



TESIS DOCTORAL

**IMPLICACIÓN DE LOS DESULFOVIBRIOS EN
LAS DIARREAS HEMORRÁGICAS PORCINAS**

MARTA CALDERÓN DOMÍNGUEZ

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

FACULTAD DE VETERINARIA

Conformidad de los directores:

Fdo: Dr. Santiago Vadillo Machota

Fdo: Dr. Gonzalo Palomo Guijarro

Fdo: Dra. M^a Isabel Igeño González

2017

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado, un esfuerzo total es una victoria completa”.

Mahatma Gandhi (1869-1948)

*A quienes me han sufrido,
A mi familia y seres queridos,
Gracias.*

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral no hubiera sido posible sin la contribución, orientación y apoyo de todos los que en estos años me dedicaron su tiempo y su paciencia. Sirvan estas líneas como disculpa y como muestra de mi más sentido agradecimiento.

En primer lugar, gracias a mis directores de tesis por toda su dedicación: a la Dra. Dña. M^a Isabel Igeño González, al Dr. D. Gonzalo Palomo Guijarro y en especial al Dr. D. Santiago Vadillo Machota por su confianza, por poner a mi disposición su sabiduría, animarme y ser mi faro en los momentos más oscuros, por enseñarme el valor de la tranquilidad, la paciencia y la perseverancia.

Hago extensivo mis agradecimientos al profesorado, al personal y a mis compañeros de la Facultad de Veterinaria de Cáceres, especialmente a las áreas de Bioquímica y Microbiología por toda su ayuda y cariño.

A Miguel Ángel Hurtado Preciado, a Victoriano Fernández Benito y Javier Velasco Diego, de la empresa de Zootecnia Análisis Clínicos Veterinarios S.L.P. (Salamanca), y a Luis Mateo del Pozo Vegas y María Luisa Martínez Sanz, de la empresa Facsis Consulting S.L. (Segovia), por su colaboración.

Al Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) de la Universidad Complutense de Madrid, en especial a Dr. D. Lucas Domínguez Rodríguez y a la Dra. Dña. Marta Pérez Sancho por su inestimable ayuda.

Por último, aunque no menos importante, gracias a mi familia y seres queridos por su apoyo incondicional y por animarme durante todo el camino. Gracias porque siempre me he sentido protegida, querida y afortunada de teneros a mi lado. Os quiero.

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
ABREVIATURAS.....	XIII
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. ORIGEN DE LAS PRIMERAS FORMAS DE VIDA.	3
1.2. LOS MICROORGANISMOS Y SU RELACIÓN CON EL OXÍGENO.	5
1.2.1. Derivados tóxicos del oxígeno.	6
1.3. BACTERIAS ANAEROBIAS ESTRUCTAS SULFATORREDUCTORAS (BASR). 7	
1.4. ESPECIES DEL ORDEN <i>Desulfovibrionales</i> DE INTERÉS EN MEDICINA HUMANA Y VETERINARIA.	11
1.4.1. Situación taxonómica de <i>D. fairfieldensis</i>	13
1.4.2. Género <i>Desulfovibrio</i>	15
1.4.2.1. Características generales.	15
1.4.3. Cultivo de las BASR.	16
1.4.4. Tolerancia al oxígeno.	22
1.4.5. Factores de virulencia.....	23
1.4.5.1. Efectos del sulfuro de hidrógeno sobre el tracto intestinal.....	23
1.4.5.2. Metilación del mercurio.	26
1.4.5.3. Acción de la endotoxina.	28
1.4.5.4. Derivados del lactato.	30
1.4.5.5. Otros posibles factores de virulencia.....	31
1.4.6. Poder patógeno de los desulfovibrios para el ser humano.	32
1.4.6.1. Abscesos y otros procesos purulentos.	33
1.4.6.2. Bacteriemias.	38
1.4.6.3. Los desulfovibrios y el sistema nervioso central.....	48
1.4.6.4. Periodontitis.	50

1.4.6.5.	Otras implicaciones	55
1.4.7.	Los desulfobios y su relación con el mundo animal.	58
OBJETIVOS.....		63
ESQUEMA DE TRABAJO		67
MATERIALES Y MÉTODOS.....		71
4.1.	MUESTRAS ESTUDIADAS.	73
4.1.1.	Recogida de muestras.....	73
4.2.	TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS.....	74
4.2.1.	Medios y condiciones de cultivo.....	74
4.2.1.1.	Medios de cultivo líquidos.....	74
4.2.1.2.	Medios de cultivo sólidos.....	75
4.2.1.3.	Condiciones de cultivo y aislamiento de las bacterias del género <i>Desulfobios</i>	76
4.2.2.	Examen de las colonias.....	78
4.2.3.	Estudio microscópico.....	79
4.2.4.	Técnica de la tinción de Gram.....	80
4.2.5.	Identificación mediante pruebas bioquímicas.....	81
4.2.5.1.	Prueba de la Desulfoviridina.....	82
4.2.5.2.	Producción de Ureasa, Reducción de Nitratos, Producción de Indol.....	83
4.2.5.3.	Prueba del Spot Indol.....	84
4.2.5.4.	Producción de Catalasa.....	85
4.2.5.5.	Producción de Sulfuro de Hidrógeno.....	86
4.2.5.6.	Movilidad.....	87
4.2.5.7.	Crecimiento en 20% de bilis.....	87
4.2.5.8.	Resistencia a los antimicrobianos.....	88
4.2.6.	Conservación de las cepas.....	89
4.2.7.	Curva de crecimiento bacteriano del género <i>Desulfobios</i>	90

4.3.	TÉCNICAS MOLECULARES.....	92
4.3.1.	Extracción de ADN cromosómico de las cepas aisladas del género <i>Desulfovibrio</i>	92
4.3.2.	Electroforesis de ADN.	92
4.3.3.	Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente (PCR).....	93
4.3.3.1.	Diseño de la técnica de PCR para la determinación de las especies del género <i>Desulfovibrio</i>	94
4.3.4.	Secuenciación de ADN.	96
4.3.5.	Análisis bioinformático.	96
4.4.	TÉCNICA MALDI-TOF MS.....	97
4.4.1.	Fundamento de la técnica MALDI-TOF MS.	97
4.4.1.1.	Aplicación de la técnica MALDI-TOF MS en bacterias del género <i>Desulfovibrio</i>	99
4.4.1.2.	Preparación de las muestras para su identificación mediante la técnica MALDI-TOF MS.	100
4.4.1.3.	Identificación de <i>Desulfovibrio</i> spp. mediante MALDI-TOF.	102
4.4.1.4.	Aportaciones a la base de datos BDAL Bruker Daltonics (Bremen, Alemania) y reidentificación bacteriana mediante la técnica MALDI-TOF.	103
4.5.	SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA.	104
4.5.1.	Concentración mínima inhibitoria.....	104
4.5.2.	Términos clave en sensibilidad antimicrobiana.	104
4.5.3.	Método de la microdilución en caldo.	105
4.5.3.1.	Preparación de las placas de microdilución en caldo.	106
4.5.3.2.	Inoculación e incubación de las bacterias del género <i>Desulfovibrio</i> en las placas de microdilución en caldo.	110
4.5.3.3.	Control de calidad de las placas de microdilución en caldo.....	110
4.5.3.4.	Lectura de resultados.....	111
4.5.4.	Actividad beta-lactamasa.	111
4.5.4.1.	Prueba cualitativa en placa.	112
4.5.4.2.	Cuantificación de la actividad enzimática.	113
4.5.4.3.	Prueba cualitativa en tubo.	114
4.5.4.4.	Determinación cuantitativa de la actividad beta-lactamasa.....	115
4.6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	117

RESULTADOS.....	119
5.1. AISLAMIENTO DE LOS DESULFOVIBRIOS.....	121
5.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS.....	127
5.2.1. Pruebas bioquímicas del género <i>Desulfovibrio</i>	127
5.2.2. Curva de crecimiento bacteriano del género <i>Desulfovibrio</i>	132
5.3. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES.....	136
5.3.1. Identificación de los aislados del género <i>Desulfovibrio</i> mediante secuenciación del gen ARNr 16S.....	136
5.3.2. Identificación de las especies del género <i>Desulfovibrio</i> mediante amplificación por PCR de genes específicos.....	140
5.4. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO <i>Desulfovibrio</i> MEDIANTE LA TÉCNICA MALDI TOF MS.....	143
5.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS MEDIANTE TÉCNICAS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA.....	147
5.5.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) e interpretación.....	147
5.5.2. Perfiles de resistencia.....	155
5.5.3. Identificación y análisis de expresión de beta-lactamasas.....	157
DISCUSIÓN.....	159
6.1. ETIOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA.....	161
6.1.1. Etiología.....	161
6.1.2. Epidemiología.....	163
6.2. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO.....	166
6.2.1. Caracterización de los aislados.....	166
6.2.1.1. Pruebas bioquímicas.....	166
6.2.1.2. Curva de crecimiento.....	169
6.2.2. Técnicas moleculares: secuenciación ARNr 16S y PCR.....	170
6.2.3. Identificación de las especies del género <i>Desulfovibrio</i> mediante la técnica MALDI-TOF MS.....	172

6.3.	SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA.	176
6.3.1.	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y <i>cut off value</i>	177
6.3.2.	Interpretación de los valores de CMI: cepas R, I y S.	177
6.3.3.	Sensibilidad a los antimicrobianos en relación al sistema de explotación.	186
CONCLUSIONES.....		189
BIBLIOGRAFÍA.....		193
ANEXOS		223

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Big Bang</i>	3
Figura 2.	BASR pertenecientes al dominio <i>Archea</i>	7
Figura 3.	BASR pertenecientes al dominio <i>Bacteria</i>	8
Figura 4.	Reducción del sulfato por parte de las BASR.....	9
Figura 5.	Interacción de las BASR con los ambientes anóxicos y subanóxicos.....	11
Figura 6.	Encuadre taxonómico actual de los desulfovibrios.....	12
Figura 7.	Especies y subespecies de mayor interés en medicina humana y veterinaria.....	13
Figura 8.	Esquema de trabajo para el estudio de las cepas aisladas del género <i>Desulfovibrio</i> obtenidas a partir del cerdo.....	70
Figura 9.	Hisopos con el medio de transporte de Amies empleados para recoger las muestras.....	74
Figura 10.	Medio de cultivo de agar sangre con cinco antibióticos.....	76
Figura 11.	Jarra de anaerobiosis e indicador de la atmósfera anaerobia.....	77
Figura 12.	Estufa de cultivo programada a 42 °C.....	78
Figura 13.	Cultivo puro de <i>D. fairfieldensis</i>	78
Figura 14.	Análisis de las colonias con el microscopio de contraste de fase.....	79

Figura 15.	Polimorfismo de las células bacterianas integrantes de las colonias formadas por los aislados de <i>D. fairfieldensis</i> tras ser examinadas mediante el microscopio de contraste de fase (40x).....	80
Figura 16.	Células bacterianas gramnegativas y polimórficas de las colonias formadas por los aislados de <i>D. fairfieldensis</i> tras ser teñidas con la tinción de Gram y examinadas con el microscopio óptico (100x).....	81
Figura 17.	Producción de desulfovirdina. Coloración roja.....	83
Figura 18.	Galería API <i>rapid</i> ID32A.....	84
Figura 19.	Prueba del Spot Indole: reacción negativa (rosa) y positiva (azul).....	85
Figura 20.	Reacción positiva a la prueba de la catalasa.....	86
Figura 21.	Producción de sulfuro de hidrógeno.....	87
Figura 22.	Estudio de la sensibilidad antimicrobiana. Método de difusión en disco.....	89
Figura 23.	Sistema de crioconservación Vibakstore.....	90
Figura 24.	Esquema de la técnica MALDI-TOF MS.....	99
Figura 25.	Esquema de la preparación de las muestras para su identificación mediante la técnica MALDI-TOF MS.....	102
Figura 26.	Placa de microdilución en caldo preparada con amoxicilina para la inoculación de las bacterias del género <i>Desulfovibrio</i>	109
Figura 27.	Procedencia de las muestras. Número de casos por provincia y porcentajes de cada Comunidad Autónoma.....	121
Figura 28.	Número de muestras recogidas (en %) por cada estación del año.....	122

Figura 29.	Raza/Régimen de explotación de los animales de los que se tomaron las muestras.....	123
Figura 30.	Edad de los animales muestreados en porcentajes.....	124
Figura 31.	Tipo de muestras recibidas.....	124
Figura 32.	Especies del género <i>Brachyspira</i> aisladas en los 79 casos. (San Juan, C., 2015).....	125
Figura 33.	Especies del género <i>Brachyspira</i> aisladas en cocultivo con desulfovibrios.....	127
Figura 34.	Curvas de crecimiento realizadas con el medio de cultivo BHI enriquecido.....	133
Figura 35.	Curvas de crecimiento realizadas con el medio de cultivo Mueller-Hinton.....	134
Figura 36.	Curvas de crecimiento realizadas con el medio de cultivo caldo Brucella.....	135
Figura 37.	Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos del gen ARNr 16S.....	138
Figura 38.	Análisis filogenético resaltando la posición de la cepa DS-1 respecto a otras especies del género <i>Desulfovibrio</i>	139
Figura 39.	Productos de amplificación, por PCR, de fragmentos del gen ARNr 16S de <i>D. fairfieldensis</i>	141
Figura 40.	Representación del número de cepas aisladas a partir de cerdo ibérico o blanco con respecto a los valores de CMI obtenidos para el metronidazol.....	155

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Antibióticos añadidos al medio de cultivo de agar sangre.....	76
Tabla 2.	Descripción de los oligonucleótidos utilizados como cebadores para la determinación de las especies del género <i>Desulfovibrio</i>	95
Tabla 3.	Antimicrobianos elegidos con sus disolventes y diluyentes necesarios para la preparación de las microdiluciones.....	108
Tabla 4.	Nº de cepas de cada especie del género <i>Brachyspira</i> aisladas en cocultivo con los desulfovibrios.....	126
Tabla 5.	Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas aisladas.....	128
Tabla 6.	Resultados de las pruebas bioquímicas efectuadas a las cepas de colección.....	131
Tabla 7.	Resultados de la PCR específica de especie de los aislados obtenidos.....	141
Tabla 8.	Resultados de la técnica MALDI-TOF para los aislados obtenidos a partir del cerdo ibérico.....	144
Tabla 9.	Resultados de la técnica MALDI-TOF para los aislados obtenidos a partir del cerdo blanco.....	145
Tabla 10.	Valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) para cada antimicrobiano empleado.....	148
Tabla 11.	CMIs de los antimicrobianos empleados y resultados de sensibilidad para las 33 cepas aisladas.....	151

Índice

Tabla 12.	CMIs de los antimicrobianos empleados y resultados de sensibilidad para las cepas de colección.....	152
Tabla 13.	Perfiles de resistencia obtenidos tras los ensayos de sensibilidad frente a 7 antimicrobianos, considerando como punto de corte CMI90.....	156
Tabla 14.	Perfiles de resistencia obtenidos tras los ensayos de sensibilidad frente a 7 antimicrobianos, considerando como punto de corte CMI75.....	157
Tabla 15.	Resultados de las pruebas bioquímicas y de la resistencia a los antimicrobianos de las cepas de <i>D. fairfieldensis</i> aisladas en el presente trabajo y cepa <i>D. fairfieldensis</i> ATCC 700045 tipo.....	166
Tabla 16.	Resultados de las pruebas bioquímicas y de la resistencia a los antimicrobianos de las cepas de <i>D. fairfieldensis</i> aisladas por Warren et al. (2005)	167
Tabla 17.	Resultados de las pruebas bioquímicas y de la resistencia a los antimicrobianos de las cepas de <i>D. fairfieldensis</i> aisladas por Pimentel, J.D. y Chan, R.C. (2007).....	167
Tabla 18.	Resultados de las pruebas bioquímicas y de la resistencia a los antimicrobianos de las cepas de referencia y las de <i>D.intestinalis</i> aisladas por Ichiishi, S. et al. (2010).....	168

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ORGANIZACIONES

ATCC: *American Type Culture Collection.* (Colección Americana de Cultivos Tipo).

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute.*

DSMZ: *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures.* (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares).

EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.* (Comité Europeo sobre Sensibilidad a los Antimicrobianos).

ESCMID: *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* (Asociación Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas).

OIE: *World Organisation for Animal Health.* (Organización Mundial de Sanidad Animal).

GENERAL

A: Adenina.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AMP: Adenosin monofosfato.

APS: Adenosina – 5´ fosfosulfato.

ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico.

ATP: Adenosín trifosfato.

BASR: Bacterias anaerobias estrictas sulfatorreductoras.

BBE: *Bacteroides Bile Esculine agar.*

BHI: *Brain Heart Infusion.*

Abreviaturas

BLAST: *Basic local alignment search tool.*

C: Citosina.

° C: Grado centígrado.

CO₂: Dióxido de carbono.

CMI: Concentración mínima inhibitoria.

DA: Agar *Desulfovibrio*.

dNTP: Desoxinucleótido trifosfato.

e⁻: Electrón.

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético.

FeS: Sulfuro ferroso.

G: Guanina

G: Unidades de fuerza G (Gravedad)

g: Gramo.

h: Hora.

H₂S: Sulfuro de hidrógeno.

IL: Interleucina.

λ: Longitud de onda.

l: Litro.

LPS: Lipopolisacárido.

M: Molaridad.

m/z: Relación masa/carga.

MALDI-TOF MS: *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass Spectrometry.*

NADH: Nicotinamina-adenina-dinucleótido reducido.

NCBI: *National center for biotechnology information.*

μl: Microlitro.

μm: Micrómetro.

μM: Micromolar.

μg: Microgramo.

mg: Miligramo.

ml: Mililitro.

Min: Minuto.

nm: Nanómetro.

O₂: Oxígeno.

O₃: Ozono.

P: Probabilidad.

Pb: Pares de bases.

PCR: Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente.

p/v: Relación peso/volumen.

RDP: *Ribosomal database project II.*

rpm: Revoluciones por minuto.

s: Segundos.

SIM: Medio de cultivo sulfito-indol-movilidad.

sp/spp: Especie/especies.

T: Timina.

TBE: Tampón Tris-Borato-EDTA.

Abreviaturas

U: Unidad de actividad enzimática.

u.f.c.: Unidad formadora de colonia.

USA: Estados Unidos de América.

UV: Luz ultravioleta.

v/v: Relación volumen/volumen.

ANTIMICROBIANOS

(Según las normas de publicación de *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*: JAC).

AMX: Amoxicilina.

AMC: Amoxicilina-ácido clavulánico.

CIP: Ciprofloxacina.

CLI: Clindamicina.

CTX: Cefotaxima.

IMI: Imipenem.

MTZ: Metronidazol.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. ORIGEN DE LAS PRIMERAS FORMAS DE VIDA.

Según los datos obtenidos por la sonda Planck de la Agencia Espacial Europea (ESA), el Universo nace tras la gran explosión de la materia compactada (fenómeno conocido como el *Big Bang*) hace 13.820 millones de años. A partir de ese instante comienza su expansión, fenómeno físico que sigue llevándose a cabo en los momentos actuales, desconociéndose cuándo finalizará (**Figura 1**).



Figura 1. *Big Bang*.

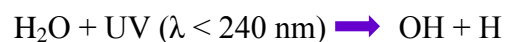
El Sol y sus Planetas tuvieron una génesis común hace unos 4.500 millones de años. En su origen, el Planeta Tierra mostraba un ambiente inhóspito, con una gran actividad volcánica y frecuentes impactos de meteoritos y otros elementos espaciales, que originaban una situación incompatible con la vida. Poco a poco el hábitat terrestre se atemperó y surgieron las condiciones idóneas para que aparecieran las primeras formas de vida microscópicas. Estas fueron las bacterias anaerobias obligadas, organismos unicelulares procariontes (el nombre deriva de *pro*, primitivo, y *karion*, núcleo). Los primeros restos fósiles de células vivas en las rocas más antiguas conocidas datan de unos 3.800 millones de años, de lo que se infiere que los seres vivos han estado presentes en al menos el 85% del tiempo transcurrido desde la creación de la Tierra.

Introducción

Para que surgieran los primeros seres se necesitó la presencia de materia orgánica, que se incorporó al Planeta por dos vías: una parte de ella se formó a partir de la materia inorgánica primigenia y otra tuvo un origen interespacial, alcanzando al hábitat terrestre tras el impacto de los cuerpos materiales que circulaban por el Universo, pues se admite que en la gran explosión se formó una gran cantidad de materia orgánica que vaga por el Cosmos.

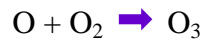
El nacimiento de los primeros microbios dependió de que las condiciones del Planeta se tornaran más favorables. Tuvieron que aparecer grandes océanos de agua. Este elemento, esencial para la vida, se formó a partir de las reacciones químicas llevadas a cabo en la Tierra, pero quizá el mayor volumen se incorporó a la superficie terrestre mediante el impacto con la corteza terrestre de numerosos cometas y asteroides. Hoy se sabe que entre las órbitas de Marte y Júpiter existe lo que se denomina cinturón de asteroides. Uno de ellos, conocido como *Ceres* (considerado en la actualidad un planeta enano), dispara chorros de vapor de agua. Muchos asteroides como éste pudieron impactar con la Tierra hace unos 4.000 millones de años proporcionando el líquido elemento y otras sustancias que sirvieron de base para la aparición de la vida microscópica.

También se precisaba cambiar la atmósfera existente de CO₂, que era permeable a las radiaciones ultravioletas (UV) emitidas por el Sol y que resultaban muy lesivas para las primeras formas de vida microbiana, por otra de ozono (O₃) impermeable a las mismas. La capa de ozono se formó mediante las siguientes reacciones químicas:

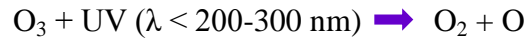


A partir de estas reacciones se incorporaron las primeras moléculas de oxígeno a la atmósfera, que sirvieron de base para la formación de la capa de ozono, de la siguiente manera:





A partir del O₃ formado y mediante el impacto de las radiaciones UV se elaboraran nuevas moléculas de O₂:



Al parecer, hace unos 2.000 millones de años, estas condiciones medioambientales facilitaron la aparición de nuevas formas de vida más complejas. El proceso se completó cuando los nuevos integrantes del Planeta comenzaron a producir más cantidad de oxígeno mediante el proceso de la fotosíntesis, dando lugar a la formación de la actual atmósfera terrestre, que contiene un 21% de O₂ (**Vázquez, M. et Martín, E.**, 1999).

1.2.LOS MICROORGANISMOS Y SU RELACIÓN CON EL OXÍGENO.

Como se dijo anteriormente, las primeras formas de vida tuvieron un metabolismo anaerobio. La aparición en la atmósfera del oxígeno y sus derivados tóxicos provocaron, para adaptarse a las nuevas condiciones medioambientales, una auténtica catarsis metabólica en la evolución de estos seres. Algunos mantuvieron su carácter anaerobio al restringir su localización en ambientes anóxicos y subanóxicos (tracto intestinal del hombre y de los animales, fangos, etc.); en estas circunstancias permanecieron gran cantidad de bacterias, algunos hongos y ciertos protozoos. Otros seres microscópicos cambiaron su forma de vida hacia una respiración aerobia.

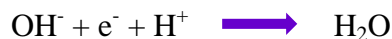
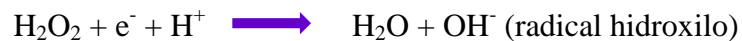
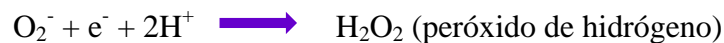
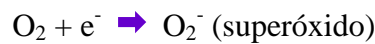
Se diferencian dos tipos de bacterias anaerobias: las estrictas u obligadas, que son incapaces de utilizar el oxígeno, e incluso éste es letal para ellas; y las aerotolerantes, que no emplean el O₂ pero lo toleran y pueden desarrollarse en presencia de él y de sus derivados.

Las bacterias aerobias han adquirido la capacidad de emplear el oxígeno atmosférico para llevar a cabo sus procesos biosintéticos. Las microaerófilas son bacterias aerobias que sólo emplean el O₂ cuando se encuentra en concentraciones más

bajas que la existente en la atmósfera (por lo general, viven en ambientes que poseen entre un 5 y un 10% de O₂). Muchas bacterias son aerobias facultativas; es decir, pueden multiplicarse tanto en presencia como en ausencia de O₂ (**Madigan, M.T. et al., 2012; Vadillo, S. et al., 2002.**).

1.2.1. Derivados tóxicos del oxígeno.

El oxígeno, por lo general, en sí mismo no es tóxico para los seres vivos microscópicos. Pero, como consecuencia de su reducción, se elaboran formas muy tóxicas del mismo por la adición secuencial de cuatro electrones hasta la formación de agua:



El O₂⁻ (superóxido) y el OH⁻ (radical hidroxilo) pueden oxidar cualquier compuesto orgánico de la célula bacteriana, incluso las macromoléculas. El H₂O₂ (peróxido de hidrógeno) también puede dañar a determinadas bacterias, aunque no se comporta de una manera tan lesiva como los anteriores. El O₂⁻ y el H₂O₂ son los derivados tóxicos del oxígeno más frecuentes. Los microorganismos disponen de diversos sistemas enzimáticos para destruirlos:



Las bacterias aerobias y las facultativas suelen elaborar tanto superóxido dismutasa como catalasa. Algunas anaerobias aerotolerantes carecen de superóxido dismutasa, pero emplean complejos no proteicos de Mn^{2+} libre para transformar el O_2^- en H_2O_2 y O_2 . *Brachyspira hyodysenteriae*, bacteria anaerobia aerotolerante, produce NADH oxidasa, junto con NADH peroxidasa y superóxido dismutasa, que reducen el O_2 hasta formar agua. Con esta capacidad enzimática puede desarrollarse en el intestino grueso provocando la disentería hemorrágica porcina. Ciertas bacterias anaerobias estrictas elaboran superóxido reductasa para reducir el O_2^- hasta H_2O_2 sin formar O_2 ; esta enzima la elaboran muchos anaerobios estrictos, como las bacterias sulfatorreductoras. (Barton, L.L. et Fauque, G.D., 2009; Barton, L.L. et al., 2014; Hampson, D.J., 2012; Levett, P.N., 1990; Ljungdahl, L.G., et al., 2003, Madigan, M.T. et al., 2012; Nakano, M.M. et Zuber, P., 2004, Stanton, T.B. et Jensen, N.S., 1993; Stanton, T.B. et al., 1999.).

1.3.BACTERIAS ANAEROBIAS ERICTAS SULFATORREDUCTORAS (BASR).

Las BASR son un grupo muy heterogéneo de bacterias que fueron descubiertas por Beijerinck en el año 1895 al describir *Spirillum desulfuricans*. Pertenecen a diferentes grupos filogenéticos (Barton, L.L. et Fauque, G.D., 2009; Barton, L.L. et al., 2014; Boone, D.R. et al., 2001; Brenner, D.J. et al., 2005; Cypionka, H., 2000; De Vos, P. et al., 2009; Kuever, J., 2014; Rosenberg, E. et al., 2014; Sherry, A. et al., 2013) (Figuras 2 y 3).

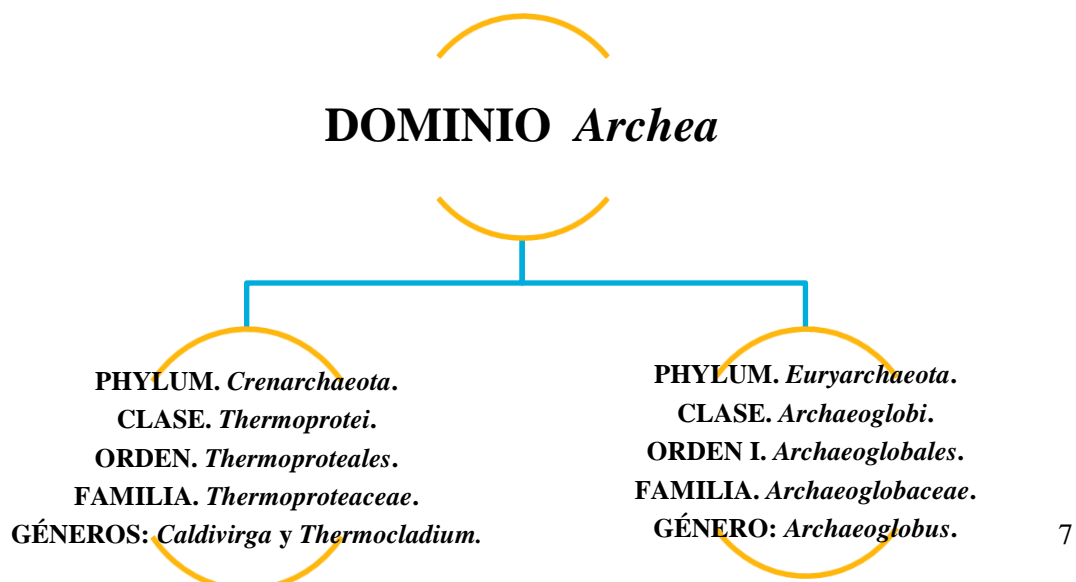


Figura 2. Bacterias anaerobias estrictas sulfatorreductoras pertenecientes al dominio Archea.

DOMINIO
Bacteria

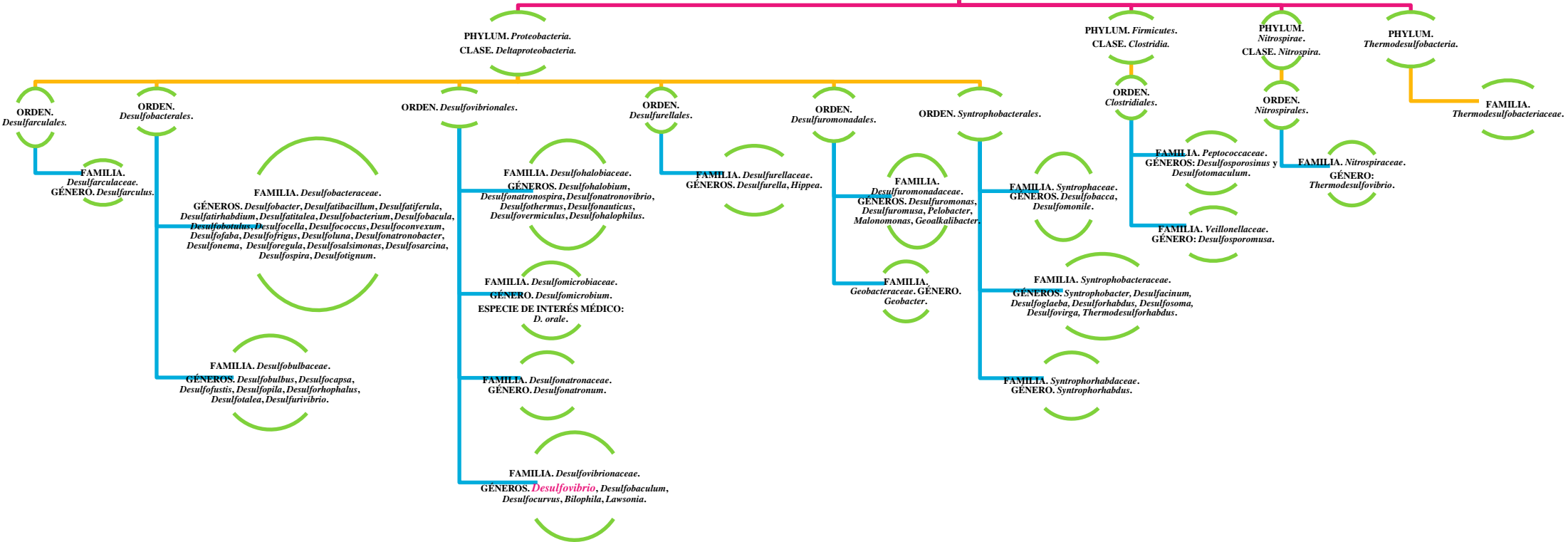


Figura 3. Bacterias anaerobias estrictas sulfatorreductoras pertenecientes al dominio *Bacteria*.

Las BASR agrupan una gran cantidad de géneros. Algunos de ellos integran especies que participan en el desencadenamiento de diversos procesos infecciosos en sus hospedadores. *Desulfomicrobium orale* y algunas especies del género *Desulfovibrio* son las que originan con mayor frecuencia alteraciones en el hombre y en los animales (Brenner, D.J. *et al.*, 2005; Fauque, G.D. *et al.*, 2012; Heggendorn, F.L. *et al.*, 2013; Lobo, S.A.L. *et al.*, 2012; Nakano, M.M. *et al.*, 2004).

Los microorganismos integrantes del género *Desulfovibrio* cuando se encuentran en ambientes anóxicos o subanóxicos con altas concentraciones de materia orgánica, tienen la capacidad de reducir de una manera no asimiladora el sulfato (SO_4^{2-}), el sulfito (SO_3^{2-}) o el tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) para utilizarlos como fuente de azufre en sus necesidades biosintéticas, empleándolos como aceptores de electrones y produciendo como desecho metabólico sulfuro de hidrógeno (H_2S) (Figura 4).

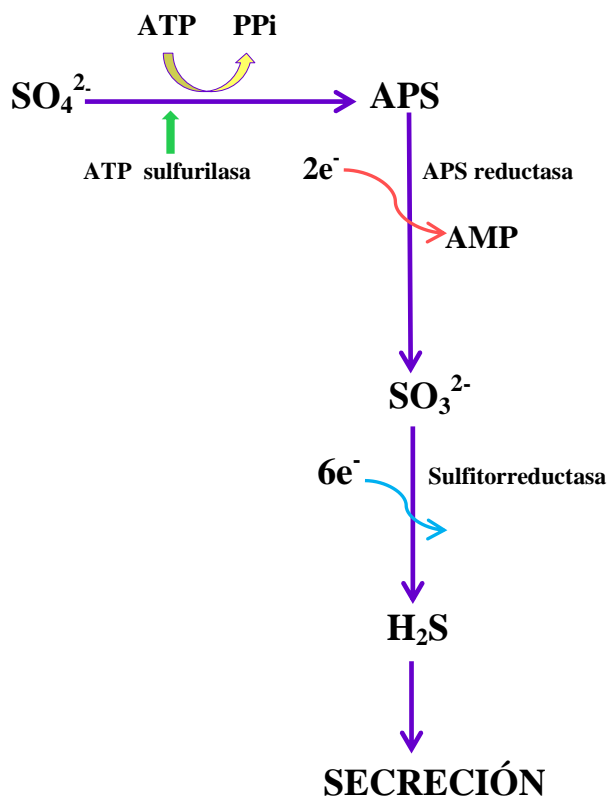
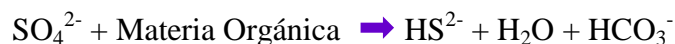


Figura 4. Reducción por parte de las bacterias anaerobias estrictas sulfatorreductoras del sulfato por la vía desasimiladora, formando sulfuro de hidrógeno. APS: adenosina-5'-fosfosulfato (Barton, L.L. *et al.*, 2009; Barton, L.L. *et al.*, 2014; Fauque, G.D. *et al.*, 2012; Madigan, M.T. *et al.*, 2012; Parey, K. *et al.*, 2013).

