

Identificación y diagnóstico de Actinomicetales patógenos

**Universidad de Los Andes
Autoridades Universitarias**

Léster Rodríguez Herrera
Rector

Humberto Ruiz Calderón
Vicerrector Académico

Mario Bonucci R.
Vicerrector Administrativo

Nancy Rivas de Prado
Secretaria

Publicaciones del Vicerrectorado Académico

Director
Humberto Ruiz Calderón

Editor
Luis Ricardo Dávila

Consejo Editorial
Tomás Bandes, Asdrúbal Baptista, Rafael Cartay,
Mariano Nava, Stella Serrano, Gregory Zambrano

Colección Ciencias de la Salud
Comité Editorial
César Colosante, Diego Dávila Spinetti, Patricio Jarpa,
Sabino Melonasina, Jesús Alfonso Osuna Ceballos

Identificación y diagnóstico de Actinomicetales patógenos

**José Antonio Serrano
A. Horacio Sandoval y Trujillo**



**Publicaciones del Vicerrectorado Académico
Colección Ciencias de la Salud**

**Publicaciones del Vicerrectorado Académico
Colección Ciencias de la Salud**

**Título de la obra:
Identificación y Diagnóstico de Actinomicetales Patógenos**

**©Editores
José Antonio Serrano
A. Horacio Sandoval y Trujillo**

Primera edición, 2005

**Producción editorial
Publicaciones del Vicerrectorado Académico
Universidad de Los Andes**

**Diseño de portada
Kataliñ Alava**

**Impresión
Editorial Venezolana C. A.
Mérida Venezuela
Telf. 0274-2638308**

**Hecho el Depósito Legal
Depósito Legal: LF 23720047922837
ISBN: 980221399-3**

**Dirección
Universidad de Los Andes
Av. 3 Independencia, Edificio Central del Rectorado
Mérida, Venezuela
viceacad@ula.ve
<http://viceacademico.ula.ve>**

Con la colaboración de:

Blaine Beaman.
Departamento de Microbiología e Inmunología.
Universidad de California. Davis. CA. EE.UU.

Enrique García.
Departamento de Microbiología.
Facultad de Farmacia.
Universidad de Los Andes.
Mérida. Venezuela.

George Brownell.
Medical College of Georgia.
Augusta GA. EE.UU.

Hugo Ramírez Saad.
Departamento de Sistemas Biológicos
Universidad Autónoma Metropolitana – Xochimilco.
México

Mario César Salinas Carmona
Facultad de Medicina y Hospital Universitario Dr. José E. González
Universidad Autónoma de Nuevo León
Monterrey, NL México

Martin Embley
Natural History Museum.
Londres. Reino Unido.

Michael Goodfellow.
Universidad de Newcastle.
Newcastle upon Tyne. Reino Unido.

Patrick Boiron.
Facultad de Farmacia
Université Claude Bernard, Lyon I
Lyon, Francia

Thuioshi Ioneda.
Universidad de São Paulo. Brasil.

Índice

PRÓLOGO	13
CAPÍTULO 1	
LOS ACTINOMICETOS	15
BIOLOGÍA DE LOS ACTINOMICETOS DE IMPORTANCIA MÉDICA Y ORGANISMOS RELACIONADOS	19
Actinomyces	19
<i>Actinomyces bovis</i>	
<i>Actinomyces israelii</i>	
<i>Actinomyces naeslundii</i>	
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	
<i>Actinomyces viscosus</i>	
<i>Actinomyces pyogenes</i>	
<i>Actinomyces denticolens</i>	
<i>Actinomyces lowelii</i>	
<i>Actinomyces hordeovulneris</i>	
<i>Actinomyces meyeri</i>	
Corynebacterium	28
<i>Corynebacterium bovis</i>	
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	
<i>Corynebacterium pseudodiphthericum</i>	
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	
<i>Corynebacterium xerosis</i>	
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	
<i>Corynebacterium striatum</i>	
<i>Corynebacterium renale</i>	
<i>Corynebacterium cystitidis</i>	
<i>Corynebacterium pilosum</i>	
<i>Corynebacterium mycetoides</i>	
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	
<i>Corynebacterium iranicum</i>	
Mycobacterium	40
<i>Mycobacterium africanum</i>	
<i>Mycobacterium avium</i>	
<i>Mycobacterium bovis</i>	
<i>Mycobacterium flavescens</i>	

Mycobacterium fortuitum
Mycobacterium gastri
Mycobacterium gordonae
Mycobacterium intracellulare
Mycobacterium kansasii
Mycobacterium leprae
Mycobacterium lepraemurium
Mycobacterium marinum
Mycobacterium microti
Mycobacterium nonchromogenicum
Mycobacterium paratuberculosis
Mycobacterium phlei
Mycobacterium scrofulaceum
Mycobacterium simiae
Mycobacterium smegmatis
Mycobacterium terrae
Mycobacterium triviale
Mycobacterium tuberculosis
Mycobacterium ulcerans
Mycobacterium vaccae
Mycobacterium xenopi
Mycobacterium malmolense
Mycobacterium shimoidei
Mycobacterium asiaticum
Mycobacterium szulgai
Mycobacterium haemophilum
Mycobacterium farcinogenes
Mycobacterium chelonae
Mycobacterium senegalense
Mycobacterium porcinum

Nocardia..... 73

Nocardia asteroides
Nocardia brasiliensis
Nocardia farcinica
Nocardia otitidiscaviarum (N.caviae)
Nocardia rhodnii
Nocardia rugosa
Nocardia transvalensis

Streptomyces..... 83

Streptomyces paraguayensis
Streptomyces somaliensis

Actinomadura	85
<i>Actinomadura madurae</i>	
<i>Actinomadura pelletieri</i>	
<i>Actinomadura latina</i>	
Faenia	87
<i>Faenia reactivirgula</i>	
Geodermatophilus	89
<i>Geodermatophilus obscurus</i>	
Dermatophilus	91
<i>Dermatophilus congolensis</i>	
Rhodococcus	93
<i>Rhodococcus bronchialis</i>	
<i>Rhodococcus equi</i>	
<i>Rhodococcus sputi</i>	
<i>Rhodococcus aichiensis</i>	
<i>Rhodococcus auranticus</i>	
<i>Rhodococcus chubuensis</i>	
<i>Rhodococcus obuensis</i>	
Nocardiopsis	97
<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	
CAPÍTULO 2	
EL MICETOMA	103
Aspectos serológicos e inmunológicos del Micetoma	
Situación inmunológica del paciente con Micetoma	
Inmunidad no específica: Interacción fagocito-nocardia	
Inmunidad mediada por células	
Inmunidad humoral	
Conclusiones	
CAPÍTULO 3	
SENSIBILIDAD DE <i>Nocardia</i> A LOS ANTIBIÓTICOS	121
CAPÍTULO 4	
MORFOLOGÍA DE LAS ESPECIES INCLUIDAS EN EL GRUPO	
NOCARDIOFORMES Y TAXONES RELACIONADOS	129
<i>Nocardia asteroides</i>	

Nocardia brasiliensis
Nocardia caviae
Saccharopolyspora brevicatena
Rhodococcus rhodochrous
Micropolyspora brevicatena
Micropolyspora faeni
Faenia reactivirgula
Actinomadura madurae
Actinomadura pelletieri
Actinomadura roseoviolacea
Actinomadura verrucospora
Nocardiopsis dasonvillei

CAPÍTULO 5

TÉCNICAS PARA EL AISLAMIENTO Y DIAGNÓSTICO
 DE ACTINOMICETOS PATÓGENOS..... 137

CAPÍTULO 6

CITOQUÍMICA DE ACTINOMICETOS..... 157

Análisis celular total de Actinomicetos.

Azúcares

Aminoácidos.

Análisis de la pared celular de Actinomicetos.

Método de Braun y Sieglin para purificar pared celular.

Método rápido para la demostración de ácidos micólicos.

Preparación de polisacáridos para pruebas de precipitación

Según Zamora, Bojalil y Bastarrachea (1962)

Procedimiento de extracción de ácidos micólicos y ácidos

Grandes de cadena corta.

Cromatografía bidimensional de ácidos micólicos.

Purificación de ácidos grasos.

Lípidos polares y menaquinonas.

Cromatografía bidimensional de lípidos polares.

Purificación de menaquinonas.

Cromatografía de capa fina en fase reversa de las menaquinonas.

CAPÍTULO 7

LÍPIDOS DE ACTINOMICETOS 181

CAPÍTULO 8

LA RESPUESTA INMUNE DE PACIENTES CON ACTINOMICETOMA
 Y EL DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE INFECCIONES
 POR NOCARDIA BRASILIENSIS 195

CAPITULO 9	
DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DE ACTINOMICETOS PATÓGENOS BASADOS EN TÉCNICAS MOLECULARES	203
CAPÍTULO 10	
PRINCIPIOS DE TAXONOMÍA NUMÉRICA.	219
Procedimientos operacionales.	
Análisis de grupo.	
Determinación de grupos (Faena).	
APÉNDICE	
FÓRMULAS DE LOS MEDIOS DE CULTIVO PARA AISLAMIENTO Y CRECIMIENTO DE ACTINOMICETALES	229
PREPARACIÓN DE COLORANTES MÁS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO DE LOS ACTINOMICETALES	239
TÉCNICAS DE TINCIÓN	242

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.1 Clasificación de actinomicetos	17
TABLA 1.2 Prueba de Shick	32
TABLA 1.3 Corynebacterias patógenas encontradas en especímenes clínicos....	34
TABLA 1.4 Micobacterias patógenas encontradas en especímenes clínicos.....	43
TABLA 1.5 Tabla comparativa de lepra tuberculoide y lepra lepromatosa.....	53
TABLA 2.1 Agentes etiológicos de micetoma.....	104
TABLA 2.2 Actinomicetos patógenos encontrados en especímenes clínicos.....	105
TABLA 2.3 Morfología de los granos producidos por diferentes especies de actinomicetos aeróbicos	107
TABLA 2.4 Morfología de los granos producidos por diferentes especies de actinomicetos aeróbicos	108
TABLA 3.1 Sensibilidad de <i>N.asteroides</i> a diversos antibióticos.....	125
TABLA 3.2 Esquema de identificación presuntivo de nocardias	126
TABLA 5.1 Características para diagnóstico y diferenciación entre organismos de los géneros <i>Mycobacterium</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Nocardia</i> y <i>Actinomadura</i>	145
TABLA 5.2 Características bioquímicas y fisiológicas útiles para la determinación de <i>Nocardia</i> , <i>Actinomadura</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Dermatophilus</i> , <i>Actinomyces</i> y <i>Corynebacterium</i>	146
TABLA 5.3 Características que distinguen cepas de <i>Nocardia</i> en el medio de Schaall (1974).....	147
TABLA 5.4 Características diferenciales de las especies del género <i>Actinomyces</i> y bacterias relacionadas.....	148
TABLA 5.5 Propiedades diferenciales entre los organismos de los géneros nocardioformes.....	149
TABLA 6.1 Tipos de pared celular en algunos actinomicetos.....	158
TABLA 6.2 Clasificación de peptidoglicanas.....	159
TABLA 6.3 Patrones de fosfolípidos en actinomicetos.	160
TABLA 6.4 Fosfolípidos de diagnóstico.....	160
TABLA 6.5 Principales componentes de la pared celular.	161
TABLA 6.6 Lípidos de actinomicetos.	163
TABLA 7.1 Ejemplo de ácidos grasos encontrados en rodococos, Nocardias y Micobacterias.	190
TABLA 7.2 Ejemplos de ácidos micólicos.....	191
TABLA 7.3 Relación entre la longitud de la cadena hidrocarbonada y los microorganismos.	191
TABLA 7.4 Ésteres de ácidos grasos.....	192
TABLA 7.5 Grupos funcionales presentes en los ácidos micólicos	193
TABLA 7.6 Ejemplos de micobacterias y la ocurrencia de ácidos micólicos...	194
TABLA 8.1 Gel de corrimiento.....	201
TABLA 8.2 Gel concentrador	201

PRÓLOGO

Esta nueva edición del manual “Identificación y Diagnóstico de Actinomicetos Patógenos”, usado internacionalmente como texto de referencia en el laboratorio clínico para el estudio de los actinomicetales patógenos, como en las ediciones anteriores, resulta del esfuerzo que en forma conjunta realizan los profesores-investigadores del Grupo Internacional de Investigaciones sobre los Actinomicetales Patógenos(GIIAP).

Este grupo se constituyó en el año 1980, con motivo del primer curso internacional sobre actinomicetales, que fue dictado en la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela y fue durante la realización de este curso, cuando se decidió escribir un libro de texto en español que pudiera ser utilizado durante los siguientes talleres. Estos cursos de carácter internacional fueron dictados en Mérida (1980-1990) y en la Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco, México, (1990-1996) como resultado de estos cursos se presenta hoy la octava edición del manual, edición la cual constituye un esfuerzo conjunto de la Universidad de Los Andes y de la Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco de México.

Esta iniciativa de trabajo de docencia e investigación sobre los actinomicetos patógenos tiene su origen en la ciudad de Mérida, en la Universidad de Los Andes, cuando se realizó en agosto de 1974, la primera Conferencia Internacional sobre la Biología de Nocardiae, conferencia la cual dio origen a la realización de otras reuniones similares y sucesivas a esta, hasta ahora realizadas en los siguientes países: Polonia, Alemania, México, Hungría, Rusia, Corea del Sur, EE.UU, Japón, China, Canada y Australia.

De este esfuerzo han resultado numerosas publicaciones y asimismo se ha generado un activo intercambio de estudiantes tanto de pre como de postgrado, en particular entre, Brasil, Francia, México, Reino Unido y Venezuela, y, de una manera muy especial entre los laboratorios de los investigadores miembros del GIIAP.

DR. JOSÉ ANTONIO SERRANO
Universidad de Los Andes
jacielo@cantv.net

DR. A. HORACIO SANDOVAL Y TRUJILLO
Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco
hsandov@correo.xoc.uam.mx

Abril 2005
Venezuela-México.

CAPÍTULO 1

LOS ACTINOMICETOS

Los Actinomicetos son bacterias gram positivas que generalmente en algún momento de su ciclo de crecimiento desarrollan células filamentosas, ramificadas que fragmentan en elementos cocoides y/o bacilares.

Los géneros dentro de este grupo son muy diversos e incluyen algunos patógenos para animales y el hombre. Los más importantes de estos son los llamados corineformes y nocardioformes y que incluyen los siguientes géneros: *Corynebacterium* (*C.diphtheriae*), *Mycobacterium* (*M.tuberculosis*), *Nocardia* (*N.asteroides*, *N.otitidiscaviarum*, *N.brasiliensis*), *Rhodococcus* (*R.equi*), *Gordona*, *Tsukamurella* y *Actinomadura* (*A. madurae*).

Otros géneros importantes son: *Streptomyces* y *Dermatophilus*, así como los actinomicetos anaerobios: *Actinomyces*, *Arachnia* y *Rothia*.

Aunque estos microorganismos han sido asociados con países subdesarrollados del área tropical y subtropical del mundo, con frecuencia variable, todos estos géneros han sido encontrados en países desarrollados como Estados Unidos, Europa y Asia.

En el caso del Brasil, Venezuela, México y el resto de Latinoamérica, así como en algunos países africanos y en la India por el número de infecciones que se presentan anualmente se pueden considerar problemas importantes de salud pública.

Por muchos años los principales esfuerzos se han enfocado en estudiar las enfermedades causadas por *Nocardia*, así como entender sus mecanismos de patogenicidad. Dado que *Nocardia* y *Mycobacterium* están filogenéticamente muy relacionados, se espera que los modelos experimentales desarrollados para uno de los géneros puedan servir para explicar el comportamiento del otro, además de que ambos microorganismos pueden causar enfermedades muy parecidas en el humano, caracterizadas por una enfermedad pulmonar crónica que se puede diseminar hasta otros órganos del cuerpo.

Las nocardias se diferencian de las micobacterias por que tienden a causar infecciones piogénicas con formación de abscesos, mientras que *Mycobacterium* generalmente induce una respuesta granulomatosa, aunque bajo ciertas condiciones las nocardias también inducen el desarrollo de granulomas. Otra diferencia que encontramos entre estos dos géneros es que aunque *M.tuberculosis* y *N.asteroides* pueden invadir el sistema nervioso central, *M.tuberculosis* causa preferentemente meningitis; mientras que *Nocardia* causa lesiones cerebrales, en algunos casos de tipo crónico degenerativo.

Por otro lado, a diferencia de *M.tuberculosis* y *N. asteroides*, las demás especies de

Nocardia prefieren las regiones más frías del cuerpo causando serias lesiones dérmicas (nocardiosis cutánea) o micetomas cuando también se involucran músculo y hueso. Consecuentemente, las enfermedades causadas por *Nocardia* se asemejan mucho a las causadas por *M.leprae*, especie a la que también están estrechamente relacionadas filogenéticamente. En Brasil México y Venezuela los micetomas causados por *N.brasiliensis* y la tuberculosis causada por *M.tuberculosis* representan, entre otros, serios problemas de salud pública que requieren urgentemente, atención por parte de las autoridades sanitarias y también de las instituciones encargadas de la formación del personal que constituirá los equipos de salud.

Es evidente que la clave para un tratamiento exitoso de estas enfermedades depende de un diagnóstico certero y temprano, seguido por el manejo y cuidado apropiados del paciente. Las infecciones causadas por actinomicetos, por lo general, son difíciles de diagnosticar, en parte porque se supone que son **infecciones raras** y por lo tanto los laboratorios de diagnóstico no están preparados para efectuar su identificación además, estos microorganismos pueden dar cuadros clínicos no bien definidos, además de crecer lentamente en los medios de cultivo y en las que las pruebas usadas para su identificación tardan a veces hasta uno o dos meses en producir resultados; como consecuencia las infecciones causadas por actinomicetos, generalmente, no son diagnosticadas a tiempo y con frecuencia sólo son reconocidas durante la autopsia.

Paradójicamente se ha establecido que estas infecciones responden mejor a la terapia si se tratan de al inicio de las misma, de donde se desprende que el diagnóstico a tiempo es clave para que el tratamiento sea exitoso y se garantice la cura.

El buen diagnóstico de las infecciones por actinomicetos requiere, para empezar, de dos condiciones; que el laboratorio considere la posibilidad de encontrar un actinomiceto en la muestra y por lo tanto esté preparado para ello, y la habilidad clínica del médico que le haga sospechar de la presencia de un actinomiceto involucrado en el proceso infeccioso de su paciente. Así, médico y laboratorio, entrenados en la búsqueda de estos microorganismos seguramente harán un diagnóstico acertado.

Con el entrenamiento y la información provista por este libro, los integrantes del equipo de salud estarán capacitados para reconocer y diagnosticar infecciones causadas por actinomicetos. Esta formación adecuada puede ayudar a salvar vidas e incrementar los niveles de salud de las comunidades de campesinos, particularmente las marginadas, en donde se encuentra la incidencia más alta de micetomas y otras infecciones por actinomicetos.

TABLA 1.1 CLASIFICACIÓN DE ACTINOMICETOS		
FAMILIA	CARACTERÍSTICAS	GÉNERO
Actinomycetaceae	Filamento ramificado con fragmentos. Sin micelio aéreo. Paredes celulares variables que incluyen tipo V y VI.	<i>Actinomyces</i> <i>Agromyces</i> <i>Arachnia</i> <i>Bacterionema</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Rothia</i>
Actinoplanaceae	GRUPO A Sin micelio aéreo. Pared celular tipo II. Zoosporas en vesícula (esporangio).	<i>Actinoplana</i> <i>Ampullariella</i> <i>Dactylosporangium</i>
	GRUPO B Micelio Aéreo Pared celular tipo III Esporas con motilidad o sin ella, formadas dentro de vesículas (esporangio)	<i>Planobispora</i> <i>Planomonospora</i> <i>Spirillospora</i> <i>Streptosporangium</i>
Dermatophilaceae	Micelio dividido en todos los planos, sin micelio aéreo. Pared celular tipo III. Forma elementos móviles (zoosporas).	<i>Dermatophilus</i> <i>Geodermatophilus</i>
Frankiaceae	Simbióticas obligadas, formando nódulos en raíces de plantas no leguminosas que pueden fijar nitrógeno.	<i>Frankia</i>
Micromonosporaceae	Únicamente micelio vegetativo. Pared celular tipo II Forma esporas individuales, sensibles al calor.	<i>Micromonospora</i>
Mycobacteriaceae	Crecen como bacilos, filamentos ramificados, ocasionalmente con micelio rudimentario. Fuertemente ácido resistente. Pared celular Tipo IV. Alto contenido en lípidos que incluye ácidos micólicos.	<i>Mycobacterium</i> <i>Mycrococcus</i>
Nocardiaceae	Micelio vegetativo que fragmenta, forma ácidos nocardiomicólicos (lípidos LCN-A). Pared celular tipo IV. Se pueden formar cadenas de esporas en el micelio vegetativo y aéreo. Micelios vegetativos no fragmentados. Micelio aéreo. Aeróbios. Pared celular tipo I. Esporas presentes en micelio aéreo, pero también pueden ser observadas en micelios vegetativos. Cadenas de artrosporas formadas dentro de una vaina. Esporas principalmente no móviles	<i>Rhodococcus</i> <i>Micropolyspora</i> <i>Nocardia</i> <i>Chainia</i> <i>Elytrosporangium</i> <i>Intrasporangium</i> <i>Kitasatoa</i> <i>Microlobisporia</i> <i>Streptoverticillium</i> <i>Streptomyces</i>

TABLA 1.1 CLASIFICACIÓN DE ACTINOMICETOS (Continuación)		
FAMILIA	CARACTERÍSTICAS	GÉNERO
Thermoactinomycetaceae	Micelio aéreo y vegetativo que fragmenta. Pared celular tipo III. Forman endosporas resistentes al calor. Actualmente ya no se considera dentro de los Actinomycetales, sino dentro de la Familia <i>Bacillaceae</i>	<i>Thermoactinomyces</i>
Thermomonosporaceae	Micelio aéreo y vegetativo. Micelio vegetativo puede fragmentar. Pared celular tipo III (algunos IV) Esporas individuales, en paredes o en cadenas cortas, encerradas en vaina.	<i>Actinomadura</i> <i>Microbispora</i> <i>Microtetraspora</i> <i>Saccharomonospora</i> <i>Thermomonospora</i>
No designados	1. Micelio rudimentario, se rompe en elementos móviles. Gram negativos. 2. No forma micelio aéreo. Micelio vegetativo rompe en elementos móviles (fragmentación de esporas). Pared celular tipo IV. 3. Sin micelio aéreo. Fragmentos de micelio vegetativo, producen esporas individuales. La pared celular contiene lisina pero no ácido aspártico. 4. Micelios aéreos y vegetativos no fragmentados. Pared celular tipo IV. Esporas formadas en micelios vegetativo y aéreo. 5. Sin micelio vegetativo. Pared celular tipo I. Pedúnculos que soportan cadenas cortas de oosporas.	<i>Mycoplana</i> <i>Oerskovia</i> <i>Promicromonospora</i> <i>Pseudonocardia</i> <i>Sporichthya</i>
Fuente: Serrano, José A ,Sandoval Trujillo, A.H.. "Manual de Laboratorio para el Estudio de los Actinomycetales Patógenos". 1ª ed. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela, 1992		

BIOLOGÍA DE LOS ACTINOMICETOS DE IMPORTANCIA MÉDICA Y ORGANISMOS RELACIONADOS

Se definen como bacterias filamentosas Gram positivas que frecuentemente forman células ramificadas. Existen muchos géneros, sin embargo, únicamente discutiremos algunos de los más frecuentes asociados con enfermedades.

Actinomyces.

Corynebacterium.

Mycobacterium.

Nocardia.

Streptomyces

Actinomadura.

Faenia.

Dermatophilus.

Geodermatophilus.

Rhodococcus.

Nocardiopsis

ACTINOMYCES

Bacterias Gram positivas, no alcohol-ácido-resistentes, no mótils y no forman esporas. Pueden predominar los filamentos con verdaderas ramificaciones y las colonias son particularmente evidentes después de 18-48 horas. Las células difteroides o bacilos ramificados son comunes. Pueden ocurrir formas en “V”, “Y”, y “T”. Los filamentos de 1mm ó menos de diámetro, varían en longitud y grado de ramificación dependiendo de la cepa.

Quimiorganótrofos, los carbohidratos son fermentados con producción de ácido, pero no de gas. Los productos finales de la fermentación de la glucosa pueden incluir ácido acético, fórmico, láctico y succínico, pero no ácido propiónico.

Actividad proteolítica rara, pero si está presente es débil. No produce indol. Ureasa negativa. Algunas especies poco comunes pueden mostrar alfa y beta hemólisis de células rojas de conejo.

La peptidoglicana de la pared celular puede incluir glucosa, galactosa, ramnosa y otros desoxiazúcares. La arabinosa no está presente. El nitrógeno orgánico es requerido para el crecimiento.

Anaerobios facultativos; la mayoría son preferentemente anaeróbicos, algunas especies crecen bien aeróbicamente. El CO₂ es requerido para lograr el máximo crecimiento. Catalasa positiva o negativa.

Ciertas especies son patógenas para el hombre y/o los animales. Hay cuatro especies reconocidas como habitantes normales de la cavidad oral humana.

Especie tipo: *Actinomyces bovis* (*actinomycosis en animales*)

Actinomyces bovis

Las microcolonias en 18-24 horas sobre agar, Brain Heart Infusión (BHI) (observadas a 100x) son circulares de borde completo, planas, granulares a lisas, suaves y pueden mostrar un “núcleo” central granular denso. Cepas ocasionales pueden formar colonias filamentosas (semejantes a *A.israelii*) y algunas cepas pueden producir colonias, tanto lisas como filamentosas. Las macrocolonias producidas en 7 a 14 días sobre agar BHI o agar sangre son de 0.5 a 1.0 mm de diámetro, convexas, circulares, borde entero, opacas, blancas, butirosas con superficie lisa o granular. Algunas cepas pueden producir colonias irregulares, acumuladas, en *A.israelii* no se ha reportado micelio aéreo. No producen pigmentos. No hay hemólisis en agar sangre.

En medio líquido generalmente producen un crecimiento difuso, el cual se asienta en el fondo y tiene apariencia escamosa cuando se agita. Algunos aislamientos producen un crecimiento más viscoso; otros un crecimiento granular semejante a *A.israelii*, excepto que los gránulos son generalmente suaves y se rompen con facilidad.

No se han reportado requerimientos específicos de crecimiento, a excepción de algunas cepas que son serofílicas.

Anaerobio facultativo, crece mejor en presencia de dióxido de carbono. Crecimiento aeróbico esparcido. En tubos de agar profundo hay una zona densa de crecimiento 1 ó 2cm. existe abajo de la superficie con colonias lobuladas, suaves aisladas de la profundidad del agar. Temperatura óptima de 35°C a 37°C.

Los aminoácidos, principalmente, de la pared celular son alanina, ácido aspártico, ácido glutámico y lisina; el ácido diaminopimélico y la ornitina no están presentes.

El ácido aspártico puede estar ausente en cepas filamentosas. Los azúcares incluyen ramnosa, glucosa, manosa, fucosa y desoxitalosa (variable); la arabinosa no está presente. Sensible a penicilina, estreptomycin, tetraciclina, cefalosporina y lincomicina.

Serológicamente designado como grupo B con serotipos 1 y 2; las cepas filamentosas son predominantemente serotipo 2. Con la técnica de anticuerpos fluorescentes no hay reacción cruzada entre los dos serotipos o con otras especies de *Actinomyces*. Las técnicas de difusión de gel y aglutinación de pared celular pueden también ser usadas.

Producen la “mandíbula terrosa” en el ganado (supuestamente el hábitat principal). Infecciones similares se han descrito en cerdos, caballos y otros animales; pero las especies involucradas no pudieron ser

determinadas debido a la inadecuada descripción. No se han establecido infecciones en el hombre. Se han producido infecciones experimentales en hámsteres y ratones.

Los “gránulos de azufre” son producidos en infecciones de los animales, estos gránulos contienen un complejo polisacárido-proteína, así como óxido de calcio, pentóxido de fósforo y fosfato ácido probablemente ocurriendo como apatita pobremente cristalizada. El contenido de G + C del ADN de la cepa neotipo sugerida es 63 moles % (T_M).

Actinomyces israelii (actinomicosis humana)

La actinomicosis en el hombre, provoca una enfermedad caracterizada por una condición crónica supurativa y que se difunde periféricamente a través de los tejidos. Esta cepa representa una parte importante de la flora bucal normal. *A.israelii* crece en la superficie dental y gingival, además de que pueden asociarse con la caries dental; estos organismos son anaerobios y catalasa negativa. Las colonias forman gránulos dentro del pus. Estas colonias son generalmente de color amarillo y se denominan “gránulos de azufre”. El organismo es Gram positivo y usualmente no alcohol-ácido-resistentes.

La ramificación no se presenta en los “gránulos” formados sobre el pus; sin embargo, sobre la superficie del agar sí existe, siendo extensiva y produciendo colonias en forma de “araña”.

Las lesiones actinomicóticas usualmente contienen un gran número de bacterias mezcladas, las cuales pueden ser importantes en el inicio de la infección humana por *A.israelii*.

Existen tres zonas de mayor frecuencia de infección primaria en el hombre: cérvicofacial, torácica y abdominal.

1. La forma cérvicofacial es a menudo referida como “mandíbula terrosa” y se caracteriza por una lesión granulomatosa local, que puede estar endurecida (estos endurecimientos son muy firmes o duros) y supurativa.

Se observa la presencia de fístulas y por medio de ellas puede drenar el material supurativo. El organismo puede estar en el pus como filamentos individuales, pero generalmente se encuentra en forma dura, “gránulos de azufre” lobulados o con aristas. La lesión primaria está comúnmente presente en la mandíbula o maxilar y probablemente resulta por la extensión de regiones dañadas o traumatizadas que rodean al diente. Los organismos se pueden extender del maxilar a los huesos craneanos, meninges o cerebro. Las lesiones óseas ocurren con frecuencia.

2. La forma torácica probablemente resulta de la inhalación de los organismos de las superficies dentales o de organismos que pueden estar presentes en las cavidades amigdalinas. La actinomicosis pulmonar generalmente se desarrolla en la región hiliar o en las áreas parenquimatosas basales del pulmón con consolidación que se puede extender a través de la pleura. Las lesiones pleurales se pueden extender a través de la pared torácica y pueden involucrar a las costillas.

3. La forma abdominal frecuentemente empieza en el apéndice y puede resultar de organismos ingeridos. La forma abdominal puede producir inicialmente síntomas de “apendicitis crónica”. Las lesiones en el colon son dolorosas y tumorales. La enfermedad se puede extender al hígado y otras partes del cuerpo.

Las microcolonias de 18-24 horas sobre agar BHI (observadas a 100x) están compuestas de filamentos ramificados de longitudes variables originados de un punto singular y sin un centro denso distinto. Algunos cultivos (cepa 20/64) pueden producir colonias formadas de filamentos ramificados angulares cortos, o pequeñas colonias compactas rugosas sin filamentos en la orilla. Las macrocolonias sobre agar, BHI después de 7-14 días de incubación, son rugosas y de 0.5 y 3.0mm de diámetro. Estas colonias son circulares o irregulares, convexas, apiladas, onduladas, recortadas o lobuladas; blancas a blanco cremoso y friable o dura.

La superficie puede ser granular u ondulada produciendo colonias descritas como “diente molar”, “semejando frambuesas” o “semejando migajas de pan”. Algunas cepas producen colonias lisas, las cuales son circulares o irregulares, convexas, umbonadas o pulvinadas, enteras, opacas blanco grisáceo y blandas. Las colonias tienen una apariencia similar sobre agar sangre y no son hemolíticas.

No se han observado hifas aéreas. No hay producción de pigmentos. En medio líquido, el crecimiento es generalmente en forma de masas compactas discretas o “gránulos” de tamaño variable en un medio transparente. Algunas cepas (0 /53 del serotipo 1; 9/11 del serotipo 2) producen un crecimiento difuso y viscoso.

Los productos finales de cultivos en glucosa son los mismos para el género con la tasa de ácido láctico/ácido succínico aproximadamente 2:1.

En tubos de agar profundo no hay crecimiento en el centímetro superior y después existe una zona de crecimiento denso. Las colonias lobuladas más profundas en el agar pueden llegar a ser filamentosas. La temperatura óptima es de 35°C a 37°C.

La pared celular contiene ornitina; algunas cepas contienen cantidades apreciables de ácido aspártico, glicina y leucina. Los azúcares incluyen galactosa con sólo pequeñas cantidades de otros azúcares.

Sensible a penicilina, tetraciclina, cloranfenicol, cefalosporina y lincomicina.

Serológicamente designado como grupo D con serotipos I y II. Identificable usando la técnica de anticuerpos fluorescentes. No ocurren reacciones cruzadas con otras especies excepto a baja concentración con *A.naeslundii* y *A.viscosus*; algunas cepas tienen reacción cruzada a baja concentración con *Propionibacterium acnes*. La identificación serológica es también posible usando las técnicas de difusión en gel o aglutinación de pared celular.

Causa actinomicosis humana y ocasionalmente infecciones en ganado. Infecciones experimentales han sido producidas en hámsteres, ratones y conejos. Los “gránulos de azufre” son producidos en infecciones humanas y animales. La fuente de infección es endógena puesto que su hábitat normal es la cavidad oral del hombre incluyendo las cavidades amigdalinas y cálculos dentales.

El contenido de G + C del ADN de la cepa neotipo sugerida es 60 moles % (T_M).

En el hombre la actinomicosis puede ser distinguida de infecciones fúngicas verdaderas, tuberculosis, carcinoma, apendicitis, infecciones estafilocócicas, abscesos hepáticos y osteomielitis causados por otros organismos.

Los gránulos característicos pueden también ser vistos en otras infecciones, tales como la causada por *N.brasiliensis*. Sin embargo, la presencia de “gránulos de azufre” y organismos filamentosos ramificados Gram positivos que crecen anaeróbicamente sobre medios de cultivo, es indicativo de actinomicosis. La serología no es confiable.

La actinomicosis es una enfermedad grave que puede producir la muerte. Sin embargo, la enfermedad generalmente responde bien a la penicilina (la droga de elección). La eritromicina o la tetraciclina pueden ser sustitutos en pacientes sensibles a la penicilina. La cirugía es comúnmente necesaria para drenar los abscesos extensivos.

Frecuentemente la enfermedad no es diagnosticada sino hasta la autopsia. La frecuencia exacta de actinomicosis en general no es bien conocida; pero aparece como una enfermedad endógena esporádica que puede frecuentemente ser no diagnosticada o mal diagnosticada.

Actinomyces naeslundii

Organismo microaerófilo facultativo, puede crecer aeróbicamente en agar sangre con un medio ambiente incrementado de bióxido de carbono. Estos microorganismos pueden ser diferenciados de *A.israelii* por los requerimientos de oxígeno, morfología colonial y por no ser patógeno. Se encuentra en la boca y puede estar involucrado en la formación de cálculos dentales.

Las microcolonias en 18-24 horas sobre agar BHI (observadas a 100x) tienen una masa densa de células difteroides y filamentos enredados en su centro, rodeados en la periferia por filamentos radiados, curvados y ramificados. Ocasionalmente las colonias no son filamentosas, pero son planas y redondas con borde entero. Las macrocolonias sobre agar BHI después de 7-14 días de incubación son de 1.0 a 3.0 mm. de diámetro, convexas, redondas con margen entero o rizado, superficie lisa o finamente granular, blancas y suaves. Menos comúnmente las colonias están acumuladas o irregularmente lobuladas y pueden semejarse a la colonia “diente molar” de *A.israelii*. Una sola cepa puede producir ambos tipos de colonias; pero en subcultivos repetidos usualmente produce sólo la colonia lisa.

En medio líquido el crecimiento es generalmente como una masa floculenta hacia el tope, con algunos gránulos discretos y suaves en la parte de abajo.

La mayoría de las cepas crece aeróbicamente sobre medio sólido. La temperatura óptima es 35°C a 37°C. La pared celular contiene ornitina, glicina, leucina y ácido aspártico presentes en pequeñas cantidades. Los azúcares incluyen glucosa, manosa, ramnosa, 2-desoxitalosa y fucosa. Las sensibilidades a los antibióticos no se han reportado.

Serológicamente designadas como grupo A, con serotipos 1 y 2. Identificables usando la técnica de anticuerpos fluorescentes con reacciones cruzadas de bajo título con *A.israelii* y *A.viscosus*. Reacciones cruzadas adicionales con *A.odontolyticus* y *Arachnia propionica* usando técnicas de difusión en gel o aglutinación de pared celular.

Se han reportado infecciones humanas y han sido producidas experimentalmente en ratones, reportándose destrucción periodontal en las ratas. Su hábitat es la cavidad oral humana, incluyendo las cavidades amigdalinas y cálculos dentales.

Actinomyces odontolyticus

Aislado de caries dental profunda, representa parte de la flora normal oral. Puede crecer aeróbicamente en agar sangre, pero crece mejor anaeróbicamente o con dióxido de carbono. Las microcolonias de 24-48 horas sobre agar BHI (observadas a 100x) son generalmente lisas, completas y muchas tienen centros densos. Unas pocas cepas forman microcolonias filamentosas semejantes a la “colonia araña” de *A.israelii*. Las colonias pequeñas (alrededor de 1 mm) sobre agar sangre son circulares o irregulares, poco convexas, lisas a ligeramente granulares y enteras. Pueden producir un área de enverdecimiento alrededor de las colonias y semejan α -estreptococos.

Las macrocolonias sobre agar BHI después de 7-14 días de incubación son de 1 a 2 mm. de diámetro, circulares a irregulares, elevadas, convexas o umbonadas, lisas o granulares, enteras o irregulares, opacas, blancas y suaves.

Las cepas que producen microcolonias filamentosas pueden producir colonias maduras, rugosas semejantes a las colonias “diente molar” de *A.israelii*. Sobre agar sangre de conejo, carnero o caballo, las colonias maduras semejan a aquellas sobre agar BHI excepto que la colonia es rojo oscuro a la luz transmitida. Este pigmento puede aparecer en 2 a 14 días y puede desarrollarse mejor cuando un cultivo que crece anaeróbicamente se deja aeróbicamente a temperatura ambiente. Las colonias pigmentadas pueden ser difíciles de subcultivarse.

El crecimiento en medio líquido es generalmente uniforme y turbio pero algunas veces es floculento.

Los productos finales de cultivos en glucosa incluyen ácido acético, ácido fórmico, ácido succínico y ácido láctico.

La mayoría de las cepas requieren suero para su buen crecimiento. Algunas cepas pueden crecer aeróbicamente sobre agar sangre. La temperatura óptima es 35°C a 37°C.

La pared celular contiene ornitina. Los azúcares incluyen desoxitalosa, fucosa, galactosa, glucosa, manosa y ramnosa; la arabinosa no está presente. Los resultados están basados en cinco cepas. No se ha reportado sensibilidad a antibióticos.

Serológicamente designado como grupo E con serotipos 1 y 2. Identificable usando la técnica de anticuerpos fluorescentes con reacción cruzada de bajo título solamente con *A.viscosus*.

Reacciones cruzadas de bajos títulos se han reportado con *A.naeslundii* y *A.israelii* usando las técnicas de difusión en gel o aglutinación de pared celular.

Se le ha aislado de caries dentales profundas en humanos, pero la relación de este organismo con la enfermedad no se ha establecido. Lesiones mínimas producidas en ratones. Su hábitat normal es la cavidad bucal del hombre. El contenido de G + C del ADN de la cepa tipo es 62 moles % (T_M).

Actinomyces viscosus

Anaerobio facultativo que crece mejor añadiendo bióxido de carbono. Esta especie aislada de la cavidad oral puede ser importante en la formación de la placa subgingival y no parece ser patógena para el hombre. Las microcolonias de 18-24 horas sobre agar BHI (incubadas aeróbicamente con bióxido de carbono) tienen un centro denso con un borde filamentosos (observadas a 100x).

Después de ser transferidas varias veces, algunas cepas producirán microcolonias lisas, las cuales son circulares con una superficie altamente granular, borde entero y algunas tienen un pequeño centro ópticamente oscuro.

Las macrocolonias sobre agar BHI después de 7 días de incubación, son circulares, convexas, acumuladas, lisas, enteras, de color crema a blancas, brillosas u opacas, suaves o mucoides. Presentan micelio aéreo.

Las colonias de cepas aisladas de hámsteres a menudo tiene un orificio excéntrico cercano al borde y una apariencia granular o escarchada.

Las cepas humanas muestran varias estrías radiales o concéntricas y algunas veces depresiones centrales poco profundas. Las colonias maduras "lisas" son redondas, enteras, poco convexas, lisas y transparentes con un "núcleo" central ópticamente oscuro.

En medio líquido el crecimiento es difuso con un sedimento viscoso (variable entre cepas) el cual da una hebra mucoide o viscosa cuando se agita.

Los productos finales de cultivos que crecen en glucosa incluyen ácido láctico como producto principal con pequeñas cantidades de ácido fórmico, ácido acético y ácido succínico.

Anaerobios facultativos, crecen mejor con bióxido de carbono; se obtiene mejor crecimiento en condiciones aeróbicas con bióxido de carbono; fijan el CO₂ para formar ácido succínico.

La pared celular contiene ornitina. Los azúcares incluyen galactosa, glucosa, manosa y ramnosa. No se ha reportado sensibilidad a antibióticos. Serológicamente designado como grupo F con serotipos 1 y 2. Identificable usando la técnica de anticuerpos fluorescentes con reacciones cruzadas de bajo título con *A.naeslundii* y *A.odontolyticus*.

Las pruebas de difusión en gel muestran reacciones cruzadas con *A.viscosus*, *A.israelii* y *A.naeslundii*. La enfermedad periodontal con placa subgingival ocurre espontáneamente en hámsteres. Las infecciones experimentales han sido producidas en ratones con cepas de hámsteres, la patogenicidad para el hombre no se ha establecido. Esta especie ha sido aislada de la cavidad oral de hámsteres, rata y el hombre. El contenido de G + C de ADN de la cepa tipo es 63 moles % (T_M).

Actinomyces pyogenes

Células cocobacilares de crecimiento aerobio (sin CO₂), hidrolizan caseína, gelatina almidón, Dnasa y tween 40; en cultivos líquidos presenta formas cocoides y elementos cocobacilares, las formas bacilares son irregulares y presentan extremos turgentes y redondeados; o filamentos cortos, la respuesta tintorial al Gram es de positiva a variable, las macrocolonias en agar BHI son de 2mm ó mayores, elevadas, de márgenes enteros, opacas, de color blanco a gris-blancuesino, lisas y blandas en régimen aeróbico, crece en presencia o ausencia de CO₂, en régimen anaeróbico sólo crece en presencia de CO₂, es capaz de crecer de 30 a 36 ± 1°C; acidula, coagula y peptoniza la leche tornasolada. El perfil de pruebas enzimáticas API es positivo para Leucina arilamidasa, β-galactosidasa, β-glucoronidasa, N-acetil-β-glucosaminidasa, los cultivos de 24 h son lisados por lisozima más Succinil Dodecil Sulfato (SDS), digiere con formación de ácido el adonitol, arabinosa, celobiosa, dextrina, galactosa, glucosa, glicógeno, meso-inositol, lactosa, maltosa, manosa, ribosa, sorbitol, trealosa y xilosa, produce B-hemólisis en eritrocitos humano, de cordero y de caballo; crecen en agar BHI adicionado de NaCl 2%, bilis 5%, 10% y 20%, taurochocolate sódico 0.2%, telurito de potasio 0.01% y azida de sodio 0.005%.

Actualmente *A.pyogenes* parece ser serológicamente homogéneo, sin embargo se han observado reacciones cruzadas importantes entre esta especie y *A.odontolyticus* serovar 2.

El nicho de *A.pyogenes* es presumiblemente como comensal sobre las superficies mucosas de animales de sangre caliente, causa una variedad de enfermedades patogénicas, en muchas especies de animales domésticos y en el hombre, que incluyen: Mastitis y peritonitis en vacas, pleuritis en cerdos así como varias formas de lesiones supurativas en corderos, conejos y caballos, en el hombre puede causar faringitis aguda, uretritis y procesos supurativos cutáneos y

subcutáneos.

Actinomyces denticolens

Las microcolonias son usualmente lisas y no filamentosas, sin embargo, las microcolonias muy jóvenes pueden mostrar ocasionalmente formación de filamentos de crecimiento aeróbico (sin CO₂), reduce nitritos, hidroliza la caseína, el perfil de pruebas enzimáticas API es positivo para leucin-aril-amidasa, fosfatasa ácida, fosfamidasa, α y β -galactosidasa, α y β -glucosidasa, digiere la glucosa, meso-inositol, manitol y rafinosa con formación de ácido, en medio líquido presenta bacilos ramificados irregulares con extremos turgentes y redondeados con filamentos cortos. La respuesta tintorial al Gram es positiva, el tamaño de la macrocolonia es de 2 mm en agar BHI o menor, elevada, de bordes continuos, opaca, de blanca a gris-blancuesina o rosa pálido cuando crece en agar sangre, lisa y suave; en régimen aeróbico crece en la superficie del medio en presencia o ausencia de CO₂, en régimen anaeróbico crece débilmente sin CO₂ y crece bien en presencia de CO₂, su temperatura de crecimiento es de 36°C, reduce nitratos e hidroliza esculina. La estructura serológica y antigénica de *A.denticolens* no ha sido estudiada, sin embargo, datos preliminares obtenidos con antisueros de otras especies de Actinomyces, indican que *A.denticolens* representa una entidad serológica claramente distinta de otros miembros del género incluyendo *A.naeslundii*. El hábitat normal de *A.denticolens* es la cavidad oral del ganado vacuno, especialmente en la placa dental, no se ha reportado patogenicidad. El contenido de G + C de ADN de la especie es de 65.9 a 67.7 moles % (T_M).

Actinomyces lowelli

La morfología celular es de bacilos irregulares y filamentos cortos. Las microcolonias de *A.lowelli* no han sido descritas en detalle, las colonias maduras crecidas anaerobicamente en agar sangre de caballo son blancas, lisas, brillantes, translúcidas, de bordes completos, convexas y mayores de 2mm de diámetro. En agar BHI da colonias elevadas de transparentes a opacas, de blanco a gris-blanquecinas, lisas, suaves; en régimen aerobio (sin CO₂) da respuesta positiva a la catalasa, hidroliza la arabinosa, rafinosa, trealosa y xilosa, la respuesta tintorial al Gram es positiva, su temperatura de crecimiento es de 36 ± 1°C.

Su estructura serológica y antigénica no se ha estudiado, su hábitat normal es la cavidad oral del ganado vacuno, especialmente en la placa dental, no se ha reportado patogenicidad, el contenido de G + C del ADN es de 65.4 a 67.3 moles % (T_M).

Actinomyces hordeovulneris

Son células bacilares ramificadas irregulares con extremos turgentes, se observan cuerpos esféricos grandes y filamentos cortos y largos. Las microcolonias de *A.hordeovulneris* creciendo en agar de soya-tripticaseína o BHI adicionado con 10 a 20% de suero fetal de ternero (favorece grandemente el crecimiento), son regularmente filamentosas y similares a *A.israelii*, las colonias maduras son opacas, blancas o gris-blanquecinas, adheridas al agar y presenta forma de diente molar con tendencia a cambiar a formas cónicas, blancas, con forma de cúpula, butirosas y menos

adherentes cuando se subcultivan en laboratorio. En régimen aerobio (sin CO₂) son débilmente positivas a la catalasa, hidrolizan la esculina, celobiosa, trealosa, xilosa y débilmente la ramnosa, la respuesta tintorial al Gram es positiva, crecen en régimen aerobio o anaerobio en presencia de CO₂, su temperatura de crecimiento es de 36 ± 1°C, ligeramente positivo a la catalasa, hidroliza la esculina, arabinosa, melobiosa, rafinosa. Estudios serológicos preliminares indican que existe un cierto grado de reactividad cruzada con algunas especies de *Actinomyces* y *Rothia*. El contenido de G + C del ADN de la cepa tipo es 67 moles % (T_M).

Actinomyces meyeri

Son células cocobacilares, bacilos irregulares con extremos turgentes y redondeados o cuadrados, se observan formas esféricas grandes, filamentos cortos, puede ser difícil demostrar la presencia de ramificaciones, pueden observarse filamentos rectos o curvos, largos no ramificados cuando el medio de cultivo pierde uno o más de los componentes óptimos para el crecimiento, ocasionalmente se observan extremos turgentes, las microcolonias son lisas y no filamentosas, en agar BHI las colonias maduras tienen un tamaño de 2 mm o menor, planas elevadas de márgenes enteros, de transparentes a opacas, blancas o gris-blancuecinas, lisas y suaves. En régimen aeróbico crecen con CO₂ en régimen anaeróbico crecen en presencia o ausencia de CO₂, su temperatura de crecimiento es de 30 a 36 ± 1°C.

La respuesta al Gram es positiva o variable, el perfil de pruebas enzimáticas API es positivo para leucin-arilamidasa, valin-arilamidasa, cistin-arilamidasa, α-glucosidasa, los cultivos de 24 h. son lisados por lisozima más SDS, hidroliza con formación de ácido la amigdalina, arabinosa, glicerol, ribosa, xilosa, en agar BHI adicionado de sangre las colonias son de 1 mm o menores, circulares planas o convexas, translúcidas u opacas, blancas con superficie lisa y brillante y bordes enteros, algunas cepas pueden ser α-hemolíticas, cultivos en caldo PGY (Peptone-Glucose-Yeast extract) de 5 días de incubación sólo presenta una turbidez discreta y un sedimento ligero, tienen un pH de 4.6 a 5.0, algunas cepas tienen un requerimiento absoluto de vitamina K, y su crecimiento es fuertemente estimulado por la adición de 0.02% de tween 80 o por carbohidratos fermentables, el suero también puede estimular el crecimiento.

El principal hábitat natural de *A.meyeri* es el surco periodontal, pero se le ha aislado de abscesos cerebrales y fluido pleural y menos frecuentemente de abscesos del área cervicofacial, caderas, manos, pies y brazos, también de heridas de mordedura. El contenido de G + C del ADN de la especie tipo es de 67 moles % con una variación intraespecífica de 64.4 al 67.2 moles % (T_M).

Corynebacterium

Bacilos rectos o ligeramente curvos con segmentos irregularmente teñidos. Frecuentemente muestran dilataciones en forma de clava. La división por ruptura brusca (snapping) produce arreglos celulares angulares y en empalizada. Generalmente no móviles. Gram positivos, aunque algunas especies pierden fácilmente la tinción, especialmente los cultivos viejos; los gránulos, intracitoplásmicos de volutina, sin embargo, son fuertemente Gram positivos. No alcohol-ácido-resistentes.

La composición de la pared celular se caracteriza por la presencia de ácido meso-diaminopimélico como el ácido diaminado de la peptidoglicana y por un polisacárido que contiene arabinosa, galactosa y a menudo manosa. Son quimiorganótrofos: metabolismo de carbohidratos oxidativo-fermentativo.

No producen hemolisinas solubles, pero sobre medio sólido con sangre, puede ocurrir la lisis de las células rojas que estén en contacto con la colonia. Algunas especies patógenas producen exotoxinas.

Aeróbicos y anaeróbicos facultativos; crecen mejor aeróbicamente, a menudo con una película superficial. Catalasa positiva.

El contenido de G + C del ADN reportado varía de 52-68%; pero sí se consideran las determinaciones por T_M y densidad de flotación, solamente, la mayoría de las especies están probablemente en el rango 57-60%. Ampliamente distribuidas en la naturaleza.

Especie tipo: *Corynebacterium diphtheriae*.

***Corynebacterium bovis*.**

Sobre agar nutritivo con 0.1% de Tween 80, las colonias son blancas o cremosas, circulares con borde entero, ligeramente brillantes, con un diámetro cercano a 1 mm en 24-48 hrs. de incubación. En agar sangre de ternera no hay hemólisis.

Aerobios y facultativos, la mayoría de las cepas producen ácido de glucosa, anaeróbicamente, por la prueba de Hugh y Leiffson. Todas o casi todas las cepas fermentan glucosa, fructosa, maltosa y glicerol; hay resultados variables con arabinosa, ribosa, lactosa, trealosa, melibiosa y dextrina. Produce oxidasa y acetoina. No hidroliza el almidón o la caseína; el suero es coagulado, no licuado. Crece en caldo conteniendo 9% de cloruro de sodio. Pueden usar sales de amonio como única fuente de nitrógeno, pero la caseína hidrolizada acelera el crecimiento; 11 de 42 cepas requirieron ácido nicotínico si la caseína estaba ausente, 6 de 42 cepas tuvieron un requerimiento absoluto de ácido nicotínico.

Requiere ácidos grasos de cadenas largas insaturadas. Los azúcares de pared celular son arabinosa, galactosa y manosa; el ácido diaminado de la peptidoglicana es el meso-DAP. Encontrado en leche extraída asépticamente. Probablemente comensal de la ubre. Puede ser causa de la mastitis bovina.

Corynebacterium diphtheriae

Es el agente etiológico de la difteria en el hombre. La difteria ha sido conocida desde la época de Hipócrates, y en el pasado las epidemias producidas por esta enfermedad, diezmaron a las

poblaciones.

Sin embargo, el conocimiento necesario de la etiología y de la epidemiología de la enfermedad ha permitido un control efectivo en el mundo. La enfermedad es rara, permanece potencialmente activa, ya que el agente causal es acarreado por individuos aparentemente sanos.

Bacilos aeróbicos, Gram positivos, pleomórficos. Los organismos que crecen en suero o medio enriquecido son bacilos en forma de clava, filamentos, bacilos cortos o células con ramificaciones cortas.

La división se lleva a cabo por “ruptura brusca” y las células se separan una de otra en ángulos rectos para formar interesantes arreglos, referidos por algunos autores como “configuraciones en letras chinas”.

Produce inclusiones de fosfato (polimetafosfato inorgánico). Estas inclusiones son teñidas de rojo con azul de metileno cuando los organismos se tiñen de azul cielo o con azul de toluidina las inclusiones se tiñen de rojo a púrpura mientras que las bacterias se tiñen de verde. Por estos cambios en el color se les ha llamado gránulos metacromáticos (también llamados gránulos de volutina o cuerpos de Babes-Ernest). La presencia de estos gránulos no es un diagnóstico para *C.diphtheriae* puesto que muchas especies de *Mycobacterium*, *Nocardia* y otras bacterias también tienen estos gránulos.

Sin embargo, si el paciente tuvo la sintomatología clínica apropiada, los gránulos pueden dar un diagnóstico presuntivo para *C.diphtheriae* (deben obtenerse cultivos positivos antes de que se realice el diagnóstico definitivo). En medio de suero de Loeffler las colonias son grises, no hay producción de pigmentos.

En medio de telurito, éste es reducido produciendo colonias negras brillantes. Existen tres tipos de colonias de *C.diphtheriae* (todas son negras):

1. Gravis: grandes, lisas y secas (rugosas).
2. Mitis: medianas, elevadas y lisas.
3. Intermedius: pequeñas, elevadas y cortas

No existe correlación entre los tipos de colonias y la virulencia. La diferenciación de colonias es usada en epidemiología y diagnóstico. La reducción de telurito no es usada para diferenciar entre *Mycobacterium* y *Nocardia*.

La virulencia de *C.diphtheriae* es debida principalmente a la producción de una poderosa exotoxina. Ésta es sintetizada únicamente por organismos que portan un profago llamado fago beta. La lisogenia y conversión fágica es la conversión de cepas no toxigénicas a organismos que producen toxina por infección con el fago beta apropiado (portando el gen de la toxina).

Únicamente se produce un tipo antigénico de toxina y hay una buena respuesta inmune humoral por el huésped a esta toxina, así adquirimos una buena inmunidad de larga duración. La toxina modificada (toxóide) se usa para inmunizar personas. La producción de la toxina por la bacteria es dependiente de la concentración de hierro en el medio.

Para diagnosticar difteria se debe demostrar que el organismo produce la toxina diftérica. La toxina es una proteína con un peso molecular de sesenta y cuatro mil y está compuesta de dos subunidades.

La toxina actúa inhibiendo la síntesis de proteínas. Se enlaza e inhibe específicamente e irreversiblemente a la aminoaciltransferasa II (también llamada factor de translocación II o factor de elongación II).

Si la antitoxina es administrada al paciente en la primera hora de exposición a la toxina, la unión a la transferasa II puede ser inhibida o revertida, después de este período la antitoxina no puede revertir la unión.

Patogenicidad: el hombre es el único reservorio de este organismo.

Faringitis: la lesión inicial es en el tracto respiratorio superior. Induce un crecimiento de colonias pequeñas, las exotoxinas causan lisis celular y permiten al microorganismo que se establezca. Se forma una pseudomembrana sobre la colonia de apariencia grisácea.

Diseminación nasofaríngea: se disemina de la faringe al área nasofaríngea. Generalmente se produce una postración severa y una toxemia alta. Después de la recuperación, frecuentemente se tienen complicaciones cardíacas y neurológicas.

Difteria laríngea: puede causar completa obstrucción del conducto laríngeo y muerte por sofocación. Se debe practicar inmediatamente la traqueotomía.

Tanto la difteria nasofaríngea como la laríngea son amenazas contra la vida. Ambas pueden ser diferenciadas de: Angina de Vincent y faringitis estreptocócica. En la difteria existe fiebre moderada y no hay bacteremia.

Las cepas no tóxicas pueden también infectar al hombre. Las lesiones son atípicas, puede existir difteria cutánea (ulceraciones en la piel) o difteria ocular. El tratamiento contra la bacteria no productora de toxinas es con antibióticos. La difteria cutánea es más común en los trópicos. La difteria ocular es rara. Inmunidad y pruebas en la piel:

A. Prueba de Shick: para determinar si el individuo es inmune o no a la difteria:

1) En un brazo ponga una inyección de toxina mientras que en el otro se inyecta toxoide (la toxina tratada con formalina; tiene todos los caracteres antigénicos de la toxina pero no es tóxica).

2) El toxoide es usado en la inmunización contra la difteria.

B. Reacciones a la Prueba de Shick:

1) Reacción Positiva:

Significa que el individuo es susceptible a la difteria y que no contiene cantidades adecuadas de antitoxina circulando.

La toxina en el brazo produce enrojecimiento e inflamación, los cuales aumentan por varios días y después decaen lentamente.

El toxoide en el brazo no muestra ninguna reacción.

2) Reacción Negativa:

Toxina en el brazo no causa reacción.

Toxoide en el brazo: ninguna reacción.

3) Pseudorreacción: las reacciones de la prueba de Shick pueden ser complicadas por hiposensibilidad a materiales distintos a la toxina, contenidos en la inyección. Una pseudorreacción muestra enrojecimiento e inflamación en ambos brazos, los cuales desaparecen en el segundo o tercer día. Esta es una reacción negativa.

4) Reacción combinada: este tipo de reacción muestra enrojecimiento e inflamación en ambos sitios de inyección; el sitio de la toxina continúa siendo eritematoso mientras que el sitio del toxoide baja rápidamente. Esto denota hipersensibilidad así como relativa susceptibilidad a la toxina.

Si la prueba de Shick es negativa o existe pseudorreacción el individuo es considerado inmune: Tuvo difteria antes. Había sido inmunizado anteriormente. Si la reacción fue combinada o positiva necesita ser reinmunizado.

TABLA 1.2 PRUEBA DE SHICK				
	TOXINA RX		TOXOIDE RX	
	48 h.	120 h.	48 h.	120 h.
Pseudorreacción	+	-	+	-
Combinada	+	+	+	-
Positiva	+	+	-	-

C. Reinmunización y Prueba de Maloney:

- 1) Puede adquirir una seria hipersensibilidad con la reinmunización.
- 2) Prueba de Maloney:

Inyección intradérmica de pequeña cantidad de toxoide en el brazo para ver si hay una reacción de hipersensibilidad (enrojecimiento, inflamación, etc.)

Ninguna reacción: reinmunice.

Reacción: reinmunice lentamente en pequeñas dosis sobre largos períodos y siempre esté preparado para un shock anafiláctico.

D. Diagnóstico: El diagnóstico definitivo puede ser hecho con:

- 1) Cultivo.
- 2) Prueba positiva de toxina.

Antes de que inicie la terapia obtenga los cultivos y si se sospecha que es difteria, no espere los resultados de laboratorio, inicie el tratamiento.

E. Tratamiento de la Difteria:

- 1) Combinación de grandes dosis de antitoxinas y antibióticos.
- 2) Inyección de antitoxina:

El individuo puede llegar a sufrir un shock anafiláctico puesto que puede ser sensible al suero de caballo. Pruebe la hipersensibilidad a suero de caballo antes de dar una gran dosis de antitoxina. Si es sensible al suero de caballo, entonces aplique la antitoxina muy lentamente y tenga previsiones para un caso de shock anafiláctico. Los antibióticos de elección son penicilina y tetraciclina.

Corynebacterium kutscheri

Bacilos delgados irregularmente teñidos, a menudo en forma de clava, algunas veces con terminaciones puntiagudas, con presencia de gránulos metacromáticos.

Colonias dentadas, pequeñas, delgadas, de color blanco amarillento a blanco grisáceo sobre agar nutritivo. Crecimiento abundante sobre medio de Loeffler. Caldo turbio con sedimento, no hay película. La leche tornasolada no cambia.

Aeróbico facultativo. Produce ácido de glucosa, fructosa, maltosa, salicina, sacarosa. Reduce el telurito de potasio. De cinco cepas probadas todas aglutinaron con un suero preparado contra una de ellas. Los azúcares de la pared celular son arabinosa, galactosa, manosa, y ramnosa; el ácido diaminado de la peptidoglicana es el meso-DAP.

Este organismo parece ser parásito de ratones y ratas. Su patogenicidad para otros animales es baja, pero su resistencia a la infección se ve alterada, por ejemplo, con cortisona o dieta deficiente, desarrollando excesivas lesiones del tipo de la pseudotuberculosis, de las cuales

C.kutscheri puede aislarse. Sin embargo, el organismo no ha sido aislado hasta la fecha del tejido de animales normales no tratados.

TABLA 1.3 CORYNEBACTERIAS PATÓGENAS ENCONTRADAS EN ESPECÍMENES CLÍNICOS		
ORGANISMOS	OCURRENCIA EN EL HOMBRE	ENFERMEDAD PRODUCIDA
<i>C.diphtheriae</i>	Usualmente como patógeno	Cepas toxigénicas causan difteria
<i>C.haemolyticum</i>	Ocasionalmente patógeno	Infecciones de garganta, sangre y piel.
<i>C.ulcerans</i>	Ocasionalmente patógeno	Enfermedad parecida a la difteria
<i>C.equii</i>	Muy raramente en el hombre	Abscesos
<i>C.aquaticum</i>	Muy raramente en el hombre	Infecciones de sangre y fluido Espinal
<i>C.acnes</i>	Habitante normal	Acné e infecciones de la piel

Corynebacterium pseudodiphthericum

Bacilos cortos regulares, 0.5 - 2.0 µm por 0.3-0.5 µm, los cuales se tiñen regularmente excepto en un septo transversal medio que no se tiñe: presentan formas de clava y los gránulos metacrómicos son mínimos o ausentes. En frotis teñidos, el organismo a menudo está dispuesto en hebras con los ejes largos paralelos. Gram positivo, realmente menos decolorado que la mayoría de las corinebacterias.

Buen crecimiento en todos los medios conteniendo o no sangre o suero. Sobre agar sangre crecen colonias blancas a color crema, regulares y lisas, de consistencia butirosa.

Aeróbicos y facultativamente anaeróbicos. No producen ácido en cualquier prueba de fermentación de carbohidratos. Temperatura óptima 37°C.

Los principales azúcares de la pared celular son arabinosa, galactosa y glucosa; el ácido diaminado de la peptidoglicana es el meso-DAP. Las paredes celulares contienen un determinante antigénico común a otras corinebacterias, las cuales poseen arabinosa y galactosa como principales azúcares de la pared celular. Las células contienen ácido corinomicólico, principalmente una mezcla de C₃₂H₆₄O₃, C₃₄H₆₆O₃ y C₃₆H₆₈O₃.

Encontrados en mucosa nasofaríngea del hombre, no es patógeno. No produce toxinas.

Corynebacterium pseudotuberculosis

Apariencia muy similar a la de *C.diphtheriae*, especialmente al tipo “gravis”; bacilos

irregulares pequeños, 0.5-0.6 μm por 1.0-3.0 μm . Se tiñen irregularmente con formas de clava y gránulos metacromáticos: en micrografías electrónicas una capa granulosa densa a los electrones es observada en la parte externa de la pared celular, la cual probablemente representa el líquido tóxico de superficie descrito por Carne, Wickham y Kater (1956) y es análogo al “factor cuerda” de *M.tuberculosis*.

Sobre agar sangre las colonias son blanco amarillento, opacas, convexas con superficie mate, alrededor de 1 mm a las 24 hrs. de incubación, a menudo con una zona angosta de hemólisis alrededor de la colonia Lovell y Zaki (1966) demostraron una hemolisina extracelular en 9 de 11 cepas; la actividad hemolítica es en gran medida mejorada por productos solubles de *C.equii* y *C.renale*.

En agar sangre telurito las colonias son pequeñas, uniformemente negruzcas, poco convexas, superficie mate y más uniforme en color que *C.diphtheriae*.

El crecimiento es amarillento y friable sobre medio inclinado de Loeffler con suero después de 24 horas, no hay licuefacción. Existe crecimiento escaso en caldo con una ligera película y sedimento; en general no hay turbidez. Aeróbico y facultativo; la glucosa es fermentada, no oxidada.

Todas o casi todas las cepas, producen ácido de glucosa, galactosa, maltosa y manosa; resultados variables reportados de lactosa, sacarosa, xilosa, dextrina, arabinosa, manitol, glicerol; el almidón y la trealosa no son fermentados; sin embargo, se ha reportado que la cepa NCTC 3450 hidroliza el almidón.

La reducción de nitrato es variable; Knight (1969) reportó que cepas equinas redujeron nitrato a nitrito, mientras que las cepas ovinas no pudieron hacerlo.

Algunas cepas han sido reportadas como hidrolizadoras de la urea, v.g. NCTC 3450 y 8 cepas de abscesos crónicos en caballos. La licuefacción de la gelatina es variable. Los resultados en la literatura para fermentación y otras pruebas sobre este organismo parecen ser raramente variables, pero es difícil decir si esto es debido a diferencias en la técnica o a la variación de las cepas.

Los azúcares de pared celular son arabinosa, galactosa, glucosa y manosa; el ácido diaminado de la peptidoglicana es el meso-DAP. Los requerimientos nutricionales no son conocidos en detalle; el crecimiento aumenta mucho con la adición de sangre o suero al medio; el incremento de la concentración de bióxido de carbono puede facilitar el aislamiento primario.

Los filtrados libres de células de la mayoría de las cepas son letales a cobayos, conejos y carneros; el material tóxico puede ser toxoidificado con formalina y producirse suero antitóxico; las toxinas en bruto causan intensa exudación celular y fluído; la toxina es probablemente idéntica a la hemolisina soluble. Todas las cepas producen toxinas antigenicamente similares. Las pruebas de aglutinación con suspensiones de células intactas son generalmente imposibles, debido a la

autoaglutinación, probablemente debida a los lípidos de superficie.

Las paredes celulares contienen determinantes antigénicos comunes a especies tipo y a otras corinebacterias, teniendo como azúcares principales de pared celular: arabinosa y galactosa.

Las cepas de *C.pseudodiphtheriae* son sensibles a algunos de los bacteriófagos usados en la tipificación de *C.diphtheriae*, aunque ninguna de las cepas probadas cayó exactamente en cualquiera de los lisotipos de *C.diphtheriae*: las cepas de *C.diphtheriae* son sensibles a los bacteriofagos de *C.pseudotuberculosis*. Originalmente aislado de áreas necróticas en el riñón de carnero.

Causa linfagitis ulcerativa, abscesos y otras infecciones purulentas crónicas en carneros, cabras, caballos y otros animales de sangre caliente y ocasionalmente infecta al hombre. El contenido de G + C del ADN reportado como 52.5 moles % para una cepa. Sin embargo, Sukapure et al (1970) han reportado el contenido de la cepa 1076 como 67.5 moles %. (T_M).

Corynebacterium xerosis

Bacilos Gram positivos, de teñido irregular, ocasionalmente presentan gránulos metacromáticos y formas de clava, colonias pequeñas circulares (1mm o menos a 24h. de cultivo), sobre agar pueden ser rugosas o lisas, en cultivo líquido forma depósitos granulares con sobrenadante claro, son aeróbicos y facultativos, no produce indol, ni licua la parafina, fermenta glucosa, galactosa y sucrosa produciendo ácido pero no gas, crece bien a 22 y 37°C, generalmente reduce nitrito aunque esta propiedad es variable, requiere aminoácidos pero no vitaminas, posee algunas cadenas cortas de lípidos y ácidos micólicos.

Generalmente no patogénico, pero puede causar endocarditis o neumonía en pacientes severamente enfermos o que estén recibiendo esteroides, aunque originalmente se aisló del saco conjuntival del hombre se presume que su hábitat es la piel y las membranas mucosas del hombre. El contenido de G + C del ADN es generalmente de 55 a 57 moles % (T_M).

Corynebacterium minutissimum

Las colonias superficiales en agar sangre son menores de 1mm después de 24h. de cultivo, son circulares, ligeramente convexas, brillantes y húmedas, formadas por bacilos cortos y rectos y ligeramente curvos (1-2 x 0.3-0.6 μm) algunas células adquieren formas en "V", son Gram-positivos, aunque puede observarse tinción irregular, se observan gránulos metacromáticos, cuando crecen en medios enriquecidos, (ejem. suero fetal de bovino al 20 %) las colonias muestran color rojo coral o naranja bajo fluorescencia (luz de Wood, 365nm).

Son anaerobios facultativos, su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, la peptidoglicana de la pared celular contiene meso-DAP, arabinosa y galactosa, el contenido de G + C del ADN es de 56.4 - 58.4 moles %.

Corynebacterium striatum

Bacilos Gram positivos, pleomórficos, a menudo con forma de clava de 0.25 - 0.5 x 2 - 3µm, en cultivos viejos se encuentran formas cocoides y filamentos largos, hay presencia de gránulos metacromáticos dispuestos regularmente para dar un efecto de segmentación, inmóviles, no alcohol-ácido-resistentes, de crecimiento lento en agar, dan colonias blancas de aproximadamente 1 mm de diámetro a 48 hrs. de incubación, algunas cepas producen un pigmento amarillo-verdoso soluble en el medio, en agar sangre se observa hemólisis ligera en colonias profundas, en cultivo líquido se forma un sedimento granular fino con sobrenadante claro y no forma película en superficie, desarrolla crecimiento moderado en medio de Loeffler y no hay licuefacción.

Aerobio facultativo, fermenta glucosa, fructosa, manosa, trealosa, dextrina, glicógeno y usualmente lactosa, maltosa y almidón, aproximadamente el 50% de las cepas fermenta sacarosa y licua gelatina, no reduce nitratos ni produce indol ni acetona.

Aislado originalmente de nasofaringe humana, también se encuentra en leche de vacas con mastitis, los cultivos de 24h., son fatales para cobayos y ratones por vía intramuscular.

Corynebacterium renale

Colonias amarillas visibles a las 24 hrs. de cultivo a 37°C, crece en caldo a pH 5.4, los bacilos de 0.7 x 3.0 µm o más presentan una gran irregularidad en la tinción, a menudo con extremos puntiagudos, presentan pili escaso, fermentan glucosa, fructosa, maltosa, trealosa, dextrina y almidón, hidroliza hipurato, produce ureasa y pirazinamidasas, digiere caseína, contiene meso-DAP en pared así como arabinosa, galactosa, glucosa y manosa, el contenido de G + C de ADN es de 53 - 58 moles %, causa cistitis y pielitis en ganado vacuno.

Corynebacterium cystitidis

Bacilos Gram positivos, rectos o ligeramente curvos de 0.5 x 2.6µm a menudo ocurren en arreglo angular o en empalizada, presentan gránulos metacromáticos, numerosas fimbrias (pili) visibles con microscopía electrónica, las colonias en agar nutritivo o agar sérico son blancas, enteras, circulares y semitranslúcidas, usualmente son muy pequeñas y no son fácilmente visibles a 24h. de cultivo, no son hemolíticas en agar sangre (sangre de cordero, cobayo, conejo), en cultivo líquido se observa turbidez discreta pero no forma película, crece a 41.5°C.

Aerobios y anaerobios facultativos, tiene requerimientos complejos de vitaminas y aminoácidos, hidroliza almidón, hipurato y tween 80 pero no reduce nitratos, produce ureasa, contiene meso-DAP, galactosa, arabinosa y glucosa. El contenido reportado de G + C es de 52.6 - 53.5 moles %, causa cistitis hemorrágica severa en vacas, se aísla del prepucio de toros sanos.

Corynebacterium pilosum

Bacilos Gram positivos de 0.5 x 1.3 μ m organizados como células aisladas, en pares, a menudo en ángulo o en masas irregulares, presentan gránulos metacromáticos, gran número de fimbrias (pili) visibles en microscopía electrónica.

Las colonias en agar nutritivo o agar sérico son de color crema a amarillo pálido, enteras, circulares, opacas, de 1mm de diámetro a 24h. de cultivo, no hay hemólisis en agar sangre (sangre de cordero, cobayo, conejo), en cultivo líquido forma sedimento y película superficial, no crece a 41.5°C, pero las células permanecen viables por 30 min. a 56°C.

Aerobios y anaerobios facultativos, tienen requerimientos complejos de vitaminas y aminoácidos, reducen nitratos e hidrolizan almidón e hipurato, no hidroliza tween 80, produce ureasa. Contiene meso-DAP, arabinosa y galactosa en la pared, el contenido de G + C del ADN es de 57.0 - 60.9 moles %, originalmente aislado de orina y vagina de vacas saludables, ocasionalmente causa cistitis y pielonefritis.

