

## Infecciones producidas por *Bilophila wadsworthia*: anaerobio estricto, de lento crecimiento, difícil diagnóstico de laboratorio e importante resistencia contra los antimicrobianos

Carlos Quesada-Gómez

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

### RESUMEN

*Bilophila wadsworthia* es bacilo Gram negativo, asacarolítico, resistente a la bilis, catalasa positivo, ureasa positivo y capaz de reducir los nitratos a nitritos. Crece estimulado por la taurina, el cual es un derivado de cisteína y uno de los mayores solutos orgánicos en el humano. *Bilophila* ha sido aislada de diferentes procesos infecciosos como de apendicitis perforadas, otitis externa, abscesos cerebrales, abscesos de tejidos blandos, del líquido articular y de la sangre. Además, también se ha recuperado de materia fecal. Por lo que se ha visto vinculado en diferentes infecciones en el humano, pero al ser una bacteria anaerobia y de muy lento crecimiento es difícil de cultivar e identificar a nivel de laboratorio. Por otro lado, se ha demostrado que posee una importante resistencia contra los antibióticos tradicionalmente más utilizados en los hospitales para el tratamiento de infecciones bacterianas. Es por esto que es necesario realizar una revisión y un análisis de la importancia clínica de esta bacteria anaerobia para, en un futuro, realizar el correcto diagnóstico y conocer datos epidemiológicos en hospitales latinoamericanos y otras infecciones por bacterias anaerobias.

**Palabras clave:** *Bilophila wadsworthia*, resistencia a antibióticos, diagnóstico de laboratorio

### ABSTRACT

***Bilophila wadsworthia* Infections: Laboratory diagnoses of an antimicrobial resistant, slow growing, difficult, and important strict anaerobe**

*Bilophila wadsworthia* is an asaccharolytic, Gram-negative, bile-resistant, catalase-positive bacillus that is often urease positive and able to reduce nitrate to nitrite. Growth is stimulated by taurine, which is a cysteine derivative and major organic solute in humans. *Bilophila* have been recovered from specimens of patients with perforated appendicitis, otitis external, brain abscesses, soft tissue abscesses, from joint fluid, and from blood. In addition, *Bilophila* has been isolated from fecal material. This bacterium has been linked in various infections in humans, but it is an anaerobic bacteria with slow growth, making it difficult to cultivate and identify in the laboratory. It is also worth noting that *Bilophila* has significant resistance to antibiotics traditionally used in hospitals for the treatment of anaerobic infections. These reasons make it necessary to review and analyze the clinical significance of this anaerobic bacteria, to make the correct future diagnoses, and to acquire and report epidemiologic data from Latin-American hospitals on this and other anaerobic infections.

**Autor para correspondencia:** : Carlos Quesada Gómez. Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, 2060, San Pedro, Montes de Oca, San José, Costa Rica

**Recibido:** el 26 de marzo de 2012. **Aceptado para publicación:** el 11 de julio de 2012

Este artículo está disponible en <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb122325.pdf>

**Key words:** *Bilophila*, anaerobic infections, antibiotic resistance

## INTRODUCCIÓN

*Bilophila wadsworthia* es un bacilo Gram negativo, anaerobio, asacarolítico, ureasa positivo, resistente a bilis y con una reacción de catalasa fuertemente positiva, la cual es característica de este microorganismo. Se ha descrito que, aproximadamente, el 75% de las cepas son ureasa positiva (1,2).

Fue reportado por primera vez en pacientes con apendicitis gangrenosa o perforada y es el tercero más común de los anaerobios aislados de tales pacientes, usualmente en infecciones polimicrobianas (2,3). Debido a que fue inicialmente aislado de estos pacientes, se ha asumido que el hábitat natural de *Bilophila* sp. es el tracto gastrointestinal (4). Este microorganismo también ha sido ocasionalmente aislado de cavidad oral y vagina (2).

