertenecen a grupos socioeconómicamente bajo.¹⁶ Otros factores predisponentes son la anemia, malnutrición, promiscuidad sexual.⁴

CUADRO 7 Frotis cervical positivo para *Actinomyces* en relación a la duración del uso y tipo de DIU.

Duración de uso (meses)	Tipo de DIU usado									
	Lippes Loop		Cobre-T		Cobre 7		Multirecargado Cu-250		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
≤ 24	2/117	(1.7)	2/197	(1.0)	0/2	(-)	-	(-)	4/316	(1.2)
25-48	8/83	(9.6)	20/238	(8.4)	2/11	(18.2*)	1/7	(14.3*)	31/339	(9.1)
≥ 49	4/24	(16.6)	11/95	(11.5)	6/35	(17.1)	1/6	(16.7*)	22/160	(13.7)
Total	14/224	(6.25)	33/530	(6.22)	8/48	(16.6)	2/13	(15.4*)	37/815	(6.99)

() % del número total de mujeres examinadas

* Estos porcentajes son poco significativos debido al pequeño número de casos reportados

Tomado de Bapurao⁽⁴⁾

Este riesgo debe ser considerado, dado que 70 millones de mujeres en el mundo usaban el DIU como control natal. En la India 5.8 millones de mujeres aceptaron el DIU en 1986,⁴ y es probable que en las últimas décadas este número haya aumentado.

En la literatura inglesa se han encontrado tres casos reportados de infección causada por *Actinomyces* de placenta y el reportado por Abadi que lo asocia al trabajo de parto pretérmino y la corioamnionitis histológica. La severidad de la corioamnionitis en este caso probablemente contribuya a la invasión del trabajo de parto pretérmino. El estudio histológico de la placenta mostró múltiples microorganismos filamentosos, Gram positivos y ácido resistentes negativos. El cultivo del líquido amniótico y de la placenta no se realizó.

Abadi sugiere que la terapia con ampicilina pudo haber protegido a la madre y al recién nacido de la morbilidad adicional, porque es un tratamiento efectivo en contra de *Actinomyces*.¹

Formas menos frecuentes

Actinomyces israelii también se ha aislado, junto con estreptococos anaerobios y *Bacteroides ssp.*, en abscesos cerebrales originados a partir de focos en el oído medio, senos y pulmón. La actinomicosis ósea se produce principalmente en la mandíbula y vértebras, causando periosteitis u osteomielitis. La osteomielitis mandibular puede quedar confinada al hueso, cavitarse o fistulizarse al exterior. La actinomicosis vertebral generalmente es una complicación de la actinomicosis torácica o abdominal.^{3, 13, 40} Rara vez, se comunica actinomicosis del sistema nervioso central y músculo esquelético. *A. israelii*, *Arachnia propionica*, y otras especies pueden provocar una enfermedad semejante.²⁸ Existen unos cuantos casos de actinomicosis generalizada y ósea que se han atribuido a una especie descrita recientemente, *A. meyeri*.^{3, 17}

La actinomicosis del hueso temporal no es común, en la literatura inglesa se han reportado 24 casos. En 1997 reportan un caso causado por *A. israelii*.²

El hígado puede ser invadido por vía portal desde el intestino, extensión directa de un foco de abdomen o tórax, o como consecuencia de bacteriemias. La lesión es un granuloma supurado, que se adhiere a la pared abdominal o diafragma y después se fistuliza.⁴⁰

Las infecciones por *Actinomyces* tienen un origen endógeno y al parecer no se produce transmisión de una persona a otra.¹⁴ El proceso afecta a personas de cualquier edad y no muestra ninguna preferencia estacional.²²

Morfología e identificación

En los tejidos, la especie *Actinomyces* presenta filamentos ramificados que rodean a una zona de inflamación fibrosante y supurante. El hallazgo típico es el "gránulo de azufre" (gránulos amarillo-anaranjado) en el pus. Consiste en una colonia de filamentos miceliales gram positivos rodeados por "masas" eosinofílicas (rosetas densas de filamentos). Estos últimos pueden ser complejos antígeno-anticuerpo. Las rosetas individuales suelen tener un diámetro de 30 a 40 μm , pero a veces llegan hasta 200 μm .^{14, 17, 28} Los pequeños gránulos amarillos, visibles a simple vista, pueden estar constituidos por una sola roseta o por varias. La roseta está formada a su vez por tres tipos de estructuras: un núcleo central de filamentos ramificados dispuestos irregularmente, pero todos ellos con un ordenamiento radial; cuerpos periféricos refringentes en forma de masa ordenados radialmente, y cuerpos esféricos similares a los cocos. Los gránulos pueden aplastarse y observarse en preparaciones frescas en las que se aprecian las formas en masa plana. Los filamentos son gram-positivos y la tinción de hematoxilina-eosina es útil para los tejidos. Los organismos no son ácidosresistentes.

Los filamentos del núcleo central son ramificados, frecuentemente curvos, a veces espirales y entretreídos con una espesa red de micelio. Los filamentos individuales tienen una apariencia granular y son frecuentes la fragmentación y segmentación, sobre todo en los gránulos más viejos, da a los filamentos la apariencia de cadenas de cocos.¹⁷

Los cuerpos en forma de masa del margen del gránulo son notorios por su alta refringencia

y por su apariencia homogénea, carente generalmente de estructuras. Son hinchamientos piriformes de los extremos terminales de los filamentos, y aparecen como transformaciones diferentes de éstos. En las colonias jóvenes, la sustancia hialina que constituye las masas es blanda, y puede disolverse en agua, pero a medida que la colonia aumenta, las masas van adquiriendo una consistencia más firme. Dicha firmeza se debe a la deposición de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Su formación parece estar relacionada con la resistencia de los tejidos: cuando ésta es leve, están ausentes, encontrándose únicamente filamentos.¹⁷

Pueden observarse otros microorganismos en los casos clínicos de actinomicosis. Entre éstos se incluyen diversos micrococcos aerobios y anaerobios, difteroides, bacilos gram-negativos y bacilos fusiformes como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, que puede ser un simbionte de varias cepas de *Actinomyces*. Es probable que algunas especies de *Actinomyces* no puedan inducir procesos infecciosos cuando están aisladas, sin el resto de la flora asociada.¹⁷

Patogénesis.

Los actinomicetos no sintetizan exotoxinas específicas relacionadas con la patogenicidad y la producción de la enfermedad. Tampoco se ha demostrado la presencia de una cápsula que interfiera con la fagocitosis. La capacidad de estos microorganismos para invadir los tejidos del huésped y causar enfermedad deben estar controlados por otros componentes de la célula bacteriana.²²

El principal mecanismo de defensa del organismo frente a la infección anaerobia endógena es el potencial de oxidorreducción (Eh) de los tejidos. Si el Eh es normal, los anaerobios son incapaces de multiplicarse y lesionar los tejidos. Cualquier factor que disminuye el Eh hace que estas bacterias se multipliquen e invadan los tejidos subyacentes (Cuadro 8). Entre estas causas destacan las extracciones dentarias, pequeños traumatismos de boca (que originan pequeñas áreas necróticas) e infecciones por otras bacterias aerobias o anaerobias. La infección con formación de abscesos tiene un potencial de oxidoreducción de -250 mv.²³

CUADRO 8 Agrupación de las bacterias en relación con los potenciales de óxido reducción (Eh).

Aerobias	(+ 300 mv) a (- 50 mv*)
Anaerobias facultativas	(+ 300 mv) a (- 420 mv)
Anaerobias aerotolerantes	(+ 180 mv) a (- 350 mv)
Anaerobias obligadas	(+ 150 mv) a (- 420 mv)

*mv = milivoltios

Tomado de García-Cano y Col. ²³

El incremento de la actinomicosis en las personas que tienen el hábito de masticar paja, palillos, o individuos alcohólicos o fumadores ^{3,13} es el resultado de los microtraumatismos gingivales y no una infección exógena introducida por estos elementos. ⁴⁰

Algunas especies poseen mecanismos de adherencia a superficies duras y células epiteliales que les permiten, además, formar agregados con otras bacterias y aglutinar hemáties. Esta propiedad de adherencia parece estar relacionada con la capacidad de producción de dextrano y levano, así como con la existencia de fimbrias.

La lesión periodóntica es consecuencia de la acción del complemento. Se ha comprobado que el polisacárido de algunos *Actinomyces* puede activar el complemento, lo cual produce, por tanto, una liberación de factores quimiotácticos y migración de fagocitos. Como consecuencia de la liberación de enzimas lisosómicas por éstos, aumenta la reacción inflamatoria y aparecen las lesiones periodónticas. ⁴⁰

Sin embargo, hasta ahora no se conocen con exactitud cuales son los determinantes más importantes en la virulencia y que lugar ocupan en la célula. ²²

Patogenicidad en animales de experimentación.

Los intentos para infectar a los animales de experimentación con *A. israelii* se han llevado acabo, por lo general, sin éxito, ya que sólo una pequeña proporción de los animales inoculados desarrollan la enfermedad, las lesiones son limitadas y benignas. Se han conseguido resultados alentadores al producir previamente traumatismos en los tejidos e incluir la flora asociada con *A. israelii*. La infección experimental con cultivos puros se ha conseguido en los ratones, utilizando mucina gástrica de cerdo para aumentar la efectividad del organismo. Las inyecciones repetidas del microorganismo en conejos y cobayos se han llevado acabo con menos éxito. En la enfermedad experimental se observan los factores esenciales de la infección natural, incluyendo la formación de nódulos en forma de túberculos y el desarrollo de gránulos de estructura característica con masas. ¹⁷

Datos clínicos

El aspecto característico de la actinomicosis es una tumefacción dura, rojiza no dolorosa que, por lo general, se desarrolla con lentitud. Se vuelve fluctuante, señala a la superficie y, por último, drena, formando un trayecto fistuloso con poca tendencia a sanar. Las lesiones se extienden por contigüidad. La diseminación a través de la sangre es muy rara. ²⁸

Diagnóstico

El aislamiento de los actinomicetos a partir de material clínico, aunque parece fácil, presenta cierta dificultad técnica por el empleo de medios de cultivo y las condiciones de incubación.

Colección y transporte de las muestras.

Para demostrar que una infección es causada por actinomicetos y organismos relacionados, deben tenerse ciertas precauciones para evitar la contaminación de las muestras clínicas con la flora normal de la región de donde se haga la toma; por esto el esputo y las secreciones nasales no son adecuadas para la búsqueda de dichas bacterias. A continuación se muestra una lista de las muestras clínicas que no son aptas para investigar la presencia de bacterias anaerobias y por consiguiente de *Actinomyces*.

Muestras clínicas no aptas para investigar bacterias anaerobias

Exudado faríngeo y nasofaríngeo

Esputo o secreciones obtenida por broncoscopia

Heces o exudado rectal

orina obtenida por micción o catéter

Exudados cervicales o vaginales

Material de heridas o abscesos que no son tomados adecuadamente para excluir contaminantes superficiales

Material de heridas abdominales contaminadas previamente con heces

Tomado de García-Cano y Col. ²³

Para el estudio de bacterias anaerobias (*Actinomyces*), la selección de la muestra es importante y sólo deben aceptarse: secreciones obtenidas por punción.

Muestras clínicas útiles para la investigación de bacterias anaerobias.

Sistema nervioso central

 Líquido cefalorraquídeo

 Abscesos

 Biopsia del tejido

Cavidad bucal

 Material aspirado de abscesos y biopsias

Cavidad torácica

 Aspirado directo del pulmón

 Líquido pleural

 Biopsias

 Secreción bronquial obtenida por punción transcricotiroidea o transtraqueal

 Material de pústulas que presenten "gránulos de azufre"

Cavidad abdominal

 Aspirado de abscesos localizados

 Líquido ascítico

 Biopsias

Aparato genitourinario

 Aspirado suprapúbico de la orina

Aspirado de abscesos localizados
Biopsia de tejidos normalmente estériles
Material cervical tomado por visualización directa

Otros

Sangre, médula ósea, líquido articular
Biopsia de músculo con sospecha de gangrena gaseosa
Biopsias de tejidos normalmente estériles.

Tomado de García-Cano y Col. ²³

El contacto directo con el oxígeno es perjudicial para muchas especies, por lo que las muestras no deben exponerse al aire.

La obtención de la muestra depende de la localización y evolución de la enfermedad, en muchos casos resulta fácil hacerlo, pero a veces es casi imposible. Si el material obtenido proviene de un absceso superficial, después de la desinfección de la piel se efectúa la aspiración de material mediante equipo esterilizado; el transporte se efectúa en la misma jeringa eliminando las burbujas e insertando la aguja en un tapón de corcho. Este procedimiento es útil en centros hospitalarios donde se cuenta con un laboratorio que investigue bacterias anaerobias; por el contrario cuando el producto es llevado a lugares distantes de donde se tomó, no debe usarse este método. ²³ También se pueden utilizar para el transporte medios como el de Stuart modificado, Amies, Cary-Blair; que tienen una baja tensión de oxígeno y un indicador de óxido reducción ²³ e inclusive el caldo tioglicolato actúa como un agente reductor. Las secreciones obtenidas por punción transtraqueal o directa de pulmón deberán transportarse de la misma manera. En las infecciones profundas de abdomen o de cerebro, las muestras son difíciles de lograr mediante la punción, ya que las lesiones frecuentemente son infiltrativas y por lo tanto difíciles de obtener. En estos casos la enfermedad primaria sin ser reconocida hasta que las fístulas se presentan o el paciente es sometido a un procedimiento quirúrgico mayor. ²² Goldsan, señala algunos datos que pueden sugerir la posibilidad de que una muestra clínica contenga bacterias anaerobias (*Actinomyces*) como pueden ser: ²³

Olor fétido de la muestra

Localización de la infección en la proximidad de una membrana mucosa
Infecciones secundarias a mordidas humanas o de animales
Presencia de "gránulos de azufre" en los exudados
Morfología característica con la coloración de Gram
Crecimiento en la parte profunda de los medios de cultivos anaerobios líquidos

El uso de hisopo no es conveniente, ya que puede haber reducción del número de bacterias, debido a la falta de humedad, exposición al oxígeno y adherencia de éstos a las fibras de algodón. ²³

Biopsias

Las biopsias para cultivo e histopatología son útiles, pero puede ser necesario examinar muchos cortes y piezas de tejido para encontrar colonias de *Actinomyces* en forma de gránulos de azufre. La morfología del “gránulo de azufre” en los tejidos es muy característica, cuando se emplea la tinción con hematoxilina eosina (H-E) rutinaria o la tinción de Gram histológica.¹⁴

Los fragmentos de tejido se fijan previamente con formol y se utiliza alguna de las siguientes técnicas de tinción: hematoxilina-eosina, PAS-díastasa o la técnica de Brown y Brenner modificada y se observa la presencia de gránulos o filamentos característicos. En el 50% de los casos no se encuentran los gránulos y sólo se observan en la tinción de Gram bacilos difteroides que pueden corresponder a otros géneros: *Propionibacterium*, *Corynebacterium* y otros gram-positivos.