Corynebacterium mycetoides

Bacilos rectos o ligeramente curvados de 1-3 x 0.3 - 0.5 μ m, algunas células se arreglan en ángulo para dar formaciones en "V", pueden encontrarse formas cocoidales, usualmente presenta coloración desigual y a menudo contienen gránulos metacromáticos, las colonias superficiales en agar sangre o agar nutritivo son aproximadamente de 1mm de diámetro después de 2 días de cultivo, son circulares, convexas con márgenes enteros, brillantes, producen pigmento amarillo, producen fosfatasa y fermentan glucosa, contienen meso-DAP, arabinosa y galactosa en pared, el contenido de G + C del ADN es de 59 moles %, se ha reportado que causa úlceras tropicales en el hombre.

Corynebacterium matruchotii

Las células son pleomórficas comprendiendo filamentos septados, no septados y bacilos, la morfología característica es de un bacilo unido a un filamento (forma de "látigo") las ramificaciones son frecuentes en condiciones aerobias y/o ácidas, son Gram positivos, no ácido-resistentes y no móviles, forman gránulos metacromáticos, la morfología de las microcolonias es similar en condiciones aerobias o anaerobias, las microcolonias son planas, filamentosas en forma de "araña", pueden presentar centros densos y estar compuestas de filamentos fragmentados, septados y no septados de longitud variada, la apariencia macrocolonial es variable, las colonias superficiales incubadas aerobíamente tienen un diámetro de 0.5 - 1.5mm, pueden ser circulares, convexas, rugosas, con márgenes enteros o filamentosos o forma irregular de "diente molar" rugoso con márgenes enteros o filamentosos en la base o pueden presentar también formas irregulares con poca convexidad y márgenes elevados abarquillados y lobulados, las tres formas coloniales son opacas, duras y adheridas al medio.

Incubadas en régimen anaerobio las colonias superficiales tienen entre 1 y 2 mm de diámetro, son filamentosas, planas con extremos filamentosos, opacas en el centro y translúcidas en el margen, duras y adheridas al medio. Son anaerobios facultativos con algunas cepas aerobias, la temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, fermentan carbohidratos, glucosa, ramnosa, maltosa, sacarosa y rafinosa, algunas cepas, salicina y dextrina produciendo ácido y algo de gas, hidrolizan almidón y en ocasiones urea, esculina e hipurato.

Producen ureasa, pirazinamidasas y reducen nitritos, presentan requerimientos complejos de vitaminas y aminoácidos.

La hemina estimula el crecimiento en condiciones anaerobias pero puede inhibirlo en condiciones aerobias, el CO₂ estimula el crecimiento en ambos regímenes de incubación, contiene meso-DAP, arabinosa y galactosa en la pared celular.

El contenido de G + C en el ADN es de 55 - 58 moles %, se le encuentra en la cavidad oral de hombres y primates particularmente en cálculos y depósitos de placa sobre los dientes.

Se han reportado algunas cepas de *Corynebacterium* fitopatógenas que se mencionan más adelante como ejemplo:

Corynebacterium iranicum

Fermenta con producción de ácido a la manosa, melexitosa, utiliza succinato, produce H₂S a partir de peptona y de Na₂S₂O₃.5H₂O, crecen en medios adicionados de NaCl a un máximo de 2%, el diaminoácido presente en la peptidoglicana es DAB, el tipo de peptidoglicana es B2 y su contenido de G + C en ADN es de 67 - 78 moles %, causa una enfermedad "gomosa" en la espiga del trigo (*Triticum aestivum*).

Las otras especies fitopatógenas reportadas son:

Corynebacterium michiganense

Corynebacterium insidiosum

Corynebacterium nebraskense

Corynebacterium sepedonicum

Corynebacterium tritici

Corynebacterium rathayi

MYCOBACTERIUM

Bacilos ligeramente curvos o rectos 0.2-0.6 por 1.0-10µm, algunas veces ramificados; es posible que se presente crecimiento filamentosos o similar a micelio pero con una ligera alteración generalmente llega a fragmentar en bacilos o elementos cocoides. Alcohol-ácido-resistentes en alguna etapa de su crecimiento son parcialmente teñidos por el método de Gram, pero generalmente se consideran Gram positivos. No forman endosporas, conidios o cápsulas, no poseen micelio aéreo visible.

El género incluye parásitos obligados, saprófitos y formas intermedias que se diferencian por sus requerimientos nutricionales.

Las cepas saprofíticas crecen sobre sustancias muy simples; otras requieren medios más complejos o suplementos para el crecimiento (micobactina) y otras no han sido cultivadas fuera de células vivas. Las especies difieren en amilasa, catalasa y otras actividades enzimáticas; todas son aeróbicas aunque de crecimiento disperso en agar en tubo, el crecimiento de algunas especies ocurren sólo en la profundidad del medio.

Contenido de lípidos de las células y especialmente de pared celular: están incluidos lípidos que poseen componentes solubles en cloroformo, ácidos micólicos (grasos), con cadenas largas, ramificadas de alrededor de 80 átomos de carbono.

Pigmento soluble raro: las colonias de algunas especies son regularmente amarillas-anaranjadas, generalmente debido a pigmentos carotenoides, la formación de los cuales pueden o no requerir exposición a la luz. La peptidoglicana de la pared celular contiene ácido meso-diaminopimélico, alanina, ácido glutámico, N-acetil-glucosamina ácido N-glicolil-murámico, arabinosa y galactosa (pared tipo IV). Las micobacterias hidrolizan el disulfato de fenoltaleína, aunque algunas especies lo hacen lentamente.

Crecimiento lento o muy lento: las colonias fácilmente visibles son producidas de inóculo diluido después de 2 días a 8 semanas de incubación a temperatura óptima, la cual puede estar cerca de los 40°C para algunas especies; pero más cercana a 30°C para otras. Aunque no se ha reconocido la división taxonómica del género con base en la tasa de crecimiento, los términos “rápido” y “lento” son utilizados por conveniencia en la identificación.

Las enfermedades incluyen tuberculosis, lepra y otros granulomas crónicos más o menos necrosantes limitados o extensivos.

Encontrados en suelo, agua, animales de sangre fría y animales de sangre caliente.

El contenido de G+C del ADN varía de 62-70 moles %.

Especie tipo: *Mycobacterium tuberculosis*.

Mycobacterium africanum

Bacilos promedio de 3µm, cuando crecen sobre medio solidificado con huevo a 37°C, las colonias son planas, difusas y rugosas. El piruvato de sodio estimula el crecimiento en medio de huevo. El crecimiento es homogéneo en medio de Dubos con tween 80, y granular en medio de Youman con suero bovino. El crecimiento en agar Lebek llega a 15mm abajo de la superficie. Resistencia a 2µg/ml de tiacetazona.

Aislado de esputo de un paciente con tuberculosis en Senegal. Es el agente de la tuberculosis humana en África tropical. En cobayos un inóculo de 0.01 a 1mg subcutáneo produce patogénesis irregular, de menor orden que *M.tuberculosis* de virulencia normal. Lesiones generalizadas aparecen alrededor del tercer mes. Virulencia limitada con inyección intravenosa de 0.01mg a conejos. En ratones, 0.5mg inyectados intravenosamente causa lesiones pulmonares y granulación considerable con 50% de muerte alrededor de los 65 días.

Mycobacterium avium

Bacilos cortos a largos, algunos filamentosos. Los inóculos diluidos sobre medio solidificado con huevo, usualmente forman colonias lisas no pigmentadas después de 7 o más días de incubación a 37°C; las colonias envejecidas pueden llegar a ser amarillentas. Sobre agar albúmina ácido oléico las colonias son planas, delgadas transparentes, lobuladas no pigmentadas. Ocasionalmente se encuentran cepas rugosas.

Produce tuberculosis en aves domésticas y otros pájaros. Los organismos causan una infección parecida a la tuberculosis en el hombre y parece estar fuertemente relacionado al bacilo de Battey del grupo III de Runyon (*M.intracellulare*).

M.avium puede ser diferenciado de *M.tuberculosis* por no producir niacina, siendo resistente a la isoniazida y por la reducción de telurito.

Experimentalmente prolifera en conejos y ratones usualmente sin tubérculos macroscópicos, produciendo una enfermedad del tipo Yersin. No patógeno para cobayos y ratas. Los serotipos de cepas de *M.avium* ocasionalmente han estado implicados en enfermedades pulmonares humanas, aunque organismos semejantes a *M.avium* que causan enfermedades humanas son generalmente similares a *M.intracellulare* y encajan en uno de los serotipos de esta especie.

Las lesiones en las reses pueden ser causadas por los serotipos de *M.avium* o *M.intracellulare*. Los serotipos de *M.avium* son altamente virulentos, el tipo II es el más consistente, y representa el patógeno de aves más común en la naturaleza; inóculos de 0.01mg matan a los pollos. Los pollos infectados con 5mg de bacilos húmedos intravenosos, mueren en 2 meses, con lesiones aparentes en el bazo y lesiones microscópicas en pulmón y bazo. La resistencia a 1-2 µg de isoniazida/ml es acompañada por la pérdida de la virulencia para los pollos. Un inóculo de 0.01mg mata a los conejos. Los inóculos de 5mg de bacilos húmedos intravenosos en conejos,

usualmente produce la muerte en 40 días con lesiones macroscópicas de bazo, y ocasionalmente pulmonares, y lesiones microscópicas de articulaciones y cubiertas de los tendones.

Los cobayos generalmente exhiben solamente lesiones locales; aunque 1mg de bacilo intravenoso puede causar alguna mortalidad en los mismos. Los ratones inoculados en forma intravenosa con 10 mg son variablemente afectados, produciendo alguna mortalidad.

Estructura antigénica: Magnusson (1962, 1967) distinguió *M.avium* de 10 micobacterias, incluyendo *M.intracellulare* por hipersensibilidad dérmica; esta técnica no distinguió entre el serotipo I y II. Aunque ocurre algún grado de reactividad cruzada, la desensibilización dérmica es efectuada solamente por antígenos homólogos.

El complejo *M. avium-M. intracellulare* ha sido reportado como uno de los principales agentes de tuberculosis (infección emergente) en pacientes con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).

El uso de intestino de cobayos sensibilizados por la técnica de Schultz-Dale diferenció *M.avium* de al menos cinco especies, incluyendo, *M.intracellulare*. Dos serotipos aglutinantes (I y II) fueron establecidos para *M.avium*; bacilos aislados de aves enfermas casi siempre caen dentro de estos tipos, con el tipo II. La causa más frecuente de infección natural de pájaros. Subsecuentemente, Marks y Col. (1969) mostraron que el tipo II podría ser dividido en dos subtipos, con alguna reacción cruzada. Estos autores propusieron que las designaciones de los serotipos I y II fueran remplazadas por tipos 1, 2 y 3. El tipo II es también el más patógeno en infección experimental de pollos. Ocasionalmente, un miembro de estos serotipos es aislado de infección humana.

Bennedsen (1968) empleando una técnica indirecta de inmunofluorescencia, encontró reacciones específicas para cada uno de los dos serotipos originales; dos reacciones cruzadas con cepas de *M.intracellulare* fueron observadas.

Estudios de inmunodifusión e inmunoelectroforesis sobre filtrados de cultivos o lisados demostraron nueve líneas de precipitados contra sueros homólogos, pero algunos representando antígenos comunes a *M.intracellulare* y *M.bovis*, seis comunes a *M.paratuberculosis* y solamente dos comunes a *M.smegmatis* y *M.marinum*.

Una línea de precipitina cuando el antígeno de *M.avium* es probado contra el antisuero de *M.tuberculosis* no coincide con ninguna línea producida con antígeno de *M.tuberculosis* contra este suero. Aislado de tubérculos en aves. Ampliamente distribuido como el agente causal de tuberculosis en pájaros y menos frecuentemente en lesiones o ganglios linfáticos de reses, cerdos y otros animales.

Raramente encontrado en el suelo o como agente etiológico de enfermedad humana. Los serotipos aviares 1 y 2 están ampliamente distribuidos a través de tres continentes al menos, aunque el nuevo tipo 3 sólo es visto en Europa.

TABLA 1.4
MICOBACTERIAS PATÓGENAS ENCONTRADAS EN ESPECIMENES CLÍNICOS

ORGANISMOS	OCURRENCIA EN EL HOMBRE	ENFERMEDAD PRODUCIDA
<i>M.tuberculosis</i>	Sólo como patógeno	Tuberculosis
<i>M.bovis</i>	Sólo como patógeno	Tuberculosis
<i>M. leprae</i>	Sólo como patógeno	Lepra
<i>M.ulcerans</i>	Sólo como patógeno	Ulcera de Buruli
<i>M.marinum (balnei)</i>	Usual como patógeno	Granuloma de Piscina
<i>M.kansasii</i>	Usual como patógeno	Pseudotuberculosis
<i>M.intracellulare</i>	Usual como patógeno	Pseudotuberculosis
<i>M.avium</i>	Usual como patógeno	Infecciones Pulmonares
<i>M.scrofulaceum</i>	A menudo no patógeno	Adenitis Cervical e infecciones de Nódulos linfáticos
<i>M.xenopi</i>	A menudo no patógeno	Infecciones Granulomatosas

Mycobacterium bovis

Bacilos cortos a moderadamente largos. En el aislamiento primario el crecimiento es muy pobre en medios que contengan glicerol, aunque cultivos repetidos permiten su adaptación para crecer en tales medios. Además, cultivos de aislamiento reciente de *M.bovis* son microaerófilos; los inóculos dispersados en el medio líquido, semisólido o agar sólido crecen en el medio pero no en la superficie, lo que lo distingue de *M.tuberculosis*, el cual es altamente aeróbico. En cultivos repetidos, *M.bovis* se adapta al crecimiento aeróbico.

Inóculos diluidos en medio de huevo producen colonias pequeñas, redondas, blancas con bordes irregulares y una superficie granular después de 21 días o más de incubación a 37°C. Las colonias sobre agar transparente-albúmina-ácido oleico son delgadas, planas, generalmente acordonadas; no fácilmente emulsificadas en ausencia de un detergente.

Las cepas usualmente pierden catalasa al adquirir resistencia a la isoniazida. Algunas cepas son resistentes al ácido para-aminosalicílico (PAS) al primer aislamiento.

Aislado originalmente de tubérculos en ganado, generalmente es más patógeno para animales que *M.tuberculosis*. Producen tuberculosis en ganado, tanto en rumiantes domésticos como silvestres, el hombre y otros primates, perros, gatos, cerdos, pericos y posiblemente algunas aves de presa. Experimentalmente es muy patógeno para conejos, cobayos y terneras; moderadamente patógeno para hámsteres, ratones, perros, gatos, cobayos y ratas; no patógeno para la mayoría de aves.

La pérdida de virulencia para cobayos y conejos así como la actividad de catalasa, es acompañada de una pérdida de sensibilidad a la isonizada como *M.tuberculosis*. Ciertas cepas aisladas de casos de lupus y escrofuloderma en el hombre tienen baja patogenicidad para animales.

M.bovis produce tuberculosis en ganado y puede ser transmitida de vacas infectadas al hombre por medio de la leche contaminada. Como consecuencia, los organismos penetran la mucosa del intestino o la orofaringe y se establecen en cualquiera de los nódulos mesentéricos o en los nódulos linfáticos cervicales.

Si los nódulos mesentéricos llegan a infectarse, entonces puede producirse una adenitis mesentérica que algunas veces es acompañada de peritonitis. Sin embargo, si la lesión aparece en los nódulos cervicales hay un ensanchamiento del cuello produciendo adenitis cervical (también conocida como “escrófula”). *M.tuberculosis* puede también ocasionalmente causar adenitis mesentérica y escrófula.

Generalmente los organismos se diseminan de estas regiones hacia el interior de los huesos o articulaciones. Si *M.bovis* es inhalado se produce tuberculosis pulmonar típica. A causa del estricto control de calidad en lecherías y debido a la pasteurización de la leche, la tuberculosis en el hombre causada por *M.bovis* (anteriormente común) es ahora verdaderamente rara.

Estructura antigénica: las tuberculinas preparadas de *M.tuberculosis* y *M.bovis* son ordinariamente indistinguibles en su acción. Wothington y Kleeberg (1967) demostraron que la desensibilización fue más específica que la sensibilización para distinguir entre especies micobacterianas, y *M.bovis* fue claramente distinguido de otras 3 especies; *M.tuberculosis* no fue incluido en este estudio. Los análisis de inmunodifusión e inmunolectroforéticos de filtrados y extractos de cultivos indicaron que *M.bovis* y *M.tuberculosis* comparten los antígenos demostrados. Cualquier diferencia observada se consideró debida a la ausencia de antígenos individuales de cepas particulares, más que relacionados a las especies.

Sin embargo, el uso de sueros absorbidos parecen permitir la distinción entre estas dos especies. El bacilo de Calmette-Guérin (BCG) se ajusta a las propiedades descritas para *M.bovis* excepto que es más atenuado en patogenicidad y crece bien sobre medios glicerinados y es usado para inmunizar contra la infección por *M.tuberculosis*.

Mycobacterium flavescens

Organismos en forma de bacilos. Los inóculos diluidos en medio solidificado con huevo, usualmente producen después de 7 a 10 días de incubación, colonias suaves, butirosas, de color anaranjado intenso, las cuales se adhieren fuertemente al medio y son difíciles de remover. Capaces de crecer de 25°C a 42°C. Aunque estos organismos tienen una tasa de crecimiento intermedia, sus actividades metabólicas y fisiológicas son más similares a las de las especies de crecimiento rápido. Aislado de tubérculos de cobayos tratados con drogas.

Mycobacterium fortuitum

Bacilos de 1.0 a 3.0 µm de longitud. Formas cocoides y bacilares cortas a largas y delgadas ocasionalmente en forma de rosario o hinchados con un cuerpo ovoide, no alcohol-ácido resistente en un extremo. En pus, formas alargadas y filamentosas con ramificación definida. De 10 a 100% de células alcohol-ácido resistente después de 5 días de incubación a 28°C, los inóculos diluidos sobre medio solidificado con huevo usualmente producen abundante crecimiento en 2-4 días.

Las colonias pueden ser lisas, suaves, butirosas, hemisféricas o ceráceas y multilobuladas o apiñándose en forma de roseta; también son comunes las colonias difusas, ceráceas, rugosas con centros acumulados.

Las colonias generalmente están coloreadas de blanco a crema, sin embargo, cuando crecen sobre medio con verde de malaquita, el colorante es comúnmente absorbido por las colonias impartiendoles un color verde. Sobre agar albúmina-ácido oléico, los tipos de colonias lisas producen colonias convexas con bordes enteros y áreas centrales oscuras. Sobre agar harina de arroz, las colonias lisas de *M. fortuitum* producen una red extensiva de filamentos periféricos.

Las variantes de colonias rugosas, tanto en agar albúmina-ácido oléico, como en agar harina de arroz, son densas y acordonadas; se han visto extensiones filamentosas en crecimiento temprano, aunque inconspicuo en colonias maduras. Capaz de crecer de 25 a 37°C. La mayoría de las cepas crecen a 40 y 22°C, pero el crecimiento a 45°C o 17°C es generalmente inhibido.

La enfermedad generalizada en cobayos, conejos y ratones es raramente vista, igual con dosis masivas de cultivos jóvenes. Lesiones locales comúnmente observadas en riñones de ratones, cobayos, conejos, monos y terneras; las lesiones del oído, producen una conducta característica, en la cual los ratones giran sobre sí mismos. Aislado de un absceso frío del hombre.

Varias cepas han sido aisladas de ganglios linfáticos así como de saliva de ganado, de enfermedades pulmonares y abscesos locales y de la rana Gia.

Encontrado en el suelo e infecciones del hombre, ganado y animales de sangre fría. Produce enfermedad pulmonar en el hombre que puede confundirse con tuberculosis.

Resistente a estreptomicina y PAS, pero muy sensible a la isoniazida. No hay droga específica de elección.

Estructura antigénica: Schaefer (1967) describió dos tipos de *M.fortuitum*.

Magnusson (1962) reportó que este organismo puede ser identificado por técnicas de hipersensibilidad dérmica. Estudios de inmunodifusión e inmunoelectroforésis apoyan la singularidad de esta especie.

Mycobacterium gastri

Bacilos moderadamente largos a largos, con septos transversales frecuentes. Los inóculos diluidos sobre medio solidificado con huevo producen colonias lisas o rugosas blancas después de 7 o más días de incubación a 37°C.

Sobre agar albúmina-ácido oléico, colonias planas, lisas o algo granulares, con márgenes regulares o ligeramente ondulados, con mancha central densa, algunas cepas rugosas. Capaces de crecer en un rango de temperatura de 25 a 40°C.

Las cepas generalmente pierden la actividad catalasa al adquirir resistencia a la isoniazida. Deja de producir enfermedad progresiva en los cobayos, pero usualmente es capaz de producir ulceración local en el sitio de inoculación intradérmica de 10^{-2} a 10^{-3} mg de bacilos.

Encontrado en el lavado gástrico humano o esputo como residentes ocasionales, no considerados como agentes etiológicos de la enfermedad. También encontrado en el suelo.

Estructura antigénica: aunque cercanamente relacionado a *M.kansasii* en términos bioquímicos, ésta especie no es aglutinada por sueros tipificadores de *M.kansasii*, el antígeno soluble en fenol no produce reacción cruzada con este suero.

Norlin y Col. (1969) encontraron una muy alta similitud entre *M.gastri* y *M.kansasii* por técnicas de inmunodifusión; tanto *M.gastri* como las cepas de catalasa débilmente positiva de *M.kansasii* carecieron de un antígeno encontrado en las cepas más comunes de catalasa fuertemente positiva de las especies posteriores.

Mycobacterium gordonae

Bacilos moderadamente largos a largos. Las colonias sobre medio solidificado con huevo son generalmente lisas y de color amarillo o anaranjado en 7 o más días de incubación a 38°C. Aunque el pigmento es producido cuando los cultivos están creciendo en la oscuridad, el color a menudo se intensifica con su exposición a la luz continua.

Sobre agar albúmina-ácido oléico las colonias son lisas de color amarillo a anaranjado, pueden ser convexas con borde completo o tienen centro convexo con abatimientos e irregularidades en la periferia, ocasionalmente rugosas, crecimiento óptimo a 35°C.

Frecuentemente encontrado como residente ocasional en el esputo humano y muestras de lavado gástrico. También encontrado en agua corriente y suelo. Raramente puede estar implicado en el proceso de enfermedad.

Estructura antigénica: estos organismos han estado sujetos a muy pocos análisis inmunológicos. Pueden ser distinguidos de *M.scrofulaceum* por pruebas de hipersensibilidad retardada en la piel. La fracción celular soluble en metanol y acetona no produce banda de precipitación en los estudios de inmunodifusión contra los antisueros específicos de extractos similares de *M.scrofulaceum*. Estos bacilos no se aglutinan con sueros producidos contra *M.scrofulaceum* (*marinum*), *M.avium*, *M.intracellulare*, *M.kansasii* o *M.marinum*.

Mycobacterium intracellulare

Bacilos cortos a largos. En crecimiento nuevo transitoriamente filamentosos, pudiendo llegar a ser cocobacilares; son fuertemente alcohol-ácido-resistentes. Los inóculos diluidos en medio solidificado con huevo producen usualmente colonias lisas no pigmentadas (no fotocromógeno, pertenece al grupo III de Runyon) después de 7 o más días de incubación a 37°C, las colonias envejecidas pueden llegar a ser amarillentas. Sobre agar albúmina-ácido oléico, las colonias son planas, delgadas, transparentes, lobuladas no pigmentadas, a menudo llegando a ser convexas en el centro, raramente ocurren colonias rugosas.

Pueden causar enfermedad crónica en el hombre muy similar a la tuberculosis. Las lesiones son limitadas en los cerdos. Experimentalmente causa enfermedad limitada en pollos y ratones, mucho menos severa que *M.avium* y raramente fatal. En general la patogenicidad a pollos corresponde al serotipo, con los serotipos I y II de *M.avium* más consistentemente patógeno que los serotipos de *M.intracellulare*. Se han observado formas intermedias entre *M.avium* y *M.intracellulare* en términos de la morfología de sus colonias, comportamiento, cultivo y patogenicidad en pollos. Se ha reportado que el crecimiento a 42°C incrementa la patogenicidad del inóculo. Las lesiones en cobayos están usualmente limitadas al sitio de inoculación.

Los hámsteres inoculados por vía intratesticular muestran lesiones locales extensivas y, frecuentemente, lesiones focales secundarias en hígado, bazo y ganglios linfáticos abdominales. Los conejos que reciben 10⁻³mg intravenosamente no desarrollan lesiones demostrables; pero en los que reciben 5mg, aunque no provocan la muerte, producen lesiones macroscópicas raras en las vísceras y usualmente lesiones moderadas a severas de articulaciones y cubiertas de tendones.

Aislado de enfermedad sistémica fatal de un niño. Más frecuentemente encontrado en secreciones pulmonares de personas que sufren una enfermedad semejante a la tuberculosis, y de especímenes quirúrgicos de tales pacientes. Cuando fueron aislados de secreciones humanas, usualmente fueron considerados agentes etiológicos de la enfermedad pulmonar, aunque

ocasionalmente fueron aislados como aparente residente casual. También aislado de procesos de enfermedad en reses y cerdos. Ocasionalmente encontrado en el suelo.

Resistente a isoniazida, PAS y estreptomina, por lo que la cirugía es el tratamiento de elección. Existen algunos éxitos reportados con cicloserina, viomicina, kanamicina y estreptomina.

Estructura Antigénica: Magnusson (1962, 1967) distinguió *M.intracellulare* de 10 especies micobacterianas, incluyendo *M.avium* por hipersensibilidad dérmica, la cual no permitió la división de esta especie en serotipos.

El uso de intestino sensibilizado de cobayos por la técnica de Schultz-Dale separó esta especie de otras 7 incluyendo *M.avium*. Al menos 15 serotipos aglutinantes o serogrupos fueron establecidos entre cultivos identificados como *M.intracellulare*.

Los miembros de estos serotipos son predominantemente no patógenos para pollos y fueron aislados principalmente del hombre, reses y cerdos, como contrarios a 2 o posiblemente 3 distintos serotipos *M.avium*, los cuales son virulentos para pollos, y menos frecuentemente asociados con enfermedad de los mamíferos.

Jones y et al. (1965) fueron capaces de hacer algunas divisiones a lo largo de líneas comparables por medio de técnicas de inmunofluorescencia; Bennedsen (1968) empleando una técnica indirecta con sueros obtenidos al principio de infecciones experimentales de conejos, distinguió 7 serotipos inmunofluorescentes, que correspondieron a sendos patrones aglutinantes.

Mycobacterium kansasii

Bacilos moderadamente largos y ensanchados, exhiben marcados septos transversales cuando se incuban en presencia de fuentes de ácidos grasos. Son alcohol-ácido resistentes.

Los inóculos diluidos en medio solidificado con huevo producen colonias lisas a rugosas después de 7 días o más de incubación a 37°C. Sobre agar albúmina-ácido oléico, las colonias son de superficie plana, lisas o algo granulares, los bordes regulares o ligeramente ondulados, mancha central densa, exhiben igual patrón de pigmentación (fotocromogenicidad) en medio de huevo. La mayoría de las cepas aparecen algo rugosas microscópicamente, pero son realmente emulsificadas en agua. Algunas cepas son tanto rugosas como resistentes a la emulsificación.

Las colonias que crecen en la oscuridad son no pigmentadas; cuando crecen en la luz o son brevemente expuestas a ésta y cuando las colonias son jóvenes, llegan a ser de color amarillo brillante. Raramente las cepas no producen pigmento después de la exposición a la luz o producen un pigmento anaranjado profundo cuando crecen en la oscuridad. La mayoría de las cepas son fotocromogénicas; pero en ocasiones las hay escotocromogénicas, si crecen en una incubadora iluminada forman cristales rojo oscuro de β -caroteno sobre la superficie y dentro de la colonia. Los cristales son útiles en la identificación.

La mayoría de las cepas son fuertemente positivas; las células pueden ser diferenciadas de *M.tuberculosis* por su actividad fotocromogénica, por no producir niacina y por ser menos sensibles a isoniazida, PAS y estreptomina.

Aislado de lesión pulmonar humana. Causa enfermedad pulmonar crónica semejante a la tuberculosis, aunque algunas formas no comunes, con actividad catalasa débilmente positiva han sido encontradas en especímenes clínicos sin estar implicadas en la enfermedad. Si éste no responde a isoniazida, PAS, cicloserina, viomicina o promizona, entonces la intervención quirúrgica puede ser necesaria.

La inoculación subcutánea puede causar lesiones locales, pero no lesiones viscerales grandes o muerte en cobayos. La inoculación intraperitoneal o intravenosa produce lesiones viscerales limitadas por sí mismas. La patogenicidad para cobayos no es marcadamente mejorada por la administración de cortisona, pero el pretratamiento a los pulmones de animales con polvo de hulla puede intensificar la extensión de la enfermedad.

Las formas usuales causan ulceración limitada por sí misma por inoculación intradérmica de cobayos con 10^4 mg de bacilos mientras que las formas de catalasa débilmente positiva requieren de un inóculo cien veces mayor. La inoculación intraperitoneal de hámsteres generalmente causa la muerte, con lesiones de ganglios linfáticos, bazo, hígado e invasión ocasional de la cápsula de Bowman; la virulencia aumenta con cortisona. Algunas muertes ocurren en ratones inoculados intraperitonealmente, pero la mayoría exhibe granulomas del hígado limitados por sí mismos, bazo y ganglios linfáticos.

Las ratas exhiben lesiones mínimas y los pollos ninguna. Los conejos inoculados intravenosamente con 5mg, desarrollan lesiones macroscópicas de articulaciones y cubierta de tendón y algunas lesiones grandes de hígado y pulmón, raramente fatales. La inoculación intratraqueal a mono *Rhesus* causa enfermedad limitada por sí misma, la cual reaparece con el tiempo.

Más frecuentemente aislado de secreciones pulmonares o tubérculo renal del hombre. Ocasionalmente asociado con lesiones de pulmones o ganglios linfáticos de venado, cerdo o reses. Las fuentes naturales de infección no se han aclarado. Las cepas de catalasa débilmente positiva se han aislado del agua. Algunas cepas de catalasa fuertemente positiva también han sido aisladas de agua corriente.

Estructura antigénica: Magnusson (1967), distinguió a *M.kansasii* de otras 10 micobacterias, incluyendo *M.marinum*, por medio de hipersensibilidad dérmica. Aunque algún grado de reactividad cruzada ocurre, la desensibilización dérmica es efectuada solamente por antígenos análogos.

El uso de intestinos de cobayos sensibilizados por la técnica Schultz-Dale permitió la diferenciación de 2 o posiblemente 3 patrones antigénicos. Solamente un serotipo aglutinante ha

sido establecido, contado para 154 de 155 cepas aisladas probadas cuya identidad se ha establecido por métodos bioquímicos.

Las cepas rugosas no podrían ser tipificadas debido a la aglutinación espontánea. Las variedades, tanto de catalasa fuertemente positiva como débilmente positiva, exhiben el mismo serotipo aglutinante y éste parece estar asociado con un antígeno específico soluble en fenol detectable por inmunodifusión. Esta especie es también de serotipo homogéneo, de acuerdo con las pruebas de inmunofluorescencia.

Los estudios de inmunodifusión e inmunoelectroforésis sobre filtrados o lisados de cultivos, demostraron hasta 19 líneas de precipitación contra suero homólogo. El patrón es distinto para esta especie, aunque comparte cierto número de antígenos con *M.tuberculosis*.

Las variantes no pigmentadas y escotocromógenas exhiben el mismo patrón electroforético que las cepas fotocromogénicas.

***Mycobacterium leprae* (Bacilo de Hansen)**

M.leprae fue la primera bacteria descubierta como el agente etiológico causante de una enfermedad. En 1874, Hansen descubrió la presencia de *M.leprae* en tejidos de individuos que padecían lepra.

Debido a los estigmas sociales y psicológicos, injustificados, asociados con el término lepra, muchos científicos piensan que la enfermedad no debería ser llamada lepra, sino enfermedad de Hansen. La palabra “leproso” para referir a una persona con lepra nunca debería ser usada.

La lepra puede ser definida como una enfermedad crónica granulomatosa que generalmente afecta a las regiones frías del cuerpo, como la piel, ciertos nervios periféricos, membrana, mucosa del tracto respiratorio superior y boca, la porción anterior del ojo y testículos.

A. Clasificación de la lepra:

1) Lepra Lepromatosa: es una enfermedad crónica a menudo fatal que es acompañada por una gran mutilación del cuerpo. Las lesiones de nervios periféricos y piel (y en casos avanzados, otras partes del cuerpo) contienen numerosos bacilos alcohol-ácidos-resistentes que son característicos. La reacción cutánea de Mitsuda (reacción a la inyección con lepromina) es negativa mientras que células de Virchow (espumosas) están presentes en la lesión.

2) Lepra Tuberculoide: es una enfermedad crónica no fatal que eventualmente lleva a la mutilación de algunas partes del cuerpo. Las lesiones de la piel y nervios contienen pocos o ningún bacilo alcohol-ácido-resistente y los individuos responden a la reacción cutánea de Mitsuda. En resumen, las lesiones tienen una estructura tuberculosa característica.

3) Lepra Dudosa (dimorfa): es una enfermedad inestable con características tanto de lepra lepromatosa como de tuberculoide. Puede haber variación del número de bacilos alcohol-ácido-resistentes en las lesiones, mientras que las reacciones de Mitsuda varían de débilmente positivas a negativas.

4) Lepra Indeterminada: representa un estado temprano de la enfermedad y a menudo no puede ser reconocida y tampoco se han desarrollado características lepromatosas o tuberculoides. La lepra es clasificada como una enfermedad infecciosa crónica, esto implica que la lepra es contagiosa. Esto debe enfatizarse, a pesar de que varios intentos de transferir la lepra de un paciente a otro por inoculación directa, con un gran número de bacilos de lepra de un donador, han fallado.

La lepra no infecta generalmente a animales de laboratorio (en 1960 Shepard logró con éxito la transferencia en cojinete, plantar de ratón y en 1965 Bindford tuvo éxito en la inoculación sucesiva en hámsteres, también puede ser transmitida a armadillos), y, aunque la enfermedad puede ser diseminada de hombre a hombre, es considerada una enfermedad muy poco contagiosa. Los individuos que viven en contacto muy cercano, contacto íntimo, con pacientes leprosos frecuentemente no contraen la enfermedad. Existen, sin embargo, algunos casos reportados donde la lepra ha sido transferida artificialmente de un individuo a otro.

Seres humanos de todas las características raciales y vivienda en diferentes áreas climatológicas han contraído lepra, sin embargo; está generalmente confinada a individuos que viven en áreas tropicales o subtropicales, económicamente subdesarrolladas.

De todas las regiones del mundo, el sureste de Asia (India) tiene el mayor número de casos de lepra. África, sin embargo, es el área de mayor importancia donde la lepra es una enfermedad endémica. Puesto que vivimos en un mundo muy móvil, las personas con lepra pueden ser encontradas en todas partes del mundo.

No se conoce como es transmitida la lepra, pero el contacto íntimo con una lesión que contiene bacilos es necesaria probablemente. El tiempo de incubación no es conocido, sin embargo, se ha estimado que varía de varios meses a más de siete años. (A menudo tres o más años). En regiones endémicas, la lepra ocurre más frecuentemente en niños o adultos jóvenes. La forma lepromatosa a menudo fatal ocurre con más frecuencia en hombres que en mujeres. En muchos países las personas con lepra son separadas de la población sana, sin embargo, el tratamiento a pacientes externos no ha llegado a ser ampliamente usado.

B. Características del Bacilo de Hansen

El organismo es conocido como *Mycobacterium leprae*, usualmente aparece como un organismo delgado, en forma de bacilo alcohol-ácido-resistente de longitud variable. El organismo puede teñirse irregularmente, presentando una apariencia “bandeada”.

Los organismos son encontrados usualmente en macrófagos y células periféricas nerviosas. Cuando *M.leprae* está presente en gran cantidad (en lepra lepromatosa) los organismos se acumulan de manera muy característica y forman masas regulares esféricas (llamadas “gránulos” o “globi”). Desde que *M.leprae* fue descubierto por Hansen (1874), se han hecho numerosos intentos para cultivarlo en medios artificiales, como consecuencia se han aislado numerosas bacterias alcohol-ácido-resistentes, sin embargo, muchos expertos aseguran que *M.leprae* nunca ha sido cultivado en un medio artificial. No se conoce que relación puede existir entre los microorganismos aislados de lesiones de pacientes con lepra, con esta enfermedad.

Para diagnosticar la lepra se debe considerar la presencia de bacterias alcohol-ácido-resistentes junto con el cuadro clínico del paciente. Se observan lesiones características de los nervios periféricos y una reacción positiva a la lepromina en el tipo tuberculoide, mientras que una reacción negativa es observada en la lepra lepromatosa.

C. Manifestaciones Clínicas de la lepra

El primer signo de lepra puede ser la presencia de lesiones inconspicuas en la piel. Esto seguido de un desarrollo progresivo de lesiones cutáneas y síntomas que indican que los nervios periféricos están involucrados.

La lepra puede ser clasificada generalmente como lepromatosa, tuberculoide o dudosa; siendo esto posible, después de la aparición de las lesiones cutáneas. El curso de las infecciones es determinado por el tipo de enfermedades. En todas las formas de la enfermedad, sin embargo, las lesiones se restringen a ramificaciones nerviosas superficiales y a las partes frías del cuerpo.

El daño a los nervios causa anestesia local y ocurre en forma temprana en la lepra tuberculoide, aun en ausencia de lesiones cutáneas prominentes.

En la lepra lepromatosa, los síntomas clínicos tempranos no indican por lo general que los nervios periféricos están afectados. Produce un ensanchamiento de los nervios periféricos en todas las formas de lepra y esta enfermedad tendría que ser considerada como un “tumor” de una ramificación nerviosa periférica en que es diagnosticada.

En la lepra lepromatosa son comunes las lesiones tempranas de la membrana mucosa de la nariz. Los ojos y testículos en hombres generalmente llegan a ser afectados conforme progresa la enfermedad. Las lesiones cutáneas, aunque presentes durante los estados tempranos, no son comúnmente sobresalientes. El sistema reticuloendotelial en estados avanzados puede recargarse con bacilos de la lepra, provocando lesiones del hígado bazo y médula ósea. El desarrollo de lesiones en todas las formas de lepra es lento y gradual. Tanto las remisiones espontáneas como las exacerbaciones repentinas pueden ocurrir (estados reactivos).

Los estadios reactivos de la infección son mucho más severos en lepra lepromatosa y dudosa que en el tipo tuberculoide.

El eritema nodoso-leproso, es un estado reactivo serio de la lepra lepromatosa y dudosa. Las lesiones del eritema nodoso leproso, están compuestas de nódulos de inflamación aguda que se desarrollan por infiltraciones lepromatosas pre-existentes. El tratamiento con sulfonas parece provocar esta reacción.

Otra reacción del estado reactivo en lepra lepromatosa es el “fenómeno de Lucio”, que ocurre como una necrosis focal en regiones difusamente infiltradas de la piel.

En la lepra tuberculoide los pacientes pueden eventualmente pasar a ser inválidos porque la destrucción de los troncos nerviosos pueden producir la degeneración de los músculos y la pérdida de la sensibilidad, resultando en lesiones traumáticas.

La lepra tuberculoide en contraste con la lepromatosa, se apacigua después de pocos años y no mata al paciente.

TABLA 1.5 TABLA COMPARATIVA DE LEPROSIS TUBERCULOIDE Y LEPROSIS LEPROMATOSA		
Lesiones de la piel	Tuberculosis	Lepromatosa
- Número	Pocas	Muchas
- Tamaño	Grandes	Pequeñas
- Infiltración celular	Pequeñas	Grandes
- Límites	Definidos	Vagos
- Adormecimiento	Temprano	Tardío
Bacteriología:		
- Número de bacilos alcohol-ácido-resistentes	Pocos	Numerosos
- Gránulos (paquetes de organismos ácido resistentes)	Ausentes	Presentes
Histología:		
- Granulomas Epiteliales	+	-
- Células Leprosas	-	+
- Destrucción Nerviosa	Temprana	Tardía
- Prueba de Mitsuda	+	-

D. Terapia

Las lesiones encontradas en las formas indeterminadas de lepra no son sobresalientes, sin embargo, es muy importante reconocer las lesiones como leprosas porque el tratamiento conveniente detendrá el futuro desarrollo de la lepra. Las sulfonas son las más efectivas. La droga de elección es probablemente la 4,4-diaminodifenil sulfona (DDS) también conocida como Dapsona. La sulfona Promin es también efectiva. La Tiambutosina (una tiourea) puede ser usada

con éxito en individuos que no pueden tomar sulfonas.

E. Diagnóstico de Lepra

El examen médico rutinario del paciente no establecerá la presencia o ausencia de lepra. Se deben considerar los antecedentes del paciente, por ejemplo: dónde vive el paciente, sus contactos personales, si sus parientes han tenido lepra, si él ha estado en áreas endémicas de lepra. Se debe averiguar si el paciente es hipersensible a la drogas.

Durante el examen físico se debe prestar especial atención a cualquier irregularidad en la piel, ganglios linfáticos, ramificaciones nerviosas superficiales, músculos, membrana mucosa de la nariz, garganta, boca y ojos. Siempre compromete la sensibilidad nerviosa. Una disminución en la sensibilidad es un síntoma primario de neuritis leprótica. Inspeccionar la cavidad nasal en busca de lesiones en el tabique. Note las fibras de las cejas e inspeccione los ojos.

El examen bacteriológico es indispensable para el diagnóstico. Los frotis deben ser hechos rutinariamente de varias lesiones diferentes. Todos los frotis deben ser teñidos para determinación alcohol-ácido-resistente.

A menudo, al menos en una lesión cutánea, (sí está presente) se debe hacer biopsia para examen histopatológico. La prueba cutánea con lepromina no es diagnóstica; sin embargo, ésta puede ser útil una vez que la lepra está establecida, para determinar el tipo.

F. Resumen de las características de la Lepra

1) *Mycobacterium leprae* es el organismo causante de la enfermedad en el hombre (Hansen 1874), por lo que también se le conoce como Bacilo de Hansen.

2) Es el agente causal de la lepra, la cual también es conocida como enfermedad de Hansen.

3) Esta enfermedad está ampliamente distribuida. En el hombre, produce cuatro formas:

Lepra indeterminada: lesiones tempranas.

Lepra tuberculoide.

Lepra lepromatosa.

Lepra dimorfa: condición de frontera, tratamientos mezclados.

4) La lepra indeterminada presenta lesiones tempranas que son de difícil diagnóstico. Este tipo de lesión, responde bastante bien al tratamiento. No se puede determinar qué tipo de lepra resultará de una lepra indeterminada.

5) La lepra es caracterizada como una enfermedad superficial, granulomatosa, que afecta comúnmente las extremidades.

a) La lepra tuberculoide es una forma leve de infección, la cual a menudo desaparece.

b) La lepra lepromatosa es severa y en ocasiones fatal.

6) Los gránulos son paquetes o aglomeraciones de bacilos alcohol-ácido-resistentes, que se encuentran dentro de los macrófagos (globi).

7) Las células leprosas son grandes, espumosas, llenas de bacilos alcohol-ácido-resistentes.

8) Prueba de Mitsuda en piel: Aislar el bacilo de un tejido fijado en formalina. Inyectar subcutáneamente al individuo sospechoso.

Buscar una reacción de hipersensibilidad retardada. Prueba usual para diferenciar formas tuberculosas de lepromatosas, pero debido a su reactividad con agentes etiológicos de otro tipo, no es una prueba de diagnóstico de lepra.

9) El aislamiento y cultivo de *Mycobacterium leprae* en medios artificiales ha fallado, pero se han aislado bacterias alcohol-ácido-resistentes de individuos infectados. La relación específica con la enfermedad es desconocida.

10) Tratamiento:

Dapsona (4,4 diaminodifenil-sulfona o DDS). Cura la lepra indeterminada. Promin. Sulfona utilizada cuando DDS no se puede utilizar.

11) Diagnóstico:

No puede ser diagnosticada por medio de una prueba simple.

Hay que tomar en cuenta varios criterios:

a) Si el individuo sospechoso ha estado en alguna área endémica de lepra (sureste de Estados Unidos, Sudamérica, África, Asia, áreas subtropicales).

b) Buscar zonas de adormecimiento en la piel.

c) Presencia de granulomas no ulcerativos y no supurativos.

d) Buscar algunos caracteres específicos (listados en la tabla 1.5

12) La lepra no es muy infecciosa. No es tan contagiosa como se describe en la Biblia. De hecho no es muy transmisible. (Aparentemente se requiere un contacto prolongado).

Mycobacterium lepraemurium

Bacilos de 3 a 5µm de longitud con extremos ligeramente redondeados. Cuando se tiñen, las células a menudo muestran una apariencia irregular. Las formas densa y uniformemente teñidas parecen ser infectivas para animales, en contraste a las formas “degeneradas” irregularmente teñidas. Fuertemente alcohol-ácido-resistente.

Como los bacilos leprosos humanos, este organismo no ha sido cultivado “*in vitro*”, pero puede ser pasado experimentalmente a través de ratas, ratones y hámsteres. Alguna elongación de células con síntesis de sustancias macromoleculares ha sido observada en medios de cultivo, pero la multiplicación de células no ocurrió.

Los bacilos de lesiones no están agrupados en racimos, masas redondeadas o en palizada como en la lepra humana. La capacidad de los bacilos de transferir hidrógeno de los tejidos puede ser demostrada por reducción de tetrazolio y alguna correlación puede ser hecha entre esta propiedad y el carácter infeccioso de los bacilos. La multiplicación de *M.lepraemurium* en ratones es inhibida por isoniazida, estreptomycin, iproniazida y viomicina y, en menor grado, por promina y diaminodifenil sulfona.

Las paredes celulares de *M.lepraemurium* contienen arabinosa y galactosa como azúcares principales y alanina, ácido glutámico y ácido diaminopimélico como aminoácidos del mucopéptido; y una alta proporción de lípido, como es típico de otras micobacterias cultivables.

Causa de enfermedad endémica de ratas en varias partes del mundo, habiendo sido encontrado en Odessa, Berlín, Londres, Nueva Gales del Sur, Hawai, San Francisco y algunos otros sitios. La enfermedad natural ocurre principalmente en la piel y ganglios linfáticos causando endurecimiento, alopecia y ulceración eventual.

Enfermedades nodulares en la piel de otros animales han sido descritas, por ejemplo: enfermedad del búfalo en India, de una rana en Sudamérica y de gatos en Australia, ha sido asociado con bacilos alcohol-ácido-resistentes que aún no han sido cultivados sobre medio artificial.

Mycobacterium marinum

Bacilos moderadamente largos a cortos, con septos transversales. Los inóculos diluidos en medio solidificado con huevo producen colonias lisas a rugosas después de 7 o más días de incubación a 30°C. Las colonias que crecen en la oscuridad no son pigmentadas; cuando las colonias crecen en la luz o cuando siendo jóvenes son brevemente expuestas a ésta, llegan a ser de color amarillo brillante. Sobre agar albúmina ácido oléico, las colonias son lisas, interconvertibles a convexas, con borde completo y centro abovedado, con abatimientos o irregularidades en la periferia, exhiben el mismo patrón de pigmentos (fotocromogenicidad) que en el medio de huevo. Crecen en un rango de temperatura de 22°C a 35°C.

Aislado de peces enfermos y de acuarios. En el hombre frecuentemente se puede encontrar en la epidermis, en lesiones de la piel, resultantes de rozaduras ocurridas en piscinas contaminadas con el organismo. Produce granulomas cutáneos (“gránuloma de piscinas”) en el hombre, generalmente en los codos, pero también se puede encontrar en las rodillas, los pies, y en los dedos de los pies y manos, produciendo pápulas o nódulos, algunas veces ulcerantes. Usualmente se cura de manera espontánea, luego de algunos meses de infección.

Los ratones que reciben un gran inóculo intraperitoneal desarrollan ulceraciones en la cola, las patas y el escroto, algunas veces ocurren lesiones viscerales y muerte. Después de la inoculación intravenosa las lesiones se limitan a la cola, inoculación en el cojinete plantar da lugar a inflamación local y alguna ulceración. Los cobayos inoculados subcutáneamente o por inhalación

no desarrollan la enfermedad, la inoculación intraperitoneal, ocasionalmente produce lesiones escrotales. Las ratas inoculadas intraperitonealmente no desarrollan la enfermedad, pero pueden presentar nódulos viscerales y en ganglios linfáticos hiliares. Los pollos no desarrollan lesiones cuando son inoculados intraperitoneal o intravenosamente, pero los embriones de pollo mantenidos a 30°C (no a 37°C) adquieren una enfermedad fatal.

Los conejos desarrollan lesiones locales cuando el inóculo es aplicado en sitios cutáneos raspados, y pueden desarrollar granuloma con necrosis caseosa en el escroto después de la inoculación intraperitoneal o intravenosa. Representantes de cincuenta especies poiquilothermas (reptiles, anfibios y peces) han sido encontrados susceptibles a la fatal infección sistemática, cuando los mismos son mantenidos a 30°C.

Estructura antigénica: Magnusson (1967), distinguió *M.marinum* de otras diez especies micobacterianas, incluyendo *M.kansasii*, por hipersensibilidad dérmica. El uso de intestinos de cobayos sensibilizados por la técnica Schultz-Dale demostró un patrón antigénico distinto. Un serotipo de aglutinación ha sido establecido, el cual reaccionen 21 cepas probadas.

No se ha visto reacción cruzada con *M.kansasii* por esta técnica o por inmunodifusión con antígeno soluble en fenol. Similarmente, sólo un serotipo se estableció por inmunofluorescencia.

Castelnuovo y Morellini (1961) empleando análisis inmunoelectroforético, reportaron numerosas bandas de identidad entre *M.balnei*, *M.platypoecilus* y *M.marinum* y concluyeron que

éstas representaban una sola especie. La infección puede causar numerosas reacciones de bajo título de tuberculina, sugestiva de una tuberculosis epidérmica.

Mycobacterium microti

Bacilos, que producen un crecimiento primario (28-60 días) en medios a base de huevo pero libre de glicerol. Puede adaptarse y tolerar al glicerol. La morfología de sus colonias es variable. Temperatura óptima, para el crecimiento es de 37°C.

Causa la tuberculosis naturalmente adquirida en el ratón campestre. Produce lesiones locales en cobayos, conejos y terneras. Pierde patogenicidad en cultivos repetidos.

Es un organismo que inmunológicamente está estrechamente relacionado con *M.tuberculosis* y *M.bovis*. Es una forma intermedia entre *M.tuberculosis* y *M.bovis*.

Mycobacterium nonchromogenicum

Subsecuente a la publicación original de este nombre, Tsukamura (1966), propuso que el nombre de estos organismos fuera cambiado a *M.terrae*, tal propuesta probablemente no constituye una publicación válida del nuevo nombre bajo la Regla 12 del Código Internacional de Nomenclatura de Bacterias (1966). Bajo estas circunstancias, el nombre *M.terrae* aplicado

independientemente por Wayne (1966) a otro grupo de organismos podría aparecer válidamente publicado. *M.nonchoromogenicum* de Tsukamura es similar a *M.terrae* de Wayne, pero difieren en algunas propiedades. Por cierto número de criterios de diagnóstico aplicados, pueden ser agrupados juntos para propósitos prácticos como un complejo *M.terrae*, puesto que ninguno de los dos parece estar asociado con enfermedad.

Carentes de actividad α y β -esterasa. Cepas que ocasionalmente desarrollan un pigmento rosa. Los bacilos persisten en los tejidos de ratones sin evidencia de patogenicidad. Aislado de ratones inyectados con suero.

Mycobacterium paratuberculosis

Bacilos gruesos, 1-2 μm de longitud, se tiñe de manera uniforme, pero ocasionalmente las formas más largas muestran segmentos alternos sin tinción.

Este organismo es difícil de cultivar; en cultivos primarios ha sido cultivado solamente en medios que contengan bacilos de tuberculosis muertos u otras bacterias alcohol-ácido-resistentes. En pocas ocasiones los cultivos han sido aclimatados a un medio sintético libre de la adición de bacterias muertas.

La incorporación de extractos purificados de micobacterias (micobactinas) elimina el requerimiento de adición de bacilos alcohol-ácido-resistentes muertos al medio para así permitir su crecimiento.

Las micobactinas representan una familia de factores de crecimiento quelantes del hierro que derivan de diferentes especies de micobacterias.

Las colonias que crecen sobre el agar glicerol conteniendo *M.phlei* muerto por calor, son discernibles tan sólo después de 4-6 semanas y éstas son de color blanco pálido, elevado y circulares, con una capa y el borde ligeramente irregular. Las colonias viejas llegan a ser más elevadas, radialmente estriadas o irregularmente plegadas y de color blanco amarillento pálido. Sobre medio de Dorset glicerol huevo, conteniendo cerebro de carnero y *M.phlei* muerto por calentamiento, el crecimiento es ligeramente más superfluo que el descrito arriba.

Aislado de la mucosa intestinal del ganado con enfermedad de Johnes, una diarrea crónica. Aparentemente, parásito obligado en la naturaleza. Los organismos aislados de ovejas son reportados como más difíciles de cultivar que los de reses.

Produce la enfermedad de Johnes en reses y ovejas. Experimentalmente produce una enfermedad similar en cabras. Los cobayos, conejos, ratones y ratas son afectados. Dosis muy grandes en animales de laboratorio, producen lesiones nodulares locales ligeras en comparación con las producidas por *M.phlei*.

Estructura Antigénica: la Johnina, preparada como tuberculina, provoca reacciones positivas en ganado con enfermedad de Johnes. De acuerdo con Fadyean y Sheather (1916), los

animales tuberculosos pueden también dar reacción. Plum (1925), mostró que los animales sensibles a la tuberculina aviaria reaccionan a la Johnina y que la tuberculina aviaria causa una reacción en algunos animales infectados con bacilos de Johnes.

En estudios inmunolectroforéticos Tuboly (1965), demostró la presencia de cuatro antígenos en común con *M.avium* y cinco en común con *M.tuberculosis*.

Mycobacterium phlei

Bacilos cortos, 1.0-2.0µm de longitud, raramente más largos. Alcohol-ácido-resistente, particularmente después de incubación prolongada (5-7 días) puede ser irregular (5-100% de células alcohol-ácido-resistentes). Los inóculos diluidos en medio solidificado con huevo, usualmente producen colonias rugosas, toscamente arrugadas, de color amarillo profundo a anaranjado después de 2 a 5 días de incubación; unos pocos cultivos lisos, suaves y butirosos. Sobre agar albúmina ácido oléico el crecimiento no es abundante; las colonias pueden ser lisas con un centro convexo rodeado por un borde plano translúcido con sus bordes enteros o irregulares y gránulos oscuros cercanos al centro de la colonia; las colonias rugosas son planas y de apariencia granular a ligeramente acordonada, con gránulos cercanos al centro y bordes irregulares. Capaz de crecer de 22°C a 52°C.

No patógeno para ratones, ratas, cobayos, conejos, pollos, ranas o carpas. Originalmente aislado de heno y pasto. Reportado como ampliamente distribuido en la naturaleza, aunque recientes estudios de suelo han revelado pocas cepas.

Estructura Antigénica: un grupo homogéneo demostrado por técnicas de inmunofluorescencia, sensitinas específicas e inmunodifusión e inmunolectroforesis.

Mycobacterium scrofulaceum

Bacilos cortos a largos o filamentos. Las colonias sobre agar solidificado con huevo, son usualmente lisas y de color amarillo a anaranjado en 7 o más días de incubación a 37°C. Son escotocromógenas y no producen niacina. Sobre agar albúmina ácido oléico, las colonias son planas, amarillas, algunas convexas, con borde entero y otras con el centro convexo y borde irregular. Ocasionalmente cepas rugosas. Crecimiento óptimo a 35°C.

Aislado de una lesión cerrada de linfadenitis cervical en un niño. Más comúnmente encontrados en secreciones humanas y en pus de ganglios linfáticos cervicales supurantes (especialmente en niños) y considerado el agente etiológico de tales lesiones. También encontrado en esputo humano y en lavado gástrico, usualmente como residente casual, pero en ocasiones asociado con enfermedad pulmonar. Ocasionalmente encontrado en suelo. Los serotipos de esta especie han sido encontrados en cerdos.

En enfermedades humanas, más comúnmente implicado como agente etiológico de linfadenitis cervical en niños. De patogenidad limitada en animales experimentales.

No causa enfermedad generalizada extensiva en ratas, hámsteres o pollos, ocasional involucramiento de ganglios linfáticos, y raramente lesiones localizadas en hígado o bazo.

En cobayos inoculados subcutáneamente produce absceso en el sitio de inoculación e inflamación de los ganglios linfáticos regionales; la inoculación intraperitoneal causa inflamación y supuración de los ganglios linfáticos regionales y ocasionalmente una peritonitis de varios grados y raramente lesiones en hígado o bazo, pero sí causa enfermedad no generalizada o muerte. Estos organismos no responden bien a la quimioterapia.

Estructura Antigénica: Magnusson (1962) distinguió *M.scrofulaceum* de nueve especies de micobacterias y de ciertas nocardias con base en la hipersensibilidad dérmica. Así también, igualó *M.scrofulaceum* con *M.marinum*. Runyon y Dietz (1971) fueron capaces de distinguir éstas de *M.gordonae* por esta técnica.

Schaefer (1965, 1968) demostró la existencia de tres serotipos identificados como “scrofulaceum”, “lunning” y “Gause” por aglutinación bacilar, con alguna actividad cruzada con cultivos, los cuales presentan en adición propiedades de otras especies.

En estudios inmunolectroforéticos de extractos bacilares, esta especie dio un patrón de reacción distinto y bien definido. Un extracto soluble de bacilos en metanol y acetona produjo por inmunodifusión una banda específica de precipitina, común a aquellas bacterias que encajan en el patrón bioquímico de *M.scrofulaceum*, incluyendo los cultivos identificados como *M.marianum*, *M.scrofulaceum* y la cepa “Gause”.

Mycobacterium simiae

La publicación original de las especies descritas como micobacterias fotocromogénicas, las cuales fueron niacina negativa y positiva para catalasa o peroxidasa. Resultados variables fueron reportados para reducción de nitratos, lipasa y amidasa. Ningún tipo de cultivo fue especificado en la publicación original. Kappler produjo una descripción bioquímica detallada de una de las cepas originales (No. 61) reportándola negativa para reducción de nitratos pero positiva para fosfatasas, hidrólisis de tween 80 y nicotinamidasas y pirazinamidasas.

Ésta difiere del reporte original de Karassova y et al, quienes encontraron esta cepa negativa para todas las pruebas de amidasa. Magnusson dividió los cultivos reconocidos como *M.simiae* en dos grupos, con base en las reacciones de hipersensibilidad retardadas, con la cepa No. 61 cayendo en el grupo 1 y la cepa original de los autores No. 29 típica del segundo grupo. Karassova y et al describieron las cepas No. 29 como positivas para la reducción de nitrato, hidrólisis de tween 80, acetamidasa y ureasa.

Weiszfeiler et al reportaron similitud en estructura antigénica entre No. 61 y *M.avium*, *B.C.G.* y *M.balnei (marium)*, pero notan que esta cepa puede no ser considerada típica de *M.simiae*. El estatus taxonómico de esta especie no está claro.

Mycobacterium smegmatis

Bacilos delgados de 3.0-5.0 μ m de longitud, algunas veces curvados, con células ramificadas o en forma de “Y”, células ocasionalmente hinchadas, en cuerpos como rosario o cocoides que se tiñen profundamente.

La tinción alcohol-ácido resistente después de incubar por 5 días puede ser irregular (10-80% de células alcohol-ácido-resistentes). Los inóculos diluidos en medio solidificado con huevo, usualmente producen abundante crecimiento de colonias finamente arrugadas a toscamente plegadas de color blanco cremoso después de 2-4 días de incubación. Colonias lisas brillantes, butirosas comúnmente vistas. Raras colonias pigmentadas, pero pueden ser observadas en cultivos viejos y más comúnmente sobre medio que no contenga huevo. Sobre agar albúmina ácido oléico, forman colonias rugosas, ligeramente convexas, de textura suave, no acordonadas pero sí granulares.

La forma lisa es convexa, tiene una capa delgada translúcida con borde entero, y los gránulos oscuros están distribuidos a través de la porción central de la colonia. Capaz de crecer de 25°C a 45°C.

Los inóculos pequeños no son patógenos en cobayos, ratones, hámsteres o pollos; aunque se obtienen algunas veces cultivos positivos de bazos de ratones y/o cobayos. Aislado de esmegma. Comúnmente encontrado en suelo y agua, aunque recientes aislamientos de estas fuentes no han sido frecuentes.

Estructura Antigénica: es un grupo homogéneo identificable por sensitinas específicas y técnicas de inmunodifusión e inmunológicas.

Mycobacterium terrae

Bacilos moderadamente largos a cortos. Los inóculos diluidos en medio solidificado con huevo o agar albúmina ácido oléico, producen colonias lisas a rugosas, blancas a grises después de 7 o más días de incubación a 37°C. La cepa tipo exhibe actividad α y β -esterasa. Aislado de esputo y lavado gástrico humanos, considerado residente casual en vez de patógeno. Se ha aislado también del suelo. Produce lesiones locales no sistémicas después de inoculación intradérmica de 10⁻¹mg a cobayos.

Mycobacterium triviale

De un inóculo diluido no aparecen colonias maduras sobre medio sólido en una semana. Las colonias sobre medio de huevo son rugosas, secas acumuladas y no cromogénicas. Sobre agar ácido oléico las características colonias “R” son vistas, las cuales son fácilmente confundidas con las de *M.tuberculosis*. Crecen pobremente, si existen, sobre agar harina de maíz.

Resistente a tiacetazona. Aislada de esputo, pero no considerada patógena.

Estructura Antigénica: se encontraron bandas específicas por análisis de inmunodifusión de extracto citoplasmático y reacción específica por anticuerpos fluorescentes y prueba de aglutinación en células totales.

Mycobacterium tuberculosis

Bacilos, varían de 0.3-0.6 por 1.0-4.0µm, rectos y ligeramente curvados, ocurriendo singularmente y ocasionalmente en hebras. Se tiñen uniformemente o irregularmente, a menudo mostrando formas bandeadas o de rosario. Fuertemente alcohol-ácido-resistentes y ácido alcohol resistentes, como se demostró por el procedimiento de Ziehl-Neelsen o fluorocromo.

El crecimiento tiende a ser en serpentina; en masas como cordones en los cuales los bacilos muestran una orientación paralela.

Las colonias de las formas avirulentas son menos compactas. El crecimiento en todos los medios es lento, requiriendo varios días o semanas para desarrollarse, dependiendo del medio y tamaño del inóculo, el tiempo de generación "*in vitro*" bajo condiciones óptimas es de 14 a 15 horas.

En la mayoría de los medios sólidos las colonias son rugosas, elevadas, gruesas, con una superficie nodular o arrugada y un margen delgado irregular; pueden llegar a estar pigmentadas (de blanco a color carne pálido o amarillo uniforme). Las colonias en agar albúmina ácido oléico, son planas, rugosas, acordonadas, secas y usualmente no pigmentadas.

En medio líquido carente de un agente dispersante, el crecimiento empieza sobre el fondo del tubo como una película, la cual se extiende hacia los lados del envase; esto eventualmente formará una película la cual se extenderá hacia arriba por los lados del tubo sobre la altura del medio. Cuando el tubo es agitado, el crecimiento se arremolina a través del medio como flóculos típicos pequeños y sueltos.

Una película extendida sin crecimiento sobre el fondo puede resultar de la inoculación en superficie. Las películas, con el tiempo, llegan a ser gruesas y arrugadas.

En el medio arabinosa-tween de Dubois el crecimiento es difuso, asentado, si no se mueve, pero realmente disperso. De la siembra dispersada en el medio de agar en tubo, el crecimiento evidente es confinado principalmente a la superficie. Temperatura óptima 37°C algunas crecen de 30°C a 34°C.

El pH óptimo varía de 6.4-7.0. El crecimiento a 37°C es estimulado por incubación aeróbica con adición de 5-10% de bióxido de carbono y por adición de glicerol al 0.5% en el medio. Vigorosa reducción de nitrato. Niacina positiva. Actividad de catalasa relativamente débil y pérdida de ésta después de calentamiento a 68°C.

Las diferencias entre cepas de bacilos tuberculosos han sido demostradas por sus diferentes patrones de respuesta a cierto número de fagos.

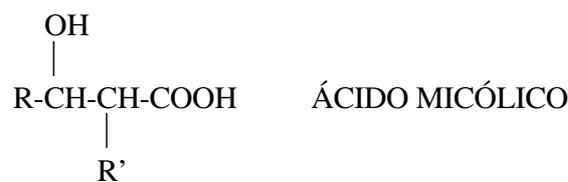
M.tuberculosis produce la tuberculosis en el hombre, otros primates, perros y algunos otros animales que tienen contacto con el hombre. Experimentalmente un inóculo de 0.01mg es altamente patógeno para cobayos y hámsteres, pero relativamente no patógeno para conejos, gatos, cabras, bovinos o aves domésticas. Los inóculos de 0.001-1.0mg son usados para la producción de enfermedades experimentales en ratones.

Las cepas de menor virulencia para animales experimentales han sido aisladas de lupus, tuberculosis urogenital y escrofuloderma. La atenuación de la virulencia puede ocurrir espontáneamente por subcultivos en medios artificiales. La virulencia puede ser manifestada por selección de porciones apropiadas de crecimiento sobre medio adecuado o por paso en animal.

Muchas cepas de *M.tuberculosis* aisladas de pacientes del sur de la India sólo causaron lesiones localizadas en cobayos y la enfermedad tiende a recidivar. Estas cepas son de catalasa activa, pero son susceptibles a peróxido e isoniazida.

La estreptomina, el PAS, isoniazida y al menos nueve medicamentos más, están en uso debido a su efecto inhibitorio en *M.tuberculosis* y la susceptibilidad a su acción es útil en el reconocimiento de las especies. Las mutantes espontáneas resistentes a uno de estos medicamentos pueden reemplazar a la cepa original, sí el tratamiento es impropio.

La resistencia a isoniazida regularmente acompañada de cambios en otras propiedades, tales como la pérdida de la actividad de peroxidasa y catalasa y la atenuación de la virulencia para los cobayos, mientras que las cepas con catalasa negativa casi uniformemente carecen de la habilidad de producir enfermedad progresiva en cobayos.



Componentes Celulares: todas las especies de *Mycobacterium* así como *Corynebacterium* y *Nocardia* contienen lípidos complejos que tienen subunidades de ácidos micólicos. Ninguna otra bacteria contiene estos compuestos. La longitud de la cadena de ácido micólico es característica de cada género de organismo.

Mycobacterium: longitud de la cadena de carbono de 80-88.

Corynebacterium: longitud de la cadena de carbono de 30-40.

Nocardia: Longitud de la cadena de carbono de 50-60.

Estos compuestos semejantes a la cera son hidrofóbicos y protegen al organismo contra la desecación y sustancias químicas.

M.tuberculosis virulento posee el “factor cuerda” y estas cepas tienden a crecer en cordones “serpentinados”. El factor cuerda es encontrado en la pared celular (envoltura celular) y membrana citoplasmática y es el 6,6'-dimicolato de trealosa. El factor cuerda puede contar mucho en la reacción del huésped al organismo que inducirá las lesiones tuberculosas. El factor cuerda es también encontrado en *Corynebacterium* y *Nocardia*. La relación con la virulencia no es conocida.

La cera “D” es encontrada en la pared celular de *Mycobacterium*, *Corynebacterium* y *Nocardia*. Esta es un peptido-glucolípid (la mitad del lípido es ácido micólico) responsable de la hipersensibilidad retardada. Ésta aumenta la formación de anticuerpos actuando como un adyuvante.

Estructura Antigénica: los animales infectados incluyendo al hombre, exhiben hipersensibilidad retardada a filtrados de cultivos de *M.tuberculosis* crudos o purificados y menos sensibilidad a preparaciones semejantes a tuberculina de otras micobacterias.

La enfermedad causada por *M.bovis* no se distingue de la provocada por *M.tuberculosis* por el uso de las tuberculinas utilizadas comúnmente. Las infecciones por otras especies de micobacterias resultan mucho menos sensibles a la tuberculina, aunque sí una “segunda concentración” de 250 unidades de tuberculina PPD es administrada, las pruebas de piel pueden erróneamente ser interpretadas como índice de infección con *M.tuberculosis*.

A las técnicas por aglutinación y absorción de aglutinina, *M.tuberculosis* es antigénicamente homogéneo, es muy similar a *M.bovis* y *M.microti* pero distinto de otras especies. La inmunoelectroforesis, las pruebas de doble difusión de precipitina en gel, la hemaglutinación y otras técnicas serológicas en general confirman estos descubrimientos. Algunos antígenos son compartidos por *M.tuberculosis*, *M.bovis* y *M.kansasii*, pero cada uno de ellos probablemente tiene uno o más antígenos distintivos. La relación con *M.leprae* se establece por la presencia de anticuerpos que precipitan al antígeno de *M.tuberculosis* en sueros de pacientes con lepra lepromatosa.

Los rayos X pueden mostrar las lesiones tuberculosas, pero frecuentemente una persona puede tener tuberculosis sin ningún signo demostrable por Roentgenografía. La prueba de la tuberculina es muy utilizada en pacientes que presentaron negatividad a la búsqueda con rayos X.

El fenómeno de Koch. Si se infecta un animal (cobayo) y después se trata de reinfectarlo. Se produce una reacción severa, que se caracteriza por un endurecimiento y ulceración de la piel. Pero el animal no es reinfectado. Las lesiones desaparecen después de 48 horas y los ganglios linfáticos quedan libres de micobacterias. El fenómeno de Koch es la base de la reacción a la tuberculina.

El Derivado Proteínico Purificado (PPD) o la tuberculina de “Old” que son usadas en la prueba de la tuberculina (Prueba de Mantoux), ya no son un material crudo puesto que la PPD está precipitada con sulfato de amonio.

Prueba de Mantoux: (Prueba de Sensibilidad) inyecte PPD intradérmicamente y observe el endurecimiento después de 48 horas. Prueba positiva: induración mayor de 10 mm. Prueba dudosa: induración menor de 10 mm.

Una prueba positiva indica que el paciente puede tener o ha tenido una infección (pero recuerde que ocurren reacciones cruzadas con otras micobacterias).

Prueba de Tyne: menos tuberculina inyectada y no tan sensible. Si se sospecha tuberculosis haga una prueba de Tyne en lugar de la de Mantoux. Si la prueba es negativa y aún se sospecha tuberculosis, haga la prueba de Mantoux.

Tratamiento: INH (isoniazida) es la droga de elección. Es bactericida tanto para organismos intracelulares como extracelulares.

La INH se usa frecuentemente en combinación con ácido p-amino-salicílico (PAS). En algunos casos se usa etambutol en lugar de PAS. La estreptomina se usa frecuentemente sola. Mata a organismos extracelulares pero no tiene efecto sobre los intracelulares.

Ciertas cepas de *M.tuberculosis* son resistentes a estreptomina. Otras drogas usadas son: kanamicina, rifampicina y cicloserina.

El tratamiento con antibióticos en la tuberculosis es una terapia prolongada.

Mycobacterium ulcerans

Bacilos moderadamente largos. El crecimiento sobre medio solidificado con huevo se hace evidente como mínimo después de 4 semanas de incubación a 30-33°C, produciendo colonias transparentes convexas. En cultivos viejos llegan a ser poco convexas a planas con bordes irregulares y superficie rugosa, de color amarillo. Colonias acordonadas rugosas son producidas sobre agar albúmina ácido oléico. Capaz de crecer entre 30 y 33°C, pero existe poco crecimiento a 25°C y usualmente ninguno a 37°C.

Causa úlceras en la piel humana, caracterizadas por extensión indolora desde áreas de endurecimiento apenas visible hasta grandes áreas con adelgazamiento de los bordes. Las ratas y ratones se pueden infectar experimentalmente; los cobayos, cerdos, conejos, aves y lagartos son resistentes. Las ratas inoculadas experimentalmente desarrollan lesiones necróticas hemorrágicas rodeadas por zonas de acumulación celular consistentes de leucocitos, linfocitos y macrófagos. No hay células gigantes.

Las zonas necrótica y celular muestran grandes masas de bacilos alcohol-ácido-resistentes en los espacios extracelulares y macrófagos.

Las lesiones humanas no muestran respuestas inflamatorias pero consisten de áreas de necrosis líquidas y lisis tisular. Desarrolla lesiones solamente en las partes más frías del cuerpo de animales experimentales. Así, la inoculación en el cojinete plantar del ratón, en forma consistente, causa lesiones locales; la inoculación por vía intranasal, intraperitoneal o intravenosa no causa lesiones viscerales, pero después de la inoculación masiva, resulta en lesiones ulcerantes en partes periféricas, sin pelo del cuerpo y sobre el escroto.

Ocasionalmente ha sido aislado de lesiones cutáneas humanas en Australia; ha sido también aislado de infecciones cutáneas ulcerativas del hombre en México, Nueva Guinea, Malasia y África.

No hay quimioterapia. La cura solamente puede ser producida por remoción quirúrgica cuidadosa. (Se debe estar seguro de que fue removido todo el tejido infectado). Los organismos no parecen diseminarse por la ruta de la corriente sanguínea.

Estructura Antigénica: En pruebas de fijación de complemento con sueros de conejos inmunizados con tipos humanos, bovinos y musélicos, de bacilos de tubérculos, *M.ranae* y *M.phlei*, (los bacilos muertos por calentamiento y lavados sirvieron como antígenos), *M.ulcerans* fue encontrado que es antigénicamente distinto de las otras especies patógenas de los *Mycobacterium* probados. Esta conclusión fue apoyada por reacciones de sensibilidad en la piel de cobayos.

Mycobacterium vaccae

Bacilos cortos rollizos de 1.0-4.0 μm de longitud, con extremos ligeramente redondeados u ocasionalmente engrosados; raramente se observa ramificación pero ocasionalmente pueden aparecer, se observan células en forma de "Y". La tinción ácido-resistente puede ser irregular en cultivos viejos.