*B. wadsworthia* ha sido aislado de muestras clínicas asociadas con gran variedad de infecciones (5), incluso abscesos escrotales, abscesos hepáticos, osteomielitis mandibular, hidradenitis supurativa axilar, empiema pleural, fluido pericardial, otitis externa, abscesos cerebrales, sangre, gangrena de Fournier, endometritis, descarga vaginal, y abscesos anal y perianal, proveyendo crecimiento evidente y suficiente para ser considerado un patógeno clínicamente significativo (1,6-8).

## MECANISMOS DE VIRULENCIA

Se han descrito por lo menos cinco mecanismos de virulencia asociados a las especies de *Bilophila*. Semejante a *Bacteroides fragilis* y a diferencia de la mayoría de especies anaerobias, las cepas de *Bilophila* han mostrado que inducen formación de abscesos intra-abdominales cuando un cultivo puro de la bacteria es inyectado dentro de la cavidad peritoneal en ratones. Aunque la formación de abscesos es usualmente asociada a la presencia de un polisacárido capsular, *Bilophila*

no parece tener una cápsula, por lo tanto, el factor de virulencia específico responsable de la formación del absceso todavía no se conoce (5). Tal como la mayoría de las bacterias Gram-negativas, la especie de *B. wadsworthia* inducen la lisis de la pared celular de los amebocitos y promueven la actividad procoagulante de las células mononucleares humanas, ambas características son asociadas a la presencia de endotoxina. Sin embargo, la actividad de la endotoxina de las especies de *B. wadsworthia* que han sido analizadas fueron menores que las observadas en los típicos organismos Gram-negativos (9). Estudios in vitro adicionales han demostrado gran variabilidad en la habilidad de las cepas de *B. wadsworthia* para adherirse a células intestinales embrionarias humanas, aunque las características de adherencia de las cepas individuales fue estable durante múltiples pasajes (2).

Otros factores de virulencia son las proteínas reguladoras de hierro presentes en la membrana externa. Estas proteínas son expresadas por la bacteria cuando enfrenta condiciones de hierro disminuido, pero su contribución en la virulencia de este organismo aún es desconocida (10).

## IMPORTANCIA CLÍNICA Y EPIDEMIOLOGÍA

En Finlandia, se aisló *B. wadsworthia* de las pústulas periodontales de 3 de 16 perros en estudio. Las colonias fueron reconocidas inicialmente en placas de agar *Bacteroides-bilis-esculina* (BBE), pero no se pudo confirmar si estos microorganismos eran importantes en el proceso de la enfermedad (5).

En Suecia, se realizó cultivo de saliva (1.0 mL cada muestra) de 100 sujetos voluntarios saludables y cultivo de tampones vaginales de 100 mujeres asintomáticas atendidas en una clínica ginecológica para evaluación anual. Todos los cultivos fueron inoculados en agar BBE e incubados por un mínimo de 7 días. *B.*

*wadsworthia* fue aislado del 4% de las muestras de saliva y del 3% de las muestras vaginales (2,5).

También, se han reportado aislamientos de *Bilophila* en heces de sujetos sanos con una incidencia del 60% (3,5) y a partir de muestras del tracto gastrointestinal de cerdos (11).

Cultivos polimicrobianos de *B. wadsworthia* han sido reportados de sangre de pacientes que presentaban abscesos en hígado. Es probable que los aislamientos obtenidos de la muestra de sangre se hayan originado de la microbiota nativa del absceso hepático (5). Estos casos asociados con abscesos hepáticos son los primeros casos de bacteriemia documentados ocasionados por *B. wadsworthia* (12).

## DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

**Diagnóstico microbiológico.** El nombre *Bilophila* fue seleccionado por la gran resistencia y preferencia a la bilis, característica de este anaerobio (“bile-loving”), y esto no es sorprendente, ya que esto explica la razón por la cual este microorganismo puede estar involucrado en casos de abscesos hepáticos polimicrobianos. Su presencia como miembro de la flora humana del tracto gastrointestinal y su recuperación previamente demostrada de muestras obtenidas de apendicitis también confirman y apoyan el papel de *B. wadsworthia* como agente causal en infecciones intra-abdominales (12).