Se cuenta además con técnicas de inmunofluorescencia que son específicas para la identificación de ellas.²²

Examen microscópico

El material purulento se deposita en el medio de transporte y parte de este se pone en una caja de Petri estéril y se examina macroscópicamente. Se busca la presencia de “gránulos de azufre”, los cuales miden alrededor de 1mm de diámetro; un dato importante que ayuda a identificarlos es la dureza que presentan. Para probar ésta, se toma con una asa bacteriológica y se colocan entre porta y cubreobjetos, presionando ligeramente (no se desintegran fácilmente, como lo hacen otras partículas).²²

El examen microscópico, consiste en examinar el exudado para detectar la presencia de “granos de azufre”, previa dilución del grano en agua destilada o solución salina. Después de agitar, se mantiene un tiempo en reposo. Si existen “granos de azufre”, éstos se depositarán en el fondo.¹⁴

En estos “granos”, aplastados entre dos portaobjetos y teñidos por el colorante de Gram, se observa una masa entretejida de filamentos que con facilidad se fragmentan en formas cocoideas o bacilares que son gram positivas, no son ácido resistentes y muestran una ramificación característica en “V” o en “Y”.^{22, 28, 40}

Cultivos

Los “gránulos de azufre” del pus que contienen actinomicetos pueden ser lavados e inoculados en un medio líquido de tioglicolato, sembrados en estrías sobre agar cerebro-corazón o de gelosa soya tripticaseína,²² e incubados en anaerobiosis a 37°C. Cuando la muestra proviene de una región muy contaminada es preferible usar los medios anteriores adicionado con sustancias selectivas como el CdSO₄ (sulfato de cadmio) o alcohol fenil etílico, simultáneamente se siembra en un tubo con caldo tioglicolato enriquecido con suero de conejo o con extracto de levadura.²² En el medio de tioglicolato, *A. israelii* crece lentamente, formando una colonia dura y granular, como pelotas de pelusa (bordes vellosos) cerca del fondo del tubo de ensayo, mientras que *A. bovis*, por lo general, produce turbidez.

El género *Actinomyces* presenta micro y macrocolonias (colonias maduras), las primeras se observan en las placas mencionadas de las 18-24 h de incubación; al observarse al microscopio, dependiendo de la especie, se pueden ver filamentos dispuestos en forma radial con centros densos o en forma de araña (*A. israelii*).²²

Como se observa en los medios sólidos, *A. israelii* produce colonias pequeñas rugosas (formas R) que comienzan con la aparición de filamentos ramificados (Aracniformes), en 2 o 3 días, que se vuelven de color blanco, con un borde a modo de festón, apiladas, en forma irregular y evolucionan para dar una colonia lobulada, brillante, en forma de "muela", de tamaño mayor, formándose en 10 días.^{17, 28} La variante S o serotipo II puede ser transparente, de forma regular y se parece a *A. bovis*.¹⁷ *A. bovis* y *A. odontolyticus* producen microcolonias no filamentosas, de bordes nítidos y regulares, con una pequeña condensación en la parte central.⁴⁰

El tamaño de las colonias de *A. bovis* es de 0.5 -1 mm de diámetro. Son redondas, de superficie lisa (S) o ligeramente granular, convexas y de aspecto blanquecino. Algunas cepas producen colonias rugosas, precisamente aquellas que presentan microcolonias filamentosas.^{17, 40}

El saprófito habitual de la boca, *A. naeslundii* suele ser liso en agar y crece rápidamente con un aspecto difuso y turbio en el caldo de cultivo. También crece de forma aeróbica después del aislamiento inicial; los otros son microaerofílicos desde el aislamiento inicial.¹⁷

Sólo *A. odontolyticus* en agar-sangre da colonias de aspecto rojizo, que pueden estar rodeadas de una zona de hemólisis.⁴⁰

En los cultivos recientes en caldo, las formas más jóvenes aparecen como difteroides doblados o con una configuración que recuerda a la letra "X" o "Y".¹⁴

Las características fundamentales de las rosetas o de gránulos de azufre se han reproducidos en los cultivos. Las colonias más pequeñas son clavas redondeadas de filamentos ramificados y entrelazados, las más grandes son clavas densas y opacas de filamentos cortos y formas alargadas. No se forman masas en los medios habituales. Pueden formarse clavas "blandas" en presencia de sangre, suero o líquido ascítico, desarrollándose, incluso en éstos, de forma irregular. En general, se acepta que la formación de clavas en los tejidos es en gran parte una respuesta del huésped y consiste, probablemente en una respuesta antígeno anticuerpo similar al fenómeno de Splendore-Hoepli.¹⁷

Identificación

La identificación de las cepas aisladas se realiza por estudios bioquímicos. La valoración de las distintas pruebas precisa una investigación más exhaustiva. Se puede, no obstante, afirmar que todas las especies son indol-negativas, no proteolíticas y, con la excepción de *A. viscosus*, catalasa-negativas. Todas las especies fermentan la glucosa, y los productos catabólicos son ácidos: acético, fórmico, láctico y succínico. La fermentación de otros azúcares es variable: *A. israelii* fermenta la xilosa, manitol y no hidrolisa el almidón lo que le diferencia de *A. bovis*. La producción de H₂S depende del medio y del método de estudio. La mayoría de las especies de *Actinomyces* no son hemolíticas.^{17, 28, 40} *A. israelii* reduce los nitratos, *A. bovis* no lo hace. *A. naeslundii* reduce los nitratos, pero no fermenta xilosa ni manitol; *Actinomyces viscosus* es similar a *A. bovis*, pero fermenta rafinosa y no hidrolisa el almidón. Los cuatro microorganismos se distinguen de los difteroides anaerobios por la composición de su pared celular.¹⁷(Cuadro 9)

CUADRO 9 Pruebas presuntivas para algunos grupos de *Actinomyces* de acuerdo a la metodología de Lombard y Dowell.

Pruebas	<i>A. bovis</i>	<i>A. israelii</i>	<i>A. odontolyticus</i>	<i>A. meyeri</i>	<i>A. pyogenes</i>
Indol	-	-	-		
Derivado del indol	-	-	-		
Hidrólisis de esculina	+	+	V-1	-	-
H ₂ S			-	-	-
Catalasa	-	-	-	-	-
Lecitinasa	-	-	-		
Lipasa	-	-	-		
Crecimiento en agar bilis	I	I	I		
Fermentación glucosa	-	+	V		+
Hidrólisis de almidón	+	-	-		
Digestión de la leche	-	-	-		
DNAasa	-	-	-		
Nitrato		V	+	-	-
Hidrólisis de gelatina	-	-	-	-	+
Fermentación manitol	-	+	-	-	-
Fermentación lactosa	-	-	-		
Fermentación ramnosa	-	+	-	-	-
Ureasa		-	-	V	-
Xilosa		V	V	+	+
Glicerol		-	V	V	-
Mol % G+C de DNA		57-65	62	64-67	56-58

+ = positivo; - = negativo; V = variable; I = Inhibición de crecimiento

Tomado de García-Cano y Col. ²³

Los métodos serológicos y/o la cromatografía gas-líquido son de gran utilidad para completar la identificación.^{22, 40} (Cuadro 10)

CUADRO 10 Características diferenciales de tres especies de *Actinomyces* *.

Características	<i>A. israelii</i>	<i>A. naeslundii</i>	<i>A. odontolyticus</i>
Tolerancia al oxígeno	An, M	F, M	An
Movilidad	-	-	-
Sacarosa	a	a-	a-
Maltosa	A	A-	A
Salicina	V	V	A-
Glicerol	-	V	A-
Xilosa	A-	-	V
Arabinosa	V	-A	V
Red. NO ₃	V	+-	+
Acidos orgánicos por GLC	A, L, S	A, L, S	A, L, S

GLC = Cromatografía gas líquido

V = Reacción variable

A = Acido acético

L = Acido láctico

S = Acido succínico

M = Microaerófilico; F = Facultativo; An = Anaerobio

- = Reacción negativa en el 90-100 % de las cepas. Un índice sobre escrito indica que la reacción se lleva acabo en el 11 - 25 % de las cepas.

+ = Reacción positiva en el 90-100 % de las cepas.

a = Reacción ácida (color amarillo con indicador de azul de, pH 6.0

*Las reacciones están basadas en los datos de la unidad de micología del CDC

Tomado del Manual para aislamiento e identificación de bacterias anaerobias.²³

Serología

Actinomyces israelii se divide en dos serotipos. La mayoría de las infecciones están provocadas por las colonias rugosas del serotipo I. Existe un anticuerpo polivalente para la tinción de fluorescencia de *A. israelii* (serotipos I y II) y *A. naeslundii*.¹⁷

Inmunidad.

Se ha demostrado la presencia de aglutininas, precipitinas y anticuerpos fijadores del complemento en el suero de pacientes de actinomicosis. Ninguna de estas pruebas tiene significación diagnóstica. Existe muy poca o ninguna evidencia de que estas sustancias estén implicadas en la defensa contra la enfermedad o protejan al individuo contra ella.¹⁷

Actinomyces es parte de la flora normal del organismo. Resulta incierto, si los anticuerpos o las reacciones mediadas por células son producidas hasta que ocurre la invasión de los tejidos.²⁸ La defensa activada contra el microorganismo corre a cargo, probablemente, de la inmunidad celular, y se ha sugerido que las formas en "clava" que presenta el microorganismo en la periferia del gránulo representa una respuesta frente a las defensas celulares del huésped,¹⁷ por la infección evolutiva, y no a un estado de inmunidad.¹⁴

Tratamiento

El tratamiento de la actinomicosis consiste fundamentalmente en la combinación de procedimientos quirúrgicos (incisión, drenaje) de los tejidos afectados y antibioterapia prolongada.^{3, 22, 28, 40}

Nichols y Herrel notificaron en 1948 el éxito en la utilización de penicilina en la enfermedad, y éste es el tratamiento general desde entonces.¹⁷ La penicilina G es el fármaco de elección para la actinomicosis.¹⁴ En los pacientes alérgicos a la penicilina, la tetraciclina, eritromicina, clindamicina, lincomicina, rifampicina, etc., se muestran efectivos *in vitro* y han demostrado alguna eficacia clínica.^{14, 17, 28, 40}

La penicilina debe usarse en dosis elevadas, de 600,000 U, dos veces al día y durante períodos prolongados (4 a 6 semanas o más), para obtener buena respuesta. Puede continuarse con penicilina V durante otro mes, a dosis de 1 g/día. Según diferentes casuísticas, esta terapia proporcionaría un 4-18 % de fracasos.⁴⁰

Si una infección parece no responder a la antibioticoterapia prolongada (4-12 meses), se debe sospechar de un drenaje inadecuado del foco o la penetración escasa del medicamento al absceso.^{22, 28} La respuesta clínica suele ser correcta, a pesar de la extensa destrucción tisular provocada por *Actinomyces*,²² dado el grado de fibrosis y deformidad causado por la infección.¹⁴

Es importante señalar que la anfotericina B, la nistatina y la griseofulvina son ineficaces en el tratamiento de dicha enfermedad. La prevención de las infecciones endógenas es bastante compleja. Sin embargo, debe mantenerse una adecuada higiene bucal, con una profilaxis antibiótica correcta.²²

JUSTIFICACION

En México existen pocos reportes de infecciones causadas por actinomicetos aerobios y anaerobios, posiblemente se deba a lo siguiente:

- En nuestro país en los laboratorios de microbiología pocas veces se lleva a cabo la recuperación de actinomicetos aerobios y anaerobios y en ocasiones son diagnosticadas de forma errónea o pasadas por alto al reportarlas como contaminantes.
- Como son infecciones crónicas, la mayoría son asintomáticas y en los primeros periodos no presentan durante su evolución signos y síntomas característicos de la infección, por lo tanto no se diagnostica a tiempo.^{11, 22, 29, 31, 40}
- La actinomicosis humana es una infección polimicrobiana en donde participan en forma sinérgica más de una bacteria como: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus agalactiae*, *Haemophilus sp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* y *C. trachomatis*,^{16, 24} lo que puede originar un diagnóstico erróneo.
- En los humanos, los actinomicetos anaerobios, son consideradas como flora normal que prevalece en la boca, alrededor de los dientes; en el tracto gastrointestinal, en especial en el colon y en la piel, por lo que no se les da importancia.^{11, 14, 24, 29, 31, 34}

Sin embargo, en las últimas décadas, a través de la literatura, se han reportado infecciones causadas por anaerobios de origen endógeno como la actinomicosis, y lo han atribuido principalmente a la existencia de pacientes que reciben drogas inmunosupresoras para tratar procesos malignos y otros trastornos, lo que puede comprometer la resistencia del huésped.³¹

En nuestro país hay pacientes inmunosuprimidos; con caries dental, por mala higiene dental,²² malos hábitos dietéticos y desnutrición. Lo que puede ser causa de actinomicosis cervico-facial, torácica y pulmonar como resultado de la aspiración de *Actinomyces israelii* presente en la cavidad oral o a través del arrastre de cuerpos extraños (como las cánulas endotraqueales, la aspiración de secreciones el humo que se arrastra al fumar).⁴⁰ Siendo los bronquios el primer órgano lesionado al dañar el tejido peribronquial, progresando por contigüidad al lóbulo pulmonar, formando abscesos.⁴⁰

También pudiera iniciarse a través del esófago por ataque al mediastino y de esta manera pudiera invadir la pleura generando un derrame pleural.⁴⁰

Por tal motivo se empleará un modelo para poder aislar e identificar a este agente causal.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿ Se podrán aislar actinomicetos aerobios y anaerobios, a partir de las muestras clínicas obtenidas en niños internados en el Hospital Infantil de México.?

HIPÓTESIS

Si se realiza un modelo de trabajo, para el aislamiento de los actenomicetos, en muestras obtenidos del Hospital Infantil, entonces será posible detectarlos en un periodo de un año

OBJETIVOS.