Los inóculos diluidos sobre medio solidificado con huevo, usualmente producen colonias después de 2-3 días de incubación, lisas, húmedas, brillantes, butirosas de forma convexa, con pigmentación amarillo profundo a anaranjado. La mayoría de las cepas son extremadamente sensibles a la luz, siendo no cromogénicas si crecen 1 ó 2 días en la oscuridad total, pero adquiriendo un pigmento amarillo cuando son expuestas brevemente a la luz. Ocasionalmente son encontradas colonias rugosas, así como pigmentadas.

Crece bien de 22 a 40°C; a 17 y 42°C el crecimiento es restringido y la producción de pigmento inhibida.

Aislado de ubres de vaca. Parece estar ampliamente distribuido en la naturaleza; encontrado

en praderas, pastizales, estanques de riego, pozos e igualmente, en ocasiones, en lesiones cutáneas en vacas.

Mycobacterium xenopi

Bacilos largos o filamentosos. Los inóculos diluidos en medio solidificado con huevo producen colonias lisas, no pigmentadas después de 14 días o más de incubación a 37°C, las colonias envejecidas son amarillas. Sobre agar Middlebrook pH 10. las colonias tienen centros opacos, rodeados por una franja de filamentos ramificados, que microscópicamente pueden ser evidenciados sobre la superficie del agar. Las colonias llegan a ser adherentes al medio por un crecimiento semejante a botones dentro del agar. Crecimiento óptimo a 40 - 45°C.

Ocasionalmente asociado con enfermedad pulmonar crónica, pero más frecuentemente aislado de secreciones humanas sin enfermedad asociada, no frecuente en enfermedad del tracto genitourinario. Aislado de granulomas dérmicos de *Xernopus laevis*. Respuesta variable en diferentes cepas de ratones inoculados intraperitonealmente con 0.2-10mg, pero pocos animales mueren, y limitadas lesiones macroscópicas aparecen en hígado, bazo, riñón o pulmón.

Los cobayos que reciben 4mg intravenosamente desarrollan abscesos caseosos en el sitio de inoculación; 1mg intravenoso no causa lesiones macroscópicas e intraperitonealmente causa nódulos macroscópicos en las vísceras de algunos animales; 0.1mg intracutáneamente causa infección y ulceración en el sitio.

Las gallinas que reciben 4mg intravenosamente desarrollan lesiones no muy grandes, pero 5mg por la misma vía, usualmente matan con lesiones de hígado y/o bazo; 1mg por esta ruta induce lesiones poco severas.

Los conejos que reciben 4mg intravenosamente desarrollan abscesos caseosos en el sitio de inoculación; 5mg intravenosamente causan lesiones macroscópicas o lesiones de articulaciones o cubiertas de tendones.

Estructura Antigénica: distinguido de otras micobacterias por reacciones de hipersensibilidad dérmica. Exhibe cuatro antígenos específicos por pruebas de inmunodifusión.

Mycobacterium malmolense

La morfología celular va de formas cocoides a bacilos cortos en medio espeso de huevo y agar albúmina-ácido oléico, se requiere más de una semana para observar crecimiento en un rango de temperatura de incubación de 22 a 37°C, las colonias son lisas y no pigmentadas; en medio de agar semisólido después de inoculación profunda se observa crecimiento debajo de la superficie como se observa en *M.bovis*, pero no con otras especies de micobacterias, produce ureasa; en agar produce pirazinamidasas, es capaz de crecer en presencia de isoniazida (1µg/ml), triacetazona (10µg/ml), hidrazida de ácido tiofen-2-carboxílico (1µg/ml), hidroliza tween a los 10 días de cultivo.

Se aisló de esputo y biopsias de pacientes con enfermedad pulmonar considerándose el agente etiológico de la enfermedad; la inoculación subcutánea de 0.01 mg de bacilos en cobayos produce lesiones locales pero no generalizadas, el mismo inóculo por vía intravenosa en pollos causa lesiones macroscópicas en hígado y bazo en aproximadamente la mitad de las aves y algunas murieron, el mismo inóculo por vía intravenosa en conejos causa lesiones mínimas y raras que contienen algunos pocos bacilos visibles.

La seroaglutinación demuestra un serovar único, distinto de otras especies, esto está de acuerdo con la demostración de un único patrón de lípidos superficiales por cromatografía en capa fina.

Mycobacterium shimoidei

Bacilos moderadamente largos, frecuentemente en "travesaño", en medio espeso de huevo aparecen colonias rugosas, no pigmentadas después de 14 a 21 días de incubación a 37°C, el rango de temperatura de incubación óptima es de 37 a 42°C, crece erráticamente a 28°C, produce pirazinamidasas y fosfatasa ácida, hidroliza tween a los 10 días de cultivo y resiste temperaturas de 68°C, resiste la inhibición por tiacetazona (10 µg/ml), hidrazida del ácido tiolen-2-carboxílico (1 µg/ml), izoniazida (1 µg/ml).

Fue aislado de esputo y se considera agente etiológico de enfermedad pulmonar.

Mycobacterium asiaticum

Bacilos cocoides, en medio espeso de huevo presenta crecimiento disgónico después de 15 a 20 días de cultivo a 37°C, usualmente fotocromógeno, pero ocasionalmente falla en la producción de pigmento después de la exposición a la luz, no produce pigmento en la oscuridad, la cepa original se aisló de monos, pero se ha considerado que una cepa es causante de enfermedad pulmonar humana, produce lesiones focales en pulmón de ratón después de inoculación intravenosa y puede provocar su muerte de 30 a 60 días.

Dos cepas de *M.asiaticum* estudiadas por técnicas intradérmicas recíprocas parecen ser homogéneas y distintas de otras 5 especies incluidas *M.simiae*, pero no se comparan con *M.gordoniae*, células intactas de *M.asiaticum* que no aglutinaron con un número de otras micobacterias.

Mycobacterium szulgai

Bacilos moderadamente largos con algunas estructuras en "travesaño", en medio espeso de huevo desarrolla colonias lisas y rugosas en dos semanas de cultivo a 37°C, en cultivo expuesto a la luz continua, desarrolla un pigmento naranja. Comportamiento fotocromógeno más pronunciado a 25°C que a 37°C, produce nicotinamidasas, pirazinamidasas y fosfatasa, presenta respuesta positiva a la catalasa, se le asocia con enfermedad pulmonar, adenitis cervical y bursitis olécranon en el hombre. Exhibe aglutinación específica con antisuero de *M.szulgai* y un patrón único de lípidos de

superficie por cromatografía de capa fina.

Mycobacterium haemophilum

Bacilos cortos, ocasionalmente curvados, fuertemente ácido-alcohol resistente, en medio de albúmina-ácido oléico o en medio espeso de huevo, desarrolla colonias de rugosas a lisas no pigmentadas después de 2 a 4 semanas de incubación a 32°C, siempre que el medio sea enriquecido con hemoglobina al 0.4% o hemina 60 µM, pero no con FeCl₃ o catalasa, crece lentamente a 25°C y 35°C y no crece a 37°C.

Aislado en Israel de un granuloma subcutáneo de un paciente, bajo tratamiento por enfermedad de Hodgkins, posteriormente se encontró en lesiones de piel de pacientes inmunosuprimidos en Australia. Los cobayos no desarrollan patología evidente después de la administración intravenosa, intramuscular o subcutánea de suspensiones densas, algunos ratones mueren de 2 a 4 semanas después de la inoculación, no se observan lesiones gruesas, pero se encuentran numerosos bacilos intracelulares en monocitos y macrófagos de hígado, riñón y bazo, la inyección intramuscular de 10⁶ a 10⁷ bacilos en ranas no causan enfermedad cuando el animal se mantiene a temperatura ambiente, pero el animal muere en 8 a 21 días cuando se le mantiene a 30°C y se encuentran bacilos en hígado y riñón. Se observa aglutinación específica para bacilos completos de *M.haemophilum*.

Mycobacterium farcinogenes

Filamentos cortos o largos curvados y ramificados en masas, marañas, o redes, puede encontrarse en pus procedente de lesiones o restos de cultivo, no fragmentan en formas bacilares, fuertemente ácido-alcohol resistentes, en medio espeso de huevo desarrolla colonias rugosas, amarillas convolucionadas, firmemente adheridas al medio y rodeadas de un halo iridiscente después de 15 a 20 días de cultivo. Produce nicotinamidasa, reduce nitratos. Aislado de lesiones de muermo en bovinos africanos, en administración subcutánea en cobayos produce abscesos supurativos después de 8 días que sanan lentamente, abscesos en testículos, vesícula seminal o vagina y grandes abscesos en paredes peritoneales y vísceras, la mayoría de los animales muere después de una infección prolongada.

Mycobacterium chelonae

Organismos pleomórficos que van desde bacilos largos y angostos hasta cortos y gruesos (0.2-0.5 x 1-6µm) también se han reportado formas cocoides (0.5µm), los cultivos de menos de 5 días son fuertemente alcohol-ácido-resistentes pero después de este tiempo comienzan a desarrollarse formas no ácido-resistentes, después de 3 o 5 días de incubación en la mayoría de los medios, un inóculo diluido produce colonias que pueden ser lisas, húmedas y brillantes o rugosas, usualmente no cromogénicas a color gamuza cremoso. Cuando crece en agar de harina de maíz no muestra la extensa red de filamentos observada en *M.fortuitum*.

Usualmente es capaz de crecer entre 22 a 40°C, es incapaz de crecer a 42°C; las especies de *M.chelonae* subespecie *chelonae*, a menudo no crecen o crecen muy pobremente a temperatura de 37°C o mayor. Cuando se reportó originalmente se dijo que sólo producía lesiones transitorias en ratones, hámsteres, cobayos y conejos. Estudios más recientes han revelado que la infección intravenosa en ratones con *M.chelonae* produce lesiones gruesas visibles en bazo, hígado, pulmón y riñón, ha causado cambios patológicos en tejido sinovial de rodilla y lesiones con abscesos en región glútea del hombre, raramente aislado de esputo (con o sin enfermedad relacionada), ha causado infecciones en heridas postoperatorias incluyendo implantes de válvulas cardiacas, mamoplastías e infecciones corneales, también se encuentra en suelo.

Se ha demostrado que esta especie es serológica y químicamente distinta de otras especies de crecimiento rápido muy relacionado.

Se ha presentado evidencia que muestra sinonimia *M.abscessus* y *M.borstelense* con *M.chelonae*, no obstante se ha demostrado que estas especies tienen una diferente composición lipídica.

Estudios de taxonomía numérica mostraron que *M.abscessus* difiere en algunos aspectos de *M.chelonae* y *M.borstelense* indicando la existencia de dos subespecies, estudios más recientes confirman esta situación, la homología ADN/ADN muestra que la designación de subespecies es válida.

Mycobacterium chelonae* subespecie *chelonae

Además de las propiedades indicadas antes, esta subespecie es incapaz de crecer en presencia de 1% de desoxicolato o nitrito 0.4M y no puede crecer con nicotinamida, benzamida o nitrito como única fuente de nitrógeno.

Mycobacterium chelonae* subespecie *abscessus

Además de las propiedades indicadas antes, esta subespecie sí es capaz de crecer en las condiciones indicadas para la subespecie *chelonae*.

Mycobacterium senegalense

Originalmente descrita como una subespecie de *M.farcinogenes*, posteriormente se reconoció como una especie totalmente diferente, son organismos que crecen como filamentos cortos o largos, curvos y ramificados, organizados en masa o redes no fragmentan a formas bacilares.

Después de 1 ó 2 días de incubación a 25-37°C en la mayoría de los medios aparecen colonias rugosas, convolucionadas fuertemente, unidas al medio y rodeadas de un halo iridiscente, su coloración usualmente va de incolora a color ocre, la homología ADN/ADN indica la unidad de este taxón.

M.senegalense es uno de los dos agentes alcohol-ácido-resistentes causantes del muermo, una enfermedad de piel y sistema linfático superficial en bovinos africanos, siendo *M.farcinogenes* el segundo agente.

Mycobacterium porcinum

Bacilo de 1.5-6µm de largo y 0.5µm de ancho, en medio base de huevo produce colonias lisas a rugosas no fotocromogénicas a los tres días de cultivo, crece a 28 - 42°C pero no a 45°C, la especie que muestra respuesta positiva en 3 días a la arilsulfatasa, resistencia a NH₂OH.HCl (0.5 µg/ml) y degradación de p-aminosalicilato, *M.porcinum* difiere de *M.fortuitum* por su carencia de nitroreductasa, por exhibir actividad positiva de succinamidasa y por utilizar benzoato como única fuente de carbono. Se aisló de ganado vacuno con linfadenitis tuberculósica.

CLASIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS SEGÚN RUNYON

i) Micobacterias típicas: (causantes de tuberculosis)

1. *Mycobacterium tuberculosis*: colonias rugosas, produce niacina, crecimiento lento, crecimiento eugónico (exuberante).
2. *Mycobacterium bovis*: colonias pequeñas lisas, crecimiento disgónico lento, no produce niacina.

ii) Micobacterias atípicas o anónimas:

1. Crecimiento lento:

a) Grupo I de Runyon (Fotocromógenos): colonias pigmentadas en la luz, no pigmentadas cuando crecen en la oscuridad.

Ejemplos: *M.marinum*
M.kansasii

b) Grupo II de Runyon (Escotocromógenos): pigmento anaranjado a rojo tanto en la luz como en la oscuridad.

Ejemplos: *M.scrofulaceum*

c) Grupo III de Runyon (no pigmentados): no se pigmentan cuando crecen en la luz u oscuridad. Son niacina negativos.

Ejemplos: *M.intracellulare* (bacilo de Battey)
M.ulcerans
M.avium

M.intracellulare no responde bien a la quimioterapia. Este puede prevalecer en infecciones humanas sobre *M.tuberculosis*

2. Crecimiento rápido:

d) Grupo IV de Runyon: especies principalmente saprofitas.

Ejemplos: *M. smegmatis*

M. phlei

M. fortuitum (puede producir prueba de la tuberculina, positiva).

M. flavescens

M. vaccae.

NOCARDIA

El género *Nocardia* está conformado por un grupo heterogéneo de microorganismos aeróbicos aún no totalmente bien caracterizados. Son bacterias Gram positivas, parcialmente alcohol-ácido-resistentes o no alcohol-ácido-resistentes, filamentosas, que presentan extensa ramificación celular. Los filamentos ramificados fragmentan dentro de las células pleomórficas variando de formas cocoides a bacilares u organismos semejantes a *Corynebacterium*. Si no son observadas cuidadosamente pueden ser fácilmente confundidas con otros organismos. Son aeróbicos y pueden ser muy difíciles de diferenciar de *Mycobacterium*, género con el cual están filogenéticamente relacionadas. Pueden ser diferenciados de *Actinomyces* y *Streptomyces* con base en un análisis de pared celular. Las paredes celulares de *Nocardia*, *Mycobacterium* y *Corynebacterium* son muy similares.

La especie tipo del género es la *N. asteroides*. Con el advenimiento de los nuevos métodos de estudio taxonómico, incluyendo la taxonomía molecular basada en estudios de el ARN ribosomal 16S, con la utilización de estos métodos el complejo *Nocardia asteroides* ha sido dividido en muchos subtipos y diferentes especies. Con la idea proveer una base estable de referencia para toda esta confusión taxonómica, la *N. asteroides* ATCC19247 ha sido establecida como la cepa tipo para establecer la *N. asteroides sensu stricto*. Todas las otras *Nocardias* deberán ser comparadas con esta cepa. Otros miembros del complejo *N. asteroides* han sido renombrados y éstos incluyen: *N. farcinica*, *N. nova*, *N. transvalensis*, *N. cyriacigeorgici*, *N. puris*, *N. abscesus*, *N. veterana*, *N. africana*, *N. cerradoensis*, *N. tenerifensis*, *N. inohanensis*, *N. yamanashiensis*, *N. niigatensis*, *N. neocaledoniensis*, *N. asiatica*, *N. testaceus*, *N. senatus*, *N. mexicana sp.* Las otras especies caracterizadas incluyen: *N. brasiliensis*, *N. pseudobrasiliensis*, *N. otitidiscaviarum*, *N. seriolae*, *N. salmonicida*, *N. vaccinii*, *N. crassostreae*, *N. brevicatena*, *N. carnea*, *N. lactamdurans*, *N. paucivorans*, *N. flavorosea*, *N. pseudovaccinii*, *N. uniformis*, *N. fusca*, *N. pseudosporangifera*, *N. violaceofuscai*, *N. cummidelens*, *N. fluminea*, *N. soli*, *N. corynebacteroides*, *N. beijingensis*, *N. arthritidis*, y *N. pigrifrangens sp. nov.* Desafortunadamente, debido a la heterogenicidad de este complejo, nuevas especies de *Nocardia* vienen siendo descritas de una manera bastante regular, por lo que la taxonomía de estos microorganismos permanece en constante cambio.

Existen numerosas especies saprofiticas de *Nocardia* encontradas comúnmente en el suelo, las cuales en términos generales no son patogénicas, por ejemplo, la *N. asteroides* ATCC19247 no es patógena para los animales de experimentación a diferencia de muchas otras *N. asteroides* que son moderadas o muy virulentas para los animales de experimentación. Una de estas cepas es la *N. asteroides* GUH-2, la cual pertenece al subgrupo VI de Wallace (esta subagrupación se basa en los patrones de susceptibilidad a los antibióticos visualizados en el antibiograma). Las *N. asteroides* pertenecientes al subgrupo VI de Wallace, representan las cepas de *Nocardias* aisladas en los Estados Unidos de casos de nocardiosis humanas. *N. asteroides* ATCC19247 y GUH-2 representan el polo opuesto de la continuidad taxonómica para estas especies. La mayoría de las cepas aisladas de casos clínicos, tanto de humanos como de animales que en el pasado fueron identificadas como *N. asteroides*, actualmente están más relacionadas a *N. cyriacigeorgici* (subgrupo VI Wallace de *N. asteroides*). Microorganismos semejantes a *N. asteroides* ATCC19247 casi nunca han sido aislados de infecciones en humanos. Debido a que la mayor parte de las cepas aisladas de casos

clínicos incluyendo aquellos del pasado histórico, es decir, anteriores a la *N. cyriacigeorgici*, parece que pertenecen al subgrupo VI de *N.asteroides*, podría argumentarse que el subgrupo VI de *N. asteroides* (*N. cyriacigeorgici*) debería ser reasignado al estatus de *N. asteroides sensu stricto*; entonces la cepa tipo más correcta para estas especies podría ser la *N. asteroides* ATCC14759 la cual ha sido extensivamente estudiada. *N.asteroides* GUH-2 es muy similar a la ATCC14759 y según datos obtenidos por June Brown del *Communicable Disease Center* (CDC), cito: “He secuenciado utilizando el ARNr 16S de la cepa GUH-2, y así mismo realicé un alineamiento con la cepa DSM44484 que es la cepa tipo de *N. cyriacigeorgici*, variante de Roth DSM 43005, y mi secuencia con la *N. asteroides* del VI de Wallace (ATCC14759) y en base a estos resultados, puedo decir que estas cepas son casi idénticas. La cepa tipo DSM (tanto en mi secuencia como en la Roth y la cepa *N.asteroides* 14759, son idénticas. *N.asteroides* GUH-2 es idéntica a la cepa tipo de *N.cyriacigeorgici* y probablemente *N.asteroides* 14759. Por medio de la secuenciación de ARNr 16S, las cepas tipo DSM 44484, GUH-2 y ATCC14759 son prácticamente idénticas”. Desde el punto de vista de la clínica, es muy importante identificar la especie correcta de *Nocardia* causante de una enfermedad específica, esto debido a que la terapia a ser establecida puede ser completamente diferente para cada especie. Previo a toda esta nueva taxonomía del complejo de *Nocardia*, tres eran las especies conocidas causantes de la mayoría de las infecciones nocardias en el hombre, *N.asteroides*, *N.brasiliensis* y *N.caviae*. (*N.otitidiscaviarum*).

Las infecciones por nocardia en el hombre han sido consideradas generalmente raras, sin embargo, estudios recientes revelan numerosos casos reportados en los Estados Unidos y Europa. Todos los médicos puntualizan que existe un problema en el reconocimiento de las infecciones por nocardias, de esta forma, no son reconocidas o son mal diagnosticadas. La tasa de mortalidad actual por infecciones por nocardias en el hombre se aproxima al 50%.

Por lo anterior se vuelve evidente que las enfermedades causadas por *Nocardia* no son tan raras como alguna vez se creyó. Existen dos tipos básicos de enfermedad en el hombre causadas muy frecuentemente por *N.asteroides* causando una infección pulmonar primaria la cual frecuentemente se disemina a través del torrente sanguíneo y linfático a otras partes del cuerpo. Sin embargo, también puede ser inicialmente una enfermedad del sistema nervioso central, riñones, ojos u otros órganos. Por otro lado, los micetomas por *Nocardia*, son generalmente causados por *N.brasiliensis*. Estos son caracterizados como infecciones crónicas granulomatosas que se agravan progresivamente en un período de varios años. Siendo característica importante la producción de granos (microcolonias de estos microorganismos) que salen por las fístulas de la lesión y el pus.

El micetoma usualmente permanece localizado desarrollándose por extensión directa a través de los tejidos.

La nocardiosis es más comúnmente reportada en los Estados Unidos, aunque posee una distribución mundial. Los micetomas por *Nocardia* han sido reportados en los Estados Unidos pero son muy comunes en regiones tropicales y subtropicales del mundo. La nocardiosis frecuentemente aparece como segunda infección en individuos sometidos a condiciones extenuantes y debilitantes, tales como proteinosis alveolar pulmonar, tuberculosis, asma y enfisema, neoplasias, leucemia, etc.

En resumen, algunos laboratorios enfatizan un marcado incremento de infecciones por Nocardia asociadas con el uso prolongado de corticosteroides, el tratamiento de enfermedades neoplásicas malignas y con el uso de agentes inmunosupresores. El diagnóstico de nocardiosis y micetomas por Nocardia puede ser difícil y frecuentemente el diagnóstico correcto es realizado “post mortem”.

A menudo el organismo no crece partiendo de aislamientos del tejido por lo cual esos cultivos son reportados como negativos. Las Nocardias pueden ser alcohol-ácido-resistentes en el tejido y fragmentarse en células cocoides o bacilares, por lo que frecuentemente son confundidas con *Mycobacterium*.

Una vez que los organismos son cultivados pueden ser distinguidos de *Mycobacterium* dado que *Nocardia* produce células filamentosas ramificadas en todos los medios. Las colonias, sin embargo, presentan gran variación y pueden ser lisas y grasosas, rugosas y cerosas o elevadas y duras. El “micelio aéreo” que produce puede ser similar al de *Streptomyces* en algunas cepas.

Las infecciones por nocardia no responden a la penicilina usada para las actinomicosis o a la isoniazida y al PAS usados para la tuberculosis, por lo tanto, la diferenciación y correcta identificación del agente causal de esta enfermedad frecuentemente es posterior a la muerte del paciente. La droga de elección son las sulfonamidas, particularmente sulfadiazina, posiblemente en combinación con cicloserina. La quimioterapia es efectiva sólo en las etapas tempranas de la enfermedad.

Las etapas avanzadas, tanto de nocardiosis como de micetomas por Nocardia, requieren cirugía parcial, ya que los medicamentos son pocas veces efectivos. El pronóstico para una nocardiosis establecida es pobre.

N. asteroides, *N. brasiliensis* y *N. caviae* (*otitidiscaviarum*) pueden ser aisladas del suelo en casi cualquier parte del mundo, existen en la naturaleza primordialmente como saprófitos. No se conoce cómo y por qué causan tan devastadora enfermedad en el hombre.

La morfología microscópica varía de formas que producen micelio esparcido debido a la temprana división en fragmentos cocoides y/o bacilares, a aquellas en las cuales la fragmentación es retenida, permitiendo una abundante producción de micelio. Los filamentos ramificados pueden ser encontrados en la mayoría de los cultivos; pero no son comunes en cultivos viejos de algunas especies. El micelio aéreo es formado por algunos organismos los cuales pueden fragmentar irregularmente en células cocoides y bacilares, similares a aquellos producidos por el micelio vegetativo. Los miembros del género pueden ser divididos en 3 grupos morfológicos de acuerdo al grado de desarrollo micelial.

Grupo I: los miembros de este grupo tienen una cantidad limitada de desarrollo micelial debido al inicio de la fragmentación en el centro de la colonia después de 2-14 horas de incubación. La textura de la colonia es blanda, butirosa o mucosa.

Grupo II: en los miembros de este grupo la fragmentación es retardada de 18-20 horas, así que se da una ramificación extensiva del micelio. No se produce micelio aéreo. La textura de las colonias tiende a ser escamosa, pastosa o con una superficie mate.

Grupo III: en los miembros de este grupo la fragmentación es a menudo retardada por varios días permitiendo un abundante desarrollo micelial. El micelio aéreo es comúnmente producido por los miembros de este grupo, los cuales pueden fragmentar en elementos cocoides y bacilares.

La pared del micelio permanece como la pared de los fragmentos del mismo modo que la producción de artrosporas en los hongos; por lo tanto, no se les considera esporas “*sensu stricto*”, pero sí fragmentos miceliales. La textura colonial de los miembros de este grupo puede ser áspera, cartilaginosa o coriácea.

Característicamente, una colonia se desarrolla por elongación de un fragmento micelial cocoide o bacilar. La ramificación primaria comienza a formarse después de varias horas de incubación con ramificaciones secundarias y terciarias seguidas, aunque la fragmentación generalmente impide la ramificación en las *Nocardias* del Grupo I.

La fragmentación empieza en el centro de la colonia joven produciendo elementos bacilares los cuales continúan elongándose y otra vez se fragmentan. Los elementos bacilares más lejanos al centro de la microcolonia son rodeados por un micelio periférico ramificado.

Las células cocoides que han sido llamadas “microcistos” o “clamidosporas” son producidas por algunos miembros del grupo I y II. Estas estructuras son más resistentes al calor que las células vegetativas, sobreviviendo a 80°C varias horas.

Gram positivas. Algunas especies alcohol-ácido-resistentes a parcialmente alcohol-ácido-resistentes. Aerobios facultativos. No móviles.

Algunas especies de *Nocardia* producen pigmentos; los pigmentos carotenoides son los más comunes y mejor conocidos.

Generalmente resistentes a la lisozima. Se reconocen fagos virulentos para pocas especies; se ha reportado evidencia de un sistema lisogénico para al menos una especie.

El contenido de G + C del ADN nocárdico varía de 60-72 moles %. La distribución parece discontinua y puede estar burdamente correlacionada a los grupos morfológicos: grupo I: 61-63% de G + C; grupo II 66-68% de G + C y grupo III: 68-72% de G + C.

Especie tipo: *Nocardia asteroides* (Eppinger) de acuerdo con la opinión No. 58 de la Comisión Judicial en 1985.

Nocardia asteroides

El crecimiento empieza después de 10 horas de incubación por elongación y formación del tubo germinal de elementos bacilares y cocoides. El crecimiento es lento y la ramificación primaria empieza después de cerca de 24 horas de incubación. Hay un extensivo desarrollo micelial puesto que la fragmentación empieza hasta después de 4 días de incubación. Los filamentos empiezan a romperse en el centro de las microcolonias mientras que la hifa periférica continúa creciendo y ramificando.

La producción de micelio aéreo varía de acuerdo con la cepa del organismo y condiciones de cultivo. En cultivos envejecidos, las células bacilares y cocoides están mezcladas con elementos hifales. La hifa larga ramificada persiste.

Grupo morfológico III. alcohol-ácido resistente.

Sobre agar nutritivo las colonias son elevadas, acumuladas, plegadas y granulares con bordes irregulares. La mayoría de las cepas se colorean de amarillo-naranja. Generalmente producen un micelio aéreo delgado a lo largo de los márgenes de la colonia.

Producen colonias delgadas y escamosas, sobre la gelatina nutritiva, sin licuarla. Producen colonias delgadas y escamosas, irregulares, de color amarillo naranja sobre medio a base de sales minerales y glucosa.

Sobre agar glucosa extracto de levadura, son producidas colonias acumuladas, plegadas, irregulares llegando a ser de color anaranjado rojizo profundo y cubiertas con micelio aéreo blanco.

Fermentan el adonitol, la arbutina, la dextrina, la D-fructuosa, la D-glucosa y la manosa, sin producir gas.

La esculina, la alantoína, la benzina, y los tweens 20, 40, 60 y la urea son degradados. Las siguientes sustancias sirven como únicas fuentes de carbono y energía: el ácido adípico, la D-fructosa, la D-glucosa, el glicerol, la maltosa, el manitol, la manosa, la parafina, el ácido sebácico, el acetato de sodio, el butirato de sodio, el malato-H de sodio, el propionato de sodio, el piruvato de sodio, el succinato de sodio y la testosterona.

Alcaliniza la leche tornasolada en una semana, no hay cambio posterior. Reducen el nitrato. Rango de temperatura: 10 - 50°C. Temperatura óptima: 28-30°C. Rango de pH: 6.0-10.0. pH óptimo: 7.5.

El crecimiento no es inhibido por 7% de sales. No es sensible a la penicilina (discos de 5UI). Es resistente a la lisozima.

Los aislamientos (diferentes cepas) de este organismo difieren marcadamente en

patogenicidad para ratones. La mayoría de las cepas requieren de un adyuvante antes de que ocurra la invasión de tejido. Sin embargo, algunas cepas matan ratones por intoxicación aguda en 1 ó 2 días. Los conejos y cobayos son más susceptibles que los ratones.

Aislado de lesiones varias en humanos y otros animales; también de suelos.
El contenido de G + C del ADN varía de 67.0 - 69.4 moles %.

Nocardia brasiliensis

Filamentos ramificados formando micelio extensivo sobre la mayoría de los medios, alrededor de 1µm de diámetro. La fragmentación empieza en el centro de la colonia después de alrededor de 4 días de incubación y produce células bacilares y cocoides irregulares. El micelio vegetativo de color amarillo-anaranjado a café con hifa aérea delgada y blanca sobre la superficie. Las colonias son granulares, acumuladas, convolutas. Producen un exopigmento amarillo pardo sobre la mayoría de los medios orgánicos.

Grupo morfológico III. Alcohol-acido-resistente.

Las colonias en agar nutritivo son de color anaranjado sucio, granulares, acumuladas con hifa aérea escasa y blanca en los bordes.

Sobre agar nitrato glicerol las colonias son acumuladas, de color coral con micelio aéreo escaso en los márgenes.

Sobre agar extracto de levadura glucosa, las colonias son de color amarillo a naranja o color tostado (canela), elevadas, plegadas. La producción de hifa aérea blanca es variable, de nula a abundante dependiendo de la cepa. Un pigmento soluble amarillo es producido en cultivos viejos.

Crecimiento anaranjado tostado, seco, granulado, con micelio aéreo escaso y blanco sobre un pedazo de papa.

Fermentan la arbutina, la D-arabinosa, la D-fructosa, la D-galactosa, el DL-inositol, la glucosa, el glicerol, el manitol, la manosa, el sorbitol y la trealosa. Hidroliza la esculina, la caseína, la gelatina, la guanina, la hipoxantina, la queratina, la tirosina y la urea, sin producción de gas. Las siguientes sustancias sirven como únicas fuentes de carbón y energía: el acetato, el butirato, el citrato, la D-fructosa, la D-galactosa, la glucosa, el inositol, el malato, la maltosa, el manitol, la manosa, la parafina, la L-prolina, el propionato, el piruvato, el ácido sebácico, el sorbitol y el succinato.

Coagulan en forma lenta a la leche tornasolada, seguida de peptonización alcalina, con producción de película amarillo-naranja. Reducen el nitrato.

Rango de temperatura: 10-45°C, no crece a 50°C. Rango de pH: 6.0-9.0. Crece bien en 5% de cloruro de sodio. Completamente inhibido a 7% de cloruro de sodio. No sensible a penicilina (discos de 5UI). Resistente a la lisozima.

Produce gránulos multilobulados en ratones blancos, cobayos y conejos. Aislado de varias clases de nocardiosis incluyendo micetoma. Este organismo se encuentra más comúnmente implicado en nocardiosis y micetoma en los trópicos, que en regiones templadas. El contenido de G + C del ADN varía de 67 - 68 moles %.

Nocardia farcinica

Las microcolonias son formadas de células bacilares y cocoides por elongación y formación del tubo germinal. La ramificación primaria empieza después de 24 horas de incubación. Forman un micelio extenso, pero la fragmentación empieza hasta que los cultivos tienen de 3 a 5 días.

El micelio aéreo es esparcido, grisáceo, aparece en la mayoría de los medios con cultivos viejos. En cultivos envejecidos los productos de fragmentación consisten en elementos hifales, bacilares y cocoides. La hifas largas ramificadas y no fragmentadas persisten.

Grupo morfológico III. alcohol-ácido-resistentes. Colonias de lento crecimiento, planas, duras y grisáceas sobre agar nutritivo, cubiertas por un micelio aéreo delgado y blanquecino, sobre la gelatina nutritiva las colonias son pequeñas, escamosas e irregulares teniendo una apariencia granular. No existe licuefacción.

Producen colonias irregulares grisáceas sobre medio a base de sales minerales y glucosa; con pocas hifas aéreas en los bordes.

Producen un crecimiento amarillo grisáceo, seco desmenuzable, coriáceo cuando cultivadas sobre un pedazo de papa. Hifa aérea al declive.

Fermenta la D-fructosa y la manosa. La esculina, el tween 20, 40 y la urea son hidrolizados. Los siguientes compuestos sirven como únicas fuentes de energía y carbono : La D-fructosa, la D-glucosa, la maltosa, la parafina, el acetato de sodio, el butirato de sodio, el malato H de sodio, el propionato de sodio, el piruvato de sodio, el succinato de sodio y la testosterona.

Reducción de nitrato, variable. La leche tornasolada es alcalinizada después de 5 días; no hay cambio posterior.

Rango de temperatura: 20 - 40°C. Temperatura óptima: 35°C. Rango de pH: 6.0-10.0 pH óptimo: 7.5.

El crecimiento no es inhibido por 5% de cloruro de sodio. No es sensible a la penicilina (discos con 5 UI). Resistente a la lisozima.

Fuente: presumiblemente de un caso de muermo bovino. El contenido de G+C del ADN es 71.0 moles %.

Nocardia otitidiscaviarum (*N.cavie*)

Fragmentos miceláneos cocoides y bacilares producen extensivamente microcolonias ramificadas. La fragmentación es retardada por 5 días, permitiendo el desarrollo de micelio aéreo y vegetativo abundante. Este último es ramificado y algunas veces enrollado.

Los fragmentos bacilares son producidos en el centro de la microcolonia y la división celular se produce a una tasa acelerada con las colonias envejecidas. Tanto el micelio aéreo como el vegetativo fragmentan en segmentos hifales más pequeños, algunos de los cuales llegan a ser cocoides en cultivos más viejos.

Grupo morfológico III. Alcohol-ácido-resistentes en ciertos medios, como el agar ácido oléico de Dubos. Las colonias sobre agar nutritivo son elevadas, convolutas, irregulares y duras; de color rosa sucio. Micelio aéreo delgado y blanquecino en cultivos más viejos.

Crecimiento escaso sobre gelatina nutritiva, no hay licuefacción. Crecimiento elevado, convoluto, granular e irregular sobre un pedazo de papa. Crecimiento vegetativo grisáceo cubierto con hifa blaquecina aérea. Fermentación de la arabinosa, la D-fructosa, la D-glucosa, el glicerol, el inositol, la maltosa, el manitol y la trealosa. Sin producción de gas.

Los siguientes compuestos sirven como única fuente de carbono: la D-fructosa, el glicerol, la maltosa, el manitol, la parafina, el acetato de sodio, el butirato de sodio, el propionato de sodio, el piruvato de sodio, la testosterona y la trealosa.

La hipoxantina, la xantina y la urea son hidrolizadas. Coagulación y alcalinización de la leche tornasolada. El nitrato es reducido. Rango de temperatura: 20-45°C. Temperatura óptima: 30°C. Completamente inhibida a 50°C. Rango de pH: 7.0-10.0, pH óptimo: 7.5. No inhibido por 7% de cloruro de sodio. No sensible a la penicilina (discos con 5UI). Resistente a la lisozima.

Produce el 100% de mortalidad en ratones blancos en un lapso de 7 días, cuando es inyectada con mucina gástrica como adyuvante.

Los conejos y cobayos usualmente sobreviven, pero desarrollan lesiones según la vía de inoculación.

Aislados de infección del oído de un cobayo en Sumatra y de suelos de los Estados Unidos e India.

El contenido de G + C del ADN es 65.4 moles %.

Nocardia rhodnii (Rhodococcus)

Las colonias consisten de un micelio ramificado extensamente. La fragmentación empieza después de 24 horas de incubación en la parte central de una colonia pequeña. Elementos bacilares ramificados cada vez más cortos son formados conforme envejece el cultivo. Produce hifa aérea corta y escasa.

Los centros de las microcolonias llegan a estar llenos de elementos bacilares y cocoides mientras que la hifa periférica continúa elongándose y ramificándose. Los microcistos son producidos en cultivos más viejos.

Grupo morfológico II. No alcohol-ácido-resistentes. Las colonias sobre agar nutritivo son convolutas, de color salmón, teniendo una textura granular y márgenes irregulares; micelio aéreo escaso y blanquecino presente.

Colonias elevadas, redondas, de color rosa pálido sobre gelatina nutritiva, licuefacción rápida. Crecimiento abundante de color rosa coral, acumulado, convoluto, sobre agar glucosa peptona. Masas acumuladas irregulares de color salmón, producidas sobre trozos de papa con micelio aéreo escaso, blanquecino al secarse.

Produce ácido de etanol, D-fructosa, maltosa, manitol, manosa, sorbitol, sacarosa y trealosa. Los siguientes compuestos sirven como única fuente de energía y carbono: ácido adípico, malato, n-butirato, propionato, ácido sebásico y tartrato. Película anaranjada sobre leche tornasolada, llega a ser alcalina con el tiempo, no hay coagulación o peptonización. Reduce nitratos.

Temperatura óptima: 28°C. Sensible a la penicilina. Sensible a la lisozima. Aislado del redúvideo *Rhodnius prolixus*.

Nocardia rugosa

Las microcolonias consisten de un micelio ramificado extensivamente, el cual empieza a fragmentar en el centro de la colonia en hifas ramificadas cortas después de 24 horas de incubación. La hifa central se fragmenta llegando a ser más corta conforme se avejenta el cultivo. Los microcistos son encontrados en los cultivos más viejos. No se produce micelio aéreo.

Grupo morfológico II. No alcohol-ácido-resistentes. Colonias elevadas de color crema sobre agar nutritivo, las cuales son rugosas, convolutas y tienen una consistencia pastosa; producen un pigmento soluble pardo después de 2 semanas de incubación.

Colonias de color canela (quemado) acumuladas, plegadas con márgenes irregulares sobre gelatina nutritiva; ésta es licuada. Las colonias sobre agar glucosa asparagina son de apariencia cremosa, elevadas, arrugadas con superficie húmeda y márgenes irregulares.

Colonias fuertemente convolutas, irregulares, acumuladas de color crema sobre agar peptona glicerol; un pigmento soluble café es producido en los cultivos más viejos. Colonias lisas, plegadas, de color crema a tostado (quemado) sobre agar de papa con consistencia pastosa y márgenes irregulares.

Produce ácido de adonitol, L-arabinosa, galactosa, glucosa, glicerol, D-manitol, ramnosa y ribosa. Alcalinización de la leche tornasolada; hay coagulación, no peptonización. Temperatura óptima: 34°C. Sobrevive a temperatura de 60°C por una hora y media, pero no por tres. pH óptimo: 7.4. Aislado del rumen de ganado.

Nocardia transvalensis

Extensivo micelio vegetativo y aéreo, producido por elementos bacilares germinados. La fragmentación es retardada por 5 o más días, así las microcolonias resultan del micelio esparcido. El estroma vegetativo está algo sombreado de rosa a naranja sobre la mayoría de medios y el micelio aéreo es blanco. La hifa vegetativa en bastones más cortos como lo hace el micelio aéreo. Gotitas de exudado incoloras formadas en la mayoría de medios.

Grupo morfológico III. Ácido resistente. Crecimiento pobre sobre agar nutritivo, colonias rosadas pequeñas, llegando a estar cubiertas con hifa aérea blanca con el paso del tiempo.

Crecimiento escaso sobre gelatina nutritiva, no hay licuefacción. Colonias pequeñas, convolutas sobre agar nitrato glicerol de color coral con hifa aérea blanca escasa. Sobre agar peptona glucosa colonias pequeñas, elevadas, de color salmón con una cubierta delgada de hifa aérea blanca.

Crecimiento pobre sobre agar almidón, no hay hidrólisis. Sobre un pedazo de papa el crecimiento es elevado, acumulado, convoluto de color salmón, cubierto con micelio aéreo blanco. Leche tornasolada alcalina; no hay coagulación o peptonización. Nitrato no reducido. Temperatura óptima: 28 - 30°C pH óptimo: 7.5. Aislado de micetoma del pie en Sudáfrica. El contenido de G+C del ADN es 69.0 moles %.

STREPTOMYCES

Los “*Streptomyces*” son bacterias Gram positivas que forman filamentos extensivamente ramificados que no fragmentan como los de *Nocardia*. Las células son usualmente no alcohol-ácido-resistentes y pueden ser diferenciadas de *Nocardia* con base en un análisis de pared celular.

La pared celular de *Nocardia* contiene arabinosa y ácido meso-diaminopimélico. Todas las cepas de *Streptomyces* carecen de arabinosa y contienen ácido L-diaminopimélico en sus paredes celulares. Los *Streptomyces* son organismos del suelo, pero ocasionalmente pueden causar micetoma en el hombre (muy difícil de distinguir del micetoma por *N.brasiliensis*). Los *Streptomyces* forman micelio aéreo con esporas, sin embargo, existen mutantes que no producen esporas sobre el “micelio aéreo que pueden ser muy difíciles de distinguir de *Nocardia* a menos que el análisis de pared celular sea llevado a cabo.

Los *Streptomyces* son más importantes como fuentes de antibióticos que como patógenos ocasionales en el hombre. Poco más de quinientos antibióticos han sido descubiertos como productos de varios miembros de este género, siendo muchos de estos de gran valor práctico. De esta manera, los *Streptomyces* son el centro de una industria farmacéutica multimillonaria en dólares.

Streptomyces paraguayensis

Posee pared celular del tipo I que contiene cantidades mayores de ácido L-diaminopimélico (DAP) y glicina, así como glucosamina, ácido murámico, ácido glutámico y alanina en menor proporción. Utiliza caseína, tirosina, xantina, gelatina, leche púrpura de bromocresol y urea en un periodo de 2 semanas a 27°C. No utiliza almidón. Existe duda de la existencia de esta especie como agente patógeno distinto. Está asociado con el micetoma granuloso negro. Los cultivos designados como *N.paraguayensis* se asemejan a *Streptomyces* saprófitos, tanto morfológicamente (colonias blancas o color crema a gris, duras con centro convexo, a menudo presentando hifa aérea corta) como fisiológicamente y poseen pared celular del mismo tipo.

Streptomyces somaliensis

Poseen pared celular del tipo I que contiene glucosamina, ácido murámico, ácido glutámico y alanina y cantidades mayores de ácido L-diaminopimélico (DAP) y glicina, llevan a cabo la utilización de caseína, tirosina, gelatina, leche púrpura de bromocresol en 2 semanas a 27°C y es ligeramente positiva para almidón. No utilizan xantina y urea. No forma ácido de lactosa y xilosa. En pus se observan gránulos duros de color amarillo a café, redondos a ovales de 1 - 2 mm de diámetro.

En agar Hickey y Tresner los gránulos pueden ser grandes o diminutos, redondos, densos y homogéneos; pero se tiñen de color púrpura ligero y a menudo son parcialmente rosa en parches; tienden al rompimiento en tiras paralelas, los bordes son lisos, suavemente definidos. Crecen lentamente en agar glucosa Sabouraud a una temperatura óptima de 30°C.

El crecimiento es coriáceo, eventualmente acumulado plegado de color crema a café o negro, glabroso o con hifa aérea blanquecina. No fragmentada; la hifa aérea puede formar cadenas de conidios características del género.

ACTINOMADURA

Bacterias Gram positivas, quimioorganotróficas, aeróbicas con hifas vegetativas extensamente ramificadas formando un micelio de sustrato denso y no fragmentado; micelio aéreo moderadamente desarrollado o ausente, cuando el micelio aéreo está ausente las colonias tienen un aspecto cartilaginoso o de cuero. El micelio aéreo maduro forma cadenas cortas u ocasionalmente largas de artrosporas. Las cadenas de esporas son largas ganchudas (rizos abiertos) o espirales irregulares (1 a 4 vueltas) la superficie de la espora es lisa o verrugosa. El color del micelio aéreo maduro va de blanco, gris a marrón, amarillo, rojo (rosa y rojo), azul, verdoso o violeta.

El rango de temperatura de incubación va de 24 a 45°C, algunas especies crecen a temperaturas del rango termofílico (arriba de 55°C); poseen pared celular tipo III que contiene meso-DAP como principal ácido diaminado y cantidades grandes de galactosa en la mayoría de las especies, aunque algunas especies contienen cantidades pequeñas de L-DAP, el hidrolizado de células intactas contiene el azúcar madurosa, no se encuentran ácidos micólicos, las menaquinonas son predominantemente de los tipos MK-9(H₄) y MK-9(H₆), también pueden encontrarse menaquinonas de los tipos MK9-(H₂) y MK-9(H₈).

Se aíslan de suelos de diferentes regiones, también pueden encontrarse en especímenes clínicos, se sabe que *A.maduræ* y *A.pelletieri* son causantes de actinomicetoma humano en áreas tropicales y subtropicales, particularmente en África y América, se piensa que el hábitat natural de estas especies patógenas de actinomadura es el medio ambiente, particularmente las capas superficiales del suelo, a partir de donde invaden el cuerpo humano mediante polvo o partículas contaminadas que penetran en lesiones de las extremidades inferiores, esta es la explicación más aceptada de la etiología del “pie de madura” debido a que esta enfermedad generalmente se localiza en extremidades inferiores, no obstante, pueden también presentarse en otras zonas del cuerpo. Se ha reportado que algunas cepas virulentas de *A.maduræ* producen una colagenasa que tiene un papel significativo en la patogenicidad del organismo.

Pueden emplearse muchos medios diferentes para el aislamiento de cepas de actinomadura, especialmente a partir de suelo, los que han resultado más adecuados son: Agar de harina de avena, agar de extracto de levadura - extracto de malta, agar de almidón y sales minerales, agar de Bennett-sacarosa y agar de glicerol- asparagina. Las cepas pueden ser aisladas por técnicas de dilución después de incubación por 14 a 21 días, el enriquecimiento de actinomadura en procedimientos de aislamiento de suelo puede conseguirse por métodos relativamente sencillos que van desde el calentamiento de las muestras de suelo (100°C por una hora) hasta la adición de algunos antibióticos para inhibir el crecimiento de los contaminantes que comúnmente son estreptomicetes, los antibióticos que mejores resultados han dado son estreptomycinina (0.5, 1.0 ó 2.0µg/ml), rubomicina (5.0, 10.0 ó 20.0µg/ml) y bruneomicina (0.5, 1.0 ó 2.0µg/ml).

El contenido de G+C del ADN de este género va de 65 a 69 moles % la especie tipo es *Actinomadura maduræ*.

Actinomadura madurae

Presenta cadenas cortas de espora ganchudas o rizadas en grupos que emergen directamente de la superficie del agar o unidos a hifas aéreas largas, se presentan de 3 a 12 esporas elípticas o redondas de superficie verrugosa por cadena, el crecimiento en agar de harina de avena es bueno, las colonias presentan aspecto de cuero, no se observa micelio aéreo, el micelio vegetativo es incoloro al centro y a menudo rojo en los extremos, no se observan pigmentos difusibles. En agar de extracto de levadura - extracto de malta se observa crecimiento moderado, las colonias tienen aspecto cartilaginoso, no hay micelio aéreo y el micelio vegetativo presenta un color rosa oscuro o café-violáceo, no hay pigmentos difusibles. En agar de almidón y sales minerales el crecimiento es pobre, las colonias tienen superficie granular y no presentan micelio aéreo, el micelio vegetativo es blanco grisáceo sin pigmentos difusibles. En medio de peptona-glucosa el crecimiento es pobre y presenta aspecto cartilaginoso, no hay micelio aéreo, el micelio vegetativo es de rosa a rojo sin pigmentos difusibles, crecen entre 10 y 45°C, su temperatura óptima está entre 28 y 37°C. Se aísla de especímenes clínicos (micetoma) y suelo, el contenido de G+C del ADN es de 66.0 a 68.2 moles %.

Actinomadura pelletieri

Cadenas cortas de 2 a 6 esporas subsféricas de superficie verrugosa, ganchudas o en espirales de dos o tres vueltas, en agar de harina de avena se observa crecimiento moderado de superficie cartilaginosa sin micelio aéreo, el micelio vegetativo es de rosa a café rojizo sin pigmentos difusibles. En agar de extracto de levadura-extracto de malta hay crecimiento moderado de superficie cartilaginosa con trazas de micelio aéreo con hifas estériles, el micelio vegetativo es de rosa a café rojizo sin pigmentos difusibles. En agar de harina de avena-nitrato hay crecimiento moderado de superficie cartilaginosa, micelio aéreo con trazas de hifas esporulativas, el micelio vegetativo es incoloro y no tiene pigmentos difusibles. En medio de peptona-glucosa hay crecimiento moderado con superficie cartilaginosa sin micelio aéreo, el micelio vegetativo es café rojizo sin pigmentos difusibles. El contenido de G + C del ADN es de 66.5 a 67.3 moles % (T_M).

FAENIA

Bacterias Gram positivas no alcohol-ácido-resistentes aerobias, micelio vegetativo bien desarrollado ramificado y septado de 0.5 a 0.8 μ m de diámetro. Micelio aéreo de 0.8 a 1.2 μ m de diámetro elevándose del micelio vegetativo, en hifas de ambos micelios se observan cadenas largas de más de 20 esporas de 0.7 a 1.5 μ m de largo ubicadas en esporóforos cortos no ramificados laterales o terminales. Las esporas presentan formación basipetal, ocasionalmente se encuentran esporas intercaladas.

Las colonias presentan crecimiento lento, elevadas con márgenes enteros o filamentosos; micelio aéreo esparcido, termodúricas, xerotolerantes, capaces de usar un amplio rango de compuestos orgánicos como única fuente de carbono para obtención de energía y crecimiento y para degradar un número de substratos. Resistentes a algunos antibióticos pero susceptibles a lisozima. La peptidoglicana de pared contiene meso-DAP, arabinosa y galactosa pero no contiene ácidos micólicos (pared tipo IV).

Característicamente las ramificaciones de las hifas vegetativas son casi en ángulo recto con cadenas de esporas mayormente en esporóforos no ramificados laterales y terminales, las hifas aéreas usualmente son dispersas y elevadas respecto de las hifas vegetativas en disposición de ramilletes cortos con cadenas de espora laterales y terminales y aunque las cadenas pueden contener más de 20 esporas usualmente presentan sólo 5. Se han distinguido dos tipos de hifas, uno de pared gruesa (19 a 25nm) y otro de pared delgada (11 a 15nm), en general la estructura celular semeja la de otros actinomicetos pero en las células de pared gruesa el citoplasma presenta una estructura fina uniformemente granular con una amplia zona nuclear extendida a lo largo de toda la célula, mientras que en las células de pared delgada el citoplasma es menos compacto y homogéneo y la zona nuclear aparece como áreas pequeñas de baja densidad, los mesosomas también están menos desarrollados que en las células de pared gruesa, las hifas tienden a autolisarse durante la incubación prolongada a 55°C o temperatura ambiente, las cadenas de esporas están rodeadas por una cubierta multicapa, aunque ésta es menos evidente en las hifas vegetativas que en las aéreas. Las esporas están cubiertas por una pared de 70 a 100nm de grueso en la que pueden discernirse dos capas que difieren en grosor y densidad electrónica, usualmente se observan engrosamientos de las paredes de las esporas produciendo puentes interesporales característicos que pueden observarse a veces con microscopía óptica en preparaciones teñidas, apareciendo como zonas conspicuas sin teñir, estos puentes se rompen en las esporas maduras.

La única especie reconocida actualmente en este género es *Faenia reactivirgula*.

Faenia reactivirgula

Las colonias de *F.reactivirgula* crecen 5 mm en 7 días a 40-50°C, el micelio vegetativo puede ser incoloro, café amarillento o naranja amarillento, el micelio aéreo es blanco, a menudo disperso o ausente, se obtiene buen crecimiento en agar extracto de levadura-extracto de malta o en agar de hidrolizado de caseína, puede aumentarse la producción de micelio aéreo por la adición de NaCl 5% (p/v), la longitud de la cadena de esporas tiende a incrementarse en medio de Umezawa modificado, no produce pigmentos solubles, aunque se ha observado algún pigmento café en agar

V-8. A veces *F.rectivirgula* muestra resultados inconsistentes en la pruebas de utilización de carbono, pero la mayoría de los autores está de acuerdo en que puede utilizar las siguientes como únicas fuentes de carbono: amigdalina, D-arabinosa, celobiosa, dextrina, eritritol, fructosa, galactosa, glicerol, lactosa, manitol, manosa, ribosa, almidón, sacarosa, trealosa y xilosa; no puede utilizar L-arabinosa, dulcitol, glucosamina, melibiosa, melezitosa, salicilina y sorbosa. Diferentes aislados difieren en su capacidad de utilizar adonitol, celobiosa, glicógeno, inulina, maltosa, inositol, rafinosa, ramnosa y sorbitol. Degrada esculina, gelatina, guanina, hipoxantina, ácido ribonucleico, tween 20 y 80 y xantina, puede demostrarse degradación ocasional de arbutina, caseína, ADN, hipurato, testosterona, tirosina, tirosina y urea. No degrada adenina, alantoina, celulosa, quitina, elastina, queratina, almidón, tributirina y xilan.

Produce catalasa, galactosidasa, glucosidasa y fosfatasa; algunas cepas reducen nitratos, es sensible a lizozima, crece entre 30 y 63°C y su temperatura óptima está entre 50 y 55°C el rango de temperatura de incubación puede cambiar con la cepa, condiciones de crecimiento o sustrato. La antigenicidad de *F.rectivirgula* ha recibido mucha atención desde que se le relacionó con la condición conocida como "pulmón de granjero", la forma clásica de pnemonitis hipersensitiva, se han resuelto 75 compuestos antigénicos y muchos otros componentes que involucran proteínas y azúcares en su estructura.

F.rectivirgula resiste lincomicina, neomicina y penicilina. No se sabe que *F.rectivirgula* produzca infección pero la inhalación de sus esporas puede producir la enfermedad conocida como pulmón de granjero.

GEODERMATOPHILUS

Bacterias Gram positivas, aeróbicas, quimioorganotróficas, mesofílicas que producen un talo multilocular, muriforme, en forma de tubo no capsulado, holocárpico que contiene masas de células cuboidales de 0.5 a 2.0 μm de diámetro, el talo se rompe bajo condiciones favorables liberando células cuboidales y cocoides no móviles, algunas de estas células pueden desarrollarse a zoosporas elípticas o lanceoladas que se mueven mediante un largo flagelo terminal, forman micelio rudimentario, no produce micelio aéreo. La pared celular contiene meso-DAP junto con ácido glutámico, alanina, glucosamina y ácido murámico, los hidrolizados de células completas no contienen madurosa, su hábitat natural es el suelo, el contenido de G + C del ADN es de 72.9 a 74.6 moles %.

Los organismos de este género originalmente parecían estar relacionados con *Dermatophilus*, sin embargo las considerables diferencias en su contenido de G + C del ADN no confirman esta relación. La composición de pared se ajusta al tipo III de Lechevalier y los fosfolípidos pertenecen al tipo PII. La distinción entre *Geodermatophilus* y otros géneros de tipo III fue subrayada por estudios de taxonomía fenética.

La especie tipo del género es *Geodermatophilus obscurus*.

Procedimientos de aislamiento y enriquecimiento.

Es necesario un medio diluido para prevenir la contaminación por otras especies de bacterias y hongos; un medio que se ha utilizado exitosamente para el aislamiento incluye los siguientes ingredientes: (las cantidades están dadas en % p/v) Extracto de levadura 0.1; glucosa 0.1; almidón soluble 0.1; carbonato de calcio 0.1 y agar 1.5

Las diluciones de suelo se preparan para producir 50 colonias o menos por placa cuando se incuban a 28°C por 2 ó 3 semanas; las placas se revisan semanalmente con la ayuda de un microscopio de disección y las colonias encontradas se transfieren a un medio de crecimiento y mantenimiento compuesto de: (% p/v) extracto de levadura 0.5; NZ amina tipo A (Sheffield Chemical Company, Norwich, NY) 0.5; Glucosa 1.0; almidón soluble 2.0; carbonato de calcio 0.1; y agar 1.5.

Es deseable inocular un área de 1 cm o más de diámetro cuando se transfieren las colonias del medio de aislamiento al medio de crecimiento. El medio de crecimiento es incubado a 28°C por 1 a 3 semanas e inspeccionado regularmente para prevenir la proliferación de colonias contaminantes.

No se reportan especies patógenas.

Geodermatophilus obscurus

Células con apariencia de tallo, de tamaño variable, de color negro-verdoso cuando se le observa con luz transmitida; se observan células cuboidales cuyo número varía de pocas a muchas ordenadas en masas o agregadas en forma de tubo; se observa presencia de zoosporas abundantes, tubos germinales y filamentos que varían con la cepa.

Las colonias en agar presentan un color café oscuro a negro después de 30 días de incubación a 26-28°C; pueden ser desde planas hasta plegadas, de textura granular, secas y con olor a humedad. Se observa buen crecimiento en agar de extracto de levadura-extracto de malta-almidón-sacarosa y hay poco crecimiento en agar BHI, la utilización de carbohidratos y la producción de ácido varía con la subespecie, hidroliza almidón pero no hidroliza caseína, la hidrólisis de gelatina y la reducción de nitratos varía con la subespecie, no presenta hemólisis.

Su rango de temperatura óptima de crecimiento va de 24 a 28°C se reduce a 37°C y es nulo a 50°C; en suspensión acuosa pocas células sobreviven al calentamiento a 60°C por 30 min.

Las subespecies reportadas son:

Geodermatophilus obscurus subesp. *obscurus*

Geodermatophilus obscurus subesp. "*amargasae*"

Geodermatophilus obscurus subesp. "*utahensis*"

Geodermatophilus obscurus subesp. "*dictyosporus*"

Geodermatophilus obscurus subesp. "*everesti*"

DERMATOPHILUS

Organismos Gram positivos, desarrollan micelio aéreo en atmósfera adicionada de CO₂, el micelio de substrato consiste de filamentos largos en forma de cintas ramificadas lateralmente en ángulo recto, forma septos en planos longitudinales transversos, horizontales y verticales elevándose en ocho filas paralelas de células cocoides (esporas) cada una de las cuales se torna móvil por un flagelo en forma de mechón.

Contiene ácido meso-diaminopimélico (meso-DAP) en la pared; se encuentra madurosa en los hidrolizados de células completas, los lípidos polares incluyen fosfatidilglicerol, difosfatidilglicerol y fosfatidilinositol.

Quimioorganotróficos no fermentativos, pero produce ácido a partir de ciertos carbohidratos. Catalasa positiva, no ácido alcohol resistente. Se ha reportado que sólo crece en medios complejos, no se conocen sus requerimientos nutricionales mínimos.

Aeróbicos y anaeróbicos facultativos, su temperatura óptima de crecimiento está alrededor de 37°C.

Parásito de mamíferos, especialmente de herbívoros domésticos, la patología usualmente se limita a dermatitis exudativa, la cual puede, sin embargo, volverse severa e incluso amenazar la vida del animal, en raras ocasiones causa abscesos subcutáneos y granuloma de los nódulos linfáticos.

El contenido de G+C del ADN es de 57 - 59 moles % (T_M).

La especie tipo es *Dermatophilus congolensis*.

Dermatophilus congolensis

Desarrolla hifas de 0.5 - 1.5µm de diámetro a partir de tubos germinativos; después de varias divisiones transversales y longitudinales las hifas pueden aumentar su diámetro a 5 µm con ramificaciones en ángulo recto en forma de cinta, hasta ápices no septados, éstas son convertidas enteramente en paquetes de ocho filas de segmentos isodiamétricos encajados en una matriz gelatinosa, cada segmento es liberado como una espора móvil impulsada por un mechón de cinco o más flagelos, las esporas subsecuentemente pierden la movilidad y germinan.

En agar sangre producen colonias rugosas que a menudo se vuelven viscosas, adheridas al medio debido a una invasión del substrato por hifas, a menudo son blancas a grises al principio y usualmente se vuelven naranjas o amarillas. Hemolíticas en medios conteniendo sangre de oveja o caballo.

Crece bien en medio de Loeffler dando colonias amarillo claro, la mayoría de las cepas licuan el medio. No crece en agar Sabouraud-glucosa, agar Czapek o agar de pasta de

tomate-harina de avena, en cultivo líquido forma un sedimento floculento o viscoso con sobrenadante claro, a veces con un anillo superficial de crecimiento.

Produce ácido a partir de glucosa y fructosa y dentro de las primeras 48 hrs. de crecimiento también lo produce a partir de galactosa, y tardíamente a partir de maltosa, no produce ácido a partir de lactosa, sacarosa, xilosa, dulcitol, manitol, sorbitol o salicina, hidroliza almidón, gelatina y caseína, no hidroliza tirosina y xantina, produce ureasa y catalasa, no forma indol, da negativa la prueba de rojo de metilo y Voges-Proskauer, no reduce nitrato.

Aeróbico y anaeróbico facultativo, en una atmósfera de 10% de CO₂ el crecimiento es acelerado y forma hifas aéreas mientras que la formación de septos y esporas se retrasa.

Susceptible a un amplio rango de antibióticos antibacterianos incluyendo: penicilina, estreptomina, cloranfenicol, eritromicina y tetraciclinas, resiste a los antifúngicos griseofulvina, nistatina y tolnaftato.

Es el agente etiológico de dermatofitosis, una dermatitis exudativa a menudo severa que afecta un gran número de animales domésticos, incluyendo vacas, ovejas, cabras y caballos y causa cuantiosas pérdidas económicas en muchas partes del mundo.

Se han reportado infecciones ocasionales en muchas otras especies de mamíferos incluyendo el hombre, así como también ciertas lagartijas.

RHODOCOCCUS

Bacterias Gram positivas, parcialmente ácido-alcohol resistentes en algunos estados de crecimiento, aeróbicas, quimioorganotróficas, con metabolismo oxidativo, dan respuesta positiva a la prueba de la catalasa. La mayoría de las cepas crecen bien en medios estándar a 30°C, sin embargo, algunas requieren tiamina.

Su morfología microscópica es bacilar transformándose con el tiempo en un micelio vegetativo extensamente ramificado. En todas las cepas el ciclo morfogenético es iniciado con formas cocoidales o de bacilos cortos, con diferentes organismos mostrando una sucesión de estados morfológicos más o menos complejos mediante los cuales se completa el ciclo de crecimiento, así los cocos iniciales pueden simplemente germinar en bacilos cortos, formar filamentos con proyecciones laterales, mostrar una ramificación elemental o en las formas más diferenciadas producir un extenso micelio de hifas ramificadas. La siguiente generación de cocos o bacilos cortos es formada por fragmentación de los bacilos, filamentos e hifas.

Algunas cepas producen hifas aéreas débiles, visibles microscópicamente, las cuales pueden ser ramificadas o no, en este último caso los filamentos coalescen y se proyectan hacia arriba. Las especies de *Rhodococcus* no son móviles y no producen conidias ni endosporas.

Las colonias pueden ser rugosas, lisas o mucoides y de color canela, crema, amarillo, naranja o rojo, sin embargo, pueden existir variantes incoloras.

Las especies de *Rhodococcus* son arilsulfatasa negativas, sensibles a lisozima, e incapaces de degradar caseína, celulosa, quitina, elastina o xilán, son capaces de usar un amplio rango de compuestos orgánicos como única fuente de carbono, la peptidoglicana de la pared celular contiene meso-DAP, arabinosa y galactosa, ácidos tubérculo esteáricos y micólicos con 32-66 átomos de carbón con más de 4 dobles enlaces, el contenido de G + C del ADN va de 63 a 70 moles %; están ampliamente distribuidos, pero son particularmente abundantes en suelo y estiércol de herbívoros, algunas cepas son patógenas para el hombre y los animales.

La cepa tipo es *Rhodococcus rhodochrous*.

Rhodococcus bronchialis

Se observa un ciclo de vida de bacilos a cocos, descompone urea, utiliza como única fuente de carbón los siguientes compuestos: inositol, maltosa, manitol, sorbitol, p-cresol, ácido pimérico, adipato de sodio, benzoato de sodio, citrato de sodio, lactato de sodio y testosterona; crece en presencia de azida de sodio al 0.02%, cristal violeta (0.001 y 0.01%), fenol (0.1%) fenil etanol (0.3%) y cloruro de sodio (5 y 7%); crece a 40°C su contenido de G+C del ADN es de 63-65 moles %.

En agar de extracto de levadura y glucosa forma colonias rugosas, pardas; en medio Sauton con huevo forma haces de filamentos verticales, coalescentes en la superficie de las colonias después de 12 a 18 hrs. de incubación.

Da respuesta positiva a las pruebas de acetamidasa, nicotinamidasa, pirazinamidasa y ureasa; da respuesta negativa a las pruebas de alantoinasa, benzamidasa, isonicotinamidasa, malonamidasa, salicilamidasa y succinamidasa.

Son α -estearasa y β -estearasa negativas, β -estearasa y fosfatasa ácida positivas. Se aísla de esputo de pacientes con enfermedad pulmonar.

Rhodococcus equi

Se observa un ciclo vital que va de bacilos a cocos, en etapas tempranas de crecimiento puede observarse ramificaciones elementales. Descomponen adenina, pueden usar ácido m-hidroxibenzoico, lactato de sodio, fumarato de sodio, malato de sodio, piruvato de sodio, succinato de sodio, testosterona, L-tirosina, etanol, sacarosa, trealosa, acetamida, como única fuente de carbono; pueden crecer en presencia de azida de sodio (0.02%), cristal violeta (0.001 y 0.001%), fenil etanol (0.3%), cloruro de sodio (5 y 7%); su contenido de G+C del ADN es de 70-72 moles %.

En agar de extracto de levadura-glucosa produce colonias lisas, brillantes de color naranja a rojo con márgenes enteros, algunas cepas producen un limo abundante que puede gotear en la tapa de la caja de petri cuando está invertida durante la incubación, dan respuesta positiva a la ureasa y negativa a la acetamidasa y nicotinamidasa, no degradan esculina o arbutina; el perfil de reacciones API-ZIM es positivo para fosfatasa ácida y alcalina, estearasa-lipasa (C4), leucinarilamidasa, fosfoamidasa, y valinarilamidas y negativo para quimotripsina, β -glucuronidasa, y α -manosidasa.

Resiste la ampicilina (20 μ g/ml), eritromicina (4 μ g/ml), gentamicina (8 μ g/ml), lincomicina (64 μ g/ml), minociclina (0.125 μ g/ml), neomicina (8 μ g/ml), novomicina (4 μ g/ml), penicilina (10 μ g/ml), ácido pícrico (0.2%), polimixina (256 μ g/ml), rifampicina (0.25 μ g/ml), estreptomina (5 μ g/ml), sulfadiazina (100 μ g/ml), tetraciclina (50 μ g/ml) y tobramicina (8 μ g/ml); es susceptible a 5-fluorouracilo (5 μ g/ml) y mitomicina C (5 μ g/ml).

Se encuentra en suelo, estiércol de herbívoros y en el tracto intestinal de vacas, caballos, ovejas y cerdos; causa bronconeumonía en potros, ocasionalmente infecta otros animales domésticos como ganado vacuno y porcino y puede ser responsable de infecciones en humanos con tratamiento inmunosupresor o con linfoma.

Rhodococcus sputi

Se presentan como bacilos cortos o cocos, puede usar manitol, sorbitol, etanol, sacarosa, trealosa, ácido p-hidroxibenzoico, fumarato de sodio, piruvato de sodio, succinato de sodio y citrato de sodio como única fuente de carbono; en medio de huevo forma colonias rugosas de color rosa; da respuesta positiva a las pruebas de nicotinamidasa, pirazinamidasa y ureasa, y negativa a la benzamidasa; produce fosfatasa ácida pero no β -galactosidasa y α -estearasa. Produce ácido a partir de glucosa, manitol, manosa, sorbitol y trealosa.

Resiste al etambutol (5µg/ml), ácido p-nitrobenzoico (0.5mg), ácido pícrico (0.2%) y rifampicina (25µg/ml); es sensible al 5- fluorouracilo (20µg/ml), mitomicina C (5µg/ml), nitrato de sodio o salicilato de sodio (0.1%). Crece a 28-37°C pero no a 42°C. Se aísla de esputo humano.

Rhodococcus aichiensis

Bacilos cortos, en medio de huevo, forman colonias rugosas, rosáceas o naranjas; da respuesta positiva a las pruebas de acetamidasa, nicotinamidasa, pirazinamidasa y ureasa, en cambio da respuesta negativa a alantoinasa, benzamidasa, isonicotinamidasa, salicilamidasa y succinamidasa.

Reduce nitratos, hidroliza tween 80 y es ácido fosfatasa positivo; arilsulfatasa, α y β -estearasa y β -galactosidasa negativo.

Crece usando fructosa, glucosa, manosa, sacarosa, trealosa, n- butanol, acetato, citrato, fumarato, malato, piruvato y succinato de sodio como única fuente de carbono.

Resistente a ácido pícrico (0.2%), nitrito y salicilato de sodio (0.1%), es sensible a 5-fluorouracilo (20µg/ml) y mitomicina C (5µg/ml). Crece a 28, 37 y 42°C no crece a 45°C; se aísla a partir de esputo humano.

Rhodococcus auranticus

Presenta un ciclo de vida que va de bacilos a cocos, en agar Sauton y agar extracto de levadura-glucosa produce colonias rugosas de color crema a naranja, se encuentran grupos de filamentos en arreglo vertical coalescente sobre la superficie de las colonias.

Da respuesta positiva a las pruebas de acetamidasa, alantoinasa, nicotinamidasa, pirasinamidasa, ureasa y β - galactosidasa, no reduce nitratos, degrada hipoxantina, tirosina y tweens 20, 40, 60 y 80.

Producción de ácido a partir de galactosa, glucosa, inositol, manitol, manosa, sorbitol, trealosa y xilosa. Usa acetamina, glutamato, clorhidrato de glucosamina, monoetanol-amina y serina como única fuente de carbono y nitrógeno.

Resistente a etambutol (5 µg/ml), 5-fluorouracilo (20 µg/ml), mitomicina C (10 µg/ml), ácido pícrico (0.2%) y nitrato de sodio (0.2%). Crece a 10, 28 y 37°C pero no a 45°C. Se aísla de esputo humano.

Rhodococcus chubuensis

Se presentan como bacilos cortos, en medio de huevo forman colonias rugosas, rosáceas o naranjas, Reduce nitratos, hidroliza tween 80, es α y β -estearasa y fosfatasa ácida positiva, usualmente no muestra ninguna actividad de amidasa.

Crece con fructosa, glucosa, manitol, manosa, sorbitol, sacarosa, trealosa, etanol, n-propanol, acetato, citrato, fumarato, malato, piruvato y succinato de sodio como única fuente de carbono. Resiste ácido pícrico (0.2%) y es sensible a 5-fluorouracilo (20µg/ml), mitomicina C (5µg/ml) y nitrato de sodio (0.1%); crece a 28 y 37°C pero no a 42°C. Se aísla de esputo humano.

Rhodococcus obuensis

Células bacilares que en medio de huevo forman colonias rugosas, rosáceas o naranjas. Acetamidasa, nicotinamidasa, pirasinamidasa y ureasas positivos. Reduce nitratos, hidroliza tween 80 y es fosfatasa ácida positivo. Crece con fructosa, glucosa, manitol, sacarosa, acetato, citrato, malato, piruvato y succinato de sodio como única fuente de carbono.

Resiste al ácido pícrico (0.2%) y nitrito de sodio (0.2%); es sensible a 5-fluorouracilo (20µg/ml), mitomicina C (5µg/ml). Crece a 28 y 37°C pero no a 42°C. Se aísla de esputo humano.

BIBLIOGRAFÍA

- Díaz-Corrales FJ, Serrano JA. 2003. *Rhodococcus equi* en humanos: Aspectos clínicos y terapéuticos. Rev Soc Ven Microbiol. 23:131-134.
- Hidrin N, Goodfellow M, Boiron P, Moreno M, Serrano JA. 2001. Los estreptomices. Actualización y revisión didáctica Rev Soc Ven Microbiol. 21:36-38.
- Sánchez N, Sandoval AH, Díaz-corrales FJ, Serrano J.A. 2001 El Género *Rhodococcus*: Una revisión didáctica. Rev Soc Ven Microbiol. 2:24-33
- Serrano JA. 1996. Infecciones producidas por *Nocardia*. Bol Soc Ven Microbiol. 16: 6-14.
- Serrano JA. 1996. El género *Streptomyces* y algunos otros géneros relacionados Bol Soc Ven Microbiol. 16:19-28.
- Serrano JA, Mejía MA, García E, Zamora R, Boiron, P. 1998. *Streptomyces somaliensis* as an etiological agent of Actinomycetoma in Lara state, Venezuela. An epidemiological, clinical, microbiological, molecular and histological study of five cases. J Mycol Méd 8:97-104.