*B. wadsworthia* requiere condiciones estrictamente anaerobias y factores suplementarios para un crecimiento *in vitro* óptimo; exhibe formación lenta de colonias, lo cual es otro aspecto característico de ella (4).

*B. wadsworthia* ha sido probablemente pasada por alto o identificada erróneamente debido a que crece lentamente en los medios para anaerobios de rutina, produciendo colonias pequeñas, translúcidas, poco características en platos de agar sangre en ambiente anaerobio. Una colonia puede ser fácilmente diferenciada en medios de agar BBE; sin embargo, éstas aparecen después de 3 días o más de incubación, y se va a

observar como una colonia transparente con un centro negro debido a la precipitación de sulfuro ferroso, que ocurre por la producción de sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) por parte del microorganismo. *B. wadsworthia* es incapaz de hidrolizar la esculina. En áreas en las cuales el inóculo es espeso, el precipitado negro es visible en el agar BBE subyacente al crecimiento (1,7). A diferencia de otros géneros como *Desulfovibrio* y *Bacteroides* productoras de sulfuro, *B. wadsworthia* no es reductora de sulfatos (5); sin embargo, puede utilizar sulfito y algunos sulfonatos; además, se ha visto que es capaz de producir el pigmento desulfovirdina al igual que *Desulfovibrio*; sin embargo, en *B. wadsworthia* se presenta como un positivo débil (7,13).

Otra característica o rasgo importante de las especies de *B. wadsworthia* es la reacción de catalasa fuertemente positiva observada utilizando peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3%, que es aplicado a varias colonias transferidas a un portaobjetos (2,14). Sólo algunos otros pocos anaerobios, realmente pocos, como el grupo *B. fragilis*, *Propionibacterium acnes*, *Actinomyces viscosus*, entre otros, son catalasa positivos, sin embargo, ninguno muestra la rápida y también explosiva evolución de burbujas exhibida por cepas de *Bilophila* sp. Esta característica fue muy importante en el reconocimiento temprano de este organismo como único (14).

Además de lo anterior, también tiene la habilidad de reducir nitratos a nitritos. Entre otras características, está la estimulación de su crecimiento con piruvato y su incapacidad para fermentar carbohidratos. *B. wadsworthia* es tolerante a la bilis, no tiene movilidad, es indol negativo, no produce esporas y es anaerobio obligado. Asimismo, la mayoría de las cepas producen la enzima fosfatasa ácida (1,7).

Los aspectos bioquímicos de cada especie bacteriana son muy útiles para su identificación en el laboratorio; no obstante, debido a que este microorganismo es asacarolítico (no fermenta carbohidratos), es necesario hacer uso de

diversas pruebas bioquímicas necesarias para su identificación, tales como las expuestas en los párrafos anteriores: crecimiento en BBE, producción de sulfuro sin reducción de sulfatos, fuerte reacción ante el peróxido de hidrógeno, lento crecimiento en agaros no selectivos (hasta 5 días), muy tolerante a la bilis, indol negativo y sin movilidad. También, se puede hacer uso de las técnicas moleculares y de la cromatografía de gases, las cuales son metodologías que hacen posible una identificación definitiva con mayor especificidad y sensibilidad.

Los productos finales del metabolismo de *B. wadsworthia* detectados mediante cromatografía gas-líquido incluyen, principalmente, ácido acético, además de diferentes cantidades de ácido láctico y succínico (2,14).

**Diagnóstico molecular.** El rRNA 16S de una cepa ureasa-positiva de *B. wadsworthia* fue secuenciado y se construyó un oligonucleótido prueba complementario al rRNA secuenciado. Se pudo concluir que es posible utilizar este tipo de prueba para la identificación de esta bacteria en muestras clínicas y que se puede hacer uso de la amplificación del gen 16S rRNA mediante PCR y su posterior secuenciación para mejorar la identificación de la bacteria; pero esta última prueba no es práctica de realizar de manera rutinaria en la mayoría de los laboratorios clínicos de diagnóstico de hospitales latinoamericanos (15).