- Determinar un modelo de trabajo para el aislamiento e identificación de actinomicetos aerobios y anaerobios.
- Aislar e identificar de las muestras clínicas obtenidas de niños del Hospital Infantil de México, actinomicetos aerobios y anaerobios.
- Buscar la presencia de gránulos actinomicosicos y estructuras filamentosas de actinomicetos aerobios y anaerobios, en muestras representativas: hemocultivos, aspirado de abscesos profundos, aspirado transtraqueal o aspirado pulmonar directo y tejido de biopsias.
- Identificar y aislar actinomicetos aerobios y anaerobios de las cepas aisladas por pruebas bioquímicas y galerías de pruebas bioquímicas miniaturizadas (API-20E, API-ZYM, API-50CH en aerobios y API-20A en anaerobios)

Diseño de la investigación:

Experimental, prospectivo por temporalidad, transversal, descriptivo y abierto.

Población:

Muestras clínicas obtenidas de niños del Hospital Infantil de México "Federico Gómez".

Criterios de inclusión:

Muestras biológicas provenientes de pacientes que presenten los siguientes diagnósticos clínicos:

- Absceso dental y periodontal
- Absceso pulmonar
- Neumonía necrosante
- Empiema subdural y torácico
- Mediastinitis
- Neumonía por aspiración
- Fiebre en estudio
- Micetomas
- Inmunosuprimidos
- Transplante de un órgano
- Antecedentes quirúrgicos

Criterios de exclusión:

- Pacientes con diagnóstico clínico de infección viral y micótica.
- Pacientes que estén recibiendo tratamiento antibacteriano.

Criterios de eliminación:

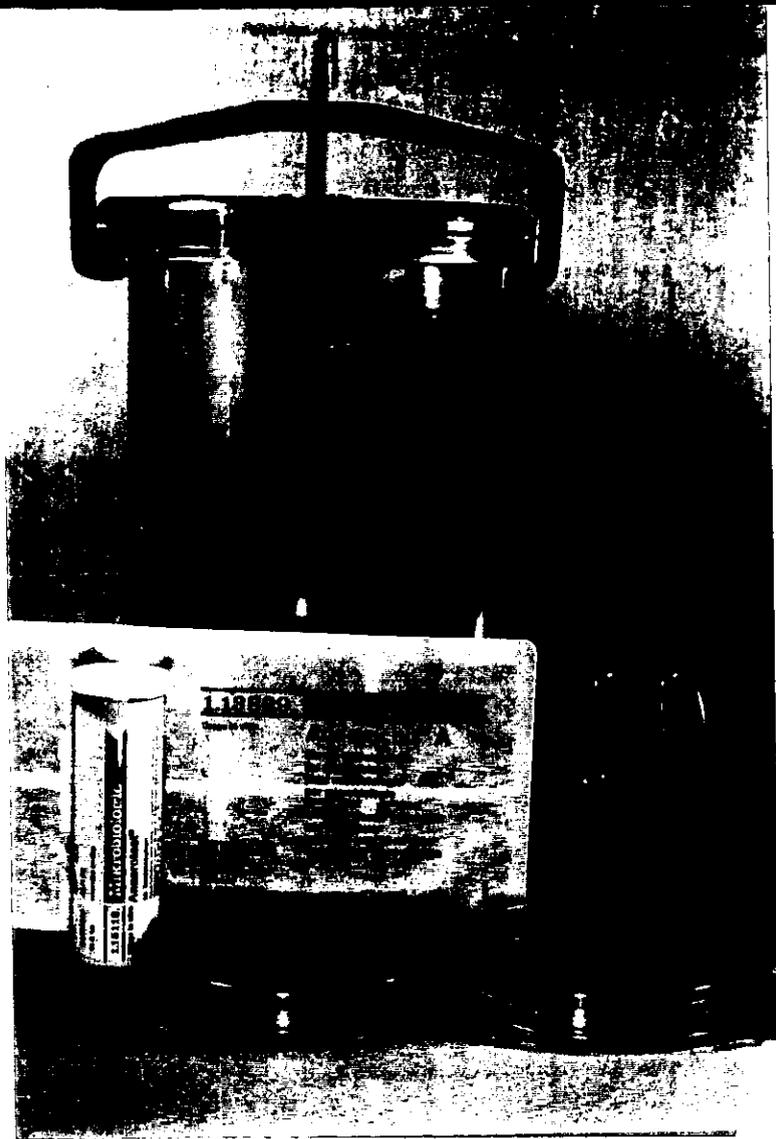
1. Medios de cultivo contaminados del laboratorio donde se labora.
2. Muestras que en el cultivo de aislamiento presenten características macroscópicas y microscópicas no típicas de actinomicetos aerobios y anaerobios.

METODOLOGIA

AISLAMIENTO DE ACTINOMICETOS ANAEROBIOS (*ACTINOMYCES*) DE DIVERSAS MUESTRAS CLÍNICAS.

Metodología:

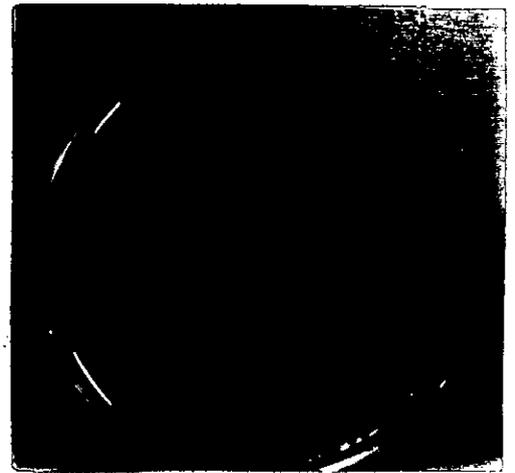
- A. Tomar la muestra (tejido, abscesos, líquidos, secreciones, aspirados, otros), del sitio donde se sospeche que existe infección, para llevar a cabo el cultivo bacteriológico, en el Hospital Infantil de México "Federico Gómez".
 - B. Utilizar el medio de transporte Stuart modificado (tiene una baja tensión de oxígeno y un indicador de óxido reducción) o caldo tioglicolato con carne cocida sellado con aceite mineral (actúa como agente reductor), cuando el producto es llevado a lugares distantes de donde se tomó ²³.
- Para las muestras de tejido óseo o pulmonar:
- C. Homogeneizar el tejido óseo o pulmonar, colocándolo en solución salina para evitar que exista aglutinación. Se utilizará un mortero, arena estéril para efectuar la homogeneización. Este procedimiento se efectúa a baja temperatura, para evitar la proliferación de bacterias y en condiciones estériles. El procesamiento del tejido se realizará con una mínima exposición al oxígeno atmosférico.
 - D. Hacer una suspensión con caldo tioglicolato (2-3 mL) sin carne cocida, si la muestra (abscesos, aspirado, líquidos, secreción, otros) es escasa.
 - E. Sembrar la suspensión obtenida de la muestra por duplicado tanto en caldo tioglicolato, con carne cocida y en gelosa sangre hemina menadiona (GSHM), en condiciones de anaerobiosis a 37°C, empleando el sistema Anaerocult ® A o algún otro semejante e incubar durante 24-48 horas (Fig. 4. A y B).
 - F. Hacer frotos de la muestra, teñidas con la técnica de Gram y Ziehl Neelsen para la investigación de gránulos actinomicéticos o formas filamentosas ramificadas en Y o V.
 - G. Colocar la muestra clínica que presenta material purulento, en un tubo con 2 a 3 mL de solución salina estéril y agitar ligeramente hasta obtener una suspensión para realizar el examen microscópico. Si se observan granos, lavar 4 veces con 9 mL de solución salina estéril y realizar observaciones en fresco y posteriormente teñir por la técnica de Gram.
 - H. Cuando la muestra clínica no presenta granos o material purulento, los fragmentos del tejido se homogeniza en 3-4 mL de solución salina y se agita para obtener una ligera suspensión. Esta se observará en fresco para la investigación de granos actinomicéticos. Se harán frotos teñidos con la técnica de Gram y Ziehl Neelsen (Fig. 5 A y B).
 - I. Transcurrido el tiempo de primoincubación, abrir la jarra anaerobia. Si el crecimiento es positivo proceder a sembrar por duplicado empleando el Sistema Anaerocult ® A u otro sistema de anaerobiosis e incubar a 37°C, para favorecer las condiciones de anaerobiosis en los medios de cultivo (Previamente preparados en el Departamento de Microbiología. E.N.C.B. del I.P.N.):
 - J. Gelosa sangre alcohol fenil etílico para *Actinomyces* a una concentración de 0.25 %, para inhibir bacterias Gram negativas y permitir el desarrollo de *A. odontolyticus*.
 - K. Gelosa cerebro corazón con 20 µg/mL de CdSO₄ (BHI modificado), es un medio diferencial que ayuda a determinar la morfología colonial de los microorganismos de los géneros: *Actinomyces*, *Bacterionema* y *Rothia*, pero tiene la desventaja de inhibir *A. odontolyticus*. El período de incubación es de 4-5 días ²³.



A



B



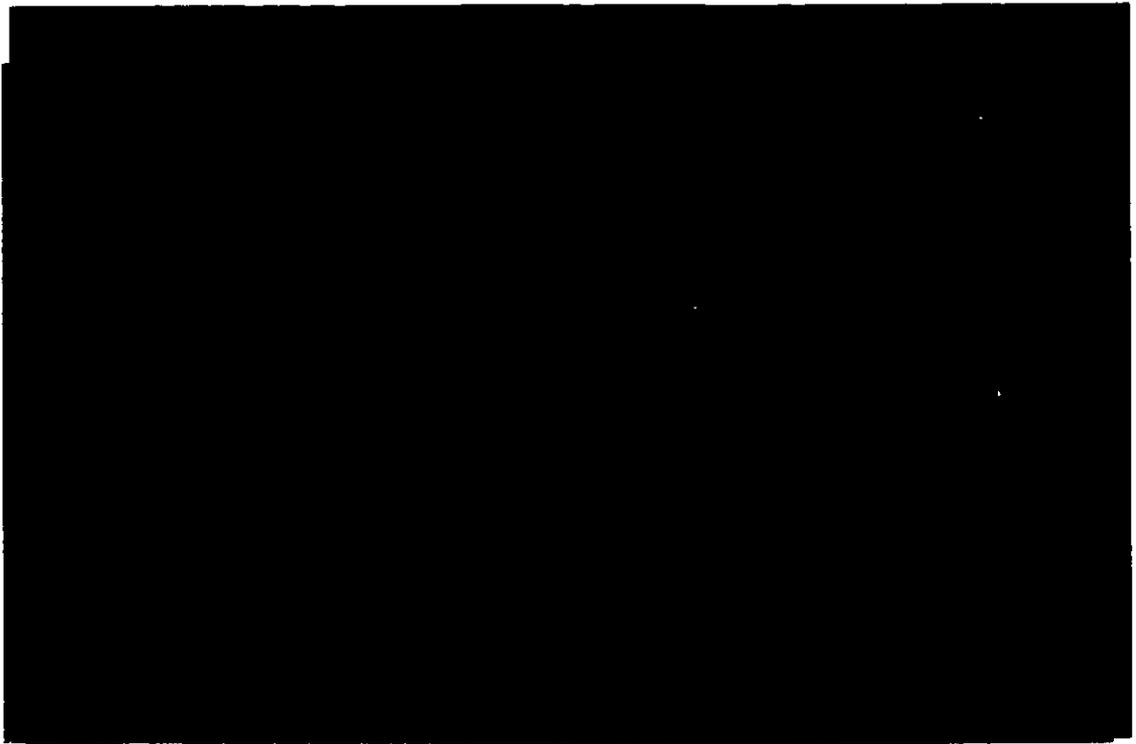
C



D

Fig.4. Aislamiento de actinomicetos anaerobios (*Actinomyces*). Sistema anaerobio Anaerocult®

- A. La jarra contiene: 1 placa GSHM, 1 tubo THIO con carne cocida, el generador de bióxido de carbono e hidrógeno y un indicador de óxidoreducción.
- B. Tejido pulmonar (obtenido por biopsia) en tioglicolato con carne cocida (sellado con aceite mineral).
- C. Desarrollo de colonias de *A. israelii* a las 48 Hrs. de incubación en gelosa sangre.
- D. Tira de API-20A (bio-Mérieux), después de 24 Hrs. de incubación, ilustrando las reacciones que ocurren en las cúpulas.



A



B

Fig. 5. Frotis de líquido peritoneal.

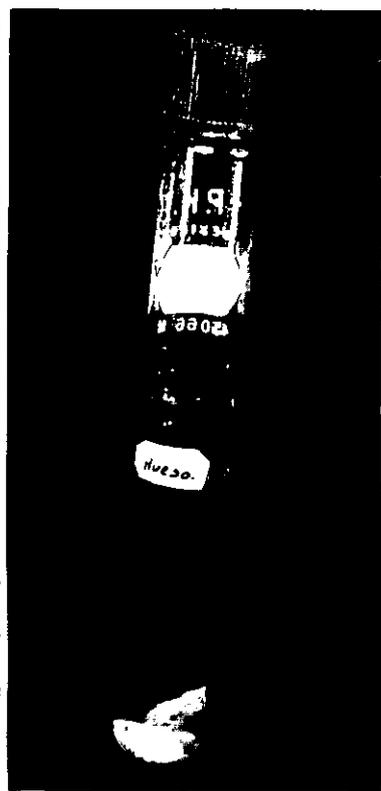
A. Tinción de Gram, revela numerosos leucocitos polimorfonucleares, cocos gram positivos, bacilos cortos y largos gramnegativos y bacilos positivos. Las infecciones anaerobias por lo general contienen una flora mixta. En esta muestra se aisló *A. meyeri*.

B. La misma muestra, pero con tinción de Ziehl Neelsen modificada.

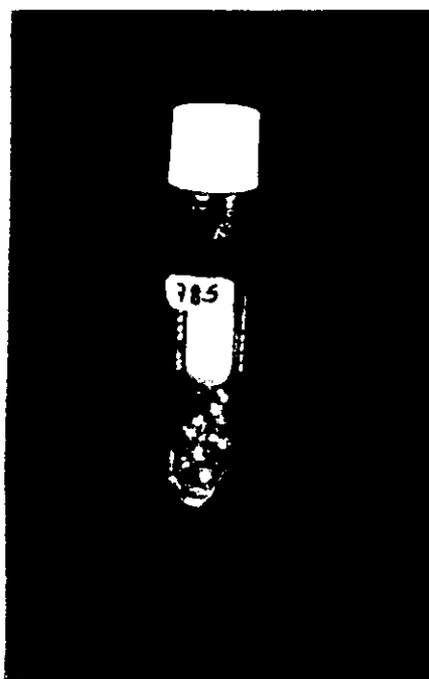
AISLAMIENTO DE ACTINOMICETOS AEROBIOS DE TEJIDO ÓSEO O PULMONAR.