Las bacterias del género *Desulfovibrio* utilizan fundamentalmente lactato, piruvato y etanol como fuente de carbono y de energía, reduciendo el sulfato a sulfuro de hidrógeno (**Kosinska, K. et Miskiewicz, T., 1997; Shao, D. et al., 2012**).



Para degradar la materia orgánica actúan en asociación o simbiosis con otras bacterias, como las pertenecientes a los géneros: *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Sarcina*, entre otras. Las BASR se encuentran ampliamente distribuidas en el Planeta, localizándose en muchos ambientes anóxicos y subanóxicos (**Figura 5**). Estas bacterias en ocasiones actúan en el estadio terminal de la degradación de la materia. Son utilizadas en digestores anaerobios de plantas depuradoras de agua residuales. Fueron empleadas como una alternativa para la eliminación de sulfatos y ciertos metales presentes en aguas residuales provenientes de minas e industrias con alto contenido de metales, en las cuales aumentan el pH generando sulfuros insolubles. También se encuentran en los biofilms metálicos de las conducciones industriales donde producen corrosión. Así mismo, algunas especies del género *Desulfovibrio* forman parte de la micropoblación bacteriana normal del tracto intestinal del hombre y de los animales, comportándose como bacterias patógenas cuando las circunstancias resultan favorables, casi siempre participan en procesos infecciosos de carácter polimicrobiano (**Barton, L.L. et Fauque, G.D., 2009; Barton, L.L. et Hamilton, W.A. 2007; Barton, L.L. et al., 2014; Hao, O.J. et al., 1996; Kuever, J., 2014; Madigan, M.T. et al., 2012**).

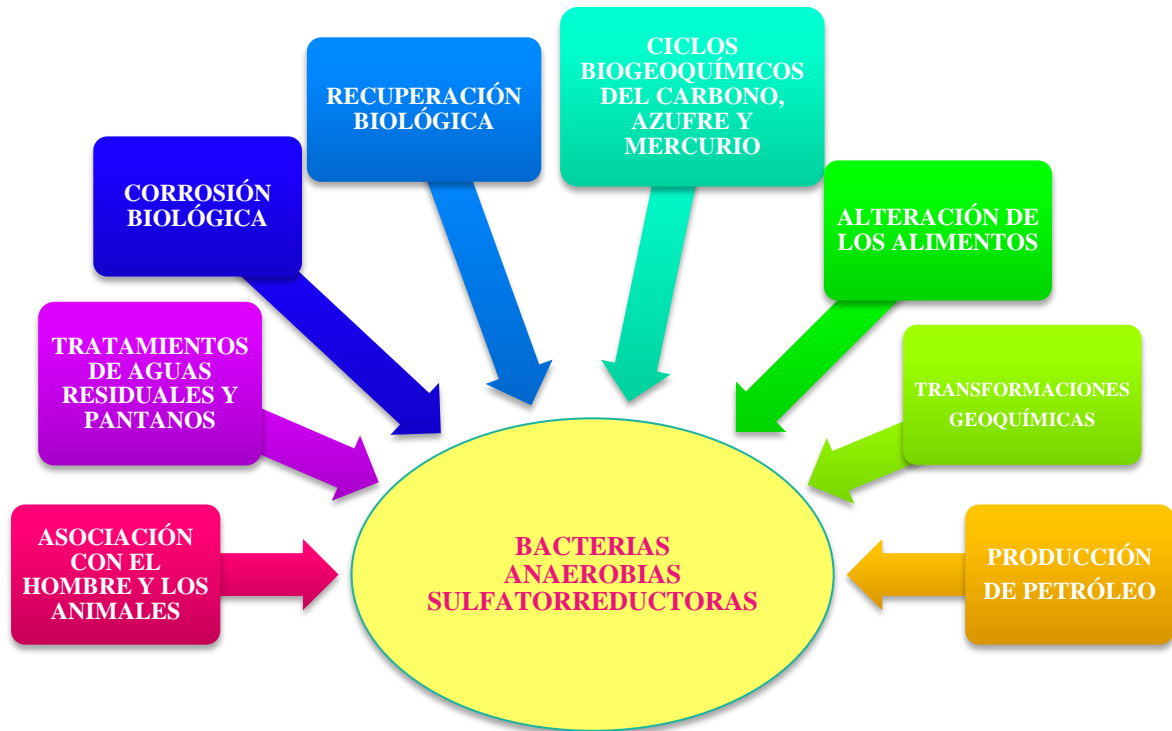


Figura 5. Interacción de las BASR con los ambientes anóxicos y subanóxicos.

1.4. ESPECIES DEL ORDEN *Desulfovibrionales* DE INTERÉS EN MEDICINA HUMANA Y VETERINARIA.

En la actualidad, los desulfovibrios presentan el siguiente encuadre taxonómico (Devereux, R. *et al.*, 1990; Klouche, N. *et al.*, 2009; Kuever, J., *et al.*, 2005; Kuever, J., 2014; Rosenberg, E. *et al.*, 2014; Zhao, Ch. *et al.*, 2012) (Figura 6):

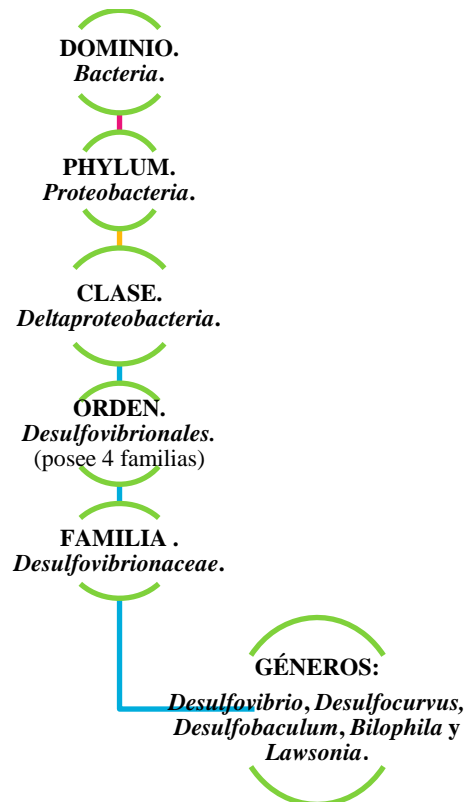


Figura 6. Encuadre taxonómico actual de los desulfovibrios.

El género *Desulfovibrio* agrupa unas 66 especies y 8 subespecies; número que aumenta cada cierto tiempo con la descripción de nuevas especies.

Las de mayor interés en medicina humana y veterinaria según **Goldstein, E.J.C. et al.** (2003) (**Figura 7**) son:

<i>D. desulfuricans.</i>	<i>D. desulfuricans</i> subsp. <i>aestuarii.</i>	<i>D. desulfuricans</i> subsp. <i>desulfuricans.</i>	<i>D. fairfieldensis.</i>	<i>D. piger.</i>
<i>D. vulgaris.</i>	<i>D. vulgaris</i> subsp. <i>oxamicus.</i>	<i>D. vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris.</i>	<i>D. intestinalis.</i>	<i>D. legallii</i>
<i>D. salexigens.</i>	<i>D. africanus</i>	<i>D. africanus</i> subsp. <i>africanus.</i>	<i>D. africanus</i> subsp. <i>uniflagellum.</i>	<i>D. gīgas.</i>
<i>D. baculatus.</i>	<i>D. sapovorans.</i>	<i>D. baarsii.</i>	<i>D. thermophilus.</i>	<i>D. gabonensis.</i>
<i>D. profundus.</i>	<i>D. burkinensis.</i>	<i>D. longus.</i>	<i>D. aespoeensis.</i>	

Figura 7. Especies y subespecies de mayor interés en medicina humana y veterinaria.

1.4.1. Situación taxonómica de *D. fairfieldensis*.

En el año 1996, Tee, W. *et al.*, estudiaron en Australia la micropoblación bacteriana del contenido de un absceso hepático de un ser humano de 82 años, que presentaba un cuadro febril desde hacía tres semanas. Aislaron una cepa bacteriana gramnegativa anaerobia estricta, que mostraba formas vibrioides y espirales. La bacteria crecía a una temperatura comprendida entre 37 y 40°C, pero no lo hacía a 25°C. El microorganismo mostraba una movilidad intensa. Tras realizar las pruebas bioquímicas correspondientes se apreció que pertenecía al género *Desulfovibrio*. La secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S, demostró que tenía una homología del 97% con *D. desulfuricans*, diferenciándose con éste en 45 nucleótidos. Los datos obtenidos permitieron a los investigadores proponer que la cepa aislada se considerara provisionalmente como una nueva especie, a la que denominaron *D. fairfieldensis*.

McDougall, R. *et al.* (1997) aislaron a partir de la sangre de un ser humano de 75 años que sufría una bacteriemia, una cepa anaerobia estricta que tenía una gran similitud en la secuencia del gen que codifica el ARNr 16S con la aislada por parte de

Tee, W. et al. (1996). Fue el primer caso en el que se aisló *D. fairfieldensis* a partir de un paciente que mostraba un historial de colelitiasis no obstructiva y pólipos sangrantes adenomatosos.

El tercer aislado de *D. fairfieldensis* fue obtenido en el año 1999 por parte de **La Scola, B. et Raoult, D.** La bacteria se aisló a partir de la orina de un hombre que mostraba un cuadro clínico de infección urinaria y meningoencefalitis. La secuencia del gen que codifica el ARNr 16S, confirmó que se trataba de la especie bacteriana de referencia.

Loubinoux, J. et al. (2000) aislaron una cepa bacteriana anaerobia estricta en cultivo puro a partir de la sangre de un ser humano que presentaba un cuadro de peritonitis y apendicitis perforada. Tras realizar las pruebas bioquímicas adecuadas y la secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S, se constató que se correspondía con el cuarto aislado de *D. fairfieldensis*.

Dos años más tarde, **Loubinoux, J. et al.** (2002a) aislaron *D. fairfieldensis* a partir de las lesiones de enfermos humanos con periodontitis.

Posteriormente, se ha relacionado a *D. fairfieldensis* con la aparición de diversos procesos infecciosos en los seres humanos. A pesar de ello, el microorganismo todavía no ha sido validado como especie por parte del comité de la revista *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, aunque es de suponer que ocurrirá próximamente.

Vasoo, S. et al. (2014), señalaron que aunque *D. desulfuricans* es la especie del género *Desulfovibrio* que aíslan con mayor frecuencia a partir de seres humanos con bacteriemia y otras infecciones, *D. fairfieldensis* puede ser la especie con mayor poder patógeno del género (aunque todavía no se han caracterizado exhaustivamente sus genes de patogenicidad) como consecuencia de su elevado poder invasivo.

1.4.2. Género *Desulfovibrio*.

1.4.2.1. Características generales.

Las especies del género *Desulfovibrio* de interés médico presentan un marcado pleomorfismo dependiendo del tipo de cultivo en el que se multipliquen y de la edad de los mismos. Cuando se examinan las colonias con el microscopio óptico se aprecian formas curvadas, bacilos rectos, estructuras sigmoideas y morfotipos espirales. El tamaño varía entre 0,5-1,5 μm de ancho y 2,5-10,0 μm de largo. No forman esporos. Son gramnegativas, aunque es más aconsejable emplear la microscopía de contraste de fase, pues al tiempo que se aprecian los tipos morfológicos se pone de manifiesto su movilidad, que la desarrollan mediante un flagelo polar o por flagelos lofótricos. La temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 25 y 35°C, aunque pueden desarrollarse a la temperatura límite de 44°C. No licúan la gelatina. Pocas especies utilizan los carbohidratos. A veces reducen los nitratos a amonio. Mediante la cromatografía gas-líquido, se evidencia la producción de acetato como producto final a partir de la peptona, extracto de levadura y glucosa. Algunas cepas producen ureasa. El crecimiento en presencia de bilis varía con las cepas. Son resistentes a la acción de la vancomicina y colistina; sin embargo, son sensibles a la acción de la kanamicina. Participan en la degradación de la materia orgánica y juegan un papel importante en la extracción de metales pesados (mercurio, cromo y cobre) a partir del medio ambiente. Desarrollan su ciclo de vida en ambientes anóxicos o subanóxicos, como barro, lodo, vertidos industriales, aguas residuales, tierra, aguas dulce y salada y ambientes marinos; así como en el tracto intestinal del hombre y de los animales, que eliminan las bacterias al medio ambiente a través de las heces. En este lugar de la economía orgánica los desulfovibrios representan el 66% del total de las BASR (**Barton, L.L. et Fauque, G.D.**, 2009; **Beerens, H. et Romond, C.**, 1977; **Devereux, R. et al.**, 1990; **Dzierzewicz, Z. et al.**, 1994; **Fude, L. et al.**, 1994; **Gibson, G.R.**, 1990; **Gibson, G.R. et al.**, 1988; **Kuever, J.**, 2014; **Kuever, J. et al.**, 2005; **Warren, Y.A. et al.**, 2005).

Como ya se comentó, las BASR son ubicuas en los ambientes anóxicos y subanóxicos, donde se encuentran por lo general en un número celular muy bajo.

Cuando se pretende aislarlas a partir de estos hábitats, se requieren medios de cultivo especiales, ambientes anaerobios y un tiempo muy prolongado de incubación (20 días o más) para conseguir su cultivo y, en consecuencia, su aislamiento.

Los desulfobios utilizan el sulfato, el sulfito o el tiosulfato como aceptores finales de electrones, transformándolos en sulfuro de hidrógeno; sin embargo, el metabolismo en ocasiones puede ser de tipo fermentativo. La mayoría de las especies oxidan compuestos orgánicos como el lactato de manera incompleta hasta acetato, al cual no pueden oxidar después.



Todos los integrantes del género elaboran desulfobiosidasa, una enzima que se comporta como una sulfitorreductasa. En ocasiones producen catalasa (**Shao, D. et al.**, 2012).

1.4.3. Cultivo de las BASR.

En los procesos infecciosos las BASR y, en especial los desulfobios, se suelen encontrar en un número elevado, lo que facilita su aislamiento. En estos casos es suficiente emplear medios de cultivo de agar sangre enriquecidos, como el “agar Brucella” suplementado con un 5% de sangre de oveja, vitamina K₁ y hemina equina tipo III. También se puede utilizar “agar Wilkins-Chalgren” enriquecido con el suplemento anaeróbico G-N y con un 5% de sangre de oveja (**Hartemink, R. et Rombouts, F.M.** (1999); **Ichiishi, S., et al.**, (2010); **Jousimies-Somer, H.R. et al.**, 2002; **Liderot, K. et al.**, 2010; **Nakao, K. et al.** (2009); **Urata, T. et al.**, 2008). Algunos investigadores aislaron desulfobios a partir de la sangre de un perro con bacteriemia empleando “agar chocolate” (**Shukla, S.K. et Reed, K.D.**, 2000). Cuando se pretende aislar las BASR a partir de la micropoblación normal de determinados hábitats orgánicos como las heces, la saliva, etc., al encontrarse estos microorganismos en esos lugares en un número muy bajo, es necesario emplear medios de cultivo más eficaces e incubar en anaerobiosis durante periodos de tiempo superiores a 20 días. En este sentido, **Postgate, J.R.** (1979) ideó diversos medios de cultivo para aislar las

BASR. De todos ellos, el más adecuado para aislarlas a partir de las micropoblaciones bacterianas normales del hombre y de los animales es el “**Medio E**”. Su composición por litro de medio de cultivo es la siguiente:

- KH ₂ PO ₄	0,5 g.
- NH ₄ Cl.....	1,0 g.
- Na ₂ SO ₄	1,0 g.
- CaCl ₂ . 6H ₂ O.....	1,0 g.
- MgCl ₂ . 7H ₂ O.....	2,0 g.
- Lactato sódico.....	3,5 g.
- Extracto de levadura.....	1,0 g.
- Ácido ascórbico.....	0,1 g.
- Ácido tioglicólico.....	0,1 g.
- FeSO ₄ . 7H ₂ O.....	0,5 g.
- Agar.....	15 g.

El medio de cultivo se hierve para disolver el agar. Seguidamente se ajusta el pH con NaOH a 7,6. A continuación se esteriliza en autoclave.

El “**Medio E**” se emplea para contar el número de unidades formadoras de colonias presentes en un determinado sustrato de origen humano o animal. Tras sembrar la muestra en la superficie del agar e incubar la placa en condiciones anaeróbicas, se aprecian colonias de color negrozco. También se emplea para obtener cultivos puros de las BASR aisladas.

Van der Hoeven, J.S. et al. (1995) obtuvieron el primer aislado de bacterias sulfatorreductoras a partir de la boca del hombre, concretamente de la placa subgingival dental de personas con periodontitis. Consiguieron cultivo puro de bacterias pertenecientes a los géneros *Desulfobacter* y *Desulfovibrio*. Emplearon un medio basal semisintético que tenía un pH de 7,2 y un potencial de oxidorreducción de -100 mV. El medio de cultivo se fabricaba a partir de cinco soluciones que se elaboraban y esterilizaban por separado; finalmente se mezclaban en condiciones de anaerobiosis. Las soluciones tenían la siguiente composición:

Solución 1

- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$3,0 mg.
- $\text{K}_2\text{HPO}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$0,65 g.
- NH_4Cl1,0 g.
- Na_2SO_41,0 g.
- Extracto de levadura.....1,0 g.
- Resazurina.....0,0003 mmol/l

La disolución se llevaba a cabo en 800 ml de agua desionizada.

Solución 2

Contiene los siguientes donadores de electrones:

- Acetato sódico.....2,5 g.
- Piruvato sódico.....2,0 g.
- Propionato sódico.....2,0 g.
- Citrato sódico.....0,5 g.
- Lactato sódico.....2,0 g.

Todas las sustancias se disolvían en 100 ml de agua desionizada.

Las dos soluciones se esterilizaban en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Solución 3

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$2,0 g.
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,5 g.
- 0,5 ml de HCl 6N.

La disolución se realizaba en 50 ml de agua.

Solución 4

- NaHCO_32,0 g.

Se disolvía en 50 ml de agua.

Solución 5

- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$30 mg.

Se preparaba en 1 ml de agua.

Las soluciones 3, 4 y 5 se prepararon con agua desionizada y libre de oxígeno. Se esterilizaron por filtración.

Una vez preparadas y esterilizadas, las soluciones se mezclaban en una cámara de anaerobiosis.

El medio sólido se obtenía añadiendo a las soluciones 15 g/l de agar.

Las muestras se sembraban en el medio de cultivo líquido y los tubos o frascos se incubaban en anaerobiosis. La aparición de BASR se detectaba por la aparición de un sedimento de color negro debido a la precipitación de FeS.

A partir del precipitado se tomaba una cantidad que se sometía a una serie de diluciones dobles. A partir de ellas, se sembraban en el mismo medio de cultivo con agar. Las placas se incubaban en condiciones de anaerobiosis durante 21 días. La aparición de colonias de color negro ponía de manifestó la presencia de BASR.

Sobre la base de los medios de cultivo ideados por **Postgate, J.R.** (1979) y **Van der Hoeven, J.S. et al.** (1995), otros investigadores realizaron modificaciones que permitieron aislar con mayor eficacia las BASR (**Feio, M.J. et al.**, (1998); **Ichiishi, S., et al.**, (2010); **Knoblauch, C. et al.**, (1999); **Langendijk, P.S. et al.**, (2001a); **Pitcher, M.C.L. et al.**, (2000); **Rattray, R.M. et Craig, A.M.**, (2007); **Sungur, E.I. et Cotuk, A.**, (2005); **Viehman, S. et al.** (2006); **Zinkevich, V. et Beech, I.B.**, (2000).

Nakao, K. et al. (2009) estudiaron la sensibilidad a los antimicrobianos de 23 cepas del género *Desulfovibrio* obtenidas a partir de muestras tomadas de seres humanos que padecían diversos trastornos clínicos. Dichas cepas fueron sembradas en dos medios de cultivo: “agar sangre Brucella” y en otro ideado por ellos, que denominaron “agar *Desulfovibrio*” (DA). Apreciaron que los desulfovibrios crecían más rápidamente sobre el medio “DA” que sobre el “agar sangre Brucella”. El “DA” tiene la siguiente composición:

- -Polipeptona.....15 g.
- -Peptona de soja.....7,5 g.
- -Extracto de levadura.....7,5 g.
- -Extracto de carne.....7,5 g.
- -L-cisteína HCL.....0,75 g.
- -Citrato amónico férrico.....0,75 g.
- -Dextran sulfato sódico.....10 g.
- -Agar.....15 g.
- -Agua destilada.....1000 ml.

EL pH se ajusta a 7,0.

Heggendorn, F.L. et al. (2013) estudiaron la presencia de BASR en la saliva de pacientes humanos que padecían diversos trastornos, como periodontitis, gastritis y procesos sistémicos. Aislaron *D. fairfieldensis*, *D. desulfuricans* y *Raoultella ornithinolytica*. Para su aislamiento emplearon el “Medio E con agar” descrito por **Postgate, J.R.** (1979), al que realizaron algunas modificaciones. Su composición por litro de medio de cultivo fue la que se detalla a continuación:

- KH_2PO_40,5 g.
- NH_4Cl1,0 g.
- Na_2SO_41,0 g.
- $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$0,67 g.
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$1,68 g.
- Lactato sódico.....7,0 g.
- Extracto de levadura.....1,0 g.
- Ácido ascórbico.....0,1 g.
- Agar.....15 g.

- NaCl.....5,0 g.
- Resazurina.....4,0 mL
- FeSO₄. 7H₂O.....0,5 g.
- Tioglicolato sódico.....12,4 g.

Una vez sembradas las muestras, las placas se incubaban en anaerobiosis durante 28 días a 30 °C. Las colonias formadas por las BASR se detectaban por la aparición de un precipitado de color negro debido a la formación de sulfito de hierro en las colonias.

A continuación, se tomaba una alícuota de los cultivos en placa y se diluía en un tubo *ependorf* que contenía 2ml de una solución reductora para anaerobios, cuya composición por litro es la siguiente:

- Tioglicolato sódico.....0,124 g.
- Ácido ascórbico.....0,1 g.
- NaCl.....5,0 g.
- Resazurina.....4,0 ml.

Después, 1 ml de los tubos *ependorf* se sembraba en el “**Medio C**” de **Postgate, J.R.** (1979), cuya composición por litro de medio de cultivo es la que a continuación se detalla:

- KH₂PO₄.....0,5 g.
- NH₄Cl.....1,0 g.
- Na₂SO₄.....4,5 g.
- CaCl₂. 2H₂O.....0,04 g.
- MgSO₄. 7H₂O.....0,06 g.
- Lactato sódico.....6,0 ml.
- Extracto de levadura.....1,0 g.
- NaCl.....5,0 g.
- Resazurina.....4,0 ml.
- FeSO₄. 7H₂O.....0,004 g.
- Citrato sódico dihidrato.....0,3 g.

La incubación se llevaba a cabo en condiciones de anaerobiosis durante 28 días a 30 °C.

Earley, H. et al. (2015) investigaron la capacidad que tienen *Akkermansia muciniphila* y *Desulfovibrio spp.* de unirse a las mucinas del colon en personas sanas y con colitis ulcerosa. Cultivaron *D. desulfuricans* ATCC 27774 en un medio de cultivo cuya composición se basó en una modificación del descrito por **Postgate, J.R.** (1979):

- K_2PO_40.5 g/L
- NH_4CL0.5 g/L
- $CaSO_4$1 g/L
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$2 g/L
- Lactato sódico.....3.5 g/L
- Extracto de levadura.....1 g/L
- Caldo anaeróbico fastidioso.....30 g/L
- Ácido ascórbico.....0.1 g/L

Una vez disueltos todos los elementos en agua destilada, se procedió a la esterilización en el autoclave a 12°C durante 15 minutos.

Antes de utilizar el medio de cultivo descrito, se añadió 0.5 g/L de $FeSO_4$ tras su esterilización por filtración.

Una vez realizada la siembra en el medio de cultivo, los tubos o matraces se introdujeron en una jarra de anaerobiosis junto con un sobre de AnaeroGen™ 3.5L (Thermo Scientific), que se sometieron a 37°C durante 16 horas en agitación a 200 rpm.

1.4.4. Tolerancia al oxígeno.

Las BASR pueden resistir la exposición al oxígeno durante varios días. Algunas de ellas, incluso son capaces de reducirlo hasta formar agua. En las BASR se han descrito varios sistemas enzimáticos reductores del oxígeno. En el espacio periplásmico de *D. vulgaris* y *D. desulfuricans* se han descubierto hidrogenasas como las NADH oxidasa y la NADPH oxidasa. Así mismo, se encuentra citocromo c_3 en este lugar, que también cataliza con eficacia la reducción del O_2 . En el citoplasma de *D. gigas* se ha identificado una NADH rubredoxina oxidorreductasa la cuál es capaz de reducir lenta e incompletamente el O_2 hasta H_2O_2 . Algunas de las propiedades espectroscópicas de la

rubredoxina oxidorreductasa son similares a las del citocromo c_3 . La rubredoxina oxidorreductasa reacciona con el monóxido de carbono, pero es insensible a la presencia de cianida (Cypionka, H., 2000; Yurkiw, M.A. *et al.*, 2012). En los últimos años, se han publicado diversos trabajos científicos que demuestran la existencia de un gran arsenal enzimático en las bacterias del género *Desulfovibrio*, que permite a las mismas defenderse del ataque del O_2 y, en consecuencia, facilita la supervivencia y adaptación a los ambientes óxicos (Dolla, A. *et al.*, 2007; Imlay, J.A., 2008).

D. vulgaris dispone de una gran variedad de enzimas para la defensa frente al estrés oxidativo. Las enzimas y los genes que las codifican son los siguientes: DVU2410 superóxido dismutasa y DVUA0091 catalasa, las cuales utilizan NADH para reducir el O_2^- a H_2O_2 y éste a H_2O . También poseen DVU3183 superóxido reductasa (*sor*), así como las NADH peroxidasas DVU3094 rubreritrina-1 (*rbr1*), DVU2310 rubreritrina-2 (*rbr2*) y DVU0019 nigeritrina (*ngr*). La especie bacteriana referida también se defiende del oxígeno mediante las oxígenorreductasas de membrana: Cox (DVU1811) y Cyd (DVU3270); así como a través de las rubredoxinas citoplasmáticas: oxígeno oxidorreductasas DVU2014 Roo1 y DVU3185 Roo2. Los análisis de delección ponen de manifiesto que Roo1 y Roo2 confieren resistencia al oxígeno cuando la bacteria se encuentra en condiciones de microaerofilia. Por otro lado, la expresión del gen *sor* protege en situaciones de aerobiosis (21% de O_2) (Wildschut, J.N. *et al.*, 2012).

1.4.5. Factores de virulencia.

1.4.5.1. Efectos del sulfuro de hidrógeno sobre el tracto intestinal.

El intestino del hombre (y con total seguridad el de los mamíferos omnívoros) posee una comunidad microbiana muy amplia y heterogénea, que se cifra en torno a los 100 trillones (10^{20}) de microorganismos; cantidad muy superior al número de células eucariotas que posee el hospedador. El análisis de la secuencia de los genes que codifican el ARNr 16S, pone de manifiesto la existencia en el tracto intestinal de un ecosistema muy complejo, diferenciándose alrededor de 1.000 especies microbianas, con más de tres millones de genes (150 veces más que los genes que posee un ser

humano). Las bacterias que predominan en el intestino humano pertenecen a los *phyla Bacteroidetes* y *Firmicutes*. En un número muy inferior, se encuentran otras pertenecientes a los *phyla Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria* y *Verrucomicrobia*. La colonización microbiana del intestino del neonato se inicia en el momento del nacimiento tras su paso por la vagina de la madre durante el parto y su posterior contacto con el medio ambiente. Estos seres microscópicos viven en el intestino en simbiosis entre sí y con el hospedador (**Kurokawa, K. et al.**, 2007; **Li, Q. et Zhou, J.M.**, 2016; **Rodrigues Hoffmann, A. et al.**, 2016; **Structure, function and diversity of the healthy human microbiome**, 2012).

Las BASR colonizan el tracto intestinal del 50% de las personas, pero se encuentran en poblaciones muy bajas (**Rey, F.E. et al.**, 2013). Las dietas inadecuadas, provocan un desequilibrio de estas micropoblaciones originándose una auténtica disbiosis intestinal, que se traduce en un incremento notable de las BASR (**Chan, Y.K. et al.**, 2013; **Khalil, N.A. et al.**, 2014; **Vipperla, K. et O'Keefe, S.J.**, 2013). En el tracto gastrointestinal del ser humano se han identificado BASR encuadradas dentro de las delta proteobacterias: tales como las pertenecientes a los géneros *Desulfovibrio* (*D. desulfuricans*, *D. fairfieldensis* y *D. piger*), *Desulfobulbus*, *Desulfobacter*, *Desulfotomaculum* y *Bilophila wadsworthia*. Estos microorganismos tienen la capacidad de metabolizar compuestos orgánicos como los aminoácidos sulfurados (metionina y cisteína) y los sulfatos inorgánicos a CO₂; así como producir a partir de ellos el gas sulfuro de hidrógeno. Algunos alimentos son ricos en metionina, como las algas marinas, el queso, el atún y las anchoas. Otros lo son en cisteína, como las salchichas, la carne de pavo, la leche, la cebolla, el brócoli, los cereales de avena, el germen de trigo y los brotes verdes de lentejas. Las carnes rojas, los huevos y la carne de pollo poseen cantidades importantes de ambos aminoácidos. Los alimentos referidos favorecen el desarrollo de las BASR en el intestino grueso. El H₂S producido por estos microorganismos se comporta como beneficioso o deletéreo para las células epiteliales de la mucosa del intestino grueso dependiendo de su concentración en este hábitat orgánico. En concentraciones elevadas inhibe la respiración de dichas células (**Deplancke, B. et Gaskins, H.R.**, 2003; **Finegold, S.M.**, 2011; **Mafra, D. et al.**, 2013; **Magge, et al.**, 2000; **Rajilic'-Stojanovic', M. et de Vos, W.M.**, 2014; **Vipperla, K. et O'Keefe, S.J.**, 2013).

El intestino grueso está recubierto por una capa de mucus, que actúa como protectora frente a las acciones de los microorganismos presentes en ese hábitat, al tiempo que permite la entrada por difusión al torrente sanguíneo de los nutrientes esenciales. Las mucinas (glucoproteínas sulfatadas) son las unidades funcionales de la capa de mucus. El principal componente del mucus presente en el colon es la mucina MUC2. Los desulfovibrios tienen la capacidad de unirse a las mucinas y utilizar parte de los sulfatos de las mismas produciendo sulfhídrico. En las personas que padecen colitis ulcerosa, se ha constatado un aumento de los desulfovibrios en el intestino grueso, así como una gran afinidad de estas bacterias por las mucinas del colon. La gran cantidad de sulfhídrico producida por los desulfovibrios origina una elevada vulnerabilidad del epitelio de la mucosa del colon, favoreciendo el desarrollo de la colitis ulcerosa (**Croix, J.A. et al.**, 2011; **Earley, H. et al.**, 2015).

En los últimos años, se han llevado a cabo numerosos trabajos de investigación para aclarar los efectos del H₂S sobre las células intestinales. Sin embargo, aunque se ha avanzado sustancialmente en este propósito aún quedan muchos aspectos por dilucidar. Se conoce que altas concentraciones de H₂S pueden inhibir la oxidación del butirato y la fagocitosis, lo que dificulta la eliminación de las bacterias indeseables para el hospedador presentes en el intestino (**Roediger et al.**, 1993). Así mismo, originan hiperproliferación y alteraciones metabólicas de las células epiteliales provocando daño de la mucosa intestinal que conduce a una inflamación crónica. En los pacientes con colitis ulcerosa se producen elevadas concentraciones de sulfuro de hidrógeno en el intestino, así como un aumento considerable de los desulfovibrios en las heces. El gas se asocia igualmente con la aparición del cáncer colorrectal o cáncer de colon. El H₂S también lo producen de manera endógena los colonocitos. Cuando el H₂S se produce en concentraciones no tóxicas, tiene efectos fisiológicos positivos sobre el cerebro, corazón, sistema circulatorio, aparato urogenital y tracto gastrointestinal (**Christophersen, C.T. et al.**, 2011; **Linden, D.R.**, 2014; **Wallace, J.L.**, 2010).

El mecanismo a través del cual el sulfuro de hidrógeno actúa sobre las células intestinales en los casos de cáncer de colon fue publicado por **Attene-Ramos, M.S. et al.** en el año 2006. Los investigadores estudiaron la citotoxicidad crónica que provoca el H₂S en las células ováricas del hámster chino y en las células HT29-C1.16E. Se apreció que el H₂S, en condiciones normales, no ejerce ningún efecto negativo sobre el ADN de las células de referencia; sin embargo, cuando previamente se inhibe la capacidad de

reparación del ADN en las mismas, el sulfuro de hidrógeno ejerce un marcado efecto genotóxico sobre ellas, siendo más intenso sobre el primer tipo de células que sobre el segundo. Esto hace pensar que en los seres humanos con predisposición genética para padecer el cáncer colorrectal, al tener dañados los sistemas de reparación del ADN, el H₂S ocasiona un intenso efecto genotóxico provocando mutaciones y desencadenando el proceso neoplásico.

1.4.5.2. Metilación del mercurio.

El mercurio es un elemento muy tóxico para la mayoría de los vertebrados. En el medio ambiente se encuentra en dos formas: inorgánica (Hg⁰, Hg²⁺ y Hg₂²⁺) y orgánica (CH₃Hg⁺, (CH₃)₂Hg, etc.). Los compuestos orgánicos del mercurio son los más tóxicos. Cuando son ingeridos a través de los alimentos (pescado, fundamentalmente) por el hombre y los animales, debido a su gran solubilidad en los lípidos, pasan rápidamente al torrente sanguíneo y se dirigen al sistema nervioso central, donde originan trastornos graves; comportándose como una neurotoxina muy potente. Los elementos inorgánicos son menos perjudiciales: la toxicidad es mayor en las formas más reducidas y menor en las más oxidadas (Hg²⁺ > Hg₂²⁺ > Hg⁰). El consumo de pescado contaminado con CH₃Hg⁺ produce en la especie humana enfermedad neurológica grave. El cerebro y el sistema nervioso periférico son los primeros lugares de actuación de esta sustancia. Provoca marcados disturbios sensoriales, reducción del campo visual, ataxia, disartria (trastorno motor del habla), alteraciones auditivas, temblor y trastornos cardiovasculares. Igualmente, se ha observado que el CH₃Hg⁺ y el Hg²⁺ alteran el sistema inmunitario del hospedador provocando fenómenos de autoinmunidad e inmunosupresión (**Canela, M.C. et Jardim, W.F.**, 1997; **Mergler, D. et al.**, 2007).