A pesar de la gran utilidad de las técnicas moleculares y de la cromatografía de gases para la identificación definitiva de *B. wadsworthia* y de otros microorganismos fastidiosos, éstas no siempre pueden aplicarse debido a que son metodologías que requieren equipos y recursos muy caros que no se encuentran al alcance de muchos laboratorios. Por estas razones, se prefiere conocer más acerca de la bioquímica de estos microorganismos para poder llegar a una identificación adecuada, utilizando los recursos mínimos de la mayoría de los laboratorios de

bacteriología (16).

## TRATAMIENTO Y RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

Muchas de las cepas de *Bilophila* son resistentes a la mayoría de los antibióticos betalactámicos, debido a la producción de la enzima  $\beta$ -lactamasa o, posiblemente, a la alteración de las proteínas de unión de la penicilina, lo cual hace que estos microorganismos, por su patogenicidad y resistencia contra antimicrobianos, sean considerados de interés clínico (4,17). Se ha observado resistencia significativa contra varios antibióticos, incluyendo imipenem, cefoxitina, penicilina G y otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos (18).

La producción de  $\beta$ -lactamasa generalmente es confirmada mediante el uso de discos de nitrocefina (Cefinas, cefalosporina cromogénica), que se colocan sobre el inóculo en placas de agar brucella suplementado, en el caso de *B. wadsworthia*, con piruvato (18-20). Mediante este tipo de análisis se ha encontrado que más del 85% de las cepas de *B. wadsworthia* son productoras de  $\beta$ -lactamasa (2).

La susceptibilidad de *B. wadsworthia* en los diversos estudios consultados es muy variable. En cuanto al imipenem, se pudo observar que algunas de las cepas de este microorganismo son sensibles a este antimicrobiano (21,22); sin embargo, en un estudio realizado en 2000 por Goldstein y otros colaboradores (23), el 90% de los aislamientos analizados presentaban una MIC (Concentración Inhibitoria Mínima)  $>32\mu\text{g/mL}$ , mostrando resistencia con un rango de MIC de  $0.06 - >32\mu\text{g/mL}$ .

También se ha observado resistencia en algunas de las cepas de *B. wadsworthia* contra amoxicilina/clavulanato con un rango de  $1 - 64\mu\text{g/mL}$  (24), cefoxitina de  $8 - 128\mu\text{g/mL}$  con un porcentaje de resistencia de aproximadamente 20%, ampicilina/sulbactam con  $0.06 - >32\mu\text{g/mL}$  y con 18% resistentes (21,23,25), piperacilina/tazobactam  $0.06 - >128\mu\text{g/mL}$  con 20% de

resistencia (23,26), ticarcilina /clavulanato con 0.06 - >128 µg/mL y ceftriaxona con un rango de MIC de 0.06 - >128 µg/mL (23,26). Además, se ha detectado un 3% de resistencia contra clindamicina (25).

La telitromicina es otro antibiótico que ha sido probado contra *B. wadsworthia* y se ha visto que esta bacteria presenta un 15% de resistencia con MIC de 0.25 - >64 µg/mL. Otros macrólidos inhiben el 4-33% de las cepas de *B. wadsworthia* (14,27). Asimismo, se ha reportado resistencia contra ertapenem en 20% de las cepas con MIC de 0.015 - >32 µg/mL (23,26).

*B. wadsworthia* es uno de los organismos que se toma en consideración cuando se aísla de muestras clínicas de pacientes con infecciones por bacterias anaerobias, para realizar pruebas de sensibilidad, debido no sólo a su resistencia tan variable, sino también a su patogenicidad (27, 28).

## CONCLUSIONES

Algunas bacterias anaerobias de lento crecimiento y resistentes a bilis, presentes en la microbiota nativa, se han visto involucradas en esta clase de infecciones y han empezado a tomar mayor importancia debido a sus patrones de resistencia contra antimicrobianos, tal como ha ocurrido con organismos como *B. wadsworthia*.