Metodología:

- A. Tomar la muestra de tejido óseo o pulmonar (por biopsia lo realiza el médico), del sitio donde se sospeche que existe infección.
- B. Transportar rápidamente la muestra, conservarla a una temperatura mayor de 10°C. La *Nocardia* es muy sensible al frío ⁴³.
- C. Homogenizar el tejido, como esta descrito en el inciso D de la metodología aislamiento de actinomicetos anaerobios.
- D. Sembrar el tejido fragmentado en caldo tioglicolato, gelosa sangre, Löwenstein-Jensen.
- E. Incubar a 37°C de 24-48 Hrs. las placas de gelosa sangre, BHI. De 24 hrs.-20 días el caldo tioglicolato o Löwenstein-Jensen (Fig. 8 A,B).
- F. Transcurrido el tiempo de incubación, continuar con lo descrito en el inciso H al M de la metodología, aislamiento de actinomicetos aerobios en hemocultivos.



A



B

B

Fig. 8. . Aislamiento de actinomicetos aerobios en tejido óseo.

- A. Tejido óseo en tioglicolato sin carne cocida, incubación de 37°C, 15 días (muestra 785).
- B. Desarrollo de las colonias de *Nocardia brasiliensis* en el medio BHI.

RESULTADOS.

En 4109 hemocultivos, se encontraron 783 positivos, de los cuales 15 correspondieron a actinomicetos aerobios, en dos de ellos no se logró su identificación debido a que las cepas estaban contaminadas con otros microorganismos.

De los 15 actinomicetos (Cuadro 1), 1 fue *Nocardia asteroides* y 12 *Streptomyces* sp. (Fig.10.A-C).

En el medio ambiente de la Unidad de Transplante de Médula Ósea (UTMO) se aisló una cepa de *Streptomyces* sp.

De un fragmento de hueso de peroné izquierdo se identificó *Nocardia brasiliensis* (Cuadro 1) (Fig. 9).

De las 64 muestras clínicas, en que se buscó *Actinomyces* (Cuadro 2) se aislaron:

- 1 *Actinomyces israelii*, de un absceso hepático.
- 1 *Actinomyces meyeri*, también de líquido peritoneal (Fig. 12 B)
- 2 *Actinomyces naeslundii*, de líquido peritoneal (Fig. 11 B).

Los microorganismos asociados con los *Actinomyces* fueron:

Peptostreptococcus sp., *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus niger*, *E. coli*, *Streptococcus intermedius* del grupo *Streptococcus milleri*, *Streptococcus constellatus*, *Serratia* sp., *Enterococcus* sp, *Bacteroides fragilis*.

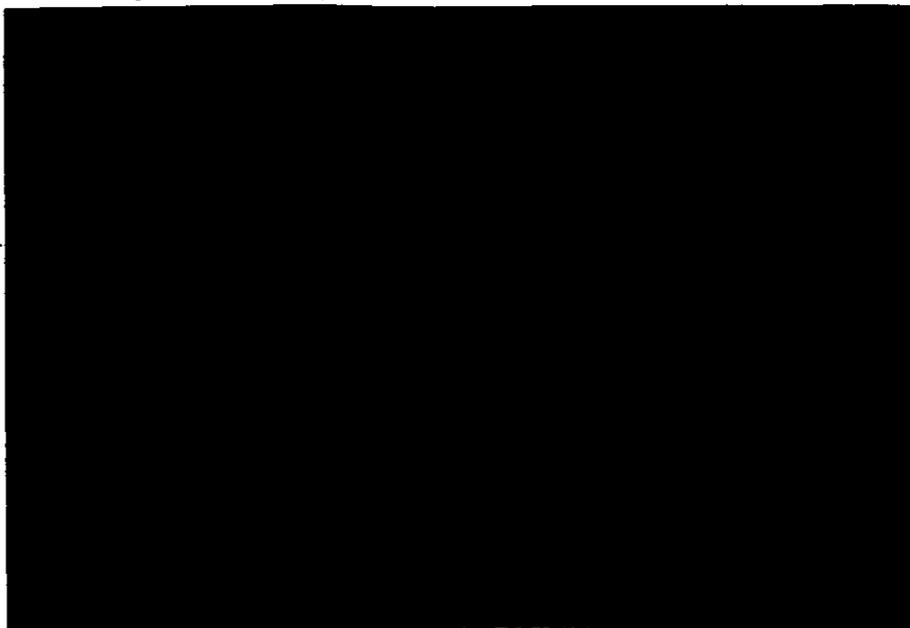


Fig. 9 Frote teñido con la técnica de Ziehl Neelsen, observando los filamentos ramificados parcialmente ácido resistentes de *Nocardia brasiliensis* (muestra 785).

Frecuencia de actinomicetos aerobios aislados de muestras clínicas en el Hospital Infantil de México "Federico Gómez"

Cuadro 11.

No.	FECHA	SERVICIO	DIAGNOSTICO	TIPO DE MUESTRA	POSITIVO	EDAD	SEXO	ACTINOMICETO
08-H	26-III-99	UCIN	Sx. Mala adaptación pulmonar.	Hemocultivo periférico	9 días	4 meses	Masculino	Se contaminó
368-H	16-IV-99	Terapia Quirúrgica	Cierre de CIV y colocación de homoinjerto Conexión de Ventriculo Pulmonar	Hemocultivo central	4 días	4 meses	Femenino	<i>Streptomyces sp.</i>
549-H	30-IV-99	UCIN	Meningitis/Encefalopatía hipoxica, isquemica	Hemocultivo periférico	3 días	27 días	Masculino	<i>Streptomyces sp.</i>
675-H	3-V-99	UCIN	Sx. Mala adaptación pulmonar. Descartar neumonía intrauterina	Hemocultivo central	4 días	1 día	Femenino	<i>N. asteroides</i>
768-H	9-V-99	Terapia Quirúrgica	Hipoplasia de rama de la arteria Pulmonar Der. Sepsis neonatal temprana. Descartar IR por Hidroamnios	Hemocultivo periférico	4 días	2 meses	Masculino	<i>Streptomyces sp.</i>
991-H	23-V-99	Neurocirugía	Plagiocefalea	Hemocultivo periférico	2 días	1 a. 2 meses	Masculino	<i>Streptomyces sp.</i>
UTMO	4-IV-99	UTMO	Estudio del área	del área	3 días			<i>Streptomyces sp.</i>
251-H	7-VI-99	Nefrología	Transplante de riñón 8/X/98	Hemocultivo periférico	4 días	7 años	Masculino	Se contaminó
549K-H	28-VI-99	Cirugía	Prob sepsis. El 23-VI se reportó <i>K. pneumoniae</i>	Hemocultivo periférico	1 día	10 meses	Femenino	<i>Streptomyces sp.</i>
785-D	30-VI-99	Hospital de Pachuca	Micetoma en extremidad inferior izquierda. Hace 2 años padece de osteomielitis	Fragments de hueso de Ext. Inf. Izq.	15 días	14 años	Masculino	<i>N. brasiliensis</i>
527 H	26-VI-99	Urgencias	Tumor neuroectodermico primitivo de tallo cerebral	Hemocultivo periférico	5 días	8 años	Masculino	<i>Strptomyces sp</i>
197-H	14-VIII-99	Medicina	Parto pretermino atresia de vías biliares, sepsis neonatal	Hemocultivo central	10 días	31 días	Masculino	<i>Streptomyces sp.</i>
867-H	24-IX-99	Cirugía	Enf. De Hodking. Hemiesplenectomía	Hemocultivo periférico	6 días	12 años	Masculino	<i>Streptomyces sp.</i>
371-H	28-X-99	Oncología	Pb. Linfoma	Hemocultivo central	7 días	10 años	Masculino	<i>Streptomyces sp.</i>
391-H	29-X-99	UCIN	Prematuro (950 g) Enf de membrana hialina. Hemorragia intraventricular e hidrocefalea.	Hemocultivo periférico	4 días		Masculino	<i>Streptomyces sp.</i>
904-H		Gastroenterología	Probable Sepsis	Hemocultivo periférico		15 años	Femenino	<i>Streptomyces sp.</i>
242-H	23-XII-99	Cirugía	Fiebre en estudio	Hemocultivo periférico	8 días	29 días	Femenino	<i>Streptomyces sp</i>

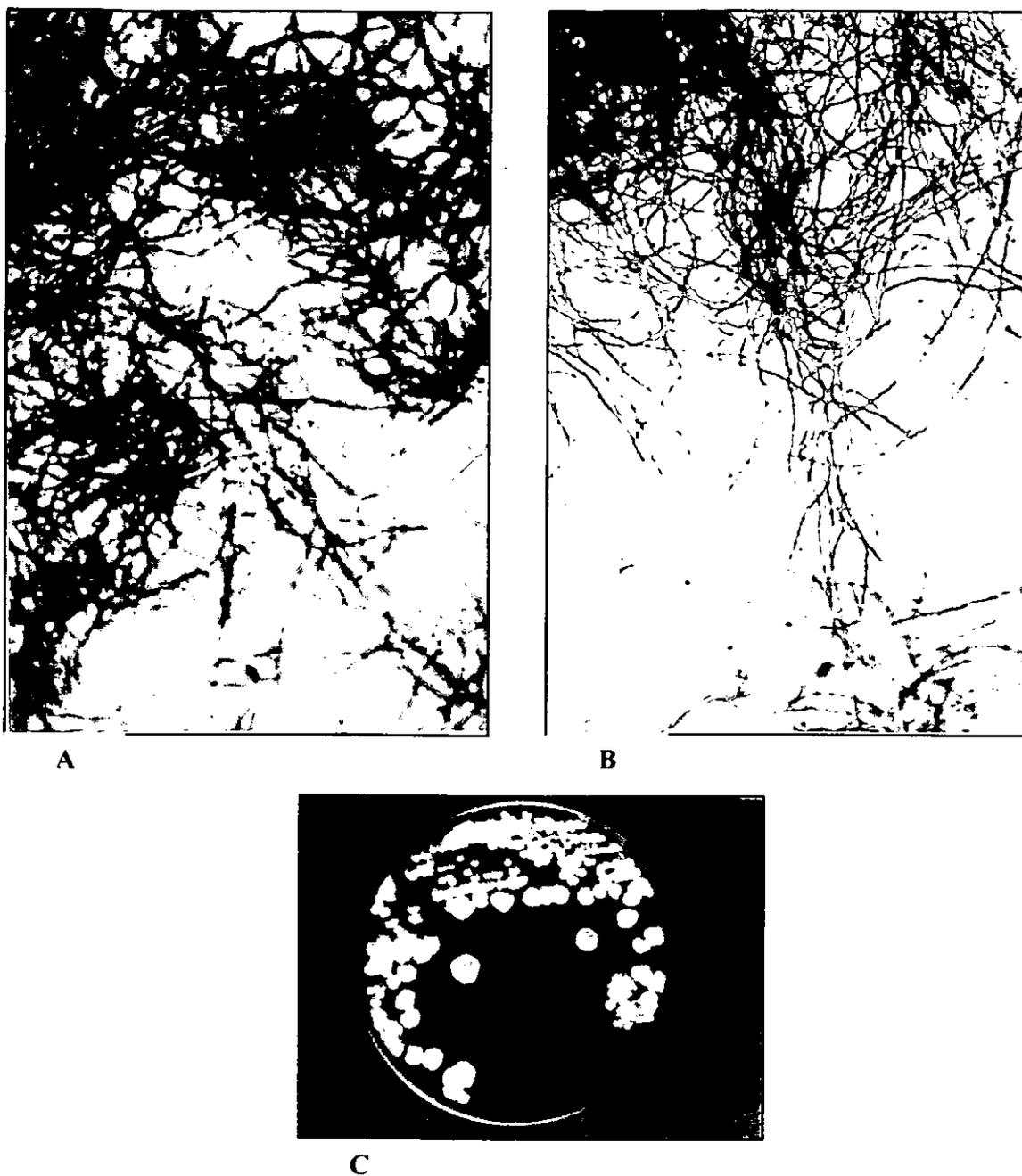
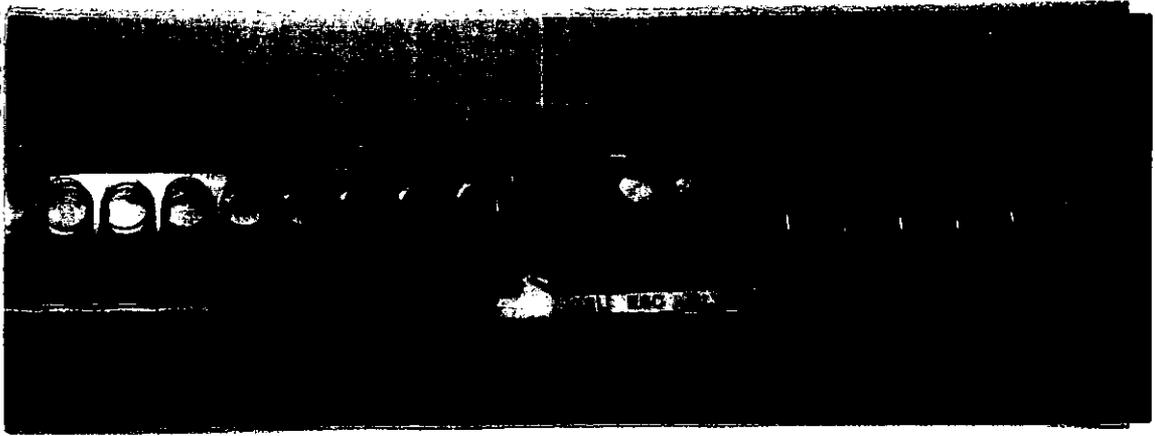


Fig. 10

- A. Frote con la técnica de ácido modificada, que permite observar las estructuras filamentosas de *Streptomyces* sp.
- B. Frote con la técnica de Gram de *Streptomyces* sp.
- C. Placa de gelosa sangre con colonia blancas, rugosas, de consistencia dura, tiene el aspecto de "palomitas de maíz", es *Streptomyces* sp. (muestra 904)



A



B

Fig. 11

A. Tira de API-20A, después de 24 horas de inoculación en anaerobiosis, a 37°C, ilustrando las reacciones que ocurren en las cúpulas con *Actinomyces naeslundii*.