El mercurio contamina el medio ambiente mediante las actividades industriales y agrícolas incontroladas. La forma gaseosa (Hg⁰) pasa a la atmósfera a través de los gases emitidos por las plantas de tratamiento del cinabrio (HgS). El Hg⁰ que llega a la atmósfera reacciona con el ozono (O₃) dando lugar a la formación de Hg²⁺. En consecuencia, en el medio ambiente (agua, sedimentos, superficie terrestre, etc.) el mercurio se encuentra en las formas Hg⁰ y Hg²⁺. El derivado más tóxico del mercurio es

el metilmercurio (CH_3Hg^+). El proceso de metilación de Hg^0 y Hg^{2+} es muy complejo y no se conoce exhaustivamente. El CH_3Hg^+ formado es absorbido por el fitoplancton, de ahí pasa a toda la cadena alimentaria hasta llegar a su último eslabón: el hombre. En el medio ambiente, la oxidación y metilación de las formas inorgánicas del mercurio hasta formar CH_3Hg^+ , la llevan a cabo algunos microorganismos, y dentro de ellos las bacterias anaerobias juegan un papel primordial, destacándose por su eficacia e intensidad las BASR. Los miembros de las familias *Desulfobacteraceae* y *Desulfovibrionaceae* tienen una gran capacidad para metilar el mercurio; sin embargo, las bacterias del género *Desulfobulbus* no realizan el proceso con intensidad (Gilmour, C.C. *et al.*, 2011; Li, W.C. *et Tse H.F.*, 2015; Mergler, D. *et al.*, 2007; Scheuhammer, A.M. *et al.*, 2007; Zhao, X. *et al.*, 2008).

Colombo, M.J. *et al.* (2013) y Hu Lin, H.H. *et al.* (2013), descubrieron que *Desulfovibrio desulfuricans* ND132 tiene la capacidad de actuar sobre el Hg^0 y formar Hg^{2+} produciendo su metilación para dar lugar a la formación de la neurotoxina CH_3Hg^+ . En el mismo sentido, Parks, J.M. *et al.* (2013), demostraron la existencia de dos genes en *Desulfovibrio desulfuricans* ND132 responsables de la metilación del mercurio, a los que denominaron *hgcA* y *hgcB*, que codifican la síntesis de las proteínas HgcA y HgcB, respectivamente; las verdaderas responsables del proceso de metilación, que lo llevan a cabo a través de las cisteínas Cys93 y Cys73, respectivamente. Por otro lado, la delección de los genes de referencia impide que la bacteria lleve a cabo el proceso de metilación (Smith, S.D. *et al.*, 2015).

De lo apuntado, se desprende que Hg^0 y Hg^{2+} pueden alcanzar la economía orgánica del hombre y de los animales tras la ingestión de algunos integrantes de la cadena alimentaria que han acumulado dichos elementos en sus organismos. Cuando llegan al intestino, las BASR transforman el mercurio ingerido en CH_3Hg^+ , que origina las alteraciones descritas. También pueden adquirir directamente la neurotoxina CH_3Hg^+ formada en el medio ambiente por la acción de las bacterias anaerobias y acumuladas en la estructura de los integrantes de la cadena trófica, fundamentalmente por parte de los peces.

1.4.5.3. Acción de la endotoxina.

Las bacterias del género *Desulfovibrio* son gramnegativas. Como en todos estos microorganismos, la parte más externa de la pared celular se corresponde con el lipopolisacárido (LPS). En él se distinguen tres zonas: el polisacárido O (antígeno somático o antígeno O), el núcleo polisacárido (core o antígeno R) y el lípido A (endotoxina); esta última zona contacta con la doble capa fosfolipídica de la pared celular. El lípido A es la estructura más conservada del lipopolisacárido, a la vez que muy inmunógena. La endotoxina está constituida por N-acetil-glucosamina y ácidos grasos saturados. **Wolny, D. et al.** (2011) comprobaron que la composición en ácidos grasos saturados del lípido A de *D. desulfuricans* es similar a la que presenta la endotoxina de *Escherichia coli* y *Salmonella entérica*. La endotoxina, durante la infección se libera tras la lisis y en el proceso de división de las bacterias. Esta sustancia, cuando se encuentra en la sangre, interacciona con los componentes del sistema inmunitario, especialmente con los monocitos y los macrófagos, provocando en ocasiones shock endotóxico e incluso la muerte del hospedador. Se une a receptores específicos existentes en las células del sistema inmunitario y estimula en ellas la formación de mediadores de la inflamación como interleucinas, factor de necrosis tumoral α , interferón y prostaglandinas.

Se ha demostrado que el LPS procedente de dos cepas de *D. desulfuricans* aisladas una del suelo y otra del tracto intestinal, no estimulan la secreción de IL-8 por parte de las células epiteliales intestinales humanas (**Weglarz, L. et al.**, 2003a). Por el contrario, la endotoxina activa las células endoteliales vasculares para que expresen en su superficie moléculas de adhesión como la selectina-E (también llamada CD62E o ELAM-1) y VCAM-1 (CD106) e incrementen la secreción de IL-8 e IL-6 (**Weglarz, L. et al.**, 2003b). Así mismo, se ha observado que el LPS de las cepas de referencia activa las células mononucleares de la sangre periférica para que aumenten la producción de TNF- α . Estos resultados, ponen de manifiesto que el LPS de *D. desulfuricans* puede ser un factor de patogenicidad que juegue un papel relevante en las bacteriemias provocadas por estos microorganismos (**Weglarz, L. et al.**, 2006).

Dzierzewicz, Z. et al. (2010) investigaron la influencia del lipopolisacárido endotóxico de la pared celular de *D. desulfuricans* en la inflamación periodontal de los

seres humanos. Los experimentos se llevaron a cabo con la línea de fibroblastos HGF-1 procedente de la gingiva humana. Las células se sometieron a la acción del LPS obtenido a partir de cepas de *D. desulfuricans* de origen intestinal y de la cepa tipo 2226 conseguida del suelo, del butirato sódico y de la IL-1 β . La respuesta de los fibroblastos se evaluó midiendo mediante la técnica ELISA, la secreción de las citocinas IL-6 e IL-8. Se apreció que el LPS no desencadena una gran inhibición del crecimiento de los fibroblastos, excepto cuando se sometían a altas concentraciones (100 μ g/ml) de la endotoxina de la cepa intestinal. Así mismo, se observó que la endotoxina de *D. desulfuricans* aumenta la secreción de IL-6 e IL-8 por parte de los fibroblastos. Por otro lado, se apreció que los fibroblastos estimulados con la citocina proinflamatoria IL-1 β aumentaban considerablemente la secreción de las dos citocinas de referencia. Del mismo modo, se constató que la producción de IL-6 e IL-8 tras la inducción por la endotoxina e IL-1 β se regulaba mediante la acción del ácido butírico. Estas investigaciones sugieren que *D. desulfuricans* puede participar en la patogénesis de la periodontitis humana. En el mismo sentido, el butirato presente en la cavidad oral puede comportarse como un factor regulador en la producción de citocinas por parte de los fibroblastos gingivales en condiciones fisiológicas y durante la inflamación provocada por *D. desulfuricans*.

Zhang-Sun, W. et al. (2015) observaron que las BASR, incluyendo las integrantes de la familia *Desulfovibrionaceae*, aumentan en número de forma considerable en las personas alimentadas con dietas ricas en grasas. Aislaron a partir de un individuo sano una cepa de *D. desulfuricans*. Seguidamente, caracterizaron exhaustivamente el lípido A de la pared celular y observaron que ejerce un efecto inflamatorio sobre la mucosa intestinal. Así mismo, constataron que la endotoxina tiene una gran relevancia en el desencadenamiento de procesos como la obesidad y la diabetes.

La disbiosis intestinal y la liberación por parte de algunas de estas bacterias de gran cantidad de LPS tienen una gran relevancia en la patogénesis de las enfermedades hepáticas. Sin embargo, todavía no está demostrada la relación directa de los factores anteriormente citados con el desarrollo de la esteatosis hepática y su subsecuente deriva a la esteatohepatitis no alcohólica, así como con el carcinoma hepatocelular. Con el objeto de poner algo de luz en esta cuestión, **Xie, G. et al.** (2016) emplearon como modelo ratones de la cepa NASH-HCC C57BL/6J, que alimentaron con una dieta a base

de streptozotocina y gran cantidad de grasa. Analizaron la correlación existente entre los cambios producidos en la micropoblación intestinal, la concentración del LPS en plasma, hígado y heces con la aparición de los procesos patológicos indicados anteriormente en el hígado. Tras comparar los resultados con los obtenidos en los ratones testigos, constataron un aumento poblacional de *Atopobium spp.*, *Bacteroides spp.*, *B. vulgatus*, *B. acidifaciens*, *B. uniformis*, *Clostridium cocleatum*, *C. xylanolyticum* y *Desulfovibrio spp.* Así mismo, se detectó una gran correlación entre el aumento de estas bacterias con el propio del LPS en plasma, hígado, heces y con las manifestaciones fisiopatológicas en el hígado. Los investigadores sostienen que existe una correlación directa entre el equilibrio ecológico de la micropoblación bacteriana del tracto intestinal y la aparición de enfermedades hepáticas. Sobre la base de esta afirmación, se abrirán (sin lugar a dudas) nuevas líneas de investigación encaminadas a la prevención y el tratamiento de las enfermedades hepáticas crónicas y del carcinoma hepatocelular.

1.4.5.4. Derivados del lactato.

Las BASR son capaces de metabolizar algunos compuestos orgánicos y formar a partir de ellos lactato. Éste es oxidado por diferentes especies, dando lugar a la formación de ácidos grasos volátiles como piruvato, acetato, propionato y butirato, que a su vez son degradados por otras BASR u otros microorganismos. Los desulfovibrios elaboran eficazmente butirato a partir del lactato, el cual es un importante donador de electrones en el proceso de reducción del sulfato a sulfuro de hidrógeno. Algunas BASR pueden fermentar tres moléculas de lactato y producir dos de propionato (**Bertolino, S.M. et al.**, 2012; **Finegold, S.M.**, 2011; **Vita, N. et al.**, 2015).

1.4.5.5. Otros posibles factores de virulencia.

Campbell, A.G. et al. (2013) estudiaron diversos genomas bacterianos para comprender mejor las funciones de las bacterias pertenecientes a la clase IV *Deltaproteobacteria* presentes en la cavidad oral y que aún no han sido cultivadas. Tomaron muestras de las lesiones de cuatro personas que padecían periodontitis y aislaron bacterias de los géneros *Desulfobulbus* (Dsb5) y *Desulfovibrio* (Dsv1). Observaron que ambas cepas poseen genes que facilitan su poder patógeno. En el caso de los desulfovibrios apreciaron la existencia de genes comunes con las cepas que habitan en el medio ambiente, pero al tiempo detectaron otros muchos que solo poseen los microorganismos relacionados con el hospedador.

Las cepas bacterianas patógenas que ejercen su acción en la cavidad oral humana elaboran posibles factores de virulencia. En este sentido, se detectan genes relacionados con la adherencia, la defensa, la absorción de determinados nutrientes, la adaptación a las condiciones adversas o estrés, la interacción con las células del hospedador y con otros microorganismos que se encuentran en las lesiones de ese hábitat orgánico. Los autores de referencia pusieron de manifiesto algunos de ellos en las cepas Dsb5 y Dsv1.

El hierro es un elemento esencial para el desarrollo de múltiples procesos metabólicos. La capacidad para adquirir esta sustancia es particularmente importante en las bacterias relacionadas con el ser humano, pues el elemento apenas está disponible ya que se encuentra unido a ciertas proteínas del hospedador. En la cavidad oral, la mayoría del hierro se encuentra unido a la proteína lactoferrina. La bacteria patógena emplea varios genes para adquirir el elemento. Dsb5 y Dsv1, además de los sistemas tradicionales de adquisición del hierro (receptores TonB-dependientes, proteína A transportadora de hierro ferroso, sideróforo que posee el sistema transportador ABC-tipo Fe³⁺, etc.), elaboran una hemolisina.

Dsb5 y Dsv1 agrupan genes que codifican la síntesis de una gran variedad de transportadores y sistemas que protegen a las cepas frente a la acción de diversos antimicrobianos. También poseen genes que facilitan la aerotolerancia y la síntesis de las proteínas UspA y Clp que protegen frente al estrés. Así mismo, se demostró la

existencia de genes que permiten la adherencia de las cepas a las células del hospedador, como los *pili* tipo IV, antígenos superficiales, lipoproteínas, péptido tetrático repetido (TPR) y dipéptido YD que contiene dominios repetidos. Igualmente, elaboran muchas proteasas y peptidasas, que permiten la degradación de algunas proteínas del hospedador, cuyos elementos resultantes son nutrientes para las cepas y contribuyen a la citotoxicidad que originan en las periodontitis.

Últimamente, se han demostrado en las cepas Dsb5 y Dsv1 muchos genes relacionados con el metabolismo de los polisacáridos. En Dsb5 se han puesto de manifiesto genes implicados en la síntesis de polisacáridos extracelulares y de la cápsula. La presencia de esta última, otorga muchas ventajas al microorganismo pues le permite luchar contra las defensas específicas e inespecíficas del sistema inmunitario y adherirse a determinadas superficies de la cavidad oral del hospedador.

1.4.6. Poder patógeno de los desulfovibrios para el ser humano.

La relación de los desulfovibrios con la enfermedad en el ser humano es un hecho que se conoce desde hace muy pocas décadas. En la actualidad, son bacterias ignoradas por parte de los profesionales de muchos laboratorios de microbiología clínica, ya que su aislamiento e identificación requieren cierta especialización del personal sanitario. Un hecho adicional que ha retrasado la determinación del poder patógeno es la implicación fundamental en personas a partir de los sesenta años de edad que padecen trastornos orgánicos diversos, generalmente poco controlados. Además, como muchas bacterias anaerobias, colaboran con otros microorganismos (polimicrobismo) en el desencadenamiento de la enfermedad, lo que hace que en muchos casos pasen desapercibidas. La novedad del tema obliga a llevar a cabo una descripción exhaustiva y cronológica de la participación de estas bacterias en algunos procesos infecciosos en el ser humano.

1.4.6.1. Abscesos y otros procesos purulentos.

En el año 1987, **Johnson, C.C. et Finegold, S.M.** investigaron los bacilos gramnegativos, móviles y anaerobios relacionados con la aparición de procesos infecciosos en el *Veterans Administration Wadsworth Medical Center* de California (USA). Aislaron en cultivo puro a partir del líquido peritoneal procedente de un paciente que presentaba un absceso abdominal y que no había recibido tratamiento antimicrobiano, una cepa que reducía el sulfato a sulfuro de hidrógeno y que identificaron como *D. vulgaris*. Los autores afirmaron que la especie bacteriana provenía del tracto intestinal. Además, estudiaron la sensibilidad a los antimicrobianos del microorganismo aislado. Para ello, emplearon dos métodos: dilución en agar y dilución en medio de cultivo líquido. Tras dichos estudios apreciaron que *D. vulgaris* era sensible a la penicilina G, clindamicina, cloranfenicol, tetraciclina y eritromicina. Sin embargo, se mostró resistente a la acción de la vancomicina y colistina.

Baron, E.J. et al. (1992) realizaron un estudio microbiológico en 20 pacientes que presentaban un cuadro de apendicitis aguda y en otros 19 enfermos que sufrían apendicitis perforada o gangrenosa. El estudio se llevó a cabo a partir del líquido peritoneal y del tejido del apéndice. Las muestras se sembraron en medios de cultivo para anaerobios (agar sangre Brucella, etc.) y en otros para aerobios (agar sangre tripticosa soja, etc.). Las placas se incubaron, en el primer caso, en condiciones de anaerobiosis y, en el segundo, en aerobiosis. Se aislaron un total de 235 cepas bacterianas. Dos de ellas pertenecieron al género *Desufovibrio*. Éstas se aislaron a partir del apéndice y del líquido peritoneal: una correspondió a una apendicitis aguda y la otra a una apendicitis perforada.

Tee, W. et al. (1996) estudiaron un paciente de 80 años que padecía un proceso febril de tres semanas de duración. Diagnosticaron en el enfermo la existencia de un absceso hepático. Tomaron muestras del interior del mismo y las sembraron en un medio líquido de enriquecimiento para bacterias anaerobias. Alícuotas del mismo se subcultivaron en agar sangre y en agar chocolate. Las placas se incubaron en condiciones de anaerobiosis a 37°C durante 10 días. En la superficie del agar aparecieron unas colonias pequeñas y redondeadas. Tras realizar la tinción de Gram, se apreciaron formas vibrioides y espirales gramnegativas. Por microscopía electrónica se

observó la presencia de un flagelo polar. Los aislados se sometieron a diversas pruebas bioquímicas empleadas para identificar las bacterias anaerobias, así como a la prueba de la desulfoviridina, específica de los desulfovibrios, que pusieron de manifiesto que se trataba de una bacteria perteneciente al género *Desulfovibrio* (cepa FH26001/95, ATCC 700045). La secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S demostró que tenían una homología del 97% con *D. desulfuricans*, diferenciándose con esta especie en 45 nucleótidos, lo que indujo a pensar a los investigadores que se podría tratar de una nueva especie de este género. En las placas de cultivo, junto a las colonias formadas por los desulfovibrios aparecieron otras cuyos microorganismos fueron identificados como *Fusobacterium varium*.

Así mismo, investigaron la sensibilidad de los desulfovibrios a diferentes antimicrobianos mediante las técnicas de difusión en disco y el E-test. Comprobaron que eran resistentes a la penicilina, ampicilina, ciprofloxacina y cloranfenicol. Sin embargo, se mostraron sensibles a la acción del metronidazol.

Posteriormente, **Schoenborn, L. et al.** (2001) realizaron un estudio más exhaustivo para caracterizar la cepa FH26001/95 (ATCC 700045). Llevaron a cabo un análisis comparativo de la secuencia del gen que codifica el ARNr 16S con otros microorganismos relacionados y comprobaron que la cepa estaba relacionada con los integrantes del subgrupo delta de las proteobacterias, dentro del *cluster* de las bacterias sulfatorreductoras (*Desulfovibrio spp.*) y no sulfatorreductoras (*Bilophila wadsworthia* y *Lawsonia spp.*). El fenotipo de la cepa se correspondió con el típico de las bacterias del género *Desulfovibrio*. Así mismo, se constató que la utilización de los nutrientes necesarios para su desarrollo y crecimiento se llevó a cabo en una atmósfera que contenía una concentración de oxígeno entre el 2 y el 5% (vol/vol), pero no se realizó a la concentración atmosférica del 21%. El aislamiento de esta cepa a partir del absceso hepático de una persona, puso de manifiesto la posibilidad de que algunos integrantes del género *Desulfovibrio* puedan ser considerados como microorganismos patógenos oportunistas.

Los abscesos cerebrales son poco frecuentes en la especie humana. Cuando aparecen, se aprecia que tienen una etiología polimicrobiana, predominando las bacterias anaerobias. **Lozniewski, A. et al.** (1999) investigaron un ser humano de 39 años, varón, alcohólico, que presentaba un cuadro de fiebre, sinusitis maxilar, dolor de

cabeza, rigidez de la nuca, gingivitis, caries dental y, en general, con una mala higiene bucal; que fue tratado con 400 mg/día de cefpodoxime por vía oral. Al paciente se le realizó una tomografía computarizada craneal (TAC), detectándose un absceso cerebral. El pus se cultivó, por un lado, en agar sangre Wilkins-Chalgren, en condiciones de anaerobiosis; y por otro, en agar sangre bajo una atmósfera que contenía un 10% de CO₂. En el primer caso, se aisló *Capnocytophaga* sp., *Eubacterium exiguum* y *Desulfovibrio* sp. En el segundo, obtuvieron una cepa de *Streptococcus constellatus*. Los investigadores, pues, describieron por primera vez el aislamiento de un desulfovibrio a partir de un absceso cerebral de etiología polibacteriana. Los autores infirieron que las bacterias procedían de las lesiones de la boca y de los senos nasales.

A continuación, sometieron a todos los aislados a la acción de diversos antimicrobianos mediante la técnica de dilución en agar. Observaron que los desulfovibrios fueron los que mostraron una mayor resistencia a las sustancias probadas. Así, se mostraron resistentes a la acción de la amoxicilina, piperacilina, cefotaxima, pefloxacima y fosfomicina. Sin embargo, fueron sensibles a la amoxicilina-ácido clavulánico, imipenem y metronidazol; coincidiendo en este último resultado con el obtenido por Tee, W. *et al.* (1996).

Lozniewski, A. *et al.* (2001) estudiaron la sensibilidad de 16 cepas de *Desulfovibrio* spp. a diferentes antimicrobianos. Los desulfovibrios fueron aislados a partir de enfermos del *Hospital Center of Nancy* (Nancy, Francia) durante el periodo de tiempo comprendido entre los años 1992 y 1999. Los aislados tuvieron los siguientes orígenes: sangre (3 cepas), absceso hepático (1 cepa), pus intraabdominal (11 cepas) y absceso cerebral (1 cepa). Para calcular las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI₉₀) se utilizó el método de dilución en agar, empleando como medio de cultivo agar Brucella suplementado con un 5% de sangre desfibrinada de oveja, 5 µg/ml de hemina y 1 µg/ml de vitamina K₁. Los aislados fueron sensibles a:

- Imipenem.....CMI₉₀ 0,5 µg/ml.
- Metronidazol.....CMI₉₀ 0,25 µg/ml.
- Clindamicina.....CMI₉₀ 4 µg/ml.
- Cloranfenicol.....CMI₉₀ 16 µg/ml.

Se mostraron resistentes o intermedios a:

Introducción

- Penicilina G.....CMI90 64 µg/ml.
- Piperacilina.....CMI90 256 µg/ml.
- Piperacilina-Tazobactam.....CMI90 256 µg/ml.
- Cefoxitina.....CMI90 >256 µg/ml.
- Cefotetan.....CMI90 64 µg/ml.

Entre las cepas que mostraron una disminución de la sensibilidad a los antibióticos betalactámicos (un total de 15), 6 de ellas produjeron β -lactamasas y fueron sensibles a la acción de la amoxicilina-ácido clavulánico y ticarcilina-ácido clavulánico.

En el hospital universitario de Nancy (Francia) se aislaron a partir de personas hospitalizadas 13 cepas pertenecientes al género *Desulfovibrio*: 9 se obtuvieron del pus procedente de infecciones intraabdominales, 2 de procesos septicémicos y 1 de un absceso cerebral. Las muestras se sembraron en agar chocolate y se incubaron en condiciones de anaerobiosis a 37°C, durante 4 a 6 días. Tras realizar las pruebas bioquímicas correspondientes y efectuar la caracterización del gen que codifica el ARNr 16S, 8 cepas fueron identificadas como *D. fairfieldensis* y las restantes como *D. desulfuricans*. Seguidamente, se investigó la producción de β -lactamasas por parte de los aislados y la presencia del gen *bla_{DES-1}*, que codifica su síntesis. El gen no fue identificado en ninguna de las cepas aisladas de la especie *D. fairfieldensis*. Sin embargo, se encontró en algunas (aunque no en todas) de las cepas de *D. desulfuricans* (Morin, A.S. et al., 2002).

Loubinoux, J. et al. (2003) analizaron en el hospital universitario de Estrasburgo (Francia), durante unos seis meses, material purulento de 100 pacientes (55 mujeres y 45 hombres), con una edad media de 57 años (rango entre 2 y 95 años), obtenido en los servicios de cirugía tras llevar a cabo los correspondientes procesos quirúrgicos. El objetivo fue determinar la prevalencia de las BASR en el pus procedente de infecciones abdominales y pleurales.

Para cultivar las BASR, tomaron 200 µl de cada muestra de pus y los inocularon en el medio líquido descrito por Loubinoux, J. et al. (2002b). Una vez efectuada la siembra, el medio de cultivo se incubó a 37°C durante un mes en condiciones de anaerobiosis. La presencia de BASR se puso de manifiesto por la aparición de un precipitado negro de sulfito ferroso. A partir de dicho material se realizó una PCR

múltiple para identificar las especies bacterianas, según el método propuesto por **Loubinoux, J. et al.** (2002b).

Se aislaron BASR de 12 muestras. Todas ellas fueron de origen abdominal: 10 de líquidos peritoneales y 2 de colecciones de pus intraabdominales. Las BASR encontradas procedieron de pacientes con peritonitis, apendicitis y de un absceso aparecido tras la intervención quirúrgica de un cáncer rectal. Mediante la PCR múltiple se identificaron 7 cepas de *D. piger*, 4 de *D. fairfieldensis* y 1 de *D. desulfuricans*. En todos los casos, las BASR formaron parte de una micropoblación bacteriana mixta aerobia y anaerobia. No se aislaron BASR a partir de las 12 muestras tomadas de fluidos pleurales purulentos. Los resultados obtenidos sugieren que las BASR aisladas del pus abdominal procedían del tracto intestinal. Aunque se aisló *D. fairfieldensis*, esta especie se encuentra con poca frecuencia en el intestino y en el material purulento abdominal; sin embargo, se aísla en mayor número de ocasiones a partir de la sangre (**Loubinoux, J. et al.**, 2000; **McDougall, et al.**, 1997) y de las placas periodontales de los enfermos con periodontitis, lo que explicaría su carácter invasivo (**Loubinoux, J. et al.** 2002a; **Tee, W. et al.**, 1996). El hecho de aislar solo una cepa de *D. desulfuricans* puso de manifiesto que esta especie se encuentra con poca frecuencia en el intestino del hombre, tal y como demostraron anteriormente **Loubinoux, J. et al.** 2002b, siendo su hábitat natural el medio ambiente. La especie que se aisló en un mayor número de ocasiones fue *D. piger*. Esta especie bacteriana, nunca había sido aislada a partir de material procedente de infecciones extraabdominales, lo que hace pensar que por su ubicación orgánica está relacionada con el desencadenamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (**Loubinoux, J. et al.** 2002b), aunque su verdadero papel no era conocido.

Warren, Y.A. et al. (2005) caracterizaron y diferenciaron mediante pruebas bioquímicas 17 cepas del género *Desulfovibrio* de origen humano que fueron aisladas durante varios años en California (USA). 15 cepas procedieron de enfermos que padecían infecciones intraabdominales y 2 se aislaron a partir de la sangre. Se emplearon las siguientes pruebas: sensibilidad a la kanamicina, vancomicina y colistina, catalasa, indol, nitratos, crecimiento en 10% de bilis, urea, estimulación por formato sódico/fumarato sódico (F/F), movilidad, desulfovirdina y detección de la producción de H₂S en el medio sulfito-indol-movilidad (SIM). Todos los aislados produjeron desulfovirdasa y H₂S, fueron móviles (salvo las 2 cepas de *D. piger*), crecieron en 10%

de bilis (con la excepción de las 3 cepas de *D. desulfuricans*), se mostraron resistentes a la vancomicina y colistina y sensibles a la kanamicina. Las pruebas restantes, permitieron diferenciar las siguientes especies: 2 *D. piger* (aisladas a partir de líquido peritoneal), 10 *D. fairfieldensis* (5 de líquido peritoneal, 2 de abdomen, 1 de pelvis, 1 de sangre y 1 de cáncer de colon), 3 *D. desulfuricans* (2 de líquido peritoneal y 1 de sangre) y 2 *D. vulgaris* (1 de líquido peritoneal y 1 de abdomen). También estudiaron la sensibilidad de los aislados a diferentes antimicrobianos. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que todas las cepas fueron sensibles al cloranfenicol y metronidazol. La mayoría se mostraron sensibles al imipenem y la clindamicina. En general, se apreció resistencia a la penicilina. *D. fairfieldensis* fue la especie que mostró mayores resistencias: los 10 aislados se comportaron como resistentes a la piperacilina-tazobactam y a la ceftriaxona; la mayoría también lo fueron a la ticarcilina-ácido clavulánico, cefoxitina y ertapenem. *D. vulgaris* fue sensible a la acción de todos los antimicrobianos probados. Solo en 3 cepas del total de las investigadas se demostró la producción de beta-lactamasas.

Vasoo, S. et al. (2014), aislaron en el laboratorio de microbiología clínica de la Clínica Mayo (USA) durante el año 1997, *D. piger* a partir del líquido peritoneal de un enfermo que padecía una apendicitis aguda perforada. Así mismo, apreciaron que el microorganismo era sensible a la acción de la clindamicina y del metronidazol; sin embargo, fue resistente a la penicilina.

1.4.6.2. Bacteriemias.

El primer caso de una bacteriemia provocado por un microorganismo del género *Desulfovibrio* fue descrito en California (USA), en el año 1977, por **Porschen, R.K. et Chan, P.** Al *Long Beach Veterans Administration Hospital* llegó un paciente de 67 años que mostraba una sintomatología variada, en el que se apreciaron sepsis, coledocolitiasis y alteraciones del tracto gastrointestinal. Tomaron sangre de la persona, que sembraron en un medio líquido para el enriquecimiento de las bacterias anaerobias. A partir del mismo se llevaron a cabo subcultivos en agar sangre Brucella-menadiona. Las placas se incubaron en condiciones de anaerobiosis. A las 72 horas aparecieron en

la superficie del agar unas colonias pequeñas, no hemolíticas, circulares, convexas y semitransparentes. Al examinarlas con el microscopio, se observaron bacterias polimorfas típicas de *D. desulfuricans*. Seguidamente, sometieron a la cepa a diferentes pruebas bioquímicas, destacando su positividad a la desulfovirdina y la producción de ácido acético mediante cromatografía de gases. Las pruebas realizadas permitieron clasificar al microorganismo como *D. desulfuricans*. Años más tarde, **Warren, Y.A. et al.** (2005) sospecharon que podía tratarse de *D. fairfieldensis*. Se sugirió que la puerta de entrada de esta bacteria para llegar a la sangre fue el tracto gastrointestinal. Así mismo, estudiaron la sensibilidad de la cepa a diferentes antimicrobianos mediante la técnica de dilución en un medio de cultivo líquido con discos de antibióticos; apreciaron que era sensible a la penicilina (2 U/ml), clindamicina (1,6 µg/ml), cloranfenicol (12 µg/ml), tetraciclina (6 µg/ml) y eritromicina (3 µg/ml).

McDougall, R. et al. publicaron, en el año 1997, un trabajo de investigación realizado en Australia. Relatan que se encontraron ante un paciente de 75 años, que presentaba un cuadro febril desde hacía tres días, escalofríos, sudoración, debilidad y anorexia. Fue tratado con cefalexina por vía oral durante cinco días sin producirse ninguna mejoría. Ante semejante cuadro clínico, tomaron muestras de sangre del enfermo y las sembraron en un medio líquido apropiado para el cultivo de las bacterias anaerobias, que incubaron en anaerobiosis durante seis días. Transcurrido el tiempo de incubación observaron su contenido mediante el microscopio de contraste de fase, apreciando bacterias espirales y muy móviles. A continuación, realizaron subcultivos en agar Wilkins-Chalgren con un 4% de sangre de caballo. Las placas se incubaron a 37°C en condiciones de anaerobiosis durante cinco días. En la superficie del agar encontraron unas colonias de 1mm de diámetro, que recordaban a la cabeza de un alfiler, no hemolíticas, grises, redondeadas y brillantes. Mediante la microscopía electrónica de transmisión, observaron que se trataba de bacterias curvadas mezcladas con bacilos sigmoideos, que tenían un largo flagelo polar. Los microorganismos fueron sometidos a diversas pruebas bioquímicas, apreciando que producían desulfovirdasa y que formaban gran cantidad de sulfuro de hidrógeno a partir del sulfato. La secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S, puso de manifiesto que se trataba de una cepa del género *Desulfovibrio*, que tenía una homología del 97% con la cepa tipo de este género, *D. desulfuricans* ATCC 27774, con la que se diferenciaba en 45 nucleótidos. Los estudios genéticos realizados pusieron de manifiesto que mostraba el mismo perfil que

la cepa aislada por **Tee, W. et al.** en el año 1996. También estudiaron la sensibilidad a los antimicrobianos de la cepa de referencia. Para ello, emplearon dos técnicas: difusión en disco y E-test. Constataron que la cepa era resistente a la penicilina, ampicilina, cefalotina, cefaclor, ticarcilina, trimetropim, sulfametoxazol-trimetropim, gentamicina, cefotaxima y vancomicina. Sin embargo, se mostró sensible a la acción del metronidazol, cloranfenicol, ciprofloxacina, imipenem, amoxicilina-ácido clavulánico, ticarcilina-clavulánico y azitromicina.

Una persona de 23 años, con antecedentes de padecer úlcera de estómago, ingresó en el hospita l *Saint-Avold* de la región de *Lorraine* (Francia) con un cuadro de apendicitis perforada. Ante la gravedad del paciente, se tomó una muestra de sangre y se envió al Laboratorio del Hospital Universitario de Nancy para realizar un análisis bacteriológico (**Loubinoux, J. et al.**, 2000). La muestra se sembró en un medio de cultivo líquido para el crecimiento de las bacterias anaerobias y así lograr un enriquecimiento bacteriano de la misma. A continuación, se llevó a cabo el subcultivo en agar sangre Wilkins-Chalgren. Las placas se incubaron a 37°C en condiciones de anaerobiosis durante 5 días. En la superficie del agar aparecieron unas colonias puntiformes, no hemolíticas, grises, redondeadas y brillantes. La tinción de Gram puso de manifiesto unos bacilos curvados gramnegativos. El análisis fenotípico de la cepa permitió apreciar las siguientes propiedades de la misma: su movilidad, la producción de desulfoviridasa y la producción de H₂S a partir del sulfato. Estos datos orientaron la identificación hacia una bacteria del género *Desulfovibrio*. Para completar el proceso de caracterización, se realizó el análisis y secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S, que se comparó con todas las secuencias conocidas de las especies integrantes del género *Desulfovibrio*. Los investigadores constataron que el gen de la cepa aislada tenía una homología del 99,9% con la descrita para el mismo gen de *D. fairfieldensis*, diferenciándose solo en dos nucleótidos.

Al mismo tiempo, investigaron la sensibilidad de la cepa hallada a diferentes antimicrobianos mediante el método de la dilución en agar. Se apreció que el aislado era resistente a la penicilina G, amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, ticarcilina, ticarcilina-clavulánico, piperacilina, piperacilina-tazobactam, cefoxitina, cefotetan y cefotaxima. Sin embargo, se mostró sensible al metronidazol, imipenem y clindamicina.

Por otro lado, los mismos investigadores examinaron 8 cepas pertenecientes al género *Desulfovibrio*, que habían sido obtenidas de 7 pacientes a lo largo de 5 años. Del enfermo nº 3 se aislaron dos cepas diferentes: D31 y D32. Las cepas D1, D2, D31, D5 y D7 se aislaron de diferentes tipos de abscesos: uno cerebral, otro apendicular y tres abdominales, respectivamente; y las cepas D32, D4 y D6 se consiguieron a partir de la sangre de los enfermos. El aislado D4 fue el único que se obtuvo en cultivo puro. En todos los casos, se analizó y secuenció el gen que codifica la síntesis del ARNr 16S. Sobre la base de los resultados obtenidos, los aislados se diferenciaron en tres grupos: las cepas D1 y D2 presentaron una homología del 99,4% con *D. desulfuricans* Essex 6 (ATCC 29577); D4 y D5, por un lado, y D6 y D7, por otro, mostraron una homología del 99,9% y 99,1% con *D. fairfieldensis*, respectivamente; D31 y D32 presentaron una homología del 99,9% con *D. desulfuricans* MB (ATCC 27774). Las cepas de cada grupo tuvieron una homología con las de los otros de al menos el 97,3%. Hoy día se afirma que una homología del gen que codifica la síntesis del ARNr 16S entre dos cepas inferior al 98%, indica que se trata de especies bacterianas diferentes de un mismo género.