NOCARDIOPSIS

Organismos grampositivos, aeróbicos, quimioorganotróficos, no alcohol-ácido-resistentes; presentan micelio bien desarrollado con hifas largas y densamente ramificadas, de 0.5-0.8 μm de diámetro, puede ocurrir fragmentación a formas bacilares y cocoides, usualmente se observa micelio aéreo bien desarrollado y abundante con hifas largas y moderadamente ramificadas, rectas, flexibles o de forma zigzagueante irregular, fragmentan completamente en esporas de varias longitudes, las esporas son de forma oval o elongada de superficie lisa; cuando falta el micelio aéreo la superficie colonial es tosca, arrugada o con dobleces; también puede estar cubierta con un micelio aéreo lanuginoso o pulverulento.

Su rango de temperatura de incubación va de 10 a 45°C, la pared celular contiene meso-DAP sin azúcares de valor diagnóstico, no presenta ácidos micólicos, su contenido de G+C del ADN es de 64-69 moles % (Tm).

Los cultivos crecen abundantemente en agar de harina de avena, agar de extracto de levadura-extracto de malta y agar de extracto de levadura-glucosa. La producción de micelio aéreo varía de disperso a abundante, las hifas aéreas formadas por algunas cepas no son visibles a simple vista, pero al menos en agar de peptona-glucosa y agar de harina de avena los cultivos muestran parches microscópicos dispersos blanquecinos y recubiertos. Otros cultivos presentan una ligera cubierta pulverulenta o aterciopelada de micelio aéreo que simula el color amarillo-grisáceo de *Streptomyces griseus*. Se le encuentra en suelo, granos mohosos y material clínico de procedencia humana y animal.

La especie tipo es *Nocardiosis dassonvillei*.

Nocardiosis dassonvillei

Las hifas aéreas son largas, moderadamente ramificadas y al inicio de la esporulación tienen forma más o menos zigzagueante, están divididas en segmentos largos que subsecuentemente se subdividen en esporas pequeñas de tamaño irregular de forma elongada y superficie lisa.

Se obtiene crecimiento de bueno a abundante en medio peptona-glucosa, agar extracto de levadura-extracto de malta, agar de harina de avena, agar de almidón y sales inorgánicas (ISP 4) y agar de Bennett-sacarosa. Cuando el micelio aéreo está presente es pulverulento blanco o amarillento-grisáceo, las colonias tienen márgenes filamentosos densos, el color del micelio de substrato en los medios mencionados es amarillo-marrón o de color verde olivo a café oscuro, se ha reportado producción de pigmentos difusibles de color amarillento, amarillo-verdoso o café en algunas especies. Algunas cepas presentan cristales púrpura que se han identificado como cristales de yoduro.

Pueden producir nitritos a partir de nitratos, degradan adenina, esculina, caseína, ADN, gelatina, guanina, hipoxantina, almidón, tirosina y xantina, pero no degrada testosterona.

La temperatura óptima de crecimiento es de 28-37°C, el contenido de G+C del ADN es de 64.5 - 69 moles % (Tm), se reconocen dos subespecies:

Nocardiosis dassonvillei, subesp. *dassonvillei*

Nocardiosis dassonvillei, subesp. *prasina*

BIBLIOGRAFÍA

- Basak P Banerjee PP. 1995. Culture of nocardioform bacilli from leprosy patients and clinical evaluation of nocardioform bacilli derived antigen. *Indian J Med Res.* 101: 150-153.
- Beaman BL. 1992. *Nocardia* - An Environmental Bacterium Possibly Associated with Neurodegenerative Diseases in Humans. *Vulnerable Brain and Environm.* 147-166.
- Beaman BL, Boiron P., Beaman L., Brownell GH., Schaal K. and Gombert ME. 1992. *Nocardia* and Nocardiosis. *J Med Vet Mycol* 30: Suppl. 1 317-331.
- Beaman L., Beaman BL. 1993. Interactions of *Nocardia asteroides* with Murine Glia Cells in Culture. *Infect Immun* 61 (1): 343-347.
- Beaman BL. 1993. Nocardial infections. In: Murphy JW ed. *Fungal infections and Immune Responses.* New York: Plenum Press.533-553.
- Beaman L., Beaman BL. 1994. Differences in the Interactions of *Nocardia asteroides* with Macrophage, Endothelial, and Astrocytoma Cell Lines. *Infect Immun* 62 (5): 1787-1798.
- Beaman BL, Saubolle MA, Wallace RJ. .1995. *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Oerskovia*, and other aerobic actinomycetes of medical importance. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover EC, Tenover EC, eds. *Manual of Clinical Microbiology.* 379-399.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1986. Vol. 2 y 4. Williams and Wilkins Ed. Baltimore.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2001 2nd ed. Springer –Verlag, New York.
- Boscaro M., Fallo F. and Sonino N. 1994. Disseminated nocardiosis in a patient with Cushing's syndrome. *J Endocrinol Invest* 17 (6): 443-445.
- Brown JM, Pham KN, Mcneil MM, Lasker BA. 2004. Rapid identification of *Nocardia farcinica* Clinical Isolates by a PCR Assay Targeting a 314-Base-Pair-Species-Specific DNA

- Fragment. J. Clin Microbiol; 42: 3665-3666.
- Chun J, Seong CN, Bae KS, Lee KJ, Kang SO, Goodfellow M, Hah. 1998. *Nocardia flavorosea* sp. nov. Int J Syst Bacteriol; 48: 901-905.
- Coker RJ., Bignardi G., Horner P., Savage M., Cook T., Tomlinson D. and Weber J.1992. *Nocardia* Infection in AIDS - A Clinical and Microbiological Challenge. J Clin Pathol 45 (9): 821-822.
- Farina C., Boiron P., Goglio A., Provost F., Minola E., Suter F., Marinoni N., Tortorano AM., Bonato C., Casolari C., Grossi P., Minoli L., Marchiaro G. and Scarparo C. 1995. Human nocardiosis in Northern Italy from 1982 to 1992. Scand J Infect Dis 27 (1): 23-27.
- Garcia Corbeira P. and Esteban Moreno J. 1994. Liver Abscess Due to *Actinomyces meyeri*. Clin Infect Dis 18 (3): 491-492.
- Granier F., Kahlaclemenceau N., Richardin F., Leclerc V, Bourgeoisdroin C., Berardigrassias L. and Tremolieres F. 1994. Isolated Cutaneous *Nocardia farcinica* Infection in an Immunodepressed Patient. Presse Med 23 (7): 329-331.
- Hidrin N., Goodfellow, M. Boiron, P. Moreno, M. and Serrano, JA. 2001. Los estreptomicos. Actualización y revisión didáctica. Re SoVe Microbiol 21: 36-38.
- Hunter LR., Krinsky AH. and Fleener CH. 1992. Preseptal Cellulitis Caused by *Nocardia brasiliensis* Am J Ophthalmol 114 (3): 373-374.
- Isik K, Goodfellow M. 2002. Differentiation of nocardia species by PCR-randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting. Syst. Appl Microbiol; 2002, 25: 60-67.
- Koll BS., Brown AE., Kiehn TE. and Armstrong D. 1992. Disseminated *Nocardia brasiliensis* Infection with Septic Arthritis. Clin Infect Dis 15 (3): 469-472.
- Leblang SD., Whiteman MLH., Post MJD., Uttamchandani RB., Bell MD. and Smirniotopolous JG. 1995. CNS *Nocardia* in AIDS patients: CT and MRI with pathologic correlation. J Comput Assist Tomogr 19 (1): 15-22.
- Mcneil MM., Brown JM., Georghiou PR., Allworth AM. and Blacklock ZM..1992. Infections Due to *Nocardia transvalensis* - Clinical Spectrum and Antimicrobial Therapy. Clin Infect Dis 15 (3): 453-463.
- McNeill MM. and Brown JM. 1994. The medically important aerobic actinomycetes: Epidemiology and microbiology. Clin Microbiol Rev 7 (3): 357-417.
- Mellmann A, Cloud JL, Andrees S, Blacwood K, Carroll KC, Kabani A, Roth A, Harmsen D.

- 2003, Evaluation of RIDOM, Microseq, and Genbank services in the molecular identification of *Nocardia* species. *Int J Med Microbiol*; 293: 359-370.
- Miralles GD. 1994. Disseminated *Nocardia farcinica* infection in an AIDS patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13 (6): 497-500.
- Naka W., Miyakawa S., Niizeki H., Fukuda T., Mikami Y. and Nishikawa T. 1995. Unusually located lymphocutaneous nocardiosis caused by *Nocardia brasiliensis*. *Br J Dermatol* 132 (4): 609-613.
- Newton JA. and Wallace MR. 1994. Nodular lymphadenitis caused by *Nocardia brasiliensis*. *Clin Infect Dis* 18 (5): 843.
- Ostrum RF. 1993. *Nocardia* Septic Arthritis of the Hip with Associated Avascular Necrosis - A Case Report. *Clin Orthop* 288: 282-286.
- Patel JB, Wallace Jr, Brown-Elliott BA, Taylor T, Imperatrice C, Leonard DG, Wilson RW, Mann L, JostKC, Nachamkin. Sequence-based identification of aerobic *actinomycetes*. *J Clin Microbiol*; 2004, 42: 2530-2540.
- Philit F., Boibieux A., Coppere B., Reverdy ME., Peyramond D. and Bertrand JL. 1934. *Nocardia asteroides* Meningitis Without Brain Abscess in a Non-Immunodepressed Adult. *Presse Med* 23 (7): p.346.
- Rees W., Schuler S., Hummel M., Hempel S., Moller J. and Hetzer R. 1995. Primary cutaneous *Nocardia farcinica* infection after heart transplantation: A case report. *J Thorac Cardiovasc Surg* 109 (1) : 181-183.
- Rodríguez-Nava V, Devulder G, Laurent F. Taxonomie et identification des *Nocardia*: Evolution et perspectives. *Bull Soc. Fr. Microbiol*; 2003, 18: 177-184.
- Rodríguez-Nava V, Couble A, Molinard C, Sandoval H, Boiron P, Laurent F. *Nocardia mexicana* sp. nov. a New Pathogen Isolated from Human Mycetomas. *J. Clin Microbiol*, oct, 2004; 42: 4530-4535.
- Roth A, Andrees S, Kroppenstedt RM, D Harmsen, Mauch H. Phylogeny of the genus *Nocardia* based on reassessed 16S rRNA gene sequences reveals underspeciation and division of strains classified as *Nocardia asteroides* into three established species and two unnamed taxons. *J. Clin Microbiol*. 41: 851-856.
- Sachs MK. 1992. Lymphocutaneous *Nocardia brasiliensis* Infection Acquired from a Cat Scratch - Case Report and Review. *Clin Infect Dis* 15 (4): 710-711.
- Sánchez-Saucedo NL, Sandoval HA, Ramírez-Durán N, Sánchez HK, Novoa-Farías O. *Nocardia*

- cyriacigeorgica*: First case reported in México. J Mycol Med (enviado a publicación).
- Saubolle MA, Sussland. Nocardiosis: review of clinical and laboratory experience. J Clin Microbiol; 2003; 41: 4497-4501.
- Serrano, J.A., Diaz, C., F., and Uzcátegui N., M. 2001. Genus Actinomadura. Aspects of its taxonomy, microbiology, pathology, clinical, and therapeutical. Rev Soc Ven. 21: 24- 37
- Shearer C., Chandrasekar PH., Sensenbrenner L., Ratanatharathorn V., Karanes C., Momin F., Abella S., Lum L. and Uberti J. 1995. Pulmonary nocardiosis in a patient with a bone marrow transplant Bone Marrow Transplant 15 (3): 479-481.
- Silva CL. and Faccioli LH. 1992. Tumor Necrosis Factor and Macrophage Activation Are Important in Clearance of *Nocardia brasiliensis* from the Livers and Spleens of Mice. Infect Immun 60 (9): 3566-3570.
- Srinivasan M. and Sundar K. 1994. Nocardial endophthalmitis. Arch Ophthalmol 112 (7): 871-872.
- Tleifsson PS., Basse A., Jensen HE., Bloch B. and Aalbaek B. 1995. Pulmonary intravascular macrophages in the pathogenesis of bovine pulmonary lesions caused by *Actinomyces pyogenes*. J Comp Pathol 112 (2): 197-206.
- Tokumoto JIN. and Jacobs RA. 1994. Nocardia osteomyelitis. Am J Med Sci 307 (6): 428-433
- Yoon HK., Im JG., Ahn JM. and Han MC. 1995. Pulmonary nocardiosis: CT findings. J Comput Assist Tomogr 19 (1): 52-55.
- Wallace RJ Jr, Steele LC, Sumter G, Smith JM. 1998 Antimicrobial susceptibility patterns of *Nocardia asteroides*. Antimicrob Agents Chemother; 32:1776-1779.
- Wang L, Zhang Y, Huang Y, Maldonado LA, Liu Z, Goodfellow M. 2004 *Nocardia pigrifrangens* sp. nov. A novel actinomycete isolate from a contaminated agar plate. Int J Syst Evol Microbiol. 54: 1683-6.
- Yassin AF, Rainey FA, Steiner U. 2001 *Nocardia cyriacigeorgici* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol.; 51: 1419-1423.

CAPÍTULO 2

EL MICETOMA

El micetoma es una enfermedad crónica, generalmente localizada en los miembros inferiores, causada por bacterias aeróbicas y hongos verdaderos, que afecta la piel, el tejido celular subcutáneo, y en ocasiones, músculo, hueso y puede diseminarse (dependiendo de la localización) a la cavidad torácica, abdominal, etc.

El término micetoma fue utilizado en 1860 por Van Dyke Carter para nombrar a esta enfermedad, siendo que Rangel en 1909, describe el primer caso en Venezuela y Cícero es el primer médico mexicano que en 1912 lo describe en México. (Ver Tabla 2.1).

La enfermedad se ha observado en niños de 3 años de edad y en individuos de 80 años, pero predomina entre la segunda década de la vida, es más común en hombres que en mujeres (2 a 1) y predomina en campesinos afectando principalmente los miembros inferiores del cuerpo.

Esta entidad puede ser ocasionada por bacterias aeróbicas (micetomas actinomicóticos) y hongos verdaderos (micetomas eumicóticos). (Ver tabla 2.2.)

El agente etiológico más frecuente en México es la *Nocardia brasiliensis* en un 87%, seguido por *Actinomadura madurae*, *Streptomyces somaliensis*, *Actinomadura pelletieri*, *Nocardia asteroides* y *Nocardia otitidiscaviarum*.

En Venezuela la *A. madurae* es el principal agente etiológico de Actinomictoma (40.3 %), seguido por la *N. brasiliensis* (28%). En Brasil la *N. brasiliensis* es el agente etiológico más comúnmente reportado.

En los micetomas eumicóticos que predominan en México tenemos la *Madurella micetomatis* y la *Madurella grisea*, aunque también se ha visto *Pseudoallescheria boydii* y *Acremonium sp.*

En Venezuela los principales agentes etiológicos del eumictoma son: *Pyrenochaeta mackinnonii* (32%), *P. romeroi* (24%) y *Madurella grisea* (20%).

La enfermedad predomina en regiones templadas (entre los paralelos 14 y 32) principalmente en India, África, México, Venezuela y Brasil. En México se han descrito casos

prácticamente en toda la República, predominando en los estados de: Morelos, México, Jalisco, Veracruz, Oaxaca, Michoacán, Guerrero, Hidalgo y Nuevo León.

En Venezuela la enfermedad predomina en la región centro occidental del país, en los estados Lara y Falcón, así mismo se han reportado casos en la región central, zuliana y de guayana.

El agente causal se introduce mediante un traumatismo, espina, etc. El estado nutricional, susceptibilidad a la infección, respuesta inmune y tratamiento inicial, determinarán que se resuelva la infección o que se instale la entidad con el cuadro clínico característico. En el estudio anatomopatológico del área afectada se observa un granuloma, con polimorfonucleares, células plasmáticas, linfocitos, histiocitos, células gigantes y neoformación vascular.

Habitualmente los “granos” son observados en medio de un absceso constituido por leucocitos polimorfonucleares y rodeados de las células descritas anteriormente.

El cuadro clínico característico está constituido por un aumento de volumen del área afectada (a menudo asintomático) de consistencia leñosa que con el tiempo desarrolla nódulos, abscesos y fístulas que drenan un pus filante en el que se pueden identificar granos, a veces a simple vista y en otros en el estudio micológico directo en el microscopio.

Tabla 2.1	
Aspectos históricos del micetoma	
Antes del Siglo XVIII, ya el micetoma había sido descrito en los libros védicos del Atharva Veda (India) como <i>padvalmicum</i> (“hormiguero de pie”). Desde la antigüedad, en Sudán (África) lo han llamado <i>nebit</i> (“crecimiento”).	
1714	Los misioneros franceses, en Pondicherry (India) describieron el micetoma como <i>fourmilier des vers</i> (“gusanera”).
1814	Gill, en Madura, (citado por H.v. Carter 1860, 1874, India) describió los aspectos clínicos fundamentales del micetoma.
1846	L. Colebrook (citado por Chouhan y Agarwal 1969) lo denominó <i>Pie de Madura</i> . J. Godfrey observó la presencia de “granos negros” y denominó al micetoma <i>morbus tuberculosis pedis</i> .
1860	Henry van Carter introdujo la definición del término micetoma [de <i>miceto</i> , hongo; y <i>oma</i> , tumor] por ser una lesión semejante a un tumor causada por infección por hongos.
1874	Henry van Carter diferenció “granos negros” y “granos claros” que observó en las lesiones del micetoma.
184-1929	Se reportaron los primeros casos de micetoma en África: Sudá (A. Balfouer 1904), senegal (A. Le Dantec 1929) y otros países africanos (M.H. Vincent 1894; M. A. Laveran 1902 y E. Brumpt 1906)
1912-1927	Se reportaron los primeros casos de micetoma en México (R. Cicero 1912); en Brasil (Pacheco Mendes, citado por Yazbek 1920) y en Venezuela (R.Rancel citado por Rísquez 1927).

Fuente: Lavalle P. 1966; Lacaz 1981; Serrano et al 1988; López & Welsh 1992; Develoux et al 1999; Joshi et al 2000.

TABLA 2.2 AGENTES ETIOLÓGICOS DE MICETOMA	
EUMICÓSICOS	ACTINOMICÓSICOS
<i>Acremonium kiliense</i> <i>Acremonium falciforme</i> <i>Acremonium recifei</i> <i>Aspergillus nidulans</i> o sp <i>Cochliobolus spicifer</i> <i>Curvularia geniculata</i> <i>Curvularia lunata</i> <i>Exophiala jeanselmei</i> <i>Fusarium</i> sp (F.moniliforme,F.solari,F.oxysporum) <i>Leptosphaeria senegalensis</i> <i>Leptosphaeria tompkinsii</i> <i>Madurella grisea</i> <i>Madurella mycetomatis</i> <i>Neotestudina rosatii</i> <i>Pseudoallescheria boydii</i> <i>Pseudochetosphaeronema larense</i> <i>Pyrenochaeta romeroi</i> <i>Pyrenochaeta mackinnonii</i>	<i>A.madurae</i> <i>A.pelletieri</i> <i>N.brasiliensis</i> <i>N.coeliaca</i> <i>N.dassonvillei</i> <i>N.otitidiscariarum</i> (antes <i>N.cavie</i>) <i>S.albus</i> <i>S.griseus</i> <i>S.somaliensis</i>

La enfermedad generalmente afecta el pie y/o los miembros inferiores pero puede localizarse en cualquier región del cuerpo.

Hemos observado micetomas en otros lugares del cuerpo como región torácica, miembros superiores, cuello, abdomen y la cabeza.

Esta entidad es a menudo lenta en su duración (años de evolución) pero en algunos su desarrollo es relativamente rápido y en el curso de uno a dos años, pueden afectar huesos o diseminarse a órganos vecinos, la afectación a pulmón y a médula espinal es vista en las formas torácicas, puede existir diseminación por vía linfática a ganglios regionales y en ocasiones muy raras por vía hematógena.

En las formas cefálicas el peligro es la diseminación al cerebro, lo que generalmente trae consecuencias fatales.

En ocasiones los micetomas son muy pequeños (minimicetomas) y en otras pueden adquirir formas clínicas atípicas con formación de tejidos de granulación exuberante que le da un aspecto

neoplásico a la lesión. El diagnóstico clínico diferencial de los micetomas, debe hacerse con la tuberculosis cutánea, botriomicosis, la osteomielitis, la esporotricosis, coccidioidomicosis y neoplasias.

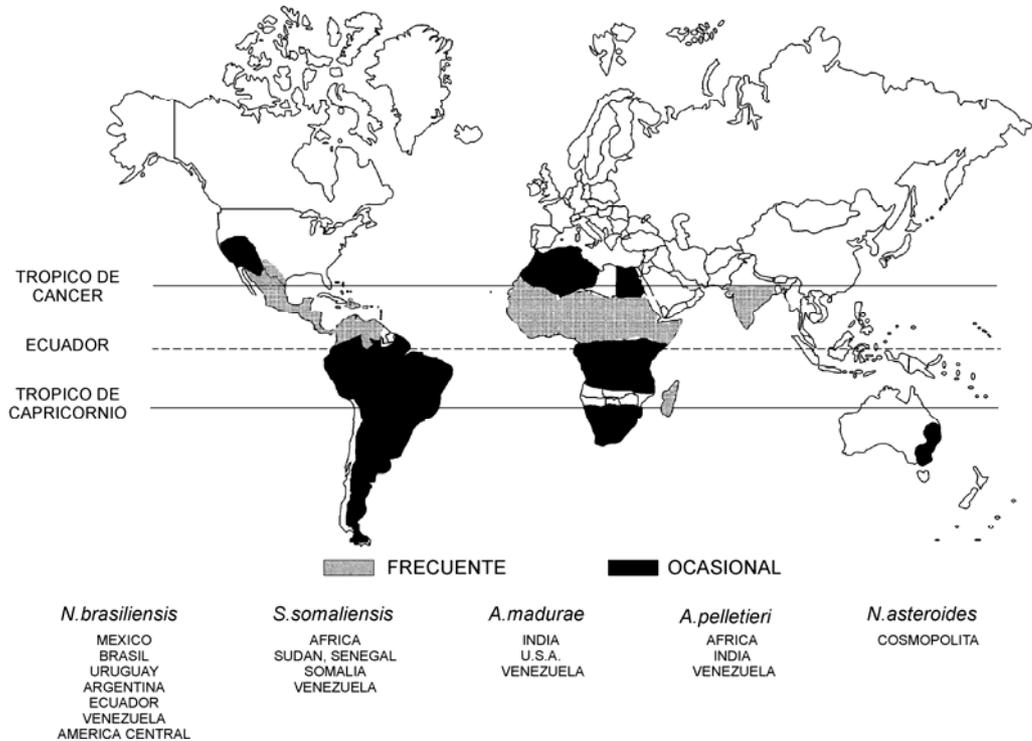


Figura 2.1

Diagnóstico de Laboratorio: El estudio micológico directo con hidróxido de potasio o agua destilada, nos permite identificar a los “granos” del micetoma, estos están formados en los actinomicéticos por hifas microsifonadas y una substancia que las amalgama en forma de grano.

En la *Nocardia brasiliensis* y *N. asteroides* frecuentemente vemos clavos en la periferia y en la *Actinomyces madurae* pseudoclavas. En el estudio anatomopatológico podemos observar un proceso granulomatoso agudo y crónico, en el que a menudo encontramos el “grano”.

Si las hifas que lo componen son microsifonadas su etiología es bacteriana (98% de los casos), si las hifas son macrosifonadas su etiología es micótica (2% de los casos), esto es muy importante ya que el tratamiento de unos y de otros es diferente. Las características histológicas han sido bien descritas en los diversos actinomicetos y es posible llegar al diagnóstico de la especie en algunos de ellos por sus características tintoriales y morfología microscópica.

El cultivo: Después de cultivar secreción filante del área afectada en medio de Micosel y/o Sabouraud y esperar por lo general de 2 a 3 semanas, incubándose a 30°C, observamos en el caso de *Nocardia brasiliensis*, colonias blanco amarillentas, yesosas de aspecto de palomitas de maíz, la

bacteria es Gram positiva y Zielh Neelsen positiva. La *Nocardia brasiliensis* hidroliza la caseína y licúa la gelatina, estas dos últimas características la diferencia del resto de los actinomicetos causantes de micetoma.

Cuando el agente causal es *Madurella micetomatis* o *M.grisea* se desarrolla una colonia de crecimiento generalmente lento, con micelio aéreo, color variable entre ocre, gris y negro. El estudio radiológico del área afectada nos permite observar si existe diseminación a hueso y definir la extensión de la enfermedad.

Patología

Tanto los granos como las muestras de tejidos “biopsias” son estudiados al microscopio óptico, utilizando técnicas histopatológicas, las muestras luego de fijadas en sol, de formol al 10% e incluidos en parafina, pueden ser coloreadas por Hematoxilina Eosina u otras técnicas. Estas observaciones permiten determinar el tipo de respuesta tisular a la infección por el agente etiológico del actino o eumicetoma, así como describir las características generales o particulares del “grano”, tales como: su forma, tamaño, etc.

ORGANISMOS	OCURRENCIA EN EL HOMBRE	ENFERMEDAD PRODUCIDA
<i>N.asteroides</i>	Generalmente patógeno	Nocardiosis, ocasional micetoma
<i>N.brasiliensis</i>	Generalmente patógeno	Micetoma, ocasionalmente nocardiosis
<i>N.otitidiscaviarum</i>	Generalmente patógeno	Nocardiosis y Micetoma
<i>N.farcinica</i>	Raro (generalmente animales)	Nocardiosis
<i>A.maduræ</i>	Generalmente patógeno	Micetoma
<i>A.pelletieri</i>	Generalmente patógeno	Micetoma
<i>Nocardiosis dassonvillei</i>	Generalmente patógeno	Micetoma
<i>S.somaliensis</i>	Generalmente patógeno	Micetoma
<i>Dermatophilus congolensis</i>	Generalmente patógeno en animales	Dermatitis
<i>A.israelii</i>	Generalmente patógeno	Actinomicosis
<i>A.naeslundii</i>	Generalmente patógeno	Actinomicosis

Tratamiento: La Diamino-Difenil-Sulfona (DDS) fue usada por primera vez en 1947 por Latapí y colaboradores en los micetomas actinomicóticos con buenos resultados. En la actualidad el tratamiento de elección es Sulfametoxazol, Trimetoprim y en algunos casos se emplea Diamino-difenil-sulfona, Inh, Rifampicina, Minociclina, Estreptomina y para los casos complicados, combinaciones de Trimetoprim Sulfametoxazol y Amikacina. Este último tratamiento, con controles audiométricos y de función renal, esta asociación puede administrarse en ciclos de 5 semanas hasta por tres ciclos, de acuerdo con lo descrito por Welsh y colaboradores en el JAAD de Septiembre de 1987. Vol. 17 N° 3pp. 443-448.

El tratamiento cuando se emplea Diamino Difenil Sulfona o Sulfametoxazol Trimetoprim, deberá mantenerse seis meses después de su remisión clínica y bacteriológica.

El tratamiento de los micetomas eumicóticos es a base de: Ketoconazol, Itraconazol, Fluocomazol y Anfotericina B. Si la lesión es pequeña y resecable, se recomienda su extirpación quirúrgica y continuar el tratamiento médico ya descrito. No existen medidas preventivas para esta enfermedad y sólo se recomienda el uso de calzado y la atención primaria adecuada de las heridas de piel.

TABLA 2.4					
MORFOLOGÍA DE LOS GRANOS PRODUCIDOS POR DIFERENTES					
ESPECIES DE ACTINOMICETOS AERÓBICOS					
ESPECIE	TAMAÑO	CONSIS- TENCIA	FORMA	COLOR	OCURRE
<i>N.asteroides</i>	Pequeño (1mm de diámetro)	Blando	Lobulado, ocasionalmente en bastonetes.	Blanco o amarillento	Se encuentra en micetomas y no en otros procesos.
<i>N.brasiliensis</i>	Pequeño	Blando	Lobulado, ocasionalmente en bastonetes.	Blanco o amarillo pálido	En micetomas, raro en otros procesos.
<i>A.maduræ</i>	Grande (1.5 mm de diámetro)	Blando	Irregular oval, serpinginoso o lobulado.	Blanco o amarillento o rosado a rojizo	En micetomas.
<i>A.pelletieri</i>	Pequeño (0.3-0.5mm)	Blando	Bordes lisos o finamente lenticulados, irregular esférico.	Rojo fuerte puede ser amarillento o rosáceo	En micetomas.
<i>S.somaliensis</i>	1-2mm de diámetro	Duro	Redondo a oval, denso y homogéneo.	Amarillo o café	En micetomas.
<i>S.paraguayensis</i>	1-2mm de diámetro	Duro	Redondo a oval, denso y homogéneo.	Café o negro	En micetomas.

ASPECTOS SEROLÓGICOS E INMUNOLÓGICOS DEL MICETOMA

Las pruebas serológicas son una ayuda diagnóstica de laboratorio, las cuales pueden ser usadas para:

- a) Hacer el diagnóstico de micetoma.
- b) Diferenciar el tipo de micetoma, si es un Actino o Eumicetoma.
- c) Como ayuda de monitoreo del tratamiento, tomando como referencia los anticuerpos circulantes.

Uno de los primeros estudios sobre el posible uso de la serología en el estudio de los organismos capaces de producir micetoma, es el de Claypole (1913) quien trató de utilizar la prueba de fijación de complemento para establecer la relación entre *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Streptomyces*. Con el uso de la técnica de fijación de complemento para estudiar sueros de conejos inmunizados con *Actinomyces bovis*, *A.madurae* y *Actinomyces gypsoides* se observó reactividad cruzada entre los grupos.

Otros investigadores como: Schneidan, González-Ochoa, Bovis y Macotela-Ruíz, desarrollaron diversas técnicas y metodologías tanto para la clasificación de los actinomicetales, como para la demostración de relaciones entre estos microorganismos.

Unos de los trabajos fundamentales en el estudio inmunológico de los actinomicetales, es el realizado por González-Ochoa y Baranda (1953); quien preparó antígenos de *N.brasiliensis*, uno de estos antígenos, que es un carbohidrato, demostró ser específico cuando es usado en pruebas cutáneas en pacientes con micetoma por *N.brasiliensis*.

Murray en 1961 hizo experimentos con cobayos, los cuales podía sensibilizar por inyecciones subcutáneas con antígenos de actinomicetales o eumicetos suspendidos en adyuvante de Freund. En 1964 Murray y Moghralely probaron los antígenos preparados por Murray en 1961, en pacientes del Sudán. En 1962 Magnusson preparó una serie de antígenos a los cuales denominó **sensitinas**. En 1963 Bojalil y Magnusson; y Bojalil y Zamora prueban estas sensitinas en pacientes mexicanos con micetoma. En 1965 Mahgoub, preparó sensitinas a partir de *S.somaliensis*, *A.pelletieri* y *A.madurae* y los probó en pacientes en el Sudán. Zamora y Bojalil fueron los primeros en describir pruebas de precipitación con *N.asteroides* y *N.brasiliensis*.

La metodología desarrollada por Ouchterlony, (1949), de difusión en agar gel, ha permitido a través de su uso el diferenciar un eumicetoma de un actinomicetoma, aunque existe reacción cruzada entre los actinomicetos, la reacción de un antígeno y su antisuero homólogo es siempre mucho más fuerte y definida.

Las pruebas serológicas tienen aún bastantes limitaciones y se requiere para su posible uso confiable el que se desarrollen antígenos aun más sensibles y específicos.

Los mecanismos de patogenicidad de los actinomicetales, así como los mecanismos de resistencia del huésped, aún no están bien dilucidados. Entre los posibles mecanismos de defensa del huésped, están:

- a) La acción combinada de los monocitos, linfocitos, etc. y de los leucocitos polimorfonucleares para inhibir y opsonizar a las nocardias;
- b) La activación y migración de los macrófagos y
- c) 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.

Los anticuerpos son importantes para el inmunodiagnóstico y monitoreo de la acción terapéutica en el paciente. Los pacientes con micetoma presentan alteraciones en su inmunidad mediada por células. Así mismo, es de gran importancia la hipersensibilidad retardada.

Estudios más recientes han preconizado el uso de técnicas, tales como la contra-inmunolectroforesis y la técnica de ELISA, pero aún no se ha desarrollado un antígeno apropiado y específico. Sugar y Col. recientemente han caracterizado un antígeno específico para *N.asteroides*. Estos autores utilizaron las técnicas de electroforesis en gel de acrilamida y la técnica de Westernblot.

Beaman y Col. han producido diversos anticuerpos monoclonales específicos para componentes celulares de *N.asteroides* GUH-2, tales como para la superóxido dismutasa, entre otros.

Los estudios serológicos e inmunológicos de las enfermedades, tales como Nocardiasis y Micetomas, a pesar de que en estos últimos años han avanzado mucho, aún están lejos de ofrecer resultados que puedan ser utilizados en forma plena en la rutina o en estudios de tipo epidemiológico.

SITUACIÓN INMUNOLÓGICA DEL PACIENTE CON MICETOMA

El micetoma es una enfermedad crónica de la piel y del tejido celular subcutáneo, encontrada en el hombre y otros animales. Está caracterizada por tumoraciones inflamatorias indoloras, con trayectos de drenaje o presencia de fístulas por la que drenan granos que son microcolonias del organismo causal. Recientemente, Lavallo (1987), clasifica los procesos fístulosos de acuerdo con la presencia y tipo de grano, tipo de organismo causal y modo de inoculación. En esta clasificación los procesos fístulosos los agrupa en tres clases: los micetomas, los paramicetomas y los pseudomicetomas.

La enfermedad tiene una etiología múltiple y es producida por un gran número de bacterias del orden actinomicetales y hongos eumicetos. Los micetomas producidos por actinomicetales se

les denomina actinomicetomas, para diferenciarlos de los eumicetomas o micomicetomas producidos por hongos. Los actinomicetales más frecuentemente implicados son: *Nocardia brasiliensis*, *N.asteroides*, *N.otitidiscaviarum*, *Actinomadura madurae*, *A.pelletieri*, *Streptomyces somaliensis* y *Nocardiosis dassonvillei*.

Los eumicetomas tienen etiología aun más variada, encontrándose *Madurella grisea*, *M.micetomatis*, *Pyronochaeta romeroi*, *Acremonium falciforme*, *Exophiala janselmii*, *Curvularia geniculata*, *Soedospodium apiospermum*, *Leptosheria senegalensis* y otros más.

A pesar de la gran diversidad de los agentes causales todos ellos comparten dos características en común, el tener un habitat exógeno y producir granos filamentosos que drenan de las lesiones. Los micetomas se adquieren por la inoculación traumática de la dérmis o tejido subcutáneo con los organismos saprófitos que habitan en el suelo.

No son contagiosos de persona a persona, se presentan en ambos sexos, pero con más frecuencia en hombres que en mujeres. En nuestros países la mayoría de los pacientes se encuentran entre los 30 y 59 años de edad.

A pesar de su relativa alta endemicidad en regiones tropicales y subtropicales, una interrogante siempre está presente, ¿por qué sólo unos pocos pacientes desarrollan micetoma? En áreas endémicas la población está igualmente expuesta a pequeños traumas y al organismo causal, ello indica que otros factores, además de la “primoinfección” juegan un papel importante en la frecuencia de la enfermedad.

Los estudios clínicos inmunológicos de pacientes con micetoma reflejan una alteración en algunas funciones de la respuesta inmunológica del hospedador frente a la infección por los organismos causales. Mahgoub y colaboradores han reportado observaciones interesantes de pacientes atendidos en una clínica especializada en micetomas en Khartoum (Norte de Sudán) En esta clínica en un período de siete años, han tratado a 350 pacientes con micetoma.

Ellos reportan casos de pacientes con reinfección en sitios diferentes a la lesión original y con agentes etiológicos diferentes, un paciente con infección causada por *Madurella micetomatis* en un pie y con *Actinomadurae pelletieri* en la rodilla del otro miembro, pacientes con lepra, infectados además con *Mycobacterium micetomi*, padre e hijo infectados con *Madurella micetomatis*, madre e hija infectadas con *Streptomyces somaliensis* e historias de cuatro pacientes que tenían parientes cercanos con micetoma.

Estas observaciones sugieren una posible deficiencia o alteración de la respuesta inmunológica de los pacientes con micetoma.

A varios pacientes con micetomas se les evaluó la respuesta mediada por células mediante las pruebas de la tuberculina, sensibilización con dinitroclorobenceno (DNCB), la proliferación de linfocitos inducidos con fitohemaglutinina y los niveles de inmunoglobulinas. Los investigadores sugieren que los resultados de estas pruebas muestran evidencias de una deficiencia en la inmunidad mediada por células en los pacientes con micetomas. Sin embargo, aun cuando los

valores obtenidos en las pruebas sean significativos, no por ello son concluyentes de una inmunodeficiencia. Los resultados en tal caso reflejan, una posible alteración de algunas de las funciones de la respuesta inmune determinadas a través de estas pruebas.

El estudio de los diferentes aspectos inmunológicos del micetoma están confinados a unos pocos agentes causales.

Se han desarrollado varios modelos experimentales en animales de laboratorio con el objeto de analizar la respuesta del hospedador frente a la infección, así como de estudiar las bases bioquímicas y estructurales de la patogenicidad. Casi todas las investigaciones se han realizado en unos pocos miembros del género *Nocardia*. Muy poca información se tiene sobre los géneros *Actinomadura*, *Streptomyces* y sobre las infecciones producidas por Eumicetos.

Por lo tanto, en esta revisión nos limitaremos a presentar los mecanismos de resistencia del hospedador y la patogenicidad de las *Nocardias* que producen actinomicetomas.

INMUNIDAD NO ESPECÍFICA: INTERACCIÓN FAGOCITO – NOCARDIA

Los macrófagos y los leucocitos polimorfonucleares eliminan la mayoría de los actinomicetales del tejido del hospedador mediante la fagocitosis. Una vez que un agente infeccioso, tal como la *Nocardia* es fagocitado, puede ser destruido, o persistir dentro de la célula en una forma alterada y posiblemente reproducirse. Las células de *Nocardia* pueden crecer como parásito intracelular facultativo en el macrófago, no siendo así en el leucocito polimorfonuclear.

Fillice y colaboradores encuentran que los neutrófilos y los monocitos humanos fagocitan e inhiben el crecimiento *in vitro* de las cepas de *Nocardia* pero no las destruyen.

Las nocardias virulentas no son inhibidas y son resistentes a la destrucción por los neutrófilos a pesar de la producción de metabolitos tóxicos por el fagocito. Esta resistencia pareciera ser parcial, debida a la producción por parte del microorganismo de altos niveles de catalasa.

El papel del macrófago en la defensa del hospedador contra infecciones por *Nocardia*, se han determinado utilizando macrófagos provenientes del pulmón de conejos infectados y no infectados con *Nocardia asteroides*. Las células de *nocardia* son capaces de sobrevivir y crecer dentro de los macrófagos alveolares de animales no infectados. Sin embargo, los macrófagos de animales infectados inhiben el crecimiento, de las nocardias, la inhibición es más efectiva cuando las cepas se encuentran en fase estacionaria de crecimiento comparada con las cepas en fase logarítmica. Aún más, los macrófagos activados inhiben más efectivamente el crecimiento de las nocardias cuando se pre-incuban con linfocitos específicamente activados, provenientes de ganglios linfáticos, combinados con sueros de animales infectados con actividad de complemento y surfactantes del pulmón. Estos resultados indican que el estado activado del macrófago es un

componente esencial en la destrucción de *Nocardia*.

En el laboratorio del Dr. Beaman se ha encontrado que los macrófagos aislados de diferentes sitios anatómicos de ratones BALB/c muestran actividades fagocitarias y bactericidas diferentes frente a la *Nocardia*. Estos resultados se han demostrado tanto en ensayos "in vivo", como "in vitro".

Black y Col. comparan la actividad fagocitaria y bactericida de macrófagos alveolares, peritoneales, de hígado y pulmón provenientes de ratones BALB/c normales e infectados con cepas virulentas y poco virulentas de *Nocardia asteroides*. La cepa *N.asteroides* GUH2 es altamente virulenta, fue aislada por el Dr. Beaman del riñón de un paciente fallecido por nocardiasis diseminada en el Hospital de la Universidad de Georgetown Washington D.C., Estados Unidos. La cepa *N.asteroides* ATCC-10905 es poco virulenta y proviene de la Colección del *American Type Culture Collection*. Los resultados muestran que los macrófagos de ratones infectados con *Nocardia* son más eficientes en destruir tanto las cepas virulentas como las poco virulentas de *Nocardia asteroides* que los ratones no infectados. Hay diferencias en la capacidad fagocitaria y bactericida entre las diferentes poblaciones de macrófagos.

En animales no infectados, los macrófagos del bazo son más eficientes en eliminar los organismos que los macrófagos del hígado o del pulmón.

En animales infectados el orden de capacidad bactericida de los macrófagos es también diferente y depende no sólo del origen del macrófago, sino también del tipo específico de la cepa de *Nocardia*.

Cuando se infectan los ratones con la cepa virulenta de *Nocardia asteroides* GUH-2 los macrófagos del hígado muestran el mayor índice de fagocitosis y muerte de las *Nocardias* comparada con los macrófagos peritoneales, del bazo y pulmón.

Cuando la infección se realiza con la cepa poco virulenta de *Nocardia asteroides* 10905 el orden de efectividad de la fagocitosis y muerte es: macrófagos peritoneales, seguidos por macrófagos del bazo, alveolares y células del hígado. Se encontró también una correlación entre la eficiencia funcional de las diferentes clases de macrófagos frente a la *Nocardia* y la actividad enzimática de la fosfatasa ácida lisosomal. La actividad enzimática de esta enzima estaba aumentada en los macrófagos que más destruían a las nocardias fagocitadas.

Se han descrito una serie de mecanismos y funciones de las cepas de *Nocardia* virulenta 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.

Por otra parte, se han descrito una gran variedad de componentes de la pared celular de los Actinomycetales que están implicados en la patogenicidad y virulencia de estos organismos. Uno de estos componentes, el "factor cuerda" (6-6' dimicolato de trealosa), se ha puesto en evidencia en *Mycobacterium* y *Nocardia* y demostrado que tiene efecto tóxico e induce la formación de granulomas en ratones.

Estos estudios indican que el estado activo del macrófago es un componente esencial, pero no una barrera suficiente para proteger al hospedador frente a las infecciones producidas por *Nocardia*.

INMUNIDAD MEDIADA POR CÉLULAS

Se ha demostrado que fundamentalmente se induce a la inmunidad mediada por células durante las infecciones producidas por *Nocardia*. Esta inmunidad se pone en evidencia "in vivo" por la reacción de hipersensibilidad retardada y por reacciones protectoras como son la formación de granuloma. Varios investigadores han ensayado la reacción de hipersensibilidad retardada en el hombre y en varios animales de laboratorio infectados con cepas de *Nocardia*.

Se han aislado y purificado antígenos somáticos y metabólicos de diferentes especies de *Nocardia* con el objeto de confirmar infecciones en animales de experimentación. La limitación de esta técnica ha sido el aislamiento y purificación de antígenos específicos.

El papel del linfocito T, fue demostrado en experimentos de infección de ratones normales y congénitamente inmunodeficientes (atímicos o carentes de bazo) con cepas de *Nocardia otitidiscaviarum* y *Nocardia brasiliensis*. En estos experimentos se utilizaron varias cepas de ratones y la inoculación se realizó a través de diferentes vías. Los resultados claramente demuestran que los animales deficientes en linfocitos T, eran significativamente más susceptibles a las nocardias que los ratones normales.

La transferencia de linfocitos T, provenientes de animales heterocigotos preinmunizados protegían a los ratones atímicos y carentes de bazo que no desarrollaban lesiones micetomasas después de la infección; sino una enfermedad sistémica aguda con producción de abscesos purulentos que causaba la muerte de los animales.

Recientemente se ha encontrado que una población de linfocitos T se asocia a las *Nocardias* mediante el contacto membrana-pared y las destruye directamente en ausencia de otras células, tales como leucocitos PMN, monocitos o macrófagos. La habilidad de estos linfocitos T de matar a las células de *Nocardia* es inmunológicamente específica y pudiera ser un mecanismo de defensa importante del hospedador ya que el patógeno es capaz de crecer y así evadir su destrucción por las células fagocíticas.

INMUNIDAD HUMORAL

Aparentemente hay producción de anticuerpos circulantes durante las diferentes etapas del micetoma, sin embargo estos anticuerpos no parecen brindar una respuesta protectora frente a la infección. Por tal razón varios investigadores han utilizado diferentes técnicas inmunológicas con el objeto de desarrollar pruebas serológicas de rutina para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con micetomas. Se han detectado anticuerpos en pacientes infectados con diferentes especies de *Nocardia*, *Actinomadura*, *Streptomyces* y también eumicetos mediante las pruebas de: Fijación de Complemento, la doble difusión de Ouchterlony, Contrainmunolectroforesis y ELISA (ensayo inmunoenzimático). Los resultados indican que hay poca especificidad o un alto grado de reacción cruzada entre los antígenos provenientes de los diferentes géneros de actinomicetales y eumicetos. La mayor limitación de estas pruebas ha sido la producción de buenos antígenos para uso en el serodiagnóstico de rutina para todas y cada una de las especies productoras de micetoma.

Recientemente, Sugar y col. (1985) han aislado e identificado, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y la técnica de "Western blot" (inmunolectrotransferencia) dos antígenos protéicos provenientes de filtrados de cultivos de *N.asteroides*. Estos antígenos fueron utilizados para serodiagnóstico de nocardiasis encontrándolo muy específico y no presentando reactividad cruzada con sueros de pacientes normales o con tuberculosis.

También, recientemente Beaman y col. han producido una colección de diez anticuerpos monoclonales específicos para la cepa virulenta de *Nocardia asteroides* GUH-2. Todos ellos parecen tener alta especificidad en los ensayos de ELISA y en pruebas de aglutinación. Los anticuerpos monoclonales podrían representar una herramienta útil en la terapia (como la bala mágica), inmunoprofilaxis, inmunodiagnóstico y determinación de factores virulentos de *Nocardia*.

CONCLUSIONES

La baja frecuencia del micetoma en áreas endémicas, la reinfección en sitios anatómicos diferentes a las lesiones originales, así como la infección con varios agentes etiológicos, reflejan en gran parte la respuesta inmunológica del paciente frente a la infección micetomatosa. Los estudios inmunológicos de pacientes con micetomas han sido escasos. Las determinaciones de la inmunidad celular se han realizado mediante pruebas indirectas de hipersensibilidad retardada como son la prueba de la tuberculina, la sensibilización con DNCB. Sin embargo, estos estudios sugieren que los pacientes con micetoma muestran una alteración en algunas de las funciones de la inmunidad mediada por células.

Las nocardias patógenas son eliminadas del tejido del hospedador mediante procesos no específicos, tales como la fagocitosis y por mecanismos específicos dependientes de la inmunidad

mediada por células.

La resistencia a las infecciones por las nocardias ha sido asociada con la activación de macrófagos, la inhibición del crecimiento de las nocardias por los neutrófilos y por mecanismos específicos mediados por células T citotóxicas.

Varios factores influyen en el destino de las nocardias ingeridas. Estos incluyen el estado metabólico del fagocito, el tipo de fagocito, la disponibilidad, concentración y tipo de enzimas lisosomales dentro de los macrófagos o leucocitos polimorfonucleares y el tipo de cepa de *nocardia*. Una deficiencia en uno de estos factores pudiera por lo tanto comprometer al hospedador y aumentar su susceptibilidad a adquirir las enfermedades producidas por las nocardias.

La inmunidad humoral no parece brindar protección frente a las infecciones producidas por las nocardias. Hasta el momento no hay procedimientos serológicos establecidos para el diagnóstico y pronóstico del micetoma, debido a la carencia de antígenos específicos purificados para las diferentes especies que producen micetomas.

Es posible que la producción de anticuerpos monoclonales facilite no solamente el diagnóstico, sino la orientación del tratamiento y la prevención de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- Atkinson PL, Jackson H, Philpottoward J, Patel BC, Aclimandos W. 1993. Exogenous *Nocardia asteroides* Endophthalmitis Following Cataract Surgery. *J Infect* 26 (3): 305-308.
- Barroeta S. 1986. Micetomas. Memorias del Primer Simposio Internacional. Editorial Venezolana C.A. Venezuela.
- Beaman BL. 1972. Interaction of *Nocardia asteroides* at different phases of growth with in vitro maintained macrophages obtained from the lungs of normal and immunized rabbits. *Infc and Immun.* 26: 355-361.
- Beaman BL. 1981 Mechanisms of pathogenesis and host resistance to the Actinomycetes. En *Actinomycetes*, pag. 209-220. *Zbl. Bakt. Mikro. Hyg. Suppl.*11 Editado por: K.P. Schaal and G. Pulverer. Fischer. Verlag. Stuttgart. New York.
- Beaman BL. 1985. Determinants of infection in Nocardiosis. En *Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes*, pag. 635-645. *Sixth Int. Symp. on Actinomycetes Biology*. Editado por: Szabó, G., Biro, S. and Goodfellow, M.
- Beaman BL. 1985. Identification of monoclonal IgG and IgM antibodies specific against virulent

- Nocardia asteroides* GUH2. En Biological. Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes pag. 689, Sixth Int. Symp. On Actinomycetes Biology. Editado por Szabó, G., Biro, S., and Goodfellow, M.
- Beaman, BL., Black, C. 1985. Interaction of *Nocardia asteroides* in BALB/c mice: Modulation of macrophage function, enzyme activity and the induction of immunologically specific T-cell bactericidal activity. *Current Topics in Microbiology* 122:138-147.
- Beaman, BL., Sugar, A. M. 1983. *Nocardia* in naturally acquired and experimental infection in animals. *J Hyg Can.* 91: 393-419.
- Bevis, ML. 1961. Serological studies on *Mycobacteria*, *Nocardia*, *Actinomyces* and fungi. *Sabouraudia.* 1: 154-160.
- Black, CM., Beaman, BL., Donovan, R.M. and Goldstein, E. 1985. Intracellular acid phosphatase content and ability of different Macrophage populations to kill *Nocardia asteroides*. *Infect and Immun.*, 47: 375-383.
- Bojalil, LF. & Magnusson, M. 1963. Specificity of skin reaction of humans to *Nocardia sensitins*. *Am. Rev. rep. Dis.*, 88: 409-411.
- Bojalil, LF. & Zamora, A. 1963. Precipitin and skin test in the diagnosis of Mycetoma due to *Nocardia brasiliensis* 28270. *Proc Soc Exp Biol med.* 113: 40-43.
- Bottei E, Flaherty JP, Kaplan LJ. and Duffeekerr L. 1994. Lymphocutaneous *Nocardia brasiliensis* Infection Transmitted via a Cat Scratch - A 2nd Case. *Clin Infect Dis* 18 (4): 649-650.
- Castelli L, Zlotnik H, Ponti R. and Vidotto V. 1994. First reported *Nocardia otitidiscaviarum* infection in an AIDS patient in Italy *Mycopathologia* 126 (3): 131-136.
- Casty FE. Wencel M. 1994. Endobronchial nocardiosis *Eur Resp J.* 7 (10): 1903-1905.
- Chandler, FW. 1989. Pathology of the Mycoses in patients with the acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) *Current Topics in Medical Mycology.* Vol. 1 Ed. M.R. McGinnis. Springer-Verlag.
- Conde, C, Mancilla, R, Fresan, M., and Ortiz-Ortiz, L.1983. Immunoglobulin and complement in tissues of mice infected with *Nocardia brasiliensis* *Infect and Immun* 40: 1218-1222.
- Deem, RL, Beaman, BL., Geshwin, M.E. 1982. Adoptive transfer of immunity to *Nocardia asteroides* in nude mice *Infect an Immun* 38: 914-920.
- Deem, R.L., Doghty, F.A. and Beaman, B. 1983. Immunologically specific direct T-lymphocyte

- mediated killing of *Nocardia asteroides* J of Immun. 130 (5): 2401-2406.
- Develoux M., Dieng MT, Ndiaye B. 1999 Les Mycétomes. J Mycol Med. 9: 197-209
- Díaz Corrales FJ., Serrano, JA. 2000. Patogenicidad de las “Formas L” de Nocardia. Bol Soc Ven. Microbiol. 20:5-9.
- El Sheikh Mahgoub, Ian G. Murray. 1973. Mycetoma. William Heinemann Medical Books Ltd London
- Fillice, GA., Beaman, BL., Krick, JA., Remington, JS. 1980. Effects of human neutrophils and monocytes on *Nocardia asteroides*: failure of killing despite occurrence of the oxidative burst J of Infec. Dis. 142: 432-438.
- González-Ochoa, A. & Baranda, F. 1953. Una prueba cutánea para el diagnóstico del micetoma actinomicótico por *Nocardia brasiliensis*. Rev Inst Salubr Enferm trop Mex, 13: 189- 197.
- González-Ochoa, A. & Vázquez Hoyos, A. 1953. Relaciones serológicas de los principales actinomicetes patógenos. Rev Salubr Enferm trop Mex., 13: 177-187.
- Hidrin, N, Goodfellow, M, Boiron, P, Moreno, M., Serrano JA. 2001. Los estreptomices Actualización y revisión didáctica. Rev Soc Ven Microbiol 21: 36-38.
- Joshi, K R, Solanki A. & Joshi YR. 2000. Mycetoma. Agrobios, Jodhpur 342 002, India.
- Lacaz Carlos da Silva. Distribuicao geográfica dos micetomas no Brasil. An Bras Dermatol, 1981; 56:167-172.
- López R & Welsh O. 1992. Epidemiology of mycetoma in Mexico. Study of 2105 cases. Gac Méd Méx 128: 477-481.
- Lavalle, P. A. 1987. Micetomas: concepto, nomenclatura, clasificación y diferenciación. Resúmenes, II Simp Int de Micetomas, Taxco, Gro. México.
- Long PF. 1994. A retrospective study of *Nocardia* infections associated with the Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) Infection 22: (5): 362-364.
- Mamelak AN, Obana WG, Flaherty JF, Rosenblum ML. 1994. Nocardial brain abscess: Treatment strategies and factors influencing outcome. Neurosurgery 35: (4) 622-631.
- Mycetoma in Sudan. 1994. Published by the Sudan Medical Association 32: 1-105.
- Novoa-Montero, Darío, Serrano JA, Boiron P, and Mejía, MA. 1999. Multidisciplinary Famili-case

- Biomedical and Epidemiologic model to study Pathogenic Aerobic Actinomycetes. *J Mycol Med* 9:127-129.
- Novoa-Montero, Darío, Serrano José A, and Boiron, Patrick. 2000. Epidemiologic models to develop new research on human mycoses. *Bol Soc Ven Microbiol* 20: 22-29
- Novoa-Montero, Darío., Serrano José A. 2001. Review on human mycoses in Venezuela. *Rev Soc Ven Microbiol* 21: 46-48
- O'Hare, MJ, Yin CY. 1987. Human monoclonal antibodies as cellular and molecular probes: a review. *Molecular and Cellular Probes* 1: 23-54.
- Ortíz-Ortíz L, Bojalil LF. 1972. Delayed skin reactions to cytoplasmic extracts of *Nocardia* organisms as a means of diagnosis and epidemiological study of *Nocardia* infection. *Clin Exp Immun* 12: 225.
- Ortíz-Ortíz L, Contreras MF, Bojalil, LF. 1976. Delayed hypersensitivity to *Nocardia* antigens. En *Biology of Nocardiae*, pag. 418. Ed. Goodfellow, M. Brownell, G.H., Serrano, J.A. Academic Press. London.
- Pickles RW, Malcolm JA, Sutherland DC. 1994. Endobronchial nocardiosis in a patient with AIDS. *Med J Aust* 161: (8) 498-499.
- Rico, G., Ochoa, R., Oliva, A. Ortíz-Ortíz, L. 1981. Role of antibody in *Nocardia brasiliensis* infection in mice. En *Actinomycetes*, pag. 229-233, *Zbl. Bakt. Mikro. Hyg. Suppl.* 11. Ed KP. Schaal, G. Pulverer. Fischer Verlag Stuttgart. New York.
- Seggev J. S. 1994. Fatal pulmonary nocardiosis in a patient with chronic mucocutaneous candidiasis. *J Allerg Clin Immunol* 4 (2) 259-262.
- Serrano J. A. Beaman B, Mejía M.A. Vilorio JE. and Zamora R. 1987. The Actinomycetoma in Venezuela: A ten year study (1976-1986). *Resumenes. II Simp. Int. de Micetomas, Taxco, Gro. México*, and in: (1988) *Rev. Inst. Med. Tro. São Paulo* 30:297-304.
- Serrano JA, Mejía MA. 1987. El Eumicetoma en el Estado Lara (1986-1987). Revisión de casos. *Boletín informativo. Boletín Informativo Las Micosis en Venezuela*; 9:29-30.
- Serrano JA. 1987. El Actinomycetoma en Venezuela. *Boletín informativo "Las Micosis en Venezuela"*; 9:12-17.
- Serrano JA. Mejía MA. García E Zamora R, Boiron, P. 1998. *Streptomyces somaliensis* as an etiological agent of actinomycetoma in Lara state, Venezuela. An epidemiological, clinical, microbiological, molecular and histological study of five cases. *J Mycol Méd.* 8:97-104.
- Serrano JA; Pisani ID, Lopez F. A. 1998. Black grain Minimycetoma caused by *Pyrenochaeta*

- mackinnonii* the first clinical case of Eumycetoma reported in Barinas state, Venezuela. Clinical-histological features and case treatment. J Mycol Méd. 8:34 –39.
- Serrano JA, Mejía MA, Díaz-Corrales F, Uzcátegui-Negrón M, Saad C, Couble A, Casoli E, Boiron P, and García E. 2001. Rapid identification by PCR of two strains of *Nocardia brasiliensis* isolated from an actinomycetoma case. J. Mycol. Med; 11:106-108
- Serrano JA, Diaz-Corrales F, Uzcátegui Negrón M. 2001. El género Actinomadura. Aspectos de su taxonomía, microbiología, patología, clínica y terapéutica. Rev Soc Ven Microbiol. 21: 34 - 37
- Serrano JA, Novoa-Montero Darío. 2001. Review on human mycoses in South America. Rev Soc Ven de Microbiol. 21: 66-77.
- Serrano JA, Sandoval AH. 2003. El micetoma. Revisión. Rev Soc Ven Microbiol 23: 70-79
- Schiff TA, Mcneil MM, Brown JM. 1993. Cutaneous *Nocardia farcinica* Infection in a Nonimmunocompromised Patient - Case Report and Review. Clin Infect Dis 16 (6) 756-760.
- Sugar AM, Schoolnik GK, Stevens DA. 1985. Antibody response in human nocardiosis: Identification of two immunodominant culture filtrate antigens derived from *Nocardia asteroides*. J. Infect. Dis 151(5): 895-901.
- Uzcátegui-Negrón M, Serrano JA, Rojas K, García E, Díaz-Corrales F, Couble A, Casoli, E, Renaud FN R, Boiron P. 2001. Aislamiento de *Nocardia asteroides* de muestras de suelo de cinco estados de Venezuela. Rev Soc Ven Microbiol .21: 17-23
- Vandenbogart HGG, Vandenende G, Vanloon PCC., Vangriensven LJLD. 1993. Mushroom Worker's Lung - Serologic Reactions to Thermophilic Actinomycetes Present in the Air of Compost Tunnels. Mycopathologia 122 (1) 21-28.
- Vergara S, 2001. Micetoma y factores sociodemográfico en el Estado Lara (1976-1997). Trabajo de Ascenso a Profesor Titular.(Mimeografiado). ULA, Mérida, Venezuela
- Viscidi RP, Yolken, RG. 1987. Molecular diagnosis of infection diseases by nucleic acid hybridization Mol & Cell Probes 1: 3- 14.
- Viscaya L, Almeida E. Ionedá T, Díaz I, García E., Serrano J. A. 1987. Estudio de los componentes lípidos y de su actividad toxigénica de dos cepas de *Nocardia asteroides*. Resúmenes. II Simposio Int de Micetomas. Taxco, Gro. México.

Wortman PD. 1993. Treatment of a *Nocardia brasiliensis* Mycetoma with Sulfamethoxazole and Trimethoprim, Amikacin, and Amoxicillin and Clavulanate. Arch Dermatol 129 (5) 564-567.

CAPÍTULO 3

SENSIBILIDAD DE *Nocardia* A LOS ANTIBIÓTICOS

La nocardiosis es una infección granulomatosa y supurativa, localizada o diseminada, debida a la proliferación de actinomicetos aeróbicos del género *Nocardia* que generalmente penetran al organismo por inhalación o más raramente por inoculación transcutánea.

Nocardia asteroides, Es la principal especie patógena. Algunas otras especies también son responsables de infecciones: *N. brasiliensis* (causante de micetomas frecuentes en las regiones tropicales), *N. farcinica* y más raramente *N. otitidiscaviarum*.

Aunque la nocardiosis puede encontrarse en individuos aparentemente sanos, es una infección oportunista frecuentemente observada en sujetos que presentan uno o varios factores de riesgo, entre los cuales el más importante es una deficiencia en la inmunidad celular. Sin embargo, la nocardiosis es poco frecuente en pacientes con SIDA (0.3 % de casos con nocardiosis asociada).

El interés de estudiar la sensibilidad tan variable que presenta, sobre todo, *N.asteroides* frente a diferentes antibióticos, se basa en la necesidad de administrar una antibioticoterapia, particularmente en los casos de nocardiosis pulmonar o diseminada, que serían fatales sin el tratamiento. Esto implica la selección del mejor antibiótico posible en función de la sensibilidad de la cepa responsable de la infección.

Aunque las sulfamidas siguen siendo el quimioterápico de mejor elección, sólo son eficaces en el 80 % de las infecciones pulmonares y en el 50 % de las infecciones del sistema nervioso central. Además, los casos de alergia a las sulfamidas o a la asociación trimetoprim-sulfametoxazol obligan a la aplicación de otro antibiótico.

Aunque en la actualidad se dispone de muchos antibióticos, como las β -lactaminas, el interés en el tratamiento de las nocardiasis está condicionado por la verificación de la sensibilidad de la cepa.

Finalmente, el perfil de sensibilidad a los antibióticos de diferentes actinomicetos ha sido utilizado con fines taxonómicos.

Para las diferentes especies de *Nocardia* pueden ser usados un cierto número de antibióticos que ofrecen información útil, tanto desde el punto de vista clínico como taxonómico.

Métodos de estudio y sus límites

El antibiograma nos muestra la actividad bacteriostática de uno o varios antibióticos aislados sobre una bacteria. Hay tres técnicas para estudiar la sensibilidad de las cepas de *Nocardia* a los antibióticos:

- Dilución en medio de sólido
- Dilución en medio líquido
- Método de discos

a) Dilución en medio sólido

Se realiza con la ayuda del aparato de Steers para replicación, éste ha sido el método estándar usado por muchos autores. Este método presenta el inconveniente de ser completamente inaplicable en laboratorios de análisis de rutina.

b) Dilución en medio líquido

Los métodos más recientes para la determinación de la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) utilizan un caldo de Müeller-Hinton suplementado con cationes y repartido en una microplaca de 96 pozos. La incubación se hace a 35°C de 48 a 72 horas.

c) Método de discos

Descrito por primera vez por Wallace, es seguramente la técnica más práctica para el estudio de la sensibilidad de *Nocardia* a los antibióticos.

El inóculo se prepara a partir de un cultivo en agar, o mejor aún, de un cultivo en medio líquido que permite una mayor homogeneidad de la suspensión bacteriana. La adición de perlas de vidrio al medio de cultivo permite la fragmentación de los filamentos de *Nocardia* dando así una suspensión más fina.

Después de 48 a 72 horas de incubación se miden los halos de inhibición que se presentan alrededor de los discos. Algunos autores evalúan la sensibilidad de las cepas a las sulfamidas o a la asociación de trimetoprim-sulfametoxazol tomando en cuenta solamente el 80 % del diámetro de la inhibición.

Para *Nocardia* un antibiograma estándar debe contener los siguientes antibióticos:

Penicilina G (o Ampicilina)
Amoxicilina + ácido clavulánico
Cefuroxina
Cefotaxina
Pefloxacina
Imipenem
Eritromicina
Sulfamidas
Trimetoprim
Vancomicina
Gentamicina
Metilmicina
Cránfenicol

El antibiograma mínimo debe contener:

Penicilina G
Amoxicilina + ácido clavulánico
Cefuroxima
Amikacina
Trimetoprim-sulfametoxasol

Los resultados se expresan en categorías clínicas, SENSIBLE o RESISTENTE, con una zona entre estos dos extremos llamada categoría intermedia. Esta categorización basada en parámetros farmacocinéticos no contempla otros criterios que determinan la sensibilidad o resistencia de una bacteria hacia un antibiótico, como son:

- *Criterio estadístico*; diferencia de sensibilidad de la bacteria estudiada con la de la población dominante de la misma especie.
- *Criterio bioquímico*; presencia de un mecanismo de resistencia.
- *Criterio clínico*; eficacia terapéutica.

Las técnicas del antibiograma han sido estandarizadas para bacterias de crecimiento rápido sobre agar. Para *Nocardia*, la interpretación del antibiograma por difusión no puede ser análogo a la de los gérmenes de crecimiento rápido. La resistencia no presenta duda, pero la sensibilidad "aparente" debe ser determinada según otras normas o confirmada por una técnica de dilución.

Medios para el estudio

Las nocardias son bacterias que generalmente crecen bien en la mayoría de los medios de laboratorio. En particular crecen favorablemente en gelosa sangre o en gelosa chocolate, en medio de Müeller-Hinton, medio de tripticosa-soya, agar DTS, etc. El crecimiento puede ser favorecido por la presencia de CO₂.

Menos del 10 % de las cepas pueden presentar un crecimiento difícil en medio de Müeller-Hinton no suplementado; el enriquecimiento del medio con 5% de sangre de carnero o la utilización de medio Müeller- Hinton – chocolate, puede permitir un crecimiento normal de estas cepas.

Las cepas viejas, conservadas en aceite durante mucho tiempo en el laboratorio y cuyo metabolismo está inactivado, pueden presentar un crecimiento mínimo en medio de Müeller-Hinton. El medio usado no debe contener ninguna sustancia que afecte la acción de los antibióticos. Para el trimetoprim y las sulfamidas el contenido de timidina del medio debe ser menor a 0.03 mg/ml.

En general el medio de Müeller-Hinton cumple con esta restricción, sin embargo, es importante determinar el contenido de timidina de cada lote de medio. Si el lote no pasa la prueba es preferible cambiarlo, sin embargo, es posible disminuir la concentración de timidina en el medio adicionando timidina fosforilasa (que transforma la timidina en timina) y esto es posible por los siguientes métodos:

Adicionando timidina fosforilasa (Wellcome) al medio, a una concentración de 0.025-0.1 UI/ml de medio.

Añadiendo al medio 5% de eritrocitos de caballo hemolizados que contienen timidina fosforilasa.

Resultados

a) Dilución en medio sólido y líquido

En general la dilución límite que corresponde a la CMI es fácil de determinar: es la primera dilución del antibiótico que inhibe completamente el crecimiento de la cepa.

La técnica de dilución en agar es mejor que la de dilución en líquido pues permite un crecimiento más rápido de *Nocardia*, además el agar tiene un efecto protector sobre el antibiótico lo que retarda su degradación. Muchos antibióticos han sido probados con estas técnicas.

b) Métodos de disco

Ciertos antibióticos como las tetraciclinas, las β -lactaminas o las sulfamidas dan halos de inhibición cuyos bordes no son claros. En el caso de las β -lactaminas se debe a la producción de β -lactamasas por las cepas de *Nocardia* por lo que se puede presentar un crecimiento tardío en los bordes de la zona de inhibición. Las sulfamidas dan una zona de inhibición grande pero se presenta crecimiento residual dentro del halo.

La concentración del inóculo es un factor crítico, sobre todo para el estudio de las

sulfamidas. Los diferentes estudios han mostrado grados variables de sensibilidad a los antibióticos, en particular a las fluoroquinolonas, carbapenems y cefalosporinas de amplio espectro.

La razón de esta variabilidad es desconocida, pues se trata de una resistencia intrínseca de *Nocardia* ya que la mayoría de las infecciones tiene un origen extra-hospitalario. Aunque las diferentes cepas de *Nocardia asteroides* presentan sensibilidades variables a los antibióticos han podido ser agrupadas de acuerdo con sus perfiles de sensibilidad como se muestra en la Tabla 3.1.

Los agentes antibacterianos de uso parenteral que presentan mayor actividad son la amikacina (inhibe al 95 % de las cepas), el imipenem (88 %), la cefotriaxona (82 %) y la cefotaxima (82 %).

Entre los agentes empleados oralmente las sulfamidas (100 %), la minociclina (100 %) y la ampicilina (40 %) son los más activos.

Interés Taxonómico

Se ha demostrado que el perfil de sensibilidad a los antibióticos de *Nocardia* tiene un valor taxonómico (Tabla 3.2).

Particularmente el valor taxonómico de los perfiles de *Nocardia asteroides* para definir subgrupos, no ha sido estudiada.

TABLA 3.1 SENSIBILIDAD DE <i>N.asteroides</i> A DIVERSOS ANTIBIÓTICOS											
GRUPO	INCIDENCIA (%)	ANTIBIÓTICOS									
		AMP	CAB	CEF	IMP	K	CIP	E	AN	AMG	P
1	20	S	S	S	50% 8-32µg/ml						
2	0	S	S	S	50% 8-32 µg/ml	<1		S			
3	18	S	R								
4	5							S	S		
5	17			R	S			S	S	R	R
6	35	R		S	R						R
7	5	NO PRESENTA NINGUNA DE ESTAS CARACTERÍSTICAS									

AMP = Ampicilina
CEF = Cefalosposina

CAB = Carbenicilina
IMP = Imipenem

K = Kanamicina CIF = Ciprofloxacina
 E = Eritromicina AN = Amikacina
 AMG = Aminoglucósido P = Penicilina

TABLA 3.2 ESQUEMA DE IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA DE NOCARDIAS

ANTIBIÓTICO	SENSIBILIDAD			
	<i>N.asteroides</i>	<i>N.brasiliensis</i>	<i>N.otitidiscaviarum</i>	<i>N.farcinica</i>
Amoxicilina + ácido clavulánico	+	+	-	+
Kanamicina	-	-	-	+
Gentamicina	-	+	+	+/-
Cloranfenicol	-	-	+	-
Minociclina	-	+	+	+/-
Eritromicina	-	-	+	+/-

β-lactamasa

Parece ser que todas las cepas de *N.asteroides* y de *N.brasiliensis* producen una β-lactamasa, aunque las cantidades producidas varían de una cepa a la otra. En algunas cepas la β-lactamasa sólo se puede poner de manifiesto tras la inducción o por fraccionamiento celular, por lo que la búsqueda de la β-lactamasa no tiene ningún valor predictivo sobre la sensibilidad de las cepas a las β-lactaminas.

En *N. asteroides* ha sido detectada una β-lactamasa en más del 90% de las cepas, pero no se ha buscado la relación entre el tipo de actividad de estas enzimas y la resistencia a las β-lactaminas. Se han encontrado tres tipos de β-lactamasas: el Tipo C, el más común (50 % de las cepas) muestra, por isoelectroenfoque y revelado con nitrocefina, dos bandas una con pI 4.2 y la otra con pI 4.3; el Tipo A muestra una banda a pI 4.2 y el Tipo B tiene una banda a pI 4.6.

En *N. brasiliensis* se ha observado sólo un perfil de resistencia a las β-lactaminas; existe una buena correlación entre el tipo de β-lactamasa presente en 9 cepas diferentes y el espectro de sensibilidad a las β-lactaminas. Se han detectado cinco perfiles de actividad de β-lactamasa (isoelectroenfoque) con bandas a pI 4.7, 4.8, 4.95, 5.05, 5.1 y 5.4 como en el caso de *N.asteroides* los diferentes perfiles de actividad enzimática corresponden al mismo perfil de sustrato. No se ha podido establecer el origen de las β-lactamasas. Muchos plásmidos han sido identificados en *N.asteroides*, pero no se les ha atribuido ninguna función.

Hasta el momento no ha sido caracterizado ningún plásmido de *N. brasiliensis*. Sin embargo, la presencia en el 100 % de las cepas de una β -lactamasa sugiere un origen cromosómico de estas enzimas.

La importancia de las β -lactamasas en la resistencia de las cepas a las β -lactaminas es poco clara, la permeabilidad de las células o la capacidad de las proteínas para fijar la penicilina (penicillin-binding proteins) podrían jugar un papel más importante que la presencia de β -lactamasas.

TERAPÉUTICA

Las pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antibióticos de *Nocardia*, pueden guiar la selección del tratamiento. Pero dada la lentitud del crecimiento bacteriano se deben interpretar siempre con reserva, además, se han de confrontar con los resultados terapéuticos. *N. asteroides* es un germen poco sensible, y por lo tanto es conveniente dar una concentración elevada de antibióticos desde el principio del tratamiento.

Las sulfamidas a altas dosis son las drogas de elección, junto con la asociación de trimetoprim y sulfametoxazol.

Hay que hacer notar que el sulfametoxazol puede potenciar la acción granulocitopénica de los inmunodepresores y el trimetoprim es capaz de potencializar la acción nefrotóxica de la ciclosporina.

Las fallas en el tratamiento por sulfamidas y la existencia de sujetos alérgicos a la droga han hecho que se propongan otros antibióticos para el tratamiento, basados en su actividad *in vitro*. El uso de otros antibióticos en el tratamiento de las nocardiasis es aún muy limitado, sin embargo experimentalmente se han tenido buenos resultados *in vitro*; tal es el caso de la amikacina, (el riesgo de toxicidad de los aminoglicósidos en tratamientos parenterales de larga duración, se debe considerar) la ampicilina, la asociación amoxicilina + ácido clavulánico, la minociclina y el imipenem.

Es posible que los antibióticos no sulfamídicos sean usados más frecuentemente de lo que reporta la literatura. Una mayor comunicación de su actividad *in vitro* deberá permitir una mayor utilización terapéutica.

BIBLIOGRAFÍA

Biehle JR, Cavalieri SJ, Saubolle MA., Getsinger LJ. 1994. Comparative evaluation of the E test

far susceptibility testing of *Nocardia* species. *Diagn Microbiol Infect Dis* 19 (2) 101-110.