B. *Actinomyces naeslundii*. Tinción de Gram, obtenido de una muestra de líquido peritoneal.

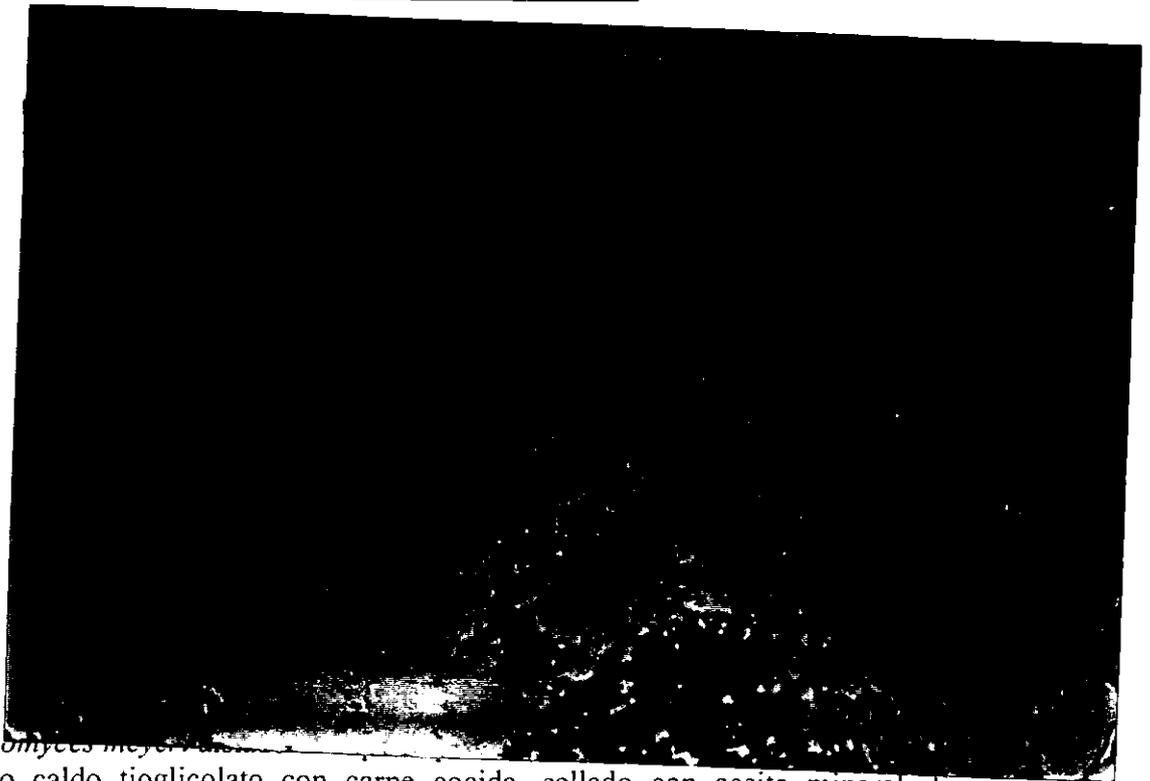


Fig. 12 *Actinomyces meyeri*.
A. En medio caldo tioglicolato con carne cocida, sellado con aceite mineral. Forma colonias duras y granulares, como pelotas de algodón.
B. Tinción de Gram del caldo de tioglicolato con carne cocida, se observan las formas que recuerdan a la letra V.

ANÁLISIS DE RESULTADOS.

En el cuadro 11, se observa que 10 niños, se encuentran entre la etapa de recién nacidos a lactantes menores, de estos niños, se logró aislar ocho *Streptomyces* sp., es de llamar la atención que el período de incubación, en la mayoría fue prolongado. También en el hemocultivo sólo crecieron los actinomicetos aerobios y no otro microorganismo asociado. Por tal motivo fue difícil pensar que se trataba de un contaminante.

De estos niños, solo uno tuvo antecedentes quirúrgicos (368-H), por lo que se podría pensar que lo adquirió en el transcurso de la cirugía. Sin embargo, en el muestreo del medio ambiente del área de quirófano, que se realiza con periodicidad, por parte del laboratorio de bacteriología, no se encontró ninguna cepa de *Streptomyces* o *Nocardia* en las muestras estudiadas.

Ocho de los niños antes mencionados, fueron dados de alta, siguiendo su tratamiento en consulta externa. Y uno (197-H) falleció al mes que se tomo la muestra. Se realizó un estudio post-mortem, cuyo resultado fue; atrofia de timo, sin aislamiento de algún germen.

Las preguntas que surgen de esta parte del trabajo son:

¿Cómo adquirieron el microorganismo a tan corta edad?

Por antecedentes clínicos y por seguimiento en la consulta externa, estas cepas no fueron causa de internamiento de estos niños.

Con las cepas aisladas. ¿Sería conveniente ver su patogenicidad?

Tres de estos niños (527-H, 867-H, 391-H), fueron tratados con quimioterapia y dos de ellos con radioterapia, antes de tomar la muestra. Este dato guarda relación con la literatura en donde menciona que estos microorganismos desarrollan la enfermedad, dependiendo más del estado general de inmunidad del huésped, que de su exposición.^{7,9,10,14,17,25,34}

A pesar de que la literatura menciona que la diseminación de estos microorganismos puede ser por vía hematógena,^{7,9,10,14,17,24,25} los medios que recomiendan utilizar son gelosa sangre, sabouraud, gelosa infusión cerebro corazón, Lowenstein-Jensen, Mueller-Hinton-sangre^{7,17,24,51}

Y las muestras para procesar son de tejido con pus, esputo, muestras de lavado bronquialveolar, transtraqueal, biopsia de tejido.^{7,9,10,14,17,24} Poco se dice acerca de realizar una muestra de hemocultivo en un medio bifásico o emplear el caldo tioglicolato, para lograr el aislamiento de estos germenos.²⁴

Si se observa el cuadro 11, la mayoría de las cepas fueron obtenidas por hemocultivo en un medio bifásico Columbia.

Actinomyces meyeri, se obtuvo de una muestra de líquido peritoneal, del que no se indicó la búsqueda de anaerobios. Sin embargo, por las características que presentó (olor fétido, polimicrobiano, y el antecedente de haber presentado apendicitis perforada), se procesó este líquido para buscar microorganismos anaerobios. Figura 5,12

Actinomyces naeslundii, las cepas aisladas se obtuvieron de líquido peritoneal, en uno de ellos, si se indicó la búsqueda de bacterias anaerobias, pero en el otro no. La primera

provenía de un absceso de pared abdominal del Área de Nefrología. Este paciente posiblemente, lo adquirió por un mal manejo de la diálisis peritoneal.

En la figura 11 se observaron estructuras cocoides, en el medio tioglicolato y el de carne cocida de *Actinomyces naeslundii*, aunque la microscopía típica del microorganismo son formas bacilares, se dice que pueden presentar formas cocoides el género *actinomyces*.¹⁷ Las pruebas bioquímicas (API-20A) indican que es *Actinomyces naeslundii*, sin embargo, presentó hemólisis en gelosa sangre de carnero, y las únicas cepas reportadas que producen una zona de β -hemólisis son *A. pyogenes* y *A. odontolyticus*.^{18,40,45,51}

Actinomyces odontolyticus de acuerdo a los datos obtenidos, es flora normal de la boca y *A. pyogenes* corresponde a la flora normal de muchos animales. No obstante se han reportado cinco casos de infección abdominal causados por *A. pyogenes*¹⁸ y un 2% de actinomicosis humana, generalmente a nivel gastrointestinal son producidos por *A. odontolyticus*. De acuerdo a estos datos, sería conveniente realizar otras pruebas para corroborar la identificación de esta cepa.

CONCLUSIÓN.

Los *Streptomyces* y *Nocardia* obtenidos de hemocultivos, fueron aislados de cultivos puros. El medio bifásico Columbia y el caldo tioglicolato permitió aislar e identificar a los actinomicetos aerobios.

Con la utilización de gelosa sangre hemina menadiona (GSHM) y gelosa sangre alcohol fenil etílico (GSAFE) disminuyó el tiempo de recuperación del género *Actinomyces*.

Aunque el aislamiento de los actinomicetos aerobios fue 0.36% del total de hemocultivos estudiados y 6.26% de actinomicetos anaerobios, se logró aislar *Streptomyces*, *Nocardia*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces meyeri* y *Actinomyces israelii*, en el total de las muestras.

La identificación de los actinomicetos aerobios es difícil, por lo que se hizo de acuerdo al mayor número de pruebas bioquímicas, a pesar de esto no proporciona un 100% de confiabilidad, por lo que se enviaron las primeras cepas a Francia para que sean identificadas por PCR.

Este trabajo ayudó a establecer relaciones interinstitucionales de cooperación, que sin ellas no hubiera sido posible su realización.

RECOMENDACIONES.

En la búsqueda de actinomicetos aerobios y anaerobios se considera que debe ser importante el control de calidad en lo siguiente:

- Procesamiento de las muestras

En los aerobios cuidar que tenga la muestra una temperatura adecuada en el traslado.

En los anaerobios, utilizar el medio de tioglicolato con carne cocida sellado con aceite, como medio de transporte.

Es importante llevar una técnica de asepsia adecuada para evitar posibles contaminantes y transportar la muestra en recipientes cerrados, protegidos del polvo.

- Selección de los medios.

La lectura por monitoreo continuo en los sistemas automatizados es una de las grandes ventajas. Sin embargo la *Nocardia* obtenida de la muestra 785-D, no fue detectada por este sistema. Por lo que se envió un fragmento de hueso, logrando aislarla en el medio de caldo tioglicolato. Es por ello, que considero que el medio bifásico Columbia y el caldo tioglicolato pueden tener una cierta ventaja sobre los métodos automatizados por su costo que es menor y permite observar por un tiempo más prolongado, el desarrollo o no de los actinomicetos aerobios. Además de evitar el uso de técnicas invasivas como fue en este caso, donde hubo necesidad de quitar un fragmento de hueso, originando quizá un daño más grave al hueso y a los tejidos circunvecinos, así como otras infecciones, cuando no se realiza con las técnicas de asepsia adecuadas.

Es importante llevar un control de calidad de los medios que se utilizan, para ello se deben usar cepas de referencia o ATCC, como se realiza en el Hospital Infantil.

En ocasiones no crecen los actinomicetos en el medio Sabouraud y el desarrollo de las colonias es pobre, por lo que es aconsejable el medio de avena que es económico y favorece el desarrollo de los *Streptomyces* y *Nocardia*.

APÉNDICE

**FORMATO QUE SE UTILIZÓ PARA ASENTAR LOS DATOS
MICROBIOLÓGICOS**

Fecha y hora de la toma del producto: _____ **Procedencia:** _____

Diagnóstico clínico:

Diagnóstico radiológico:

Datos clínicos: _____

Nombre de la persona que toma la muestra:

Tiempo de procesamiento:

Edad:

Sexo:

Tipo de muestra:

Material aspirado de abscesos profundos de infección dental y periodontal _

1a. muestra _____ 2ª. muestra _____

Secreción bronquial obtenida por aspiración transcricotiroidea _____

Secreción bronquial obtenida por lavados bronquiales _____

Secreción bronquial obtenida por bronoscopías _____

Líquido pleural _____

Biopsias _____

Características macroscópicas:

Cantidad en mL _____

Presencia de moco _____ sangre _____ material purulento _____ Gránulos _____ Hialino _____

Coloración _____

Características microscópicas:

Morfología: _____ Arreglo: _____

Tinción:

Gram: _____ Ziehl-Neelsen: _____

Tiempo de desarrollo en caldo Tioglicolato: _____

Presencia de turbidez _____ Forma granular o dura en el fondo del tubo _____

Morfología colonial en placas de primoaislamiento:

Tamaño: _____ Forma: _____

Color: _____ Borde: _____

Consistencia: _____ Superficie: _____

Tinción: _____

Características microscópicas:

Morfología: _____ Arreglo: _____

Identificación bioquímica:

Catalasa _____ Indol _____

API - 20A

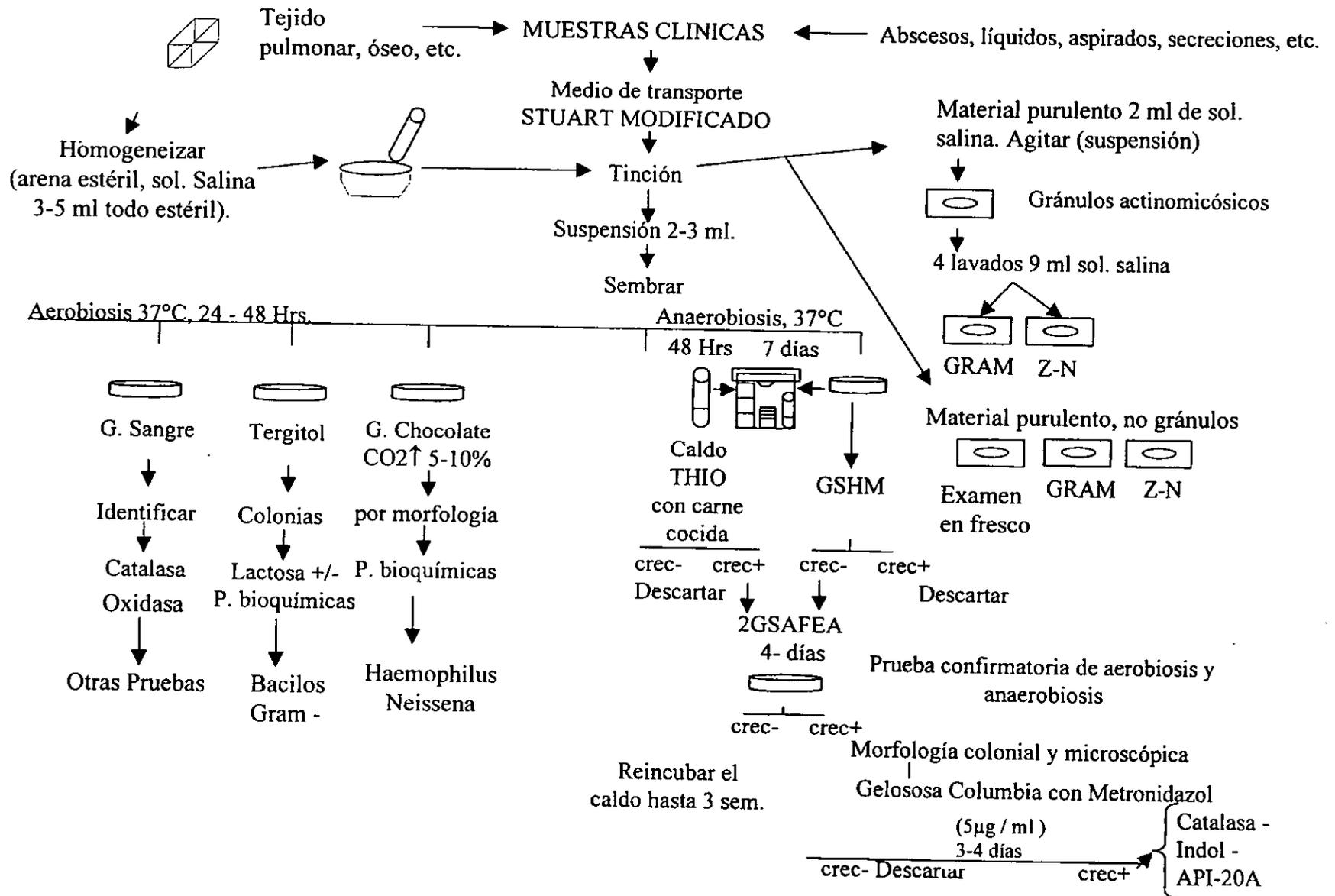


FIGURA 13 AISLAMIENTO DE ACTINOMICETOS ANAEROBIOS (ACTINOMYCETES) DE DIVERSAS MUESTRAS

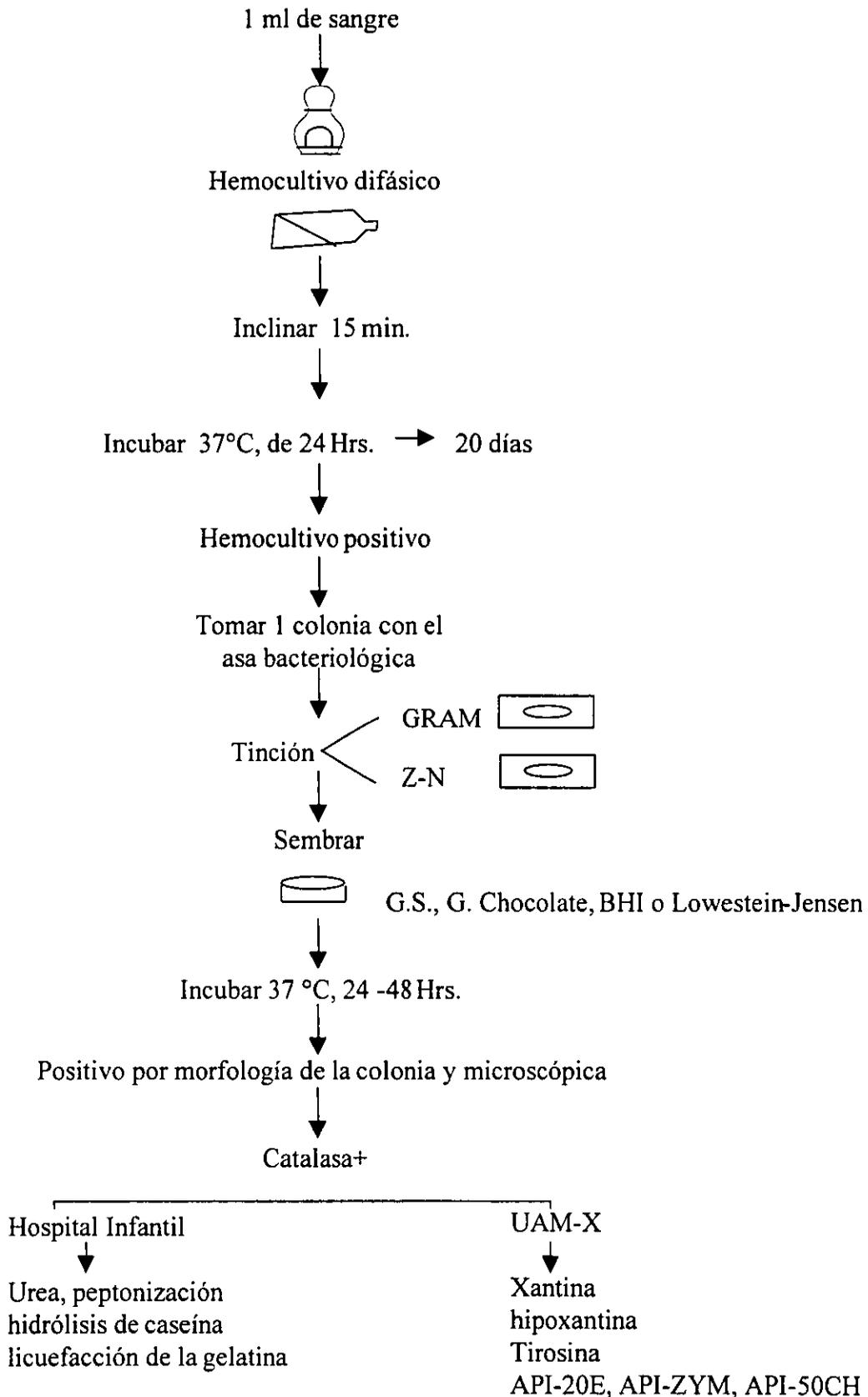


FIGURA 14 AISLAMIENTO DE ACTINOMICETOS AEROBIO EN HEMOCULTIVOS

Conservación de cepas ²³

En ocasiones se presenta la necesidad de mantener alguna cepa de *Actinomyces* en condiciones óptimas; esto significa conservarlas vivas, capaces de multiplicarse con todas sus características (microscópicas, coloniales, metabólicas y de patogenicidad).

En la literatura se recomiendan diversos métodos relacionados con el tiempo que se quiere mantener un microorganismo, recomendando algunas precauciones, como por ejemplo: no se deben emplear medios con inhibidores, ni sustancias bactericidas o bacteriostáticas, que pudieran alterar algunas propiedades fisiológicas, e inclusive matarlas durante su almacenamiento.

Suzuki y Ueno (1981) para conservar la mayoría de las bacterias anaerobias utilizan medios como el caldo cerebro corazón y el de soya tripticaseína, adicionados de agar al 0.1 % y de sustancias reductoras como el tioglicolato o la cisteína. También usan la gelosa Cisteína Tripticaseína (CTA), es aconsejable agregar 0.1 g de Na₂CO₃ por cada 20 mL de medio para regular el pH. Envasar en tubos con tapón de rosca de 9 X 150 mm llenados a dos tercios de su volumen.

Cuando se quiere conservar anaerobios no esporulados (como *Actinomyces*) se puede partir de un cultivo en caldo tioglicolato o en caldo carne cocida dextrosa y se continua como sigue:

Tomar el microorganismo con una pipeta Pasteur.

Inocular la porción más profunda del medio de cultivo

Incubar a 37°C durante 7 - 10 días (dependiendo de la cepa)

Conservar los cultivos en la obscuridad y a temperatura ambiente, sin refrigerarlos, ya que las temperaturas bajas permiten la difusión del oxígeno dentro del medio.

Cuando se trata de microorganismos no esporulados se recomienda hacer subcultivos cada 3 semanas o más.

Slack y Gerencser recomiendan el siguiente método para cepas del género *Actinomyces* sp.

A partir de un cultivo en caldo, sembrar con pipeta Pasteur un tubo que contenga medio de *Actinomyces*.

Tapar el tubo con un pedazo de algodón adicionar 5 gotas de una solución de ácido pirogálico * y 5 gotas de carbonato de sodio anhídrico.**

Sumergir el tapón con una pinza y poner otro de hule, e incubar por dos o tres días, de 48 a 72 horas.

Las cepas pueden permanecer en refrigeración durante varios meses.

*Solución de ácido pirogálico 100 g en 150 mL de agua destilada.

** Solución acuosa de carbonato de sodio al 10 %.

Medios de cultivo ²³

Medio de transporte
Stuart modificado

Fórmula en gramos por litro

Agar	3.0 g
Tioglicolato de sodio	1.0 g
Glicerofosfato de sodio	10.0 g
Cloruro de calcio	0.1 g
Azul de metileno	0.002g
pH	7.3 ± 0.2

Suspender el medio 14.1 g en 1000 mL de agua destilada y calentar hasta ebullición, agitando frecuentemente.

- Distribuir en cantidades de 2 mL en tubos de 15 X 100 mm
- Tapar con algodón y esterilizar a 121°C durante 10 minutos
- Cambiar tapón de algodón por tapón de hule (estéril)
- Poner los tubos en una gradilla en un baño María a temperatura entre 70 – 80°C, el vire del indicador de azul a blanco, hacer vacío con una aguja (unida a la manguera de la bomba de vacío) durante un minuto aproximadamente.
- Esterilizar nuevamente a 121°C durante 10 minutos
- Comprobar que el medio continúa reducido (color blanco)
- Prueba de esterilidad. Abrir un tubo y depositar 0.2 mL de este medio en una placa de gelosa sangre
- Conservar los tubos a temperatura ambiente y en la oscuridad

Medio de carne cocida

Carne molida o picada (libre de grasa)	500.0 g
Agua destilada	1000.0 mL
NaOH 1N	25.0 mL

Se utiliza carne de res o de caballo. Quitar la grasa y el tejido conectivo antes de moler.

Mezclar la carne, el agua y el hidróxido, hervir con agitación constante, dejar enfriar.

Guardar en el refrigerador durante 24 horas. Eliminar la grasa de la superficie del medio y filtrar a través de una gasa.

Al filtrado agregar:

Tripticasa o peptona	30 g
Extracto de levadura	5.0 g
Fosfato de potasio	5.0 g
Agua destilada, la necesaria para	1000 mL

Ajustar a pH de 7.8

Colocar entre 5 y 10 g de carne en tubos con tapón de rosca y agregar el caldo anterior hasta las dos terceras partes de su volumen.

Añadir un poco de hierro en polvo. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

En lugar de agregar todo lo anterior se puede esterilizar caldo tioglicolato.

Medios selectivos

Gelosa BHI modificado para *Actinomyces*

- a) **BASE.** Preparar en la forma usual según marbete 1000 mL de gelosa Infusión Cerebro Corazón.
- b) Agregar 20 mg de sulfato de cadmio
- c) Mezclar
- d) Calentar con agitación frecuente
- e) Hervir durante un minuto
- f) Esterilizar a 15 libras durante 15 minutos
- g) Dejar enfriar a 50 – 60°C
- h) Vaciar en cajas
- i) Dejar solidificar
- j) Incubar a 37°C durante 24 horas como prueba de esterilidad (la incubación se puede hacer en condiciones anaeróbicas y en este caso se obtienen los medios prerreducidos).

Gelosa Sangre Alcohol Fenil Etilico para Actinomicetos

- a) Preparar el medio Gelosa sangre Hemina Menadiona GSHM
BASE. Preparar en la forma usual según marbete 100 mL de gelosa soya tripticaseína o gelosa brucella o gelosa cerebro corazón o gelosa Schaedler o gelosa Anaeróbico
 - b) Añadir 0.5 g de extracto de levadura
 - c) Añadir 0.25 mL de Alcohol Fenil Etilico
 - d) Ajustar el pH a 7.3 -7.5
 - e) Esterilizar a 121°C durante 15 minutos
 - f) Enfriar a 50°C
 - g) Agregar sangre de carnero o conejo desfibrinada a una concentración final de 5 %
 - h) Añadir 1 mL de solución de trabajo de hemina menadiona
 - i) Mezclar
 - j) Vaciar en cajas
- Solución de trabajo hemina menadiona
Solución madre de hemina
- a) Disolver 50 mg de hemina en 1 mL de NaOH 1 N
 - b) Añadir 100 mL de agua destilada

Medios de cultivo para conservación de cepas

Medio de caldo Cerebro

- a) Añadir una pequeña cantidad de agua al cerebro de ternera o de res y poner en un homogenizador
- b) Preparar una solución de peptona usando 20 g de peptona en 1000 mL de agua destilada. Ajustar a pH 7.2-7.4
- c) Distribuir en tubo de 13 X 100 con tapón de rosca.
- d) Usar una parte de cerebro y dos partes de peptona.
- e) Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Medio de mantenimiento caldo *Actinomyces* ("AM BROTH")

1. Parte I

Solución salina	15.0 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
CaCl ₂	0.02 g
Disolver en 250 mL de agua destilada	
Peptona de Caseína (digerido pancreático)	4.0 g
Extracto de levadura	2.0 g
Infusión cerebro corazón	25.0 g
Cisteína	1.0 g

Ajustar a un volumen final de 500 mL y un pH de 6.5 con KOH al 20 %. Esterilizar por filtración.

2. Parte II

Agua destilada	500.0 mL
Glucosa	5.0 g
Agar	7.0 g
Almidón soluble	1.0 g
Acido oleico	10.0 g

Acido oleico: 100 mg/100 mL de agua destilada. Se ajusta a un pH 7.0 con NaOH 1 N. De esta solución se toma 10 mL. El almidón se disuelve en 50 mL de agua destilada y se mezcla con 450 mL de agua que contiene las otras sustancias .

La parte II se esteriliza a 121°C por 15 minutos y se mezcla después con la parte I, obteniendo un volumen final de un litro o también mezclando los ingredientes de la parte I con los de la parte II esterilizando a 121°C por 10 minutos.

NOTA: Dependiendo de la cantidad de agar en el medio, se pueden preparar:

- Medio de mantenimiento semisólido (0.7 % de agar).
- Medio sólido o gelificado (1.8 % de agar).
- Caldo *Actinomyces*.

Hemocultivo

Gelosa base Columbia (Becton Dickinson)

Fórmula en gramos por litro

Mezcla de peptonas	10.0 g
Peptona biotriptasa	10.0 g
Peptona de músculo cardíaco	3.0 g
Almidón de maíz	1.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar	13.5 g
Rojo de fenol	0.25 g
Polienriquecimiento	10.0 mL
pH final	7.3 ± 0.2

Caldo Columbia (Difco)

Formula en gramos por litro

Bacto peptona	10.0	g
Substrato nutritivo especial	3.0	g
Cloruro de L-cisteína	0.1	g
Becto dextrosa	0.02	g
Sulfato de magnesio anhidro	0.6	g
Sulfato ferroso	0.02	g
Carbonato de calcio	0.6	g
Tris hidroximetil-aminometano	0.83	g
Cloruro de sodio	5.0	g
Clorhidrato de tris hidroximetil-amino metano	2.86	g
Polianetol sulfonato de sodio	0.025	g
Polienuquecimiento	10.0	mL

Polienuquecimiento (Becton Dickinson)

Fórmula en gamos por litro

Vitamina B 12	0.01	g
L-glutamina	10.0	g
Adenina	1.0	g
Clorhidrato de guanina	0.03	g
Ac. P-aminobenzóico	0.013	g
L-cistina	1.10	g
Glucosa	100.0	g
Nucleosido de difosfopirdina oxidasa	0.25	g
Cocarboxilasa	0.1	g
Nitrato férrico	0.02	g
Clorhidrato de tiamina	0.003	g
Clorhidrato de cisteína	25.90	g

Medio gelatina ⁴³

Peptona de gelatina	4.0	g
Agua destilada	1	l
pH	7.0	

Envasar 2 ml en tubos de hemólisis y esterilizar a 10 lb durante 10 min.