Goldstein, E.J.C. et al. (2003) publicaron un caso referido a un hombre de 64 años, que padecía fuertes dolores de cabeza, gran malestar, zumbido en los oídos y elevada fiebre. La persona se presentó en los Ángeles (California, USA) después de pasar una estancia de un mes entre Francia, España y Portugal. Al día siguiente de llegar a los Ángeles desarrolló una intensa diarrea. No tuvo especial contacto con animales durante el periplo europeo. En el hospital le hicieron pruebas de brucelosis, leptospirosis, sífilis y borreliosis; los resultados fueron negativos en todos los análisis. El enfermo se trató de forma empírica con 100 mg de doxiciclina, administrada dos veces al día por vía intravenosa. La fiebre desapareció a las 24 horas. Antes de llevar a cabo el tratamiento, se tomaron muestras de sangre del enfermo y se sembraron en un medio de cultivo líquido de enriquecimiento. La incubación se llevó a cabo en condiciones de anaerobiosis durante 60 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizó una tinción de Gram a partir del medio de cultivo. Aparecieron bacilos espirales gramnegativos. A continuación, se llevó a cabo el subcultivo en agar sangre anaeróbico CDD. Las placas se incubaron a 35°C en condiciones de anaerobiosis durante 4 días. En la superficie del agar aparecieron unas colonias pequeñas y transparentes. Los microorganismos se sometieron a diferentes pruebas para su

caracterización. Todos produjeron desulfoviridasa y H₂S. También se constató que eran móviles. Para profundizar en la identificación analizaron y secuenciaron el gen que codifica la síntesis del ARNr 16S. Los investigadores concluyeron que se trataba de una cepa de *D. desulfuricans*. Como la cepa aislada era β-lactamasa positiva, procedieron a estudiar exhaustivamente la sensibilidad a los antimicrobianos. Emplearon el método de dilución en agar. Los resultados de las CMI's fueron los siguientes: penicilina, >4µg/ml; amoxicilina-ácido clavulánico, 0,5 µg/ml; ampicilina-sulbactam, 1,0 µg/ml; piperacilina-tazobactam, 64/4 µg/ml; ticarcilina-clavulánico, 2/2 µg/ml; ceftriaxona, 16 µg/ml; cefoxitina, >128µg/ml; levofloxacin, 0,5 µg/ml; moxifloxacin, gatifloxacin y metronidazol, 0,125 µg/ml; clindamicina, 0,25 µg/ml; cloranfenicol, 8 µg/ml e imipenem y ertapenem, 0,25 µg/ml. Mediante la técnica E-test apreciaron una CMI para la doxiciclina de 0,38 µg/ml. Tras la obtención de estos resultados, los investigadores afirmaron que el imipenem y el metronidazol son los antimicrobianos eficaces para tratar este tipo de procesos infecciosos.

En enero de 2007, ingresa en el *Royal Prince Alfred Hospital* de *Camperdown* (NSW, Australia) un hombre de 77 años aquejado de un cuadro de coledocolitiasis. El enfermo presentaba rigidez, fiebre de 37,4°C, ausencia de dolor abdominal, náuseas, vómitos y las constantes hemodinámicas estables. Se tomaron muestras de sangre de la persona. A continuación, se le administraron 3,1 g de ticarcilina-ácido clavulánico por vía intravenosa cada 6 horas. La fiebre remitió al día siguiente. A los 4 días, el tratamiento se sustituyó por otro a base de 500 mg de doxiciclina administrados por vía oral cada 12 horas, que condujo a la *restitutio ad integrum* de la persona. Las muestras de sangre se sembraron en un medio de cultivo de enriquecimiento para bacterias anaerobias, que se incubó en condiciones de anaerobiosis durante 4 días. La tinción de Gram, realizada a partir del medio de cultivo de enriquecimiento, puso de manifiesto la existencia de bacilos curvados gramnegativos. Mediante el microscopio de contraste de fase se apreció la movilidad de dichos microorganismos. Seguidamente, sembraron muestras procedentes del medio líquido en agar sangre de caballo; las placas se incubaron a 37°C en condiciones de anaerobiosis durante 4 días. Transcurrido dicho tiempo, se detectaron unas colonias pequeñísimas y transparentes, que observadas al microscopio óptico ponían de manifiesto unos bacilos curvados gramnegativos. Las bacterias resultaron ser catalasa, H₂S y desulfoviridina positivos; por el contrario, se mostraron oxidasa, indol y urea negativos. Las pruebas realizadas indicaron que se

trataba de una cepa del género *Desulfovibrio*. Para averiguar a qué especie pertenecía, se secuenciaron los primeros 500 pares de bases del gen que codifica el ARNr. Se constató que tenían una homología del 100% con las cepas AJ251630 y AF192155 de *D. fairfieldensis*; y de un 99% con la cepa U42221, correspondiente al primer aislado de dicha especie bacteriana. Al mismo tiempo, se estudió la sensibilidad del microorganismo a diferentes antimicrobianos mediante la técnica E-test. Los resultados obtenidos demostraron que la cepa fue resistente a la ticarcilina-ácido clavulánico (CMI, >256 mg/litro), pero sensible al metronidazol (CMI, 0,002 mg/litro) y ciprofloxacina (CMI, 0,5 mg/litro) (Pimentel, J.D. et Chan, R.C., 2007).

El primer caso de una enfermedad infecciosa humana causada por una bacteria del género *Desulfovibrio* en Japón, fue publicado por Urata, T. et al. (2008). En el servicio de urgencias de un hospital japonés ingresó una mujer de 69 años que padecía una degeneración cerebeloespinal desde hacía un año, y que llevaba postrada en la cama mes y medio. La señora tenía fiebre, diarrea, hipotensión y pérdida de consciencia. Se tomaron muestras de sangre que se sembraron en el medio líquido de enriquecimiento BacT/ALERT 3D (BioMérieux) y se incubaron en anaerobiosis. Al cuarto día se observaron en el medio líquido bacilos gramnegativos pleomórficos. A partir del sedimento del medio de referencia, se llevaron a cabo subcultivos en agar Brucella HK. Las placas se incubaron en anaerobiosis a 37°C durante 5 días. Crecieron unas colonias pequeñas, translúcidas y no hemolíticas. Las bacterias eran móviles, catalasa positivas, elaboraban sulfuro de hidrógeno y producían desulfoviridasa. No fabricaban penicilina ni cefalosporinasa. Para profundizar en la caracterización de la cepa aislada, se analizó la secuencia del gen que codifica el ARNr 16S. Los investigadores constataron que tenía una homología del 99,9% con la secuencia del mismo gen de la cepa U42221 de *D. fairfieldensis*. Así mismo, se investigó la sensibilidad del aislado a diferentes antimicrobianos. Para dicho cometido, se empleó el método E-test. Los resultados de las CMIs fueron los siguientes: ampicilina (24 µg/ml), amoxicilina-ácido clavulánico (2/1 µg/ml), ceftriaxona (>32 µg/ml), imipenem (3 µg/ml), meropenem (>32 µg/ml), clindamicina (0,25 µg/ml) y metronidazol (<0,016 µg/ml). Igualmente, se estudió la sensibilidad frente a 5 carbapenems. El método utilizado fue la microdilución en medio líquido. Se hallaron los siguientes resultados de las CMIs: imipenem (4 µg/ml), panipenem (>16 µg/ml), meropenem (>16 µg/ml), biapenem (<0,5 µg/ml) y doripenem (2 µg/ml). A la vista de los resultados obtenidos, los autores coligieron que la extracción

manual de las heces en la enferma pudo causar daños en la mucosa rectal que facilitaron la entrada de *D. fairfieldensis* en el sistema sanguíneo a partir de este hábitat orgánico.

Una mujer de 86 años vivía sola en una localidad sueca y era asistida por los servicios de bienestar social de una manera afectuosa. En 2009 ingresa en el *Stockholm South General Hospital*. Presentaba fiebre, disnea, diarrea y heridas de decúbito en la zona sacra. Se tomaron muestras de sangre, nasofaringe y de las heridas de decúbito. Las muestras de sangre se cultivaron en el medio líquido de enriquecimiento BacT/ALERT 3D (BioMérieux). A las 52 horas se realizó un subcultivo en placas de agar sangre, que se incubaron en aerobiosis y en jarras de anaerobiosis, y en placas de agar chocolate que se incubaron con un 5% de CO₂. Tras 48 horas de incubación a 37°C, no se apreció crecimiento en las placas incubadas en aerobiosis y bajo una atmósfera de CO₂; sin embargo, en las placas incubadas en anaerobiosis se observaron unas pequeñas colonias que eran inhibidas por discos de metronidazol. Estas placas se reincubaron en anaerobiosis durante 5 días más. Aparecieron dos tipos de colonias: una de ellas estaba formada por bacilos cortos grampositivos no esporulados y la otra por bacilos cortos curvados gramnegativos. A continuación, se procedió a obtener cultivo puro de cada una de ellas. Las colonias formadas por bacilos curvados gramnegativos desprendían un fuerte olor sulfuroso. Para la identificación, se sometieron ambos cultivos a las pruebas API 20A (BioMérieux) y al sistema Vitek 2 (BioMérieux). Los bacilos grampositivos se identificaron como *Eggerthella lenta*. Las otras bacterias no fueron identificadas mediante dichas pruebas. En ambos aislados se procedió a secuenciar el gen que codifica el ARNr 16S. Los bacilos curvados gramnegativos mostraron una homología del 99% con *D. desulfuricans*. Fenotípicamente, los desulfovibrios se mostraron catalasa negativos, sensibles al crecimiento en bilis al 10%, negativos a la prueba del Spot Indol Test, nitrato positivos, móviles y desulfovirdina positivos. Así mismo, cuando se aplicaron discos de kanamicina, metronidazol, vancomicina y colistina en la placa de cultivo, se apreciaban zonas de inhibición del crecimiento. Ninguna de las dos especies aisladas produjo beta-lactamasas. Por otro lado, ambas especies bacterianas se sometieron a la acción de diferentes antimicrobianos, empleando el método E-test. Seguidamente, se detallan las CMI (mg/litro) de los antimicrobianos investigados para *D. desulfuricans*. Entre paréntesis se expresan los *breakpoints* para cada antimicrobiano establecidos por el *Swedish Reference Group for Antibiotics* (SRGA). Se considera el microorganismo sensible a

un antimicrobiano cuando el valor de la CMI es igual o inferior al valor del *breakpoint* y resistente cuando es superior (**Liderot, K. et al.**, 2010).

- Amoxicilina.....0,50 (0,5, 2).
- Amoxicilina-ácido clavulánico.....0,125 (4, 8).
- Cefotaxima.....1,0 (no está definido).
- Cloranfenicol.....16 (8, 8).
- Clindamicina.....0,25 (4, 4).
- Imipenem.....0,50 (2, 8).
- Metronidazol.....0,016 (4, 4).
- Moxifloxacina.....>32 (no está definido).
- Piperacilina- Tazobactam.....64 (8, 16).

Tanamachi, C. et al. (2011) aislaron *D. desulfuricans* a partir de la sangre de un ser humano en Japón. Se trataba de un hombre de 60 años que padecía bacteriemia. La muestra de sangre tomada a partir del enfermo, se sembró en el medio líquido de enriquecimiento BacT/ALERT 3D (BioMérieux) y se incubó en condiciones de anaerobiosis durante 5 días. Se realizó la tinción de Gram del medio de cultivo, apreciándose la presencia de bacilos gramnegativos ligeramente curvados. A continuación, se procedió al subcultivo en agar Brucella HK. Las placas se incubaron en condiciones de anaerobiosis. Al tercer día aparecieron unas colonias pequeñas. La identificación de los microorganismos constató que se trataba de *D. desulfuricans*.

En el servicio de urgencias de un hospital francés ingresó una mujer de 71 años. Presentaba un cuadro febril, desorientación y sensibilidad en la fosa iliaca izquierda. Tras realizar las pruebas pertinentes, se concluyó que la enferma padecía una sigmoiditis aguda diverticular. Tomaron sangre de la paciente y se sembró en el medio de cultivo líquido de enriquecimiento BacT/ALERT 3D (BioMérieux), incubándose durante 6 días en anaerobiosis. La tinción de Gram realizada a partir del hemocultivo, desveló la presencia de bacilos pequeños y curvados gramnegativos. Alícuotas del hemocultivo se sembraron en placas de agar chocolate, que se incubaron en anaerobiosis. A las 96 horas aparecieron en la superficie del agar unas colonias puntiformes. El análisis del ARNr 16S de los microorganismos aislados puso de manifiesto la presencia de la especie *D. fairfieldensis*. La enferma fue tratada durante 8

días con amoxicilina-ácido clavulánico y ciprofloxacina, produciéndose la *restitutio ad integrum* (Gaillard, T. *et al.*, 2011).

En el año 2009, se llevó a cabo en Bélgica un trasplante de hígado a una mujer de 69 años. Tras el proceso quirúrgico se aplicó a la paciente una terapia inmunodepresora. Poco después de iniciar el tratamiento, ingresó de nuevo en el hospital aquejada de dolor abdominal, diarrea, deshidratación y fatiga. Después de realizar a la paciente una colonoscopia se diagnosticó una colitis ulcerosa. Un mes después de llevar a cabo el tratamiento correspondiente, acudió al hospital con un cuadro de fiebre, molestias abdominales y diarrea sanguinolenta que se presentaba dos o tres veces al día. Una biopsia del colon demostró la existencia de una infección por citomegalovirus, por lo que se aplicó un tratamiento con ganciclovir. Sin embargo, aparecieron otra vez episodios recurrentes de fiebre. En uno de estos brotes se extrajeron de la paciente entre 40 y 60 ml de sangre, que se inocularon en dos medios de cultivo líquidos de enriquecimiento: BacT/Alert FA (para bacterias aerobias) y Bact/Alert FN (para bacterias anaerobias) (BioMérieux). En el último aparecieron a las 111,9 horas de incubación en condiciones de anaerobiosis bacilos gramnegativos. Alícuotas del mismo se subcultivaron en agar Columbia con un 5% de sangre de caballo y en agar chocolate. Las placas se incubaron en anaerobiosis. A las 48 horas aparecieron en la superficie del agar unas colonias diminutas formadas por bacilos pequeños curvados y espirales, gramnegativos y móviles. Para llevar a cabo la identificación de la especie, se realizó el análisis y la secuenciación de gen que codifica el ARNr 16S. Se constató que tenía una homología del 99,9% con la secuencia del mismo gen de la cepa ATCC27774 de *D. desulfuricans*. Al mismo tiempo, se estudió la sensibilidad de la cepa aislada a diferentes antimicrobianos mediante el método E-test. El aislado fue sensible a:

- Clindamicina.....CMI <0,016 mg/litro.
- Metronidazol.....CMI <0,016 mg/litro.
- Eritromicina.....CMI 1,0 mg/litro.
- Amoxicilina-ácido clavulánico.....CMI 0,047 mg/litro.
- Meropenem.....CMI 0,006 mg/litro.

Se mostró resistente a:

- Piperacilina-Tazobactam.....CMI >256 mg/litro (CMI >128 mg/litro).

El caso referido es el primero en el que se comunica el aislamiento de *D. desulfuricans* a partir de la sangre de una paciente trasplantada de hígado, inmunocomprometida y con colitis ulcerosa (**Verstreken, I. et al.**, 2012).

Un agricultor japonés de 87 años de edad, mientras realizaba sus labores del campo sufrió un cuadro de pérdida de consciencia y hemiplejia del lado derecho del cuerpo. Rápidamente, fue ingresado en el servicio de urgencias de un hospital de la zona. Se diagnosticó “infarto cerebral agudo” con oclusión de la arteria cerebral izquierda y estenosis bilateral de las arterias carotídeas. El paciente padecía un cuadro médico incontrolado de diabetes mellitus (tipo 2), hipertensión, hiperlipemia y una hipertrofia prostática benigna. Al día siguiente de la hospitalización manifestó una hipertermia de 39°C y diarrea acuosa. Tras el ingreso en el hospital se procedió a tomar muestras de sangre, que se sembraron en diferentes medios de cultivo líquidos, incubándose en condiciones de aerobiosis, microaerofilia y anaerobiosis. Solo se apreció crecimiento bacteriano en el medio de cultivo incubado en condiciones de anaerobiosis. A los cinco días de incubación se observaron al microscopio óptico bacilos gramnegativos. Se realizó un subcultivo en agar sangre Bruella con hemina y vitamina K₁. Las placas se incubaron en condiciones de anaerobiosis. A los cinco días aparecieron en la superficie del agar unas colonias pequeñas, grisáceas y no hemolíticas. Los aislados fueron catalasa positivos y móviles; produjeron sulfuro de hidrógeno en el medio de cultivo líquido SIM y elaboraron desulfovirdasa. A continuación, se realizó la secuenciación completa del gen que codifica el ARNr 16S. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto una homología del 100% con la secuencia de *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* ATCC 27774. Por último, se estudió la sensibilidad de la cepa aislada a diversos antimicrobianos, empleando el método de microdilución. El aislado se mostró sensible a muchos antibióticos destacando la ampicilina (CMI, 0,5 µg/mL) y el imipenem (CMI, 0,5 µg/mL); sin embargo, mostró una baja sensibilidad a las cefalosporinas de segunda y tercera generación. Como esta especie bacteriana forma parte de la micropoblación normal del tracto intestinal de algunos seres humanos, los investigadores coligen que la cepa pasó a través de las lesiones inflamatorias intestinales del paciente al torrente sanguíneo (**Hagiwara, S. et al.**, 2014).

Vasoo, S. et al. (2014) aislaron, durante los años 1999, 2000, 2002 y 2004, a partir de la sangre de personas que padecían bacteriemia, 18 cepas identificadas como *Desulfovibrio spp.* Los enfermos sufrían diferentes procesos: apendicitis aguda perforada, infecciones intraabdominales, diverticulitis sigmoidea perforada, etc. Todas las cepas fueron resistentes a la acción de la piperacilina-tazobactam. Sin embargo, algunas mostraron sensibilidad a la clindamicina, metronidazol, imipenem, ertapenem, ampicilina-sulbactam y penicilina. Igualmente, aislaron a partir de la sangre de personas, durante los años 2005 y 2012, un número elevado de cepas de *D. desulfuricans*. Estos pacientes presentaban cuadros clínicos similares a los primeros. Las cepas mostraron una sensibilidad a los antimicrobianos similar a la descrita para *Desulfovibrio spp.* Por último, en el año 2008, aislaron a partir de la sangre de un ser humano una cepa de *D. piger*. Los investigadores consideraron que la bacteriemia fue consecuencia de la presentación en el enfermo de un absceso de colon y diverticulitis sigmoidea. La especie bacteriana fue sensible a la acción de la clindamicina y el metronidazol; mostrándose resistente a la penicilina.

Koyano, S. et al. (2015) estudiaron a una persona de 82 años que ingresó en el servicio de urgencias de un hospital; y que padecía fiebre y dolor abdominal. No manifestó ningún síntoma gastrointestinal. Apreciaron que tenía un absceso hepático y bacteriemia. A partir de la sangre aislaron una cepa de desulfovibrio, que se identificó mediante la secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S como *D. desulfuricans*. Enfrentaron la cepa aislada a diferentes antimicrobianos determinando las CMI. El enfermo respondió bien a un tratamiento por vía intravenosa de piperacilina/tazobactam complementado con la administración por vía oral de amoxicilina-ácido clavulánico.

1.4.6.3. Los desulfovibrios y el sistema nervioso central.

Hoy se conoce que existe una relación biunívoca entre la micropoblación intestinal y el sistema nervioso central. Algunas bacterias intestinales producen mediadores que influyen en la regulación de las funciones cerebrales, al tiempo que el encéfalo elabora señales que facilitan el equilibrio de la micropoblación intestinal y los

procesos fisiológicos gastrointestinales (**Li, Q. et Zhou, J.M.**, 2016; **Yarandi, S.S. et al.**, 2016).

El autismo se caracteriza por la aparición de un conjunto amplio y diverso de desórdenes del sistema nervioso. La etiología del proceso es multifactorial: en algunos casos tiene un origen genético y en otros se adquiere tras la interacción del ser humano con diversos agentes ambientales. En algunos autistas se aprecia un aumento notable de la población intestinal de los desulfovibrios, muy superior a la que presentan las personas sanas. Determinados alimentos (como se dijo anteriormente) favorecen el desarrollo exagerado de las bacterias del género *Desulfovibrio* en el tracto intestinal. Tratamientos prolongados a base de antimicrobianos administrados por vía digestiva, provocan en el tracto gastrointestinal destrucción de amplios grupos bacterianos y el subsecuente aumento de otros por disminución de la presión poblacional en el ecosistema intestinal. Los desulfovibrios son bastante resistentes a la acción de los antibióticos beta-lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, etc.) y vancomicina (administrada por vía oral). El uso reiterado de estas sustancias favorece el crecimiento poblacional de los desulfovibrios en detrimento de otras poblaciones bacterianas. En estas circunstancias, los desulfovibrios existentes en el intestino de algunos autistas expresan los factores de virulencia: endotoxina, H₂S, propionato, etc. (**Finegold, S.M.**, 2011).

Al estudiar la fisiopatología del autismo en seres humanos, se aprecian cambios neuroinflamatorios, incremento del estrés oxidativo y variaciones en el metabolismo de la glutatona. **MacFabe, D.F. et al.** (2008), observaron que cuando se inyecta ácido propiónico u otros ácidos grasos de cadena corta en los ventrículos cerebrales de ratas dos veces diarias durante 7 días, las alteraciones biológicas, químicas y patogénicas que se producen son similares a las que aparecen en los enfermos con autismo, de lo que se infiere que estas sustancias pueden estar implicadas en el desencadenamiento de la enfermedad.

Emanuele, E. et al. (2010) estudiaron la relación de la endotoxina de los desulfovibrios presente en el suero sanguíneo con la aparición del autismo en los seres humanos. Para ello, analizaron en la sangre de 22 personas de 28 años de edad de ambos sexos que padecían un autismo intenso, así como en la de 28 individuos voluntarios sanos de la misma edad y sexos, las concentraciones de lípido A, sus receptores solubles

CD14 y los marcadores de inflamación IL-1 β , IL-6 e IL-10. Apreciaron que las cantidades de endotoxina en el suero sanguíneo eran mucho más elevadas en los pacientes autistas que en los sanos. Los investigadores sostienen que aunque hay una asociación entre la elevada endotoxemia y el bajo grado de inflamación sistémica que aparecen en las personas autistas, con la disminución de las funciones cognitivas, la pérdida de memoria, el aumento de los síntomas de ansiedad y la depresión, debe profundizarse aún más en estos mecanismos.

1.4.6.4. Periodontitis.

La mayoría de los seres humanos han padecido a lo largo de la vida gingivitis o periodontitis, procesos inflamatorios que afectan a los tejidos que rodean a los dientes. En las periodontitis, además de una gran destrucción de los tejidos, se origina un daño importante de las piezas dentales. El proceso se presenta entre el 5 y el 45% de los humanos adultos (**Brown, L.J. et Löe, H.**, 1993; **Miller, C.S. et al.**, 2010). En los tejidos afectados, especialmente en la bolsa periodontal, se ha detectado la presencia de más de 500 especies bacterianas, predominando las bacterias anaerobias (**Moore, W.E. et Moore, L.V.**, 1994). Algunas bacterias como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y ciertas espiroquetas son algunos de los posibles microorganismos patógenos implicados en la enfermedad periodontal (**Haffajee, A.D. et Socransky, S.S.**, 1994; **Socransky, S.S. et Haffajee, A.D.**, 1997).

Cada vez es mayor el número de publicaciones científicas que ponen de manifiesto la participación de las BASR en el desencadenamiento de las periodontitis en el ser humano. Las condiciones existentes en la bolsa periodontal, como el bajo potencial de óxido reducción y un pH neutro o ligeramente alcalino, favorecen el crecimiento de las BASR y que éstas expresen sus factores de virulencia, en especial la producción de H₂S, lo que provoca el daño de los tejidos invadidos. El primer trabajo que comunicó el aislamiento de las BASR a partir de la cavidad oral, fue publicado por **Van der Hoeven, J.S. et al.** en el año 1995. Los investigadores estudiaron 43 personas, de las que tomaron 82 muestras de la bolsa subgingival dental. Éstas se sembraron en un medio de cultivo enriquecido para el aislamiento de las BASR. Del total de las

muestras, en 39 (48%) de ellas, correspondientes a 25 seres humanos (58%), se aislaron microorganismos de los géneros *Desulfobacter* y *Desulfovibrio*.

Willis, C.L. et al. (1995) estudiaron la presencia de las BASR en la cavidad oral de 12 personas sanas voluntarias (8 hombres y 4 mujeres, de una edad comprendida entre 21 y 36 años). Las muestras se tomaron de 6 lugares diferentes: partes anterior y posterior de la lengua, mucosa bucal media, mucosa vestibular, placa supragingival y placa subgingival. A partir de 10 (83%) de las 12 personas analizadas se aislaron BASR. Lo que representa un porcentaje superior al que encontraron **Gibson, G.R. et al.** (1993) en la mucosa del colon de individuos sanos. Así mismo, se constató que estas bacterias se encontraron con mayor frecuencia en la placa supragingival.

Langendijk, P.S. et al. (1999) investigaron la presencia de las BASR en diferentes lugares de la boca en 20 personas sanas y en 21 pacientes con periodontitis. Las muestras se tomaron a partir del paladar, vestíbulo, dorso de la lengua, placa supragingival y bolsa periodontal. Éstas se sembraron en un medio de cultivo sólido reducido que contenía hierro como indicador de la reducción del sulfato. Las placas se incubaron en una cámara de anaerobiosis a 35°C durante dos meses. La presencia de las BASR se puso de manifiesto por la aparición de un color negruzco intenso alrededor de las colonias como consecuencia de la precipitación de FeS. En 16 personas sanas no se detectaron BASR. Las 4 restantes (20%) poseían estas bacterias en diferentes lugares de la cavidad oral. Solo en una persona se constató su presencia en todos los lugares de la anatomía de la boca a partir de los cuales se tomaron muestras. Por otro lado, se apreció la presencia de BASR en la bolsa periodontal del 86% de los pacientes con periodontitis. Los resultados ponen de manifiesto que las BASR pueden formar parte de la micropoblación bacteriana normal de la boca de algunas personas, al tiempo que aumentan su presencia de una manera ostensible en las personas que padecen periodontitis.

Langendijk, P.S. et al. (2000) investigaron la relación existente entre la presencia de BASR y la aparición de las periodontitis en la especie humana. Para ello, tomaron 261 muestras de la parte profunda de las bolsas periodontales de un total de 87 personas que padecían una periodontitis intensa. Éstas se sembraron en un medio de cultivo apropiado y las placas se incubaron en una cámara de anaerobiosis a 35°C durante un mes. Se comprobó la presencia de BASR en al menos una bolsa periodontal

del 64% de los pacientes. No se apreciaron diferencias entre hombres y mujeres. También se pudo constatar una presencia mayor de estas bacterias en personas con encías sangrantes y con deformaciones de los dientes. A la vista de los resultados obtenidos se concluyó que la presencia de las BASR en la boca está asociada con distintas manifestaciones clínicas de las periodontitis intensas y con el aumento de la profundidad de las bolsas periodontales.

Langendijk, P.S. et al. (2001a) intentaron asociar en los tejidos de la cavidad oral de personas con periodontitis, la presencia de las BASR con otros posibles patógenos, entre los que se encontraban: espiroquetas en general, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola*. Los autores apreciaron que en los tejidos de las lesiones periodontales existía una correlación directa entre las BASR y *T. denticola*, *B. forsythus* y *P. gingivalis*. Así mismo, concluyeron que estas bacterias constituyen un grupo implicado en la destrucción tisular que se origina en las periodontitis.

El efecto de la terapia mecánica (raspado y alisado radicular) en la eliminación de las BASR en las periodontitis no había sido analizado hasta que **Langendijk, P.S. et al.** (2001b) llevaron a cabo unas investigaciones que pretendían dilucidar la eficacia de esta práctica médica. Los autores, estudiaron la presencia de las BASR en 38 pacientes antes y después (6 meses) de aplicar la terapia de referencia. La utilización de la técnica mecánica de reparación de las periodontitis originó una eliminación de las BASR en el 89% de los pacientes; así mismo provocó una desaparición de estas bacterias en el 95% de las bolsas periodontales. Por todo ello, los investigadores coligieron que la terapia de raspado y alisado reticular aplicada a las periodontitis humanas resulta eficaz para la eliminación de las BASR.

Langendijk, P.S. et al. (2001c) aislaron 10 cepas de BASR mesófilas a partir de la placa subgingival de personas que padecían periodontitis. Se diferenciaron dos grupos de cepas sobre la base de sus propiedades morfológicas, fisiológicas y filogenéticas. El primero, constituido por una cepa, se correspondía con bacilos curvados muy móviles. Se observó que, en la reducción del sulfato por la vía desasimiladora, oxidaban incompletamente el lactato o piruvato hasta formar acetato. Además, la cepa producía desulfoviridasa y citocromo c_3 . Así mismo, se puso de

manifiesto que el perfil de los lípidos celulares era similar al que presentaban las cepas integrantes del género *Desulfovibrio*. Finalmente, los investigadores apreciaron que la secuencia del gen que codifica el ARNr 16S era similar a la descrita para *D. fairfieldensis*. La bacteria se denominó cepa NY682 del género *Desulfovibrio*. Los estudios realizados con las 9 cepas restantes (segundo grupo) pusieron de manifiesto la presencia de una nueva especie: *Desulfomicrobium orale* sp. nov.

Sobre la base de las investigaciones descritas anteriormente, en el inicio del siglo XXI se tenía claro que, como consecuencia de la producción de sulfuro de hidrógeno a partir del sulfato, los desulfovibrios se encontraban relacionados con las periodontitis y otros procesos inflamatorios crónicos humanos. En este sentido, **Loubinoux, J. et al.** (2002a) estudiaron microbiológicamente siete personas que padecían periodontitis. A partir de cinco de ellas, aislaron ocho cepas de BASR pertenecientes al género *Desulfovibrio*, que mediante PCR se puso de manifiesto que se correspondían con la especie *D. fairfieldensis*. Los investigadores infirieron que la presencia de esta especie bacteriana en las lesiones periodontales, puede jugar un papel importante en el desencadenamiento de las mismas.

Las investigaciones reseñadas, ponen de manifiesto la presencia de las BASR en los tejidos de los enfermos con periodontitis. Ahora bien, ninguna de ellas hace hincapié en las actividades que llevan a cabo las BASR en los tejidos dañados. El primer estudio que aborda la cuestión fue realizado por **Boopathy, R. et al.** en el año 2002. Los autores aislaron en cultivo puro una cepa del género *Desulfovibrio* a partir de una persona que padecía una enfermedad periodontal de tipo IV. Comprobaron que el microorganismo utilizaba como única fuente de carbono piruvato, lactato, glucosa, fructosa y etanol; sin embargo, no era capaz de emplear para dicho cometido acetato ni metanol, lo que pone de manifiesto que es un oxidador incompleto de los sustratos. También constataron que el aislado, además de emplear el sulfato como aceptor de electrones, puede utilizar tiosulfato y nitrato. Así mismo, observaron que la bacteria tenía la capacidad de usar cloruro amónico, nitrato y glutamato como fuentes de nitrógeno. Igualmente, pusieron de manifiesto que la cepa tenía una temperatura y pH óptimos de crecimiento de 37°C y 6,8, respectivamente; y que poseía desulfoviridasa como aceptor de electrones. Por último, afirmaron que el número de las BASR presentes en la boca está condicionado por la presencia de sulfato. Las posibles fuentes de esta sustancia en las áreas subgingivales son el sulfato libre en los fluidos de las bolsas periodontales, los

glicosaminoglicanos y los aminoácidos sulfurados existentes en los tejidos periodontales.

Un año después, el mismo equipo investigador, publicó un trabajo en el que se estudió el crecimiento y las actividades de las BASR y de las bacterias metanogénicas aisladas a partir de la cavidad oral de 8 personas voluntarias (**Robichaux, M. et al.**, 2003). Aislaron BASR en 7 de los 8 voluntarios y bacterias metanogénicas en 6. Dos personas, que padecían una periodontitis tipo III, presentaron ambos tipos de bacterias. El porcentaje de personas en las que se aislaron BASR fue superior al que encontraron en la mucosa del colon **Gibson, G.R. et al.** (1991, 1993). Las muestras se tomaron de 6 lugares diferentes: partes anterior y posterior de la lengua, mucosa sublingual, mucosa vestibular, placas supragingival y subgingival. En un caso se aislaron BASR a partir de todas las localizaciones referidas. Los lugares en los que se detectaron estas bacterias en la mayoría de los voluntarios fueron: partes anterior y posterior de la lengua y placas supragingival y subgingival. Las bacterias metanogénicas fueron aisladas con mayor frecuencia a partir de las placas supragingival y subgingival. Todas las BASR produjeron una gran cantidad de H₂S tras la reducción del sulfato. La máxima producción de sulfuro de hidrógeno (6,25 µM) se originó a los 15 días de incubación.

Las placas subgingivales de los enfermos que padecen periodontitis poseen un ecosistema microbiano muy complejo. Con la intención de aclarar sus componentes, **Vianna, M.E. et al.** (2008) llevaron a cabo un estudio cuantitativo de tres grupos bacterianos hidrogenotróficos: archeas metanogénicas, BASR y bacterias acetogénicas. Para ello, analizaron muestras procedentes de las placas subgingivales de 102 personas (42 hombres y 60 mujeres, de una edad media de 50,7 años) que padecían enfermedad periodontal. Como control, se emplearon 65 muestras tomadas a partir de diversos lugares de la boca de personas sanas de una edad similar. Se obtuvo el ADN presente en cada muestra, para posteriormente identificar la presencia de los grupos bacterianos de referencia. Dicho cometido se llevó a cabo mediante la técnica de la PCR, empleando cebadores que permitieran la identificación de genes específicos de cada grupo bacteriano: *mcrA* (archeas metanogénicas), *dsrAB* (BASR) y *fhs* (bacterias acetogénicas). Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que los tres grupos se encontraban con mucha mayor frecuencia en las personas con periodontitis que en las sanas. Mientras que las bacterias metanogénicas y las BASR se hallaron solo en pacientes con periodontitis (43,1 y 41,2%, respectivamente), las acetogénicas se

obsevaron en el 84,3% de los enfermos y en el 64,4% de las personas sanas. En el 4,9% de los enfermos no se encontró ningún representante de los tres grupos investigados. A partir de algunas muestras se detectó solo un grupo bacteriano: metanogénicas (3,9%), SRB (2,9%) y acetogénicas (30,4%). De los resultados obtenidos, se desprende que las interacciones entre las bacterias consumidoras y las productoras de H₂ en la placa subgingival son similares a las que se producen en otros ambientes anaerobios e intervienen en la regulación de las funciones del ecosistema bacteriano que se origina en la enfermedad periodontal.