Debido a la dificultad para el aislamiento e identificación, en general, de los microorganismos anaerobios, para el tratamiento de este tipo de infecciones, en la mayoría de hospitales de Costa Rica y otras regiones de Latinoamérica, se prefiere la utilización de terapias empíricas (con clindamicina y cefalosporinas), las cuales no aseguran la resolución del cuadro, ya que existen algunas cepas bacterianas resistentes contra muchos de los antibióticos que generalmente se utilizan.

*B. wadsworthia* ha mostrado resistencia contra la mayoría de los antibióticos betalactámicos, debido a la producción de la enzima β-lactamasa, al igual que *Bacteroides*.

Sin embargo, también se ha observado resistencia significativa contra varios antibióticos, incluyendo imipenem, cefoxitina, amoxicilina /clavulanato, ampicilina /sulbactam, piperacilina /tazobactam, ticarcilina /clavulanato, y ceftriaxona. En el caso de cefoxitina y ampicilina/sulbactam, en los estudios consultados se observó muy buena actividad de estos antibióticos contra las especies de *Bacteroides*, contrario a *B. wadsworthia* que se mostró resistente, por lo que si se decide utilizarlos en infecciones que implican, además de *Bacteroides*, otras especies como *B. wadsworthia*, no se lograría la resolución del cuadro infeccioso producido por esta bacteria.

Estos patrones de resistencia que se han descrito confirman la importancia de reconocer la participación de estos microorganismos en infecciones, especialmente del área intra-abdominal. Además, la realización de pruebas de sensibilidad a antimicrobianos para conocer los patrones de resistencia también es de suma importancia, para asegurarle al paciente la resolución del cuadro clínico.

Debido a las características fastidiosas de microorganismos como los mencionados en esta revisión, para la determinación de los patrones de sensibilidad a antimicrobianos es necesario acudir a laboratorios especializados para obtener resultados mediante el uso de técnicas más específicas para el diagnóstico; existe una gran deficiencia de evidencias epidemiológicas de esta bacteria en hospitales latinoamericanos.

## REFERENCIAS

1. **Baron EJ, Curren M, Henderson G.** *Bilophila wadsworthia* isolates from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1882-4.
2. **Baron EJ.** *Bilophila wadsworthia*: a unique Gram-negative anaerobic rod. *Anaerobe* 1997; 3: 83-6.
3. **Laue H, Smits TH, Schumacher UK, Claros MC, Hartemink R, Cook AM.** Identification of *Bilophila wadsworthia* by specific PCR with targets the taurine: pyruvate aminotransferase gene. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 261: 74-9.
4. **Urbán E, Hortobágyi A, Szentpáli K, Nagy E.** Two intriguing *Bilophila wadsworthia* cases from Hungary. *J Med Microbiol* 2004; 53: 1167-9.