Reacción final

- Agregar 1 mL de Ninhidrina 0.2% en butanol a cada tubo.
- Tapar los tubos con canicas o tapón de rosca.
- Poner los tubos en un baño de agua durante 5 min.
- Reposar 5 min.

Es positivo si se forma un anillo purpúrea o violeta.

Medio de avena (Becton Dickinson)

	Fórmula gramos por litro	
Harina de avena	60	g
Becto agar	12.5	g
Ph	6 ± 0.2	

Suspender en el medio 72.5g en 1000 mL de agua destilada y calentar hasta ebullición, agitando suavemente.
Esterilizar a 10 lb durante 10 minutos
Vaciar a cajas de petri estériles.

Gelosa de Infusión Cerebro, Corazón (BHI) (Bioxon. Becton Dickinson)

	Fórmula en gramos por litro	
Infusión cerebro corazón sólidos	8	g
Peptona de carne	5	g
Peptona de caseína	16	g
Cloruro de sodio	5	g
Dextrosa	2	g
Fosfato disódico	2.5	g
Agar	13.5	g
pH	7.4 ± 0.2	

Suspender 52g el polvo en un litro de agua destilada. Mezclar perfectamente. Calentar agitando con frecuencia y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121°C por 15 min.

Base agar sangre (BBL. Becton Dickinson)

	Fórmula en gramos por litro	
Infusión músculo cardiaco sólido	2	g
Caseína digerida por enzimas pancreáticas	13	g
Extracto de levadura	5	g
Cloruro de sodio	5	g
Agar	5	g

Suspender 40g en un litro de agua destilada. Mezclar perfectamente. Calentar agitando con frecuencia y hervir durante 1 minuto hasta disolver completamente el medio. Esterilizar a 121°C por 15 min.
Enfriar a 45-50°C y adicionar 5% de sangre de carnero estéril desfibrinado.

Lowenstein-Jensen ⁴³

	Solución salina	
Fosfato monopotasio	4.0	g
Sulfato de magnesio	0.4	g
Citrato de magnesio	1.0	g
Aspargina	6.0	g

Glicerol	20	mL
Agua destilada	1000	mL

Disolver mediante calentamiento, distribuir en volúmenes de 300 mL y esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Solución de verde de malaquita	2	g
Agua destilada	100	mL

Disolver por calentamiento, filtrar y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

Medio completo

Solución de sales minerales	300	mL
Solución de Verde de malaquita	10	mL
Huevos batidos	10	

Método de preparación

- Limpiar el cascarón de 10 huevos grandes (aproximadamente un peso de 500 g) con alcohol metílico.
Romper el huevo dentro de un frasco cónico estéril que contiene cuentas de vidrio.
- Agitar el frasco para romper los huevos y añadir a una botella de 300 mL de solución de aceite mineral.
- Añadir 10 mL de solución de Verde de malaquita.
- Agitar bien y filtrare a través de muselina estéril.
- Distribuir en condiciones asépticas en recipientes universales.
- Colocar a 75°C, hasta que se solidifique. Mantener constante el tiempo para cada lote de medios.

Nota: Si se incluye el almidón en el medio puede añadirse a la solución de sales minerales (12 g en 3000 mL), calentándolo sobre la flama hasta que se obtenga una mezcla lisa. Luego se hierva la solución.

Se ha sugerido que la inclusión de almidón de papa proporciona al medio de Lonwenstein-Jensen un crecimiento más abundante.

El medio tiene un pH aproximadamente de 7.0

Medio para Determinación de Descomposición de Caseína. ⁴³

"Skim Milk" en polvo (Difco).	10	g
Agua destilada	100	mL

Disolver la leche, agregando poco a poco para evitar la formación de grumos

Agar	4	g
Agua destilada	100	mL

Esterilizar por separado. Cuando ambos hayan enfriado a 45°C homogenizar y distribuir en placas de petri estériles. Se inocula, se incuba y examina a los 7 y 14 días.

La prueba positiva presenta aclaramiento del medio alrededor y por debajo del crecimiento. Este medio se puede preparar con leche descremada que no tiene colorante. Se puede agregar purpura de bromocresol 0.04%.

Medio para observar coagulación y peptonización.

"Skim Milk" en polvo (Difco)	5	g
Agua destilada	100	mL

Purpura de bromocresol 0.04%
Envasar 3 mL en tubos de hemolisis.
Esterilizar 10 lb durante 10 min.

Medio para determinación de descomposición de Xantina, Hipoxantina y Tirosina. ⁴³

Tirosina	0.5	g
Hipoxantina	0.5	g
Xantina	0.4	g

Por separado mezclar en 10 mL de agua destilada y esterilizar.

Esta solución se mezcla en 100 mL (cada uno por separado) de agar nutritivo.

Agar nutritivo		
Peptona	5	g
Extracto de carne	3	g
Agar	15	g
Agua destilada	1000	mL
pH	7.0	

Calentar y disolver.

Esterilizar a 15 lb. Durante 10 min.

La mezcla se deja enfriar a 45°C y distribuir en placas (4 compartimientos).

IMPORTANTE: los cristales deben quedar bien distribuidos en el medio, se incuba y se observa.

La prueba positiva presenta aclaramiento del medio alrededor y por debajo del crecimiento.

Siembra y lectura de las pruebas metabólicas. ²³

Pruebas presuntivas

Placas LD (Lombard y Dowell)

El inóculo para la siembra de las tres placas para inhibición de crecimiento (pruebas presuntivas) y para las pruebas confirmatorias se hace a partir de un cultivo en caldo tioglicolato con 18-24 horas de incubación, o puede usarse un cultivo en caldo LD ajustando el inóculo al tubo No 1 del nefelómetro de Mc Farland.

Para la siembra, se utiliza un hisopo para cada una de las placas.

1. Introducir el hisopo en el cultivo ajustado al tubo No 1 del nefelómetro de Mc Farland.
2. Inocular a la parte central de cada uno de los cuadrantes de la placa.
3. Colocar sobre el área inoculada del cuadrante que contiene únicamente el medio base LD un disco de papel filtro estéril impregnado con paradimetil amino-cinamaldehído.
4. Incubar a 37°C durante 48 horas en condiciones anaeróbicas.

Placa LD 1

Medio base LD

Prueba de indol

Prueba positiva desarrollo de color azul alrededor del crecimiento

Medio base LD-esculina.

En este cuadrante de la placa se determina:

Hidrólisis de esculina, producción de H_2S y producción de catalasa.

1. Hidrólisis de la esculina. Prueba positiva, presencia de color café rojizo alrededor de las colonias después de exponerlas al aire durante 5 minutos.

Otra forma de hacer esta lectura es exponiendo el cultivo a una lámpara de luz ultravioleta, observándose color azul fluorescente cuando la esculina no se ha hidrolizado (es una prueba negativa).

2. Producción de H_2S . Prueba positiva ennegrecimiento de las colonias al sacar las placas de la jarra anaeróbica, el cual desaparece rápidamente al exponer las colonias al aire.
3. Producción de catalasa. Exponer la placa al aire durante 30 minutos, poner una gota de peróxido de hidrógeno al 3 % sobre el crecimiento. Prueba positiva, aparición de burbujas de inmediato; a veces se debe esperar de 30 a 60 segundos para observar una prueba positiva.

Medio base LD-yema de huevo.

En este cuadrante se determina la presencia de las enzimas lecitinasa y lipasa.

1. Lecitinasa. La prueba positiva de un precipitado blanco y opalescente en el medio alrededor de las colonias.
2. Lipasa. La presencia de colonias con apariencia perlada y con brillo iridiscente nos indica una prueba positiva. Esta prueba se observa mejor si se agrega sobre el crecimiento bacteriano una gota de solución acuosa saturada de $CuSO_4$. La presencia de un color azul verdoso indica la liberación de ácidos grasos de cadena corta.

Medio base LD-bilis

En este cuadrante se determina el crecimiento microbiano en presencia de bilis al 20 % u oxgal al 2 %.

La lectura se hace comparando el desarrollo bacteriano obtenido en el cuadrante correspondiente a la base LD que se toma como testigo, con el desarrollo del cuadrante base LD-bilis y se interpreta de la siguiente manera:

I Menor desarrollo que en el cuadrante testigo

E Crecimiento igual o mayor que en el cuadrante testigo

Otra forma de informar la prueba positiva es por la observación de un precipitado blanco insoluble, debajo del crecimiento bacteriano.

Placa LD 2

Medio base DNA

La prueba positiva se indica por un vire del indicador a rosa alrededor del crecimiento bacteriano.

Medio base glucosa

La prueba positiva se pone de manifiesto al virar el indicador a amarillo debido a la producción de ácido (pH menor de 6)

Medio base leche

la prueba positiva se observa cuando el medio se aclara alrededor de las colonias, debido a la hidrólisis de la caseína.

Medio base almidón

Cubrir el cuadrante de la placa con solución de lugol (puede ser el que se utiliza para la tinción de Gram). Una zona clara alrededor de la colonia indica hidrólisis del almidón.

Placa LD 3

Medio base-manitol, Medio base -lactosa, Medio base-ramnosa.

La prueba positiva se indica por el vire del indicador a amarillo debido a la producción de ácido en cada uno de los azúcares utilizados.

Medio base-gelatina.

Cubrir el cuadrante con la solución de Frazier (ver preparación de indicadores y reactivos)

Una zona clara alrededor de las colonias indica una prueba positiva debida a la hidrólisis de la gelatina.

Pruebas confirmatorias.

a) Fermentación de carbohidratos

El vire del indicador a un color amarillo o naranja indica una prueba positiva.

b) Producción de indol.

Tomar una parte del cultivo en caldo indol nitrato y agregar 0.5 mL de xilol y 0.5 mL de reactivo de Ehrlich. Prueba positiva, aparición de color rojo.

c) Reducción de nitratos.

Tomar la otra porción del cultivo en caldo indol nitrato y agregar 0.5 mL de ácido sulfanílico, y 0.3 mL de alfa dimetilnaftilamina

Prueba positiva aparición de color rojizo. Si no se observa color, agregar polvo de cinc, si el medio continúa incoloro se debe tomar como prueba positiva de nitritos, si por el contrario pasa a rojo, esto indica que no ha habido reducción, o sea que la prueba es negativa.

d) Hidrólisis de la esculina.

Agregar al cultivo con caldo esculina 0.5 mL de citrato ferrico de amonio al 1 %. Leer inmediatamente la reacción.

Prueba positiva aparición de un color café oscuro. Otra forma de leer esta prueba podría ser por la exposición del cultivo a una lámpara de luz ultravioleta.

Prueba positiva: desaparición de la fluorescencia.

e) Movilidad.

Se hace a partir de un cultivo en medio de carne cocida y con 6-18 horas de incubación.

Tomar con pipeta Pasteur una gota y observar entre porta y cubreobjetos, el movimiento de las bacterias en caso de tenerlo. Esta preparación puede servir también para hacer una tinción de esporas, dejando secar la gota y fijarlo al color.

f) Licuefacción de gelatina.

Después de incubar el cultivo en el medio de tiogel por lo menos 48 horas, sacarlo de la estufa. Este cultivo y un tubo con el mismo medio sin sembrar (tubo testigo), ponerlos en refrigeración durante media hora.

Prueba positiva, licuefacción de la gelatina. En la prueba negativa el medio se solidifica.

Técnica de Gram.^{23, 43}

Colorantes.

Cristal violeta.

a) Cristal violeta (solución madre)

Cristal violeta	20	g
Etanol 95 %	100	mL

b) Oxalato (solución madre)

Oxalato de amonio	1	g
Agua destilada	100	mL

Solución de trabajo: Diluir la solución madre de cristal violeta 1:10 con agua destilada y mezclar con 4 volúmenes de la solución madre de oxalato, refrigerar en una botella de color ámbar.

Solución de Lugol.

a) Yodo

1 g

b) Yoduro de potasio

2 g

Disolver completamente en 5 mL de agua destilada y agregar:

c) Agua destilada

240 mL

d) Bicarbonato de sodio en solución acuosa al 5 %

60 mL

Mezclar bien y conservar en una botella de color ámbar.

Etanol para decolorar

a) Acohol etílico absoluto

250 mL

Conservar en una botella de color ámbar.

Solución de safranina concentrada.

a) Safranina O

2.5 g

b) Alcohol etílico absoluto

100 mL

Solución de trabajo: Diluir la solución concentrada de Safranina 1:5 ó 1:10 con agua destilada. Conservar en una botella de color ámbar.

Coloración.

1. Fijar el frote con metanol durante un minuto.
2. Cristal violeta, un minuto.
3. Lavar con agua
4. Lugol, un minuto.
5. Lavar con agua
6. Decolorar con etanol
7. Lavar con agua
8. Safranina, un minuto.
9. Lavar con agua.
10. Dejar secar.
11. Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

Técnica de tinción ácido resistente (Método Zihel-Neelsen) ^{23, 43}

Fucsina fenicada

a) Solución alcohólica saturada de Fucsina:

Fucsina básica 1 g

Alcohol metílico absoluto 10 g

b) Solución acuosa de fenol al 5% de alcohol ácido 90 mL

Ácido clorhídrico concentrado 3 mL

Alcohol etílico 95% 97 mL

Azul de metileno 0.5 g

Ácido acético glacial 0.5 mL

Agua destilada 100 mL

Agite y filtre dos veces

Reactivos

a) Solución alcohólica saturada de fucsina fenicada.

b) Alcohol ácido.

c) Azul de metileno.

Coloración.

1) Preparar el frote y fijarlo con calor.

2) Tefir con fucsina fenicada, calentar sin que hierva por 5 minutos.

3) Lavar con agua corriente.

4) Sumergir en alcohol ácido.

5) Lavar con agua corriente.

6) contrastar con agua corriente

7) Dejar secar

8) Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

Preparación de indicadores y reactivos.²³

Indicador de anaerobiosis.