Heggendorn, F.L. et al. (2013, 2014) demostraron la presencia de BASR en la saliva de algunos seres humanos sanos, que identificaron como *D. fairfieldensis* y *D. desulfuricans*. Así mismo, relacionaron estos microorganismos con la aparición de periodontitis en las personas portadoras de estas especies bacterianas.

Heggendorn, F.L. et al. (2015) profundizando en los estudios anteriores, constataron que *D. fairfieldensis* y *D. desulfuricans*, cuando se encuentran en la cavidad oral, son capaces de originar procesos de corrosión en los elementos metálicos empleados en los pacientes humanos que se sometieron a diferentes técnicas de endodoncias.

Jorand, F.P.A. et al. (2015) pusieron de manifiesto que *D. fairfieldensis* es capaz de colonizar los implantes dentales de titanio y formar una capa de biofilm que impide que los antimicrobianos penetren y, en consecuencia, ejerzan su efecto sobre esta especie bacteriana.

1.4.6.5. Otras implicaciones.

La vagina de la mujer reúne las condiciones adecuadas para el desarrollo de las BASR: se encuentra anatómicamente próxima al ano, lo que facilita que las bacterias presentes en las heces invadan este lugar; posee cantidad suficiente de lactato libre y de sulfatos (sustancias necesarias para el crecimiento de estas bacterias); por último, el pH vaginal ácido no es un factor limitante para el crecimiento de los microorganismos de referencia. Sobre la base de lo apuntado, **Ichishi, S. et al.** (2010) estudiaron la

presencia de BASR en un total de 134 mujeres que presentaban diferentes problemas ginecológicos. Tras llevar a cabo los análisis microbiológicos correspondientes, obtuvieron a partir de mujeres que padecían cáncer de cuello uterino cuatro cepas de *D. intestinalis*. Esta especie bacteriana solo había sido aislada anteriormente por parte de **Frohlich, J. et al.** (1999) del tubo digestivo de la termita *Mastotermes darwiniensis*. Así mismo, investigaron la sensibilidad de los aislados a diferentes antimicrobianos. Apreciaron que eran muy sensibles a la clindamicina y meropenem, sensibles a la ampicilina, ampicilina-sulbactam, metronidazol, eritromicina, claritromicina, levofloxacino y ciprofloxacina. Mostraron resistencia intermedia a la cefalotina y ceftazidima. Se comportaron con una alta resistencia a la cefoxitina, piperacilina y piperacilina-tazobactam.

En julio de 2013, en la Clínica Mayo (USA), se implantó una prótesis en el hombro izquierdo a una mujer de 70 años. A los pocos días apareció una infección en el lugar de la intervención quirúrgica. Se tomó una muestra del fluido aparecido en el lugar de la infección, que se sembró en placas de cultivo que contenían el medio de cultivo agar sangre de oveja para anaerobios. Seguidamente, se incubaron en condiciones de anaerobiosis a 35°C durante seis días. En la superficie del agar se observó la aparición de unas colonias pequeñas, puntiformes y claras. La incubación se prolongó hasta los 10 días. Transcurrido ese tiempo, se detectaron colonias de 1 mm de diámetro, convexas y de aspecto gris verdoso. La tinción de Gram puso de manifiesto la existencia de bacilos espirales gramnegativos. Además, se comprobó que eran móviles, indol negativos y catalasa positivos. El análisis de la secuencia del ARNr 16S, puso de manifiesto una homología del 100% con la de *D. legallii*. Lo que supone la descripción del primer caso en el que se aísla esta especie bacteriana a partir de un proceso infeccioso. A continuación, se estudió la sensibilidad a los antimicrobianos por parte de la cepa aislada empleando el método E-test. Los resultados de las CMI's obtenidas fueron los siguientes:

- Ertapenem.....1 µg/ml.
- Ceftriaxone.....2 µg/ml.
- Amoxicilina-ácido clavulánico.....0,25/0,125 µg/ml.
- Piperazilina/tazobactam.....>256/4 µg/ml.
- Minociclina.....0,5 µg/ml.
- Ciprofloxacina.....>32 µg/ml.

- Clindamicina.....<0,5 µg/ml.
- Penicilina.....1-2 µg/ml.
- Metronidazol.....<0,5 µg/ml.

Sobre la base de estos resultados, y siguiendo los criterios establecidos en el documento M100-S24 del CLSI, se constató que *D. legallii* fue sensible a la acción de la clindamicina, amoxicilina-ácido clavulánico, ceftriaxone, ertapenem y metronidazol. Además, se observó que el aislado no produjo beta-lactamasas (Vasoo, S. *et al.*, 2014.). Los mismos autores, describieron en el trabajo referido el aislamiento en el año 2011 de una cepa de *D. desulfuricans* a partir de los tejidos de la espina lumbar de una persona que presentaba un cuadro de fístula y perforación del colon, además de una metástasis producida por un carcinoma. También aislaron otros microorganismos como *Mobiluncus curtisii*, *Candida albicans* y *Clostridium clostridioforme*. Por último, apreciaron que la cepa de *D. desulfuricans* fue sensible a la acción de la clindamicina, metronidazol y penicilina. Los investigadores de referencia, también pusieron de manifiesto el aislamiento en el año 2012 de otra cepa de *D. desulfuricans* a partir de la orina de una persona a la que se practicó una nefrotomía percutánea. Este ser humano, padecía una hidronefrosis bilateral, una fístula vesical y una encefalitis herpética. También se aislaron bacilos y cocos grampositivos anaerobios, *Streptococcus agalactiae*, *Actinobaculum schaalii* y *Propionibacterium spp.* Los estudios de sensibilidad a los antimicrobianos demostraron que la cepa de *D. desulfuricans* era sensible a la acción de la clindamicina, metronidazol y penicilina.

La esclerosis múltiple es una enfermedad autoinmune. En algunas ocasiones, tiene un origen genético; en otras, se desencadena por la interacción de los seres humanos con diversas causas ambientales, como ciertas infecciones y otros factores. Las últimas investigaciones relacionan el desequilibrio (disbiosis) de la micropoblación intestinal con la aparición de la esclerosis múltiple. Tremlett, H. *et al.* (2016), analizaron la micropoblación bacteriana intestinal de varios jóvenes que padecían esclerosis múltiple. En algunos de ellos se apreció un gran aumento de las bacterias pertenecientes a las familias *Desulfovibrionaceae* (géneros *Bilophila* y *Desulfovibrio*) y *Christensenellaceae* y una disminución de las incluidas en las familias *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*; al tiempo que se constató un aumento de la intensidad de las vías metabólicas relacionadas con la degeneración nerviosa. Los resultados descritos sugieren que en estas personas se crea un ambiente proinflamatorio.

1.4.7. Los desulfovibrios y su relación con el mundo animal.

Apenas existen citas bibliográficas que relacionen a estos microorganismos con trastornos en las especies animales. Sin embargo, cada día es mayor el número de trabajos científicos que aparecen en las bases de datos poniendo de manifiesto el carácter patógeno de algunas especies del género *Desulfovibrio* para la especie humana. Lo que hace pensar que, en un futuro no muy lejano, se ponga claridad a los mecanismos de la virulencia de algunas de las cepas que integran ciertas especies de este género bacteriano.

Howard, B.H. et Hungate, R.E. (1976) aislaron *D. desulfuricans* en cultivo puro a partir del contenido ruminal de ovejas. La población encontrada estuvo en torno a 10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro (u.f.c/ml), número de bacterias suficiente para llevar a cabo la reducción del sulfato a sulfuro de hidrógeno en este hábitat orgánico.

La “ileítis proliferativa porcina” es un proceso infeccioso que se conoce desde hace algunas décadas. También se ha observado en el hámster, el hurón y el zorro. Los primeros estudios microbiológicos evidenciaron en el citoplasma de las células epiteliales del íleon unos bacilos curvados. Estos microorganismos se multiplicaban *in vitro* exclusivamente en cultivos de tejidos, especialmente en los elaborados a partir de enterocitos de rata. El análisis del gen que codifica el ARNr 16S de estas bacterias puso de manifiesto una homología del 91% con el de *D. desulfuricans* (**Fox, J.G. et al.**, 1994; **Gebhart, C.J. et al.**, 1993). **McOrist, S. et al.** (1995) profundizaron en las investigaciones anteriores. Para ello, investigaron en estas bacterias las características fenotípicas, el perfil proteico mediante electroforesis y la secuenciación completa del gen que codifica el ARNr 16S. Concluyeron que estos microorganismos pertenecían a un género nuevo, que contiene una especie: *Lawsonia intracellularis*.

Kuhnigk, T. et al. (1996) obtuvieron BASR a partir del intestino de diferentes familias de termitas. Cuando aplicaron una dieta rica en sulfato a *Reticulitermes santonensis* detectaron poblaciones de BASR por encima de 10^8 u.f.c./ml. Todos los aislados pertenecieron al género *Desulfovibrio*, predominando las especies

D. desulfuricans y *D. termitidis*. Los autores afirman que las bacterias citadas juegan un papel muy importante en el ecosistema intestinal de estos seres.

Lin, C. et al. (1997) analizaron la micropoblación del tracto gastrointestinal del ganado bovino, ovino, caprino y cerdo. La identificación se llevó a cabo mediante la prueba de la PCR, empleando oligonucleótidos para caracterizar el ARNr de las bacterias presentes en ese lugar de la economía orgánica. Detectaron que dentro de las BASR gramnegativas mesófilas, las cepas predominantes en todas las muestras estudiadas pertenecieron al género *Desulfovibrio*. Sin embargo, se aislaron pocas cepas del género *Desulfobulbus*.

Frohlich, J. et al. (1999) aislaron una cepa de BASR gramnegativa mesófila del contenido de la porción posterior del tubo digestivo de la termita *Mastotermes darwiniensis*, que presentaba una gran homología en la secuencia de su ADN con el de *D. desulfuricans*. Tras realizar el estudio de sus propiedades bioquímicas y analizar la secuencia del ADNr 16S, los investigadores describieron una nueva especie del género *Desulfovibrio*, a la que denominaron *D. intestinalis*.

Shukla, S.K. et Reed, K.D. publicaron, en el año 2000, el primer caso de bacteriemia en un perro provocado por *D. desulfuricans*. Las investigaciones se llevaron a cabo en Wisconsin (USA). El animal, un perro de raza labrador retriever, de dos años y medio, llegó a la consulta presentando un cuadro de anorexia, hipertermia y rigidez de las extremidades. Fue sometido a diversas pruebas serológicas que descartaron procesos infecciosos compatibles con esas manifestaciones clínicas. Sembraron sangre del animal en agar chocolate, en condiciones de anaerobiosis, durante 5 días a 37°C. Crecieron unas colonias pequeñas, puntiformes, redondeadas y lisas. La tinción de Gram puso de manifiesto unas bacterias levemente curvadas gramnegativas. Por microscopía electrónica se apreció la existencia en estas células de un flagelo polar. Los aislados se caracterizaron por amplificación, secuenciación y análisis del gen que codifica el ARNr 16S. El perro fue tratado con doxiciclina durante 4 semanas, tras las cuales se consiguió la curación total. Los investigadores pensaron que esta bacteria se multiplicó intensamente en el intestino del animal y que desde este lugar pasó al torrente sanguíneo.

La aparición de diarreas crónicas como consecuencia de “La enfermedad intestinal inflamatoria” es un proceso frecuente en el hombre y en algunas especies

animales, como el gato. La etiología del proceso no es conocida con exactitud en estos momentos, aunque algunos investigadores mantienen la hipótesis de que es consecuencia de disturbios del sistema inmunitario que se reflejan en el intestino. Cada día son más los que piensan que en el desencadenamiento del proceso pueden estar implicadas algunas especies bacterianas. En relación con la aparición del proceso en el gato (única especie animal estudiada) sólo han sido publicadas las investigaciones realizadas por **Inness, V.L. et al.** (2007). Se tomaron muestras de las heces tras la defecación de los animales, tanto a partir de gatos sanos como de los afectados por la enfermedad de referencia, para determinar la presencia de los siguientes grupos bacterianos: *Bacteroides spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Clostridium histolyticum* subgp., *Lactobacillus-Enterococcus* subgp. y *Desulfovibrio spp.* La técnica empleada fue la fluorescencia por hibridación *in situ*. El número total de bacterias, así como el de *Bifidobacterium spp.* y *Bacteroides spp.*, fue superior en los animales sanos que en los enfermos. Sin embargo, las poblaciones de *Desulfovibrio spp.* eran más elevadas en los animales con “La enfermedad intestinal inflamatoria” que en los sanos. Las bacterias del género *Desulfovibrio* producen sulfuro de hidrógeno a partir del sulfato, el cuál se comporta a altas concentraciones como genotóxico y citotóxico para el epitelio de la mucosa del colon (**Attene-Ramos, M.S. et al.**, 2006); lo que hace pensar que los microorganismos referidos puedan participar en el desencadenamiento de la enfermedad.

Honneffer, J.B. et al. (2014) llevaron a cabo una revisión bibliográfica acerca de la alteración de la micropoblación del tracto gastrointestinal del perro y del gato en casos de inflamación aguda y crónica. Afirmaron que los nuevos métodos de identificación bacteriana ponen de manifiesto que la micropoblación gastrointestinal del perro y del gato es similar a la del ser humano y que constituye un ecosistema complejo. Revelan que estudios efectuados en perros y gatos demuestran que las enfermedades gastrointestinales agudas y crónicas, incluida “La enfermedad intestinal inflamatoria”, se asocia con alteraciones de las comunidades microbianas del intestino y, por tanto, de las heces. Estas alteraciones provocan una disbiosis intestinal que conduce a un proceso inflamatorio de este lugar. Posiblemente, la causa de la disbiosis sea una alteración de la inmunidad innata en estos animales. En los casos de “La enfermedad intestinal inflamatoria” se han observado con frecuencia cambios en la micropoblación intestinal, que disminuye en algunos grupos bacterianos como los de los *phyla Firmicutes* y

Bacteroidetes; sin embargo, aumenta en el *phylum Proteobacteria (Desulfovibrio)*. Se colige por parte de los autores que la administración de probióticos pueden lograr el equilibrio de la micropoblación intestinal en los casos de enfermedad.

Li, Z. et al. (2014) estudiaron la micropoblación bacteriana del tracto gastrointestinal del corzo chino (*Capreolus pygargus*). Emplearon la técnica de la PCR para analizar el ARNr 16S. Apreciaron que las bacterias predominantes en el colon pertenecían a la familia *Enterobacteriaceae*, y a los géneros *Succinivibrio* y *Desulfovibrio*.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS.

Los objetivos de la tesis doctoral fueron los siguientes:

- Aislar e identificar cepas bacterianas pertenecientes al género *Desulfovibrio* a partir de cerdos que padecen diarreas.
- Evaluar la utilidad de las técnicas clásicas de identificación de estos microorganismos basadas en pruebas bioquímicas.
- Realizar la técnica molecular basada en la secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S para las cepas del género *Desulfovibrio*.
- Comprobar la utilidad de las técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como diagnóstico de rutina para estas bacterias.
- Evaluar la nueva técnica MALDI-TOF MS para identificar las especies del género *Desulfovibrio* y comparar sus resultados con los obtenidos por PCR, introduciendo las cepas tipo en la base de datos.
- Estudiar la sensibilidad antimicrobiana de las cepas aisladas pertenecientes al género *Desulfovibrio*.
- Estudiar la actividad beta-lactamasa de las cepas que resulten resistentes a los antibióticos beta-lactámicos.

ESQUEMA DE TRABAJO

3. ESQUEMA DE TRABAJO.

Una vez expuestos los objetivos del presente trabajo, se detalla el esquema de trabajo seguido en estas investigaciones (**Figura 8**).

- Recogida de muestras a partir del intestino grueso o heces de cerdo que presentaban un cuadro diarreico compatible con la disentería.
- Siembra de las muestras en agar sangre enriquecido al que se añadieron cinco antibióticos. Incubación de las placas de cultivo en condiciones de anaerobiosis, a 42 °C durante 4-7 días.
- Identificación de los desulfovibrios mediante la detección de las características morfológicas de las colonias y examen de las mismas con el microscopio de contraste de fase.
- Aislamiento de las cepas, obtención de cultivo puro y almacenamiento de las mismas a -80 °C para su conservación.
- Caracterización e identificación de las cepas aisladas mediante pruebas bioquímicas específicas para las bacterias del género *Desulfovibrio*.
- Extracción del ADN cromosómico de las cepas aisladas.
- Identificación de los microorganismos aislados mediante la secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S.
- Análisis de las cepas aisladas mediante la técnica de la PCR, con la intención de constatar la especie a la que pertenecen.
- Estudio de las cepas aisladas del género *Desulfovibrio* mediante la técnica MALDI-TOF, con el objetivo de determinar la especie a la que pertenecen.
- Análisis de la sensibilidad a los antimicrobianos de las cepas aisladas.
- Análisis de la actividad beta-lactamasa en las cepas aisladas resistentes a los antibióticos betalactámicos.

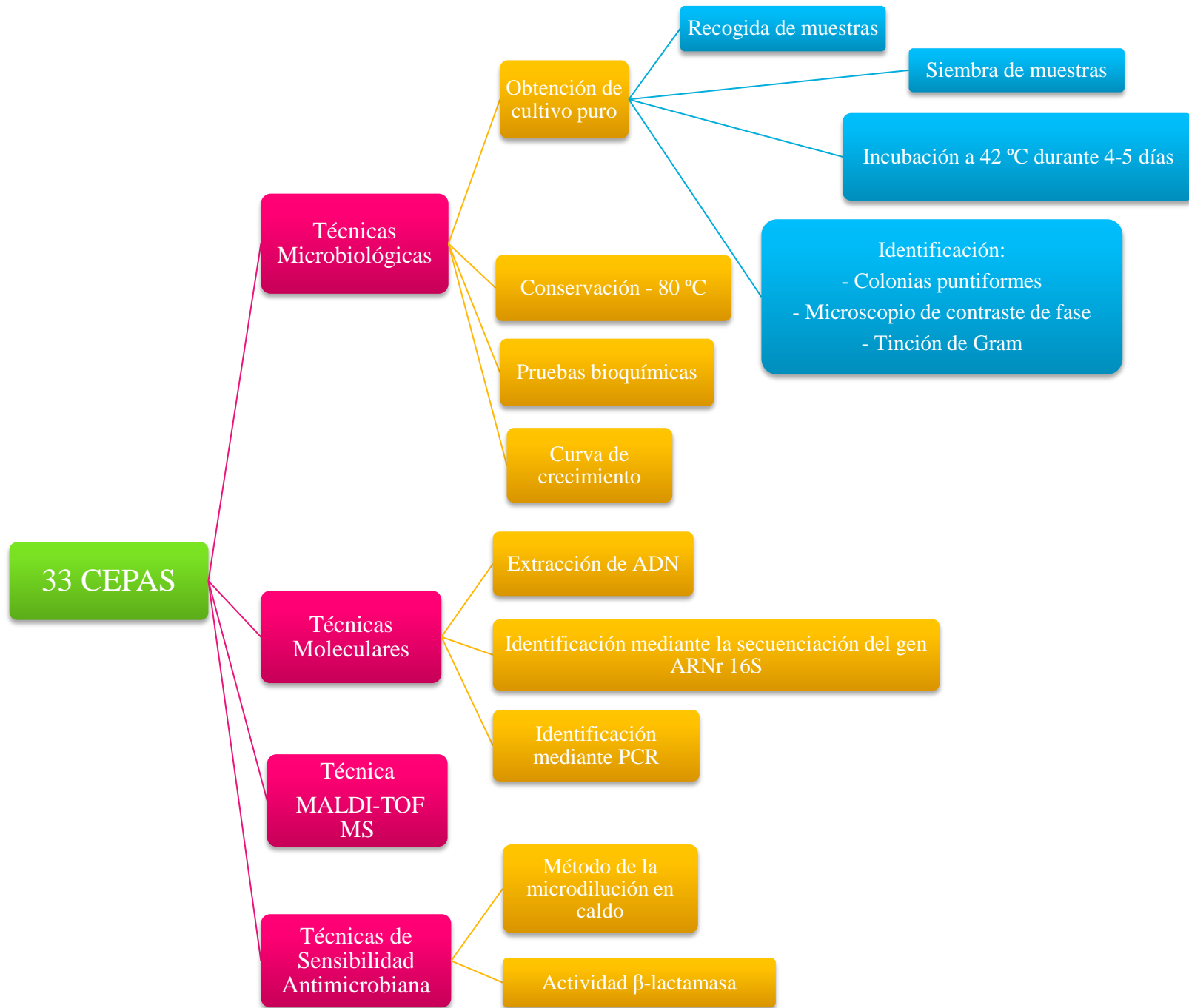


Figura 8. Esquema de trabajo llevado a cabo para el estudio de las cepas pertenecientes al género *Desulfovibrio* aisladas a partir del cerdo.

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. MUESTRAS ESTUDIADAS.

Para la realización de este trabajo se tomaron muestras de las heces de los animales enfermos o por raspado del intestino grueso en la necropsia del animal, tanto de cerdo blanco como de cerdo ibérico, desde el 2011 hasta el 2015. Los animales objeto de estudio presentaban en todos los casos un cuadro diarreico compatible con la disentería.

Por lo general, la recogida de muestras fue llevada a cabo por veterinarios colaboradores, responsables de las explotaciones en las que aparecía el proceso infeccioso. A partir de cada una de las explotaciones se analizaron de 6 a 8 animales enfermos que presentaban un cuadro diarreico mucohemorrágico. De cada individuo se tomaron 3 muestras.

4.1.1. Recogida de muestras.

Las muestras se tomaron mediante hisopos que llevaban incorporado el medio de transporte de Amies (Ventura Transystem, Copan innovation, Italy) (**Figura 9**). Éstos, según las circunstancias de cada caso, se empapaban directamente del colon y ciego en la necropsia del animal, se introducían por vía rectal o se impregnaban de heces sospechosas depositadas en el suelo.

Una vez realizada la operación, los hisopos se depositaban en un contenedor isoterma que mantenía una temperatura aproximada de 6 °C, y se transportaban al laboratorio empleando el menor tiempo posible (**Jacobson, M. et al., 2005; Jansson, D.S., 2009**). Además, se acompañaba un historial con todas las características de la explotación, lugar y fecha de recogida, raza, régimen y edad del animal y tipo de muestra.



Figura 9. Hisopos con el medio de transporte de Amies empleados para recoger las muestras.

4.2. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS.

4.2.1. Medios y condiciones de cultivo.

4.2.1.1. Medios de cultivo líquidos.

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de las bacterias del género *Desulfovibrio* fue Brain Heart Infusion (Conda, Pronidisa) (BHI) (infusión de cerebro y corazón), que se suplementa con un 2% de piruvato y 0,5% de sulfato magnésico, cuya composición se detalla a continuación:

BHI.....	7,4 g
Piruvato.....	2 g
Sulfato magnésico.....	0,5 g
Agua destilada.....	hasta 200 ml

El medio de cultivo se esterilizó por calentamiento a 121 °C en el autoclave durante 20 minutos.

4.2.1.2. Medios de cultivo sólidos.

El medio de cultivo sólido utilizado para el crecimiento de las diferentes cepas de *Desulfovibrio spp.* fue el agar sangre al 5% (v/v) basado en el descrito por **Calderaro, A. et al.** (2001, 2005). Su composición por litro se detalla a continuación:

Agar base n° 2.....	40 g
Extracto de carne.....	3 g
Bacto peptona.....	5 g
Agua destilada.....	810 ml

Para facilitar el aislamiento bacteriano, al medio de cultivo se añadieron diferentes antimicrobianos a los que son resistentes las bacterias del género *Desulfovibrio* y *Brachyspira*, y que permiten eliminar la mayor parte de la micropoblación bacteriana fecal acompañante (**Feberwee, A. et al.**, 2008; **Råsbäck, T. et al.**, 2007). Los antibióticos se añadieron al medio de cultivo a las concentraciones y en los disolventes que se especifican en la **Tabla 1**. La esterilización se realizó en el autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Una vez realizado el proceso, el medio de cultivo se atemperó a 50 °C y se añadieron 50 ml de sangre desfibrinada de oveja. Finalmente, el contenido del matraz se distribuyó en placas de Petri, que una vez solidificadas a temperatura ambiente se guardaban en el frigorífico a 6 °C, listas para ser utilizadas (**Figura 10**).

Tabla 1. Antibióticos añadidos al medio de cultivo de agar sangre.

Antibiótico	Concentración final (mg/l)	Disolvente
Espectinomicina	200	30 ml H ₂ O bidestilada
Espiramicina	25	30 ml H ₂ O bidestilada
Vancomicina	12,5	30 ml H ₂ O bidestilada
Colistina	6,25	30 ml H ₂ O bidestilada
Rifampicina	6,25	10 ml alcohol etílico + 10 ml H ₂ O bidestilada

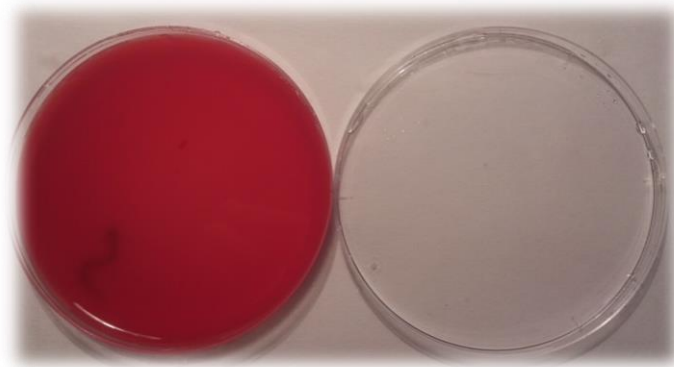


Figura 10. Medio de cultivo de agar sangre con cinco antibióticos.

4.2.1.3. Condiciones de cultivo y aislamiento de las bacterias del género *Desulfovibrio*.

Las muestras fueron sembradas en el medio de cultivo sólido de referencia por agotamiento empleando el asa de platino. Las placas se incubaron en jarras de anaerobiosis (Oxoid) a 42 °C durante tres o cuatro días. Se empleaba esta estrategia para impedir el crecimiento de otros microorganismos presentes en las heces que eran

resistentes a los antimicrobianos añadidos al medio de cultivo, pero que al tiempo mostraban un umbral térmico de desarrollo más bajo y que podrían dificultar el crecimiento en condiciones de cierta pureza de las bacterias objeto de aislamiento.

El sistema de jarras de anaerobiosis, con una capacidad de 3,5 litros, permite conseguir condiciones de anaerobiosis gracias a la utilización de sobres de generación de gas (AnaeroGen, Oxoid) (Rothkamp, A. *et al.*, 2002), que son introducidos en su interior justo antes de cerrar las jarras. La función de los sobres consiste en la absorción del oxígeno atmosférico y la generación simultánea de dióxido de carbono. Con esto se consigue reducir la concentración de oxígeno por debajo del 1% en un tiempo aproximado de 30 min, mientras que se genera un nivel de dióxido de carbono que oscila entre el 9 y el 13%. El control de la anaerobiosis se realizó de manera visual mediante el Indicador Anaeróbico Oxoid (BR55). Se trata de unas tiras impregnadas con resazurina, que al contacto con el oxígeno adquieren una coloración rosa y en su ausencia color blanco pálido (Figura 11 y 12).



Figura 11. Jarra de anaerobiosis, sobre generador de la misma e indicador de la atmósfera anaerobia.



Figura 12. Estufa de cultivo programada a 42 °C.

4.2.2. Examen de las colonias.

Una vez transcurrido el periodo de incubación a la temperatura indicada, se procedía a realizar el examen de las placas de cultivo. Se sospechaba la presencia de desulfobibrios por la visualización de colonias puntiformes y transparentes que aparecían en las líneas de agotamiento. Seguidamente, se tomaba una colonia de cada uno de los tipos morfológicos indicados y se procedía a su resiembra en el medio base de **Calderaro, A. et al.** (2001) sin antibióticos, incubando las placas en las mismas condiciones descritas anteriormente, pero ahora a la temperatura óptima de 37 °C. De esta manera, se conseguía el cultivo puro de cada una de ellas (**Figura 13**).

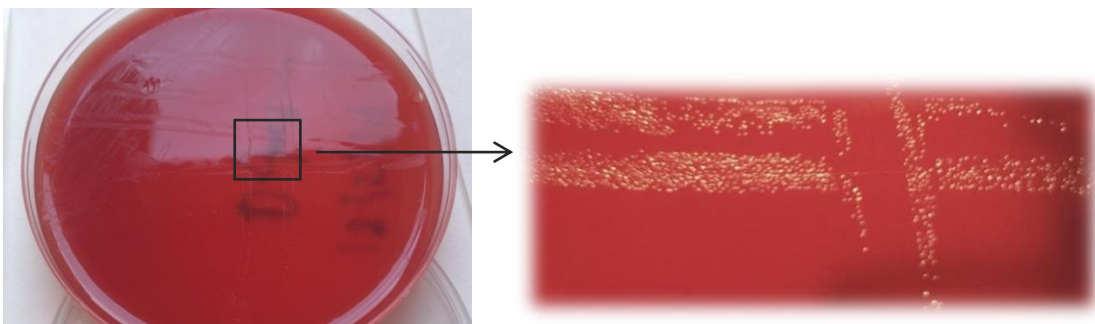


Figura 13. Cultivo puro de *D. fairfieldensis*.

4.2.3. Estudio microscópico.

Tras obtener los cultivos puros se procedió a la identificación de las bacterias anaerobias aisladas mediante el examen de las características morfológicas. Para ello, se utilizó un microscópico Nikon Eclipse 200 empleando el sistema de contraste de fase a 40x, que permite observar las bacterias vivas, sin colorear y en movimiento. Las imágenes se proyectaban en una pantalla de alta definición (**Figura 14**). Esta técnica permite constatar si las bacterias aisladas muestran una morfología propia de los desulfovibrios, así como su movilidad (**Figura 15**).



Figura 14. Análisis de las colonias con el microscopio de contraste de fase.

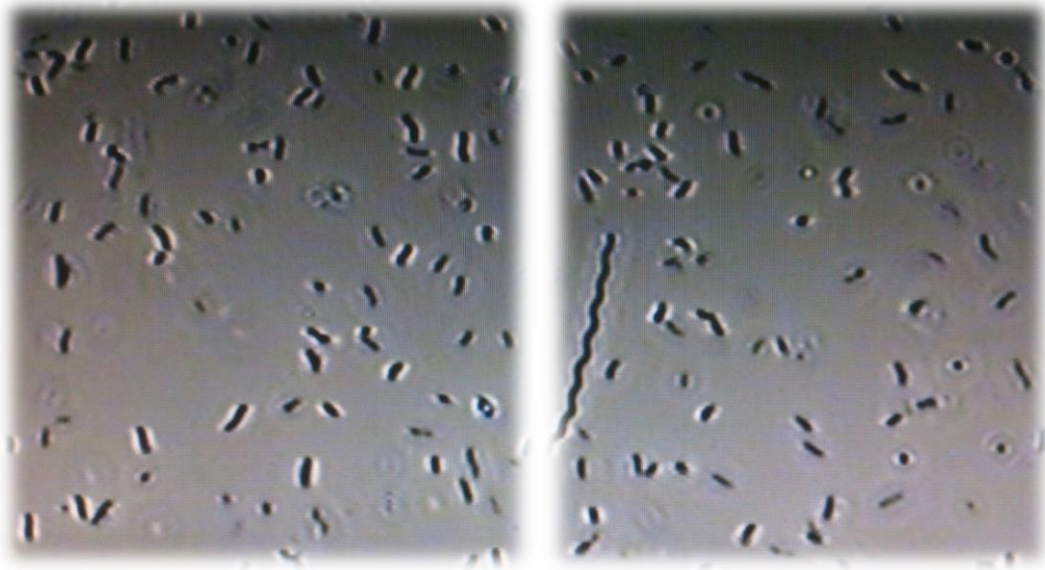


Figura 15. Polimorfismo de las células bacterianas integrantes de las colonias formadas por los aislados de *D. fairfieldensis* tras ser examinadas mediante el microscopio de contraste de fase (40x).

4.2.4. Técnica de la tinción de Gram.

Además se procedió a la identificación de las bacterias anaerobias aisladas mediante la tinción de Gram. Para ello, se hizo uso del colorante principal cristal violeta, el mordiente o fijador lugol, el decolorante alcohol-acetona y el colorante de contraste, la safranina, siguiendo el procedimiento descrito por el bacteriólogo danés Christian Gram en 1844. Se empleó un microscópico Nikon Eclipse 200 con el objetivo 100x para observar la imagen de las bacterias teñidas. Esta técnica nos permitió constatar que las bacterias aisladas mostraban una morfología vibrioide y espiral gramnegativa propia de los desulfobrios (**Figura 16**).

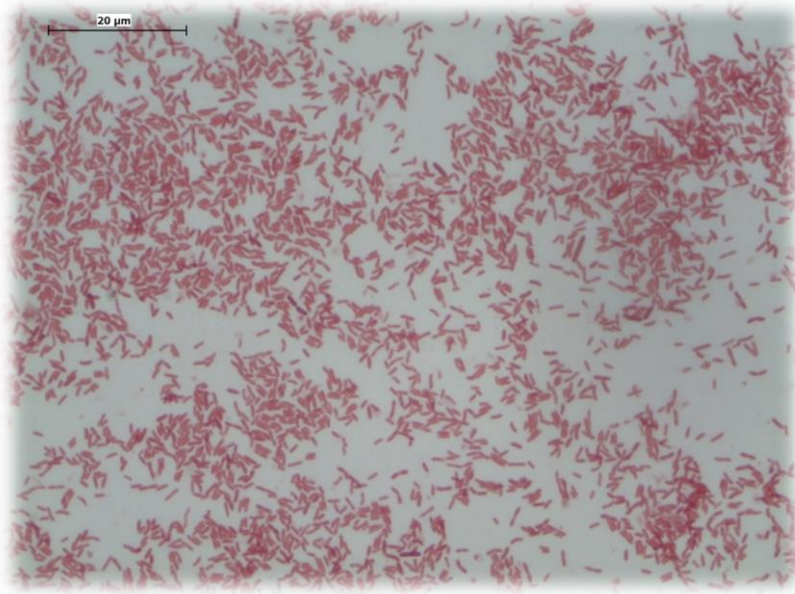


Figura 16. Células bacterianas gramnegativas y polimórficas de las colonias formadas por los aislados de *D. fairfieldensis* tras ser teñidas mediante la tinción de Gram y examinadas con el microscopio óptico (100x).

4.2.5. Identificación mediante pruebas bioquímicas.

La identificación de los desulfovibrios aislados mediante las pruebas bioquímicas se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de **Warren, Y. A. et al.** (2005). Las empleadas fueron las siguientes:

- Producción de desulfovirdina.
- Producción de ureasa.
- Reducción de los nitratos.
- Producción de indol.
- Producción de catalasa.
- Producción de sulfuro de hidrógeno.
- Movilidad.
- Crecimiento en presencia del 20% de bilis.