Khardori N, Shavar R, Gupta R, Rosenbaum B, Rolston K. 1993. *In vitro* Antimicrobial Susceptibilities of *Nocardia* Species. *Antimicrob Agents Chemother* 37 (4) 882-884.

CAPÍTULO 4

MORFOLOGÍA DE LAS ESPECIES INCLUIDAS EN EL GRUPO NOCARDIOFORMES Y TAXONES RELACIONADOS

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.

Apariencia Microscópica: Micelio fino y ramificado, menor de un (1) micrómetro de diámetro, frecuentemente fragmenta a cocos y bacilos. Las células son usualmente de ovals a cilíndricas, variando en longitud de acuerdo con la cepa, y algunas veces permanecen intactas. Las esporas observadas por Gordon y Mihm (1958) fueron similares, pero también se han visto células esféricas en cultivos formando esporas.

El grado de fragmentación varía considerablemente. En cultivos viejos el crecimiento micelial en agar nutritivo diluído puede ser clasificado en cinco tipos. El más simple es:

- 1) Hifas largas, ramificadas y no fragmentadas.
- 2) Hifas fragmentadas y en zig-zag, a veces con formación de estructuras complicadas por ramificaciones laterales parecidas a *Micropolyspora*.
- 3) Hifas con muchas ramificaciones cortas y ramificadas o hifas largas, rectas con cierto grado de ramificación.
- 4) Ocasionalmente las hifas pueden terminar en espirales o las ramificaciones pueden ocurrir en verticilios.

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

La alcohol-ácido-resistencia es variable. Cerca del 70% de los aislamientos son parcialmente alcohol-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 Material Clínico: No se forman gránulos, pero se observan hifas ramificadas y algunas veces con fragmentación. Las hifas tienen 0.5 a 1.0 micrómetro de diámetro con ramificaciones en ángulo recto pero en ocasiones se ven acúmulos de hifas cuya distribución es generalmente difusa.

Nocardia brasiliensis (Lindenberg) Castellani y Chalmers.

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. Comúnmente producen hifas aéreas blancas, a veces abundantes pero invisibles a simple vista. Se puede producir un exopigmento soluble color ámbar. Crece bien en gelatina formando colonias redondas que dan una película que se adhiere a la pared del tubo o forman un sedimento.

Apariencia Microscópica: Células largas cilíndricas, generalmente permanecen en cadenas intactas. De las cepas observadas por Gordon y Mihm crecidas en agar glicerol, 48 produjeron filamentos largos o cortos, mientras que 14 produjeron bacilos y filamentos cortos y delgados. No se observa fragmentación, aunque los 10 aislamientos de Goodfellow fragmentaron en cocos y bacilos.

Las hifas vegetativas generalmente son largos rizoides enmarañados, pero algunas cepas desarrollan colonias densas con márgenes compactos.

El micelio aéreo de rudimentario a corto, recto u ondulado o largo y ramificado; frecuentemente tiende a coalescer.

En las hifas de algunas cepas se pueden ver masas redondeadas o irregulares. Algunas hifas forman espirales en sus puntas. La esporulación es rara. La alcohol-ácido-resistencia es parcial.

Morfología en Material Clínico: En el pus de una infección por *N.brasiliensis* se observan gránulos irregulares esféricos y lobulados de menos de 1mm de diámetro. Pueden ser de color blanco a amarillo, son suaves y pueden o no tener clavazas esféricas.

El centro de los gránulos está compuesto de una masa apretada de filamentos finos, pero alrededor de estos se encuentran unas estructuras gruesas conocidas como clavazas rodeadas de polimorfonucleares del huésped. Ocasionalmente los leucocitos están en contacto directo con los filamentos.

Nocardia otitidiscaviarum, (*N. caviae*). (Gordon y Mihm.)

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, el cual sólo raramente cubre el estroma. Las colonias irregulares con márgenes filamentosos se parecen a las producidas por *N.asteroides* con la que se confunde frecuentemente. A veces produce un exopigmento café.

Apariencia Microscópica: Células esféricas y ovales a cilíndricas han sido vistas, a menudo están acompañadas por hifas intactas no fragmentadas. Los gránulos de polifosfato pueden estar presentes. El micelio está constituido por filamentos largos profundamente ramificados con protoplasma fuertemente refráctil. La segmentación produce bacilos y elementos cocoides del doble del diámetro dispuestos en forma angular. El micelio aéreo es recto y ramificado y las hifas ocasionalmente terminan en espiral dividida en conidias cilíndricas. La alcohol-ácido-resistencia es variable.

Morfología en Material Clínico: Se producen gránulos en las infecciones por *N.otitidiscaviarum*. En las infecciones experimentales en ratón, los gránulos son redondos u ovalados, alargados o irregulares, de 100 a 300 micrómetros de diámetros, no poseen clavazas.

Saccharopolyspora hirsuta.(Lacey y Goodfellow)

Apariencia Macroscópica: Las colonias pueden ser delgadas, planas o elevadas, ligeramente rugosas, incoloras o de color crema. Se forman cúmulos de micelio aéreo blanco, particularmente cerca del centro de la colonia. Algunas cepas producen un exopigmento amarillo.

Apariencia Microscópica: Posee micelio muy filamentosos y ramificado. Algunas hifas se fragmentan dando bacilos dispuestos en posición angular. Las hifas aéreas forman largas cadenas de esporas en forma de rosario, frecuentemente separadas por cortos tramos de hifas "vacías". Se producen cadenas de esporas redondas a ovales dentro de una cubierta conspicuamente velluda. Los vellos pueden ser curvados o rectos y están formados en manojos. Las esporas son de 0.7 a 1.3 micrómetros por 0.5 a 0.7 micrómetros. Las cadenas pueden ser rectas o curvas, en espirales, abiertas o en forma de asas.

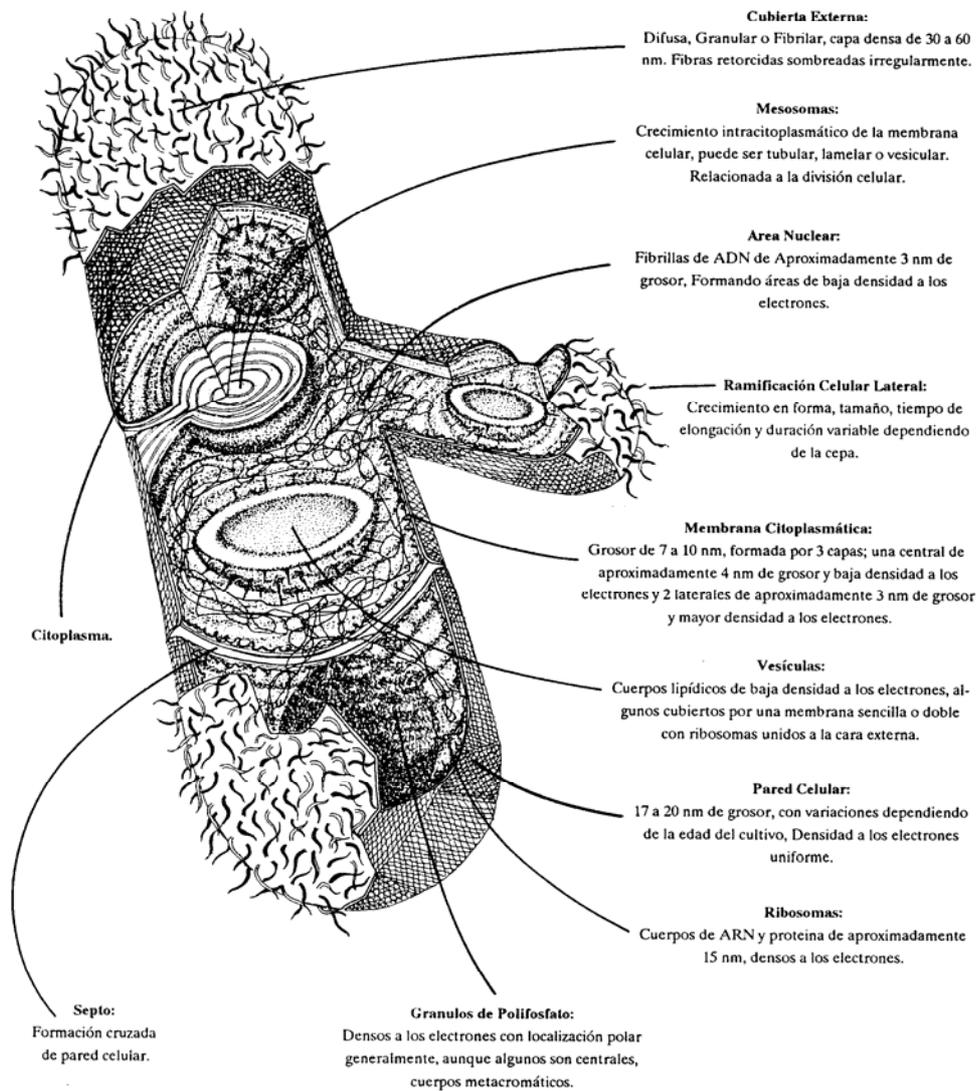
Rhodococcus rhodochrous (Overbeck) (Gordon y Mihm)

Las cepas aquí consideradas como aislamientos de *R. rhodochrous* han sido estudiadas bajo diversos nombres científicos, pero más comúnmente como *Nocardia rubra* y *N. corallina*. Actualmente conforman el género *Rhodococcus*.

Apariencia Macroscópica: El crecimiento varía de moderado a abundante. 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. Ocasionalmente las colonias densas con márgenes lisos no aparecen. 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 obscuro. Una pequeña y tenue hifa aérea es producida por algunas cepas y mechones de filamentos pueden proyectarse hacia arriba en otros. Algunas veces son producidos

exopigmentos que varían del ámbar al café claro.

DIAGRAMA CARACTERISTICO ULTRAESTRUCTURAL DE CELULAS DE NOCARDIA



Apariencia Microscópica: el micelio primario fragmenta rápidamente en cocos y bacilos. Las células, alrededor de 3 por 1 micrómetro, algunas veces unidas por filamentos semejantes a plasmodios o capa mucoide. Pueden contener gránulos densos a los electrones con otras estructuras más difusas. La ramificación y división celular también han sido vistas. Algunas cepas son ligeramente alcohol-ácido-resistentes. El citoplasma de organismos jóvenes es comúnmente homogéneo pero en ocasiones aparecen áreas altamente refractarias. Después de 12 a 32 horas se desarrollan con apariencia alveolar o de panal. Los gránulos metacromáticos se tiñen fuertemente con colorantes básicos de anilina y presenta glóbulos de lípidos.

Microspolyspora brevicatena (Lechevalier, Solotorovsky y McDurmount)

Apariencia Macroscópica: El crecimiento es delgado, de escaso a abundante, ligeramente rugoso, de incoloro a naranja pálido o amarillo naranja. La superficie es polvorienta con crecimiento de un área blanca. Puede formarse un pigmento soluble café claro.

Apariencia Microscópica: Largos filamentos ramificados de aproximadamente un (1) micrómetro de diámetro son formados en y sobre la superficie del sustrato.

La hifa crece en forma similar en el aire, algunas penetran en el agar como espolones, otras se agregan en fascículos unidos a las colonias adyacentes. También se han observado estructuras globosas formadas por fuertes enrollamientos de las puntas de la hifa aérea y que se desenrollan repentinamente.

Las esporas en cadenas cortas y rectas u onduladas, de 2 a 10 esporas de largo, en cortos esporóforos son formadas lateralmente en la hifa aérea y vegetativa.

Las esporas son esféricas, oblongas o piriformes, cercanas a 1.5 micrómetros de diámetro con una superficie ligeramente verrucosa. La germinación es de 1 a 3 tubos germinativos.

Durante el exámen de micelio intacto no se observa fragmentación, pero la preparación de frotis rompe fácilmente el micelio.

Microspolyspora faeni (Cross, Maciver y Lacey)

Apariencia Macroscópica: Las colonias son compactas, convexas, cónicas o arrugadas, de incoloras a color naranja amarillento o amarillo café. El micelio aéreo blanco, es abundante en algunos medios pero está confinado a áreas marginales o extendido en otras. Algunas veces hay un exopigmento café.

Apariencia Microscópica: La hifa vegetativa mide de 0.5 a 0.8 micrómetros de diámetro,

ramifica y penetra en el agar. La hifa aérea es de cerca de un (1) micrómetro de diámetro y es generalmente corta. Forma esporas sésiles en ambas hifas, en cadenas cortas y rectas mayores de 5 esporas de longitud en cadenas laterales o 10 en cadenas terminales.

Las esporas van de redondas a ovales, con una superficie más o menos lisa. Son de 0.7 a 1.3 micrómetros de largo y algunas veces puede ser visto un pedúnculo prominente. El micelio aparece no diferenciado y liso.

Algunas cadenas de esporas dan una apariencia de rosario en preparaciones teñidas, con áreas conspicuas no teñidas entre cada espóra. Las esporas intercaladas, clamidosporas o formas fragmentadas aparecen en microcultivos en portaobjetos.

Faenia rectivirgula (Krassilnikov & Agre) Krassilnikov & Krassilnikov.

Antes *Micropolysora rectivirgula* y *Saccharomonospora viridis* (Shuurmans, Olson & San Clemente) Nonomura O'hara y Lechevalier. Nonomura y O'hara asignan *Saccharomonospora* a las Nocardiaceae aunque Cross y Goodfellow la retienen en las Thermonosporaceae a pesar de su tipo IV de pared celular.

Apariencia Macroscópica: Las colonias son extendidas o finamente arrugadas, de incoloras a verdes azul obscuro. El micelio aéreo, a menudo abundante, va del verde azul grisáceo al verde grisáceo. Un pigmento verde obscuro o café obscuro soluble puede ser producido.

Apariencia Microscópica: El micelio vegetativo es ramificado y ocasionalmente curvado en el extremo. No se ha observado fragmentación. Las esporas formadas sobre el micelio aéreo, pueden ser sésiles o no, pueden presentarse esporóforos cortos, usualmente en forma individual, pero algunas veces en pares o cadenas largas. Las esporoforas presentan una apariencia similar a una espiga.

Las esporas son ovales, de 0.8 a 1.4 por 0.6 a 1.1 micrómetros con una superficie verrucosa. El micelio no diferenciado con superficie lisa puede también ser visto.

Actinomadura madurae (Vincent) Lechevalier & Lechevalier.

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; beige, amarillo, rosa o rojo. Gran pigmentación en cepas aisladas recientemente de material clínico. Abundante micelio aéreo producido por unas pocas cepas, pero en la mayoría no ha sido visible a simple vista. Algunas cepas producen un exopigmento café y un poco de exopigmento púrpura.

Apariencia Microscópica: Las colonias pobres o densamente filamentosas, con hifas de 0.5 a 1.0 micrómetros de diámetro ramificadas. Algunas cepas fragmentan 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 micrómetro. Los filamentos son no alcohol-ácidos-resistentes.

Morfología en Material Clínico: Los gránulos son generalmente blancos o amarillentos, aunque raramente puedan ser rosas o completamente rosados sobre una parte. Generalmente de 1 a 5 mm de diámetro pero pueden extenderse hasta 10 mm, esféricos angulares con una superficie parecida a moras o lobulada, a menudo con un borde de hifas extendido 50 micrómetros después de la masa sólida del gránulo rodeado por material eosinofílico. Fácilmente dispersados a una pasta consistente.

Actinoadura pelletieri (Laveran) Lechevalier y Lechevalier.

Apariencia Macroscópica: Colonias pequeñas, crecimiento lento, algunas planas o toscamente rugosas, diseminadas. Algunas veces descritas como semejantes a migajas de pan, rojas sobre la superficie del agar. El color varía de incoloro a través del rosa a rojo brillante o rojo oscuro con un matiz café metálico. Ocasionalmente, se produce un micelio aéreo corto y un exopigmento café rojizo.

Apariencia Microscópica: Micelio bien formado con filamentos largos, ramificaciones de 0.5 a 1.0 micrómetros de diámetro, no fragmentados. La hifa aérea, cuando es producida, es irregularmente ramificada. No hay esporas. No es ácido resistente.

Morfología en Material Clínico: Gránulos de 300 a 500 micrómetros de diámetro irregularmente esféricos u ovales, medianamente resistentes a la presión, típicamente rojo rubí brillante, presenta teñido intenso con hematoxilina. Ninguna hifa margina alrededor del gránulo, pero puede haber una zona eosinofílica angosta.

Actinoadura roseoviolacea (Nonomura & O'hara).

Las colonias son rojo opaco o púrpura oscuro, con micelio aéreo rosa amarillento brillante. La hifa aérea larga acarrea cadenas laterales de esporas usualmente en espirales estrechamente cerradas formando pseudoesporangios. Las esporas tienen una superficie lisa. Un pigmento soluble color violeta es producido algunas veces. La fragmentación no ha sido observada.

Actinoadura verrucospora (Nonomura & O'hara)

Las colonias son color piel, amarillo brillante o rosa a naranja con blanco, el micelio aéreo es gris brillante o azul pálido. Las cadenas de 5 a 15 esporas, rectas, curvas o en forma de gancho, se forman sobre el micelio aéreo.

Las esporas tienen una superficie verrucosa característica, y verrugas similares pueden también ser vistas sobre la hifa aérea. La fragmentación no ha sido observada.

Nocardiopsis dassonvillei (Brocq-Rousseau) Lechevalier y Lechevalier.

Apariencia Macroscópica: Colonias de crecimiento rápido y ligera o densamente filamentosas, toscamente 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 ser invisible a simple vista. Un exopigmento amarillento, amarillo verdoso o café puede ser producido. Algunas cepas producen cristales de yodo de color púrpura en el medio.

Apariencia Microscópica: Filamentos largos, ramificados fragmentados en bacilos y cocos. La hifa aérea corta y recta o larga, ramificada y recta o enrollada. Segmenta en cadenas de esporas que son a menudo separadas por cortas hifas vacías. No ácido resistente.

BIBLIOGRAFÍA

Beaman BL. 1993. Ultrastructural Analysis of Growth of *Nocardia asteroides* During Invasion of the Murine Brain Infect Immun 61 : 274-283.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1986. Vols. 2 y 4. Williams and Wilkins. Baltimore. EE.UU.

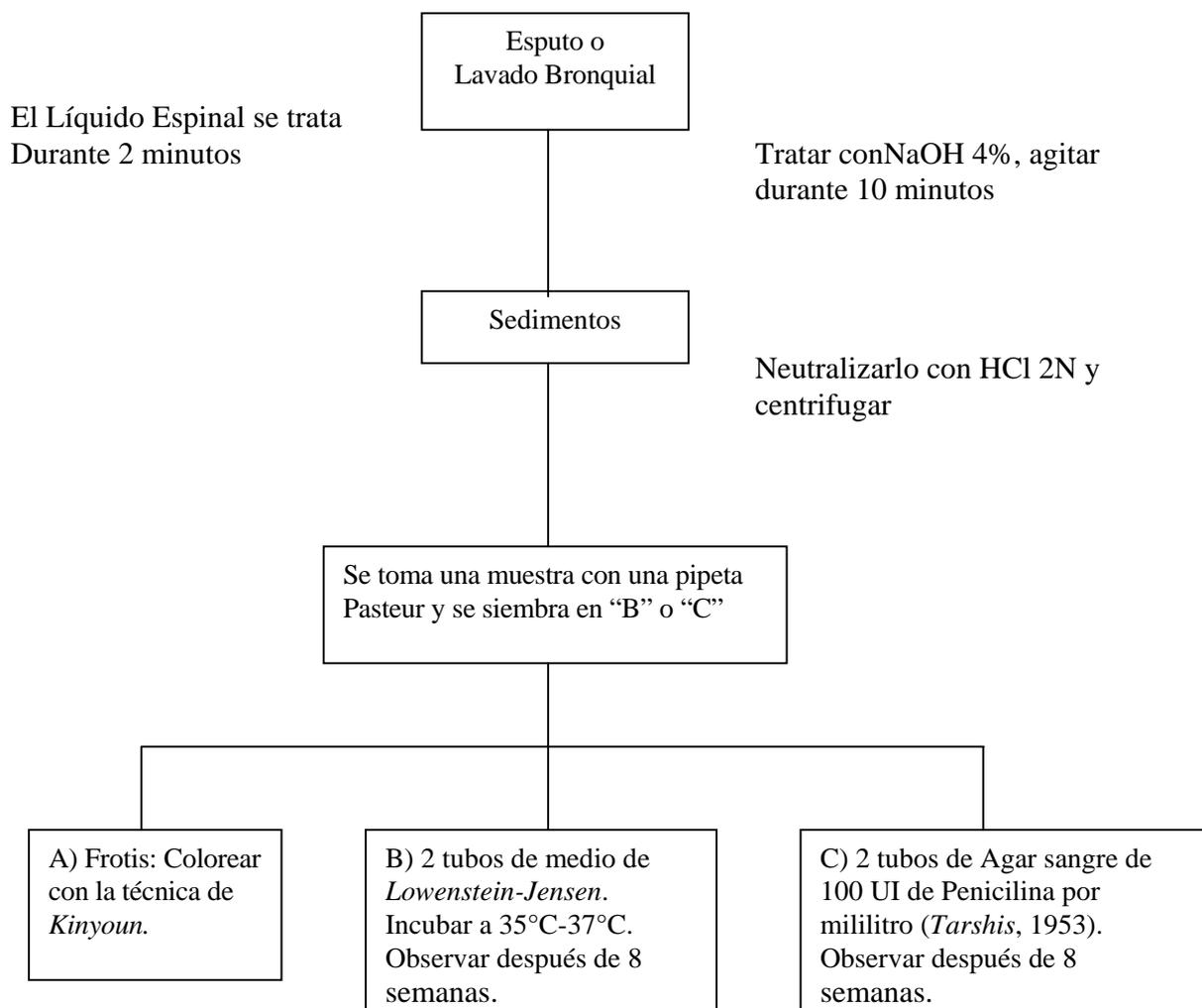
Lee KJ and Rho YT. 1994. Quantitative analysis of mycelium morphological characteristics and rifamycin B production using *Nocardia mediterranei*. J Biotechnol 36: 239-245.

Ochi K. and Hiranuma H. 1994. A Taxonomic Review of the Genera *Kitasatosporia* and *Streptoverticillium* by Analysis of Ribosomal Protein at-L30. Int J Syst Bact 44: 285-292.

CAPÍTULO 5

TÉCNICAS PARA EL AISLAMIENTO Y DIAGNÓSTICO DE ACTINOMICETOS PATÓGENOS

ESQUEMA 5.1
Rutina para la preparación de esputo para el aislamiento de Nocardia y Mycobacterium (Hosty, 1961)



ESQUEMA 5.2
FLUJO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS ACTINOMICETALES
MÁS COMÚNMENTE ENCONTRADOS EN MATERIAL CLÍNICO

A) Bacilos Gram positivos delgados, filamentosos o células pleomórficas (menos de 1 mm de diámetro) a menudo en apariencia de cuentas, de tinción irregular.

Possible selección: *Corynebacterium sp.*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Actinomyces*.

B) Bacilos alcohol-ácido-resistentes, filamentosos o células pleomórficas (frecuentemente en forma de cuentas).

Possible selección: *Mycobacterium sp.*, *Nocardia sp.*

B') No alcohol-ácido-resistentes.

Possible selección: *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Actinomyces*.

C) Crecimiento Aeróbico.

Possible selección: *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*.

C') Crecimiento Anaeróbico.

Actinomyces.

D) Células filamentosas de formas ramificadas que fragmentan a bacilos y cocos cuando crecen en todos los medios de laboratorio.

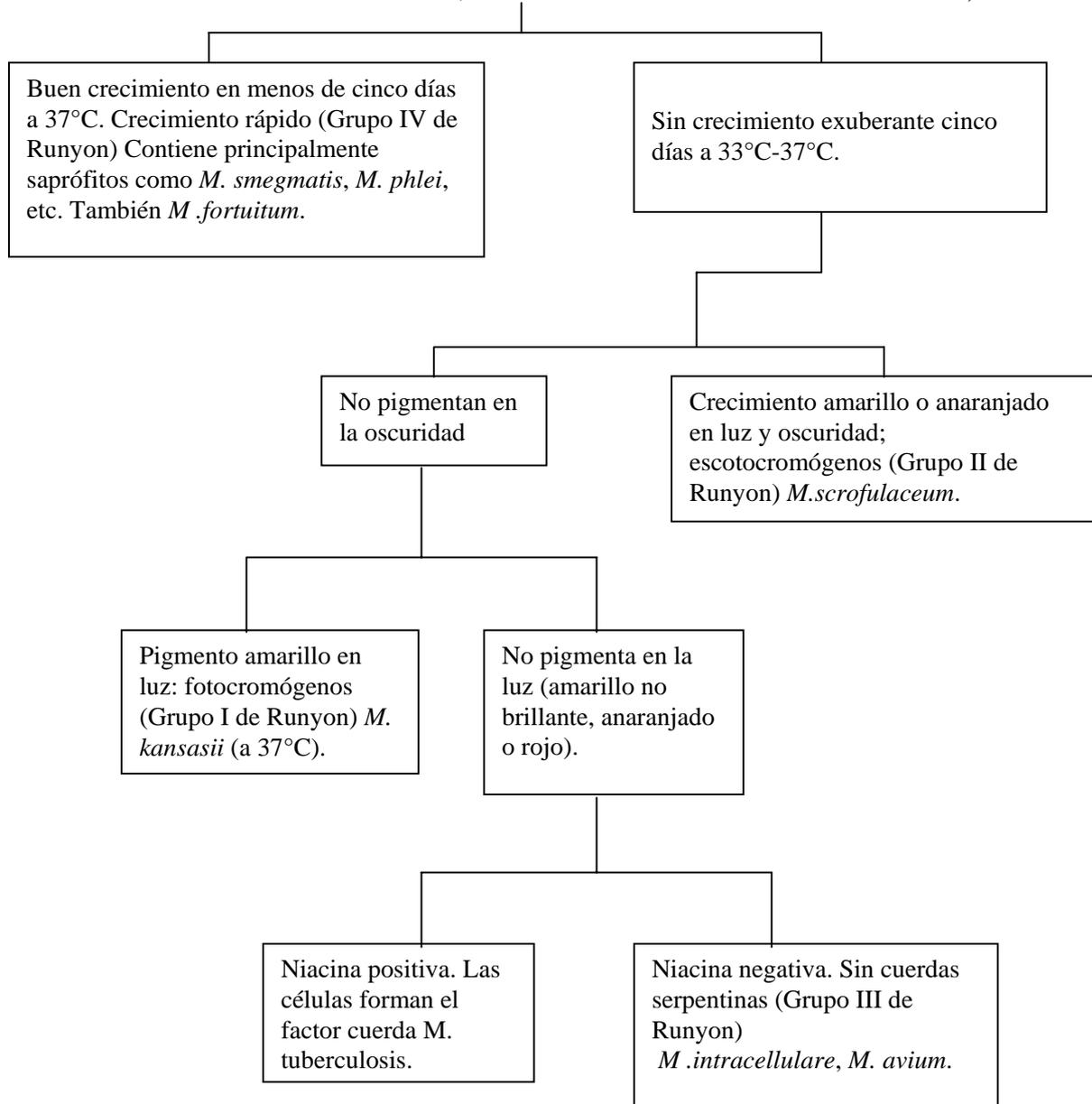
Possible selección: *Nocardia*, *Actinomyces*.

D') Raramente forman filamentos ramificados en la mayoría de los medios de laboratorio (agar BHI).

Possible selección: *Mycobacterium*, *Corynebacterium*.

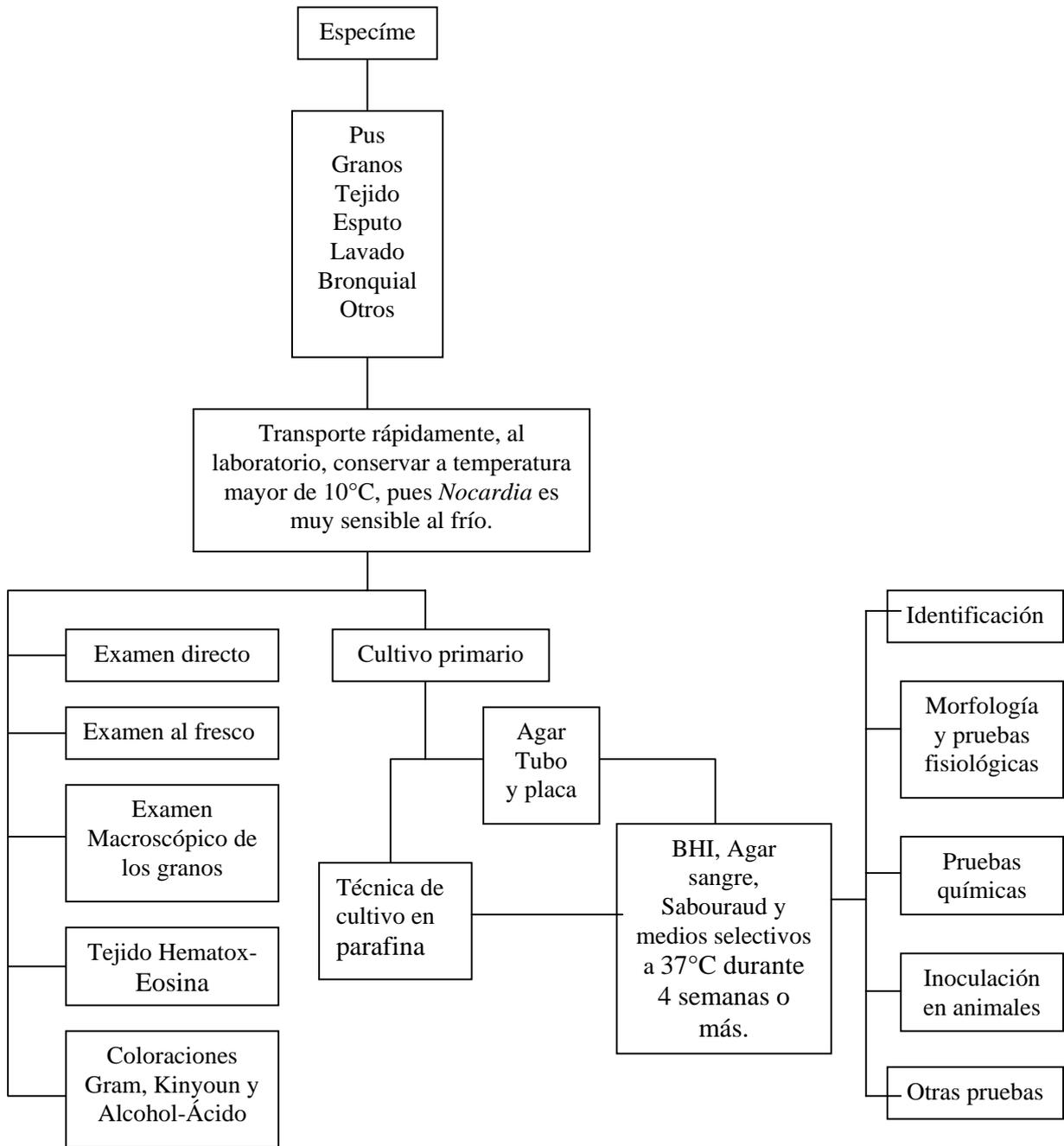
ESQUEMA 5.3
FLUJO ESQUEMÁTICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE
MICOBACTERIAS DE IMPORTANCIA CLÍNICA

A) Muestra de esputo digerida, centrifugar y sembrar en dos series de medios, incubar una serie en la luz y la segunda en la oscuridad, para estudio de formación y tipo de pigmento. El fluido espinal o material directamente de lesiones que pueden ser sembrados sin digestión previa. Medios comúnmente usados: Lowenstein-Jensen, Middlebrook 7H10 o medio oléico de Dubos).

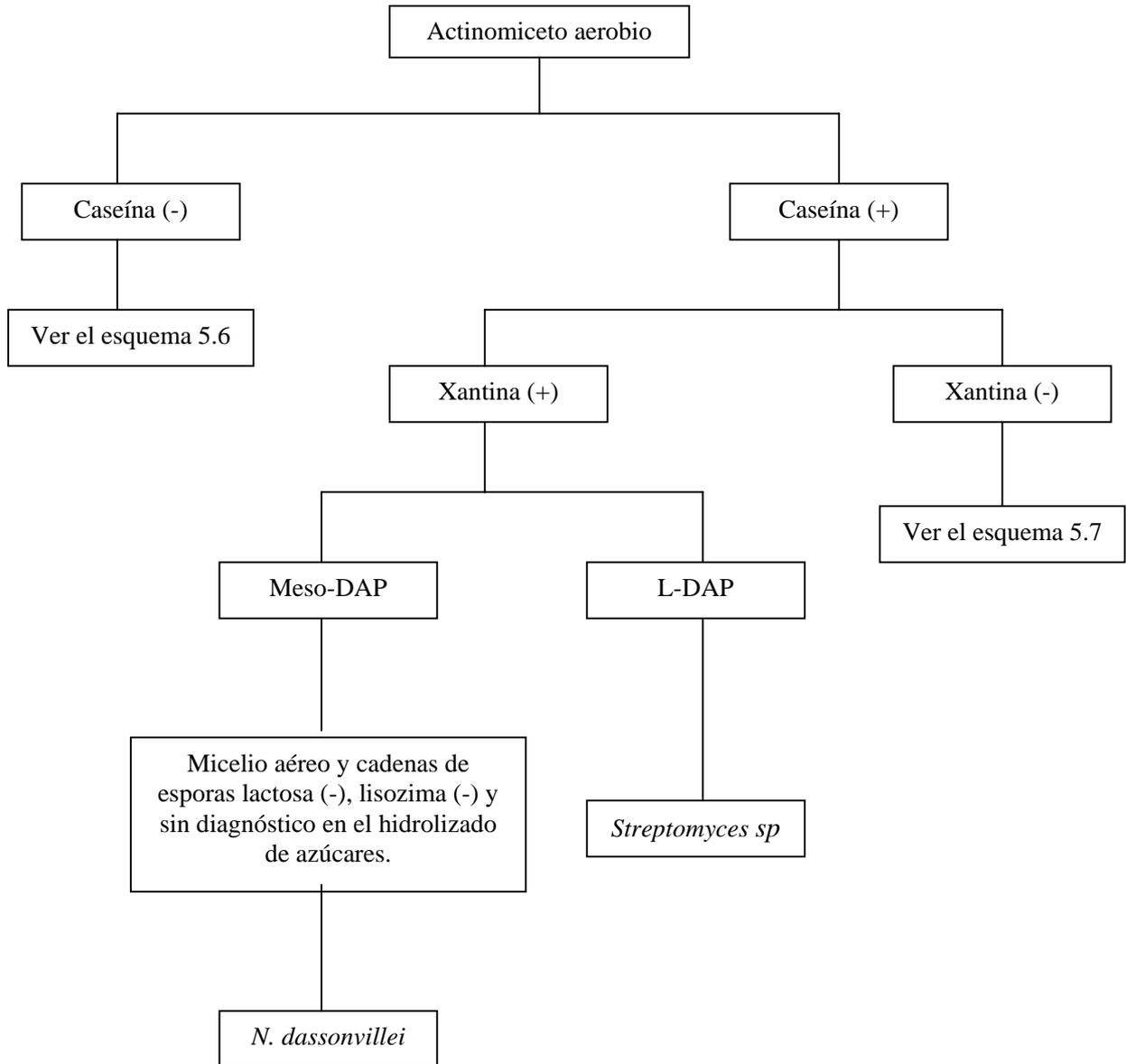


B) No hay crecimiento en cualquier medio artificial. (Puede crecer en cojinete plantar de ratón, hamster y en armadillo). *M. leprae*.

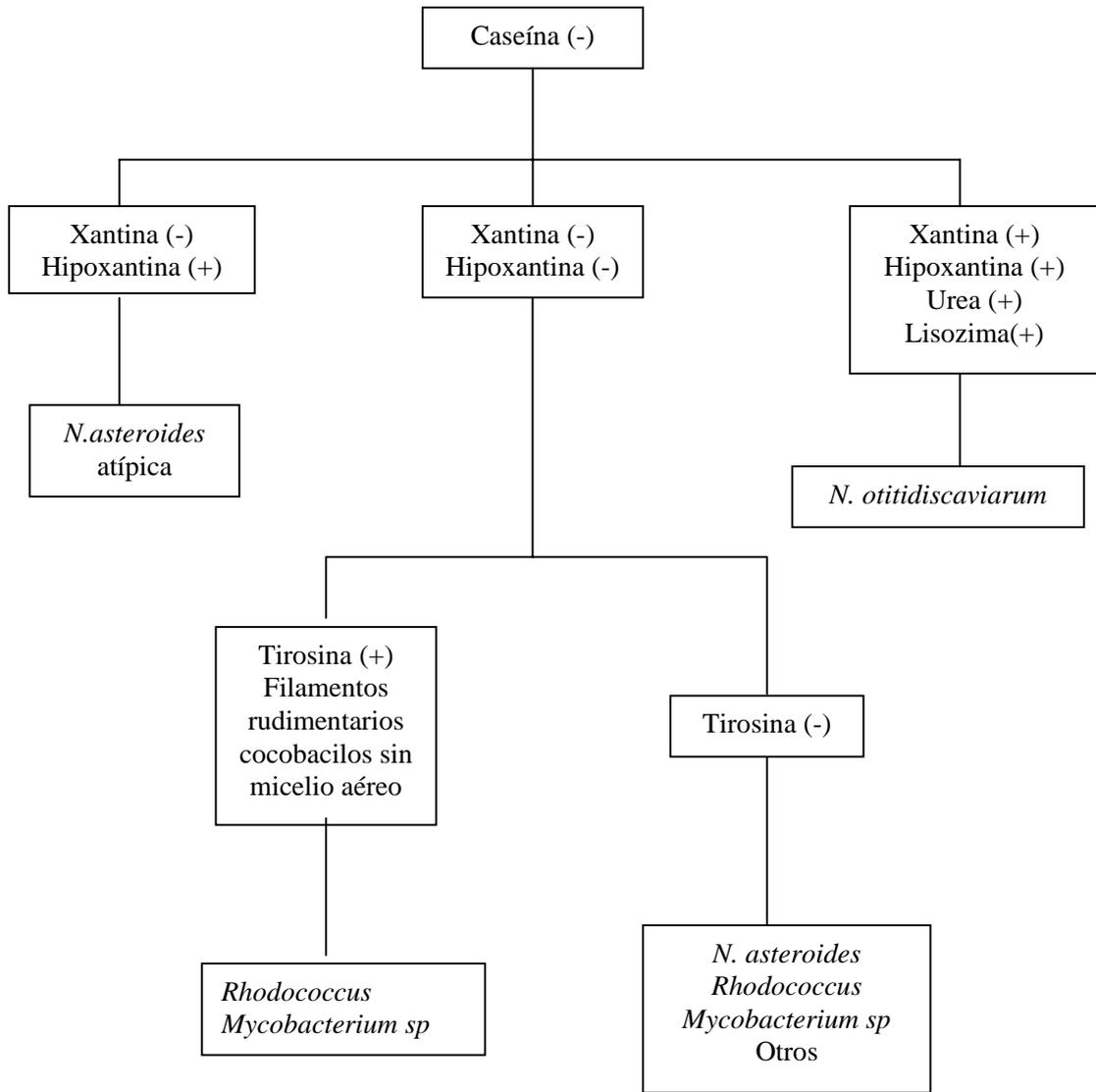
ESQUEMA 5.4
MÉTODOS PARA LA DEMOSTRACIÓN Y EL AISLAMIENTO DE ACTINOMICETOS
PATÓGENOS EN MATERIAL CLÍNICO



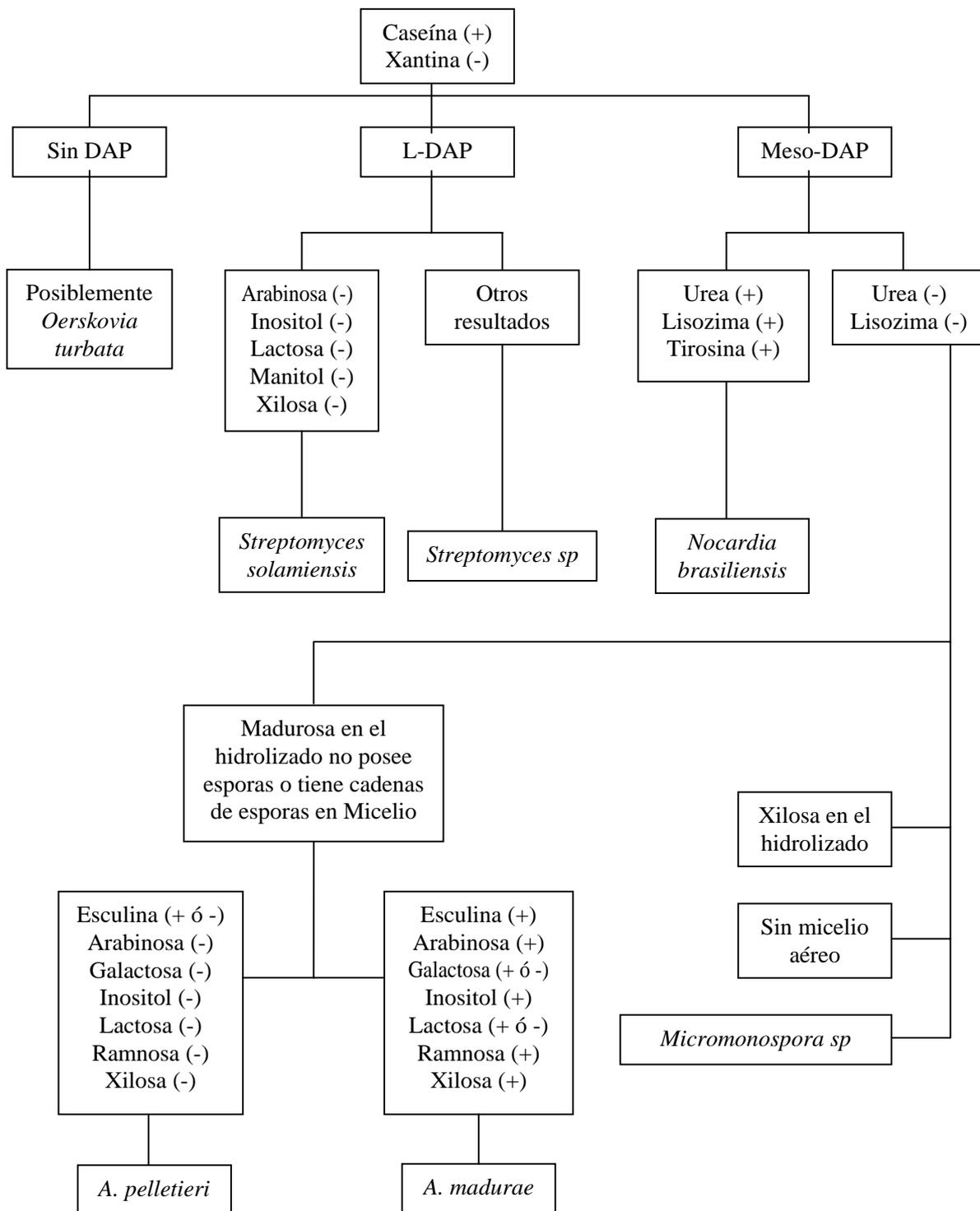
ESQUEMA 5.5
ESQUEMA DE IDENTIFICACIÓN DE ACTINOMICETOS AEROBIOS I



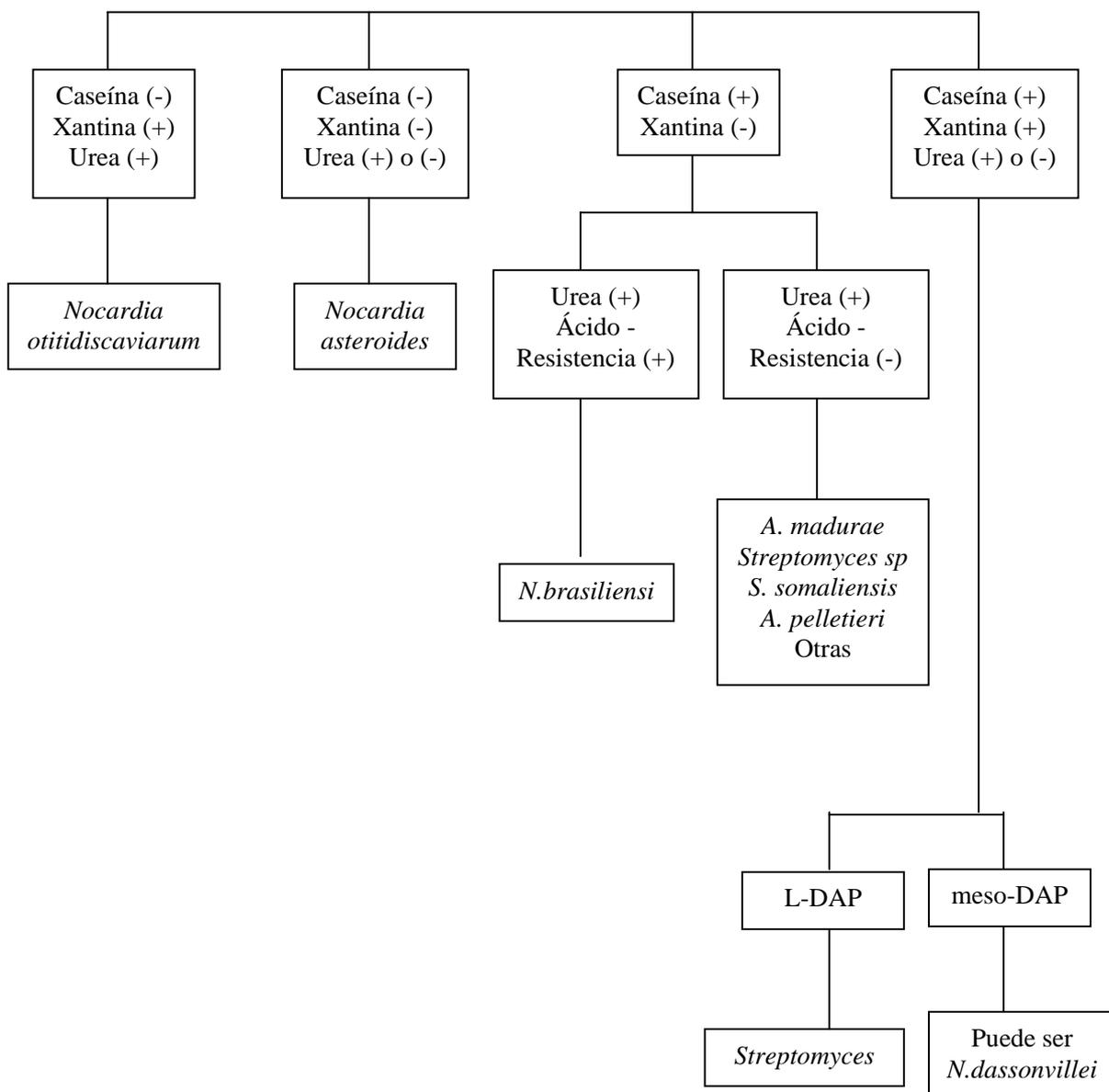
ESQUEMA 5.6
ESQUEMA DE IDENTIFICACIÓN DE ACTINOMICETOS AEROBIOS II



ESQUEMA 5.7
ESQUEMA DE IDENTIFICACIÓN DE ACTINOMICETOS AEROBIOS III



ESQUEMA 5.8
ESQUEMA SIMPLIFICADO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ACTINOMICETOS*



* Cultivo aislado con:

- a) Micelio bien formado, ramificado con o sin micelio aéreo
- b) Sin esporas o esporas formando cadenas en el micelio aéreo.

TABLA 5.1				
CARACTERÍSTICAS PARA DIAGNÓSTICO Y DIFERENCIACIÓN ENTRE ORGANISMOS DE LOS GÉNEROS <i>Mycobacterium</i>, <i>Rhodococcus</i>, <i>Nocardia</i> y <i>Actinomadura</i>				
CARACTERÍSTICAS	<i>Mycobacterium</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Actinomadura</i>
Producción macroscópica de hifa, aérea evidente	-	-	+	+
Crecimiento a 10°C	-	+	V (2%+)	-
Descomposición de Tirosina	-	V	V	+
β-Lactamasa	V	-	V	-
Sensibilidad a la Penicilina	-	+	V (2%+)	+
Tipo de pared celular	IV	IV	IV	III
Ácido micólico	+	-	-	-
Ácido nocardiomicólico				
Tipo A	-	V	+	-
Tipo B	-	V	-	-
Hidrólisis de caseína	-	-	V	+
Lisozima	+	+	-	+
Contenido de G + C del ADN	64 – 70%	51 – 68%	64.4 67 %	****
+ = 90–100%+; V = 11-89% (Bradley, 1971; Lechevalier <i>et al.</i> , 1971; Wayne y Cross, 1968).				

TABLA 5.2
CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y FISIOLÓGICAS ÚTILES PARA LA DETERMINACIÓN DE
Nocardia, Actinomadura, Streptomyces, Dermatophilus, Actinomyces y Corynebacterium.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1) <i>N. asteroides</i>	nr	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	IV
2) <i>N. brasiliensis</i>	nr	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	nr	+	-	IV
3) <i>N. otitidis-caviarum</i>	nr	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	IV
4) <i>N. farcinica</i>	nr	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	IV
5) <i>N. rubra</i>	nr	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	IV
6) <i>A. madurae</i>	nr	nr	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	III
7) <i>A. pelletieri</i>	nr	nr	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	III
8) <i>S. somaliensis</i>	nr	nr	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	I
9) <i>D. congolensis</i>	nr	nr	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	III
10) <i>A. Israeli</i>	nr	-	+	+	-	nr	nr	+	+	+	-	-	+	-	+	II
11) <i>A. nueslundii</i>	nr	-	+	+	-	nr	nr	+	+	+	-	-	+	-	nr	II
12) <i>C. diphtheriae</i>	nr	+	+	+	-	nr	nr	-	+	-	-	-	-	-	-	IV
13) <i>C. haemolyticum</i>	nr	+	+	+	-	nr	nr	-	+	nr	nr	nr	+	nr	+	IV
14) <i>C. pseudo-diphtheriticum</i>	nr	+	+	+	+	nr	nr	-	+	-	-	-	-	-	-	IV
15) <i>C. xerose</i>	nr	+	+	+	-	nr	nr	-	+	-	-	-	+	-	-	IV
16) <i>C. hofmanii</i>	nr	+	+	+	+	nr	nr	-	-	-	-	-	-	-	-	IV
17) <i>C. ulcerans</i>	nr	+	+	+	+	nr	nr	-	+	+	-	-	-	-	-	IV
18) <i>C. equi</i>	nr	+	+	+	+	nr	nr	-	-	-	-	-	+	-	-	IV
19) <i>C. acuaticum</i>	nr	+	+	+	+	nr	nr	-	+	-	-	-	+	-	-	IV
20) <i>C. acnes</i>	nr	-	-	-	+	nr	nr	+	+	+	-	-	+	-	-	IV

Nr = No realizado

1. Produce Niacina
2. Reduce Telurito
3. Crecimiento en B.H.I.
4. Crecimiento en Sabourand
5. Ureasa
6. Utilización de Almidón
7. Digestión de Caseína
8. Leche Tornasolada

9. Glucosa
10. Manitol
11. Ramnosa
12. Sorbitol
13. Sacarosa
14. Galactosa
15. Arabinosa
16. Tipo de Pared Celular

TABLA 5.4
CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *Actinomyces*
Y BACTERIAS RELACIONADAS

Características	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Células cocobacilares	d	-	-	D	-	+	-	-	-	d	d	d
Microcolonias filamentosas	d	+	D	D	d	-	d	nr	+	-	d	+
Crec. aeróbico (sin CO ₂)	-	d	D	D	+	+	d	nr	nr	-	+	+
Catalasa	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
Reducción de nitrato	-	d	+	+	d	-	+	nr	-	-	+	-
Reducción de nitrito	-	-	D	-	-	-	-	nr	nr	-	nr	nr
Hidrólisis de:												
Caseína	-	-	-	-	-	+	nr	nr	nr	-	nr	d
Esculina	d	+	+	D	d	-	+	nr	+	-	nr	+
Gelatina	-	-	-	-	-	+	nr	nr	nr	-	-	d
Almidón	+	d	D	D	d	d	nr	nr	nr	-	nr	+
ADN	+	-	-	D	-	+	nr	nr	nr	-	nr	nr
Producción de Amoniaco:												
Arginina	-	+	D	-	d	-	nr	nr	nr	-	nr	-
Urea	-	-	+	-	d	-	nr	nr	-	d	nr	-
Producción de Indol de:												
Valina arilamidasa	-	-	-	-	-	-	-	nr	nr	+	nr	nr
Fosfoamidasa	-	d	d	D	-	-	+	nr	nr	-	nr	nr
β- galactosidasa	-	+	d	-	d	d	+	nr	nr	-	nr	nr
α- glucosidasa	-	+	d	-	d	-	+	nr	nr	+	nr	nr
N-acetil-glucosamidasa	+	-	-	-	-	+	-	nr	nr	-	nr	nr
Producción de ácido de:												
Amigdalina	-	+	d	-	-	-	-	-	nr	d	nr	nr
Arabinosa	-	d	-	D	-	d	-	d	-	d	-	+
Celobiosa	-	+	d	-	-	d	-	-	+	-	nr	d
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Meso-inositol	d	+	+	-	d	d	d	-	-	-	+	-
Manitol	-	d	-	-	-	-	d	-	-	-	d	+
Rafinosa	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	d
Ramnosa	-	d	-	D	-	-	-	-	-	-	-	+
Trealosa	-	d	+	D	d	d	-	d	+	-	+	d
Xilosa	-	+	d	D	-	d	-	d	+	+	-	d
β-Hemólisis en sangre de Carnero	d	-	-	D	-	+	nr	nr	nr	nr	nr	nr

nr= No Realizado

1. *A. bovis*

4. *A. odontolyticus*

7. *A. denticoleus*

10. *A. meyeri*

2. *A. israelii*

5. *A. viscosus*

8. *A. hamellii*

11. *A. suis*

3. *A. naeslundii*

6. *A. pyogenes*

9. *A. hordeovulneris*

12. *A. humiferus*

TABLA 5.5
PROPIEDADES DIFERENCIALES ENTRE LOS ORGANISMOS DE LOS GÉNEROS
NOCARDIOFORMES

Características	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Marcada Fragmentación del Micelio en cultivos viejos	d ₂	+ ₃	-	+ ₂	+	+	+ ₂	+	d
Producción de Micelio aéreo	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Formación de Conidias	+ ₂	-	+	+ ₂	+	-	-	+	-
Producción de elementos móviles	-	-	-	-	-	+ ₄	-	-	-
Aerobios Estrictos	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Anaerobios Facultativos	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Tipo de Pared Celular	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	I	I
Presencia de Ácidos Micólicos	+ ₅	+ ₅	-	-	-	-	-	-	-
Tipo de Fosfolípidos	P II	P II	P III	P III	P III	P V	P V	PI	P IV
MOL % G+ C del DNA	64 - 72	63-72	nr	77	79	70-75	70-75	66-69	70

1) Tomado de H. A. Lechevalier de Manual de Bacteriología Sistemática, (1986), V. 2, pp. 1458, ed. P. H. A. Sneath y Col. William & Wilkins Baltimore, EE. UU. 2) Algunas cepas no la tienen. 3) Escaso. 4) Algunas cepas no son móviles. 5) Ácidos Nocardomicólicos.

d = dudoso

(+) = positivo

(-) = negativo

nr = No Realizado

1. *Nocardia*

2. *Rhodococcus*

3. *Micropolyspora*

4. *Saccharopolyspora*

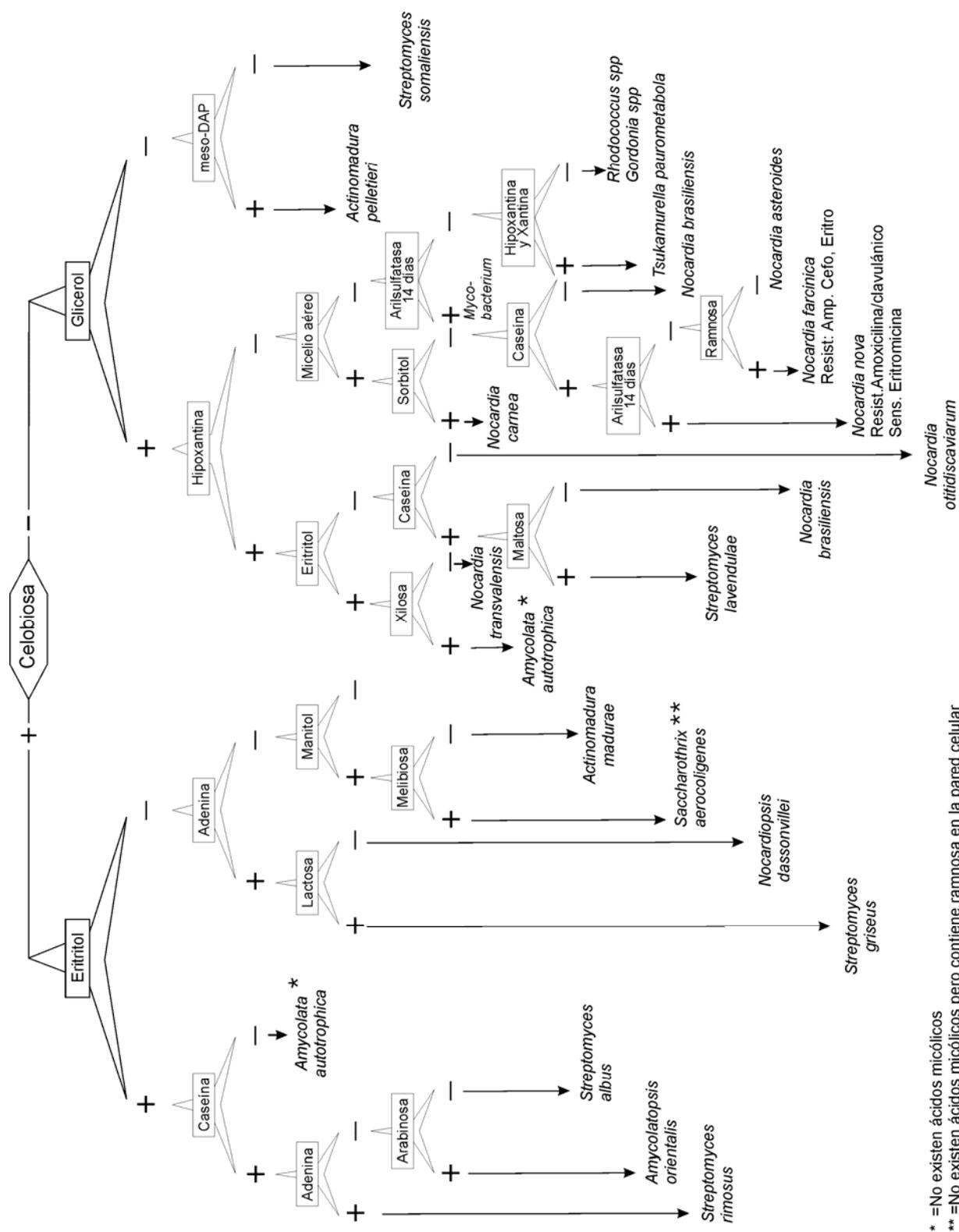
5. *Pseudonocardia*

6. *Oerskovia*

7. *Promicromonospora*

8. *Nocardioides*

9. *Intrasporangium*



* = No existen ácidos micólicos

** = No existen ácidos micólicos pero contiene ramnosa en la pared celular

Esquema 5.9 Marcha de identificación de algunos géneros de actinomicetos patógenos

MÉTODO DE CULTIVO EN LÁMINA RECUBIERTA CON PARAFINA SEGÚN OLLAR

El cultivo en lámina de parafina se basa en el principio de que los microorganismos “parafinofílicos” utilizan la parafina como fuente única de carbono cuando cultivadas en un medio basal de sales tal como lo es el caldo de Czapek, el cual está desprovisto de cualquier forma de fuente de carbono. La lámina recubierta con parafina o “cultivo en lámina” sirve ésta como base y como la única fuente de carbono en este sistema de cultivo.

Los microorganismos parafinofílicos tienen un tropismo por la parafina y que en los microorganismos no-motiles tales como los bacilos no-tuberculosos o micobacterias MOTT y Nocardia son llevados hacia la parafina (única fuente de carbono) a través del movimiento Browniano. Los microorganismos que se unen a la parafina inician en la misma su proceso de crecimiento, en estas condiciones, estos organismos no tienen a su disposición todos los componentes necesarios para realizar su ciclo celular de crecimiento, contando únicamente con la parafina como única fuente de carbono.

Esta técnica de cultivo en lámina recubierta de parafina es en realidad una técnica “bifásica” compuesta de una fase líquida (Caldo Czapek) y otra sólida (lámina recubierta de parafina). Cuando se da el crecimiento en la superficie de la lámina éste se observa como puntos o manchas presentes en la superficie de la lámina recubierta con parafina y también puede verse como grumos de crecimiento a la altura del menisco de la superficie del caldo; en algunos casos puede observarse la presencia de pigmentos.

Ollar, (1979) recientemente desarrolló un Kit comercialmente conocido como: INFECTECH IDENTI KIT TM con el cual se pueden realizar coloraciones para alcohol ácido resistencia, así como se pueden realizar algunas pruebas para determinar especies de mycobacterium o de Nocardia, así como también técnicas de GEN-PROBE para hibridización; así mismo se puede utilizar para aislamiento de micobacterias o nocardias de muestras clínicas tales como: sangre, heces o esputo, también se pueden realizar técnicas para determinar sensibilidad a los antibióticos.

Todas estas pruebas se pueden aplicar para organismos parafinofílicos. Para mayor información sobre este Kit de diagnóstico puede usted escribir a Infected Inc. 87. Stambaugh Av. Suite # 2 Sharon, Pa. 16146. USA o comunicarse a través de los e-mail: rao48@yahoo.com o raollar@pikeonline.net.

CULTIVO EN LÁMINA RECUBIERTA CON PARAFINA (OLLAR, 1976)

Esta técnica combina:

- a) La habilidad de mycobacterium o de Nocardia de utilizar la parafina como fuente única de carbono, lo que permite su aislamiento, tanto de muestras clínicas como del medio ambiente (suelos, etc.)
- b) La coloración “in situ” con técnicas para alcohol-ácido-resistente.
- c) La observación del crecimiento en portaobjetos.

d) La realización de diversas pruebas para caracterización y especiación.

Cultivo:

Resuspender la muestra en agua destilada en un tubo con perlas de vidrio y homogenizarlo. Tomar 1 ml y diluirlo a 10^{-2} . Después se siembra 1 ml de esta dilución en medio Czapek (sin carbohidratos).

Portaobjetos cubiertos de Parafina:

Los portaobjetos se cortan a la mitad, de modo que queden aproximadamente de 10 x 75 mm, se colocan en un tubo y se esterilizan. En cajas de Petri grandes se colocan tubos en vidrio (en forma de “u”) y se esterilizan. Parafina de uso en histología, se coloca en tubos y se esterilizan.

Las cajas de Petri ya estériles se colocan sobre una platina caliente y se agrega la parafina fundida hasta que cubra el tubo de vidrio. El límite de la superficie de la parafina deberá cubrir el portaobjetos cuando se coloque. Los portaobjetos cortados y estériles se pasan por la llama del mechero de Bunsen y se colocan sobre el soporte en forma de “u” de la caja de Petri, de modo que la parafina fundida cubra la superficie del portaobjetos. Se deja durante un (1) minuto y se retira, dejando caer el exceso de parafina del portaobjetos, manteniéndolo en forma vertical. Esta operación se hace rápidamente y de inmediato se coloca el portaobjetos en el tubo estéril donde originalmente estaba. Cuando los portaobjetos están listos, se toma el tubo que los contiene, se pasa varias veces por la llama para aflojar los excesos de parafina y retirar con facilidad los portaobjetos.

Se retira el portaobjetos y se transfiere al medio Czapek previamente inoculado. Se incuba a 32°C ó 37°C el tiempo deseado, después del cual se observa el crecimiento sobre la superficie del portaobjetos cubierto con parafina.

Al haber crecimiento en los portaobjetos estos son retirados del medio líquido y se llevan por pasos sucesivos en tubos (3) que contiene solución fisiológica estéril.

Del portaobjetos se retiran algunas colonias que se transfieren a medio de Lowestein-Jensen. El resto del crecimiento es fijado en formalina al 10% en buffer fosfato 0.06 M durante 30 a 60 minutos.

Enseguida se lava con agua destilada estéril. El portaobjetos, puede entonces, ser teñido con fucsina según Kinyoun.

Para mejorar la visibilidad y transparencia del material, se recomienda desparafinar el portaobjetos con cultivo. Se utiliza una mezcla de trementina y aceite de parafina 2:1 (v/v) y posteriormente se lava con éter de petróleo y agua destilada. Se seca.

ESPECIES CONOCIDAS DE MICOBACTERIAS Y NOCARDIAS COMO MICROORGANISMOS PARAFINOFÍLICOS O NO-PARAFINOFÍLICOS

ORGANISMO	CAPACIDAD PARAFINOFÍLICA
M. tuberculosis	-
M. bovis	-
M. africanum	-
M. microti	+/-
M. paratuberculosis	-
M. leprae	-
M. avium	+
M. intracellulare	+
M. scrofulaceum	+
M. kansasii	+
M. smegmatis	+
M. chelonae	+
M. fortuitum	+
M. xenopii	+
M. marinum	+
M. phlei	+
M. nonchromogenicum	+
M. paraffinicum	+
N. asteroides	+
N. brasiliensis	+
N. caviae (N. otitiscaviarum)	+
N. farcinica	+

BIBLIOGRAFÍA

Balow A. & Hausler WJ. Jr. 1981. Diagnostic Procedures for Bacterial, Mycotic and Parasitic Infections. 6th Ed. American Public Health Association, Inc. Washington. D.C.

Barksdale L. *Mycobacterium*. 1977. Bact. Rev. 41: 217-372.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1986. Vols. 2 y 4 Williams and Wilkins, Baltimore.

Carlson P. & Kontiainen S. 1994. Evaluation of a commercial kit in the identification of *Arcanobacterium haemolyticum* and *Actinomyces pyogenes*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 13 (6) 507-509.

- Coryneform Bacteria. 1978. Eds., Bousfield, I.J. y Calley, A.G., Academic Press, London.
- Manual of Clinical Microbiology. 3 ed. 1980. American Soc for Microbiology. Washington.
- Manual of Methods for General Bacteriology 1981. American Soc for Microbiology. Washington D.C.
- Goodfellow. M.; Grace Alderson Jongsik Chun; 1998 Rhodococcal systematics: problems and developments. *Antonie van Leeuwenhoek* 74: 3-20
- Kurup PV Randhawa HS & Mishra SK 1970. Use of Paraffin Bait Technique in the Isolation of *Nocardia asteroides* from Sputum. *Mycopath. Mycol. Appl.* 1970:40;363-367.
- Microbiol Classification and Identification. 1980 Goodfellow M. y Board, R.G. Eds. Academic Press, London.
- Miller PH., Wiggs LS. & Miller JM. 1995 Evaluation of API An-IDENT and RapID ANA II systems for identification of *Actinomyces* species from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 33: 2 329-330.
- Mishra SK, & Randhawa, HS. 1969 Application of Paraffin Technique to the Isolation of *Nocardia asteroides* from Clinical Specimens. *Appl. Microbiol.* 18: 686-687.
- Mcneill MM, Brown JM. 1994. The medically important aerobic actinomycetes: Epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev* 7 (3) 357-417.
- Ollar, RA. 1976 A Paraffin Technique that Enables a Direct Microscopic View of "in situ" Morphology of *Nocardia asteroides* with the Acid-Fast or Fluorescence Staining Procedures. *Zbl Bakt Hyg. I. Abt. Orig. A.* 234; 81-90.
- The Actinomycetales. Prause, H. 1970 Ed. Gustav. Fischer Verlag. Jena.
- The Biologic and Clinical Basis of Infections Diseases 1980. Eds. Youmans, G.P.: Parerson, P.Y. E.; sommen, HM. WB.Saunders, Co, Philadelphia. USA.
- The Biology of the Actinomycetes. 1984 Eds. Goodfellow, M. Mordarski, M. y Williams, S.T. Academic Press, London.
- The Biology of the Mycobacteria, Eds Ratledge, C. y Stanford, J.C. Academic Press, London. 1982.
- The Biology of the Nocardiae. 1976 Eds. Goodfellow, M.; Brownell, G.H. y Serrano J.A. Academic Press, London.

- The Prokaryotes. 1981 A Handbook of habitats Isolation and Identification of Bacteria Ed. Starr, M.P. Springer Verlag. Berlin.
- Sykes G., Skinner F.A. Actinomycetales Characteristics and Practical Importance. Academic Press, London 1973.
- Vasmel WLE, Vanmourik JC, Jiwa MN., Postmus PE. 1994 Case for Diagnosis - Skin Lesions and an Intrathoracic Mass. Eur Resp J 7 (7) 1379-1380.
- Wallace RJ., Brown BA., Brown JM. Mcneil M. 1994 Taxonomy of *Nocardia* Species. Clin Infect Dis 18 (3) 476.
- Zambardi G., Druetta A., Roure C., Fouque B., Girardo P., Chypre C., Marchand J., Freney J. Fleurette J. 1995 Rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infections by an ELISA-like detection of polymerase chain reaction products. Mol Cell Probe 9 (2) 91-99.

CAPÍTULO 6

CITOQUÍMICA DE ACTINOMICETOS

La quimiotaxonomía es el estudio de la variación química de los organismos vivos y usa estas características para la identificación y clasificación de los mismos.

Se puede decir, que este procedimiento no es nuevo, puesto que la mayoría de las clasificaciones bacterianas están basadas en características químicas. Así podemos decir que los rasgos morfológicos están influenciados por la composición de la pared celular, el color de una colonia es un reflejo de la producción de metabolitos coloridos; sin mencionar que las relaciones serológicas y de hibridación de ácidos nucleicos están basados en un análisis fundamentalmente químico.

Otra forma de definir a la quimiotaxonomía es comparable al establecimiento de la distribución que existe de las macromoléculas y otros componentes celulares específicos (aminoácidos, azúcares, lípidos, etc.) y que pueden ser usados con fines de identificación.

Inicialmente, muchos de los caracteres químicos usados eran subproductos del metabolismo y no fue sino hasta el advenimiento de técnicas cromatográficas muy sensibles que la quimiotaxonomía se hizo parte integral del arsenal diagnóstico. De la misma forma, el desarrollo de las técnicas electroforéticas y de transferencia de proteínas permitió el establecimiento de procedimientos inmunológicos que hicieron posible la comparación de proteínas de diferentes microorganismos.

Aunque los métodos químicos varían en velocidad y facilidad de aplicación y pueden proporcionar datos importantes para la identificación de microorganismos, es necesario decidir cuidadosamente su aplicación con un tipo determinado de bacteria ya que de esta selección dependerá el éxito de la clasificación que se intente establecer.

Es importante tener en mente que aun los mejores métodos quimiotaxonómicos pueden parecer inútiles si las cepas de referencia están mal clasificadas o no son cultivos puros. Una buena estrategia para eliminar estos errores ha sido el evaluar, mediante técnicas de taxonomía numérica, los resultados obtenidos al aplicar una técnica química en particular.

Se ha visto que el mismo marcador químico puede tener diferente valor taxonómico dependiendo de las especies que se estén tratando de estudiar.

Por ejemplo, la composición de las menaquinonas y el patrón de lípidos polares es poco útil en la taxonomía de *Bacillus* y *Staphylococcus*, aunque son de capital importancia en la taxonomía

de los actinomicetales-actinomicetos.

TABLA 6.1 TIPOS DE PARED CELULAR EN ALGUNOS ACTINOMICETOS				
Tipo	Aminoácido diaminado	Otras características	Tipo de peptidoglicana	Género Tipo
I	L-DAP	Glicina	A3 γ	<i>Streptomyces</i> <i>Intrasporangium</i>
II	m-DAP o OH-DAP	Glicina	A1 γ	<i>Actinoplanes</i> <i>Micromonospora</i>
III	m-DAP	Madurosa	A1 γ	<i>A. madurae</i> , <i>Dermatophilus</i> , <i>Microbispora</i>
IV	m-DAP	Arabinosa Galactosa	A1 γ	<i>Corynebacterium</i> <i>Mycrobacterium</i> <i>Nocardia</i> <i>Rhodococcus</i>
V	Lisina	Ornitina Glutámico	A4 α	<i>Actinomyces</i> <i>israelii</i>
VI	Lisina	Galactosa Aspártico Serina Treonina	A4 α	<i>Oerskovia turbata</i>
	Ornitina	Aspártico, Glutámico	A4 β	<i>Cellulomonas</i>
VII	DAB	Glicina	B2 α	<i>Agromyces</i>

TABLA 6.2 CLASIFICACIÓN DE PEPTIDOGLICANAS

Posición del Puente	Péptido del Puente	Aminoácido en posición 3
Peptidoglicana tipo A: Puente entre las posiciones 3 y 4 de dos cadenas vecinas.	1.- Ninguno	α L-lisina β L-ornitina γ m- DAP
	2.- Sub-unidades polimerizadas	α L-lisina
	3.- Oligopéptidos de L-aminoácidos monocarboxílicos o de glicina	α L-lisina β L-ornitina γ L-DAP
	4.- Contiene un aminoácido dicarboxílico	α L-lisina β L-ornitina γ m-DAP δ L-DAB
Peptidoglicana Tipo B: Puente entre las posiciones 2 y 4 de dos cadenas vecinas.	1.- Contiene un L-aminoácido	α L-lisina β L-homoserina γ L-glutámico δ L-alanina
	2.- Contiene un D-aminoácido	α L- ornitina β L-homoserina γ L-DAB
Fuente: Schleifer y Kandler 1972; modificada por Rogers <i>et al.</i> 1980.		