5. **Baron EJ, Citron DM.** Anaerobic Identification flowchart using minimal laboratory resources. *Clin Infect Dis* 1997; 25(2): S143-6.
6. **Finegold S, George WL.** Anaerobic Infections in Humans. Academic Press, San Diego, CA, EEUU. 1989.
7. **Jousimies-Somer H, Summanen P.** Recent taxonomic changes and terminology update of clinically significant anaerobic gram-negative bacteria (excluding Spirochetes). *Clin Infect Dis* 2002; 35(1): S17-21.
8. **Schumacher UK, Bless D, Plinkert PK, Laue H, Werner H.** *Bilophila wadsworthia* in ear infections: a report of tree cases. *Anaerobe* 1999; 5: 371-2.
9. **Mosca A, D'Alagni M, Del Prete R, De Michele GP, Summanen P, Finegold S., Miragliotta G.** Preliminary evidence of endotoxic activity of *Bilophila wadsworthia*. *Anaerobe* 1995; 1: 21-4.
10. **Avidan O, Kaltageser E, Pechatnikov I, Wexler H, Shainskaya A, Nitzan Y.** Isolation and characterization of porins from *Desulfovibrio piger* and *Bilophila wadsworthia* : structure and gene sequencing. *Arch Microbiol* 2008; 190: 641-50.
11. **McOrist S, Keller L, McOrist AL.** Search for *Lawsonia intracellularis* and *Bilophila wadsworthia* in malabsorption-diseased chickens. *Canadian J Veterin Res* 2003; 67: 232-4.
12. **Kasten MJ, Rosenblatt J, Gustafson DR.** *Bilophila wadsworthia* bacteremia in two patients with hepatic abscesses. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2502-3.
13. **Warren YA, Citron D, Merriam C, Goldstein EJC.** Biochemical Differentiation and Comparison of *Desulfovibrio* Species and Other Phenotypically Similar Genera. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4041-5.
14. **Jousimies-Somer HR, Summanen P, Citron DM, Baron E J, Wexler HM, Finegold SM.** *Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual*. 6th Ed. Belmont, CA: Star Publishing. 2002.
15. **Goldstein E, Citron DM, Warren Y, Tyrrell K, Vreni Merriam C, Fernandez H.** In vitro activity of Moxifloxacin against 923 anaerobes isolated from human intra-abdominal infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 148-55.
16. **Hunt S, Marina M, Citron DM.** *Bilophila wadsworthia* clinical isolates compared by polymerase chain reaction fingerprinting. *Clin Infect Dis* 1997, 25(2): S291-4.
17. **Wexler HM, Engel AE, Glass D, Li C.** In vitro activities of doripenem and comparator agents against 364 anaerobic clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4413-7.
18. **Molitoris D, Vaisanen ML, Bolaños M, Finegold SM.** In vitro activities of DX-619 and Four comparator agents against anaerobic bacterial isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1887-9.
19. **Summanen P, Wexler HM, Lee K, Becker S, Garcia MM, Finegold SM.** Morphological response of *Bilophila wadsworthia* to Imipenem: Correlation with properties of Penicillin-Binding Proteins. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 2638-44.
20. **Summanen P.** Comparison of effects of medium composition and atmospheric conditions on detection of *Bilophila wadsworthia*  $\beta$ -lactamase by Cefinase and Cefinase plus methods. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 733-6.
21. **Wexler H, Molitoris D, St. John S, Vu A, Read E, Finegold S.** In vitro activities of Faropenem against 579 strains of anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3669-75.
22. **Tanaka K, Mikamo H, Nakao K, Watanabe K.** In vitro antianaerobic activity of DX-619, a new des-fluoro(6) quinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3908-13.
23. **Goldstein E, Citron D, Merriam C, Warren Y, Tyrrell K.** Comparative in vitro activities of Ertapenem (MK-0826) against 1001 anaerobes isolated from human intra-abdominal infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2389-94.
24. **Molitoris E, Wexler HM, Finegold SM.** Sources and antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter gracilis* and *Sutterella wadsworthensis*. *Clin Infect Dis* 1997; 25(2): S264-5.
25. **Goldstein EJC.** Intra-abdominal Anaerobic Infections: Bacteriology and Therapeutic Potencial of newer antimicrobial Carbapenem, Fluoroquinolone, and Desfluoroquinolone therapeutic agents. *Clin Infect Dis* 2002; 35(1): S106-11.
26. **Barboza E, Solomkin J, Goldstein EJ, Castillo M, Alvarado R, Barboza A, Teppler H.** Nuevo agente betalactámico en el manejo de la sepsis intra-abdominal: estudio de fase III, doble ciego y randomizado del Ertapenem vs. Piperacilina/Tazobactam. *Revista de Gastroenterología del Perú* 2003; 23:192-8.
27. **Wexler H, Molitoris E, Molitoris D, Finegold S.** In vitro activity of Telithromycin (HMR 3647) against 502 strains of anaerobic bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47:467-9.
28. **Hecht DW.** Prevalence of antibiotic resistance in anaerobic bacteria: Worrisome developments. *Clin Infect Dis* 2004; 39:92-7.