Así mismo, los autores de referencia proponen como complemento a las pruebas anteriores el estudio de la resistencia a los siguientes antimicrobianos:

- Kanamicina (1mg).
- Vancomicina (5µg).
- Colistina (10µg).

Los métodos empleados para realizar estas pruebas fueron los propuestos en la sexta edición del WADSWORTH-KTL Anaerobic Bacteriology Manual (**Jousimies-Somer, H. R. et al.**, 2002).

Algunas de estas pruebas son de empleo habitual en los laboratorios de Microbiología. Por ello, se hará hincapié en las más específicas.

4.2.5.1. Prueba de la Desulfoviridina.

Las especies de los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfomonas* elaboran un pigmento conocido como desulfoviridina. El cromóforo sirohidroclorina de este pigmento cuando se examina a la luz ultravioleta a 366 nm en una cámara oscura origina una fluorescencia de color rojo.

La prueba se lleva a cabo de la siguiente manera:

- Se preparan 200 ml del medio líquido BHI (caldo infusión cerebro corazón), que se suplementan con un 1% de piruvato y un 0,25% de sulfato mangnésico. A continuación, se siembra la cepa objeto de estudio. Seguidamente, se incuba en condiciones de anaerobiosis durante 3-4 días hasta conseguir un buen crecimiento de las bacterias, lo que se pone de manifiesto por la aparición de una gran turbidez del medio de cultivo.
- Una vez que se ha producido el crecimiento, se comprueba al microscopio de contraste de fase que las bacterias se encuentran en cultivo puro.

- Posteriormente, se centrifuga el medio de cultivo a 11.000 G (centrífuga Sigma 1-14) durante 2 minutos, tantas veces como sea necesario para obtener una gran cantidad de biomasa microbiana (*pellet*). Tras la centrifugación se elimina el sobrenadante volviendo a reponer con el medio líquido descrito anteriormente para la siguiente centrifugación.
- Tras la obtención del *pellet*, una gran gota de éste se deposita sobre un portaobjetos y sobre ella se añade una gota de NaOH 2N (80mg de NaOH/ml).
- Inmediatamente, se examina la mezcla en una cámara oscura a la luz ultravioleta a 366 nm.

La aparición de una fluorescencia de color rojo, indica que la cepa en cuestión produce el pigmento desulfovirdina (**Figura 17**).



Figura 17. Coloración roja. Indica la producción de desulfovirdina.

4.2.5.2. Producción de Ureasa, Reducción de Nitratos, Producción de Indol.

Para realizar estas pruebas, se prepara un fuerte inóculo de la cepa objeto de estudio que se disuelve en 3ml de solución salina. De la mezcla se obtienen alícuotas de 55 μ l, que se depositan en los pocillos correspondientes de una galería API *rapid* ID32A. Los cambios de color de los pocillos nos indicará el resultado de las pruebas (**Figura 18**).

Para la detección de la **Producción de Ureasa**, se añade al pocillo dos gotas de parafina. Se incuba a 37 °C en condiciones de aerobiosis durante 4 h y se observa el

resultado. Si la coloración resultante es amarilla, la prueba es negativa, si es roja, es positiva.

Para la **Reducción de Nitratos**, se añade al pocillo una gota del reactivo N₁ y una del reactivo N₂. Se espera durante 10 minutos y se observa el color resultante; la apariencia incolora indica su carácter negativo, pero si el color es rojizo pone de manifiesto su positividad.

Para la **Producción de Indol**, se añade al pocillo una gota del reactivo de James. Se espera durante 10 minutos y se observa el resultado. Si el color obtenido es rosa, la prueba es positiva, por el contrario si es incolora la prueba resulta negativa.

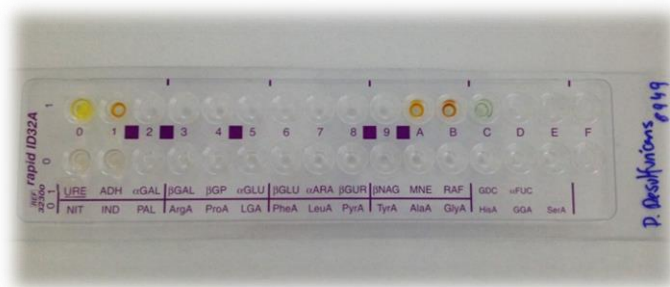


Figura 18. Galería API *rapid* ID32A.

4.2.5.3. Prueba del Spot Indol.

La producción de indol se determinó por dos métodos: las galerías API *rapid* ID32A, descrito anteriormente y el Spot indol.

El método del Spot indol se realizó como se indica a continuación:

- La cepa se siembra en el medio descrito por **Calderaro, A. et al.** (2001) sin antibióticos, con la intención de obtener una gran cantidad de masa bacteriana.
- A continuación, se utiliza un papel de filtro Whatman N° 1. Éste se impregna con 1-2 gotas de Bactidrop™ Spot Indole (Remel); reactivo formado por paradimetilaminocianamaldehído (10 g), ácido clorhídrico concentrado (100 ml) y 900 ml de agua desmineralizada.

- Sobre la mancha se añade con el asa de platino un abundante inóculo bacteriano obtenido de la placa en la que creció la cepa.
- Seguidamente, se espera durante 1-3 minutos a que se produzca la reacción.

Si la prueba es positiva, aparece un color azul alrededor del inóculo, mientras que si es negativa la coloración es rosa o no se produce cambio de coloración (**Figura 19**).

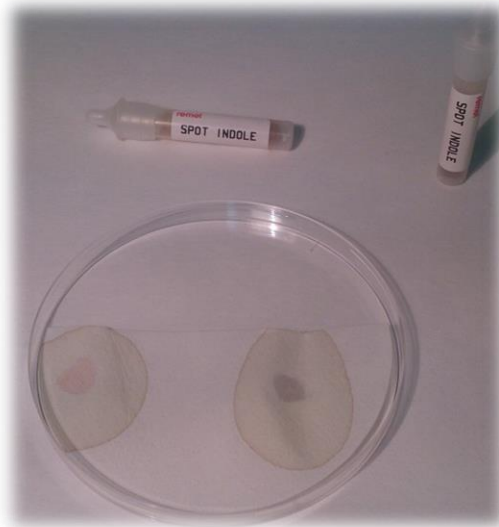


Figura 19. Prueba del Spot Indole: reacción negativa a la izquierda (rosa) y positiva a la derecha (azul).

4.2.5.4. Producción de Catalasa.

La catalasa es una enzima que poseen muchas bacterias aerobias pero también algunas anaerobias. Descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.

Para la realización de la prueba, se coloca una gota de peróxido de hidrógeno sobre un portaobjetos con ayuda de una pipeta Pasteur, se suspende el inóculo en ella y se observa el resultado. Si se detecta desprendimiento o formación de burbujas procedentes del oxígeno indica que la prueba es positiva. En cambio, si no existe reacción alguna la prueba es negativa (**Figura 20**).

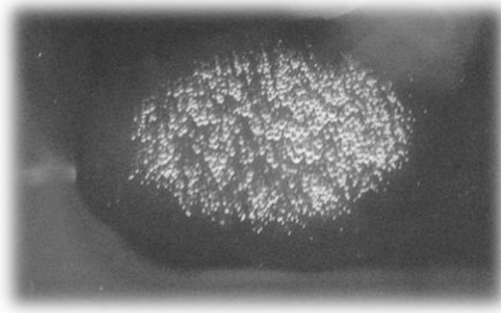


Figura 20. Reacción positiva a la prueba de la catalasa.

4.2.5.5. Producción de Sulfuro de Hidrógeno.

Como se dijo anteriormente, una de las características de las bacterias integrantes del género *Desulfovibrio* es la producción de sulfuro de hidrógeno.

Para su detección se emplea el medio de cultivo semisólido SIM (Conda, Pronidasa). Su composición en gramos por litro es la siguiente:

- Peptona de caseína.....20 g
- Peptona de carne.....6,1 g
- Sulfato de hierro y amonio.....0,2 g
- Tiosulfato de sodio.....0,2 g
- Agar bacteriológico.....3,5 g
- Agua destilada.....hasta 1.000 ml

Para obtener una gran masa bacteriana, la cepa objeto de estudio se siembra en el medio de cultivo de **Calderaro, A. et al.** (2001) sin antibióticos. A continuación, se toma un fuerte inóculo con la aguja de siembra y se deposita por punción profunda y recta en el centro del medio de cultivo SIM depositado en un tubo de ensayo.

Posteriormente, éste se incuba en condiciones de anaerobiosis a 37 °C durante 3 días. Las cepas que son productoras de sulfuro de hidrógeno, forman un precipitado de sulfuro de hierro a partir del tiosulfato, lo que origina un color negro alrededor de la línea de siembra (**Figura 21**).

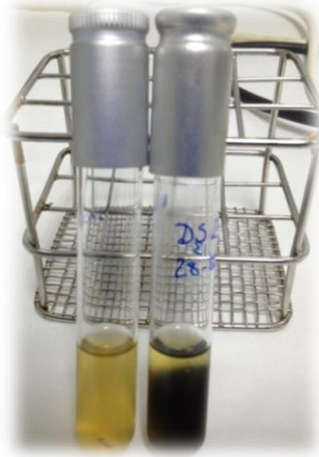


Figura 21. Producción de sulfuro de hidrógeno. El tubo de ensayo de la derecha presenta un precipitado negro alrededor de la línea de siembra, lo que indica su positividad.

4.2.5.6. Movilidad.

Las especies del género *Desulfovibrio* son móviles al poseer un flagelo polar o flagelos peritricos. Aunque existen diferentes métodos para detectar la movilidad, el empleado en este trabajo de investigación fue la visualización de las bacterias *in vivo* mediante el microscopio de contraste de fase.

4.2.5.7. Crecimiento en 20% de bilis.

Para ello se emplea el medio de cultivo sólido Bacteroides Bile Esculin agar (BBE) (Conda, Pronidasa) cuya composición por litro de agua es la siguiente:

- Agar de soja trypticaseína..... 40 g
- Bilis de buey..... 20 g
- Esculina..... 1 g
- Citrato de amonio férrico..... 0,5 g
- Sulfato de gentamicina..... 100 mg

- Hemina..... 10 mg

Para obtener una gran masa bacteriana, la cepa objeto de estudio se siembra en el medio de cultivo de **Calderaro, A. et al.** (2001) sin antibióticos. A continuación, se toma un fuerte inóculo y se realiza una siembra en el medio BBE. Posteriormente, éste se incuba en condiciones de anaerobiosis a 37 °C durante 3-4 días. Transcurrido este tiempo se observa el crecimiento, comprobándose en el microscopio de contraste de fase su estado de cultivo puro.

4.2.5.8. Resistencia a los antimicrobianos.

Una característica diferenciadora que muestran las especies del género *Desulfovibrio* de interés clínico es la sensibilidad a la kanamicina y la resistencia a la vancomicina y la colistina.

Para llevar a cabo el estudio de estas características se emplea el método de difusión en disco, el cual se realiza de la siguiente manera:

- A partir de una placa con cultivo puro se recoge un fuerte inóculo y se disuelve en 3 ml de solución salina.
- Posteriormente, se impregna abundantemente un hisopo en la mezcla homogénea y se siembra sobre toda la superficie de una placa con el medio de cultivo de **Calderaro, A. et al.** (2001) sin antibióticos.
- A continuación, se depositan sobre la superficie de la placa los discos de kanamicina (1 mg), vancomicina (5 µg) y colistina (10 µg), tal y como se indica en la **Figura 22**. La aparición de un halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco indica que la cepa es sensible a la acción de ese antimicrobiano.

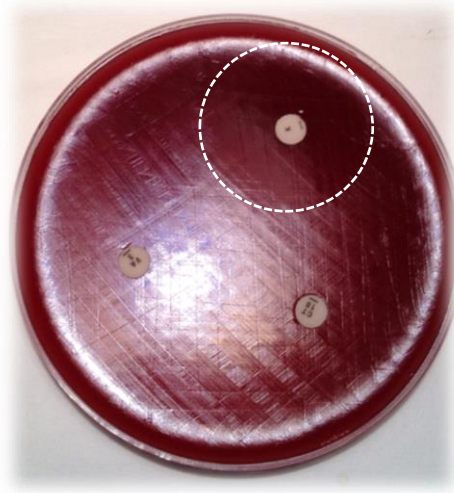


Figura 22. Estudio de la sensibilidad antimicrobiana. Método de difusión en disco. Se aprecia un halo de inhibición del crecimiento alrededor del disco de kanamicina, lo que indica que la cepa es sensible a la acción de este antimicrobiano. Sin embargo, no aparece alrededor de los discos de vancomicina y colistina, lo que pone de manifiesto su resistencia a estas sustancias.

4.2.6. Conservación de las cepas.

Para la conservación a largo plazo, las cepas obtenidas en cultivo puro se conservaron y almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para ello empleamos el sistema Vibakstore (Nirco) (**Figura 23**). Para facilitar la posterior recuperación de las cepas, se depositó abundante inóculo en cada vial empleado, transcurridos unos minutos se eliminó el líquido sobrenadante. Se congelaron mínimo tres viales por cepa.



Figura 23. Sistema de crioconservación Vibakstore.

4.2.7. Curva de crecimiento bacteriano del género *Desulfovibrio*.

Para poder realizar la prueba de la sensibilidad antimicrobiana, es necesario conocer la curva de crecimiento bacteriano del género *Desulfovibrio*.

La curva de crecimiento es la representación gráfica de la determinación periódica del número de células viables por mililitro que existen en un líquido inoculado con células microbianas provenientes de un cultivo que ha crecido previamente hasta la saturación.

Con esta curva, se pretenden definir las cuatro fases del crecimiento microbiano: fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de declinación o muerte.

La fase de latencia es el periodo de adaptación al medio de cultivo, previo al crecimiento de la población. En esta fase aunque no se incrementa significativamente el número de microorganismos, éstos son metabólicamente activos. La duración de la fase de latencia depende de dos factores: la edad del inóculo y la diferencia existente entre el medio del que procede y aquel al que se transfiere.

La fase exponencial es aquella en la cuál el microorganismo crece exponencialmente; o sea, que cada vez que pasa un cierto tiempo de generación la población se duplica y es la que se tendrá en cuenta a la hora de realizar las siguientes

pruebas. Su representación gráfica es una línea recta de pendiente positiva, que indica una velocidad de crecimiento constante.

La fase estacionaria es aquella en la que no se aprecia un incremento neto de la población. Su representación gráfica es una línea recta horizontal.

La fase de declinación o muerte se caracteriza por la disminución neta del número de células del cultivo. La velocidad con que las células mueren también es exponencial, por lo que su representación semilogarítmica da una línea recta, de pendiente negativa, que indica una velocidad de muerte constante (**Vadillo, S. et al., 2002**).

La medición de la curva de crecimiento para las bacterias del género *Desulfovibrio* se realizó por el método de la turbidimetría que consistió en sembrar tres cepas en placas de agar sangre (5%), obtenidas a partir de crioviales. Después del crecimiento durante 3-4 días a 37 ° C en anaerobiosis, se tomó con un hisopo cantidad de la bacteria y se depositó en 4 ml de tres medios de cultivo líquidos distintos (**Palomo, G., 2011**):

- Brain Heart Infusion (Conda, Pronidisa) (infusión de cerebro y corazón), que se suplementa con un 2% de Piruvato y 0,5% de Sulfato magnésico.
- Mueller-hinton Broth (Oxoid, ref. CM0405).
- Caldo Brucella suplementado con hemina (5 µg/ml), vitamina K₁ (1µg/ml) y sangre desfibrinada de oveja (5%).

Al alcanzar una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland se transfirieron 500 µl del inóculo a 49,5 ml de medio líquido correspondiente en relación 500:50. Incubamos en anaerobiosis a 37 °C realizando mediciones de absorbancia a una longitud de onda de 625 nm a las 6, 12, 24, 30, 42, 48, 54, 66, 72, 78, 90, 96, 102, 114, 120, 126, 138, 144,150, 162, 168, 174, 186, 192, 198, 210, 216, 222, 234 y 240 horas. El experimento se realizó por triplicado empleando tres cepas distintas en cada uno de los medios de cultivo anteriormente mencionados.

4.3. TÉCNICAS MOLECULARES.

4.3.1. Extracción de ADN cromosómico de las cepas aisladas del género *Desulfovibrio*.

Se partió de subcultivos sólidos en agar sangre de las cepas del género *Desulfovibrio* incubadas de 3-4 días a 37 °C en condiciones de anaerobiosis.

Con el asa de platino, se tomó una cantidad suficiente del cultivo bacteriano y se llevó a un tubo *eppendorf* estéril, con 100 µl de H₂O mili-Q estéril, que se incubó a 100 °C durante 2 minutos en un termo-bloque, para provocar la lisis celular. A continuación, para separar el ADN de los demás fragmentos celulares, se centrifugó a 14.000 rpm (centrífuga Sigma 1-14) durante 5 minutos a 22 °C. Por último, el sobrenadante se transfirió cuidadosamente a un nuevo tubo *eppendorf* estéril, para su conservación a -20 °C.

4.3.2. Electroforesis de ADN.

La electroforesis es una de las principales técnicas para la caracterización de las macromoléculas con carga (ADN, ARN y proteínas). Durante la realización de este trabajo se ha empleado la electroforesis en gel de agarosa como método básico para la identificación del ADN (productos de PCR) (Sambrook, J. et Rusell, D.W., 2001).

La gelificación de la agarosa da lugar a una estructura tridimensional formada por una red de canales cuyos diámetros oscilan desde 50 nm hasta >200 nm (Sambrook, J. et Rusell, D.W., 2001). El porcentaje de agarosa en el gel variará dependiendo del tamaño del fragmento de ADN que se vaya a analizar.

La electroforesis del ADN se llevó a cabo utilizando geles de agarosa tipo D1 Low EEO (Pronidasa) (0,8 % o 1,5% p/v) preparados en tampón TBE (*Tris base* 20 mM, ácido bórico 5mM y EDTA 0,5 mM, pH 7,8) (Sambrook, J. et Rusell, D.W., 2001). Por cada 100 ml de gel se añadieron 5 µl de solución GelStartTM (Nucleic Acid

Gel Stain 10.000x Lonza) para visualizar por fluorescencia el ADN al iluminarlo con luz UV. El molde para la preparación del gel, los peines para los pocillos, la cubeta de electroforesis y la fuente de alimentación empleadas procedieron del fabricante *Embi Tec*.

A cada 5 μ l de muestra de ADN se añadió 1 μ l de tampón de compuesto por 2 colorantes [azul de bromofenol al 0,25 % (p/v) y xilen- cianol 0,25 % (p/v)] y glicerol al 50 % (v/v). La mezcla se depositó en un pocillo del gel, sumergido en una cubeta con tampón TBE. La electroforesis se llevó a cabo en cubetas horizontales con un voltaje constante entre 80 y 100 V durante el tiempo necesario para separar suficientemente los fragmentos de ADN de interés. Como marcador de tamaño de los fragmentos se empleó 100 pb de ADN *Ladder* de Invitrogen (un primer fragmento de 2.072 pb seguido por otro de 1.500, y desde aquí cada 100 pb).

El ADN se visualizó iluminando los geles con luz UV de 220 nm empleando para ello un transiluminador de radiación UV. Las imágenes se capturaron con un equipo de fotografía con *software* (Syngene).

4.3.3. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente (PCR).

Cada reacción de PCR contenía, además del ADN a amplificar (50 mg) y la polimerasa (0,5 U de Taq ADN Polimerasa), los cebadores correspondientes (0,5 μ M), una mezcla de desoxinucleótidos (dNTPs) (0,2 mM), $MgCl_2$ (1,5 mM) y el tampón especificado por la casa comercial en un volumen final de 25 μ l. Los fragmentos de ADN amplificados se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

Los distintos oligonucleótidos empleados como cebadores en las reacciones de PCR, fueron adquiridos en IDT (Integrated DNA Technologies). La enzima Taq polimerasa utilizada fue TaKaRa Taq (Takara bio inc).

4.3.3.1. Diseño de la técnica de PCR para la determinación de las especies del género *Desulfovibrio*.

Con el objeto de identificar las distintas especies del género *Desulfovibrio* aisladas en este trabajo se han usado los cebadores específicos para la amplificación de los genes ARNr 16S previamente descritos:

Pig-F y P687-R para el gen ARNr 16S de *D. piger* (Loubinoux *et al.*, 2003), Essex-F y P687-R para el gen ARNr 16S de *D. desulfuricans* Essex 6 (Loubinoux *et al.*, 2003), 27K-F y 27K-R para el gen ARNr 16S de *D. desulfuricans* MB (Loubinoux *et al.*, 2003), Fair-F y P687-R para el gen ARNr 16S de *D. fairfieldensis* (Loubinoux *et al.*, 2003) y P94-F y P93-R para el gen ARNr 16S de *D. vulgaris* (Karkhoff - Schweizer *et al.*, 1995) (Tabla 2). En todos casos se usó como ADN molde el ADN genómico de las cepas bacterianas aisladas.

Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes: tras una desnaturalización inicial a 94 °C durante 4 min, tuvieron lugar 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 55 °C y 2 minutos de extensión a 72 °C; a estos 30 ciclos le siguieron 5 minutos a 72 °C para finalizar una posible extensión incompleta de los productos de PCR. El tamaño esperado de la amplificación es de 255 pb para los cebadores Pig/P687 y Essex/P687, de 396 pb para los cebadores 27K/27K, de 534 pb para los cebadores Fair/P687 y de 140 pb para los cebadores P94/P93.

Tabla 2. Descripción de los oligonucleótidos utilizados como cebadores para la determinación de las especies del género *Desulfovibrio*.

Aplicación	Gen diana	Tamaño producto PCR (pb)	Secuencia del cebador (5´- 3´) dirección y designación	Referencia
<i>D. piger</i>	ARNr 16S	255	CTAGGGTGTTCCTAATCATCATCCTAC (forward, Pig) GATATCTACGGATTTCACTCCTACACC (reverse, P687)	Loubinoux <i>et al.</i> , 2003
<i>D. desulfuricans</i> Essex 6	ARNr 16S	255	CTACGTTGTGCTAATCAGCAGCGTAC (forward, Essex) GATATCTACGGATTTCACTCCTACACC (reverse, P687)	Loubinoux <i>et al.</i> , 2003
<i>D. desulfuricans</i> MB	ARNr 16S	396	CTGCCTTTGATACTGCTTAG (forward, 27K) GGGCACCCTCTCGTTTCGGAGA (reverse, 27K)	Loubinoux <i>et al.</i> , 2003
<i>D. fairfieldensis</i>	ARNr 16S	534	TGAATGAACTTTTAGGGGAAAGAC (forward, Fair) GATATCTACGGATTTCACTCCTACACC (reverse, P687)	Loubinoux <i>et al.</i> , 2003
<i>D. vulgaris</i>	ARNr 16S	140	ATCGG(A/T)ACCTGGAAGGA(C/T)GACATAA (forward, P94) GGGCACAT(G/C)GTGTAGCAGTTACCGCA (reverse, P93)	Karkhoff-Schweizer <i>et al.</i> , 1995

4.3.4. Secuenciación de ADN.

Para la identificación de la cepa DS-1, se realizó un análisis de la secuencia del gen ARNr 16S.

El gen que codifica la subunidad ribosómica 16S (ARNr 16S) de la cepa bacteriana fue secuenciado en la Empresa Sistemas Genómicos S.L. (Valencia, España). Se llevó a cabo la extracción de ADN a partir de una única colonia y se sometió a una reacción de PCR con el objeto de amplificar la región del ADN correspondiente al gen ARN ribosómico 16S (ADNr 16S). El producto amplificado fue purificado, y tras ello se realizaron cuatro reacciones de secuenciación utilizando el ABI PRISM BigDye™ Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing kit. Tras este proceso, los productos de las reacciones se analizaron en un secuenciador automático modelo 3730xl ADN Analyzer.

La secuencia obtenida se comparó con las secuencias genómicas disponibles en la base de datos *GenBank* y *RDP (Ribosomal Database Project II)*. La identificación de la cepa se efectuó mediante un análisis de similitud entre la secuencia de la muestra problema y las secuencias presentes en las bases de datos mencionadas.

4.3.5. Análisis bioinformático.

Las búsquedas de similitudes de secuencias de nucleótidos se realizaron utilizando el programa BLAST en el servidor del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los alineamientos de secuencias de nucleótidos se realizaron con el programa CLUSTAL OMEGA (Larkin, M.A. *et al.*, 2007), en el servidor <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. El árbol filogenético se realizó con el método Phylogeny.fr (Dereeper, A. *et al.*, 2008) en el servidor <http://www.phylogeny.fr/>.

4.4. TÉCNICA MALDI-TOF MS.

4.4.1. Fundamento de la técnica MALDI-TOF MS.

La técnica MALDI-TOF MS (acrónimo de *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*) es un método rápido y preciso para la caracterización y la identificación microbiana (**Bizzini, A. et al.**, 2010; **Nomura, F.**, 2015). Esta técnica de espectrometría de masas, ha revolucionado el campo de la identificación bacteriana (**Bizzini, A. et al.**, 2010). Consiste en la generación huellas espectrales características en relación a su masa/carga (m/z), que son únicas para cada microorganismo, y por tanto, ideales para una identificación microbiana precisa a niveles de género y especie (**Croxatto, A. et al.**, 2012). Además, puede ser utilizada potencialmente en la tipificación e identificación de ciertas cepas bacterianas (**Croxatto, A. et al.**, 2012).

Es una técnica muy sensible, que sólo requiere para el análisis una cantidad pequeña de la biomasa bacteriana ($10^4 - 10^5$ u.f.c.) (**Nomura, F.**, 2015). Esto es especialmente favorable en el caso de bacterias anaerobias, que a menudo crecen mucho más lentamente que las aerobias y que además, producen colonias muy pequeñas, de modo que es difícil adquirir, en poco tiempo, suficiente inóculo para las pruebas bioquímicas clásicas o los métodos de identificación automatizados. Para llevar a cabo la identificación bacteriana basada en la técnica MALDI-TOF MS es necesario disponer de cultivos jóvenes (en el caso de *Desulfovibrio spp.*, 72 h \pm 24 h), conservados a temperatura ambiente y en condiciones de pureza (**Warneke, H.L. et al.**, 2014).

Cada espectrómetro de masas MALDI-TOF se compone de tres unidades principales (**Croxatto, A. et al.**, 2012):

- Una fuente de iones que hace posible la ionización y la transferencia de los mismos de la muestra a la fase gaseosa.
- Un analizador de masas que permite separar los iones en función de su relación masa carga (m/z).
- Un dispositivo de detección para el seguimiento de los iones separados.

La muestra se mezcla con una matriz sobre una placa metálica conductora. Después de la cristalización de la matriz y del material microbiano, la placa de metal se introduce en el espectrómetro de masas siendo bombardeada con pulsos de láser breves. Las moléculas ionizadas se aceleran a través de un campo electrostático y son expulsadas a través de un tubo de vuelo (analizador) sometido a vacío hasta que los iones alcanzan el detector (**Figura 24**). Los iones más pequeños viajarán más rápido que los iones más grandes. El espectro de masas que se genera está basado en su relación m/z , con picos de intensidad variables, correspondientes a la distribución estadística de los distintos isótopos del ion (**Martín-Gómez, M. et Ballesteros-González, M., 2010**). La identificación se realiza a través de la comparación (correlación) del espectro de masas de una bacteria, con todos los espectros recogidos en las bases de datos de referencia disponibles, y de acuerdo a los puntos de corte definidos para estas correlaciones. Un espectro es, por lo tanto, una firma microbiana que permite la identificación a nivel de género o especie (**Croxatto, A. et al., 2012**).

Es importante destacar que la capacidad y la fiabilidad del equipo para identificar una determinada especie bacteriana depende de la calidad y la cantidad de espectros de referencia presente en la base de datos (**Seng, P. et al., 2009**). A medida que la base de datos aumenta, mejora la capacidad de identificación (**García, P. et al., 2012**).

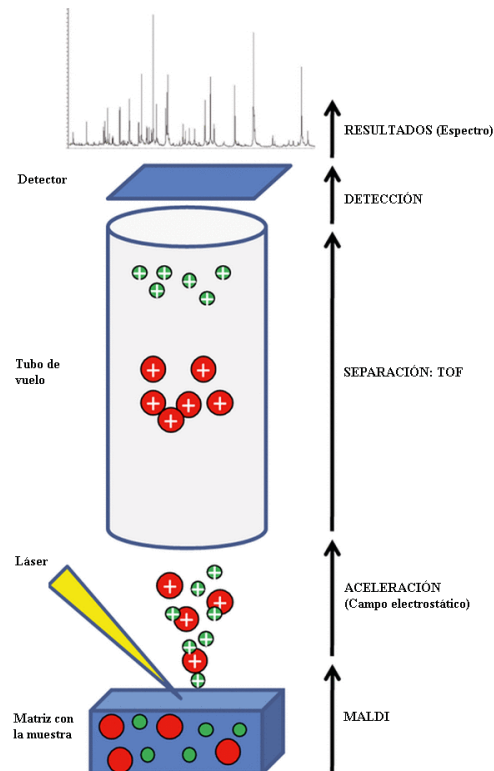


Figura 24. Esquema de la técnica MALDI-TOF MS. Esquema tomado de Croxatto, A. *et al.*, (2012).

4.4.1.1. Aplicación de la técnica MALDI-TOF MS en bacterias del género *Desulfovibrio*.

Hasta la fecha, el método más fiable para la identificación de las especies del género *Desulfovibrio* ha sido la secuenciación del gen que codifica la síntesis del ARNr 16S. Según los resultados de estudios previos basados en la comparación de la identificación mediante la técnica MALDI-TOF y la secuenciación de dicho gen se ha observado que existe una correlación entre ambas técnicas del 93-100%. (**Benagli, C. *et al.*, 2011; Bessède, E. *et al.*, 2011; Bizzini, A. *et al.*, 2010; Couturier, M.R. *et al.*, 2011; García, P. *et al.*, 2012; Saffert, R.T. *et al.*, 2011).**

Respecto a las bacterias anaerobias, es importante destacar que los métodos de identificación convencionales basados en características/propiedades bioquímicas tienen una exactitud que oscila, dependiendo del método, entre el 83% y el 98% (API®, bioMerieux; Vitek®, bioMerieux) (**García, P. *et al.*, 2012; Seng, P. *et al.*, 2009; van**

Veen, S.Q. *et al.*, 2010). Sin embargo, la técnica MALDI-TOF MS ha mostrado una excelente correlación con la secuenciación del gen ARNr 16S, llegando a sustituir a esta última como método de elección para la identificación rutinaria de bacterias anaerobias (Patel, R., 2015). Es por ello que la técnica MALDI-TOF MS podría suponer una herramienta útil en muchos laboratorios de microbiología clínica para lograr identificar bacterias anaerobias, entre las que se encuentran las bacterias del género *Desulfovibrio*.

4.4.1.2.Preparación de las muestras para su identificación mediante la técnica MALDI-TOF MS.

Se partió de cultivos puros de las cepas de desulfovibrios sembradas en agar sangre e incubadas a 37° C en jarras de anaerobiosis durante 72 h. Todos los aislados se cultivaron en las mismas condiciones con el fin de minimizar las posibles diferencias en el espectro asociadas a estas variables. La pureza del cultivo se comprobó mediante microscopia de contraste de fase.

El perfil de masas obtenido para cada bacteria mediante la técnica MALDI-TOF está compuesto fundamentalmente por péptidos y proteínas de bajo peso molecular (2-20 kDa). Para la obtención de dicho perfil se llevó a cabo una extracción de proteínas de cada aislado mediante un protocolo de etanol-ácido fórmico (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) (Schulthess, B. *et al.*, 2013).

Con el asa de plástico estéril, se tomó una cantidad suficiente del cultivo bacteriano (entre una colonia y 5-10mg), que se depositó en tubos *ependorf* de 1,5 ml con 300 µl de agua de LC-MS (acrónimo de *Liquid chromatography - mass spectrometry*) y se mezcló bien mediante una pipeta o un agitador. Posteriormente se añadieron 900 µl de etanol de calidad para HPLC o superior (Scharlab) y se homogeneizaron adecuadamente. La suspensión bacteriana se conservó a temperatura ambiente hasta completar el proceso de extracción justo antes de la lectura de la placa en el espectrómetro de masas.

Para completar el proceso de extracción, las muestras se centrifugaron a velocidad máxima (14.000 rpm) mediante un centrífuga Biofuge Pico-Heraeus durante

2 minutos, se decantó el sobrenadante, se centrifugó otra vez a 14.000 rpm y se retiró todo el residuo de etanol cuidadosamente con la punta de la pipeta, sin remover el sedimento, el cual se dejó secar completamente a temperatura ambiente durante 20 ó 30 minutos. Una vez seco el sedimento, se añadió ácido fórmico al 70% (Panreac) (de 1 a 80 μ l, siempre proporcional al sedimento obtenido). A continuación se añadió acetonitrilo (Sigma-Aldrich) (de 1 a 80 μ l, empleando siempre el mismo volumen utilizado de ácido fórmico) y se mezcló adecuadamente. Para finalizar el proceso de extracción, se centrifugó durante 2 minutos a 14.000 rpm, de tal manera que todo el material se recogió en el sobrenadante, que es donde se encuentran las proteínas de interés.

Una vez realizada la extracción de las proteínas, se depositó 1 μ l del extracto proteico de cada muestra, en una posición de la tarjeta-384 de acero pulido para MALDI-TOF. Cada pocillo, una vez seco, se cubrió con 1 μ l de matriz HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico adecuado para MALDI-TOF MS, Sigma Aldrich, C8982-10x 10 mg) a una concentración de 10 mg/ml. La función de la matriz es fundamental para el proceso de ionización que se produce a partir de la incidencia del láser. Es la clave el éxito de la técnica MALDI-TOF. La matriz cristaliza la impronta depositada en la tarjeta del MALDI-TOF, absorbiendo gran cantidad de energía a la longitud de onda del láser. Posteriormente sufre una relajación, cediendo la energía emitida a las moléculas de la muestra de una forma controlada, de manera que permite la desorción de las moléculas quedando como iones intactos en fase gaseosa. Así se genera un aerosol, cuyos iones de dicho aerosol son dirigidos hacia el analizador de masas y posteriormente al detector. Para la preparación de la matriz HCCA, se empleó Solvente Estándar (acetonitrilo 50%, agua 47,5% y ácido trifluoroacético 2,5%; Sigma Aldrich, 19182-250 ml) (**Figura 25**).