TABLA 6.3 PATRONES DE FOSFOLÍPIDOS EN ACTINOMICETOS									
Nº. de Patrón	PIM	PI	PC	PG	PE	PME	GluNU	APG	DPG
I			-	V	-	-	-	V	V
II	+	+	-	V	+	-	-	V	+
III	V	+	+	V	V	+	-	V	V
IV	?	+	-	-	V	V	+	-	+
V	?	+	-	+	V	-	+	V	+

PIM = Fosfatidil inositol mannosido
 PI = Fosfatidil inositol
 PC = Fosfatidil colina
 PG = Fosfatidil glicerol
 PE = Fosfatidil etanolamina
 PME = Fosfatidil metiletanolamina
 GluNU = Fosfolípido con glucosamina desconocida
 APG = Acil fosfatidil glicerol
 DPG = Difosfatidil glicerol

Los fosfolípidos útiles para diagnóstico están señalados con negritas.

TABLA 6.4 FOSFOLÍPIDOS DE DIAGNÓSTICO	
Nº. de patrón de Fosfolípidos	Fosfolípidos de Diagnóstico
I	Fosfolípido Insaturado
II	Fosfatiletanolamina
III	Fosfatidil colina
IV	GluNu Fosfolípidos con glucosamina desconocida
V	GluNU y Fosfatidilglicerol

TABLA 6.5
PRINCIPALES COMPONENTES DE LA PARED CELULAR
 (Excluyendo lípidos)

Grupos	Género	Tipo de			Principales constituyentes encontrados en pared		% G + C
		Pared	Peptidoglicana	Ac. murámico	Azúcares	Otros	
Actinobacterias	<i>Actinomyces</i>	V, VI	A4 α , A4 β A5 α	ND	ND	Ac. Aspártico	57-69
	<i>Agromyces</i>	VII	B2 γ	ND	ND	Glicina	71-77
	<i>Arachnia</i>	I	A3 γ	ND	Galactosa	Glicina	63-65
	<i>Arcanobacterium</i>	VI	A5 α	ND	Rhamnosa		48-52
	<i>Arthrobacter</i>	VI	A3 α	Acetil	Galactosa	Ac. Aspártico	59-70
	<i>Aureobacterium</i>	VIII	B2 β	Acetil	ND	Glicina	65-76
	<i>Brevibacterium</i>	III	A1 γ	Acetil	Galactosa	ND	60-67
	<i>Cellulomonas</i>	VIII	A4 β	ND	Glucosa	Glicerol	
	<i>Clavibacter</i>	VII	B2 γ	ND	Rhamnosa	Ac. Teicóico	71-76
	<i>Curtobacterium</i>	VIII	B2 β	Acetil	ND		68-75
	<i>Dermatophilus</i>	III	A1 γ	ND	Galactosa		68-75
	<i>Mycrobacterium</i>	VI	B1 α	Glicolil	Madurosa	m-DAP	57-59
	<i>Micrococcus</i>	VI	A3 α	Acetil	Galactosa	Glicina	69-75
	<i>Oerskovia</i>	VI	A4 α	Acetil	Rhamnosa		64-75
	<i>Pimelobacter</i>	I	A3 γ	ND	ND		70-75
	<i>Promicromonospora</i>	VI	A4 α	ND	ND	ND	69-74
	<i>Renibacterium</i>	VI	ND	ND	Glucosa	Ac. Aspártico	53-54
	<i>Rothia</i>	VI	A3 α	ND	Fructosa	Glicina	70-75
<i>Stomatococcus</i>	VI	A3 α	ND	Galactosa	Ribitol	54-57	
				Glucosa			54-60
Actinoplanetas	<i>Actinoplanes</i>						72-73
	<i>Ampullariella</i>						72-73
	<i>Catellatospora</i>	II	A1 γ	Glicolil	Arabinosa	Glicina	71-72
	<i>Dactylosporangium</i>				Xilosa		71-73
	<i>Micromonospora</i>						71-73
<i>Pilimelia</i>						ND	
Esporangios multiloculados	<i>Frankia</i>	III	ND	ND	Madurosa	Meso-DAP	66-71
	<i>Geodermatophilus</i>	III	A1 γ	ND	Fucosa		
					Madurosa	Meso-DAP	73-76
					Xilosa		
Nocardioformes	<i>Caseobacter</i>	IV		ND	Arabinosa		65-67
	<i>Corynebacterium</i>			Acetil	Galactosa		51-63
	<i>Mycobacterium</i>		A1 γ	Glicolil		Meso-DAP	62-69
	<i>Nocardia</i>			Glicolil	Arabinosa		64-72
		VI			Galactosa		
	<i>Rhodococcus</i>			Glicolil			63-72

TABLA 6.5
PRINCIPALES COMPONENTES DE LA PARED CELULAR
(Continuación)

Grupos	Género	Tipo de			Principales constituyentes encontrados en Pared		% G + C
		Pared	Peptidoglicana	Ac. murámico	Azúcares	Otros	
Estreptomicetos	<i>Intrasporangium</i>	I	A3 γ	ND	ND	Glicina LL-DAP	ND
	<i>Kineosporia</i>			ND			ND
	<i>Spirichthya</i>			ND			ND
	<i>Streptomyces</i>			Acetil			69-78
	<i>Streptoverticillium</i>			ND			69-73
Maduromicetos	<i>Actinomadura pusilla</i>	III	A1 γ	Acetil	Madurosa Fucosa	Meso-DAP	64-69
	Grupo						67-74
	<i>Microbispora</i>						66
	<i>Microtetraspora glauca</i>						70-71
	Grupo						72
	<i>Planobispora</i>						69-71
<i>Planomonospora</i>							
<i>Streptosporangium</i>							
Nocardioides	<i>Nocardioides</i>	I	A1 γ	ND	Arabinosa Galactosa	ND	ND
Thermomonosporas	<i>Actinomadura madurae</i>	III	ND	ND	Madurosa	Meso-DAP	66-69
	Grupo						71-73
	<i>Actynosynnema</i>						67
	<i>Microtetraspora viridis</i>						64-69
	<i>Nocardopsis</i>						70-76
	<i>Saccharothrix</i>						ND
	<i>Streptoalloteichus</i>						ND
<i>Thermomonospora</i>	ND						
Micropolisporas	<i>Actinopolyspora</i>	IV	A1 γ	ND	Arabinosa Galactosa	Meso-DAP	64
	<i>Amycolata</i>						68-72
	<i>Amycolatopsis</i>						66-69
	<i>Faenia (Micropolyspora)</i>						66-71
	<i>Kibdelosporangium</i>						66
	<i>Pseudonocardia</i>						79
	<i>Saccharomonospora</i>						69-74
	<i>Saccharopolyspora</i>						77
Otros Géneros	<i>Glycomyces</i>	II	ND	ND	Arabinosa, Xilosa	Meso-DAP	71-73
	<i>Kitasatosporia</i>	I, III	ND	ND	ND	Meso-DAP	66-73
	<i>Spirillospora</i>	III	A1 γ	ND	Madurosa	Meso-DAP	69-71
	<i>Thermoactinomyces</i>	III	A1 γ	ND	ND	Meso-DAP	53-55

* Todas las preparaciones de pared contienen cantidades importantes de alanina, ácido glutámico, glucosamina y ácido murámico; DAB (Ácido diaminobutírico) y DAP (Ácido diaminopimélico).

ND, No Determinado.

Tabla tomada de: The Biology of the Actinomycetes; Edited by M. Goodfellow, M. Mordarski, S.T. Williams., Academic Press, 1984, pp.14-17.

Grupos	Género	Ácidos Grasos	Ácidos micólicos			Menaquinona Predominante	Fosfolípido de Diagnóstico
			No. de Carbonos	No. De dobles enlaces	Fragmentos de pirólisis		
Actinobacterias	<i>Actinomyces</i>	S, U, (C)	----	----	----	MK-10 (H ₂ , H ₄)	PC, PG, PIM
	<i>Agromyces</i>	S, I, A	----	----	----	MK-11, 12, 13	DPG, PG
	<i>Arachnia</i>	S, U	----	----	----	MK-9 (H ₄)	PG
	<i>Arcanobacterium</i>	S, U	----	----	----	MK-9 (H ₄)	ND
	<i>Arthrobacter</i>	S, U, I, A	----	----	----	MK-9 (H ₂)	DPG, PG, PI
	<i>Aureobacterium</i>	S, I, A	----	----	----	MK-11,12	PG
	<i>Brevibacterium</i>	S, U, I, A	----	----	----	MK-8 (H ₂)	PG, PI, PIM
	<i>Cellulomonas</i>	S, I, A	----	----	----	MK-9 (H ₄)	PI, PIM
	<i>Clavibacter</i>	S, I, A	----	----	----	MK-9, 10	PG
	<i>Curtobacterium</i>	S, U, I, A	----	----	----	MK-9	PG, PI,PIM
	<i>Dermatophilus</i>	S, U	----	----	----	MK-8 (H ₄)	PI, PIM (APG, PG)
	<i>Microbacterium</i>	ND	----	----	----	MK-10, 11	DPG, PG
	<i>Micrococcus</i>		----	----	----		
	<i>Oerskovia</i>	S, I, A	----	----	----	MK-9 (H ₄)	PG, PI, PIM, (APG, PE)
	<i>Pimelobacter</i>	S, U, I, A	----	----	----	MK-8 (H ₄)	PG,PE
	<i>Promicromonospora</i>	S, I, A	----	----	----	MK-9 (H ₄)	PG, PI, PIM, (APG, PE)
	<i>Remibacterium</i>	S, I, A	----	----	----	MK-9	DPG
<i>Rothia</i>	S, I, A (U)	----	----	----	MK-7	DPG, PG	
<i>Stomatococcus</i>	ND	----	----	----	ND	PG	
Actinoplanetas	<i>Actinoplanes</i>	S, I, A (U)	----	----	----	MK-9,10 (H ₄)	PE, PI, PIM, (APG)
	<i>Ampullariella</i>	ND	----	----	----	MK-9 (H ₄), 10 (H ₈)	PE, PI, (PIM)
	<i>Catellatospora</i>	ND	----	----	----	MK-9 (H ₄ , H ₆ , H ₈)	PE, PI
	<i>Dactylosporangium</i>	ND	----	----	----	MK-9 (H ₄), 10 (H ₈)	PE
	<i>Micromonospora</i>	ND	----	----	----	MK-9 (H ₄), 10 (H ₈)	PE
	<i>Pilimelia</i>	S, I, A (U)	----	----	----	MK-9 (H ₂ , H ₄)	PE
Esporangios Multilobulado	<i>Frankia</i>	S, U	----	----	----	ND	PG
	<i>Geodermatophilus</i>	ND	----	----	----	ND	PE, PI, (APG, PG)
Nocardioformes	<i>Caseobacter</i>	S, U, T	30-36	0-2	14:0 – 18:0	MK-9 (H ₂)	ND
	<i>Cobynebacterium</i>	S, U, (T)	22-38	0-2	8:0 – 18:0 (14:1 – 18:1)	MK-9 (H ₂)	PI, PIM
	<i>Mycobacterium</i>	S, U, T	60-90	1-2	22:0 – 26:0	MK-9 (H ₂)	ND
	<i>Nocardia</i>	S, U, T	46-60	0-3	12:0 – 18:0 16:1 – 18:0	MK-8 (H ₄), 9 H ₂)	PE, PI, PIM
	<i>Rhodococcus</i>	S, U, T	36-66	0-4	12:0 – 18:0	MK-8 (H ₂), 9 H ₂)	ND
Estreptomycetos	<i>Intresporangium</i>	S, U, (T)	----	----	----	MK-8	PG
	<i>Kineosporia</i>	ND	----	----	----	MK-9 (H ₄)	PC, PI, PME
	<i>Sporichthya</i>	S, U, I, A, T	----	----	----	MK-9 (H ₆ , H ₈)	ND
	<i>Streptomyces</i>	S, U	----	----	----	MK-9 (H ₆ , H ₈)	PE (PI)
	<i>Streptoverticillium</i>	S, U	----	----	----	MK-9 (H ₆ , H ₈)	PE, (PIM)

6.6
LÍPIDOS DE ACTINOMICETOS
(Continuación)

Grupos	Género	Ácidos Grasos	Ácidos micólicos			Menaquinona Predominante	Fosfolípido de Diagnóstico
			No. de Carbonos	No. de dobles enlaces	Fragmentos de pirólisis		
Maduromicetos	<i>Actinoadura pusilla</i>	S, U, T, (I, A)	----	----	----	MK-9 (H ₀ , H ₂ , H ₄)	PI, PIM
	Grupo <i>Microbispora</i>	S, U, I, A, T	----	----	----	MK-9 (H ₄), 10 (H ₈)	PE
	<i>Microtetraspora glauca</i>	S, U, T (I, A)	----	----	----	MK-9 (H ₀ , H ₂ , H ₄)	PI, PIM
	Grupo <i>Planobispora</i>	S, U, I, A, T	----	----	----	MK-9 (H ₂ , H ₄)	PE, PI, PIM
	<i>Planomonospora</i>	S, U, I, A, T	----	----	----	MK-8 (H ₂)	PE, PI, PIM
	<i>Streptosporangium</i>	S, U, I, A, T	----	----	----	MK-9 (H ₄)	PE, PI, (PIM)
Nocardioides	<i>Nocardioides</i>	S, U, I, A, T	----	----	----	MK-8 (H ₄)	APG, PG, PI, (PIM)
Thermomonosporas	<i>Actinoadura madurae</i>	S, U, T, (I, A)	----	----	----	MK-9 (H ₄)	PE
	Grupo <i>Actinosynnema</i>	ND	----	----	----	MK-9 (H ₄), 10 (H ₈)	PE, PI, PIM, (APG, PG)
	<i>Microtetraspora viridis</i>	S, U, I, A, T	----	----	----	MK-9 (H ₄)	PG
	<i>Nocardioipsis</i>	S, U, I, A, T	----	----	----	MK-10 (H ₂ , H ₄ , H ₆)	APG, PC, PG, (PIM)
	<i>Saccharothrix</i>	ND	----	----	----	MK-9 (H ₄), 10 (H ₈)	PE, PG
	<i>Streptoalloteichus</i>	ND	----	----	----	MK-9 (H ₆), 10 (H ₈)	ND
	<i>Thermomonospora</i>	S, I, A	----	----	----	MK-10 (H ₈)	ND
Micropolispora	<i>Actinopolyspora</i>		----	----	----		
	<i>Amycolata</i>		----	----	----		
	<i>Amycolatopsis</i>		----	----	----		
	<i>Faenia</i>		----	----	----		
	(<i>Micropolyspora</i>)	S, I, A	----	----	----	MK-9 (H ₄)	PC, PG
	<i>Kibdelosporangium</i>		----	----	----		
	<i>Pseudonocardia</i>		----	----	----		
	<i>Saccharomonospora</i>		----	----	----		
<i>Saccharopolyspora</i>		----	----	----			
Otros Géneros	<i>Glycomyces</i>		----	----	----		
	<i>Kitasatosporia</i>		----	----	----		
	<i>Spirillospora</i>		----	----	----		
	<i>Thermoactinomyces</i>		----	----	----		

* Todas las preparaciones de pared contienen cantidades importantes de alanina, ácido glutámico, glucosamina y ácido murámico, DAB (Ácido diaminobutírico) y DAP (Ácido diaminopimélico).

ND, No Determinado.

Tabla tomada de: The Biology of the Actinomycetes; Edited by M. Goodfellow, M. Mordarski, S.T, Williams, Academic Press, 1984, pp. 14-17

S = Ácidos grasos saturado	DGP = Difosfatidilglicerol
PE = Fosfatidiletanolamina	PG = Fosfatidilglicerol
V = Ácidos grasos insaturados	APG = Acilfosfatidilglicerol
I = Ácidos grasos isómero iso	ND = No Determinada
A = Ácidos grasos isómero anteiso	T = Ácido tuberculoesteárico
PI = Fosfatidilinositol	PIM = Fosfatidilinositolmonosido

ANÁLISIS CELULAR TOTAL DE ACTINOMICETOS

La pared celular de los actinomicetos, así como la de otras bacterias, contiene una capa de mureina (mucopéptido) (Avery y Blank, 1954; Romano y Sohler, 1956; Cummins y Harris, 1958). Cecil Cummins subrayó en numerosas publicaciones que los constituyentes más importantes de las preparaciones de pared celular pueden ser usados como criterio de valor taxonómico.

Si se calculan juntos los resultados obtenidos por varios investigadores, se notará que varios actinomicetos se encuentran dentro de los 9 tipos de pared celular, señalados en la tabla 6.1.

El proceso por el cual la biomasa y las preparaciones de pared celular son obtenidas presentan ciertas dificultades técnicas, ya que requieren la instrumentación especial para romper células microbianas. Afortunadamente, en el caso de los actinomicetos, ha sido posible determinar cepas pertenecientes a un tipo de pared celular, sin la labor de hacer preparaciones de ésta.

Los actinomicetos con pared celular del tipo I contienen grandes cantidades de L-isómeros de ácido 2,6 diaminopimélico que pueden ser fácilmente reconocidas por una muestra de cromatografía en papel de hidrolizados de células totales. (Becker et al, 1964). La presencia de grandes cantidades de meso-DAP o D-DAP puede ser reconocida por el mismo método. Un organismo conteniendo meso-DAP podría tener paredes celulares de tipo II, III, IV o del tipo Micoplana. Estas Micoplanas son Gram negativas y este tipo de organismo puede ser fácilmente reconocido.

La presencia de azúcares de diagnóstico en hidrolizados de células totales, conduce al reconocimiento de pared celular de tipo II y IV y también permite una separación de Actinomicetos con paredes celulares de tipo III dentro de 2 grupos dependiendo de la presencia o ausencia de madurosa (Tabla 6.1).

1. Métodos usados en Medios de Cultivo

Los actinomicetos pueden crecer tanto en medio líquido como en sólido. Es preferible el uso de cultivos en medios líquidos, ya que el agar puede ser hidrolizado y dar productos de descomposición, tales como deoxigalactosa y algunos de estos tienen casi el mismo valor de Rf que la madurosa.

Varios actinomicetos crecen bien en un medio de extracto de levadura-glucosa (YD): 10g de extracto de levadura, 10g de glucosa comercial, 1 l. de agua, pH alrededor del neutro (ajustar a pH de 7.2 antes de esterilizar).

Muchos organismos exigentes generalmente crecen en BHI o en medio de triptona o soya tripticasa.

Los organismos aeróbicos se cultivan en matraces Erlenmeyer. Los anaeróbicos generalmente darán crecimiento satisfactorio en cultivos líquidos estáticos con un mínimo de 15

cm de profundidad. De cada organismo puede ser cultivado para obtener un mínimo de 60 mg (peso seco) de células. De esto 10 mg son necesarios para la determinación de DAP y 50 mg para análisis de azúcares.

2. Cosecha y Secado de Células

Los actinomicetos que forman un micelio sólido, como muchos estreptomicetos, pueden ser cosechados por filtración en papel. Otros Actinomicetos pueden también ser cosechados por centrifugación, (6.000 a 10.000 rpm por 10 minutos).

Después se lavan con agua (este paso puede ser omitido) y se centrifuga de nuevo, las células son entonces suspendidas en etanol de 24 a 48 horas y finalmente son secadas a temperatura ambiente en un lugar libre de polvo.

Si el organismo cosechado es patógeno o sospechoso, se añade primeramente formalina al cultivo de una concentración de 1% (P/V) y después se incuba a 37°C durante 18 horas. Los cultivos también pueden ser esterilizados antes de la cosecha.

3. Hidrólisis

a) Para la determinación de DAP en tubos sellados

Se colocan 10 mg de células secas en una ampolleta, se añaden 200 ml de ácido clorhídrico 6N y se sella con una flama de oxígeno-gas, las ampolletas son mantenidas durante 18 horas a 100°C en un horno y posteriormente enfriados a temperatura ambiente. Se abren las ampolletas y se secan al vacío con una trampa de NaOH. El residuo se resuspende con 500 ml de agua acidulada.

b) Determinación de Azúcares

Se colocan 10 mg de células secas en una ampolleta, se añaden 200 ml de ácido clorhídrico 4N y se sella con una flama de oxígeno-gas, las ampolletas son mantenidas durante 3 horas a 121°C en un autoclave y posteriormente enfriados a temperatura ambiente. Se abren las ampolletas y se secan al vacío con una trampa de NaOH. El residuo se resuspende con 500 ml de agua.

AZÚCARES

Aplique 10ml del extracto concentrado sobre una placa de celulosa (MERCK 5552). Aplique también un punto conteniendo una mezcla de estándares (1% p/v); galactosa, glucosa, manosa, arabinosa, ribosa y ramnosa.

Los cromatogramas se corren hasta una altura de 6 cm en una mezcla de butanol-agua-ácido acético (60:20:20 v/v) y después se secan al aire. Posteriormente se corren 3 veces con una mezcla de acetato de etilo-piridina-agua-ácido acético (100:35:25:5 v/v) hasta una distancia de 12 cm, secando al aire entre cada operación.

El revelado del cromatograma se hace por aspersion con ftalato de anilina (2 ml de anilina y 3.3 g de ácido ftálico en 100 ml de agua saturada con butanol) con calentamiento a 100°C por 2 a 5 minutos. Las hexosas dan manchas color marrón, las pentosas dan machas rojas y las 6-desoxi-azúcares dan manchas verdosas.

También se puede usar un revelador a base de difenilamina. Los valores de Rf se incrementan en el siguiente orden: galactosa, glucosa, manosa, arabinosa, xilosa, fucosa, ribosa, ramnosa y 6-desoxitalosa. La madurosa da una mancha de color marrón que aparece entre arabinosa y xilosa.

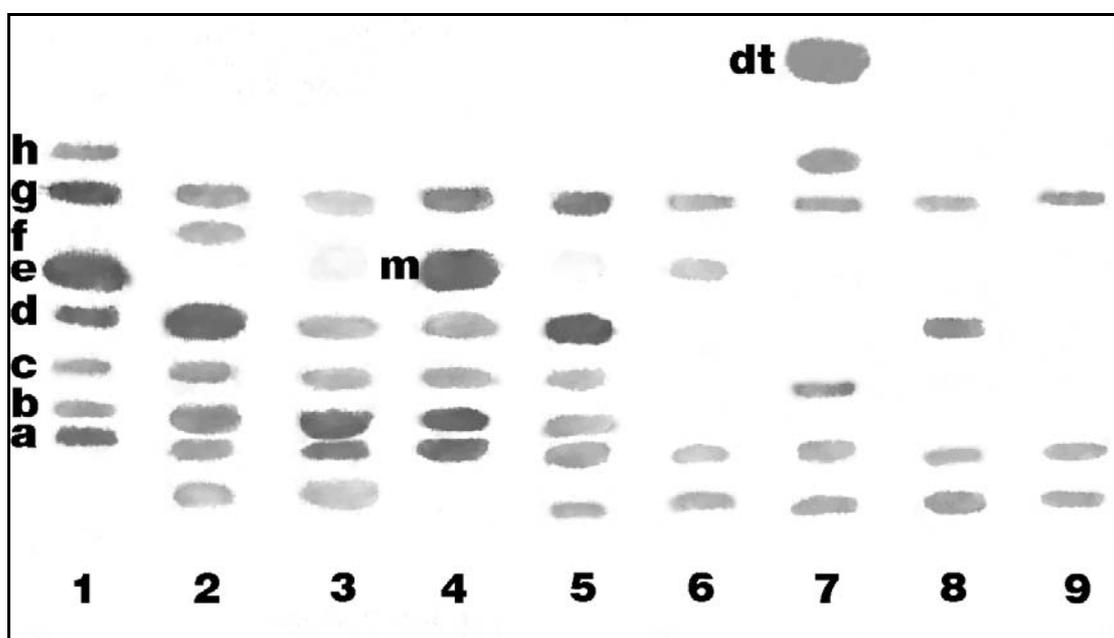


Figura 6.1

Cromatografía de azúcares de hidrolizados totales de Actinomicetos.

- 1) Estándar: a = galactosa, b = glucosa, c = manosa, d = arabinosa, e = xilosa, f = fructosa, g = ribosa, h = ramnosa.
- 2) *Nocardia asteriodes* (gal, glu, man, ara, rib)
- 3) *Streptomyces sp.* (glu y trazas de otros azúcares)
- 4) *Actinomadura madurae* (glu, madurosa (m) rib)
- 5) *Mycobacterium avium* (gal, glu, man, ara, rib)
- 6) *Actinomadura pelletieri* (glu, madurosa, rib)
- 7) *Actinomyces viscosus* (gal, glu, man, rib, ram, 6-desoxi-talosa (dt))
- 8) *Corynebacterim matruchotii* (gal, ara, rib)
- 9) *Rothia dentocariosa* (gal, glu, rib)

AMINOÁCIDOS

Aplique 3 μ l del hidrolizado en una placa de celulosa, y también una mancha de 1 μ l de estándares de aminoácidos que contenga 5 nanomoles de cada uno; alanina, ácido glutámico y ácido m-diaminopimélico, generalmente los estándares comerciales de este ácido vienen contaminados con L-DAP que también nos servirá de referencia.

Correr el cromatograma en una mezcla de metanol-agua-HCL-piridina (80:26:2:10) durante 3 h. También se puede usar la mezcla butanol-piridina-ácido acético-agua (30:20:6:24) durante 2 h.

El revelado del cromatograma se hace asperjando una solución de ninhidrina al 0.3% en butanol saturado con agua y posterior calentamiento a 100°C durante 5 a 10 minutos. Los aminoácidos básicos dan un color gris o azul acero, los aminoácidos ácidos dan un color rojizo y los neutros dan color lila.

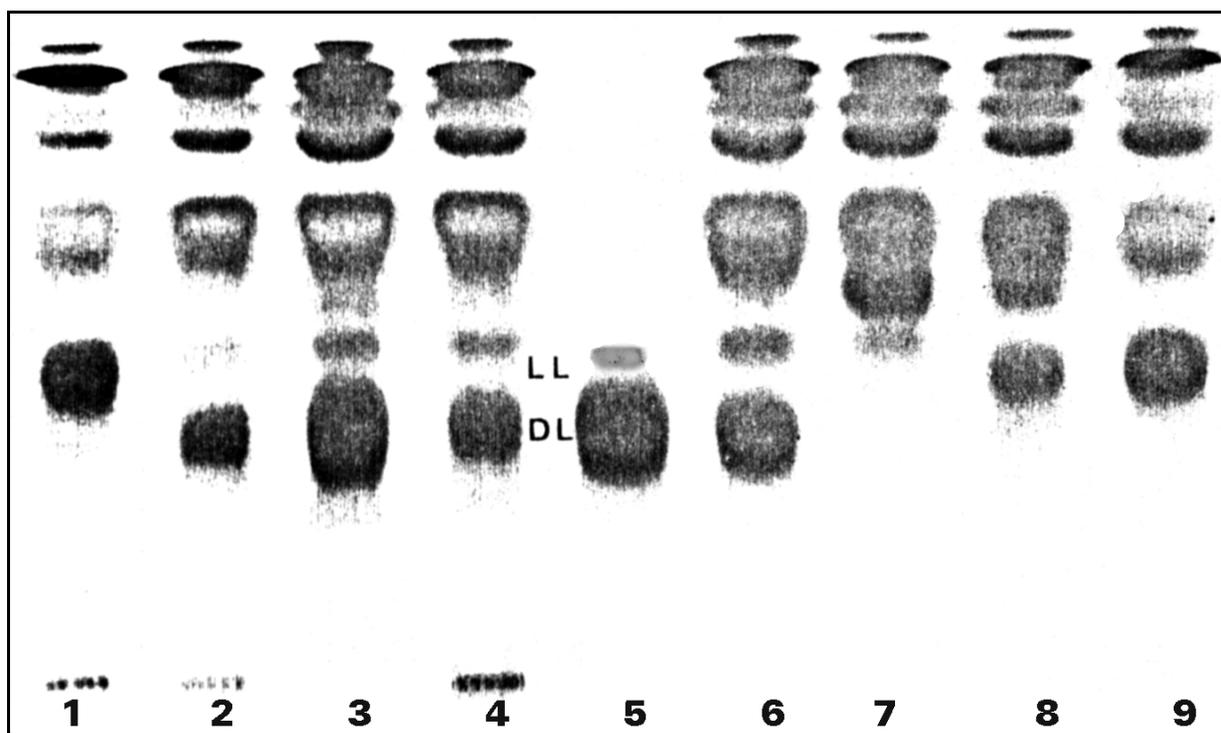


Figura 6.2.

Cromatografía de aminoácidos en capa fina de hidrolizados totales de algunos Actinomicetos.

- | | |
|---|---|
| 1) <i>Streptomyces</i> sp. (L-DAP) | 6) <i>Bacterionema mactruchotii</i> (m-DAP) |
| 2) <i>Nocardia asteroides</i> (m-DAP) | 7) <i>Actinomyces naeslundii</i> (sin DAP) |
| 3) <i>Corynebacterium diphtheriae</i> (m-DAP) | 8) <i>Propionibacterium avidum</i> (L-DAP) |
| 4) <i>C. xerosis</i> (m-DAP) | 9) <i>Arachnia propionica</i> (L-DAP) |
| 5) Estándar de DAP (meso y LL) | |

ANÁLISIS DE LA PARED CELULAR DE ACTINOMICETOS

Preparación de paredes

Para el análisis de la pared se requiere alrededor de 10g de células en fase logarítmica. Si la cepa a ser analizada es patógena, las células pueden ser muertas por esterilización en el mismo medio de cultivo en que se desarrollaron. Éstas son separadas del medio por filtración o centrifugación y pueden ser almacenadas por congelación a -25°C .

1. No intente preparar paredes celulares a partir de células secas.
2. No use células posteriores a la fase log de crecimiento debido a que procesos autolíticos pueden alterar la composición de la pared celular. Esto es particularmente importante para termófilos.
3. Sí es necesario interrumpir el procedimiento en el transcurso de la noche, almacene la preparación de pared celular en el congelador.
4. No almacene soluciones de enzimas en el congelador, prepárelas justo antes de usarlas.

Si las células están en grumos, es aconsejable una homogenización preliminar con un mezclador o mortero. Las células son suspendidas en 30-40ml de buffer de fosfatos 0.1M, pH 8.0.

La suspensión no debe ser muy densa ya que esto reducirá la eficiencia de rompimiento. Una buena suspensión es aquella en que las células se mueven libremente. Una pequeña cantidad de perlas de vidrio se añade (cetafote N° 812 o equivalente) para que las células se rompan por oscilación sónica, si se usa un oscilador Raytheon 10 Kc, 10 minutos son necesarios para realizar este proceso.

Otros osciladores pueden necesitar más tiempo para romper las células.

Algunas bacterias (como por ejemplo *Oerskovia*) pueden ser sonicadas únicamente de 2 a 3 minutos; algunos actinomicetos, especialmente organismos que han sido investigados y poseen un patrón total de azúcares celulares del tipo A, fueron sonicados entre 15 y 25 minutos.

La separación de células enteras de las rotas se realiza por centrifugación diferencial a 3.000rpm durante 3 minutos, el sobrenadante es cuidadosamente descargado procurando no resuspender la masa en el medio y se vuelve a centrifugar a 10.000rpm por 10 minutos, en el caso de organismos con un patrón de azúcares de células totales de tipo A que presentan dificultades para su clasificación. Estas fracciones pueden ser llevadas a 6.000 rpm y 17.000 rpm respectivamente para mejorar resultados.

Todos los lavados subsecuentes se realizan por centrifugación de 8.000 a 10.000 rpm de 7 a 10 minutos.

El paquete de la segunda centrifugación es lavado dos veces con etanol al 95% y luego saponificado por agitación continua de tres días a 37°C, con potasa alcohólica al 2% (2 g de KOH en 100 ml de etanol al 95%) en botellas con tapa de rosca, matraces o tubos.

Las paredes crudas se lavan dos veces con etanol al 95%, 2 veces con agua destilada y tres veces con solución amortiguadora pH 8.0 de fosfato; se recomienda usar un mezclador mecánico (vortex) para resuspender las células en cada lavado. Es esencial realizar cuidadosamente los lavados para obtener preparaciones de pared claras.

El tratamiento de paredes con buffer tripsina pH 8.0 filtrado (3 mg/ml) se efectúa con agitación durante dos horas a 37°C. Las células se lavan dos veces con buffer, dos veces con agua destilada y dos veces con ácido clorhídrico 0.02N. Posteriormente a este tratamiento, las células se agitan toda la noche en una solución filtrada de pepsina (3 mg/ml en HCl 0.2N) a 37°C. Prepare esta solución de 1 a 2 días antes de usarla ya que la enzima es ligeramente insoluble.

Lave dos veces con HCl 0.02N, dos veces con agua y dos veces con etanol y una con cloroformo. Seque las paredes al vacío o a temperatura ambiente.

MÉTODO DE BRAUN Y SIEGLIN PARA PURIFICAR LA PARED CELULAR

El cultivo se separa del medio de cultivo por centrifugación y se lava tres veces con agua destilada.

El paquete celular se seca por liofilización (previa inactivación con formol al 3% o por esterilización en autoclave) y se procede a deslipidar usando una mezcla de cloroformo-metanol (2:1) durante 12 horas en agitación. Esta operación se repite 2 veces más.

El paquete deslipidado se rehidrata con lavados, primero con metanol puro, después con metanol-agua (1:1) y finalmente con agua destilada.

Este paquete se resuspende en NaCl 1M a una concentración aproximada del 10% p/v y se somete a vibración ultrasónica (mínimo 150 W) durante 30 minutos a 1 hora, en períodos de 5 minutos de sonicación por 10 de descanso del sonicador.

Centrifugar a baja velocidad (3.000 x g) durante 15 minutos para eliminar las células que no se rompieron, y a éstas volver a sonicarlas. Juntar los dos sobrenadantes, lavarlos con agua destilada, por centrifugación a 40.000 x g durante 30 minutos.

Resuspender el paquete resultante en agua destilada y gotearla sobre una solución de Dodecil-sulfato de Sodio al 4% (en agua) a 100°C y con agitación, enfriar a temperatura ambiente y dejar en agitación durante una noche.

Centrifugar la suspensión a 40.000 x g durante una hora a temperatura ambiente (el SDS precipita en frío) y lavar el sedimento con agua destilada hasta que el sobrenadante no se sienta jabonoso.

Resuspender el precipitado en agua destilada y secarlo por liofilización.

Esta preparación se puede hidrolizar como ya fue descrito para el análisis de azúcares, lípidos unidos covalentemente y aminoácidos, pero si se desea eliminar los lípidos esterificados y los polisacáridos unidos por enlace difosfato se puede saponificar usando KOH en metanol seco al 0.5% y calentando con agitación a 37°C durante 24 horas o con KOH-metanol 2N a reflujo durante 2 horas.

MÉTODO RÁPIDO PARA LA DEMOSTRACIÓN DE ÁCIDOS MICÓLICOS (Hamid, Minnikin y Goodfellow, 1993)

a) Extracción de Ácidos Micólicos.

La biomasa seca (50mg) se coloca en un tubo de hemólisis con tapón de rosca y empaque de teflón que contiene 2ml de una solución acuosa al 5% p/v de hidróxido de tetrabutil-amonio y se calienta a 100°C durante una noche. Pasado este tiempo, la mezcla se centrifuga a 5.000 x g, el sobrenadante se transfiere a otro tubo, conteniendo 2 ml de diclorometano y 25µl de yodometano, la mezcla se agita vigorosamente durante 30 minutos. Después de centrifugar a 5000 x g se separan dos capas, se desecha la capa superior. La capa inferior, que contiene a los ésteres metílicos de los ácidos micólicos se evapora a sequedad con una corriente de nitrógeno a 37°C.

b) Precipitación de los ácidos micólicos

Los ésteres metílicos de los ácidos micólicos crudos se disuelven en 0.5 ml de diclorometano y se transfieren a un tubo de microcentrífuga (Eppendorf de polipropileno). Se procede a evaporar el diclorometano bajo corriente de nitrógeno y el residuo se redissuelve completamente en tolueno (0.2 ml) y acetonitrilo (0.1ml), entonces se agregan 0.2 ml más de acetonitrilo. La turbidez que se observa es debida a que los ésteres metílicos de los ácidos micólicos son insolubles en la mezcla acetonitrilo-tolueno (3:2).

Los tubos se guardan a 4°C durante 1 hora y se centrifugan a 5.000 xg durante 2 a 3 minutos y el sobrenadante es transferido a otro tubo. Tanto el precipitado como el sobrenadante son secados bajo corriente de nitrógeno y se guardan al 4°C para su análisis posterior.

Un abundante precipitado blanco es indicativo de *Mycobacterium*, ya que otros géneros como *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia* o *Corynebacterium* dan un precipitado muy fino que no flocula y en algunas ocasiones permanece en solución; por lo que es importante conservar tanto el

precipitado como el sobrenadante de la preparación anterior.

PREPARACIÓN DE POLISACÁRIDOS, PARA PRUEBAS DE PRECIPITACIÓN, SEGÚN ZAMORA, BOJALIL Y BASTARRACHEA (1962)

Se hacen crecer las células durante 21 días, en el medio de Proskauer y Beck (modificado por Youmans y Karlson, 1947), se cosechan, se lavan y son deslípidadas con una mezcla de metanol-acetona (1:1) durante 24 horas, se usan 250 ml. de solvente para cada 15 a 20 g de peso seco de células.

Se toman 20 g de células deslípidadas y se muelen con 40 g de polvo de vidrio pyrex, en un mortero, durante 90 minutos. Luego la mezcla se suspende en 250 ml de KCl 3 M. La suspensión se centrifuga durante 15 minutos a 800 x g. el sobrenadante se centrifuga durante 2 horas cada vez, a 3.500 xg. Se toman 10 volúmenes de metanol y se le agregan al sobrenadante, se deja durante 24 h a 4°C. La mezcla es luego centrifugada y el precipitado resuspendido en 50ml de tampón fosfato 0.02 M (pH 7.2). Esta suspensión es dializada contra agua corriente durante 72 horas y precipitada con 10 vol de metanol. Se deja por 24 horas a 4°C el precipitado se recoge por centrifugación y se seca al vacío sobre P₂O₅.

Esta preparación cruda de polisacáridos, es parcialmente solubilizada en 100 ml de tampón carbonato-bicarbonato 0.02 M (pH 10).

Ambas fracciones solubles e insolubles son separadas por centrifugación. El material soluble a pH 10 se le denomina **Polisacárido I**. La fracción insoluble se solubiliza por tratamiento en 190 ml de tampón citrato 0.02 M (pH 5.0). El material soluble a pH 5,0 se le denomina **Polisacárido II**.

Para purificar las fracciones, se desproteiniza con volúmenes iguales de cloroformo. La fase clorofórmica es descartada, esta operación se repite 4 veces. Los polisacáridos presentes en la capa acuosa, son precipitados en metanol, siguiendo el mismo procedimiento ya indicado. Luego se seca en vacío sobre P₂O₅ y se lava con acetona.

El precipitado del polisacárido I es disuelto en solución de NaOH (pH 10), el polisacárido II es disuelto en HCl (solución), pH 3. Las soluciones de cada fracción son luego purificadas por tratamientos con 25 ml de ácido tricloroacético al 5%. Los sobrenadantes del ácido tricloroacético, son dializados durante 72 horas contra agua de chorro.

El material no dializable es precipitado (dos veces) con metanol y secado en vacío (presión reducida) sobre P₂O₅.

PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS MICÓLICOS Y ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA

La pared celular de los actinomicetos contienen muchos compuestos que pueden ser usados en quimiotaxonomía.

La **metanólisis ácida** es un método muy útil para liberar, en forma de ésteres metílicos, a los ácidos grasos de cadena larga.

Existen muchos tipos de ácidos grasos entre los actinomicetos, ácidos de cadena corta y larga, metilados en C₁₀ (ácido tuberculoesteárico), etc.

Los ácidos micólicos se encuentran sólo en algunos de los actinomicetos por lo que son de gran utilidad taxonómica, particularmente en los géneros *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium* y *Rhodococcus*.

METANÓLISIS ÁCIDA

1) Pese 50 mg de biomasa seca en un tubo de tapón de rosca con sello de teflón, o en una ampolleta, añada 3 ml de una mezcla seca de metanol-tolueno-H₂SO₄ (30:15:1 v/v) y caliente a 55-75 °C durante una noche.

2) Enfríe a temperatura ambiente y añada 2 ml de hexano, agite y centrifugue a baja velocidad. Prepare una columna de carbonato de amonio en una pipeta Pasteur y lávela con una mezcla de metanol cloroformo (1:2). Tome la capa superior (hexano) y aplíquela a la columna, colecte el efluente en un vial y repita la extracción con 1 ml de hexano, finalmente añada 1 ml de éter etílico a la columna y junte el eluído con los anteriores. Secar bajo corriente de nitrógeno a 40°C.

ANÁLISIS Y PURIFICACIÓN

Análisis de muestras crudas de ácidos micólicos por cromatografía en capa fina unidimensional.

Redisolver la preparación cruda de ésteres metílicos en 100µl de hexano y aplique aproximadamente 4 µl en una placa de gel de sílice (Merck 5554). Correr el cromatograma en una mezcla de Hexano-Eter etílico (85:15 v/v) o Hexano-acetona (95:5).

La muestra cruda de ésteres metílicos obtenida por metanólisis ácida también puede ser procesada de acuerdo con el método de Hamid *et. al.* descrito anteriormente.

CROMATOGRAFÍA BIDIMENSIONAL DE ÁCIDOS MICÓLICOS

Aplique aproximadamente 5 μ l del metilado crudo en la esquina de una placa de gel de sílice (Merck 5554) a una distancia de 1 cm de cada lado. Corra el cromatograma en un sentido con hexano- acetona (95:5 v/v), secar y repetir el corrimiento en la misma dirección dos veces más. Correr la placa en la segunda dirección con tolueno-acetona (97:3) v/v).

Revelado: Asperjar las placas con una solución etanólica de ácido fosfomolíbico al 5-10% y caliente a 105°C durante 15 minutos.

PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Prepare un cromatograma aplicando una banda de aproximadamente 1cm de metilado crudo. Correr en una mezcla de hexano-éter (85:15 v/v), secar y asperjar una solución de Rodamina 6G al 0.01% en etanol. Seque y observe bajo luz ultravioleta de onda larga. Corte la banda con Rf de 0.7-0.8 y extraiga con éter etílico. Aplicar el extracto a una columna de óxido de aluminio (en una pipeta Pasteur) con objeto de eliminar la rodamina, repetir la extracción y el eluido, secarlo con una corriente de nitrógeno.

Esta preparación se usa para hacer el análisis en cromatografía de gases. Use una columna poco polar (OV-101, carbowax, silar 10C, DEGS, etc.) y un detector de ionización de flama; las columnas capilares dan mejores resultados.

LÍPIDOS POLARES Y MENAQUINONAS

Pesar aproximadamente 50 mg de biomasa seca en un tubo de tapón de rosca con sello de teflón o en una ampollita y añada 2 ml de metanol-sal (10 ml de NaCl 0.3% en agua, más 100 ml de metanol) y 2 ml de hexano.

Agitar en vortex durante 15 minutos, centrifugar a baja velocidad durante 5 minutos y transferir la fase de hexano (que contiene las quinonas isoprenoides) a un vial. Repetir la extracción una vez más y juntar los sobrenadantes, finalmente, secar con una corriente de nitrógeno; guardar en congelación y oscuridad.

El sedimento de la centrifugación se calienta en baño maría a ebullición durante 5 minutos y se enfría a 37°C por 5 minutos.

Añadir 2.3ml de cloroformo-metanol-NaCl 0.3% (90:100:30 v/v). Agitar durante una hora, centrifugar y recuperar el sobrenadante. Al residuo añadir 0.75 ml de cloroformo-metanol-NaCl 0.3% (50:100:40 v/v), agitar durante 30 minutos, centrifugar y juntar los sobrenadantes.

A los sobrenadantes añadir 1.3 ml de cloroformo y 1.3 ml de NaCl 0.3%, mezclar, centrifugar y descartar la fase superior acuosa usando una pipeta Pasteur. Evaporar a sequedad la fase inferior (orgánica) en una corriente de nitrógeno a menos de 47°C.

Este extracto contiene a los lípidos polares (guardar en refrigeración). Con esta técnica se pueden extraer tanto las menaquinonas, como los lípidos polares de la misma muestra de biomasa seca.

CROMATOGRAFÍA BIDIMENSIONAL DE LÍPIDOS POLARES

Preparar cuatro placas de cada extracto. Redisolver los lípidos polares en 50µl de cloroformo-metanol (2:1 v/v) y aplique 5µl en una esquina de cada placa de gel de sílice (aproximadamente a 1cm de cada lado). Correr los cromatogramas en cloroformo metanol-ácido acético (65:25:4 v/v) para la primera dirección y con cloroformo-ácido acético-metanol-agua (80:15:12:4 v/v) para la segunda dirección.

Revelado

Asperjar una placa con cada revelador listado a continuación.

1) Para lípidos totales: Solución de ácido molibdofosfórico al 10% en etanol y calentamiento a 105°C durante 15 minutos.

2) Para aminolípidos: Solución de ninhidrina al 0.2% en butanol saturado con agua y calentamiento a 105°C durante 5 minutos.

3) Para glicolípidos: reactivo de alfa-naftol y calentamiento a 100°C durante 10 minutos. (**Reactivo:** Mezclar 10.5 ml de una solución etanólica de alfa:naftol al 15% más 6.5 ml de ácido sulfúrico concentrado, más 40.5 ml de etanol y 4 ml de agua). Los glicolípidos dan manchas color café.

4) Para fosfolípidos: Reactivo de Zindadze, inmediatamente después de la aspersión los fosfátidos aparecen como manchas azules sobre fondo blanco.

Este reactivo se prepara de la siguiente manera: disolver 40.11 g de trióxido de molibdeno en 1 L de ácido sulfúrico concentrado, después se añaden 1.5 g de molibdeno en polvo a 500 ml de la solución anterior. Se mezclan volúmenes iguales de las dos soluciones y finalmente se diluyen con 2 volúmenes de agua.

5) Para lípidos conteniendo grupos hidroxilo vecinos: La placa se trata con solución acuosa de metaperyodato de sodio al 1% (p/v) hasta saturación y se deja durante 10 minutos a temperatura ambiente para completar la oxidación.

Decolorar con bióxido de azufre gaseoso para eliminar el exceso de peryodato.

La placa decolorada se asperja con reactivo de Schiff preparado por decoloración de una solución de clorhidrato de p-rosanilina al 1% con bióxido de azufre gaseoso.

Con el uso de este reactivo los glicolípidos pueden tardar varias horas antes de que aparezcan las manchas en tonos de azul-púrpura.

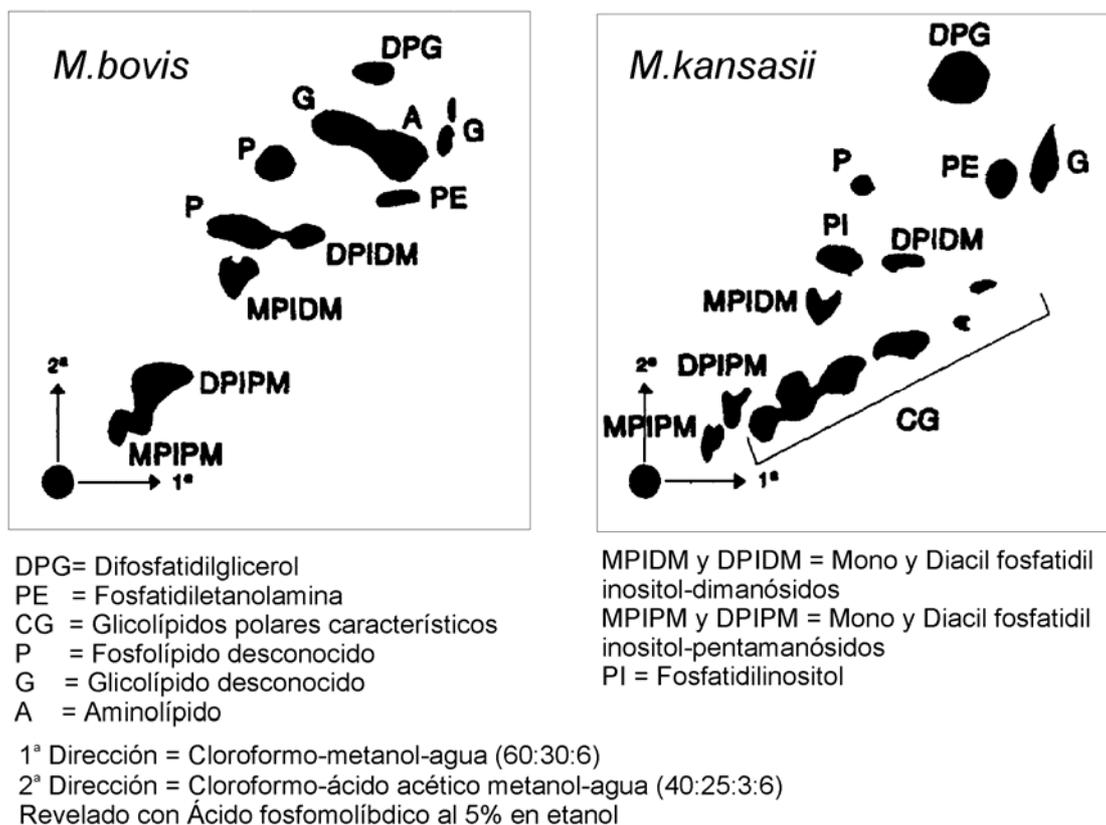


Figura 6.3

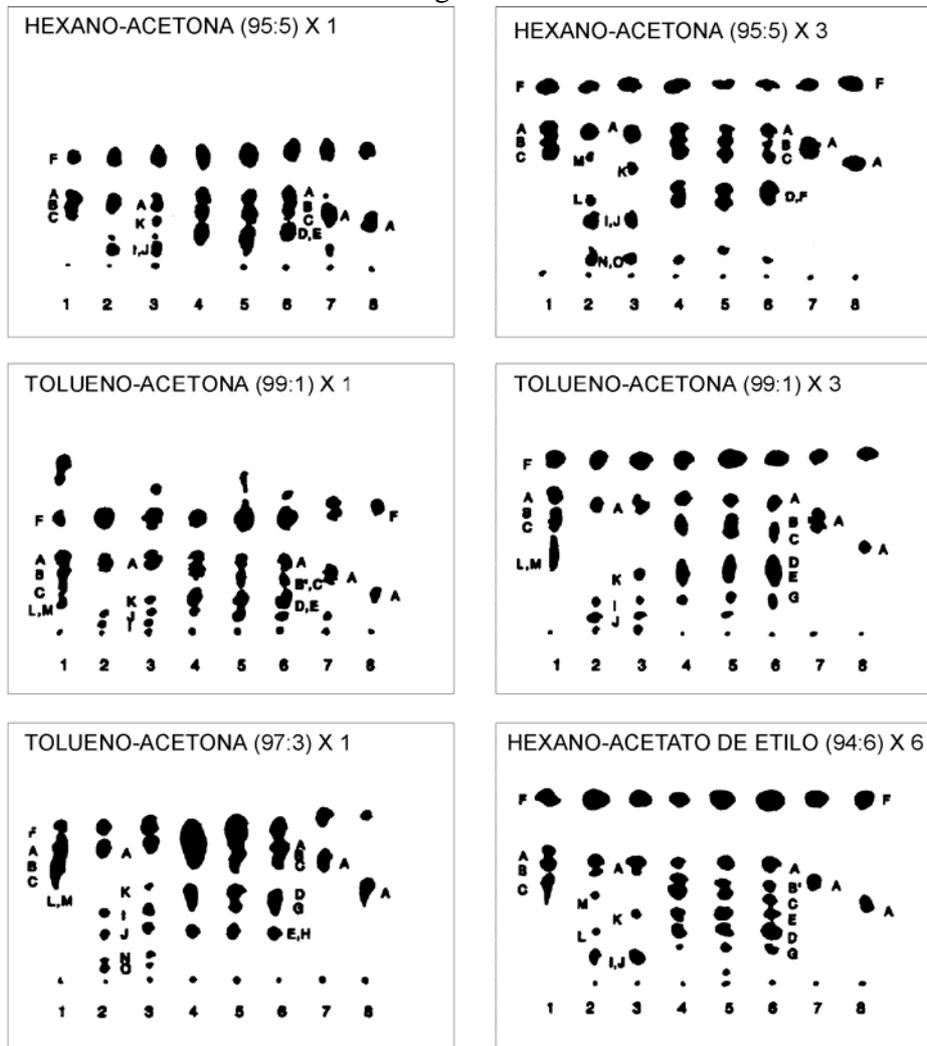
PURIFICACIÓN DE MENAQUINONAS

Disolver el extracto de las menaquinonas en 100µl de hexano y aplicarlas, como una banda, en una placa de gel de sílice. Correr el cromatograma en una mezcla de hexano-éter etílico (95:5 v/v) y detectar la menaquinonas por irradiación con luz ultravioleta de onda corta (254 nm), cortar la banda de menaquinonas (Rf 0.7- 0.8) y extraer con 1 ml de éter etílico. Secar bajo corriente de nitrógeno.

CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA EN FASE REVERSA DE LAS MENAQUINONAS

Disolver a las menaquinonas en hexano y aplicar 10µl en una placa de fase reversa (Merck 13724). Correr el cromatograma con una mezcla de acetona-agua (99:1 v/v) y revelar la manchas de menaquinonas bajo luz ultravioleta de onda larga.

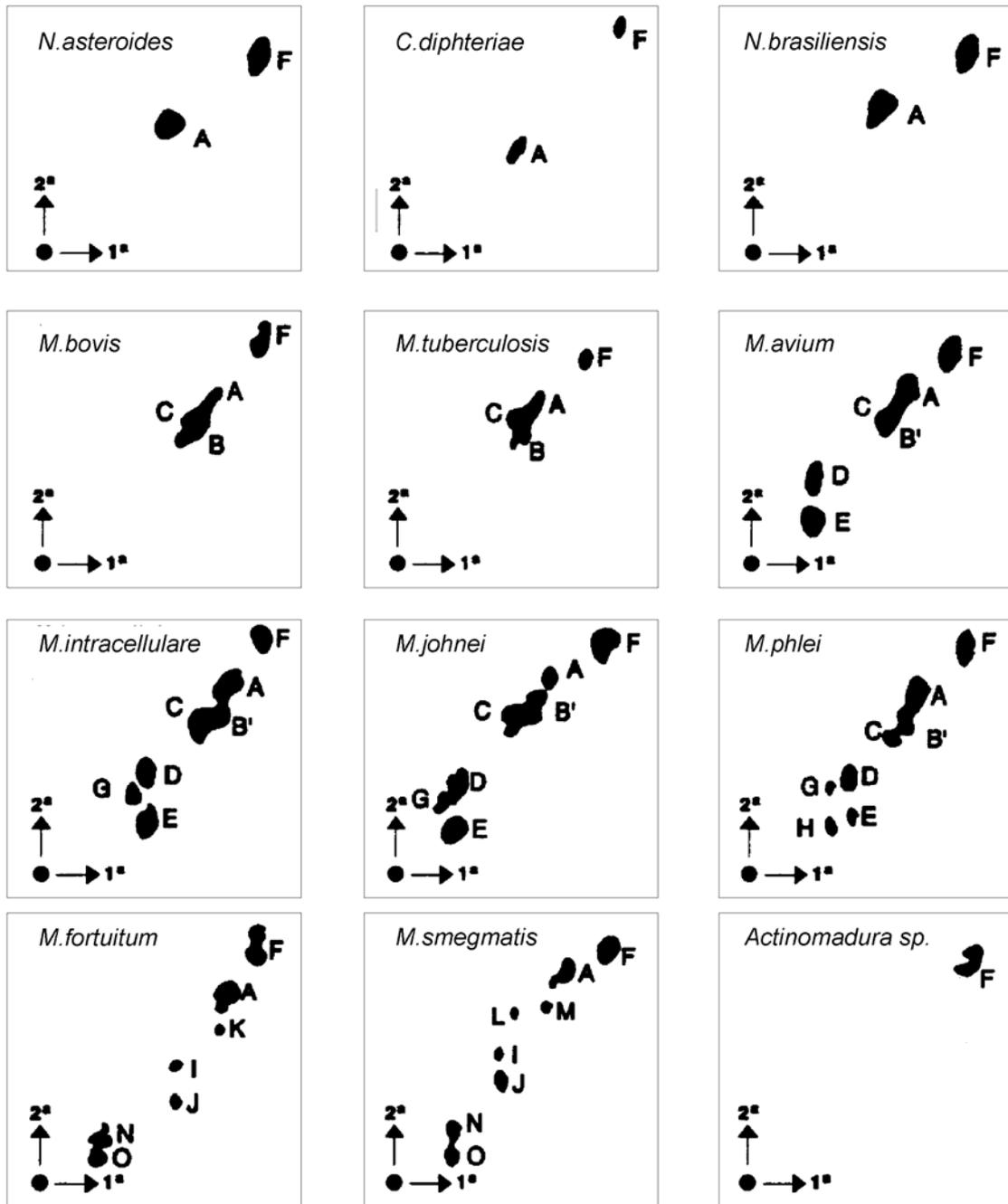
Figura 6.4



A = Ácido Micólico
 B = Metoximicolato
 C = Cetomicolato
 D = ω-carboximicolato
 E = 2-eicosanol
 F = Ácidos grasos pequeños
 G = Desconocido presente en *M. avium*, *M. johnei* y *M. phei*
 H = Desconocido presente en *M. phei*
 I, J = Desconocidos presente en *M. smegmatis* y *M. fortuitum*
 K = Desconocido presente en *M. fortuitum*
 L, M = Desconocidos presentes en *M. tuberculosis*
 N, O = Desconocidos presentes en *M. smegmatis* y *M. fortuitum*

Cepas:

- | | |
|---------------------------|--------------------------|
| 1) <i>M. tuberculosis</i> | 5) <i>M. johnei</i> |
| 2) <i>M. smegmatis</i> | 6) <i>M. phlei</i> |
| 3) <i>M. fortuitum</i> | 7) <i>N. asteroides</i> |
| 4) <i>M. avium</i> | 8) <i>C. diphtheriae</i> |



A = Ácidos micólicos
 B = Metoximicolatos
 C = Cetomicolatos
 B', G, H, I, J, K, L, M, N, O = DESCONOCIDOS
 D = ω -carboximicolatos
 E = 2-eicosanol
 F = Ácidos grasos pequeños
 1º dirección = Hexano-Acetona (95:5) 3 veces
 2º dirección = Tolueno-Acetona (97:3) una vez

Figura 6.5

BIBLIOGRAFÍA

- Analytical Microbiology Methods. 1990. Eds. Fox A., Morgan SL., Larsson L. and Odham G. Plenum Press. New York.
- Avery RJ, Blank F. 1954. On the chemical composition of the cell walls of the Actinomycetales and its relation to their systematic position. *Can J Microbiol.* (1): 140-143.
- Bojalil LF., Cerbon J. 1959. Schema for the differentiation of *N.asteroides* and *N.brasiliensis*. *J Bacteriol.* (78): 852-857.
- Burdon KL. 1949. Fatty material in bacteria and fungi revealed by staining dried, fixed slide preparation. *J Bacteriol.* (52): 665-678.
- Carson M, Hellyar A. 1994. Opacification of Middlebrook agar as an aid in distinguishing *Nocardia farcinica* within the *Nocardia asteroides* complex. *J Clin Microbiol.* 32:2270-2271.
- Cummins CS. Harris H. 1958. Studies on the cell wall composition and taxonomy of Actinomycetales and related groups. *J Gen Microbiol.* (18): 173-189.
- Goodfellow M, Minnikin DE. 1985. *Chemical Methods in Bacterial Systematics.* Academic Press. Londres.
- Goodfellow M, O'Donnell AG. 1993. *Handbook of New Bacterial Systematics.* Academic Press. Londres.
- Hamid ME, Minnikin DE Goodfellow M. 1993. A simple chemical test to distinguish mycobacterial from other mycolic-acid-containing actinomycetes. *J Gen Microbiol.* 139 2203-2213.
- Hamid ME, Chun JS, Magee JG, Minnikin DE. Goodfellow M. 1994. Rapid Characterisation and Identification of Mycobacteria Using Fluorogenic Enzyme Tests. *Zbl Bakt-Int J Med Microbiol.* 280: 476-487.
- Iwahori K, Wang M, Taki H. Fujita M. 1995. Comparative studies on utilization of fatty acids and hydrocarbons in *Nocardia amarae* and *Rhodococcus* spp. *J Ferment Bioeng* 79 86-189.
- Lechevalier MP. 1968. Identification of aerobic actinomyces of clinical importance. *J Lab Clin Med.* (71): 934-944.
- Lechevalier MP, Gerber, NN. 1970. The identity of madurose with 3-O-methyl-D-galactose. *Carbohydrate Research* (13): 451-454.

- Lechevalier MP, Lechevalier HA. 1970. Composition of whole-cell hydrolysates as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. In: (ed) Prause H. The Actinomycetales. Gustav-Fische. Jena.
- O'donnell AG., Goodfellow M, Hawksworth DL. 1994. Theoretical and practical aspects of the quantification of biodiversity among microorganisms. *Philos Trans R Soc Lond Biol* 345 65-73.
- Park YH, Suzuki KI, Yim DG, Lee KC, Kim E, Yoon JS., Kim SJ, Kho YH., Goodfellow M, Komagata K. 1993. Suprageneric classification of peptidoglycan group B actinomycetes by nucleotide sequencing of 5S ribosomal RNA. *Anton Leeuwenhoek Int J Gen M* 64 307-313.
- Rainey F, Weiss N, Prauser H, Stackebrandt E. 1994. Further evidence for the phylogenetic coherence of actinomycetes with Group B-peptidoglycan and evidence for the phylogenetic intermixing of the genera *Microbacterium* and *Aureobacterium* as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol Lett* 118 135-139.
- Romano AH y Sohler A. 1956. A comparison of the cell wall composition of species of the genera *Streptomyces* and *Nocardia*. *J. Bacteriol.* (72): 865-868.
- Sutcliffe IC. 1995. The lipoteichoic acids and lipoglycans of gram-positive bacteria: A chemotaxonomic perspective. *Syst Appl Microbiol* 17 467-480.
- Truant JP; Brett WA Thomas W Jr. 1962. Fluorescence microscopy of tubercle bacilli stained with auramine and rhodamine. *Henry Ford Hosp. Med. Bull.* (10): 287-296.
- Tulskaya EM, Potekhina NV, Naumova IB, Shashkov AS, Evtushenko LI. 1993. A Comparative Study of Teichoic Acids from Cell Walls of the Actinomycetes *Glycomyces rutgersensis* and *Glycomyces harbinensis*. *Microbiology-Engl Tr* 62 557-559.
- Zamora A, Bojalil LF Bastarrachea F. 1963. Immunologically Active Polysaccharides from *Nocardia asteroides* and *N.brasiliensis*. *J. Bacteriol.* 85 549-555.

CAPÍTULO 7

LÍPIDOS DE ACTINOMICETOS

Los lípidos representan un conjunto amplio heterogéneo de compuestos, que tienen la propiedad en común de ser solubles en solventes orgánicos y/o de poseer ácidos grasos en su constitución. Por esta razón frecuentemente son simultáneamente estudiados los hidrocarburos y las menaquinonas.

En este capítulo serán omitidos esos dos grupos de compuestos y serán solamente considerados los ácidos grasos y sus derivados.

Además serán tratados distintamente, en diversas oportunidades, los rodococos, las nocardias y las micobacterias de los demás actinomicetos, esto para facilitar la comprensión sobre los lípidos. Inicialmente serán descritos los lípidos de rodococos, de las nocardias y de las micobacterias y luego algunos constituyentes de los estreptomicetos.

A- Lípidos de rodococos, nocardias y micobacterias.

1. Ácidos grasos

1.1 Ácidos grasos no hidroxilados.

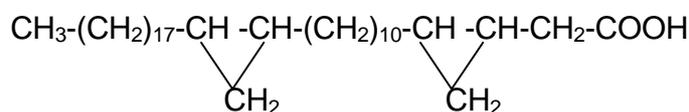
Los rodococos, las nocardias y las micobacterias se caracterizan por la presencia de dos grupos fundamentales de ácidos grasos: Los ácidos no hidroxilados y los ácidos micólicos.

Algunos de los ácidos no hidroxilados más comunmente encontrados (Tabla 9.1) son: palmítico, $C_{16:0}$ (ácido hexadecanóico), palmitoleíco $C_{16:1}$ (ácido 9-hexadecenóico), esteárico $C_{18:0}$ (ácido octadecanóico): oleíco, $C_{18:1}$ (ácido 9-octadecenóico).

En las micobacterias se encuentran en pequeña cantidad ácidos tales como: tetracosanóico, $C_{24:0}$ y hexacosanóico, $C_{26:0}$ también, se encuentran otros ácidos tales como el isopalmítico $C_{16:1i}$ (ácido 14-metil-pentadecanóico), anteiso-palmítico, $C_{16:1a}$ (ácido 13- metil-pentadecanóico).

El ácido tuberculoesteárico, $C_{19:1r}$ (ácido 10-metil octadecanóico), ha sido identificado en rodococos, nocardias y micobacterias y también ha sido descrito en *Actinomadura* y en *Microtetraspora*.

Es importante resaltar la presencia del ácido de cadena larga con anillos de ciclo propano, en micobacterias.



Ácido cis-cis-3,4-15,16-bisnitrileno tetratriacontanóico

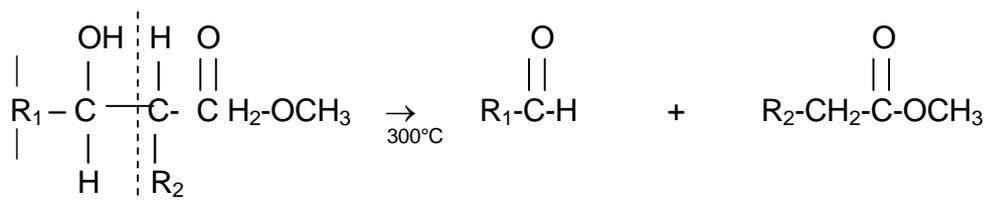
1.2. Ácidos micólicos

Con la denominación genérica de ácidos micólicos se conocen los ácidos grasos alfa-alkil-beta-hidroxiácidos de peso molecular elevado, que se encuentran en las corinebacterias, rodococos, nocardias y micobacterias (Tabla 9.2).

Los ácidos micólicos se pueden concebir en función del tamaño de la cadena hidrocarbonada (Tabla 9.3). Es interesante hacer notar que siendo $\text{R}_1\text{-CHOHCH}(\text{R}_2)\text{-COOH}$ (I) la fórmula general del ácido micólico, en las corinebacterias, los rodococos y las nocardias, el radical R_2 posee una cadena hidrocarbonada de cerca de 14 átomos de carbono (C_{14}) en cuanto que en las micobacterias es R_2 aprox. C_{24} .

Los ácidos micólicos tienen la particularidad de sufrir fragmentación por pirólisis, según el esquema siguiente:

La identificación de estos fragmentos a través de cromatografía, en fase gaseosa, o por medio de la espectrometría de masas cromatografía gaseosa combinada con espectrometría de masa, es de gran utilidad en la taxonomía e identificación de estos géneros de microorganismos.



Micolato de Metilo

Meroaldehído

Ester metílico del ácido graso

1. Esteres naturales de los ácidos grasos

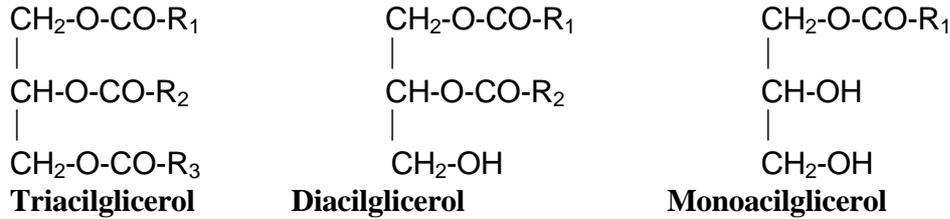
Los ésteres naturales pueden ser agrupados de acuerdo con el tipo de ácidos grasos constituyentes, así: en lípidos que contienen ácidos no hidroxilados y los que contienen ácidos micólicos.

2.1. Lípidos que contienen ácidos no hidroxilados.

Según la Tabla 9.4, se pueden considerar en este grupo las siguientes clases lipídicas: acilgliceroles, fosfolípidos, fosfoglicolípidos, glicolípidos, micósidos y ceras.

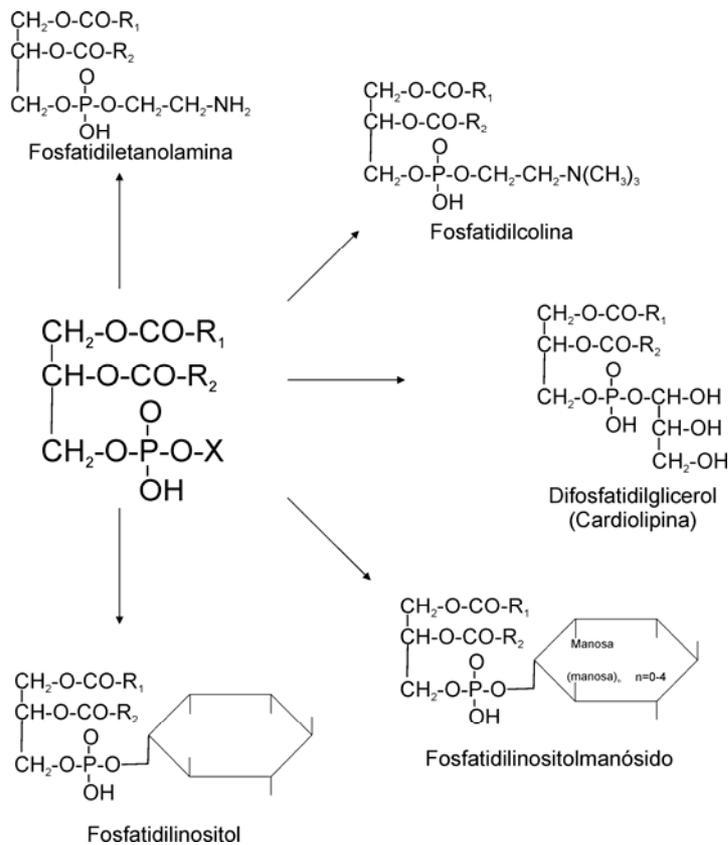
Acilgliceroles.

Los acilgliceroles son representados por mono acil-, diacil- y triacilgliceroles.



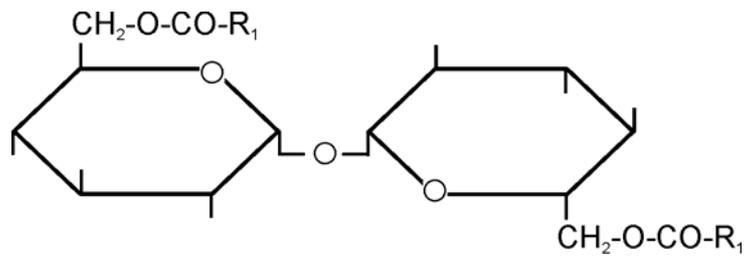
2.1.2. Fosfolípidos y fosfoglicolípidos.

En este grupo se encuentran con mayor frecuencia: cardiolipina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y fosfatidilinositol-manósido.



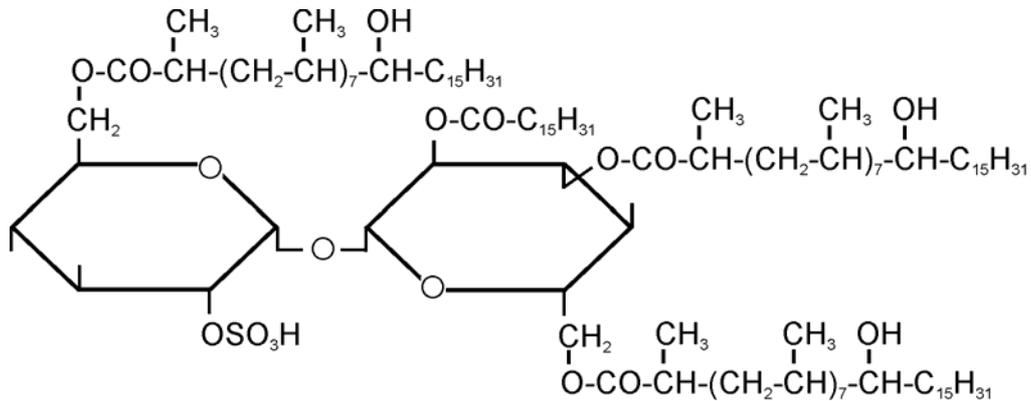
2.1.3. Ésteres de trealosa

Normalmente la molécula de trealosa se encuentra esterificada a través de un hidroxilo del carbono C₆ de las unidades de glucosa del disacárido, constituyendo 6,6'- diéster de trealosa.

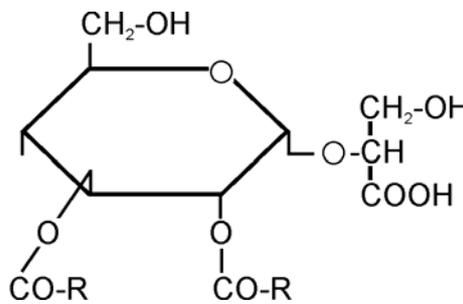


La trealosa podrá estar esterificada en la misma unidad de glucosa a través de los hidroxilos de los carbonos C₄ y C₆, originando un éster asimétrico.

En el *Mycobacterium tuberculosis* se han encontrado ésteres de trealosa, sulfatados, que poseen ácidos tioceránicos. ejemplo: sulfolípidos SL-I. El sulfolípid SL-I no posee el radical acilo en la unidad glicocídica que contiene el sulfato.