NaHCO ₃	400	g
Glucosa	100	g
Cloruro de azul de metileno	3	mg

Mezclar los tres ingredientes. Para utilizarlo, pesar dos gramos de la mezcla, colocarla en un tubo de ensayo, agregar 8 mL de agua destilada. La mezcla debe tener un color azul pálido. Colocar el tubo en la jarra de anaerobiosis, colocar el sobre generador de gas (Gas Pak), cerrarla. El vire del indicador de azul a transparente indica que en la jarra hay condiciones anaeróbicas.

Catalasa.

Agua oxigenada al 3 %

Esculina

Citrato férrico amónico	1	g
Agua destilada	100	mL

Disolver el citrato en el agua.

Indol

Ehrlich

p-dimetilaminobenzaldehído	4	g
Etanol	380	mL
Acido clorhídrico concentrado	80	mL

Paradimetilaminocinamaldehído	1	g
Acido clorhídrico diluido*	100	mL

*10 mL de HCl concentrado + 90 mL de agua destilada.

Nitrato

Reactivo A.

Acido sulfanílico	5	g
Acido acético	1000.0	mL

Disolver por calentamiento suave.

Reactivo B

Dimetil alfa naftil amina	5	g
Acido acético 5 N	1000.0	mL

Disolver por calentamiento suave.

Solución de Frazier.

Cloruro de Mercurio	10	g
Acido clorhídrico concentrado	20	mL
Agua destilada	100	mL

Material y Equipo

Material biológico

Cepas proporcionadas por la UAM-X

- *Nocardia forcinica* ATCC 3318
- *Nocardia asteroides* ATCC 19247
- *Streptomyces somaliensis* ATCC 761-6g
- *Rhodococcus* ATCC 13808
- *Nocardia asteroides* ATCC 10905
- Cepas proporcionadas por ENCB-IPN
- *Nocardia otitidiscaviarum*
- *Nocardia asteroides*
- *Nocardia brasiliensis*

Medios de cultivo

- Medio de transporte. Stuart, Becton Dicknson
- Agar de infusión de cerebro y corazón. Bioxon, Becton Dickin de México
- Peptona de carne. BBL Becton Dicknson
- Agar Soya tripticasa. Becton Dicknson
- Agar base Columbia. Becton Dicknson
- Caldo Columbia. Bioxon, Becton Dicknson
- Polienriquecimiento. Bioxon Liofilizado. Becton Dicknson
- Peptona de gelatina. ENCB-IPN
- Medios de Avena. Becton Dicknson o Avena 3 minutos de producto Quaker de México.
- Base agar sangre. BBL, Becton Dicknson
- Skim Milk en polvo. Difco
- Caldo Tioglicolato. Difco
- Agar Dextrosa Sabouraud. DIBICO
- Agar Dextrosa y Papa. DIBICO

Reactivos.

- Azul bromotimol. Analitika S.A. de C.V.
- Konakion (Fitomenadiona). Laboratorio Roche
- Ninhídrina. ENCB-IPN.
- Púrpura de bromocresol. ENCB-IPN.
- Alcohol fenil étilico. ENCB-IPN
- Safranina. Analit. Química Dinámica, S.A.
- Cristal violeta. DIBICO
- Fucsina básica. DIBICO
- Rojo de fenol. DIBICO
- Azul de metileno. DIBICO
- Verde de malaquita. DIBICO
- Indicador Anaerotest.
- Cesta de absorbente de oxígeno Anaerocult ©A.
- Sistema de identificación API-20A, API-20E, API-ZYM, API-50CH (bio-Mérieux)
- Peróxido de hidrógeno LAITZ

Equipo.

- Microscopio Zeizz. West Germany
- Microscopio Leica.
- Balanza. Harvard Trip Balance
- Balanza librar AEX-200B. Shidmadzu
- Portaobjetos y cubreobjetos. Corning
- Cajas de Petri.
- Autoclave.
- Incubadora. 36-37°C
- Asa de siembra bacteriológica.
- Pipetas, matraz (250, 500, 1000 ml), probeta (10, 50, 100 ml), vaso graduado (50, 100, 250 ml). Pyrex
- Jeringa desechable. De 1 y 20 ml. Plastipak B-D
- Mechero Bunsen
- Guantes desechables.

REFERENCIAS.

1. Abadi M A, Abadi J: *Actinomyces* chorioamnionitis and preterm labor in a twin pregnancy: A case report. *Am. J Obstet Gynecol*, **175**:1391-2, 1996.
2. Ajal M, Turner J, Fagan P, Walker P: Actinomycosis oto-mastoiditis. *J Laryngol Otol*, **111** (11): 1069-71, 1997
3. Apotheloz C, Regamey C: Disseminated infection due to *Actinomyces meyeri*: case report and review. *Clin Infect Dis*, **22** (4): 621-5, 1996.
4. Bapurao M, Jayashree V J, Usha W, Kamal H Rashmi S, Usha Ch, Jyotsna Gokral, Geeta B: *Actinomyces* in cervical Smears of women using intrauterine contraceptive devices. *Acta Cytol*, **30**(4): 367-371, 1986.
5. Bassiri N, Reda E G, James, T: *Actinomyces odontolyticus* toracopulmonary infections. *Chest*, **109**(4):1109-1111, 1996.
6. Bhave AA, Thirunavukkarasu K, Gottlieb DJ, Bradstock K: Disseminated nocardiosis in a bone marrow transplant recipient with chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant*, **23** (5): 519-21, 1999.
7. Bailey, Scott's, Forbes B A, Sahm D F, Weissfeld A S. **Diagnostic Microbiology**. Tenth Edition, 673 –685. 1998.
8. Boiron P, Locci R, Goodfellow M, Gumaa SA, Isik K, Kim B, McNeil MM, Salina Carmona MC, Shojaei H: Nocardia, nocardiosis and mycetoma. *Medical Mycology*, **36** Suppl. 1: 26-37, 1998.
9. Bonifaz A. **Micología Médica Básica**. 1ª. edición. 3ª. Reimpresión. Mendez editores. 135-168, 381-393. 1998.
10. Calne DB. **Neurodegenerative diseases**. W. B. Saunders Company. 319-338. 1996
11. Cardona-Carrillo M, M. C. Bravo Monroy, E. García-Ramos, M. Kichick Tello: Estudio histológico de *Actinomyces sp.* En amigdalitis crónicas presentes de niños. *Rev Lat-amer Microbiol*, **28**: 1-8, 1986.
12. Carriere C, Marchandin H, Andrieu JM, Vandome A, Pérez C: Nocardia thyroiditis: unusual location of infection. *J Clin Microbiol*, **37**(7): 2323-5, 1999.
13. Coppens L, Ibebeke B, Widelec J, Lustman F: Muscular actinomycosis in the back. *Acta Clin. Belg*, **51** (2): 94-6, 1996.
14. Champoux James J, Laurence Corey, F C Neidhardt, J J Plorde, C G Ray, K J Ray. **Microbiología médica. Introducción a las enfermedades infecciosas**. Ediciones DOYMA. 523-526, 917-924, 1993.
15. Ellerbroek P, Kuipers S, Rozenberg AM, Verdonck LF, Petersen EJ: *Oerskovia xanthineolytica*: a new pathogen in bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, **22**(5): 503-5, 1998.
16. Fiorino A S: Intrauterine contraceptive device-associated actinomycotic abscess and *Actinomyces* detection on cervical smear. *Obstet Gynecol*, **87**:1: 142-148, 1996.
17. Freeman, Bob A. **Microbiología de Burrows**. 22ª edición. Editorial Interamericana, Mc Graw-Hill. México, D. F.. 1001-1008. 1989.
18. Funke G, G von A, C J E, B K A: Clinical Microbiology of Coryneform bacteria. *Clin Microbiol Rev*, **10**(1): 125-159, 1997.

19. García-Ramos E, Giono S, Cicero-Sabido R: Estudio de la flora aeróbica y aneróbica de pacientes con afecciones respiratorias. *Rev Inv Salud Pública (México)*, **36**: 71-85, 1976.
20. García-Ramos E, M Kichick-Tello, J Orozco, R Caballero, Cardona-Carrillo: Aislamiento de *Actinomyces* sp. y otros microorganismos a partir de 40 amígdalas hipertróficas en niños. *Rev Lat-amer Microbiol*, **26**: 251-260, 1984.
21. García-Ramos E, Herrera-Ovalle N, Garza-Garza D, Rosas-Sandoval G, Rico-M G, Nuñez N: Infecciones respiratorias: agentes etiológicos. *Rev Inst Nal Enf Resp Méx*, **9**(4): 253-263, 1996.
22. García Ramos en: **Infecciones respiratorias agudas y crónicas**. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos "Dr. Manuel Martínez Baez" México, D. F.. 527-534.1994.
23. García-Ramos E, Hernández Méndez T: **Manual para aislamiento e identificación de bacterias anaerobias**. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. I.P.N. México, D. F.. 1988.
24. Garland S M, Leslie D E: Comparison of immunofluorescence and culture for the detection of *Actinomyces israelii* in wearers of intra-uterine contraceptive devices. *J Med Microbiol*, **35**: 224-228, 1991.
25. Hovi L, Saarinen UM, Donner U, Lindquist C: Opportunistic osteomyelitis in the jaws of children on immunosuppressive chemotherapy. *J Pediatr Hematol Oncol*, **18** (1):90-4, 1996.
26. Ieven M, Verhoeven J, Gentens P, Goossens H: Severe Infection due to *Actinomyces bernardiae* case report. *Clin Infect Dis*, **22** (1): 157-8, 1996.
27. Jassem E, Kedzia A, Rek M, Wolska Goszka L, Szelezynski K: Occurrence of non spore forming anaerobic bacteria in the upper airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Med Dosin Mikrobiol*, **48** (1-2): 49-54, 1996.
28. Jawetz E, J L Melnick, E A Adelberg. **Microbiología médica**. Decimoquinta edición. Editorial Manual Moderno. México, D. F.. 681-683. 1996.
29. Jousimies-Somer H: Recently described clinically important anaerobic bacteria: Taxonomic aspects and Update. *Clin Infect Dis*, **25** (Suppl 2): S78-87, 1997.
30. Kasano Y, Tanimura H, Yamave H, Hayashido M, Umamo Y: Hepatic actinomycosis infiltrating the diaphragm and right lung. *Am J Gastroenterol*, **91** (11) 2418-20, 1996.
31. Koneman E W, Janda W M, Allen S D, Sommers H M, Dowell V R, Winn W C. **Diagnóstico microbiológico**. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. 488-543. 1997.
32. Kron C, Camaraso P, Kron B: Abdomino pelvic actinomycosis. Apropos of 2 clinical cases. *Chirurgie*, **121** (5): 346-8; discussion 349, 1996.
33. López Mtz R, Méndez Tovar L J, Hdz Hdz F, Castañón Olivares R. **Micología Médica. Procedimiento para el diagnóstico de laboratorio**. Edit. Trillas. 1995.
34. Murray P R, Baron E J, Tenover F C, Tenover F C. **Manual of clinical Microbiology**. 7th Edition. ASM Press. 370-392. 1999.
35. Nishiuchi Y, Baba T, Hotta HH, Yano I: Mycolic acid analysis in *Nocardia* species. The mycolic acid compositions of *Nocardia asteroides*, *N. farcinica* and *N. nova*. *Microbiol Methods*, **37** (2): 111-22, 1999.

36. Nugteren S K, Ouwendijk R J, Jonkman J G, Straub M, Dees A: Colitis and lower abdominal mass by *Actinomyces israelii* in a patient with an IVD. *Neth J Med*, **49**(2):73-6, 1996.
37. Ormsby AH, Baver TW, Hall GS: Actinomycosis of the cholecystic duct; case report and review. *Pathology*, **30** (1): 65-7, 1998.
38. Ortiz-Ortiz L, Bojalil L F, Yakoleff V. **Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes**. Academic Press, Inc.. Orlando, Florida. 1984.
39. Provost F, Blanc MV, Beaman BL, Boiron P: Occurrence of plasmids in pathogenic strains of *Nocardia*. *J Med Microbiol*, **45**: 344-348, 1996.
40. Pumarola A, A Rodríguez Torres, J A García-Rodríguez, G Piedrola-Angulo. **Microbiología y parasitología médica**. 2ª edición. Ediciones Científicas y técnicas, S. A. Masson y Salvat medicina, 502-505.
41. Sakellariou P L: Periapical actinomycosis: report of a case and review of the literature. *Endod-Dent. Traumatol*, **12** (3):151-4, 1996.
42. Salinas Carmona MC, Torres López E, Ramos AI, Licon Trujillo A, Gonzalez Spencer D: Immune response to *Nocardia brasiliensis* antigens in an experimental model de actinomicetoma in BALB/c mice. *Infect Immun*, **67** (5): 2428-32, 1999.
43. Sandoval y Trujillo AH. **Manual de identificación, diagnóstico de actinomicetos patógenos**. UAM-X, México, D.F.. 1996.
44. Shigeo S, Tamaki M, Tokuya S, Hiroyuki M, Mariko I, Kunihiko I, Kenji O, Kosei M: Hepatic actinomycosis: Case report and review of the literature in Japan. *J. gastroenterol*, **32**(5): 672-6, 1997.
45. Slack JM, Gerencser MA. **Actinomyces, Filamentous Bacteria. Biology and Pathogenicity**. Burgess Publishing Company, 1975.
46. Steingrube VA, Wilson RW, Brown BA, Jost KC, Blacklock Z, Gibson JL and Wallace Jr. RJ: Rapid Identification of Clinically Significant Species and Taxa of Aerobic Actinomycetes, Including *Actinomadura*, *Gordona*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* and *Tsukamurella* Isolates by DNA Amplification and Restriction Endonuclease Analysis. *Clin Microbiol*, **35** (4): 817-822, 1997.
47. Taniguchi H, Mukae H, Ashitoni J, Ihi T, Sakamoto A, Kohnos, Matsukura S: Pulmonary *Nocardia otitidiscaviarum* infection in a patient with chronic respiratory infection. *Intern Med*, **37** (10): 872-6, 1998.
48. Tolentino A, Ahkee S, Ramírez J: Pancoast's syndrome secondary to thoracic actinomycosis. *J Ky Med Assoc*, **94** (11) Nov: 500-2, 1996.
49. Warren N G: Actinomycosis, nocardiosis and actinomycetoma. *Dermatol Clin*, **14**(1):85-95, 1996.
50. Willard Rippon J. **Micología Médica Hongos y Actinomicetos Patógenos**. 3ª. De. Interamericana Mc GrawHill. 1-58. 1990.
51. Willett H P, Wolfgang K, Joklik, D B Amos, C M Wilfert: **Zinsser Microbiología**. 20ª edición. Editorial médica panamericana. Buenos Aires, Argentina, 1996.