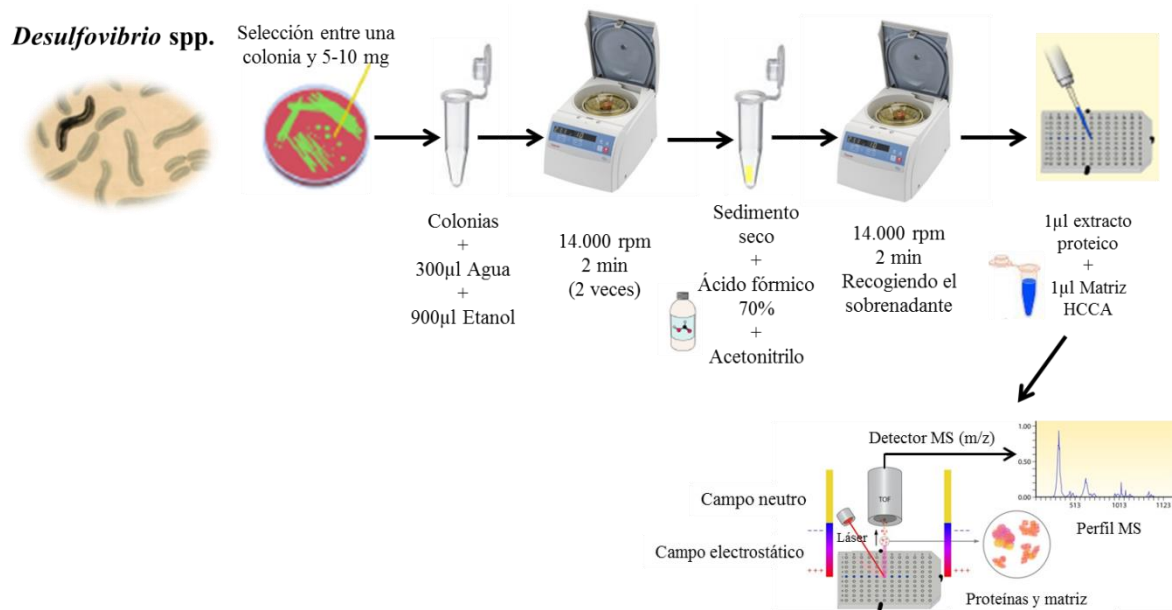


Figura 25. Esquema de la preparación de las muestras para su identificación mediante la técnica MALDI-TOF MS.

4.4.1.3. Identificación de *Desulfovibrio* spp. mediante MALDI-TOF.

La adquisición de los datos se realizó en el modo lineal positivo mediante el espectrómetro MALDI-TOF TOF UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). La creación de cada espectro se realizó mediante el programa *Flex control software* (Versión 3.4) en un rango de masas de 2.000 a 20.000 Da de un modo automático. La clasificación bacteriana a partir del perfil de masas de cada muestra se realizó mediante el programa *MALDI Biotyper Real Time Classification* que comparó el espectro problema con los espectros de la base de datos de 5.989 entradas asignándole una puntuación que representa la fiabilidad de los resultados (puntuación < 1,799: Identificación no fiable; 1,800-1,999: Probable identificación en el género; 2,000-2,299: Identificación segura de género, probable especie; \geq 2,300: Alta probabilidad en la identificación de la especie).

4.4.1.4. Aportaciones a la base de datos BDAL Bruker Daltonics (Bremen, Alemania) y reidentificación bacteriana mediante la técnica MALDI-TOF.

La base de datos de BDAL Bruker Daltonics no contenía ningún espectro de masas que se correspondiera con las bacterias del género *Desulfovibrio*, por lo que incorporaron todas las cepas de colección que posee la cátedra de Microbiología e Inmunología del Departamento de Sanidad de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura. Estas cepas son: *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* DSMZ 6949, *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* DSMZ 642, *D. fairfieldensis* ATCC 700045, *D. legallii* DSMZ 19129, *D. vulgaris* DSMZ 15375, *D. vulgaris* subsp. *vulgaris* DSMZ 644 y *D. intestinalis* DSMZ 11275. De esta manera fueron incluidas las especies *D. desulfuricans* (n=2), *D. vulgaris* (n=2), *D. legallii* (n=2), *D. intestinalis* (n=1) y *D. fairfieldensis* (n=2). Cuando se emplearon dos cepas para crear el panel de entradas de este género bacteriano, una correspondía con la cepa tipo y la otra con una de las cepas de campo, aislada e identificada por PCR.

La construcción y validación de los espectros de referencia (*Main Spectrum Profile*, MSP) que se han incluido como nuevas entradas se realizó según lo descrito por **Rettinger, A. et al.** (2012). Una vez incluidos en la base de datos, todos los perfiles de masas adquiridos para cada una de las muestras estudiadas se clasificaron de nuevo mediante el programa *MALDI Biotyper Off Line Client* (FlexAnalysis, versión 3.0., Bruker daltonics).

4.5.SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA.

4.5.1. Concentración mínima inhibitoria.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) es “la menor concentración de un agente antimicrobiano (en mg/l) que, bajo condiciones *in vitro* definidas, impide el crecimiento visible de un microorganismo en un periodo de tiempo concreto” (EUCAST, 2003).

Se trata del método aceptado y estandarizado por el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) de la European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) y usado en numerosos países punteros en la investigación microbiológica como Francia, Alemania, Suecia, Reino Unido y los Estados Unidos (Kahlmeter, G. *et al.*, 2006).

4.5.2. Términos clave en sensibilidad antimicrobiana.

Las **concentraciones mínimas inhibitorias 50, 75 y 90** (CMI50, CMI75 y CMI90) se definen como la menor concentración de antimicrobiano que inhibe el crecimiento del 50, 75 y 90%, respectivamente, de los microorganismos (Píriz, S., 1989).

Para determinar la resistencia epidemiológica de las cepas aisladas se siguen las recomendaciones de EUCAST. Estadísticamente se determina el punto de corte (*cut off value*) de la CMI a partir de los resultados de las **cepas salvajes** (WT, acrónimo de *Wild Type*) de los diversos microorganismos. Estos valores son fruto de la colaboración desinteresada de multitud de laboratorios de toda Europa (EUCAST, 2000). Sin embargo, no se recoge ningún valor de WT ni de CMI (mg/l) de antimicrobiano para el género *Desulfovibrio*; por ello, se establecen unos valores propios para nuestro estudio. Se determina que el WT de nuestro trabajo son todas las cepas con valor de CMI

inferior o igual a la CMI75, al no existir un número suficiente de casos para realizar una determinación estadística de acuerdo al procedimiento establecido por EUCAST.

El **rango o intervalo** nos indica los valores de CMI máximo y mínimo que inhiben el crecimiento de los desulfovibrios encuadrados en un determinado grupo; por un lado, de las 20 cepas que pertenecen al grupo de cerdos blancos y por otro lado a las 13 cepas que se enmarcan en el grupo de los cerdos ibéricos.

La **sensibilidad intermedia** (IS) expresa el porcentaje de cepas cuyo crecimiento se inhibe a una CMI mayor a la establecida para las **cepas salvajes**; en nuestro caso las mayores o iguales al valor de la CMI75 y las menores o iguales al valor de la CMI90.

La **resistencia antimicrobiana** (AMR, acrónimo de *Antimicrobial Resistent*), expresa el porcentaje de cepas que presentan resistencia a cada antimicrobiano, es decir, las que se inhiben a una CMI mayor a la establecida para el valor de la CMI90.

4.5.3. Método de la microdilución en caldo.

La **norma ISO 20776-1:2006** describe la **microdilución en caldo** como método de referencia para el “ensayo de sensibilidad de agentes infecciosos y evaluación del funcionamiento de los dispositivos de sensibilidad antimicrobiana”. Según dicha norma, esta técnica es la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos consistente en hacer disoluciones crecientes (normalmente en progresión geométrica en placas de razón 2) del agente antimicrobiano en placas de microdilución con capacidad de $\leq 200\mu\text{l}$ e incorporando volúmenes apropiados de otro caldo de cultivo con un inóculo de la bacteria problema.

El *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) en el documento M11-A8 (*Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobical Bacteria; Approved Standard - Eight Edition*) de febrero de 2012 llama “microdilución” al método porque implica el uso de pequeños volúmenes de caldo dispensados en placas que tienen los pocillos cónicos o redondos. Cada pocillo debe contener al menos 0,1 ml de caldo. En cuanto a los microorganismos anaerobios este procedimiento se ha llevado a cabo con

bacterias del grupo de los *Bacteroides fragilis* y otros como *Prevotella spp.*, *Fusobacterium nucleatum-necrophorum*, cocos grampositivos, *Veillonella spp.* y *Clostridium spp.* Un número limitado de agentes antimicrobianos de relevancia clínica han sido validados usando este método con bacterias anaerobias tal como se muestra en la **Tabla 2J** del documento M100-S24 del CLSI (*Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty - fourth Informational Supplement*) de Enero de 2014.

4.5.3.1.Preparación de las placas de microdilución en caldo.

El medio de cultivo utilizado fue caldo Brucella suplementado con hemina (5 µg/ml), vitamina K₁ (1µg/ml) y sangre desfibrinada de oveja (5%).

La composición del caldo Brucella deshidratado en polvo por litro es:

- Tripteína.....10 g
- Peptona de carne.....10 g
- Glucosa.....1 g
- Extracto de levadura.....2 g
- Cloruro sódico.....5 g
- Bisulfito sódico.....0,1 g

Para la preparación de este medio de cultivo se combinaron 900 ml de agua destilada con:

- Caldo Brucella en polvo 28g
- Hemina..... 1ml
- Vitamina K₁..... 1ml

Una vez disueltos los ingredientes se esterilizaron en el autoclave a 121°C durante 15 minutos. Posteriormente, el medio de cultivo se atemperó a 50 °C y se añadieron 100 ml de sangre desfibrinada de oveja por litro de medio de cultivo (50 %).

Para lisar los eritrocitos de la sangre de oveja o carnero se procedió de la siguiente manera:

- Se somete la sangre a 2-3 ciclos de congelación/descongelación.
- Se distribuye la sangre en tubos de 50 ml, diluida al 50% en agua destilada estéril, se mezcla bien y se centrifuga a 5.500 rpm durante 15 minutos.
- Se recoge 1.5 ml del sobrenadante, que se guarda refrigerado hasta su uso.

En cuanto a los agentes antimicrobianos, se eligieron los más utilizados, según la bibliografía, para los casos clínicos en los que se aislaban bacterias anaerobias sulfatorreductoras, como las bacterias del género *Desulfovibrio*. De ellos se conocían el número de lote, la potencia, la fecha de caducidad y las condiciones particulares de almacenamiento. La cantidad de antimicrobiano necesaria para elaborar la disolución madre, a partir de la cual se hicieron las diluciones seriadas para el ensayo, se calculaba a partir de la fórmula:

$$m=V \cdot \rho/P$$

Donde **m** es la masa del agente expresada en gramos (g), **ρ** es la concentración de la primera solución (mg/l), **P** es la potencia del agente antimicrobiano (mg/g) y **V** es el volumen del diluyente en litros.

La concentración en la primera solución fue 10.240 $\mu\text{g/ml}$ usando los disolventes especificados por el fabricante del antimicrobiano, o bien la farmacopea europea. Posteriormente se obtuvieron las cuatro diluciones madre con los siguientes diluyentes recomendados por la citada norma ISO (**Tabla 3**) a partir de las cuales mediante dilución a su vez en volúmenes ascendentes del medio de cultivo caldo Brucella se obtuvieron las soluciones de trabajo desde concentraciones 0,06 a 1.024 $\mu\text{g/ml}$ en progresión geométrica 2, excepto para las fluoroquinolonas en las que el rango de concentraciones fue de 0,125 a 512 $\mu\text{g/ml}$.

Más tarde, 50 μl de cada disolución final se dispensaba en las placas estériles de microdilución de fondo en V (Deltalab®) de menor a mayor concentración. Se obtenía una concentración doble de la deseada pues se incorporaban posteriormente otros 50 μl del inóculo en el mismo medio de cultivo, obteniendo así concentraciones de CMI de entre 0,03 y 512 $\mu\text{g/ml}$ (o bien 0,06-256 $\mu\text{g/ml}$, como ya se explicó anteriormente para quinolonas). En todo caso se incluía un pocillo control positivo y otro negativo según

lleve o no inóculo y siempre sin agente antimicrobiano (**Figura 26**). Según la norma ISO las placas se pueden almacenar, debidamente precintadas, en congelación (-20 °C) hasta 3 meses.

Debido a que compuestos como el ácido clavulánico se degrada más fácilmente se decidió conservarlas todas a -70 °C.

Tabla 3. Antimicrobianos elegidos con sus disolventes y diluyentes necesarios para la preparación de las microdiluciones.

Antimicrobiano	Disolvente	Diluyente
Amoxicilina	Tampón fosfato 0,1 mol/l. pH 6,0	Tampón fosfato 0,1 mol/l. pH 6,0
Amoxicilina + Ac. Clavulánico (2:1)	Tampón fosfato 0,1 mol/l. pH 6,0	Tampón fosfato 0,1 mol/l. pH 6,0
Cefotaxima	Agua destilada	Agua destilada
Ciprofloxacina	Mitad del volumen de agua destilada, 1 vol. de HCl 1 mol/l , por último se lleva al volumen total con agua destilada	Agua destilada
Clindamicina	Agua destilada	Agua destilada
Imipenem	Tampón fosfato 0,01 mol/l. pH 7,2	Tampón fosfato 0,01 mol/l. pH 7,2
Metronidazol	Agua destilada	Agua destilada

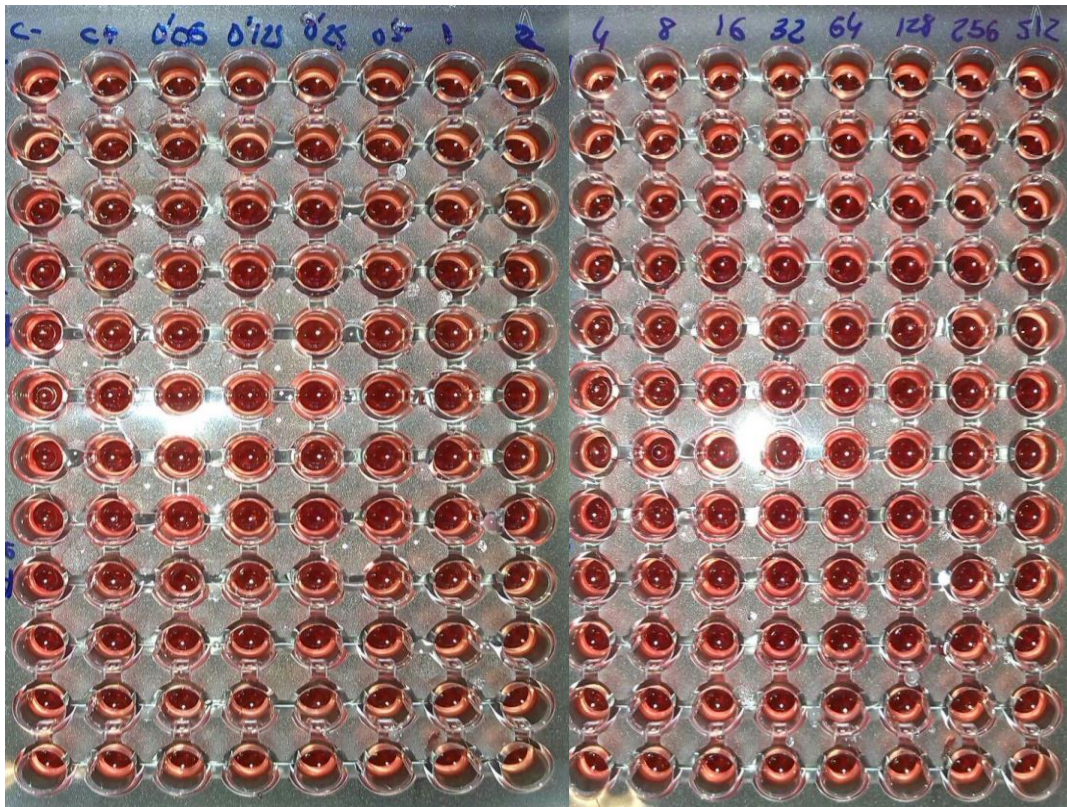


Figura 26. Placa de microdilución en caldo preparada con amoxicilina como antimicrobiano para la inoculación de las bacterias del género *Desulfovibrio*.

4.5.3.2. Inoculación e incubación de las bacterias del género *Desulfovibrio* en las placas de microdilución en caldo.

Con el objetivo de lograr una suspensión final en el pocillo de 1.10^5 UFC/ml, se sembraron los crioviales de conservación en agar sangre (5%). Después de 3-4 días en anaerobiosis a 37 °C, se recogieron las bacterias con un asa de siembra de 1 µl, se transfirieron a 4 ml de medio caldo Brucella y se incubaron a 37 °C durante 72 horas en agitación (50-80 rpm). Posteriormente se ajustó la suspensión bacteriana con el mismo medio caldo Brucella estéril hasta lograr un patrón de turbidez de entre 0,08-0,13 de absorbancia a longitud de onda de 625 nm en 1 cm de recorrido de cubeta (Perkin Elmer®), equivalente al patrón 0,5 de la escala de McFarland, obteniendo una concentración celular de 1.10^8 u.f.c./ml.

Más tarde, se diluyeron 10 µl de la solución bacteriana en 4,99 ml de caldo Brucella, siendo éste el inóculo que se siembra (50 µl) en cada pocillo de las placas de microdilución.

Las placas de microdilución se incubaron selladas con parafilm hermético y en anaerobiosis a 37 °C durante 72 (±24) horas.

4.5.3.3. Control de calidad de las placas de microdilución en caldo.

En cada par de las placas de microdilución, que sirven para realizar el ensayo con 12 cepas problema, se incluía una cepa de colección como control de calidad recomendada para monitorear las pruebas de sensibilidad antimicrobiana, *Bacteroides fragilis* ATCC® 25285, realizando el mismo procedimiento descrito para las cepas problema. Para considerar válido el experimento, el valor de CMI para cada una de ellas debía estar dentro de los intervalos dados por la norma M100-S24 (*Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement*) by Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014 y valores de referencia aportados por EUCAST, 2016 (<http://www.eucast.org/>).

Además, puntualmente se realizaba un control de calidad de las suspensiones normalizadas de inóculo para cerciorarse de que la concentración real de las mismas era de 1.10^5 u.f.c./ml. El procedimiento que se siguió fue tomando 20 μ l del pocillo control positivo (sin antimicrobiano) justo después de la inoculación para diluirlo en 9,98 ml de medio de caldo Brucella. De esta suspensión se sembraban 100 μ l sobre una placa de agar sangre (5%). Se debía obtener aproximadamente 20 colonias tras 3-4 días de incubación a 37 °C en anaerobiosis.

4.5.3.4. Lectura de resultados.

La lectura de resultados únicamente se realizaba cuando el control positivo presentaba un botón de crecimiento o una turbidez definida y no existía crecimiento en el control negativo, es decir, cuando la técnica se considera que se ha realizado correctamente y que no presenta contaminación alguna (CLSI, M11-S8, 2012).

4.5.4. Actividad beta-lactamasa.

Una vez caracterizada la resistencia fenotípica a los antimicrobianos del panel nos centramos en los mecanismos que posibilitan dicho fenómeno, especialmente en lo referido a los betalactámicos.

Uno de los principales mecanismos de resistencia a los betalactámicos es la producción por parte de las bacterias de enzimas que hidrolizan el anillo betalactámico de dichos antimicrobianos: las beta-lactamasas, quedando imposibilitados para unirse al sitio activo de la pared celular, es decir, las proteínas fijadoras de penicilinas (PBP, acrónimo de *penicillin binding proteins*), por lo que no pueden interferir en las reacciones de transpeptidación de la síntesis de la pared.

En las bacterias gramnegativas, como son los desulfovibrios, las beta-lactamasas se concentran en el espacio periplásmico, clasificándose en función del antimicrobiano sobre el que ejercen efecto (cefalosporinasas, cefuroximasas, beta-lactamasas de

espectro extendido o BLEE y metalo-lactamasas), si les afectan o no los inhibidores beta-lactamámicos (ácido clavulánico o EDTA, por ejemplo) y por la ubicación de los genes que las codifican (*bla*) en el cromosoma o en elementos de transmisión horizontal como los plásmidos (Blanco, M. *et al.*, 2006).

Tras realizar una pequeña introducción, se desarrolla el procedimiento seguido para la identificación de las beta-lactamasas. Esta parte experimental se ha basado en la experiencia adquirida en nuestro laboratorio (Palomo, G., 2011; Campos, M.J., 2011).

4.5.4.1. Prueba cualitativa en placa.

Este análisis se realizó previamente a la cuantificación de la actividad beta-lactamasa para comprobar que la resistencia a los betalactámicos se debe a dicho mecanismo. Se vertió una gota de la cefalosporina cromogénica nitrocefín (5g/ml Cayman®) sobre cada colonia problema, es decir las cepas resistentes a las penicilinas, tras su crecimiento a 37°C durante 72 horas en anaerobiosis. En los casos en los que el nitrocefín viraba del marrón-amarillo original a tonos rojos-anaranjados en el siguiente minuto se presentaba actividad beta-lactamasa, mientras que en función de la intensidad de la reacción (del color) esta se valoraba como negativa (sin cambios en la coloración del nitrocefín), baja (tonos cálidos claros) o alta (rojizo).

Este procedimiento no resultó interesante puesto que las colonias del género *Desulfovibrio* presentan tonos marronáceos por lo que había lugar a equívocos. Por lo tanto, todas las cepas resistentes o con sensibilidad intermedia a la amoxicilina, es decir, con CMI mayor a CMI75 de este antimicrobiano fueron sometidas a la prueba de la cuantificación de la actividad enzimática.

4.5.4.2. Cuantificación de la actividad enzimática.

Las cepas descritas anteriormente eran sometidas, tras la preparación de su extracto acelular, al test espectrofotométrico de actividad betalactámica, con el nitrocefín como sustrato y el ácido clavulánico como perfil de inhibición.

- **Preparación de extractos acelulares.**
 - o **Precultivo.**

Del mismo cultivo (placas de agar sangre) utilizado para la prueba cualitativa, se sembraron 4-5 asas de 1 μ l llenas de colonias en 5 ml de medio líquido (BHI suplementado con 2% de piruvato y 0,5% de sulfato magnésico). Se incubaron durante 3 días a 37°C en anaerobiosis y en agitación (70 rpm).

- o **Cultivo.**

Posteriormente se realizó una nueva siembra por dilución 1:100 de la anterior, en el mismo medio. Es decir 0,4 ml de suspensión bacteriana en 40 ml de BHI enriquecido en un matraz de Erlenmeyer. Se incubó en incubador orbital (agitación 4.000 rpm) en las mismas condiciones anteriormente citadas. Se controlaba el crecimiento celular para evitar que las bacterias entraran en fase estacionaria, aunque permitiendo un crecimiento suficiente, siempre guiándose de la curva de crecimiento que se diseñó. Se midió la densidad óptica (DO) o absorbancia (ABS) a 600 nm de longitud de onda a los 3-4 días hasta llegar a valores de 0,4-0,8 de absorbancia. Una vez logrado esto se introducían en hielo todas las cepas para detener el crecimiento.

Algunas requerían continuar con el crecimiento en el agitador orbital y otras con la dilución en medio BHI enriquecido estéril.

Finalmente, se almacenaban 150 μ l del cultivo por si fuera necesario repetir la prueba cualitativa de determinación de la producción de actividad beta-lactamasa en las células vivas con nitrocefín.

○ **Lisis celular.**

Se centrifugaba cada cultivo a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C, en tubos Falcon estériles de 50 ml. Se recuperaba el sedimento o *pellet* en 50 ml de tampón fosfato sódico (PiNa) 50 mM, pH 7. Se lavaba y se volvía a centrifugar en idénticas condiciones para eliminar los restos del medio de cultivo. Se resuspendía de nuevo en 2 ml de PiNa 50 mM, pH 7. En este punto se seguía con el protocolo, y por tanto o sonicar, o bien congelar a -80 °C.

Para lisar las células recurrimos a un método por ultrasonidos (Vibra Cell ®). Los cultivos, 20 veces concentrados en PiNa, se mantenían suspendidos en agua-hielo antes y durante la sonicación con microsonda a 100% de potencia y con 33% de eficiencia en ciclos de 30 segundos. Se aplicaban los ciclos durante 60-120 segundos hasta que la suspensión bacteriana perdía turbidez. Tras centrifugar a 8000 rpm durante 5 minutos a 4°C, con el objetivo de eliminar restos celulares indeseados, el sobrenadante, compuesto por citosol y membrana plasmática, se recogía en al menos dos alícuota en tubos *eppendorf* de 1,5 ml. Los extractos acelulares se almacenaban a -80 °C hasta su utilización.

4.5.4.3. Prueba cualitativa en tubo.

A partir de los extractos conservados se volvía a contrastar de manera cualitativa la actividad beta-lactamasa con el propósito de ajustar la cantidad del mismo que era necesario para la parte cuantitativa del ensayo. Se tomaron 20 μ l de cada extracto y se enfrentaron a 20 μ l de nitrocefín (50 μ g/ml en PiNa 0,1M pH 7) en un tubo *eppendorf* de 200 μ l, a temperatura ambiente durante un par de minutos. En estudios anteriores el

cambio de coloración en los extractos (desde el amarillo al rojo pasando por un intermedio rosáceo) fue evaluado mediante signos positivo/negativo. Sin embargo, esta vez la aparición de color rojo en el tubo, después de 2 minutos, se consideró positivo +++ (alta actividad), los tonos rosáceos indicar actividad media (++) o baja (+). Por último, el amarillo equivalente al control negativo se consideró negativo (-) (**Palomo, G., 2011; Campos, M.J., 2011**).

Sin embargo, al no conseguir unos extractos acelulares transparentes, la mezcla de estos con el nitrocefín causaba dudas en la interpretación de los resultados, por lo que se decidió realizar la determinación cuantitativa de la actividad beta-lactamasa.

4.5.4.4. Determinación cuantitativa de la actividad beta-lactamasa.

En función de la concentración de beta-lactamasas en el extracto acelular, la degradación del nitrocefín será más o menos intensa. Al tratarse de una cefalosporina cromogénica su degradación supondrá un cambio de color detectable a una longitud de onda de 486 nm. El ensayo se llevó a cabo en un espectrofotómetro con carrusel atemperado (Espectrofotómetro Helios-beta, Thermospectronic) de manera que se pudieron hacer cuatro medidas consecutivas a una temperatura constante de 37 °C en cada una de las cubetas problema: dos con el nitrocefín como sustrato y otras dos añadiendo el clavulanato como inhibidor. El ensayo se repitió desde el precultivo de manera que contamos con cuatro medidas de cada cepa con y sin clavulanato.

Para realizar esta prueba fueron necesarios los siguientes reactivos: nitrocefín (Cayman®, 500 µg/ml), tampón fosfato sódico (0,1M pH 7.0 atemperado a 37 °C) y clavulanato sódico (Sigma®, 1 mg/ml).

- Procedimiento.

Se descongelaron los extractos tan solo una vez por ensayo y se mantenían en agua-hielo hasta su utilización. Las dos primeras cubetas contenían 880 µl del tampón

fosfato sódico atemperado a 37 °C; mas 100 µl del nitrocefín. A las dos últimas cubetas se incorporan, además, 10 µl del clavulanato así como se resta esos mismos 10 µl a la cantidad de tampón de cada cubeta. La cantidad de extracto fue de 10 µl que se depositaba en cada cubeta.

Rápidamente se volteaba cinco veces cada cubeta usando parafilm como sellador y acto seguido se depositan en el carrusel para proceder a la medición de la actividad enzimática (absorbancia, ABS) frente al tiempo (minutos), con hasta seis mediciones cada 30 segundos, que generaba la correspondiente curva cinética.

El valor de la pendiente ($\eta = \Delta \text{ABS} / \Delta t$) se calcula siempre en el tramo de la curva en fase exponencial, es decir antes de que comience el agotamiento enzimático del sustrato, procurando que los valores estén comprendidos entre 0,01 y 0,1. La actividad enzimática se calcula según la Ley de Beer-Lambert a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Act. Enz.} = [(\eta * 10 / 20500) / V_{\text{extracto}}] / \text{CPT}$$

Donde **Act. Enz** es la actividad enzimática medida en mU/mg, η es la pendiente de la absorbancia (ABS) frente al tiempo (minutos). Aplicando la Ley de Beer-Lambert se calcula la cantidad de sustrato transformado por unidad de tiempo (U/ml), y de aquí la actividad enzimática en U/ml de extracto (siendo U las micromol·min⁻¹). Se aplica un factor de corrección de 10⁶ mientras que 20.500 (M⁻¹ cm⁻¹) es el coeficiente de extinción de Beer-Lambert para una longitud de onda de 486 nm. **Vextracto** es el volumen (ml) del extracto sobre el que se ha cuantificado la actividad y **CPT** la concentración de proteínas totales del extracto (mg/ml) según el método de Bradford. Por último se calcula la actividad específica (U/mg proteína).

Tras obtener las dos medidas de la actividad enzimática que se correspondían con los dos ensayos completos que realizamos, los valores eran insignificantes, por lo que no se observó actividad betalactámica en ninguna de las cepas de *Desulfovibrio* resistentes a la amoxicilina y sensibles con amoxicilina-ácido clavulánico. Por este motivo no se continuó con el procedimiento descrito por **Palomo, G., 2011** y **Campos,**

M.J., 2011, es decir con la determinación de enzimas beta-lactamasas mediante isoelectroenfoque.

4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.

Nos hemos servido de las hojas de cálculo de Microsoft Excel 2010 y del programa SPSS Statistics 18.0 para el tratamiento estadístico y para la representación gráfica de los datos. Para analizar la asociación entre variables cualitativas se empleó la prueba de Ji-cuadrado (χ^2), siempre y cuando las variables no son extremas y más del 20% presentan frecuencias esperadas ≥ 5 , siendo todas ≥ 1 , y la prueba Odds Ratio (OR), cuando las proporciones son extremas, es decir, que su rango de valores está próximo a 0 ó 1.

La prueba de Ji cuadrado (χ^2), fue utilizada para evaluar hipótesis acerca de la relación entre dos variables categóricas, pertenecientes a un nivel de medición nominal u ordinal. La prueba de χ^2 parte del supuesto de que las dos variables no están relacionadas, es decir que hay independencia. En la hipótesis nula se establece la independencia de las variables. En la hipótesis alternativa se establece que las variables están relacionadas. Para esta prueba también hay que tener en cuenta el nivel de significación. El nivel de significación indica la probabilidad de cometer un error al rechazar la hipótesis nula, en el supuesto de que esta hipótesis sea cierta. En nuestro caso este valor será de 0,05. Cuando el estadístico χ^2 tiene una probabilidad \leq a 0,05 se rechaza la hipótesis de independencia, es decir la relación entre variables para tomar la hipótesis alternativa, que indica que la relación entre las variables es estadísticamente significativa.

Para la prueba Odds Ratio (OR), indicador del riesgo, se aplica si las dos variables estudiadas son cualitativas en la escala nominal y con sólo dos categorías o modalidades. Si no hay relación entre las variables el valor del OR es igual a 1, si el factor aumenta la probabilidad, el OR es mayor que 1 y, si disminuye, el OR es menor que 1.

RESULTADOS

5. RESULTADOS.

5.1. AISLAMIENTO DE LOS DESULFOVIBRIOS.

Se analizaron un total de 276 muestras de 94 casos clínicos procedentes de cerdos que padecían un cuadro compatible con la disentería. Las muestras se acompañaban de un historial con todas las características de la explotación, lugar y fecha de recogida, raza, régimen y edad del animal y tipo de muestra.

El origen de las muestras se correspondió con diferentes explotaciones distribuidas por diversos lugares de las Comunidades Autónomas de Murcia, Cataluña, Aragón, Castilla-La Mancha, Andalucía, Extremadura y Castilla-León (**Figura 27**).

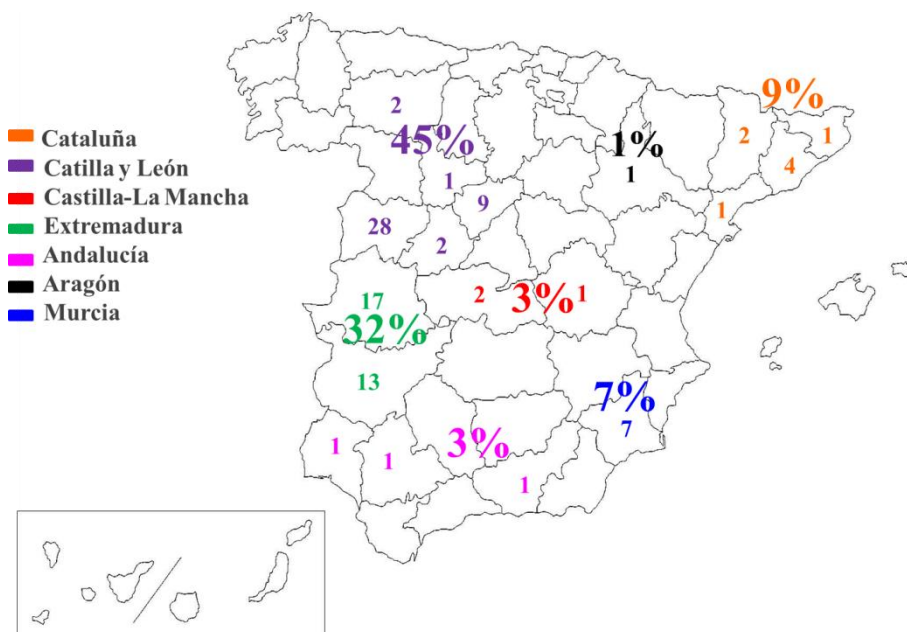


Figura 27. Procedencia de las muestras. Número de casos por provincia y porcentajes de cada Comunidad Autónoma.

Como se observa en la **Figura 27**, las Comunidades Autónomas de las que recibimos mayor número de muestras fueron Castilla y León (45%), seguida de Extremadura (32%). Cataluña (9%), Murcia (7%), Andalucía y Castilla-La Mancha con un 3% y Aragón (1%) fueron las Comunidades Autónomas de las que recibimos un menor número de muestras.

En cuanto a la estación de recogida de muestras (**Figura 28**) que se distribuye desde el año 2011 hasta el 2015, se observa un porcentaje muy similar en invierno (36%), otoño (32%) y primavera (28%) y menor en verano (4%).

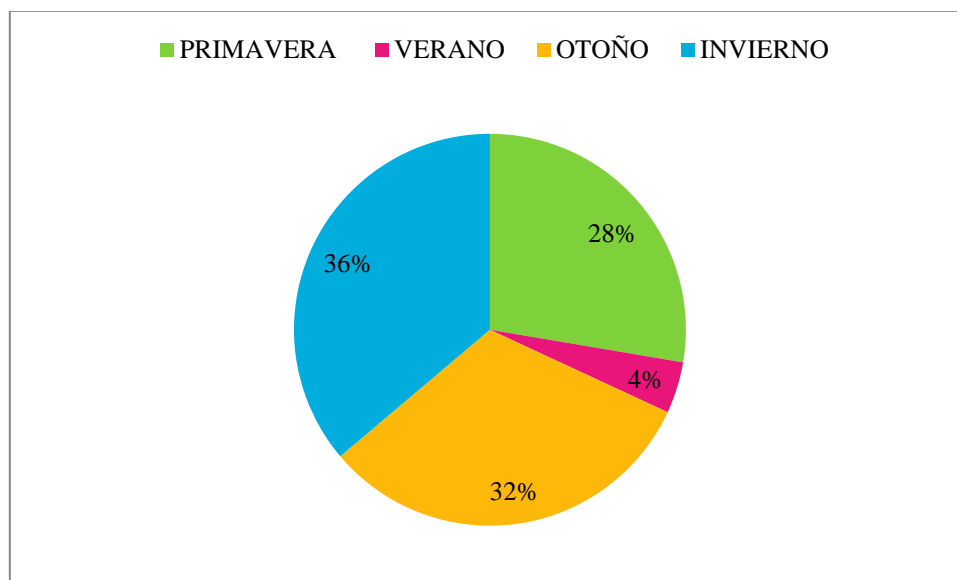


Figura 28. Número de muestras recogidas (en %) por cada estación del año.