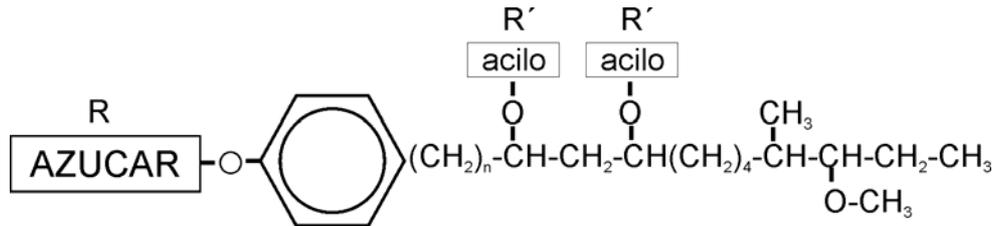


El sulfolípid ha sido solamente descrito en micobacterias. La fosfatidilcolina y el acilglucosilglicerato han sido encontrados, hasta el momento, exclusivamente en *N.coeliaca* y *N.otitidiscaviarum*.



2.1.4. Micósidos

Son conocidos por micósidos los glicolípidos fenólicos encontrados en micobacterias y cuya estructura se ilustra a continuación: R = trisacáridos que contienen 2- y 3-O-metilfucosa, ramnosa, 2,4-di-O-metilramnosa. R' = acilos -C_{12:0}, C_{18:0}, tuberculoestearoilo, micocerosoilo, n = 16-18.



Micósido B

R: 2-O-metilramnosa R': Micocerosoilo n = 18-22

Micósido G

R : 2-O metilramnosa R': micocerosoil n = 18-22

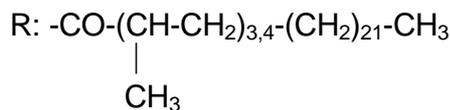
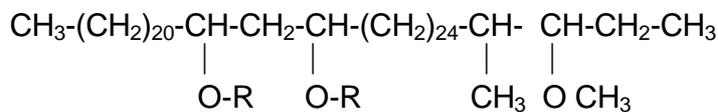
Micósido C

A diferencia de los demás micósidos, se trata de peptidoglicolípidos, serológicamente activos y tipo específicos.

Acil-Fen-Tre-Ala-alaninol-derivado de ramnosa O-(derivado de trealosa) (derivado de trealosa y ramnosa) Acilo: C₃₂-, C₃₄-, C₃₆-, hidroxiácidos insaturados.

2.1.5. Ceras

En micobacterias se han descrito la presencia de ésteres de ácidos y alcoholes de alto peso molecular, denominados ceras. vg.: dimicocerosato de fticerol.

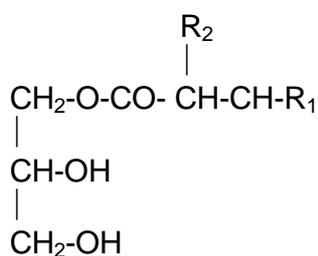


2.2 Lípidos que contienen ácidos micólicos

Los ácidos micólicos, de la misma manera que los ácidos no hidroxilados se pueden encontrar en su forma libre o en forma de ésteres.

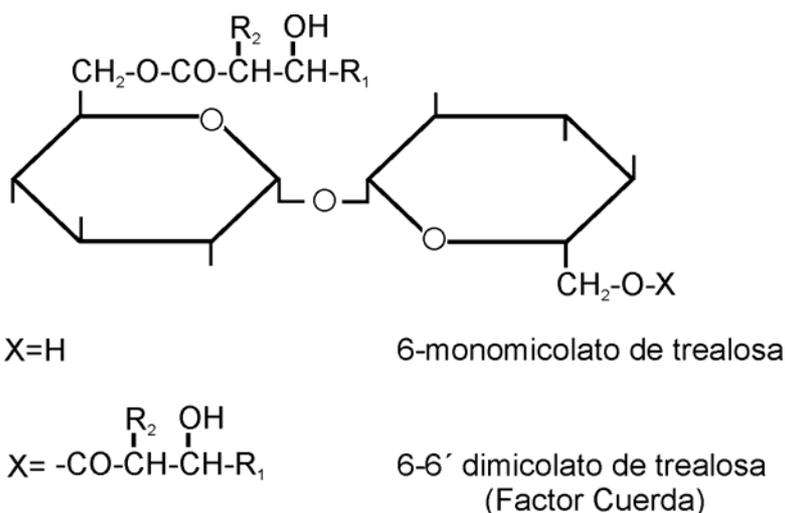
2.2.1. Ésteres de glicerol

En el caso de los ésteres de glicerol, los ácidos micólicos esterifican solamente uno de los grupos hidroxílicos primarios del glicerol, constituyendo el monomicolilglicerol.



2.2.2. Ésteres de trealosa

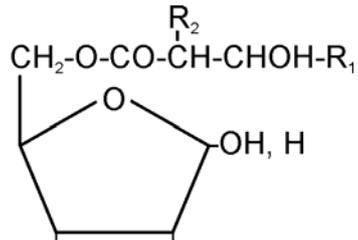
Los organismos productores de ácidos micólicos poseen en su composición lipídica, glicolípidos en cuya estructura se encuentra la trealosa esterificada a través de los hidroxilos de los carbonos C₆ y C_{6'}, con ácidos micólicos, constituyendo 6,6'-dimicolatos de trealosa. En mucha menor cantidad se encuentra el 6-monomicolato de trealosa, que sería intermediario en la biosíntesis del diéster.



El factor cuerda posiblemente puede ejercer una acción toxigénica, contribuyendo al desarrollo de un proceso inflamatorio crónico.

2.2.3. Éster de arabinosa

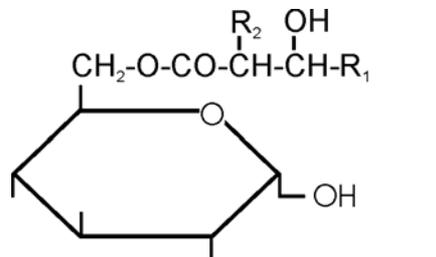
El ácido micólico covalentemente ligado al elemento estructural es representado por el ácido que esterifica el hidroxilo del carbono C₅ de la unidad no reductora del polisacárido arabinogalactano de la pared celular.



En cuanto al ácido micólico puede ser liberado en medio alcalino, el micolato de arabinosa solamente es liberado por tratamiento en medio ácido.

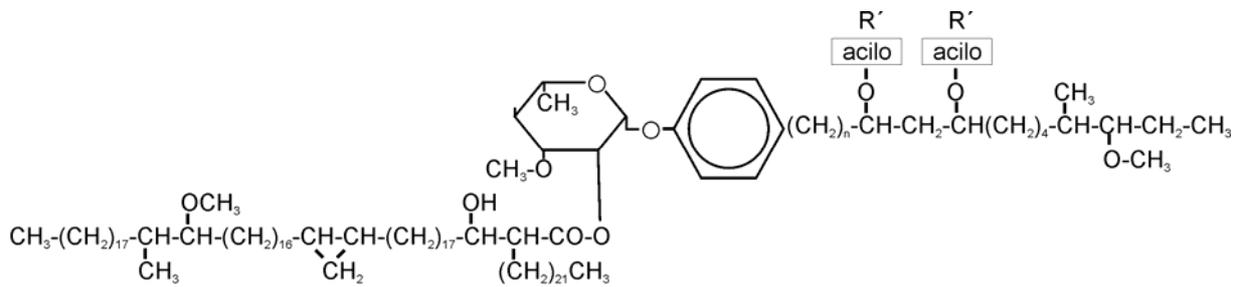
2.2.4. Éster de glucosa

Como en el caso de monoacilglicerol el ácido micólico esterifica la molécula de la glucosa, a través del hidroxilo primario del C₆, constituyendo 6- monomicolato de glucosa.



2.2.5. Micósido G'

A diferencia de otros micósidos, el micósido G', tiene además de la unidad fundamental fenol - derivada (del micósido A), el radical glucosídico R esterificado con ácido micólico.



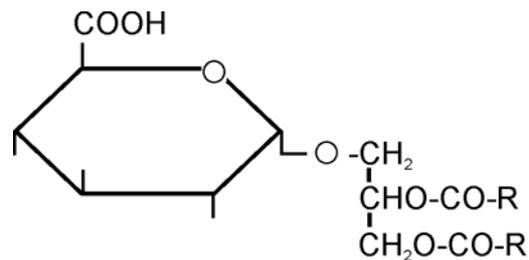
B. Lípidos de estreptomicetos.

El estudio sistemático de lípidos de estreptomicetos es más reciente, comparado con el estudio de las micobacterias, corinebacterias y nocardias.

A continuación serán considerados aquellos lípidos más característicos que hasta ahora han sido descritos.

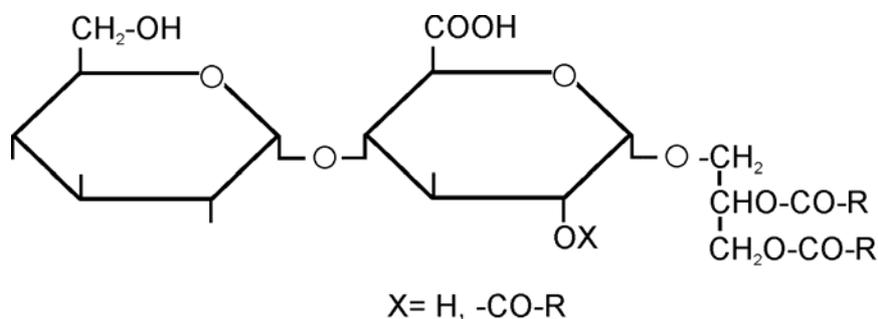
1. Glucuronosildiácilgliceroles

Son glicerolípidos derivados del diácilglicerol, que contienen el ácido glucurónico ligado al hidroxilo primario de la unidad del glicerol a través del C₁.



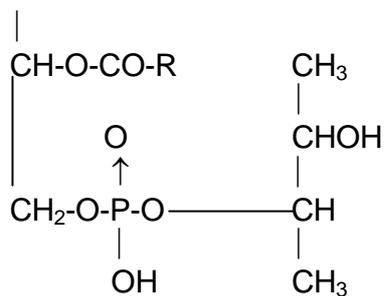
Se ha sugerido que ese compuesto pueda ser el precursor de los glucosil- glucuronosil- diácil- gliceroles (X = H o X = -CO-R, acilo).

Las posibles funciones biológicas son aún desconocidas.



2. Fosfolípidos



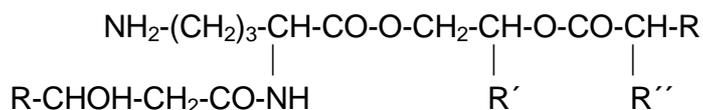


Los fosfolípidos constituyentes de los estreptomicetos están representados por: difosfatidilglicerol (cardiolipina), fosfatidil- etanolamina y fosfatidilinositolmanósido.

Se encuentra en *Actinomyces (Streptomyces) olivacens*, un fosfolípido inusitado que contiene 2,3-butanodiol análogo del fosfatidilglicerol.

3. Ornitinolípidos

Las características comunes de esos lípidos es la presencia de 3- hidroxiaácido ligado a la ornitina a través del grupo amino, constituyendo una amida, varios compuestos derivados han sido identificados.



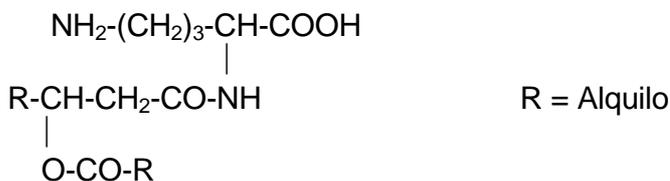
R = alquilo

R' = H, CH₃

R'' = H, OH

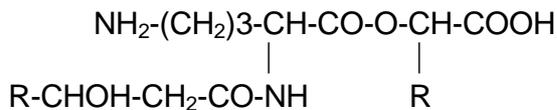
3.1. Ornitinolípido A.

Este lípido posee en su constitución química la ornitina con su grupo amino ocupado por 3- hidroxiaácido y su grupo carboxílico esterificado por etanodiol o por 1,2-propanodiol, el cual tiene otro hidroxilo esterificado con un ácido graso.



3.2. Ornitinolípido B

Ese grupo contiene la ornitina, el 3- hidroxiaácido que a su vez posee el hidroxilo esterificado por un ácido graso.



R = alquilo

3.3. Ornitinolípido C.

Los lípidos de ese grupo se caracterizan por contener ornitina además del radical proveniente del 3- hidroxiaácido ligado por el grupo amino otro radical de 2-hidroxiaácido ligado por el grupo carboxilo.

Se admite que los ornitinolípidos B y C poseen funciones similares a la fosfatidiletanolamina en la membrana celular.

TABLA 7.1 EJEMPLO DE ÁCIDOS GRASOS ENCONTRADOS EN RODOCOCOS, NOCARDIAS Y MICOBACTERIAS		
COMPUESTO	ESTRUCTURA	FÓRMULA GENERAL
Ácido Palmítico (Hexadecanoico) C _{16:0}	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
Ácido palmitoleico (9-Hexadecanoico) C _{16:1}	CH ₃ (CH ₂) ₅ -CH=CH(CH ₂)COOH	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
Ácido Esteárico (Octadecanoico) C _{18:0}	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
Ácido Oleico (9-Octadecanoico) C _{18:1}	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
Ácido Tetracosanoico C _{24:0}	CH ₃ (CH ₂) ₂₂ COOH	C ₂₄ H ₄₈ O ₂
Ácido Hexacosanoico C _{26:0}	CH ₃ (CH ₂) ₂₄ COOH	C ₂₆ H ₅₂ O ₂
Ácido Iso-Palmítico (14-Metil-Pentadecanoico) C _{16:0}	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-CH-(CH}_2\text{)}_{12}\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
Ácido Anteiso-Palmítico (13-Metil-Pentadecanoico) C _{16:0}	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH-(CH}_2\text{)}_{11}\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	C ₁₆ H ₃₂ O ₂

Ácido Tuberculoesteárico (10-Metil-Octadecanoico) C _{19:0}	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	C ₁₉ H ₃₀ O ₂
---	--	--

TABLA 7.2
.EJEMPLOS DE ÁCIDOS MICÓLICOS

MICROORGANISMOS	ESTRUCTURA	ESPECIE
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_\tau-\underset{(\text{CH}_2)_\gamma\text{CH}_3}{\text{CHOH-CH}}-\text{COOH}$	T = 24-28, Y = 13
<i>Nocardia asteroides</i> 9969	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_\tau\underset{(\text{CH}_2)_\gamma\text{CH}_3}{\text{CHOH-CH}}-\text{COOH}$	S = 13-16, T = 13-15 Y = 13
	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_R\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_S\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_\tau\underset{(\text{CH}_2)_\gamma\text{CH}_3}{\text{CHOH-CH}}-\text{COOH}$	R = 6-9, S = 4-10 T = 13-15, Y = 13
<i>Nocardia brasiliensis</i>	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_Q\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_R\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_S\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_\tau\underset{(\text{CH}_2)_\gamma\text{CH}_3}{\text{CHOH-CH}}-\text{COOH}$	Q+R+S+T = 32-34 Y = 13
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_R\underset{\text{CH}_2}{\text{CH}}-\underset{\text{CH}_2}{\text{CH}}-(\text{CH}_2)_S\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_\tau\underset{(\text{CH}_2)_\gamma\text{CH}_3}{\text{CHOH-CH}}-\text{COOH}$	R = 15, 17, 19 S = 11, 13, 15 T = 15, 17 Y = 19
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H ₃₇ R _A	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_R\underset{\text{CH}_2}{\text{CH}}-\underset{\text{CH}_2}{\text{CH}}-(\text{CH}_2)_S\underset{\text{CH}_2}{\text{CH}}-\underset{\text{CH}_2}{\text{CH}}-(\text{CH}_2)_\tau\underset{(\text{CH}_2)_\gamma\text{CH}_3}{\text{CHOH-CH}}-\text{COOH}$	R = 17, 18, 19 S = 10 T = 15, 17, 19, 21 Y = 19, 21

TABLA 7.3
RELACIÓN ENTRE LA LONGITUD DE LA CADENA

HIDROCARBONADA Y LOS MICROORGANISMOS	
MICROORGANISMOS	ÁCIDOS MICÓLICOS
Corinebacterias	-(C ₂₈ -C ₃₆)
Rodococos	-(C ₄₂ -C ₄₈) ó -(C ₆₀ -C ₆₆)
Nocardias	-(C ₅₀ -C ₅₆)
Micobacterias	-(C ₆₂ -C ₈₃)

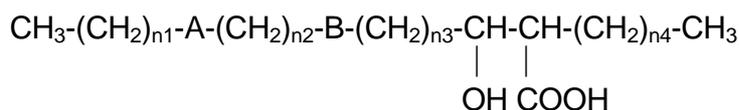
TABLA 7.4 ÉSTERES DE ÁCIDOS GRASOS		
NATURALEZA DEL ÁCIDO	CLASES DE LÍPIDOS	COMPUESTO
No hidroxilados	Acilglicerol	Triacilglicerol Diacilglicerol Monoacilglicerol
	fosfolípido	Fosfatidiletanolamina Fosfatilinositol Fosfatidilglicerol Difosfatidilglicerol (cardiolipina)
Micólico	Fosfoglucolípido	Fosfatidilinositolmanósido
	Glucolípido micósico	Éster de trealosa Ésteres fenólicos

	Acilglicerol glucolípido	Monomicolilglicerol Monoéster de trealosa (monomicolato de trealosa) diéster de trealosa dimicolato de trealosa (factor cuerda) monoéster de arabinosa (micolato de arabinosa)
	Micósidos	Ésteres fenólicos

ANÁLISIS DE ÉSTERES DE ÁCIDOS MICÓLICOS EN ACTINOMICETOS

Se ha desarrollado una metodología para su aplicación en el análisis de ácidos micólicos con fines de diagnóstico. La técnica preconizada es la cromatografía en capa fina de los derivados ésteres metílicos de ácidos micólicos, y la misma se basa en la existencia de una diversidad estructural de los ácidos micólicos (tamaño de la cadena de carbonos, grupos: cetona, hidróxilo, metóxido y epóxido). Justamente esa variación estructural y la variada composición cuantitativa ofrece la posibilidad de establecer agrupaciones definidas de tipos de ácidos micólicos.

Considerándose la estructura general de los ácidos micólicos (I), se propone representar.



Los derivados representantes en 6 diferentes tipos en función de las características de A. Aunque ocurra variación en la porción B, en el caso presente no presenta ninguna relevancia. Para la porción B se han reconocido las siguientes estructuras.



TABLA 7.5
GRUPOS FUNCIONALES PRESENTES EN LOS ÁCIDOS MICÓLICOS

TIPO	CARACTERÍSTICAS	ESTRUCTURAS DE A
I	No Oxigenado	$\begin{array}{c} -\text{CH}=\text{CH}- \text{CH}-\text{CH} \\ \quad \quad \quad \diagdown \quad \diagup \\ \quad \quad \quad \text{CH}_2 \end{array}$
II	Monoinsaturado	-CH ₃ (No tiene R)
III	Metoximicolato	$\begin{array}{c} -\text{CH}-\text{CH}- \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{OCH}_3 \end{array}$
IV	Cetomicolato	$\begin{array}{c} -\text{CH}-\text{CH}- \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{O} \end{array}$
V	Epoximicolato	$\begin{array}{c} -\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}- \\ \quad \quad \quad \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH}_3 \quad \quad \quad \text{O} \end{array}$
VI	Dicarboximicolato	HO - CO- (No tiene R)

TABLA 7.6
EJEMPLO DE MICOBACTERIAS Y LA OCURRENCIA DE ÁCIDOS MICÓLICOS

Microorganismos	ÁCIDOS MICÓLICOS	
	GRUPO	TIPO
<i>M.triviale, M.fallax</i>	A	I
<i>M.chelonae</i>	B	I, II
<i>M.bovis</i> BCG	C	I, IV
<i>M.tuberculosis</i>	D	I, III, IV
<i>M.simiae</i>	E	I, II, IV
<i>M.smegmatis</i>	F	I, II, V
<i>M.xenopi</i>	G	I, IV
<i>M.scrofulaceum</i>	H	I, IV, VI
<i>M.vaccae</i>	I	I, II, IV, VI

BIBLIOGRAFÍA

Cage GD. 1992. High-Performance Liquid Chromatography Patterns of *Mycobacterium gordonae* Mycolic Acids. J Clin Microbiol 30: 2402-2407.

Crowe LM, Spargo BJ, Ionedo T, Beaman BL, Crowe JH. 1994 Interaction of cord factor (alpha,alpha'-trehalose-6,6' -dimycolate) with phospholipids. Bba-Biomembranes 1194:

53-60.

Ioneda T. 1992. Isolation and Characterization of Mannose-6- monomycolate from *Rhodococcus rhodochrous*. Chem Phys Lipids 62: 311-317.

CAPÍTULO 8

LA RESPUESTA INMUNE DE PACIENTES CON ACTINOMICETOMAS Y EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE INFECCIONES POR NOCARDIA BRASILIENSIS

MARIO CÉSAR SALINAS-CARMONA

El Micetoma es una enfermedad infecciosa crónica que afecta la piel y el tejido celular subcutáneo y puede ser causado por dos tipos diferentes de gérmenes, cuando es producida por hongos se denomina eumicetoma y cuando el agente causal es una bacteria entonces se denomina actinomicetoma. En México, el 98% de los casos de micetoma son producidos por bacterias y sólo el 2% es producido por hongos; entre las bacterias que más comúnmente producen actinomicetoma en el caso de México está *Nocardia brasiliensis* con el 86 % y le sigue la *Actinomadura madurae*, *Actinomadura pelletieri* y *Streptomyces somaliensis* en mucho menor escala *Nocardia asteroides*; en otros países la distribución anterior es diferente.

Los Actinomicetos son microorganismos que viven como saprófitos en el suelo, entre ellos las bacterias del género *Nocardia* abundan en la región de temperatura y humedad comprendidas entre el trópico de Cáncer y el trópico de Capricornio. Estos microorganismos del suelo penetran la piel y el tejido celular subcutáneo a través de heridas o pequeños traumatismos ocasionados por astillas o espinas de arbustos o de la leña, y una vez en la piel y el tejido celular subcutáneo, inducen una inflamación la cual se infiltra o se llena de polimorfonucleares y posteriormente de macrófagos y linfocitos. Los mecanismos de patogenicidad y de virulencia en el caso de *Nocardia brasiliensis*, no son del todo conocidos, más adelante nos referiremos un poco sobre el tema. Esta infección generalmente se localiza en las extremidades superiores o inferiores, pero también pueden presentarse en el dorso, por la costumbre de algunos seres humanos de ciertas comunidades de cargar leña; y entonces por ahí ocurre el traumatismo mínimo por el cual se introducen las bacterias; al paso del tiempo que pueden ser meses o años se produce una inflamación crónica que deforma el área infectada con un aumento de volumen importante. Luego se agregan abscesos que se abren y drenan un material seroso o sanguinolento por el cual a veces descargan unas microcolonias del agente causal lo que se le denomina granos o gránulos, el color de éstas es sugestivo del agente causal. Este material de las lesiones, se cultiva en medio clásico para la identificación microbiológica, lo cual tarda generalmente más de tres semanas ya que se trata de microorganismos de crecimiento lento. (1, 2).

Nocardia brasiliensis es una bacteria gram positiva, parcialmente ácido-alcohol resistente que comparte muchas características y antígenos con bacterias del género *Mycobacterium* con el cual se encuentra relacionado (10). El aumento de volumen que produce la infección crónica en el caso del actinomicetoma es generalmente indoloro y los pacientes tardan a veces años en buscar el auxilio médico. El tratamiento de estas infecciones es generalmente con antibióticos, pero también se incluye tratamiento quirúrgico que consiste en drenaje y muchas veces desafortunadamente también la amputación aunque ésta es cada vez menos frecuente. En el

presente capítulo analizaremos algunos de los mecanismos de patogenicidad que se han encontrado en el caso de *Nocardia asteroides* y algunos en el caso de *Nocardia brasiliensis*, describiremos luego los materiales y los métodos para tratar de aislar y purificar antígenos útiles en el diagnóstico serológico de las infecciones por *Nocardia*

ANTECEDENTES

Como ya vimos el micetoma es una enfermedad infecciosa crónica que cuando es producida por bacterias se le denomina actinomycetoma. El diagnóstico de estas infecciones se hace desde el punto de vista clínico, en base de las características y manifestaciones de cronicidad, deformación del área, aparición de abscesos y fístulas por donde drena ese material que ya describimos anteriormente. Sin embargo, el cultivo clásico, el aislamiento y la identificación por métodos microbiológicos toma mucho tiempo por ello desde 1979, autores como Blummer y Kaufman en un artículo publicado en el Journal of Clinical Microbiology (Blumer y Kaufman 1979) utilizaron una técnica poco sensible como la micro-inmuno-difusión en agar para serodiagnóstico de Nocardiosis. El hecho de usar técnicas de baja resolución con mezclas de antígenos no definidos químicamente, hizo que los resultados fueran muy pobres ya que las reacciones cruzadas son comunes entre anticuerpos de personas infectadas con bacterias del género *Mycobacterium* y personas infectadas con bacterias del género de *Nocardia* por lo cual esa prueba no trascendió más allá del interés académico. En 1975 otros autores como Humphrey y White publicaron en el American Journal of Science de 1975 (4) las reacciones serológicas con antígenos de *Nocardia* con prácticamente los mismos resultados; un alto número de reacciones cruzadas y una muy baja sensibilidad por lo cual la prueba no fue de utilidad clínica, debido a que las reacciones cruzadas no permitieron diferenciar a los diferentes agentes causales. También hubo intentos por algunos otros autores usando modelos experimentales de infección, de obtener algunas pruebas con utilidad, por ejemplo las pruebas de fijación de complemento, incluso pruebas de hipersensibilidad tardía que fueron realizadas con extractos crudos, también de polisacáridos pero inmunizando animales experimentales. La utilidad general de todas estas pruebas fue muy limitada por las razones que podemos resumir así: a) baja resolución de las técnicas inmunológicas empleadas b) mezcla de antígenos crudos que cruzan antigénicamente con las demás bacterias.

En el departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario de Monterrey, Nuevo León, aislamos una bacteria del género *Nocardia brasiliensis* de un paciente atendido por el Dr. Oliverio Welsh en el Departamento de Dermatología, esta bacteria fue identificada como *Nocardia brasiliensis* por el Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla del Departamento de Microbiología de la institución y después la identificación fue confirmada por June Brown del CDC de Atlanta Georgia. Esta cepa de *Nocardia brasiliensis* se encuentra registrada ahora en la ATCC con el número 700358, con esta bacteria se han realizado todos los estudios que más adelante se van a describir con detalle.

En el Departamento de Inmunología obtuvimos en colaboración con el Dr. Oliverio Welsh Lozano y el Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla una serie de sueros de pacientes con diagnóstico de

actinomicetoma confirmados con cultivos positivos en donde se identificó *Nocardia brasiliensis* como agente causal, estos sueros fueron clasificados en sueros de pacientes activos, también se obtuvieron sueros de pacientes tratados médicamente y quirúrgicamente que fueron curados del actinomicetoma, y sueros de pacientes con tuberculosis y lepra bien conocidos en el Hospital Universitario, estos sueros fueron utilizados para identificar antígenos inmunodominantes en una técnica de Western blot en donde se utilizaron todos los antígenos proteicos de un extracto citoplásmico de *Nocardia brasiliensis* (Salinas-Carmona *et al* 1922). Con esta técnica de Western blot se lograron identificar tres antígenos inmunodominantes que tienen un peso molecular de 61,26 y 24 kilodaltones y se conocen precisamente con el nombre de P61, P26 y P24, aunque se identificaron otros antígenos inmunodominantes se pudo observar que estos últimos cruzaban porque eran identificados y reaccionaban también con los sueros de pacientes con tuberculosis y con lepra, por eso decidimos utilizar solamente P61, P26 y P24.

Posteriormente, dado que la prueba de Western blot es una técnica laboriosa para ser utilizada en los laboratorios clínicos de rutina, decidimos desarrollar una técnica de ELISA que es más sencilla para hacer la identificación serológica de anticuerpos, contra el antígeno inmunodominante P24 los detalles técnicos se describen más adelante en este capítulo con la técnica de ELISA desarrollada y Publicada en el Journal of Clinical Microbiology en 1993 (Salinas-Carmona *et al* 1993). Por primera vez se pudo obtener una prueba sensible y específica que identifica a las personas que están activamente infectadas con *Nocardia brasiliensis* y que permite además conocer a través del título de anticuerpos anti P24, si el paciente está mejorando como parte del tratamiento, ya que entonces el título de anticuerpos anti P24 disminuye considerablemente hasta llegar a los niveles de detección del valor de corte de 0.2 unidades de absorbancia. Cuando algunos pacientes que fueron diagnosticados como curados acudieron para la prueba de ELISA, encontramos para nuestra sorpresa, que en algunos de ellos el título de anticuerpos se volvía a incrementar con lo cual fueron estudiados clínicamente y se pudo demostrar que tenían una recaída de su enfermedad infecciosa inicial por lo cual esta prueba al medir el título de anticuerpos contra un antígeno específico, nos permite conocer cómo es la respuesta al tratamiento y nos permite identificar los casos de recaída.

Esta prueba ha sido realizada en forma rutinaria desde 1992 en el Departamento de Inmunología del Hospital Universitario de Monterrey, Nuevo León, y sirve como prueba de referencia (Salinas-Carmona *et al* 1997) para diagnóstico serológico de pacientes sospechosos de infecciones por *Nocardia*; esta prueba ha demostrado ya su utilidad clínica, como se menciona en artículos publicados más recientemente, incluyendo el Manual de Microbiología Clínica publicado por la Sociedad Americana de Microbiología. (Manual of Clinical Microbiology. American Society of Microbiology).

OBJETIVO

El objetivo de este capítulo es describir los métodos para aislar, purificar e identificar los antígenos inmunodominantes de *Nocardia brasiliensis*, así como especificar los detalles técnicos para realizar las pruebas de Western blot y de ELISA para el diagnóstico serológico de infecciones humanas por esta bacteria.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepa de Nocardia brasiliensis

La cepa de *Nocardia brasiliensis* que se utiliza para el presente trabajo, fue aislada como se mencionó anteriormente de un paciente atendido en el Hospital Universitario de Monterrey, Nuevo León, con el Dr. Oliverio Welsh; y su identificación fue confirmada por June Brown y ahora está registrado en la ATCC 700358, esta cepa es mantenida en cultivos y subcultivos en agar Sabouraud y por inoculación subcutánea en las patas traseras en ratones BALB/c para la reproducción del micetoma experimental y su aislamiento y cultivo en Sabouraud. Como se obtienen los antígenos de *Nocardia brasiliensis*. Utilizamos cultivos de *Nocardia brasiliensis* que se realizan a partir de inóculos unicelulares de la manera siguiente: en matraces de Erlenmeyer de 125ml que contienen 30ml de medio de cultivo de infusión de cerebro corazón (BHI) o de un medio de cultivo a base de peptona desarrollado en el Depto. de Inmunología de nuestra institución y se mantiene a 37°C con agitación leve por 72 hrs. Estos matraces se sacan del cultivo y las bacterias se trata con un sonicador para obtener suspensiones unicelulares, las cuales son utilizadas para inocular matraces de 1 ó 2 litros que contienen 150 ó 175ml de los medios de cultivos descritos anteriormente los cuales se mantienen ahora durante 7 días en cultivo estacionario a 37°C

Obtención del extracto celular crudo de Nocardia brasiliensis

Después de 7 días de cultivo las bacterias son recolectadas y se mezclan todas las bacterias obtenidas en los matraces, los cuales se deben lavar exhaustivamente con agua destilada para eliminar todos los restos del filtrado del cultivo; estas células son tratadas luego con un agente deslipidizante que consiste en una mezcla de etanol-éter en proporción 1:1 y luego 1:2 y finalmente 1:3 después de estos tres tratamientos las bacterias se consideran deslipizadas y se dejan secar a través de un preevaporador ó de una trampa de vacío para eliminar el resto de los solventes. Este material se conoce como bacterias muertas, las cuales son después o sonicadas o molidas con polvo de vidrio en mortero para después agregarse un buffer de Tris HCl con acetato de magnesio y por agitación mecánica utilizando un magneto a 4° se hace una extracción a la mañana siguiente se recupera el sobrenadante por centrifugación y se vuelve agregar el buffer de extracción por otras doce horas adicionales en agitación magnética constante. Luego, estos sobrenadantes se dializan con agua destilada a 4° C por 24 horas, con cambios constantes del líquido de diálisis, al final este material dializado que constituye el extracto celular crudo deslipidizado se liofiliza y una de las alícuotas sirve para cuantificar proteínas por el método de Bradford y otra para realizar el análisis por inmunoelectrotransferencia (Salinas-Carmona 2000, 2001).

ANÁLISIS DEL EXTRACTO CELULAR CRUDO EN GELES DE POLIACRIDAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE).

Una alícuota de este extracto celular deslipilizado de *N. brasiliensis* se utiliza para hacer el análisis de la composición proteica que nos da una idea del antígeno con el que se va a trabajar para ello se utiliza el sistema discontinuo de LAEMMLI con un gel de empaquetamiento al 5 % y geles de corrimiento a una concentración lineal al 12 % ó en gradiente de 18 a 8.75 % preparados de la manera como se ve en las tablas 1 y 2. El antígeno se mezcla con buffer de muestra hecho a base de SDS al 10 % 2 mercaptotanol al 10 % volumen a volumen, sacarosa al 50 % en buffer Tris HCl 125 mM, ph 6.8 azul de bromofenol como indicador del frente de iones, esta mezcla se calienta en ebullición durante 2 minutos y una vez enfriado se aplica en el sistema para electroforesis la cual se lleva a cabo a un voltaje constante de 150 volts hasta que el colorante nos indica que llegó al extremo inferior del gel el cual después se tiñe con plata ó Coomassie para su análisis.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN-BLOT)

Las proteínas del gel se transfieren a papel de nitrocelulosa mediante la aplicación de un voltaje de 240 volts. durante 90 minutos, obviamente, se utiliza un sistema de enfriamiento para evitar el calentamiento y la evaporación del buffer así como la alteración de las proteínas. Al término de la transferencia el papel se bloquea con cualquiera de las soluciones clásicas como gelatina de pescado o leche descremada como se menciona más adelante; para el caso de ELISA después se lava con las soluciones de lavado, se cortan las tirillas y luego de incubar durante 1 hora a 37° C con los sueros problemas diluïdos 1:25 en soluciones que contienen PBS-Tween 20, diluïdo 1:1000 después de lavar 6 veces con la solución de lavado estas tiras que contenían los sueros reactivos de los pacientes que se deseaban probar se incuban con un suero comercial anti-globulina humana, generalmente comprado en Sigma el cual está conjugado a la peroxidasa y se incuban también durante 1 hora a 37° en agitación constante. Al final las tirillas se lavan de nuevo y se les agrega la solución sustrato que contiene 3, 3 de diamionobencidina en PBS. Ésta se activa con peróxido de hidrógeno y después de un minuto la reacción se detiene con ácido clorhídrico al IN ó con ácido sulfúrico.

PURIFICACIÓN DEL ANTÍGENO P24 PARA LA TÉCNICA DE ELISA

Una vez obtenido el cultivo de *N. brasiliensis* como se describió anteriormente, el extracto celular crudo se precipitó con sulfato de amonio saturado al 50 % y después el sobrenadante fue dializado exhaustivamente por más de cuatro días para eliminar toda la sal y luego este dializado se trata con Dnasa obtenido de los laboratorios Sigma. Una vez terminada la digestión con DNA asa se pasó por una columna de filtración en gel en un Sephadex G-100 y se recolectaron fracciones de 2ml. Estas fracciones fueron analizadas en electroforesis en gel poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, es decir, en presencia de dodecil sulfato de sodio, calor y dos mercaptotanol y aquellas fracciones que contenían P24 fueron utilizadas como la fuentes de este antígeno purificado para la técnica de ELISA que se describe a continuación.

TÉCNICA INMUNOENZIMÁTICA (ELISA) PARA ANTICUERPOS ANTI P24

La técnica utilizada y ha sido publicada y se resume de la manera siguiente: se utilizan placas de poliestireno de fondo plano con 96 pozos y se sigue la técnica original descrita por Engvall con algunas modificaciones: la proteína P24 a una concentración de 500µg por pozo se disuelven en un amortiguador de acetato pH5 y se deja en incubación a 4°C durante toda la noche, a la mañana siguiente se realizan cinco lavados con la solución salina fosfato pH7.2, después los pozos se bloquean con una solución de leche descremada al 5% de PBS. Se vuelve a lavar en la forma antes mencionada, luego los sueros de los pacientes y los controles se diluyen 1:500 y se incuban a 37°C por una hora, después se lava exhaustivamente y se agrega los 200 microlitros de un conjugado comercial de peroxidasa anti-globulina G humana y se incuba de nuevo a 37°C por una hora. Luego se lava la placa otra vez y se agrega el cromógeno sustrato compuesto de peróxido de hidrógeno y ortotoluidina, la reacción se termina con ácido sulfúrico uno normal y la absorbancia se lee en el espectrofotómetro a 492nm, los resultados por arriba de 0.2 unidades de absorbancia se consideran positivas de acuerdo con lo publicado en nuestro laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

- Welsh O, Salinas-Carmona MC; Rodríguez MA. 1994. Mycetoma-Infectious Diseases Ed. Hoeprich fifth Edition pag. 1.402-1.406
- Welsh O, Salinas-Carmona MC; Rodríguez MA. 1995 Treatment of Eumycetoma and Actinomycetona-Current Topics in Medical Mycology, 6: 47-71.
- Blumer, SO, Kaufman L. 1979. Microimmunodiffusion test for Nocardiosis. J Clin Microbiol 10: 308-312.
- Humphreys, DW, Crowder JG, With A.1975. Serological reactions to Nocardia antigens.Am J Med Sci 269:23-336.
- Salinas-Carmona, MC, Vera-Cabrera L, Welsh O, Rodríguez MA.1992. Antibody response to *Nocardia brasiliensis* antigens in man. Zentralbl. Bakteriologie. 276:390-397.
- Salinas-Carmona MC, Welsh O, Casillas SM 1993. Enzyme-Linked Immunosorbent assay for serological Diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and clinical correlation with mycetoma infections.Journal of Clinical Microbiology 31 (2.901-2.906)
- Salinas-Carmona MC; Castro-Corona MA, Sepúlveda-Saavedra J, Pérez LI, 1997 Monoclonal Antibodies to P24 and P61 immunodominant antigens from *N. brasiliensis*. Clinical Diagnostic Laboratory Immunology Vol. 4 No. 2 (1.342-137)

Salinas-Carmona MC. 2000 Nocardia brasiliensis: from microbe to human and experimental infections. *Microbes and Infection* Vol. 2 (1.373-1.381)

Salinas-Carmona, MC. 2001 Anticuerpos anti-Nocardia brasiliensis en pacientes con actinomicetoma y su utilidad clínica. *Gaceta Medica de México* Vol. 37

Vera-Cabrera L, Salinas-Carmona MC, Welsh O, Rodríguez MA. 1992 Isolation and purification of two Immunodominant Antigens from Nocardia brasiliensis. *Journal of Microbiology* 30 (1.183-1.187)

TABLA 8.1

GEL DE CORRIMIENTO
Concentración (% T) 8.75

Acrilamida-Bisacrilamida (30 % T, 2.7 % C).	2.04 ml.	4.197 ml.
Buffer Tris HCl 3 M, Ph 8.8.	1.32 “	1.32 “
Laurilsulfato de sodio (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS.) al 10 %.	0.069 “	0.069 “
Agua Tridestilada	3.060 “	0.645 “
Glicerina al 50 %	0.480 “	0.740 “
Persulfato de Amonio al 5%	0.025 “	0.025 “
N, N, N', N', Tetrametiletilendiamina (TEMED).	0.003 “	0.003 “
Volumen total:	7.0 ml	7.0 ml

TABLA 8.2

GEL CONCENTRADOR AL 5 % T

Acrilamida-Bisacrilamida (30 % T, 2.7 % C)	0.1665 ml.
Buffer Tris HCl 1 M, pH 6.8.	0.125 “
Agua Tridestilada	0.66 “
SDS al 10 %	0.01 “
Persulfato de amonio al 5 %	0.014 “
TEMED	0.001 “

CAPÍTULO 9

DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DE ACTINOMICETOS PATÓGENOS BASADAS EN TÉCNICAS MOLECULARES

Hugo César Ramírez Saad

INTRODUCCIÓN

La aplicación de técnicas de Biología Molecular ha abierto grandes posibilidades para la detección de bacterias que, como en el caso de muchos actinomicetos, resultan difíciles de aislar, cultivar e identificar. Bien sea porque sólo conocemos parcialmente sus requerimientos metabólicos, lo que impide formular medios de cultivo apropiados, o porque al tratarse de microorganismos de crecimiento lento, su aislamiento y correcta identificación requiere de períodos prolongados de tiempo, en adición a la gran cantidad de trabajo que muchas veces esto representa.

Las técnicas moleculares basadas en la detección más o menos específica de secuencias de ácidos nucleicos, han permitido por una parte, incrementar notoriamente la capacidad de detección, evitando generalmente los pasos de aislamiento y cultivo. Mientras que por otra, han refinado las posibilidades de identificación y tipificación para bacterias cultivadas.

En general, se han implementado dos grandes grupos de estrategias: el primero requiere la obtención de ADN genómico, para su posterior digestión con enzimas de restricción, y análisis. Mientras que en el segundo, las necesidades de ADN en cuanto a cantidad y peso molecular son menores, ya que este grupo de estrategias utiliza como elemento central la amplificación de fragmentos específicos de ADN, principalmente mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR.

En el presente capítulo se pretende dar una descripción de las técnicas más utilizadas para detectar, identificar y tipificar actinomicetos patógenos o potencialmente patógenos, tratando de presentar las ventajas y desventajas de cada técnica. Así mismo, se hace una revisión bibliográfica reciente de los resultados obtenidos con las técnicas descritas. Dado que la gran mayoría de estas técnicas se reportaron en inglés y se nombran conforme sus siglas, por comodidad y para evitar confusiones, a lo largo del presente trabajo las seguiremos nombrando en base a su denominación original, o bien utilizando la encontrada más frecuentemente en la literatura.

TÉCNICAS BASADAS EN ADN GENÓMICO

Las dos técnicas más utilizadas de este grupo son *Análisis por Restricción con Endonucleasa* (REA – *Restriction Endonuclease Analysis*), y *polimorfismo de fragmentos restringidos* (RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*). La utilidad de ambas técnicas está enfocada a la tipificación de aislados, principalmente en brotes de infecciones micobacterianas, tanto de humanos como de ganado (Viana-Niero *et al* 2001, O'Brien *et al* 2000), aunque también se ha utilizado con propósitos taxonómicos para agrupar e identificar distintos actinomicetos (Laurent *et al* 1996, Ritacco *et al* 1998, Young-Kil *et al* 2000).

Los pasos iniciales de ambas técnicas son similares, ya que se requiere la obtención de una buena cantidad de ADN genómico de alto peso molecular el cual es digerido con endonucleasas (ver Fig 1). En el caso de REA, el ADN restringido es separado mediante electroforésis en gel de agarosa o poliacrilamida, que una vez teñido produce un patrón de bandas más o menos complejo, dependiendo del ADN utilizado y la endonucleasa que se haya elegido (Singh *et al* 1999, Njanpop-Lafourcade *et al* 2001). Dentro de las desventajas de esta técnica está la dificultad para separar una gran cantidad de fragmentos de ADN de tamaños muy variables, además de que los patrones de bandas pueden resultar muy complejos para su análisis a simple vista (por ej. patrones con más de 18–20 bandas). En tal caso, se requiere el apoyo de paquetes computacionales apropiados, lo que facilita la comparación de varios patrones de bandas, aun aquellos obtenidos en distintos geles.

Una forma particular de análisis de restricción de ADN genómico, es la *electroforésis en gel de campos pulsantes* o PFGE por sus siglas en Inglés (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*). En esta técnica los aislados bacterianos crecidos en caldo de cultivo, son concentrados e incluidos en bloques pequeños de agarosa. Las bacterias inmovilizadas son sujetas a lisis *in situ* mediante una combinación de detergentes y enzimas líticas, el ADN liberado es entonces digerido con enzimas de restricción cuyos sitios de corte, a lo largo del genoma, son infrecuentes. Los bloques con el ADN digerido son transferidos a un gel de agarosa para realizar electroforésis, la que se lleva a cabo en un aparato especial, que permite cambiar la dirección de la corriente eléctrica en intervalos predeterminados, generalmente muy cortos. Esto ocurre gracias a que el aparato cuenta con varios pares de electrodos acomodados en forma paralela, diagonal o perpendicular al gel. Esta forma de electroforesis permite una separación más eficiente de fragmentos de ADN de muy alto peso molecular, que pueden variar desde 10 hasta 800 Kb (Schwartz & Cantor, 1984). La documentación de los patrones de bandas generados se hace de manera similar al REA.

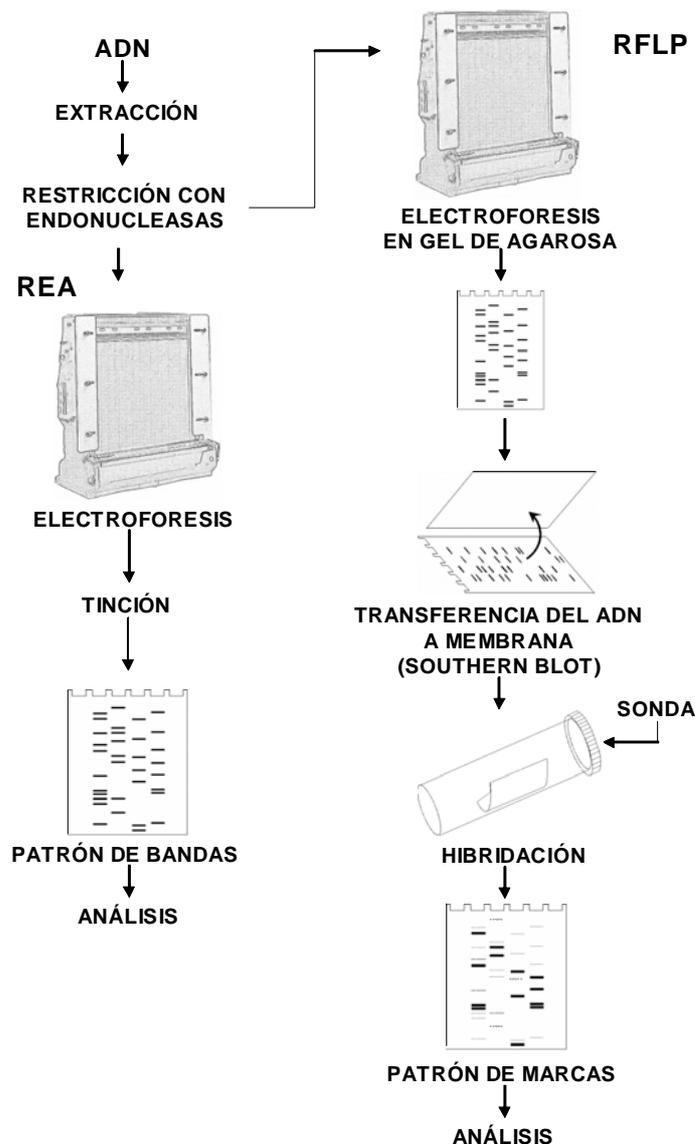


Figura 1. Pasos involucrados en el análisis por restricción con endo-nucleasas (REA), y en polimorfismo de fragmentos restringidos (RFLP), ambas técnicas basadas en ADN genómico, poseen además varios procedimientos en común. Las marcas múltiples en RFLP son resultado de la hibridación con distintas copias en el genoma del marcador molecular seleccionado.

Los resultados obtenidos mediante PFGE, para tipificación de aislados de *M. tuberculosis*, demuestran gran concordancia con los resultados de otras técnicas (Singh et al. 1999). PFGE ha sido considerado por muchos autores como la técnica de tipificación molecular más reproducible y con la mejor capacidad de discriminación (Olive Bean 1999). También se ha propuesto como la técnica de referencia para el monitoreo de seguridad de alimentos por la FDA (1997).

En RFLP, los fragmentos de ADN resultantes de la digestión son separados por electroforesis en gel de agarosa, posteriormente, son transferidos a una membrana de acetato de celulosa o nylon (normalmente mediante transferencia de Southern), a la cual los fragmentos de ADN son unidos covalentemente. Esta membrana es utilizada en reacciones de hibridación con sondas de ADN o ARN, complementarias a secuencias específicas del genoma, las que pueden estar presentes en una o varias copias (Fig. 1). La capacidad de resolución del método se incrementa notablemente conforme aumenta el número de copias diana (marcadores moleculares) en el genoma. En el análisis por RFLP, el número, ubicación e intensidad de las marcas de la sonda a lo largo del patrón de bandas, es comparado para diferenciar entre distintos aislados. Tanto REA, PFGE como RFLP presentan como principal desventaja la necesidad de cultivar los aislados para obtener cantidades suficientes de ADN genómico que pueda ser restringido.

Dentro de los marcadores moleculares más utilizados para la tipificación por RFLP de cepas de *M. tuberculosis* se encuentran las secuencias de inserción (IS) localizadas en la región de repetición directa que se describe posteriormente. Las numerosas IS de esta región han sido clasificadas y su abundancia ha permitido utilizarlas para generar perfiles de RFLP. Las secuencias de inserción denominadas IS6110 (Thierry *et al* 1990) e IS986 (Das *et al* 1993) han sido las más utilizadas ya que se han encontrado de 1 a 20 copias por genoma en *M. tuberculosis*, *M. africanum* y la mayoría de las cepas de *M. bovis*. Mientras que la IS1081 (Collins & Stephens 1991) sólo presenta de 5 a 6 copias en los mismos microorganismos, por lo que el polimorfismo encontrado mediante RFLP es menor (Suffys *et al* 2001). También se ha logrado con éxito la tipificación mediante IS de micobacterias con importancia veterinaria (Dvorska *et al* 2001).

A pesar de que el número de copias de IS6110 parece estar relacionado con el origen geográfico de los aislados de *M. tuberculosis* (Das *et al.* 1993, Viana-Niero *et al* 2001, O'Brien *et al* 2000) La tipificación e identificación de *M. tuberculosis* mediante el polimorfismo asociado a IS6110 ha sido ampliamente utilizada (Githui *et al* 1999, Soini *et al* 2000, . En un proyecto apoyado por la Unión Europea, se ha creado TBase (<http://www.caontb.rivm.nl/>), una base de datos con patrones de RFLP/IS6110 para un gran número de cepas de *M. tuberculosis*. En la cual se pueden comparar perfiles obtenidos mediante un protocolo estandarizado propuesto por van Embden *et al.* (1993).

La utilización de sondas derivadas de secuencias repetitivas multicopia, en tipificaciones RFLP de micobacterias, se encuentran ampliamente documentadas. Los marcadores moleculares más utilizados en estos casos han sido: las *repeticiones directas* (DR - Direct Repeats) (Poulet y Cole 1995), el gen del 16S rRNA, también denominado 16S rDNA (Laurent *et al.* 1996), y un grupo de secuencias repetitivas cortas, entre las que se encuentran las secuencias en tandem ricas en GC (PGRS - *Polymorphic GC-rich tandem Repeat Sequence*) (Ross *et al* 1992, van Embden *et al* 1995), *Secuencias Intergénicas Repetitivas de Enterobacterias* (ERIC - *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequences*) (Sechi *et al* 1998), repeticiones de oligonucleótidos cortos, como el triplete (GTG)₅ (Wiid *et al* 1994), y las repeticiones en tandem del complejo polimórfico principal (MPTR - *Major Polymorphic Tandem Repeat*) (Hermans *et al* 1992).

TÉCNICAS BASADAS EN AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN

La aplicación de técnicas de amplificación de fragmentos de ADN tales como PCR, *amplificación mediada por transcripción* (TMA – *Transcription Mediated Amplification*), *amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos* (NASBA – *Nucleic Acid Sequence Based Amplification*), y otras, han producido un significativo avance en las capacidades, tanto de detección como de identificación y tipificación, al permitir la realización de algunas o todas estas funciones *partiendo de muestras ambientales, especímenes tomados directamente de pacientes* (esputo, exudado, heces, etc.), o una colonia aislada de un medio de cultivo. La aplicación de una técnica de amplificación en combinación con la hibridación de ácidos nucleicos ha permitido el desarrollo de varias metodologías más o menos automatizadas, reduciendo notoriamente el tiempo requerido para la obtención de resultados.

PCR

La *reacción en cadena de la polimerasa* o PCR, es sin duda la técnica de amplificación más comúnmente utilizada. Originalmente descrita por Mullis & Faloona (1987), varias adaptaciones posteriores han permitido establecerla como una técnica de rutina en laboratorios clínicos, forenses y de investigación. Con la utilización de PCR se puede generar una gran cantidad de copias ($>10^7$) de un fragmento diana de ADN, que está flanqueado por secuencias conocidas en cadenas opuestas. Básicamente se trata de una reacción enzimática que ocurre en un proceso cíclico de 3 pasos modulado por cambios de temperatura, requiriendo por lo tanto de un termociclador, aparato especializado que permite calentar o enfriar de manera rápida y precisa los tubos de reacción puestos en la placa térmica del aparato, que posee orificios con el tamaño y forma de los tubos de reacción. Los reactivos necesarios para PCR se mencionan en la Fig 2, un elemento central de la reacción es una ADN polimerasa termoestable, la más utilizada es la *Taq* polimerasa, obtenida originalmente de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*.

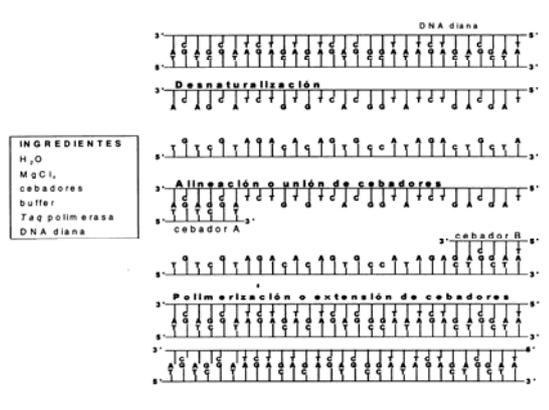


Figura 2. Esquema del proceso de PCR, el conjunto de los tres pasos básicos; desnaturalización, alineación y polimerización se denomina ciclo. En teoría, al cabo de un ciclo se duplica el número de fragmentos de

ADN. Los elementos requeridos para llevar a cabo la reacción se mencionan en el recuadro de la izquierda.

El primer paso denominado desnaturalización, ocurre a 94–96°C, a esta temperatura el ADN pierde su estructura de doble cadena, desnaturalizándose a cadenas sencillas. En el segundo paso ocurre un acoplamiento (*annealing*) de los oligonucleótidos sintéticos denominados cebadores (*primers*), con los segmentos específicos de ADN que presentan la secuencia complementaria, la temperatura a la que ocurre dicho acoplamiento estará determinada por la longitud y constitución nucleotídica de los cebadores. En el tercer paso o de polimerización, la ADN polimerasa efectúa su labor utilizando los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) y el ADN como molde, para generar una nueva cadena de ADN complementario a la secuencia diana. Dado que la polimerización ocurre a partir de los cebadores, a este paso también se le denomina como de extensión de cebadores. La temperatura óptima para el funcionamiento de la enzima *Taq* polimerasa es de 72°C. Un ciclo típico tiene una duración de 2 a 5 min, mientras que una reacción completa requiere de 25 a 35 ciclos. Cabe señalar que en la mayoría de las reacciones hay dos pasos únicos, es decir, no forman parte de los ciclos, un paso inicial de desnaturalización procura asegurarse que todo el ADN que se utilice como molde esté efectivamente desnaturalizado, y uno final de polimerización que busca completar todas aquellas copias de ADN que no se hallan extendido completamente. En los libros editados por: Persing (1996), Newton & Graham (1997), Smeltzer (1998) pueden encontrarse gran número de protocolos y aplicaciones específicas de PCR.

Hibridación

Mediante la hibridación de ácidos nucleicos se puede determinar la presencia de una secuencia nucleotídica específica en una muestra de ADN. Esto puede lograrse debido a la capacidad de los ácidos nucleicos de doble cadena para desnaturalizarse a cadenas sencillas bajo condiciones de alta temperatura o alcalinidad. Si el ADN es enfriado rápidamente, permanecerá en su estado de cadena sencilla, sin embargo, si el enfriamiento de la solución se realiza paulatinamente, el ADN retornará a su estado original de doble hélice, lo que ocurre gracias al apareamiento de bases y secuencias complementarias en ambas cadenas. En este proceso llamado renaturalización, pueden ocurrir apareamientos entre cadenas complementarias que originalmente no estaban unidas, formando moléculas híbridas.

En la técnica de hibridación, el ADN desnaturalizado se fija irreversiblemente a un soporte, normalmente una membrana de acetato de celulosa o nylon (Fig. 3). Otro elemento importante en esta técnica es la sonda, que puede estar constituida por un oligonucleótido sintético corto (longitud <30 nt.), de cadena sencilla, o bien un fragmento de ADN de longitud variable (100 – 1000 pb) y cuya secuencia puede ser desconocida. Tanto el oligonucleótido como el fragmento de ADN deben contener uno o varios grupos reporteros que permitan la posterior detección de la reacción de hibridación entre la sonda y el ADN inmovilizado. La especificidad de la reacción se modula mediante temperatura y cantidad de sales presentes en el buffer de hibridación, esto tiene como objetivo evitar la formación de apareamientos parciales entre la sonda y fragmentos del ADN inmovilizado, que contengan secuencias parcialmente

complementarias, corriendo el riesgo de detectar falsos resultados positivos.

Los grupos reporteros de la sonda pueden estar incorporados directamente en la estructura del ADN o ARN, como en el caso de las marcas radioactivas de P^{32} que forman parte de algunos nucleótidos. Sin embargo, existen actualmente varios sistemas de marcado de sondas y detección que no utilizan radioactividad, por ejemplo los ofrecidos por Invitrogen (<http://www.lifetech.com/index/BioPrime.htm>) y Roche Diagnostics (http://www.roche-applied-science.com/prod_inf/manuals/dig_man/dig51-52.pdf).

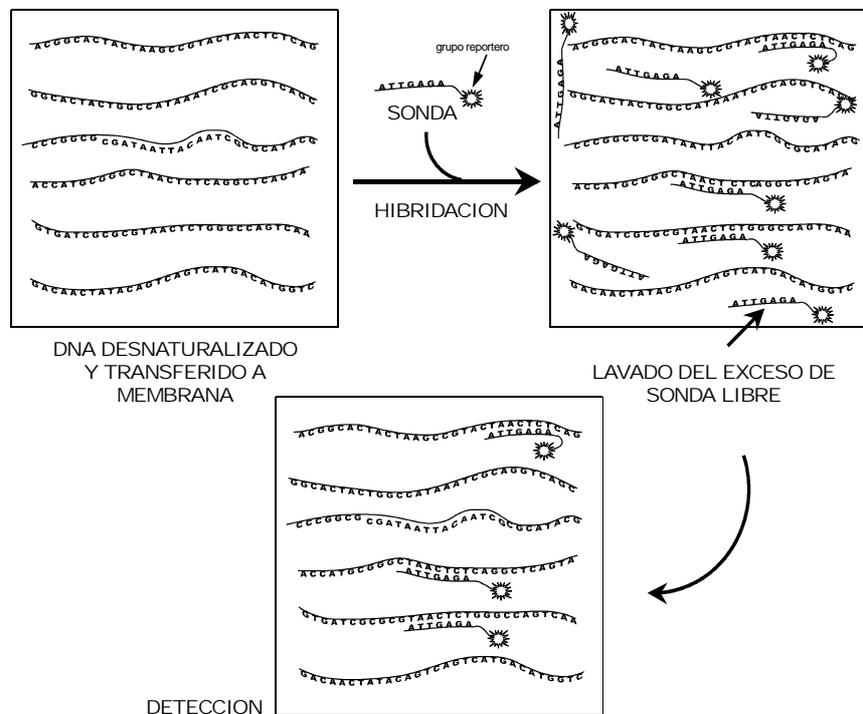


Figura 3. Representación esquemática del proceso de hibridación. En el primer paso el ADN es fijado covalentemente a la membrana, después de la hibridación toda la sonda libre o formando uniones parciales es lavada. La forma de detección estará determinada por el tipo de grupo reportero que presente la sonda.

Apoyados en una o ambas de las técnicas anteriormente descritas, se han generado un sinnúmero de metodologías para la detección – tipificación de todo tipo de microorganismos. Para una revisión y clasificación de las metodologías genéticas para tipificación de microorganismos, se recomienda la propuesta por Vaneechoutte (1996). Dentro de estas metodologías, las más utilizadas con actinomicetos en general y micobacterias en particular, caen dentro de los grupos denominados SRFA (*Selective Restriction Fragment Amplification*) y SRFH (*Selective Restriction Fragment Hibridization*). En las que una región del genoma o un gen particular es amplificado de manera selectiva, y posteriormente es restringido, generando un patrón de bandas característico (SRFA), o además podrá ser sujeto a hibridación (SRFH). El marcador seleccionado podrá estar presente en una o varias copias en el genoma. Ambos grupos de técnicas permiten una diferenciación a nivel de especie y subespecie. Dentro de estos grupos están algunas técnicas denominadas híbridas, que hacen uso tanto de amplificación como de restricción – hibridación, tal es el caso de: *Ligation- mediated PCR* (Smith 1992), *mixed-linker PCR* (Haas et al. 1993), y AFLPTM (*Amplification Fragment Length Polymorphism*) (Lin y Kuo 1995). Una característica de estas tres metodologías es la utilización de oligonucleótidos adaptadores que permiten amplificar selectivamente algunos fragmentos de ADN que han sido previamente restringidos, produciendo un patrón de bandas característico. La metodología descrita por Haas et al. (1993) utiliza una combinación de adaptadores y cebadores parcialmente complementarios a IS6110. A diferencia del IS6110/RFLP, esta técnica genera el polimorfismo por amplificación selectiva de IS6110, sin necesidad de hibridación. Dicha metodología ha sido particularmente útil en la tipificación de micobacterias, produciendo resultados similares a los obtenidos con IS6110/RFLP (Kremer et al. 1999).

Otro grupo de técnicas también basadas en amplificación, pero que amplifican de manera no selectiva regiones discretas del cromosoma, son aquéllas que hacen uso de un cebador corto con secuencia arbitraria, es decir, los cebadores no están dirigidos a un fragmento diana en particular, sino que se alinearán en distintas posiciones del genoma, y sólo aquellos que encuentren posiciones cercanas en cadenas opuestas producirán un amplímero. Las dos técnicas más conocidas de este grupo son AP-PCR (*Arbitrarily Primed PCR*) y RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic ADN*) fueron descritas de manera simultánea por Welsh y McClelland (1990) y Williams *et al* (1990) respectivamente. Ambas técnicas poseen un gran poder de resolución y pueden aplicarse a prácticamente cualquier organismo, sin embargo, su reproducibilidad es baja, debido a la susceptibilidad a producir diferentes patrones de bandas de un mismo organismo, aún bajo condiciones muy similares. Por ejemplo, diferencias en el modelo de termociclador o en la marca de la *Taq* polimerasa utilizada, pueden producir perfiles ligeramente distintos.

Spoligotyping

Se denomina así a la tipificación por oligonucleótidos espaciadores o spoligotyping (por “*spacer oligotyping*”). Este método de tipificación se basa en el polimorfismo que presenta un *locus* particular del genoma, la región de repetición directa (DR – *Direct Repeat*), que se

encuentra presente exclusivamente en bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. El locus DR fue originalmente descrito en *M. bovis* BCG, consistiendo de 49 secuencias repetidas de 36 pb cada una, las que están interrumpidas por espaciadores no repetitivos de 35 a 41 pb (Hermans et al. 1991). El número de DR varía enormemente entre los distintos integrantes del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Mientras que los espaciadores generalmente están presentes sólo una vez. Sin embargo, los espaciadores pueden contener o estar formados por distintas IS. El conjunto de un DR y su espaciador vecino se denomina repetición variante directa (DVR – Direct Variant Repeat) (ver Fig. 4).

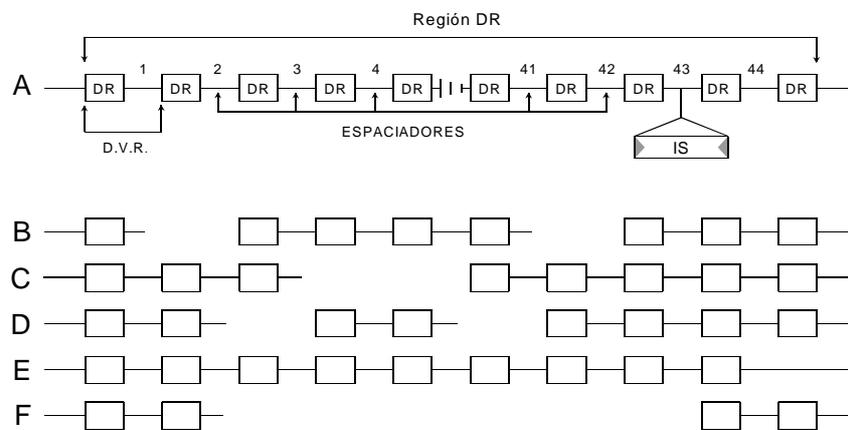


Figura 4. Esquema de la organización de la región DR mostrando en A los distintos elementos que la forman. Las regiones DR marcadas B – F corresponderían a cepas con distinta organización en sus respectivas regiones. La ausencia/presencia de cada D.V.R. sería específica de cepa, mientras que la secuencia de las D.V.R. permanece más o menos constante entre las distintas cepas. Se marca la posible ubicación de un elemento IS, como parte de uno de los espaciadores.

Mediante “spoligotyping” se puede detectar la presencia o ausencia de un número variable de espaciadores, cuya secuencia es conocida. El primer paso en el método consiste en amplificar por PCR la región DR de alguna cepa. Los cebadores utilizados se basan en las secuencias conservadas de los DR. Debido a la organización de la región DR, los amplímeros diferirán en tamaño (Fig 5), ya que los cebadores se alinearán en cada zona complementaria de las múltiples DR que se encuentren en la región DR. Además, los propios productos generados durante la reacción, pueden actuar como molde en nuevos ciclos de amplificación, si dichos amplímeros comprenden varias DR, los cebadores podrán alinearse en diferentes partes del amplímero. De tal forma que todo el conjunto de productos de PCR no podrá proporcionar información confiable sobre la secuencia o largo total de la región DR. Cabe señalar que todos los amplímeros obtenidos estarán marcados ya que uno de los cebadores utilizados cuenta con un grupo reportero (Fig. 5).

El segundo paso involucra la utilización de los amplímeros obtenidos como sondas, las cuales se aplican sobre una membrana previamente preparada, que está montada en un aparato para aplicar ADN (“blotting”) en dichas membranas. Dado que el aparato cuenta con ranuras, se pueden aplicar simultáneamente los productos desnaturalizados de varias reacciones de PCR, uno en cada ranura, los cuales son retirados posteriormente, una vez que han hibridado con los oligonucleótidos unidos covalentemente a la membrana.

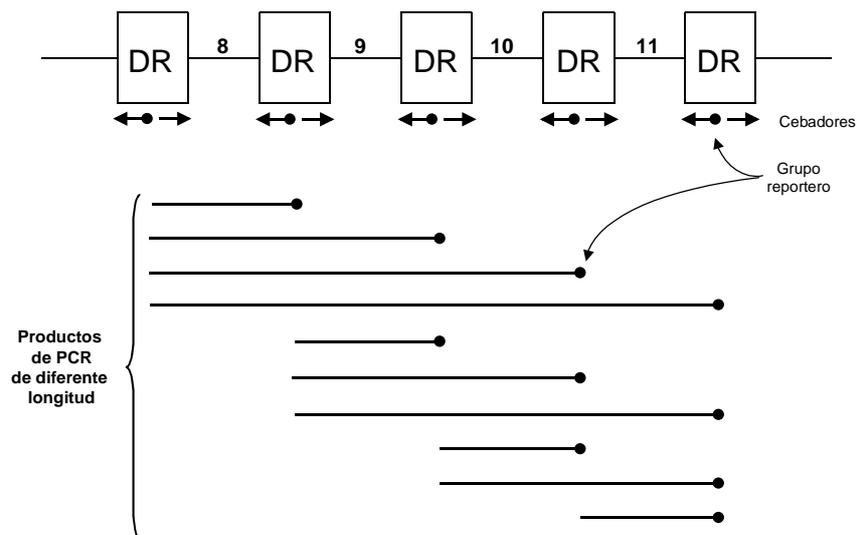


Figura 5. Ejemplo de la amplificación por PCR de la región DR, los productos diferirán en tamaño en función de las varias posiciones de alineación que encuentran los cebadores. Una cadena de los amplímeros podrá utilizarse como sonda debido al grupo reportero incorporado. Los múltiples amplímeros/sonda obtenidos hibridarán con los espaciadores inmovilizados en la membrana de *spoligotyping*, siempre que dicho espaciador se encuentre en la región DR amplificada.

La membrana se prepara aplicando oligonucleótidos con secuencias de espaciadores conocidos, en los canales provistos por el aparato, pudiéndose aplicar tantos oligonucleótidos distintos, como ranuras tenga la máscara del aparato. En uno de los protocolos de *spoligotyping* más completo, propuesto por Kremer *et al* (2001), se utiliza una máscara de 45 ranuras, en la que se aplican 43 oligonucleótidos correspondientes a distintos espaciadores encontrados en *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG. Una vez fijados los oligonucleótidos, formarán carriles paralelos a lo largo de la membrana. En el momento de la hibridación la máscara se coloca de manera perpendicular a la huella de los carriles de oligonucleótidos, de forma que cada amplímero/sonda aplicado en cada ranura, pueda entrar en contacto con una parte de la huella de los oligonucleótidos fijados. Una vez que se revelan las zonas en las que ocurrió hibridación, se obtendrá una cuadrícula en la que habrá un patrón de cuadros oscuros correspondiendo con zonas de hibridación positiva, intercalados con cuadros en blanco, en los que no ocurrió hibridación. Dicho patrón se puede considerar una huella genómica de la región DR, que es

específico para los disitintos aislados del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Un protocolo muy detallado y estandarizado para la realización de *spoligotyping*, se encuentra disponible en <http://www.caontb.rivm.nl/Manuals/principi.html>.

Por su parte, Isogen Biosciences (<http://www.isogen.nl>) ofrece membranas con ADN inmobilizado de espaciadores, para utilizarse en pruebas de *spoligotyping* específicas para cepas de *M.bovis/M.tuberculosis*.

SISTEMAS COMERCIALES

Varias compañías han desarrollado sistemas comerciales para la detección y tipificación de actinomicetos de importancia médica, principalmente los del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Todos los sistemas cuentan con un paso inicial de amplificación de una secuencia diana que puede ser ADN o ARN. Posteriormente, para la detección y en su caso cuantificación del amplímero obtenido, se han desarrollado dos grupos de estrategias. En el primer grupo, la detección se hace mediante sondas de ADN que son grupo- o especie-específicas, seguido de reacciones bioquímicas que permiten cuantificar el amplímero. A este grupo pertenecen los sistemas: AMPLIFIED *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test de Gen Probe Inc. (<http://www.gen-probe.com>), que utiliza procesos exclusivos de Amplificación Mediada por Transcripción (TMA – *Transcription Mediated Amplification*), seguido de un Ensayo de Hibridación Protegida (HPA – *Hibrydization Protection Assay*). El sistema AMPLICOR® MTB desarrollado por Roche Diagnostics (<http://www.roche-diagnostics.com>), utiliza amplificación por PCR y un sistema de detección de sondas marcadas con biotina y *ligandos* de avidina-peroxidasa. Esta misma compañía ofrece una variante altamente automatizada de su sistema, denominada COBAS AMPLICOR™ MTB. Por su parte Abbott Laboratories (<http://abbottdiagnostics.com>) y Becton Dickinson (<http://www.bd.com>) también tienen en el mercado sendos sistemas de detección denominados LCx *Mycobacterium tuberculosis* assay y BD Probe Tec ET, respectivamente.

En el segundo grupo de técnicas, los amplímeros construidos por PCR poseen un grupo reportero incorporado directamente en uno de los cebadores. Posteriormente, estos amplímeros son aplicados como sondas a tiras tipificadoras que tienen inmovilizado ADN de varias cepas control, generalmente la región espaciadora entre el 16S y 23S r ADN. Las hibridaciones positivas se evidencian mediante reacciones cromogénicas. Los sistemas comerciales se denominan *GenoType MTBC* y *GenoType Mycobacterium*, producidos por Hain Diagnostica (<http://www.hain-lifescience.de>)

Otro sistema comercial, también basado en una amplificación inicial por PCR, pero que utiliza como estrategia de identificación/tipificación, la secuenciación automatizada de fragmentos del 16S r ADN, es Microseq Microbial Identification System (<http://www.appliedbiosystems.com>).

En los últimos años, la creación y desarrollo de metodologías basadas en ADN, para la

detección, identificación y tipificación de microorganismos ha sufrido un desarrollo explosivo. Estos métodos difieren en su facilidad de aplicación e interpretación, poder de discriminación y reproducibilidad. Un buen método deberá cumplir con varios criterios con el fin de ser ampliamente utilizado; a) todos los organismos de un grupo taxonómico deben ser tipificables por la metodología seleccionada, b) el método deberá, por un lado, diferenciar claramente organismos o cepas no relacionadas, y por otro, demostrar las relaciones entre cepas relacionadas, c) los resultados obtenidos deberán ser reproducibles, en ensayos intra e interlaboratorios, provistos de la existencia de una metodología estandarizada (Olive y Bean 1999).

Desafortunadamente, las metodologías que mejor cubren estos requisitos (v. g. secuenciación de ADN), poseen también otros inconvenientes, (complejidad técnica, necesidades altas de infraestructura, muy laboriosos, lentos) que los hacen poco utilizables. En este sentido, las metodologías que generan huellas genómicas permiten obtener resultados más o menos rápidos, mientras que sus necesidades técnicas y de equipo pueden variar. Sin embargo, varias de estas metodologías han demostrado su eficiencia en cuanto a capacidad de tipificación y reproducibilidad. En un estudio interlaboratorio, Kremer et al. (1999), probaron distintas técnicas basadas en varios marcadores genéticos, para la tipificación de 90 cepas del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Encontrando que IS6110/RFLP, mixed-linker PCR y AP-PCR son las técnicas con mayor poder de diferenciación. Mientras que *spoligotyping* tiene una capacidad media pero presenta ventajas en cuanto a la interpretación de resultados y a la posibilidad de compararlos entre varios laboratorios.

Cabe señalar que aunque no existe el método perfecto de tipificación, existe la tendencia a proponer metodologías estandarizadas que faciliten el intercambio de resultados y bases de datos entre laboratorios. En un enfoque polifásico, estas metodologías deberán comprender técnicas microbiológicas clásicas (cultivo, pruebas bioquímicas), inmunológicas (serología) y pruebas moleculares (van Belkum 2000).

Agradecimientos

El autor desea expresar su reconocimiento a Luis Mario Madrid por el diseño de las figuras.

BIBLIOGRAFÍA

- Collins DM, Stephens DM. 1991. Identification of insertion sequence, IS1081, in *Mycobacterium bovis*. FEMS Lett. 83:11-16
- Das S, Chan SL, Allen BW, Mitchison DA, Lowrie DB 1993. Application of DNA fingerprinting with IS986 to mycobacterial isolates obtained from pulmonary tuberculosis in Hong Kong before, during and after short-course chemotherapy. Tubercle Lung Dis 74: 47-51.

- Das S, Paramasivan CN, Lowrie DB, Prabhakar R, Narayanan PR 1995. IS6110 RFLP typing of clinical isolates of *M. tuberculosis* from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, South India. *Tubercle Lung Dis* 76: 550-554.
- Dvorská L, Bartos M, Martín G, Erler W, Pavlík I. 2001. Strategies for differentiation, identification and typing of medically important species of mycobacteria by molecular methods. *Vet. Med. – Czech.* 46:309-328.
- Food and Drug Administration. U.S Department of Agriculture. U.S. Environmental Protection Agency, and Centers for Disease Control and Prevention 1997. Food safety from farm to table: a national food safety initiative report to the President. p. 3. FDA. Washington D.C.
- Githui, WA, Wilson SM, Drobniowski FA, 1999. Specificity of IS6110-based DNA fingerprinting and diagnostic techniques for *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol.* 37: 1.224-1.226.
- Haas WH, Butler WR, Woodley CR, Crawford JT. 1993. Mixed-linker polymerase chain reaction: a new method for rapid fingerprinting of isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol.* 31:1.293-1.298.
- Heersma HF, Kremer K, van Embden JDA.1998. Computer analysis of RFLP patterns of *M. tuberculosis*. In: T. Parish & N. G. Stoker (ed.), *Meth. Mol. Biol.* 101 *Mycobacteria Protocols book.* pp. 395 - 422. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Hermans PWM, van Soolingen D, Bik EM, de Haas PEW, Dale JW van Embden JDA 1991. The insertion element IS987 from *M. bovis* BCG is located in a hot spot integration region for insertion elements in *M. tuberculosis* complex strains. *Infect Immun.* 59: 2.695-2.705.
- Hermans PWM, van Soolingen D, van Embden JDA. 1992. Characterization of a major polymorphic tandem repeat in *Mycobacterium tuberculosis* and its potential use in the epidemiology of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium gordonae*. *J Bacteriol.* 174:4.157-4.165.
- Kremer K., van Soolingen D., Frothingham R., Haas W.H., Hermans P.W.M., Martin C., Palittapongarnpim P., Plikaytis B.B., Riley L.W., Yakrus M.A., Musser J.M., van Embden J.D.A. 1999. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: Interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J. Clin. Microbiol.* 37:2.607-2.618.
- Kremer K, Bunschoten A, Schouls L, van Soolingen D, van Embden JDA. 2001. "SPOLIGOTYPING" a PCR-based method to simultaneously detect and type *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. (versión 1.3) Research Laboratory for

Infectious Diseases. National Institute of Public Health and Environment. Bilthoven, Países Bajos.

Laurent F, Carlotti A, Boiron P, Villard J, Freney J. 1996. Ribotyping: a tool for Taxonomy and identification of the *Nocardia asteroides* complex species. *J Clin Microbiol.* 34:1.079-1.082.

Lin JJ, Kuo J, 1995. AFLPTM: A novel PCR-based assay for plant and bacteria DNA fingerprinting. *Focus* 17:52-56.

Mullis KB, Faloona FA. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Meth Enzymol.* 55:335-350

Newton CR, Graham A. 1997. PCR 2nd Ed. Bios Scientific Publishers. Oxford, U.K. 190 pp.

Njanpop-Lafourcade BM, Inwald J, Ostyn A, Durand B, Hughes S, Thorel MF, Hewinson G, Haddad N. 2001. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Cameroon. *J Clin Microbiol.* 39: 222-227.

O'Brien R, Flynn O, Costello E, O'Grady D, Rogers M. 2000. Identification of a novel DNA probe for strain typing *Mycobacterium bovis* by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *J Clin Microbiol.* 38: 1.723-1.730.

Olive DM, Bean P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol.* 37:1.661-1.669.

Persing DH (Ed) 1996. *PCR Protocols for Emerging Infectious Diseases.* ASM Press, Washington, D.C. 180 pp.

Poulet S, Cole ST. 1995. Repeated DNA sequences in mycobacteria. *Arch Microbiol.* 163:79-86.

Ritacco V, Kremer K, van der Laan T, Pijnenburg J, de Haas P, van Soolingen D. (1998). Use of IS901 and IS1245 in RFLP typing of *Mycobacterium avium* complex: relatedness among serovar reference strains, human and animal isolates. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2:242-251

Ross BC, Raios K, Jackson K, Dwyer B. 1992. Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. *J. Clin. Microbiol.* 30:942-946.

Schwartz DC, Cantor CR. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNA's by pulsed field gel electrophoresis. *Cell* 37:67-75.

- Sechi LA, Dupre I, Leori G, Fadda G, Zanetti S. 2000. Distribution of a specific 500-base-pair fragment in *Mycobacterium bovis* isolates from Sardinian cattle. *J Clin Microbiol.* 38: 3.837-3.839.
- Singh SP, Salamon H, Lahti C J, Farid-Moyer M, Small PM.(1999). Use of Pulsed-Field Gel Electrophoresis for molecular epidemiologic and population genetic studies of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 37: 1.927-1.931.
- Smeltzer SJ. 1998. PCR in Bioanalysis. Humana Press, Totowa, NJ. 292 pp.
- Smith DR. 1992. Ligation-mediated PCR of restriction fragments from large DNA molecules. *PCR Meth Applications* 2:21-27.
- Soini H, Pan X, Amin A, Graviss EA, Siddiqui A, Musser JM Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in Houston, Texas, by Spoligotyping. *J Clin Microbiol.* 38: 669-676.
- Suffys PN, Ivens de Araujo ME, Degrave WM. 2001. The changing face of the Epidemiology of tuberculosis due to molecular strain typing - A Review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 92: 297-316.
- Thierry D, Cave MD, Eisenbach KD, Crawford JT, Bates JH, Gicquel B, Guesdon JL 1990. IS6110, an IS-like element of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucl Acids Res.* 18:188.
- Vaneechoutte M. DNA fingerprinting techniques for microorganisms. A proposal for classification and nomenclature. *Mol Biotechnol.* 6:115-142.
- Van Belkum A. 2000. Are diagnostic tests reproducible? *J Microbiol Meth.* 43:65-66
- Van Embden JDA, MD Cave JT, Crawford JW, Dale KD, Eisenach KD, Gicquel, BWM. Hermans PWN, Martin RA, McAdam TM, Shinnick PM, Small 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol.*, 31: 406-409
- Van Embden JDA, Schouls LM, van Soolingen D. 1995. *Molecular techniques: applications in epidemiologic studies.* In: C.O. Thoen & J.H. Steele eds. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans, pp 15-27. Iowa State Press University, Ames.
- Viana-Niero C, Gutierrez C, Sola C, Filliol I, Boulahbal F, Vincent V, Rastogi N. 2001. Genetic diversity of *Mycobacterium africanum* clinical isolates based on IS6110-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis, Spoligotyping, and Variable Number of Tandem DNA repeats. *J Clin Microbiol.* 39: 57-65

- Welsh J, McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR arbitrary primers. *Nucl Acids Res.* 18:7.213-7.218.
- Wiid IJ, Werely C, Beyers N, Donald P, van Helden PD 1994. Oligonucleotide (GTG)₅ as a marker for *M. tuberculosis* strain identification. *J Clin Microbiol* 32: 1318-1321.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV.1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res.* 18:6531-6535.
- Young-Kil P, Gill-Han B, Sang-Jae K. 2000. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from countries in the Western Pacific region. *J Clin Microbiol.* 38:191-197.

CAPÍTULO 10

PRINCIPIOS DE TAXONOMÍA NUMÉRICA

La idea de cuantificar las relaciones existentes entre las especies (taxa) se le ocurrió a varios taxónomos desde principios de siglo y aun antes (siglo XVIII), como el botánico francés Michel Adanson. Sin embargo ninguno de estos métodos propuestos fue adoptado por los investigadores para su trabajo posterior.

Sneath y Sokal (1957) explicaron esta situación diciendo que los métodos no estaban lo suficientemente elaborados para ofrecer una adecuada codificación de caracteres, una forma fácil para el cálculo de las correlaciones y que no eran capaces de construir una clasificación. La taxonomía numérica además de usar un gran número de caracteres, para ser práctica, requiere del uso de computadoras para su cálculo; todo esto aunado a la tendencia de que la taxonomía debe reflejar las vías evolutivas que se dan entre los organismos.

Es obvio que esa taxonomía numérica primitiva no es capaz de ofrecer filogenias o cuerpos de teorías y principios alternativos, como es la taxonomía fenética.

Todos estos puntos contribuyeron a que la taxonomía numérica no fuera apreciada y su desarrollo se retrasara prácticamente hasta nuestros días. Sin embargo, quizá lo que hizo posible su popularización fue en primer lugar el advenimiento de las computadoras, al principio las gigantescas máquinas de válvulas electrónicas hasta las modernas computadoras personales; y en segundo lugar, una acalorada controversia entre los taxónomos, tanto tradicionales como numéricos, que se vieron en la necesidad de reformular sus teorías y principios para así poder defender sus respectivos métodos.

La taxonomía tradicional le confiere diferente peso a cada caracter usado, aunque no existe una regla clara para saber cómo aplicar ese peso; aún en la actualidad existen taxónomos que piensan que darle el mismo peso a cada caracter es una falta taxonómica grave.

De los principios adoptados por la taxonomía numérica resulta natural que los grupos tienen que formarse basados en el análisis de un gran número de caracteres, si se quiere que respondan bien a las propiedades de predictividad que debe tener cualquier sistema de clasificación. Esta consideración difiere diametralmente de la taxonomía tradicional que se basa en la selección de unos cuantos caracteres "filogenéticamente importantes".

Algunos autores concluyeron que no existe ninguna razón lógica para asignar diferente

peso a los caracteres estudiados, ya que en un estudio de 17 OTUs (especies) ha sido puesto en evidencia que aún valores 1.000 veces diferentes en 18 de 135 características analizadas tienen poco efecto en su taxonomía.

En cualquier estudio de taxonomía numérica la cuestión de cuántos y cuáles caracteres tomar en cuenta es de capital importancia. A menos que cada carácter pudiera proveer información independiente de un gran número de *loci*, no se puede aceptar que un número reducido de caracteres, digamos 40, podría representar una fracción razonable de la información genética del taxón descrito puesto que los taxa están definidos por la coincidencia de muchas características, que por otro lado no necesariamente están presentes en todos los miembros de un taxón.

Esta postura se opone a la taxonomía tradicional que plantea que los taxa son monofiléticos y por lo tanto se puede establecer que una clasificación será más "natural" entre mayor sea el número de propiedades estudiadas.

La forma de sortear este problema es mediante el uso de caracteres estables que se ajusten a la **Hipótesis de la Correspondencia Asintótica** de Sneath y Sokal que establece que a partir de un cierto número de caracteres analizados, la inclusión de más características ya no afecta la estructura taxonómica encontrada (Figura 7.1).

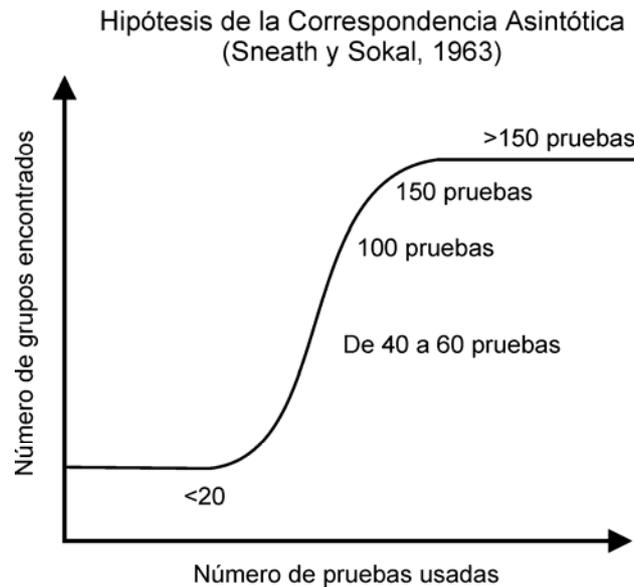


Figura 7.1

La introducción de los principios Adansonianos permitió resolver muchos de los eternos problemas asociados con la clasificación e identificación bacterianas. A las cepas aisladas se les prueban muchos caracteres cuyo peso es el mismo y se forman especies (taxa) numéricamente definidas que reflejan su similitud.

Estos grupos pueden representar nuevas especies o pueden quedar asociadas a cultivos de referencia que hayan sido incluidos en el análisis.

Una vez que una clasificación numérica ha sido construida, se puede determinar cuáles son los marcadores específicos del grupo y así poderlos proponer para su identificación. Esto da lugar a claves dicotómicas y tablas que pueden ser usadas posteriormente en la identificación de microorganismos a nivel de diagnóstico clínico.

Es evidente que se requiere analizar un gran número de cepas para poder aplicar el tratamiento estadístico adecuado que le dará confiabilidad a las claves.

En la taxonomía numérica el punto de partida generalmente es la construcción de una matriz $n \times t$ donde n representa el número de caracteres determinados para cada cepa y t es el número de cepas. En lo que podría llamarse la taxonomía numérica convencional, esta matriz se usa para determinar el parecido entre las cepas calculando los **coeficientes de similitud**.

Los resultados de estos análisis generalmente se presentan en la forma de *dendrogramas* y/o *matrices jerarquizadas*. El propósito primario de la taxonomía numérica es el de proveer clasificaciones que sean precisas, reproducibles y que contengan un gran contenido de información.

El uso de técnicas numéricas para la construcción de clasificaciones biológicas nos lleva a comprender que la circunscripción de taxa sigue ciertos principios establecidos y no es algo que simplemente sucede.

Los pasos lógicos y la secuencia a seguirse, pueden ser aplicados a todas las ramas de la Biología y la Sistemática. Estos pasos, en el caso de las bacterias, son los siguientes:

1. Las bacterias (t) por ser clasificadas son colectadas y examinadas a través de un número grande de pruebas (n) bioquímicas, morfológicas, nutricionales y fisiológicas. En seguida se prepara una matriz de datos $n \times t$ (Figura 7.2).

		PRUEBAS							
		A	B	C	D	E	F	G	H
CEPAS DE MICROORGANISMOS	1	-	+	+	+	+	+	-	-
	2	+	-	+	+	-	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	+	-	+	-	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	-	-	-	+
	6	-	-	+	+	+	-	+	-
	7	+	+	+	+	-	+		+
	8	+	-	+	-	+	-	+	-
	9	-	+	-	+	+	-	+	+
	10	-	-	+	-	+	+	+	+

Figura 7.2 MATRIZ DE DATOS $n \times t$

2. Utilizando los resultados de la matriz de datos las cepas son clasificadas con base en sus similitudes o diferencias.
3. Las cepas que parecen muy próximas la una a la otra, son agrupadas (usando técnicas para hacer "grupos").
4. Los grupos numéricamente definidos son examinados y cualquier caracter que los distingue, es extraído de la matriz de datos y analizado estadísticamente para ser propuesto como prueba de identificación con valor diagnóstico.

Finalmente, podríamos resumir los principios de la taxonomía numérica como sigue:

- A. La taxonomía ideal es aquella en la cual las taxa contiene el máximo de información basada en el mayor número posible de caracteres.
- B. A cada caracter se le da un peso igual al crear taxa naturales.
- C. El grado de relación entre dos unidades taxonómicas operacionales (OTUs) es una expresión de la similitud presentada por los diversos caracteres que son comparados.
- D. Se pueden relacionar grupos distintos debido a que existe correlación entre diversos caracteres en los taxa que se están estudiando y que pudieran ser producto de procesos de evolución convergente.
- E. La taxonomía es una ciencia estrictamente empírica.

PROCEDIMIENTOS OPERACIONALES

a) Recolección de Datos

En la taxonomía numérica los microorganismos deben ser estudiados al menos en 50 propiedades los grupos que se establecen basados en el estudio de pocas propiedades son poco confiables.

Las propiedades positivas se deben registrar como (+) y las negativas como (-) y entonces se procede a construir una matriz $n \times t$.

b) Medidas de semejanza

Cada cepa deberá ser comparada con cada una de las restantes, y el grado de semejanza se determina por medio de algún coeficiente de similitud. La codificación de los resultados se hace a partir de una tabla de 2×2 (fig 7.3), donde **a** significa que ambos microorganismos dan positiva la prueba, **b** y **c** significa que el resultado de la prueba es diferente para cada microorganismo y **d** significa que ambos microorganismos dan la prueba negativa.

Para propósitos del cálculo se considera que **a** y **d** tienen un valor de 1, en tanto que **b** y **c** tienen un valor de cero.

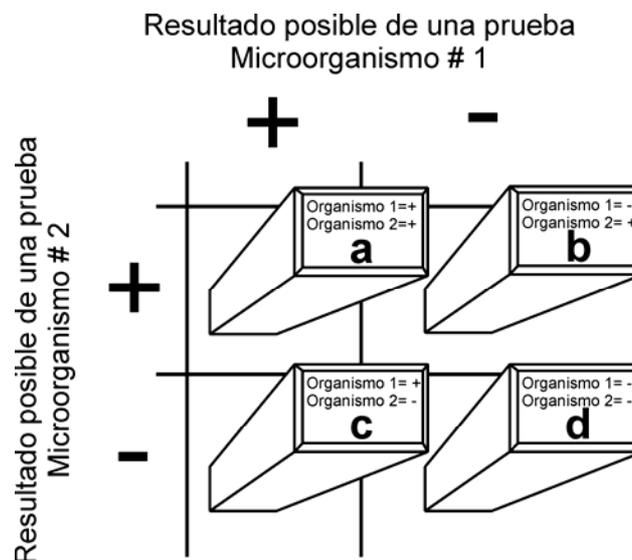


Figura 7.3 TABLA DE 2 x 2

El **Coefficiente de similitud simple** (S_{sm}) se calcula con la fórmula:

$$\%S_{sm} = \frac{\text{Número de caracteres compartidos} \times 100}{\text{Número total de caracteres}}$$

También puede expresarse como:

$$\%S_{sm} = \frac{(\Sigma a + \Sigma d) \times 100}{n}$$

Donde Σa es el número de caracteres (+) positivos compartidos entre dos cepas, Σd el número de caracteres (-) negativos compartidos y n el número total de caracteres.

La otra medida de semejanza más usada es el **Coefficiente de similitud de Jacard** (S_j), que se calcula con la fórmula:

$$\%S_j = \frac{\Sigma a \times 100}{\Sigma a + \Sigma b + \Sigma c}$$

Donde Σa es el número de caracteres (+) positivos compartidos entre dos cepas, en tanto que Σb y Σc son el número de caracteres no compartidos.

El S_j produce valores de similitud más bajos que el S_{sm} , sin embargo, no se ve afectado por pruebas mal escogidas y que lógicamente darían coincidencia con resultados negativos, sin que, por esto se pueda decir que la falta de una propiedad en los microorganismos los emparente mas.

Con los datos recolectados podemos generar una matriz de similitud no jerarquizada. Veamos algunos ejemplos de matriz de similitud no jerarquizada y su diagrama sombreado. En este ejemplo se usaron 100 caracteres para comparar a 11 organismos (Figura 7.4).

MATRIZ NO JERARQUIZADA
Coeficiente de Similitud Simple (S_{sm})

1	100										
2	100	100									
3	100	100	100								
4	15	15	15	100							
5	15	15	15	100	100						
6	15	15	15	100	100	100					
7	15	15	15	100	100	100	100				
8	69	69	69	15	15	15	15	100			
9	69	69	69	15	15	15	15	100	100		
10	76	76	76	7	7	7	7	92	92	100	
11	76	76	76	7	7	7	7	92	92	100	100
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

DIAGRAMA SOMBREADO

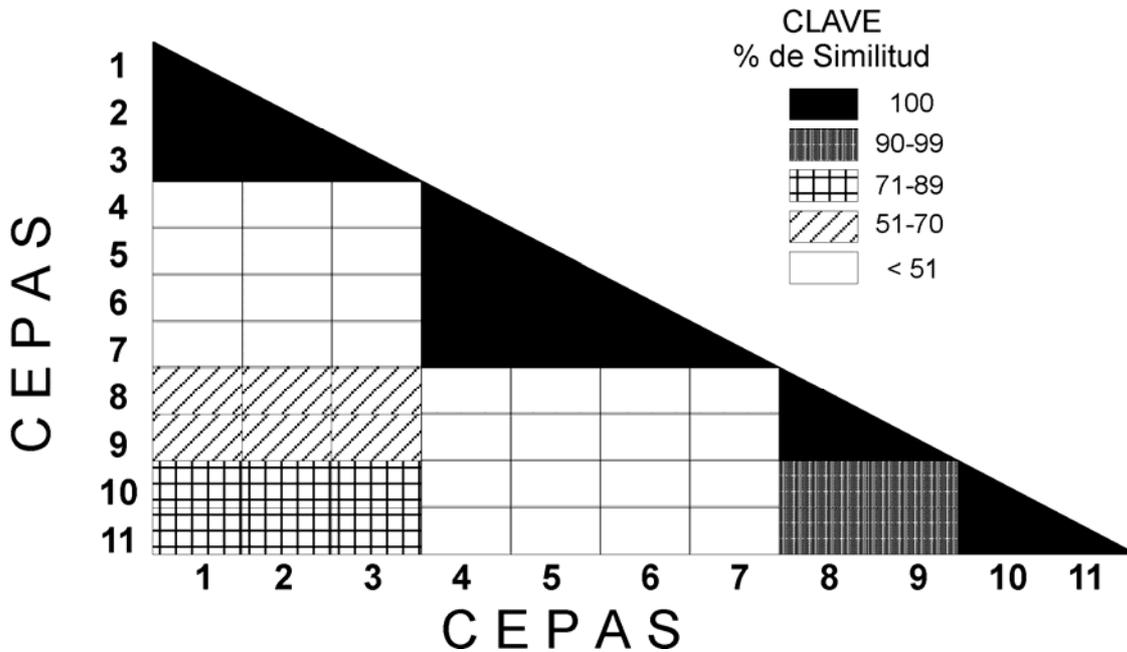


Figura 7.4 Matrices no jerarquizadas

ANÁLISIS DE GRUPO

Las cepas que fueron estudiadas en la matriz de similitud no jerarquizada, ahora deben ser acomodadas en grupos, a esto se le denominará "Análisis de grupo". Una de las técnicas más usadas es el llamado "Análisis grupal de relación simple".

Con esta técnica la matriz de similitud no jerarquizada es rastreada para detectar valores de similitud del 99% y este proceso es repetido a través de una reducción consecutiva de niveles al 1%.

Cada cepa es extraída de la matriz en el nivel más alto de similitud con cualquier otra cepa. En el ejemplo anterior, los organismos 1, 2 y 3 serán extraídos primero de dicha matriz seguidos de los organismos 10 y 11, si un organismo es ya miembro de algún grupo establecido, el nuevo organismo seleccionado se une a ese grupo.

Si ninguno de los dos organismos pertenece a un grupo establecido estos forman el núcleo de un nuevo grupo. Los grupos establecidos se unen entre sí al más alto nivel de similitud que exista entre cualquiera de los miembros constituyentes. Este proceso se completa cuando todos los grupos se hayan unido para formar un grupo agregado. Así se completa el análisis de grupo.

Los resultados generalmente son expresados bajo la forma de DENDROGRAMAS (Figura 7.5).

De manera alterna o adicional los resultados pueden ser expresados en diagramas sombreados jerarquizados que se construyen colocando los organismos en el mismo orden como aparecen en el dendrograma (Figura 7.6).

MATRIZ JERARQUIZADA
Coeficiente de Similitud Simple (S_{sm})

1	100													
2	100	100												
3	100	100	100											
10	76	76	76	100										
11	76	76	76	100	100									
8	69	69	69	92	92	100								
9	69	69	69	92	92	100	100							
7	15	15	15	7	7	15	15	100						
6	15	15	15	7	7	15	15	100	100					
5	15	15	15	7	7	15	15	100	100	100				
4	15	15	15	7	7	15	15	100	100	100	100			
				1	2	3	10	11	8	9	7	6	5	4

C E P A S

Figura 7.5 Dendrograma de los datos de la Matriz jerarquizada

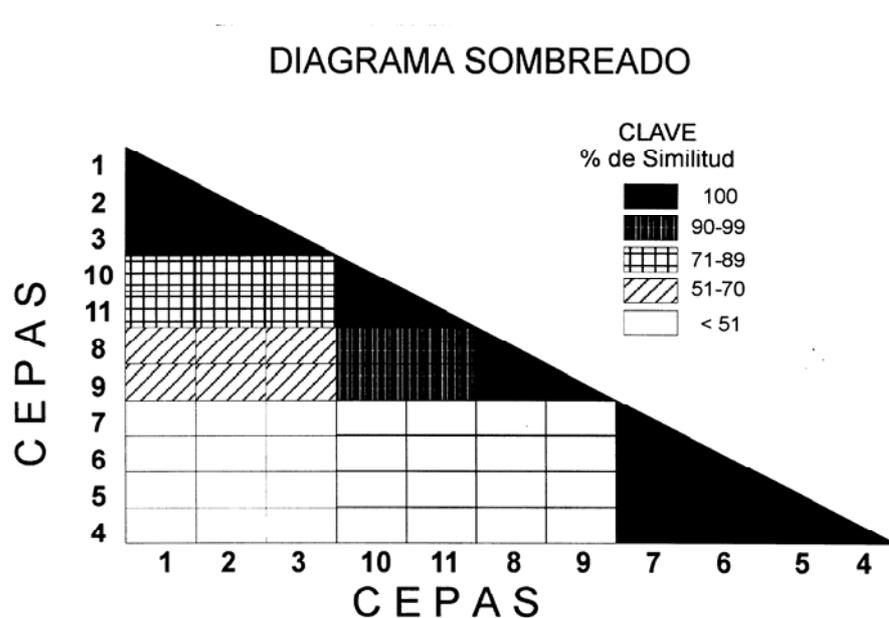


Figura 7.6 Matrices jerarquizadas

DETERMINACIÓN DE GRUPOS (FENA)

La determinación de los grupos es aún un trabajo subjetivo y existen muy pocas reglas estándar para hacer este procedimiento.

En el ejemplo indicado, los organismos 1, 2 y 3 comparten un alto grado de similitud y son muy distintos de los organismos 10 y 11.

El primer grupo es bastante compacto definido alrededor del 98 % de similitud (%S). Aunque los organismos 10 y 11, por un lado y los organismos 8 y 9 forman grupos compactos, se

encuentran poco asociados entre sí y formarían un grupo difuso junto con los organismos 1, 2 y 3 si el fena es definido en el nivel del 75% de similitud.

Si el fena es definido alrededor del 85% de similitud, estos organismos podrían formar dos grupos, uno con 3 miembros muy parecidos entre sí y el otro formado a su vez por dos grupos de 2 miembros cada uno.

De la misma manera se puede interpretar la relación que pudiera existir entre el grupo formado por las bacterias 1, 2, 3, 10, 11, 8 y 9 con el grupo compacto constituido por 5, 4, 7 y 6.

Cuando el fena ha sido bien definido, esto es, cuando la clasificación ha sido completada, suele ser posible el construir una Clave de Identificación, por medio de la cual aislados bacterianos desconocidos, pueden ser asignados a un fena en particular. Para hacer esto, las características que distinguen al grupo son extraídos de la base de datos y se define un marcador. Esto se denomina peso *a posteriori*.

BIBLIOGRAFÍA

- Bergey's Manual of systematic Bacteriology* vol.1 and 2 ed. Sneath, P. H. et al (1984-1986). Williams & Wilkins. Baltimore EE.UU.
- Cowan, ST, Steel, K.J *Manual for the Identification of Medical Bacteria* 2nd ed. 1974 Cambridge University Press Inglaterra.
- Goodfellow M. Dickinson CH1985. Delineation and description of microbial populations using numerical methods. in *Computr assisted Bacterial Systematics*. Goodfellow, M., Jones, D. and F.C Priest. eds Academic Press. London.
- Klatte S, Rainey FA. Kroppenstedt RM. 1994 Transfer of *Rhodococcus aichiensis* Tsukamura 1982 and *Nocardia amarae* Lechevalier and Lechevalier 1974 to the genus *Gordona* as *Gordona aichiensis* comb nov and *Gordona amarae* comb nov. *Int J Syst Bact* 44 769-773.
- Logan N.A. 1994 *Bacterial Systematics*. Blackwell Sci. Publ. Londres.
- Ochi K. Hiranuma H. 1994 A Taxonomic Review of the Genera *Kitasatosporia* and *Streptoverticillium* by Analysis of Ribosomal Protein at-L30. *Int J Syst Bact* 44 285-292.
- O'Donnell AG., Falconer C., Goodfellow M., Ward AC. and Williams E. 1993 Biosystematics and diversity amongst novel carboxydrotrophic actinomycetes. *Anton Leeuwenhoek Int J Gen M* 64 325-340.
- Priest F, Austin B. 1993 *Modern Bacteril Taxonomy*. 2nd. Ed. Chapman and Hall. Londres.
- Sokal R.R. (1985) *The Principles of Numerical Taxonomy*. in *Computer assisted Bacterial Systematics*. Goodfellow, M., Jones, D. and F.C Priest. eds Academic Press. London.
- Tsukamura, M.1976 An approach to numerical identification of bacterial species. *J Gen Microbiol.* 95: 207-212.
- Wallace RJ, Brown BA, Brown JM Mcneil M. 1994 Taxonomy of *Nocardia* Species. *Clin Infect Dis* 18 (3) 476.
- Whitham TS, Athalye M, Minnikin DE, Goodfellow M. 1993 Numerical and chemical classification of *Streptosporangium* and some related actinomycetes. *Anton Leeuwenhoek Int J Gen M* 64 (3-4) 387-429.
- Yassin AF, Rainey FA, Brzezinka H, Jahnke KD, Weissbrodt H, Budzikiewicz H, Stackebrandt E, Schaal KP. 1995 *Lentzea* gen nov, a new genus of the order Actinomycetales. *Int J Syst Bact* 45 (2) 357-363.

APÉNDICE

FÓRMULAS DE LOS MEDIOS DE CULTIVO PARA AISLAMIENTO Y CRECIMIENTO DE ACTINOMICETALES

1. Agar Nutritivo- Glicerol (McClung, 1949)

Extracto de carne	3.0 g
Peptona	5.0 g
Agar	15.0 g
Glicerol	20.0 g
Agua destilada	1.0 L
pH	7.0

2. Agar de Bennett (McClung, 1949)

Extracto de levadura	1.0 g
Extracto de carne	1.0 g
N - Z amina A (Caseína digerida; Sheffiekd Farms)	2.0 g
Agar	15.0 g
Glucosa	10.0 g
Agua Destilada	1.0 g
pH	7.3

3. Agar Extracto de Suelo - Glicerol (Gordon y Smith, 1955)

Peptona	5.0 g
Extracto de carne	3.0 g
Glicerol	70.0 g
Agar	15.0 g
Extracto de suelo	1.0 L

(El extracto de suelo fue preparado tamizando 1 kg de suelo jardín secado al aire a través de un tamiz de malla N° 9, esterilizado con 2.4 litros de agua corriente a 121°C por una hora, se agitó y filtró a través de papel. Cuando se hacia necesario. El extracto fue clarificado por la adición de talco y vuelto a filtrar).

4. Agar de Concentración Media de Nutrientes (Corbaz, Gregory y Lacey, 1963)

Agar nutritivo granulado Oxoid	14 g
Agar	10 g
Agua destilada	1.0 L
pH	7.4

5. Agar Extracto de Levadura -Extracto de Malta (Pridam et. al 1957)

Extracto de levadura	4.0 g
Extracto de Malta	10.0 g
Glucosa	4.0 g
Agar	20.0 g
Agua destilada	1.0 L
pH	ajustado a 7.3 con KOH

6. Agar Jugo de Vegetales V-8 (Corbaz, Gregory y Lacey, 1963)

Jugo vegetal V-8 (Campbell`s Soups LTD)	180.0 ml
Carbonato de calcio	2.0 g
Agar	21.0 g
Agua destilada	cbp 1.0 L
pH	ajustado a 7.3 con KOH

7. Medio Gelatina (Bojalil y Cerbon, 1959)

Gelatina	4.0 g
Agua destilada	1.0 L
pH	7.0

8. Agar Sabouraud

Glucosa	40.0 g
Peptona	10.0 g
Agar	20.0 g
Agua destilada	1.0 L
pH	ajustado a 5.6

9. Agar Glucosa - Neopeptona (Emmons, Binford y Utz, 1970)

Glucosa	20.0 g
Neopeptona	10.0 g
Agar	20.0 g
Agua destilada	1.0 L
pH	ajustado de 6.8 a 7.0

10. Agar Jensen (Jensen, 1930)

Glucosa	2.0 g
Caseína	1.0 g
(disuelta en 10 ml de NaOH 0.1N)	

Fosfato de potasio dibásico	0.5 g
Sulfato de magnesio. 7H ₂ O	0.2 g
Cloruro Férrico. 6H ₂ O	trazas
Agar	15.0 g
Agua destilada	1.0 L

11. Agar Extracto de Levadura (Gordon y Smith, 1955)

Extracto de levadura	10.0 g
Glucosa	10.0 g
Agar	15.0 g
Agua corriente	1.0 L
pH	6.8

12. Agar de Quitina Coloidal. (Johnston, 1971; Lingappa, 1962; Willoughby 1968).

Usado frecuentemente en la Escuela de Post grado de Estudios en Ciencias Biológicas de la Universidad de Bradford.

Quitina Cruda: Quitina, grado práctica. Ejemplo: Cáscara de Camarón de Sigma Chem. Co.

Purificación:

- 1) Lavar alternadamente por períodos de 24 horas con hidróxido de sodio 1M y ácido clorhídrico 1M, 5 ó 6 veces.
 - 2) Lavar con etanol al 95% (industrial) 3 ó 4 veces.
 - 3) Decantar el exceso de etanol dejar secar.
- Este tratamiento da un producto blanco con una pérdida del 30% al 40%.
Para 5 litros de Agar Quitina.

Hidrólisis:

- 1) Disolver 20 g de material purificado en 60 ml ácido sulfúrico al 50% a temperatura ambiente, con agitación constante durante 60 a 90 minutos. La hidrólisis ácida no debe permitirse indefinidamente.
- 2) Filtre la solución a través de un embudo Buchner con fibra de vidrio.

Precipitación:

- 1) Para filtrar 10 litros de agua destilada fría, utilice dos vasos de precipitados de 5 litros sumergidos en agua con hielo.
- 2) Agítese con lentejas de hidróxido de sodio lentamente hasta llevarse a pH de 7.0 (Mantenga los vasos de precipitados en baño de hielo)

Concentración:

- 1) Dejar reposar los vasos de precipitados una a dos horas, decantar el sobrenadante.
- 2) Pasar la suspensión a matraces grandes y dejar en reposo toda la noche.
- 3) Decantar el sobrenadante. Debe rendir de 1.0 a 1.5 litros de una suspensión lechosa.

13. Medio para Morfología de *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Mycobacterium* por Tsukamura (1967).

De un cultivo en medio de Loewestein- Jensen se transfiere al siguiente medio:

Fosfato de Sodio Monobásico	0.78 g	Agua Destilada	1.0 L
Fosfato de Sodio Dibásico	8.65 g	pH	7.8
Ácido Pírico	2.0 g		
Succinato de Sodio	2.0 g		

Distribuir 4 ml por tubo (17x170 mm), esterilizar a 121°C durante 20 minutos.

Se inocula con dos asadas, se agita vigorosamente e incuba a 28°C. Se observa durante 1, 2 y 3 días.

Los organismos crecen como una masa mucosa al fondo del tubo. Se toma el crecimiento (usar asa) se coloca en un portaobjetos, se seca a 45°C en una estufa, se fija con calor y se tiñe por Gram y Ziehl-Neelsen.

14) Medio de Schaal para diferenciación de cepas de *Nocardia asteroides* (Schaal, 1974).

Medio Base:

Fosfato de potasio monobásico	1.5 g
Sulfato de magnesio	0.5 g
Cloruro de calcio	0.1 g
Sulfato de amonio	5.0 g
Nitrato de potasio	0.5 g
agua destilada	1.0 L
Ajustar pH	7.5

Se adiciona a este medio, baja concentración de soluciones de los diferentes elementos de crecimiento y elementos traza; la concentración de las diferentes fuentes de carbono varía desde 1% a 0.002 M.

Es importante:

- Usar compuestos de alta pureza
- El material de vidriería, instrumentos, etc., deberán estar tanto química como bacteriológicamente descontaminados.
- Distribuir el medio en cantidades de 3 ml por tubo.
- La cepa de *Nocardia* debe ser bien homogeneizada y lavada, en forma esteril.

15. Medio "Ogawa Egg"

Fosfato de potasio monobásico 1%	100 ml
Glutamato de sodio 1%	100.0 ml
Huevos completos	200.0 ml
Glicerol	6.0 ml
Verde de malaquita 2% ac.	6.0 ml
pH	6.8

Distribuir 8 ml por tubo de 17 x 170 mm.

Dejar en cuña

Esterilizar a 95°C durante 60 minutos

16. Medio de Sauton (Modificado por Mordarska, 1968)

Asparagina	5.0 g
Fosfato de potasio monobásico	5.0 g
Glucosa	15.0 g
Hidrolizado de caseína	2.0 g
Ácido cítrico	1.5 g
Sulfato de magnesio	0.5 g
Sulfato de potasio	0.5 g
Citrato férrico amoniacal	Trazas
Agua destilada	1.0 L
pH	7.2

La glucosa se esteriliza por separado.

17. Medio de Sauton

Asparagina	4.0 g
Ácido cítrico	2.0 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄	0.5 g
Citrato Férrico Amoniacal	0.05 g
Glicerina	48.0 ml
Solución mínima de sales	1.0 ml
Agua destilada cbp	1.0 L
Ajustar a pH	7.2 - 7.4 con NH ₄ OH.

Solución mínima de Sales

ZnSO ₄	10.0 mg
CaCl ₂	50.0 mg
CoSO ₄	10.0 mg
Agua destilada cbp	100.0 ml

Conservar en una botella ambar en refrigeración.

18. Medio para Determinación de Descomposición de Caseína

A) "Skim Milk" en polvo	10.0 g
Agua destilada	100.0 ml
B) Agar	2.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Esterilizar por separado, mezclar y distribuir en placas. Se recomienda usar placas divididas en 4 compartimientos; para realizar 4 pruebas en una sola placa. 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.

18. Medio para Determinación de Descomposición de Xantina, Hipoxantina y Tirosina

A) 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 nutriente.

B) Agar Nutriente:

Peptona	5.0 g
Extracto de carne	3.0 g
Agar	15.0g
Agua destilada	1.0 L
pH	7.0

La mezcla se deja enfriar a 50°C y después se distribuye 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.

20. Medio para Determinación de Descomposición de Hipurato (Caldo)

Triptona	10.0 g
Extracto de carne	3.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
Glucosa	1.0 g
Fosfato de sodio dibásico	5.0 g
Ácido hipúrico (sal sódica)	10.0 g
Agua destilada	1.0 g

Esterilizar y dejar en reposo, aplicar un inóculo grande, incubar de 4 a 6 semanas

LECTURA: se toma 1 ml del sobrenadante con crecimiento y se mezcla con 1.5 ml de una solución de ácido sulfúrico 50% (v/v).

Se examina esta mezcla después de 4 horas.

Las pruebas positivas presentan cristales de ácido benzoico.

21. Medio para Determinación de Descomposición de Urea

Puede usarse caldo de úrea "BBL"

Inocular con crecimiento en caldo

Leer semanalmente hasta completar 4 semanas. Usar control.

22. Medio para Determinación de Descomposición de Esculina (Caldo Esculina)

Esculina	1.0 g
Citrato férrico	0.5 g
Peptona	10.0g
Cloruro de sodio	5 g
Agua destilada	1.0L

Se prepara caldo control, el cual no tiene esculina, se inocula con algunas gotas de crecimiento en caldo. Se observa por 4 semanas.

En la reacción positiva existe ennegrecimiento del caldo

23. Medio para Determinación de Resistencia a la Lisozima

A) Caldo glicerol

Peptona	5.0 g
Glicerol	70.0 g
Agua destilada	1 L

B) Preparación de la Lisozima

Lisozima	100 mg
Solución de Ácido Clorhídrico	100 ml

Disolver y esterilizar por filtración.

Mezcla:

95 ml caldo glicerol esteril, 5 ml lisozima esterilizada por filtración. Se distribuye en tubos en forma estéril. Se deben preparar tubos con medio control: caldo glicerol sin lisozima.

Inóculo: Una gota de cultivo en caldo. Incubar y observar hasta después de 4 semanas.

Prueba Positiva: si hay crecimiento en los dos tubos (tubo con lisozima y sin lisozima).

Prueba Negativa: si no hay crecimiento o es muy pobre en el medio con lisozima y grueso en el tubo control.

24. Medio para Determinación de Acidificación de Carbohidratos

Medio Base:

Fosfato de amonio dibásico	1.0g
Ácido clorhídrico	0.02g
Sulfato de magnesio .7H ₂ O	0.2g
Agar	15.0g
Agua destilada	1.0 L

Se agrega al medio 15 ml de una solución de púrpura de bromocresol al 0.04% para cada litro de medio base. El pH debe ser de 7.0. Se esteriliza.

Se agrega 0.5 ml de cada carbohidrato, (solución al 10%) esterilizado por filtración, cada tubo con 5 ml de medio base.

Los medios se inoculan con varias gotas de crecimiento en caldo. Se incuba por 4 semanas.

Reacción Positiva: color amarillo. Acidificación del medio.

Se recomienda el uso de los siguientes carbohidratos: arabinosa, fructosa, galactosa, inositol, lactosa, manitol, manosa, ramnosa, sorbitol, trealosa y xilosa.

25. Medio para Determinación de la Utilización de Citrato, Malonato y Succinato

Medio Base:

Cloruro de sodio	1g
Sulfato de magnesio $\cdot 7H_2O$	0.2 g
Fosfato de amonio dibásico	0.1g
Fosfato de potasio monobásico	0.5g
Agar	15g
Agua destilada	1.0 L
Indicador Rojo de Fenol 0.04% (p/v)	20ml/1000 ml de medio
Citrato de sodio	2.0g
Malonato de calcio	2.0g
Succinato de sodio	2.0 g

El pH del medio con citrato o succinato se ajusta a 6.8 antes de esterilizar, y el medio con malonato a 7.4.

Prueba Positiva: reacción alcalina.

26. Medio para Determinación de Hidrólisis de Almidón

Se utiliza el agar nutriente (Medio Base) del medio para determinación de descomposición de xantina, hipoxantina y tirosina.

Se le agrega 1g de almidón de papa, el cual se suspende en 5ml de agua destilada, se disuelve y se le agrega esta solución a 100ml de agar nutriente. Se esteriliza, se mezcla bien y se vacía en cajas de Petri.

Se siembra por duplicado y a los 5 días se lee la primera placa.

Se agrega etanol al 95% en el medio.

Reacción positiva: área claras alrededor y por debajo del crecimiento.

27. Determinación del Efecto de la Temperatura

Se siembra en tubos inclinados con Agar Bennett o Sabouraud por duplicado.

Uno se incuba a temperatura ambiente (control) y los demás a 10°C, 35°C, 45°C y 50°C.

28. Determinación de Supervivencia a 50°C

Los cultivos son sembrados en agar inclinado Bennett o Sabouraud. Rápidamente se calienta a 50°C en baño María y luego se transfiere a otro baño María de temperatura a 50°C; después de 8 horas los cultivos se enfrían y se incuban a 28°C durante 21 días.

29. Determinación de Degradación de Etilen-Glicol

Medio Base: agar Middlebrook 7H-10 al cual se le agrega 1% de etilen-glicol.

Se cultiva en caldo Middlebrook 7H-9, se incuba de 5 a 10 días a 37°C; de este crecimiento se prepara una dilución 1:10 en agua destilada con 0.01% de tween 80 y 0.25 ml de esta dilución se utiliza para inocular las placas de agar Middlebrook 7H-10 con 1% de etilen-glicol.

Las placas control no tienen etilen-glicol.

30. Medio de Long. (Medio sintético, químicamente definido)

Asparagina	5.0 g
Citrato de Amonio	5.0 g
KH ₂ PO ₄	3.0 g
Na ₂ CO ₃ (anhídrido)	2.4 g
NaCl	2.0 g
Mg SO ₄ 7H ₂ O	1.0 g
Citrato férrico amoniacal	0.05 gr
Glicerol	50.0 gr
Agua destilada cbp.	1.0 L

La fórmula original de Long, indica el uso de 3 gr. ya que es necesario agregar HCl para llevar el medio a pH 7.2, se agrega una cantidad suficiente de Na₂CO₃ para balancear el medio a pH 7.2, esto representa cerca de 2.4 g. de Na₂CO₃.

31. Medio de Agar para aislamiento de *Actinomadura*

Este medio a base de Agar blando, es útil para el cultivo de *A. madurae* de tejidos humanos.

Middlebrook 7H9 (difco)	0.5 g
Glicerol	0.2 ml
Agar Noble (Difco)	0.8 g
Polietilenglicol 4.000	4.0 g

Estos 4 ingredientes se disuelven en 87 ml de agua destilada, se calienta a 100°C, para disolver el agar. El medio se autoclavea a 121°C, durante 15 minutos, luego se deja enfriar a 56°C y en forma aséptica, le son agregados los siguientes ingredientes:

Suero de caballo (Gibco) inactivado por calor, y libre de Micoplasma	10.0 ml
Middlebrook OADC medio de enriquecimiento (Difco)	2.0 ml
Es conveniente agregar 100 UI de Penicilina G por ml (optativo)	

El pH final debe ser 7.2. El medio se vacía en placas de petri estériles, deben hacerse placas gruesas, esto permitirá una mayor duración del medio, durante el período de incubación. Se recomienda incubar a 37°C en aerobiosis y a 37°C en anaerobiosis.

32. Prueba de la susceptibilidad a la mitomicina C, para diferenciar el género *Rhodococcus* del género *Nocardia* y a *M. fortuitum* y a *M. chelonae* de micobacterias de crecimiento rápido (según Tsukamura).

Medio base del cultivo: medio "Ogawa Egg" a este medio se le agrega la mitomicina C, disuelta en agua destilada y agregada al medio antes de su esterilización. Se preparan concentraciones de 10 mg/ml, 100 mg/ml, 2.5 mg/ml y 1.25 mg/ml, control sin mitomicina.

La suspensión bacteriana para el inóculo se prepara con 1 mg peso húmedo/ml y se resuspende en una solución 0.1% (v/v) Tween 80 y 0.9% (p/v) de NaCl. En el medio se inocula, a partir de esta suspensión 0.02 ml. Se incuba a 37°C y 28°C (nocardia), durante siete días.

33. Medio para el cultivo de actinomicetos de crecimiento muy lento o pobre

Extracto de levadura	1.0 g
Extracto de carne	1.0 g
Bacto-casitona	2.0 g
D-glucosa	10.0 g
Agar	18.0 g/l
Agua destilada	1.0 L
pH	Ajustar a 7.3
Para mejores resultados se agrega Vitamina B ₁ 4 mg/L	
Preparación de varillas de vidrio cubiertas con parafina	

Limpiar en ácido las varillas. Dimensiones 1cm. de grosor. Sumergir las varillas ya limpias en parafina hasta la mitad o dos tercios. Retírelas, deje que la parafina se solidifique. Las varillas de vidrio así preparadas se pueden guardar en alcohol metílico.

Se utiliza caldo Czapek o de MacClung, (1960).

Las varillas se introducen en el medio líquido y se incuban a 37°C durante 7 a 20 días. La suspensión de suelos se inocula en el medio líquido. El crecimiento se observa alrededor de la varilla, colonias blancas, amarillas, marrones o rosadas, a nivel de la superficie del caldo. El crecimiento se siembra en medios BHI, Sabourand o nutriente con agar y en placa de Petri. Se incuban a 37°C durante dos a tres semanas.

34. Medio de Butcher-Conn en agar. Para aislamiento de Nocardia desde suelo

Extracto de Levadura	2.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
Glicerol	5.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1.0 L
pH	7

PREPARACIÓN DE COLORANTES MÁS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO DE LOS ACTINOMICETALES

TINCIÓN:GRAM

Cristal Violeta

A) Cristal violeta	2.0 g
Alcohol etílico	20.0 ml

B) Oxalato de Amonio	0.8 g
Agua destilada	80.0 g

Se mezcla las soluciones A y B y se dejan reposar 24 horas. Se filtra a través de papel y se vacía a frascos-gotero.

Lugol

Yodo	1.0 g
Yoduro de potasio	2.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Se disuelve los sólidos en 25 ml de agua destilada y después se agrega la restante.

Alcohol-Acetona

Alcohol etílico 95%	100.0 ml
Acetona	100.0 ml

Safranina

Solución Madre:

Safranina O	2.5 g
Alcohol etílico 95%	100.0 ml
Solución de Trabajo:	
Solución madre	10.0 ml
Agua destilada	90.0 ml

TINCIÓN:ZIEHL-NEELSEN (Modificado por Gordon y Smith, 1955)

Fucsina Fenicada

A) Solución alcohólica Saturada de Fucsina:	
Fucsina básica	1.0 g
Alcohol metílico absoluto	10.0 g
B) Solución acuosa de fenol al 5%	90.0 ml

Alcohol Ácido

Ácido clorhídrico Concentrado	3.0 ml
Alcohol etílico 95%	97.0 ml

Azul de metileno

Azul de metileno	0.5 g
Ácido acético glacial	0.5 ml
Agua destilada	100.0 ml
Agite y filtre dos veces.	

TINCIÓN DE PARED CELULAR (Welshimer y Robinow, 1949)

Fluido de Bouin

Solución acuosa saturada de ácido pícrico	75.0 ml
Formol	25.0 ml
Ácido acético glacial	5.0 ml

Azul Victoria

Azul victoria 4R	0.1 g
Etanol al 70%	100.0 ml

TINCIÓN DE NUCLEO (Robinow, 1945)

Fluido de Schaudin

Etanol absoluto	100.0 ml
Cloruro de mercurio acuoso saturado	200.0 ml

Colorante de Giemsa

2 a 3 gotas de solución de Giemsa (por ejemplo R66 de Gurr) por mililitro de buffer de Fosfatos.

Buffer de Fosfatos

Fosfatos de sodio dibásico anhidro	5.447 g
Fosfato de potasio monobásico	4.752 g
Agua destilada	1.0 L

TINCIÓN DE LÍPIDOS (Burdon, 1946)

Negro Sudán

Negro Sudán B	0.3 g
Alcohol etílico 70%	100 ml

Mezclar bien por agitación a intervalos, dejar reposando toda la noche y filtrar si es necesario.

TINCIÓN ALCOHOL ÁCIDO RESISTENTE SEGUN KINYOUN

Carbol Fucsina

Fucsina básica	4.0 g
Etanol 95%	20.0 ml
Fenol (cristales)	8.0 g
Agua destilada	1.0 L

Alcohol Ácido

Ácido clorhídrico concent.	1 a 3 ml
Etanol 95%	97 a 99 ml

Azul de Metileno

Azul de metileno	0.3 g
------------------	-------

Agua destilada 100.0 ml

TINCIÓN DE MICOBACTERIAS CON AURAMINA- RODAMINA (Truant, 1962)

Auramina- Rodamina (Colorantes Fluorescentes)

Auramina	1.5 g
Rodamina	0.75 g
Glicerol	75.0 ml
Fenol	10.0 g
Agua destilada	50.0 ml

Conviene que los colorantes se mezclen bien con el fenol y 25 ml de agua destilada. Después se agrega el resto del agua y el glicerol.

Se mezcla bien utilizando un agitador magnético. Si lo desea clarifique la solución por filtración con lana de vidrio.

La solución se conserva por algunos meses a temperatura ambiente o 4°C.

Alcohol Ácido

0.5% Ácido Clorhídrico en Alcohol Etilico 70° GL.

Permanganato de Potasio Solución Acuosa de Permanganato de potasio al 0.5%.

TÉCNICAS DE TINCIÓN

1. TINCIÓN GRAM

A. Reactivos:

- a) Cristal Violeta acuoso 1%
- b) Lugol
- c) Alcohol-Acetona
- d) Safranina Acuosa 2%

B. Procedimiento:

1. Preparar el frotis y fijarlo con calor
2. Tiña con cristal violeta durante 1 minuto
3. Lavar
4. Tiña con lugol fresco durante 1 minuto
5. Lave con agua corriente
6. Decolore con alcohol-acetona alrededor de 5 segundos
7. Lave con agua del chorro
8. Contraste con safranina, 30 segundos
9. Seque, examine con el objetivo de inmersión.

C. Resultados:

Los organismos Gram positivos se tiñen de púrpura, los organismos Gram negativos se tiñen de rojo.

D. Método Rápido:

- 1) Prepare el frotis, fíjelo con calor y mientras permanece caliente deje correr el Cristal Violeta sobre él.
- 2) Decolore inmediatamente
- 3) Lave brevemente
- 4) Contraste 5 segundos con safranina, lave y seque.

2. TINCIÓN ÁCIDO RESISTENTE (Método Ziehl-Neelsen modificado por Gordon y Smith, 1955)

A. Reactivos:

- a) Solución alcohólica saturada de fucsina fenicada.
- b) Alcohol Ácido
- c) Azul de Metileno

B. Procedimiento:

1. Prepare el frotis y seque con aire
2. Sumérjalo en fucsina fenicada, caliente sin que hierva por 5 minutos.
3. Lave con agua corriente
4. Sumérjalo en alcohol ácido
5. Lave rápidamente con agua corriente
6. Contraste con azul de metileno.

C. Resultados:

Los organismos alcohol-ácido-resistentes se tiñen de rojo, otros de azul.

3. TINCIÓN DE PARED CELULAR (Webb, 1954)

A. Reactivos:

- a) Solución Acuosa de Ácido Tánico al 5.0 %
- b) Solución Acuosa de Cristal Violeta al 0.5 %
- c) Solución Acuosa de Rojo Congo al 0.5 %

B. Procedimiento:

- 1) Prepare al frotis y seque con aire
- 2) Póngalo en ácido tánico de 30 minutos a 1 hora
- 3) Lave
- 4) Tiña con Cristal Violeta de un minuto y medio a dos
- 5) Lave
- 6) Decolore con Rojo Congo de 2 a 3 minutos

7) Lave y seque.

C. Resultados:

Las paredes celulares y septos se tiñen de violeta. Los resultados pueden ser mejorados adicionando una capa fina de Rojo Congo a un portaobjetos calentado a 50°C.

4. TINCIÓN DE PARED CELULAR

(Welshimer y Robinow, 1949)

A. Reactivos:

- a) Fluido de Bouin
- b) Azul Victoria 4R

B. Procedimiento:

- 1) El agar con el crecimiento es colocado hacia abajo sobre un cubreobjetos
- 2) Fije en fluido de Bouin durante 45 minutos
- 3) El agar es despegado y el cubreobjetos enjuagado
- 4) Tiña con Azul Victoria 4R
- 5) Enjuague, seque y examine.

C. Resultados:

Las paredes celulares y las membranas plasmáticas se tiñen de azul.

5. TINCIÓN DE PARED CELULAR Y SEPTOS (Robinow y Murray, 1953 Dubos, 1949)

A. Reactivos:

- a) Solución de Ácido Ósmico 2.0 %
- b) Fluido de Bouin
- c) Ácido Tánico al 5.0 %
- d) Cristal Violeta 0.02 %

B. Procedimiento:

- 1) Preparar el frotis y fijarlo con vapores de ácido ósmico durante 3 a 5 minutos
- 2) Sumérjalo en Fluido de Bouin durante 60 minutos
- 3) Lave bien, use con sumo cuidado, agua corriente
- 4) Se deja actuar a continuación una solución de ácido tánico durante 20 a 30 minutos colocando el porta- objetos boca abajo para evitar la acumulación de precipitado.
- 5) Se lava muy bien con agua corriente
- 6) Se colorea con Cristal Violeta muy diluído durante 5 a 10 segundos.
- 7) Se monta en agua o solución diluída de colorante y se observa con objetivo de inmersión.

6. TINCIÓN DE PARED CELULAR Y SEPTOS (Robinow y Murray, 1953)

A. Reactivos:

- a) Ácido Ósmico 2.0 %
- b) Solución Acuosa Saturada de bicloruro de Mercurio
- c) Solución Acuosa de Azul Victoria B o 4R al 0.05%

B. Procedimiento:

- 1) Preparar el frotis y fijarlo con vapores de ácido ósmico durante 3 a 5 minutos
- 2) Se trata con solución de bicloruro de mercurio durante 5 minutos
- 3) Se colorea con Azul Victoria durante 20 a 40 segundos
- 4) Se lavan las preparaciones, se montan en agua o solución diluída de colorante
- 5) Se sella con cera-parafina y se observa con objetivo de inmersión.

7. TINCIÓN SIMULTANEA DE NÚCLEOS, SEPTOS Y PARED CELULAR (Cassel, 1951)

A. Reactivos:

- a) Ácido Ósmico 2.0 %
- b) Ácido Clorhídrico 1N
- c) Fucsina 0.10 %

B. Procedimiento:

- 1) Preparar el frotis y fijarlo con vapores de ácido ósmico durante 3 a 5 minutos
- 2) Hidrolizar durante 10 a 12 minutos con ácido clorhídrico
- 3) Lave con agua corriente
- 4) Teñir con fucsina al 0.10% durante 5 minutos
- 5) Lave con agua corriente
- 6) Vuelva a teñir con fucsina durante 5 a 10 segundos. Lavar, secar y observar por inmersión.

8. TINCIÓN DE NÚCLEO (Robinow, 1945)

A. Reactivos:

- a) Solución Acuosa de Tetraóxido de Osmio 2.0 %
- b) Fluído de Schaudin
- c) Ácido Clorhídrico 1N
- d) Colorante de Giemsa
- e) Buffer de Fosfatos.

B. Procedimiento:

- 1) Exponga un cuadro de agar con crecimiento fino, a vapor de tetraóxido de osmio durante 2 a 3 minutos (5 ml de tetraóxido de osmio en cajas selladas para cubrir 3 capas de perlas de vidrio)
- 2) Coloque el cuadro hacia abajo sobre un portaobjetos, remueva el agar, levántelo y seque con

aire la capa sobre el portaobjetos.

- 3) Fije en fluido de Schaudin 5 minutos, flotando el portaobjetos con la cara de abajo sobre la superficie
- 4) Lave con agua abastecida con alcohol al 70%
- 5) Colóquelo en ácido clorhídrico a 60°C durante 10 minutos
- 6) Lave con agua corriente y enjuague con agua destilada
- 7) Tiña con colorante Giemsa, 30 minutos a 37°C
- 8) Lave y monte con agua para su examen inmediato

C. Resultados:

Los materiales cromatínicos se tiñen de azul violeta

9. TINCIÓN “NUCLEAR” (Webb, Clarck y Chance, 1954)

A. Reactivos:

- a) Solución Acuosa de Cristal Violeta 1% (pH 3.0 a 6.0)
- b) Cloruro Mercúrico 1%
- c) Solución de Nigrosina 5%, pH 3.5.

B. Procedimiento:

- 1) Teñir con Cristal Violeta
- 2) Aplicar el mordente cloruro mercúrico de 10 a 15 segundos
- 3) Decolorar con nigrosina

C. Resultados:

Los gránulos metacromáticos se tiñen de violeta

10. TINCIÓN DE NÚCLEOS (Piekarski, Robinow, Murray, 1953 Dubos, 1949 Robinow, 1942 Robiniow, 1949)

A. Reactivos:

- a) Solución de Ácido Ósmico al 2.0 %
- b) Metanol 70.0 %
- c) Ácido Clorhídrico 1N
- d) Colorante Giemsa (1 gota por ml de agua).

B. Procedimiento:

- 1) Se prepara el frotis y se coloca dentro de un recipiente cerrado para fijarlo con vapores de ácido ósmico durante 3 minutos
- 2) Aún húmedos se les sumerge en etanol. (Puede dejarse el tiempo deseado sin inconveniente)
- 3) Cuando se desea colorear se retira del alcohol y se lava con sumo cuidado con agua destilada
- 4) Se efectúa la hidrólisis con ácido clorhídrico durante 10 a 20 minutos a 60°C
- 5) Se lava con agua corriente suavemente
- 6) Se colorea con solución de Giemsa durante 20 min.

7) Se lava

8) Se montan las preparaciones con una pequeña gota del colorante diluido y una vez adherido con una muy delgada capa de líquido de interposición, se bordea con una mezcla fundida de cera-parafina

9) Se observa con objetivo de inmersión

11. TINCIÓN DE LÍPIDOS (Burdon, 1946)

A. Reactivos: a) Negro Sudán B b) Xileno c) Solución acuosa de Safranina 95%.

B. Procedimiento:

- 1) Preparar el frotis, fijar con calor
- 2) Cubrir totalmente con Negro Sudán, rellenando si llega a secarse, dejar 15 minutos
- 3) Secar con papel filtro
- 4) Enjuagar con xileno, secar con papel filtro
- 5) Teñir con safranina durante 10 segundos
- 6) Lavar, secar y examinar

C. Resultados: Los lípidos se tiñen de azul, negro o gris acerado. Las células de rojo.

12. TINCIÓN ALCOHOL - ÁCIDO RESISTENTE (Kinyoun)

A. Reactivos:

Carbol Fucsina

Fucsina básica 4.0 g

Etanol 96° 20.0 ml

Fenol 8.0 g

Agua destilada 1.0 L

b) Alcohol Ácido (HCl al 3 % en Etanol 95°)

c) Azul de Metileno (3% en agua dest.)

B. Procedimiento:

- 1) Preparar el frotis y fijarlo con calor
- 2) Cubra con carbol fucsina durante 2 minutos. (No es necesario calentarlo)
- 3) Lave con agua destilada y decolore con alcohol ácido, gota a gota, hasta que el alcohol ácido caiga sin color. Este paso es crítico para obtener una buena coloración
- 4) Lave con agua
- 5) Tiña con azul de metileno durante 20 a 30 segundos
- 6) Lave, seque y observe.

C. Resultados: Los organismos alcohol alcohol-ácido-resistentes se tiñen de rojo, los otros de azul.

NOTA: Existe una modificación de este método que se recomienda para Actinomicetos. Utiliza el azul de metileno al 2.5% en etanol 95%.

Se tiñe con carbol fucsina 3 minutos, se decolora con alcohol ácido de 5 a 10 segundos y se aplica el azul de metileno 3 segundos.

13. TINCIÓN DE MICOBACTERIAS CON AURAMINA-RODAMINA (Truant, 1962)

A. Reactivos:

a) Auramina	1.5 g
b) Rodamina	0.75 g
c) Glicerol	75.0 ml
d) Fenol	10.0 g
e) Agua destilada	50.0 ml

Conviene que los colorantes se mezclen bien con el fenol y 25 ml de agua destilada. Después se agrega el resto del agua y el glicerol, se mezclan bien utilizando un agitador magnético. Se puede clarificar la solución por filtración con lana de vidrio. La solución se conserva por algunos meses a 4°C. Alcohol ácido (HCl al 0.5% en etanol de 70°) Permanganato de Potasio (0.5% en agua)

B. Procedimientos:

- 1) Prepare el frotis y fíjelo con calor
- 2) Tiña con auramina-rodamina durante 15 minutos a temperatura ambiente ó 37°C.
- 3) Lave con agua destilada
- 4) Decolore con alcohol ácido durante 2 a 3 minutos
- 5) Llène el frotis con permanganato de potasio y déjelo actuar de 2 a 4 minutos
- 6) Lave bien con agua destilada
- 7) Lave, seque y examine

14. EXTRACCIÓN CON PIRIDINA DE ALCOHOL-ÁCIDORESISTENTE (Beaman, 1973)

A. Uso:

Sirve para distinguir la alcohol-ácido-resistente débil o variable presente en *Nocardia* de la de *Mycobacterium*

B. Cultivo:

En BHI o en agar Middlebrook 7H con glicerol al 10%

C. Procedimiento:

- 1) Preparar el frotis, secarlo al aire y fijarlo durante 30 minutos en glutaraldehído al 3 % en buffer de Ryter-Kelleberger (Ryter, 1978) con pH de 6.5
- 2) Lavar con agua desionizada y secar

- 3) Realizar la extracción en piridina a temperatura ambiente durante 4 horas
- 4) Teñir con el método de Kinyoun para alcohol-ácidoresistente.

BIBLIOGRAFÍA

- Beaman, BL, Gershwin ME, Almed A, Scates SM, Deem DA 1982. Response of CBA/N x DBA2/F1 mice to *Nocardia asteroides*. *Inf and Imm.* 35 1: 111.
- Bennet JE; Jennings AE 1978. Factors influencing susceptibility of *Nocardia* species to trimethoprim- sulfamethoxazole. *Antimicrob. Ag and Chemother.* 13 4: 624.
- Bjorvatn B Closs O Harboe M Dronvall G 1980. Comparative studies of antigen-21 in *Mycobacterium* and *Nocardia* species. Possible taxonomic relationship with *Mycobacterium leprae*. *Inf and Imm.* 30 2: 413.
- Bojalil LF Cerbón J. 1959. Schema for the differentiation of *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis* *J Bacteriol.* 78 (6) 33-40.
- Burdon KL 1946. Fatty material in bacteria and fungi revealed by staining drien, fixe slide preparations. *JBacteriol.* 52:665-678.
- Bradsher RW Monson TP Steele, RW 1982. Brain abscess due to *Nocardia caviae*. Report of a fatal outcome associated with abnormal phagocyte funtion. *Am J Clin Pat.* 78 1: 124.
- Conde C Melendro EI Fresan M Ortíz-Ortíz, L. 1982. *Nocardia brasiliensis* mycetoma induction and growth cycle. *Inf and Imm.* 38: 1291.
- Davissci C Beaman BL 1980. Interaction of *Nocardia* with rabbit alveolar macrophages. Association of virulence, viability, ultrastructural damage. *Inf. and Imm.* 28: 610.
- Davissci C Beaman BL 1980 Interaction of *Nocardia asteroides* with rabbit alveolar macrophages. Effect of growth phase and viability on phagosome-lysosome fusion. *Inf. and Imm.* 29: 24.
- Deem DA Harrington DD 1980. *Nocardia brasiliensis* in a horse pneumonia and pleuritis. *Cornewell Vet.* (70) 4: 321.
- Deem RL Beaman BL Gershwin ME 1982. Adoptive transfer of immunity to *Nocardia asteroides* in nude-mice. *Inf. and Imm* 38: 914.
- Filice GA Beaman BL Krick JA Remington JS 1980. Effect of human neutrophils and monocytes on *Nocardia asteroides*. Failure of Killing despite occurrence of the oxidative metabolism. *J Infect Dis.* 142: 432.
- Filice GA Remington JS Beaman BL 1980. Effects of activated macrophages on *Nocardia asteroides*. *Inf and Imm.* 27: 843.

- Goodfellow M Minnikin DE Todd C Alderson G Minnikin SM, Collins MD 1982. Numerical and chemical classification of *Nocardia amarae*. J Gen Microbiol (Jun; 128 (Pt 6): 1.283.
- Gordon RE Barnett DA Mishra SK 1978. Some bits and pieces of genus *Nocardia*: *N. carnea*, *N. vaccinii*, *N. transvalensis*, *N. orientalis*, J Gen Microbiol. 109. 69.
- Khalili, A.H. (1982). Nocardial brain abscess. A case report. J Neurol 227: 115.
- Khuller GK Malhotra S Gupta R Trana AK 1981. Specific protein antigens of *Nocardia polychromogenes*. Indian J Exp Biol 19: 977.
- Koehne G Giles RC (1981). *Nocardia asteroides* abortion in swine, J Am Vet Med Assoc. 179: 478.
- Kronvall G Bjorvatn B (1980) Detection of antigen in *Nocardia caviae* cross-reacting with mycobacterial-antigen 21 in *Mycobacterium leprae* using a lepromatous leproma. Int J Leprosy 48: 260.
- Kubin, M.; Pekarek, J.; Suejcar, J.; Prochazk, B. 1981. In vitro cellular immuno-response to homologous and heteologous antigens in rabbits sensitized by 5 species of *Mycobacterium* and *Nocardia*. Inf and Imm. 33: 725.
- Kurup, V.P.; Scribner, G.H. 1981. Antigenic relationship among *Nocardia asteroides* immunotypes. Microbios 31: 25.
- Lingappa, L.G.; Lockwood, J.C. 1962. Chitin media for selective isolation and culture of Actinomycetes. Phytopathology 52:317-323
- Lissner GS Choromok E Ogrady R 1978. Endogenous intra-ocular *Nocardia asteroides* in Hodgkins disease. Am J Ophtalmol 86: 388.
- Melendro, E.I.; Contreras, M. F.; García, A.M.; Ortíz-Ortíz, L. 1978. Changes in host resistance caused by *Nocardia brasiliensis* in mice. Cross protection against *Listeria monocytogenes*. Int Arch Allergy and Appl. Imm. 57: 74.
- McClung NM 1949. Morphological studies in the genus *Nocardia* III. Developmental studies. *Lloydia* (12) 3: 137-177.
- Mills VA, Cleary TG, Frankel L, Miner ME 1982. Central nervous system *Nocardia* infection. Clin. Ped. Philadelphia 21: 248.
- Mordarski M, Kaszen I, Szyba K, Thaez A. 1978. DNA homolgy on *Nocardia* and *Rhodococcus* strains. Arch Imm and Therap. Exp. 26: 271.

- Moreyra, H.; Martínez, P.P.; Villamar, V.M. 1980. Mastitis en ganado causado por *Nocardia asteroides*. Primer caso en Perú. *Zbl Vet.* 27: 22.
- Neubert U, Schaal KP 1982. Sporotrichoid infection due to *Nocardia brasiliensis*. *Huatarz* 30 10: 548.
- Orchard VA Goodfellow M 1980. Numerical classification of some named strain of *Nocardia asteroides* and related isolated from soil. *J Gen Microbiol.* Jun 118: 295.
- Ortíz-Ortíz L, López JS, Parks DE, Weigle WD 1979. Lymphocyte-B activation with an extract of *Nocardia brasiliensis*. *Inf. and Imm.* 25: 627.
- Pal M. 1982. Etiological significance of *Nocardia asteroides* in corneal ulcer of cattle. *Curr Sci.* 51: 533.
- Petersen DL, Hudson D, Sullivan K. 1978. Disseminated *Nocardia caviae* with positive blood cultures. *Arch. Int. Med.* 138:1.164.
- Salman MD, Bushnell RB, Pier HC. 1982. Determination of sensitivity and specificity of the *Nocardia asteroides* kintest for detection of bovine mammary infections caused. *Am J Vet Res.* 43:332.
- Shigidi MTA, Mirghani T, Musa MT. 1980. Characterization of *N. farcinica* isolated from cattle with bovine farcy. *Res Vet Sci.* 28:207.
- Tisdall PA, Anhalt JP. 1979. Rapid differentiation of *Streptomyces* from *Nocardia* by liquid-chromatography. *J Clin Microbiol.* 10: 503.
- Truant JP, Brett WA, Thomas W Jr. 1962. Fluorescence microscopy of tubercle bacilli stained with auramine and rhodamine. *Henry Ford Hosp Med Bull.* 10:287-296.
- Tsukamura M, Mizuno S, Tsukamura J, Tsukamura S. 1979. Comprehensive numerical classification of 369 strains of *Mycobacterium*, *Rhodococcus* and *Nocardia*. *Int J Syst Bacteriol* 29: 110.
- Tsukamura, M.; Ohta, M. 1980. *Nocardia farcinica* as a pathogen of lung infection. *Microbiol and Immunol.* 24: 237.
- Tsukamura M. 1981. Differentiation between the genera *Mycobacterium*, *Rhodococcus* and *Nocardia* by susceptibility to 5-fluorouracil. *J Gen Microbiol.* 125 Jul.: 205.
- Tsukamura, M. 1981. Test for susceptibility to mitomycin C as aid for differentiating the genus *Rhodococcus* from the genus *Nocardia*. *Microbiol and Immunol.* 25: 1197.

Se imprimió a los 447 años de la fundación de la ciudad de Santiago de los Caballeros de Mérida. Sede de la Ilustre Universidad de Los Andes.

Bajo el signo del Cabro (*Bafomet*) y en el año del Gallo.
A los 31 años de haberse realizado la *Primera Conferencia Internacional sobre la Biología de Nocardiae*. Mérida, Venezuela.

2005, Año de la realización de la *Tercera Conferencia Internacional de Nocardiae* 2005, Lyon, Francia.

Edición revisada y cuidada por sus autores.

Mérida, Abril del 2005