La raza y el régimen de explotación se detallaron en el historial de las muestras recibidas. Se investigaron muestras provenientes de 3 razas porcinas: la blanca, la ibérica cruzada con duroc (en el 75% y en el 25%) y la ibérica pura, cuyo régimen de explotación era intensivo, semiextensivo y extensivo, respectivamente (**Figura 29**).

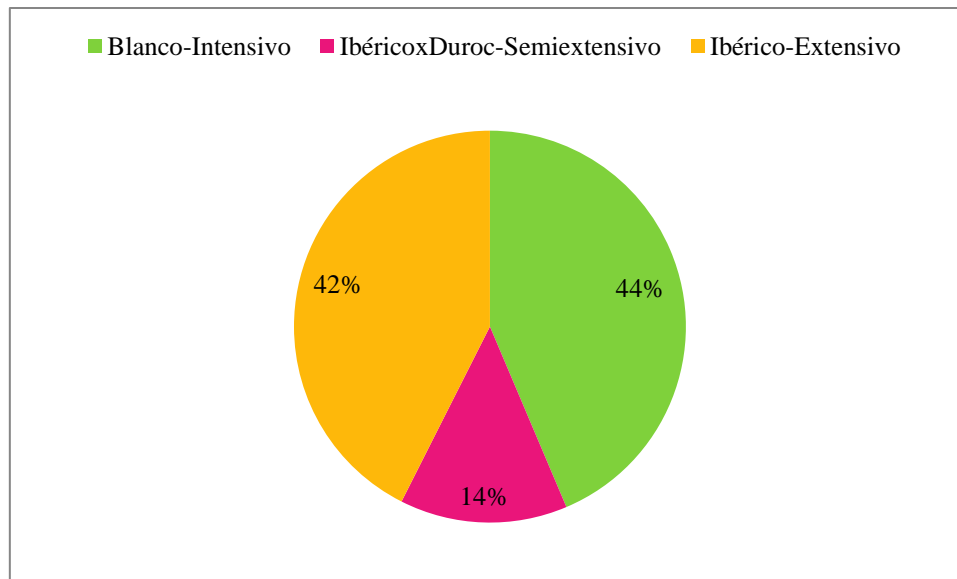


Figura 29. Raza/Régimen de explotación de los animales de los que se tomaron las muestras.

Tras analizar la figura, se constata que la mayor parte de los animales muestreados fueron blancos con régimen intensivo (44%), seguido del ibérico-extensivo con un 42% y en menor porcentaje ibérico x duroc (14%).

Con respecto a la edad de los animales muestreados, un 65% del total se situaron entre los 2-4 meses, periodo en el que sufren mayor cantidad de procesos infecciosos. Hasta ese momento no se distingue el régimen de la explotación puesto que a estas edades el control sanitario es el mismo para cualquier raza. Un 10% los animales presentaban edades comprendidas entre los 5-8 meses y un 25% se correspondieron con los reproductores (**Figura 30**).

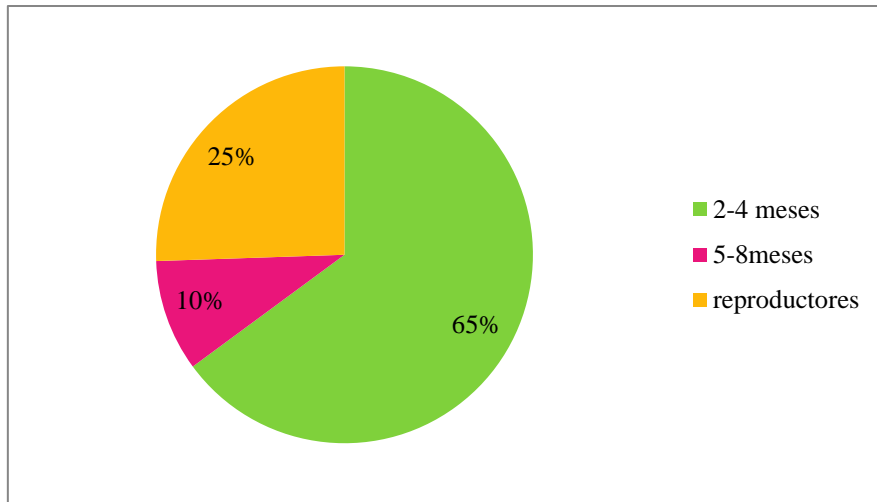


Figura 30. Edad de los animales muestreados en porcentajes.

Como se puede observar en la **Figura 31**, el tipo de muestra en la mayor parte de los casos fueron heces de los animales recogidas del suelo o por vía rectal (94%). Con este tipo de muestras es muy complicado aislar bacterias anaerobias por la gran cantidad de contaminación existente en las mismas. En una minoría de los casos muestreados (6%), se realizó la necropsia del animal, empapando el hisopo directamente en el intestino grueso (colon y ciego).



Figura 31. Tipo de muestras recibidas.

Una vez recibidas las muestras en el laboratorio se sembraron en las placas de cultivo y se incubaron en anaerobiosis a la temperatura y tiempos descritos en el apartado **4.2.1. de Materiales y Métodos**. Tras el examen de las placas de cultivo, las colonias del género *Desulfovibrio* se encontraron conjuntamente con las del género *Brachyspira*, en las líneas de agotamiento de la siembra.

De los 94 casos analizados se aislaron 79 cepas del género *Brachyspira*, lo que presenta un 74,26 % de prevalencia. Además en la **Figura 32** se muestran los porcentajes de las especies aisladas de este género por **San Juan, C. (2015)**, siendo *B. hyodysenteriae* con un 38% la especie más aislada, seguida de *B. pilosicoli* con un 18%, *Brachyspira. sp. (B. sp.)* con un 17%, *B. murdochii* con un 11%, *B. innocens* con un 10% y con un 6% *B. intermedia*.

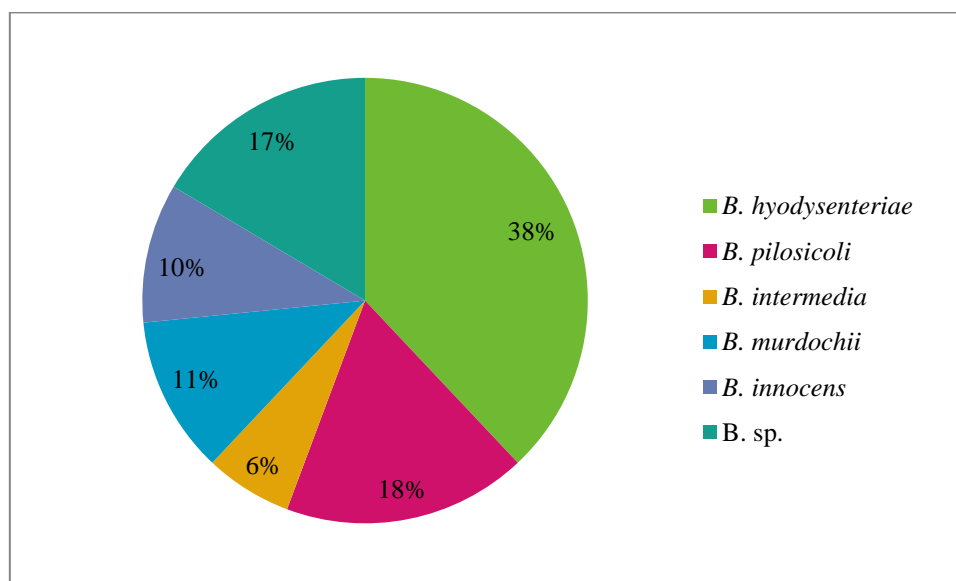


Figura 32. Especies del género *Brachyspira* aisladas en los 79 casos. (San Juan, C., 2015).

Del género *Desulfovibrio* se obtuvieron un total de 33 cepas, lo que representa el 31,02 % de los casos estudiados. De las 33 cepas aisladas, 20 corresponden a cerdo

blanco, 8 a cerdo ibérico y 5 a cerdo ibérico cruzado con duroc. Estas fueron identificadas inicialmente mediante su observación en el microscópico de contraste de fase con la intención de apreciar la morfología de las células bacterianas así como su movilidad, teniendo en cuenta que las formas espirales pueden confundirse con las brachyspiras (espiroquetas), como se observa en la **Figura 15** del apartado **4.2.3** de **Materiales y Métodos**.

Las 33 cepas de desulfovibrios aisladas crecieron en cocultivo con las distintas especies del género *Brachyspira* aisladas a partir de las mismas muestras analizadas, según se muestra en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Número de cepas de cada especie del género *Brachyspira* aisladas en cocultivo con los desulfovibrios.

ESPECIE DEL GÉNERO <i>BRACHYSPIRA</i> *	Nº
<i>B. hyodysenteriae</i>	10
<i>B. pilosicoli</i>	4
<i>B. murdochii</i>	4
<i>B. intermedia</i>	3
<i>B. innocens</i>	5
<i>Brachyspira sp.</i>	7

* Cepas identificadas mediante los genes ARNr 16S y nox (San Juan, C., 2015).

El 31% de los desulfovibrios se aislaron junto con *Brachyspira hyodysenteriae*, seguido de *B. innocens* con el 15%, con un porcentaje del 12% se encuentran *B. pilosicoli* y *B. murdochii* y con un 9% *B. intermedia*. No obstante existe un 21% de brachyspiras que quedan sin identificar (*Brachyspira sp.*) (**Figura 33**).

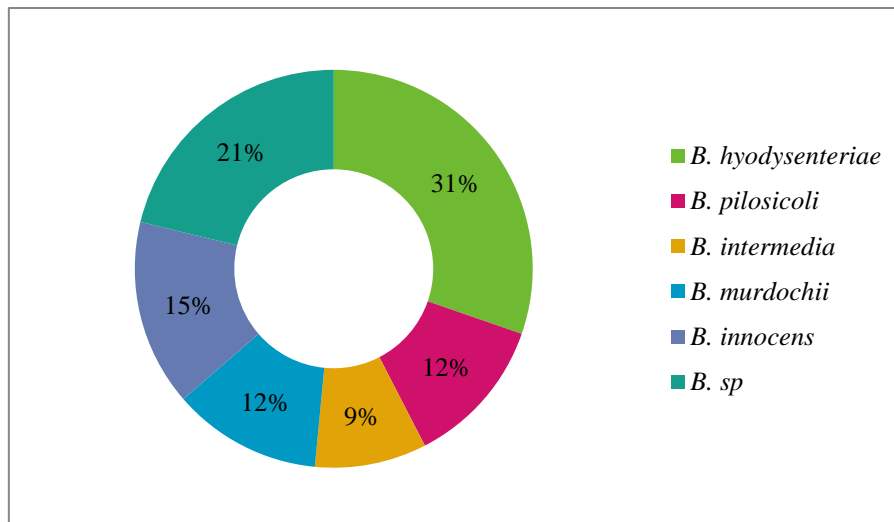


Figura 33. Especies del género *Brachyspira* aisladas en cocultivo con desulfovibrios.

Una vez descrita toda la información recibida y obtenida tras el análisis de las muestras, procedimos a realizar un estudio epidemiológico con la ayuda del programa estadístico SPSS Statistics 18.0. Realizamos la prueba de Ji cuadrado (χ^2) con todas las variables, observando que no hay asociación entre especie del género *Brachyspira* y la raza porcina de aislamiento. Sin embargo, existe una asociación en cuanto a los aislados con la estación, siendo en el estadio de primavera donde se concentran mayor número de aislados. También se observa una relación estadísticamente significativa ($p= 0,000$) en los casos negativos a *Brachyspira* y la raza ibérica.

Con respecto a la edad, tanto en el caso de los aislados como en el de los no aislados el mayor porcentaje se concentra entre los 2-4 meses.

5.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS.

5.2.1. Pruebas bioquímicas del género *Desulfovibrio*.

En la **Tabla 5** se muestran los resultados obtenidos tras realizar las pruebas bioquímicas a los desulfovibrios aislados.

Tabla 5. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas aisladas.

Cepa	Desulfovirdin test	Catalasa	Spot indol	Nitratos	Urea	SIM	Creci en 20% de Bilis	Movilidad	Vancomicina	Kanamicina	Colistina
1	+	+	-	-	-	+	+	+	R	S	R
2	+	+	-	-	-	+	+	+	R	S	R
4	+	-	-	+	-	+	+	+	R	S	R
6	+	+	-	-	-	+	+	+	R	S	R
7	+	+	-	-	-	+	+	+	R	S	R
8	+	+	-	-	-	+	+	+	R	S	R
9	+	+	-	-	-	+	+	+	R	S	R
10	+	+	-	-	-	+	+	+	R	S	R
11	+	-	-	-	-	+	+	+	R	S	R
12	+	+	-	-	-	+	+	+	R	S	R
13	+	+	-	-	-	+	+	+	R	S	R
14	+	+	-	-	-	+	+	+	R	S	R
15	+	+	-	-	-	+	+	+	R	S	R
16	+	+	-	-	-	+	+	+	R	S	R
17	+	+	-	-	-	+	+	+	R	S	R
18	+	+	-	-	-	+	+	+	R	S	R
19	+	+	-	+	-	+	+	+	R	S	R

+ = Reacción positiva; - = Reacción negativa. R = Resistente; S = Sensible.

Tabla 5. (Continuación).

Cepa	Desulfovirdin test	Catalasa	Spot indol	Nitratos	Urea	SIM	Creci en 20% de Bilis	Movilidad	Vancomicina	Kanamicina	Colistina
21	+	+	-	-	-	+	+	+	R	S	R
23	+	+	-	-	-	+	+	+	R	S	R
24	+	+	-	-	-	+	+	+	R	S	R
25	+	+	-	-	-	+	+	+	R	S	R
26	+	-	-	-	-	+	+	+	R	S	R
28	+	+	+	-	-	+	+	+	R	S	R
29	+	+	-	-	-	+	+	+	R	S	R
30	+	+	-	-	-	+	+	+	R	S	R
31	+	+	-	-	-	+	+	+	R	S	R
32	+	+	-	-	-	+	+	+	R	S	R
33	+	+	-	-	-	+	+	+	R	S	R
34	+	+	-	-	-	+	+	+	R	S	R
35	+	+	-	-	-	+	+	+	R	S	R
36	+	+	-	-	-	+	+	+	R	S	R
37	+	+	-	-	-	+	+	+	R	S	R
38	+	+	-	-	-	+	+	+	R	R	R

+ = Reacción positiva; - = Reacción negativa. R = Resistente; S = Sensible.

Resultados

Como se puede apreciar en la **Tabla 5**, todas las cepas produjeron desulfovirdina y sulfuro de hidrógeno, fueron móviles, no elaboraron ureasa y crecieron en agar con un 20% de bilis. La mayoría de los aislados resultaron positivos a la catalasa, excepto la cepa DS-4, DS-11 y DS-26 que fueron negativos. Solo un aislado (cepa DS-28) fue positivo a la prueba del Spot indol. Las cepas DS-4 y DS-19 fueron las únicas que redujeron los nitratos a nitritos.

En cuanto a los resultados de resistencia a los antimicrobianos obtenidos, se aprecia que todas las cepas aisladas fueron resistentes a la vacomicina y colistina y sensibles a la kanamicina.

También se realizaron las mismas pruebas bioquímicas a las siete cepas de colección que disponemos en la Cátedra de Microbiología e Inmunología del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura (**Tabla 6**).

Tabla 6. Resultados de las pruebas bioquímicas efectuadas a las cepas de colección.

Cepa de colección	Desulfoviridin test	Catalasa	Spot indol	Nitratos	Urea	SIM	Creci en 20% bilis	Movilidad	Vancomicina	Kanamicina	Colistina
<i>D. desulfuricans</i> subsp. <i>desulfuricans</i> DSMZ 6949	+	+	-	-	-	+	+	+	R	S	R
<i>D. desulfuricans</i> subsp. <i>desulfuricans</i> DSMZ 642	+	-	-	+	-	+	+	+	R	S	R
<i>D. fairfieldensis</i> ATCC 700045	+	+	-	-	-	+	+	+	R	S	R
<i>D. legallii</i> DSMZ 19129	+	+	-	+	-	+	+	+	R	S	R
<i>D. vulgaris</i> DSMZ 15375	+	+	-	+	-	+	+	+	R	S	R
<i>D. vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> DSMZ 644	+	-	+	-	-	+	+	+	S	S	R
<i>D. intestinalis</i> DSMZ 11275	+	-	-	-	-	+	+	+	R	S	R

+ = Reacción positiva; - = Reacción negativa. R = Resistente; S = Sensible.

Del análisis de la **Tabla 6**, se constata que los resultados obtenidos con nuestras cepas son muy similares a los conseguidos con *D. fairfieldensis* ATCC 700045, *D. desulfuricans* DSMZ 6949 y *D. intestinalis* DSMZ 11275. Igualmente, los resultados de resistencia a los antimicrobianos obtenidos con las cepas de colección son muy similares a los conseguidos con los aislados en este trabajo de investigación.

5.2.2. Curva de crecimiento bacteriano del género *Desulfovibrio*.

Hasta la realización de estas investigaciones no se había calculado la curva de crecimiento para las bacterias del género *Desulfovibrio*. Esta información es necesaria para la realización de las distintas técnicas de sensibilidad antimicrobiana.

Se eligieron al azar, puesto que todas se identificaron como *D. fairfieldensis*, tres cepas del género *Desulfovibrio*, las cuales se sometieron a la técnica desarrollada en el apartado **4.5.3. de Materiales y Métodos** por triplicado. A continuación se muestran los valores de absorbancia a las 6, 12, 24, 30, 42, 48, 54, 66, 72, 78, 90, 96, 102, 114, 120, 126, 138, 144, 150, 162, 168, 174, 186, 192, 198, 210, 216, 222, 234 y 240 horas para cada medio de cultivo. Estos valores se conforman tras la realización de las medias aritméticas de los experimentos por cada cepa investigada.

Tras emplear el medio de cultivo Brain Heart Infusion (Conda, Pronidisa) (BHI) (infusión de cerebro y corazón), que se suplementa con un 2% de piruvato y 0,5% de sulfato magnésico, se muestran las curvas de crecimiento en la **Figura 34**.

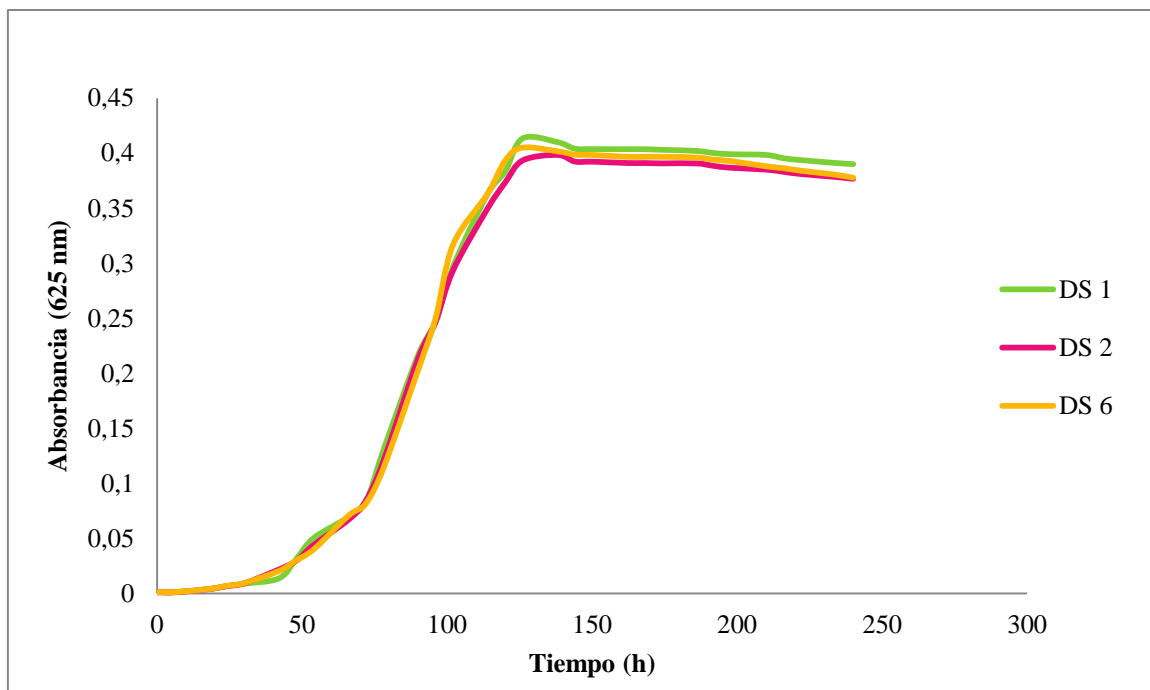


Figura 34. Curvas de crecimiento realizadas con el medio de cultivo BHI enriquecido.

Los valores de absorbancia de las distintas mediciones son reproducibles, con una desviación estándar en todo caso menor de 0,036. Como se observa en la **Figura 34** los resultados en las tres cepas aisladas del género *Desulfovibrio* cultivadas en el medio líquido BHI enriquecido son muy similares, comenzando la fase exponencial a las 72-78 horas y terminando a las 126 horas.

Con el medio de cultivo líquido Mueller-Hinton (Oxoid, ref. CM0405), la representación gráfica de las curvas de crecimiento se muestran en la **Figura 35**.

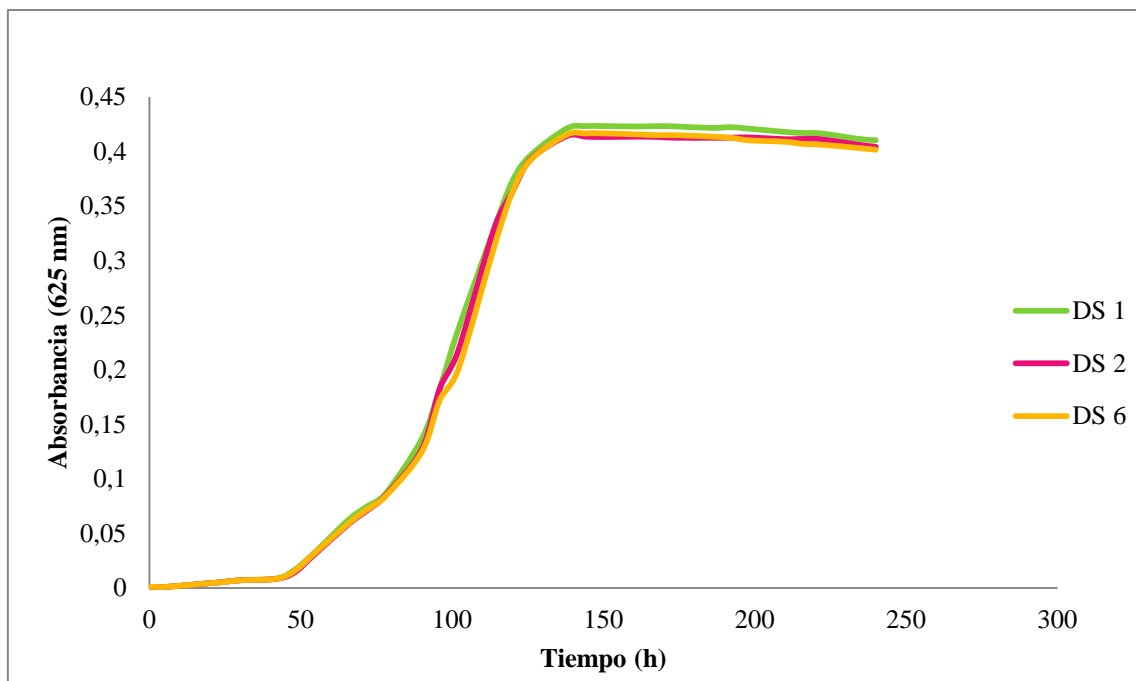


Figura 35. Curvas de crecimiento realizadas con el medio de cultivo Mueller-Hinton.

Los valores de absorbancia de las distintas mediciones son reproducibles, con una desviación estándar en todo caso menor de 0,03. Como se observa en la **Figura 35** los resultados en las tres cepas aisladas del género *Desulfovibrio* con el medio líquido Mueller-Hinton son muy similares, comenzando su fase exponencial a las 90 horas y terminando a las 144 horas.

Las curvas de crecimiento tras el cultivo de las cepas en el medio de cultivo caldo Brucella suplementado con hemina (5 $\mu\text{g/ml}$), vitamina K₁ (1 $\mu\text{g/ml}$) y sangre desfibrinada de oveja (5%), medio de cultivo de elección para el desarrollo de las técnicas de sensibilidad antimicrobiana en bacterias anaerobias estrictas (**M11-8, CLSI, 2012**), se representan en la **Figura 36**.

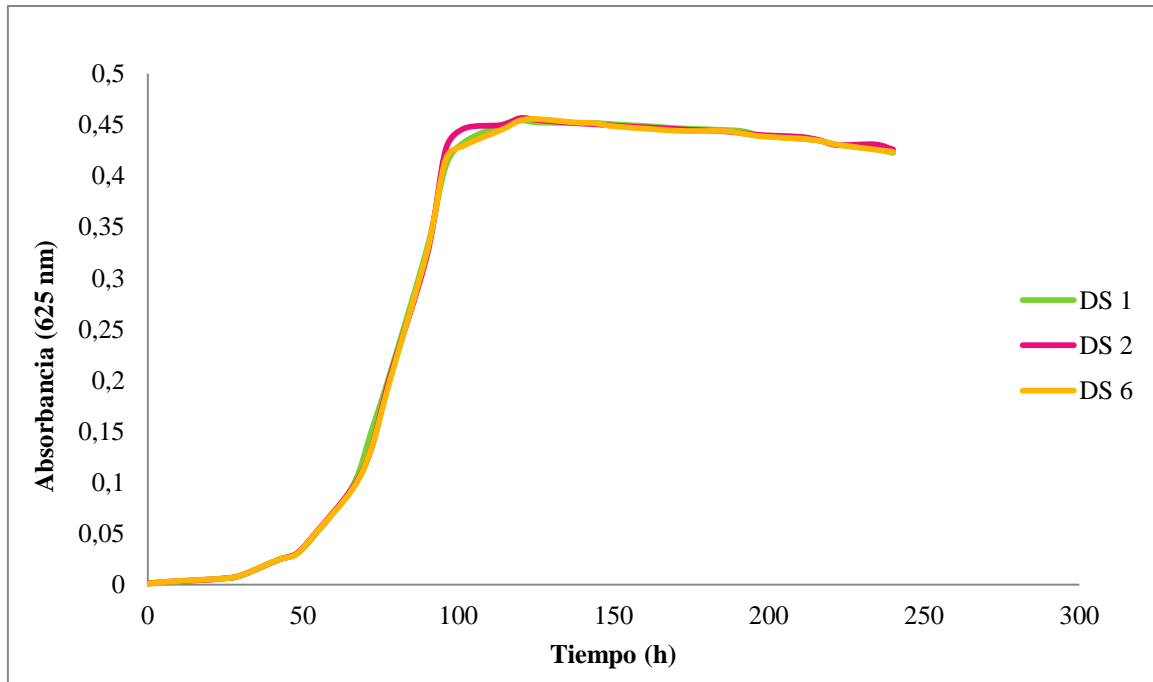


Figura 36. Curvas de crecimiento realizadas con el medio de cultivo caldo Brucella.

Los valores de absorbancia de las distintas mediciones son reproducibles, con una desviación estándar en todo caso menor de 0,02. Como se observa en la **Figura 36** los resultados obtenidos en el medio de cultivo caldo Brucella son muy similares, comenzando su fase exponencial a las 66-72 horas y finalizando a las 120 horas.

5.3.IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES.

5.3.1. Identificación de los aislados del género *Desulfovibrio* mediante secuenciación del gen ARNr 16S.

La secuenciación de los genes que codifican la síntesis del ARNr 16S (ADNr 16S) se ha convertido en el patrón de referencia de la taxonomía bacteriana. El gen ADNr 16S tiene unos 1.600 nucleótidos de longitud, y en su secuencia existen unas porciones conservadas y otras variables y específicas de cada especie. Para la secuenciación de este gen, se realiza primero la amplificación de la secuencia con cebadores específicos de las secuencias conservadas, y a continuación, se secuencian el producto génico amplificado y se compara dicha secuencia con las secuencias genómicas disponibles en la base de datos *GenBank* y RDP (*Ribosomal Database Project II*). La homología resultante permite, en la mayoría de los casos, determinar la especie debido al elevado grado de conservación evolutiva del gen ADNr 16S (Hampson, D.J. et La, T., 2006; Madigan, M.T. et al., 2004).

Puesto que es la primera vez que se ha conseguido aislar cepas del género *Desulfovibrio* a partir de muestras procedentes del cerdo, se secuenció el gen ADNr 16S de la cepa DS-1 y se comparó con las secuencias existentes.

Tras secuenciar el gen ARNr 16S de las cepa DS-1, la secuencia obtenida se comparó con las secuencias genómicas disponibles en la base de datos *GeneBank* y RDP (*Ribosomal Database Project II*) (Figura 37). La identificación de la cepa se efectuó mediante un análisis de similitud entre las secuencias obtenidas a partir de la muestra problema y las secuencias presentes en las bases de datos mencionadas. La secuencia obtenida se corresponde con secuencias de distintas especies del género *Desulfovibrio* presentes en las bases de datos.

```

D.piger ATCC29098 AACACATGCAAGTCGTACGCGAAAGGGACTTCGGTCCCGAGTAAAGTGGCGCACGGGTGA
D.desulf Essex6 AACACATGCAAGTCGAAACGCGAAAGGGACTTCGGTCTGAGTAAAGTGGCGCACGGGTGA
DS-1 TACACATGCAAGTCGAAACGCGAAAGTGGCTTCGGTACCGAGTAGAGTGGCGCACGGGTGA
D.legallii H1 AACACATGCAAGTCGAAACGCGAAAGGGCTTCGGTCCCAAGTAGAGTGGCGCACGGGTGA
:*****:*****.*.******.*****.*****

D.piger ATCC29098 GTAACACGTGGATAATCTGCCCTTATGATGGGATAACAGTTGGAAACGACTGCTAATAC
D.desulf Essex6 GTAACACGTGGATAATCTGCCCTTATGATGGGATAACAGTTGGAAACGACTGCTAATAC
DS-1 GTAACACGTGGATAATCTGCCCTCATAACCCGGATAACAGTTGGAAACGACTGCTAATAC
D.legallii H1 GTAACACGTGGACAATCTGCCCTTATGATCTGGATAACAGTTGGAAACGACTGCTAATAC
*****.*****.***** **.* **.******.*****.*****

D.piger ATCC29098 CGAATACGCTCATGATGAACCTTTGTGAGGAAAGTGGCCTCTGCTTGCAAGCTATCGCAT
D.desulf Essex6 CGGATACGCTCAAAATGAACCTTTTGAAGGAAAGTGGCCTCTGCTTGCAAGCTATCGCAT
DS-1 CGGATACGCTCTGAATGAACCTTTTGAAGGAAAGTGGCCTCTGCTTGCAAGCTATCGCAT
D.legallii H1 CGGATACGCTCAGGAAGAACCTTTTGAAGGAAAGTGGCCTCTGCTTGCAAGCTATCGCAT
*.*****:.*:*****:*.*****.*****.*****:***.**.*

D.piger ATCC29098 AGAGATGAGTCCCGCTCCCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCACCAAGGCAACGAT
D.desulf Essex6 AAGGATGAGTCCCGCTCCCATTAGCTTGTGGCGGGTAACGGCCACCAAGGCAACGAT
DS-1 GAGGATGAGTCCCGCTCCCATTAGCTGTTGGCGGGTAACGGCCACCAAGGCAACGAT
D.legallii H1 AAGGATGAGTCCCGCTCCCATTAGCTAGTTGGCGGGTAACGGCCACCAAGGCAACGAT
...*****.*****.*****.*****.*****:****

D.piger ATCC29098 GGGTAGCCGATCTGAGAGGATGATCGGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCT
D.desulf Essex6 GGGTAGCCGATTTGAGAGGATGATCGGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCT
DS-1 GGGTAGCCGATCTGAGAGGATGATCGGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCT
D.legallii H1 GGGTAGCCGATTTGAGAGGATGATCGGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCT
*****.*****.*****.*****.*****

D.piger ATCC29098 ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGC
D.desulf Essex6 ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGC
DS-1 ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGC
D.legallii H1 ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGC
*****.*****.*****.*****.*****

D.piger ATCC29098 GTGAGGGATGAAGGTTTCGGATCGTAAACCTCTGTGAGAGGGAAGAAACTAGGGTCTT
D.desulf Essex6 GTGAGGGATGAAGGTTTCGGATCGTAAACCTCTGTGAGAGGGAAGAAACTAGGGTCTT
DS-1 GTGAGGGATGAAGGTTTCGGATCGTAAACCTCTGTGAGAGGGAAGAAAGTGGGTGCTG
D.legallii H1 GTGAGGGATGAAGGTTTCGGATCGTAAACCTCTGTGAGAGGGAAGAAACTGCCGTCTT
*****.*****.*****.*****.*****

D.piger ATCC29098 CTAATCATCATCCTACATGACGGTACCTTCAAAGGAAGCACCGGCTAAC-TCCGTGCCAGC
D.desulf Essex6 CTAATCAGCAGCGTACATGACGGTACCTTCAAAGGAAGCACCGGCTAAC-TCCGTGCCAGC
DS-1 CTAATCAGCCANGTATATGACGGTACCTTCAAAGGAAGCACCGGCTAAC-TCCGTGCCAGC
D.legallii H1 CTAATCATCATGCGCATATGACGGTACCTTCAAAGGAAGCACCGGCTAAC-TCCGTGCCAGC
*****.*.*.*****.*****.*****

D.piger ATCC29098 AGCCGCGGTAATACGGAGGTTGCAAGCGTTAATCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGCACGT
D.desulf Essex6 AGCCGCGGTAATACGGAGGTTGCAAGCGTTAATCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGCACGT
DS-1 AGCCGCGGTAATACGGAGGTTGCAAGCGTTAATCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGCACGT
D.legallii H1 AGCCGCGGTAATACGGAGGTTGCAAGCGTTAATCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGCACGT
*****.*****.*****.*****.*****

D.piger ATCC29098 AGGCTGTATGTAAGTCAGGGGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAACTGCCCTTGATA
D.desulf Essex6 AGGCTGTAGTGTAAAGTCAGGGGTGAAATCCCACGGCTCAACCGTGGAACTGCCCTTGATA
DS-1 AGGCTGTATGTAAGTCAGGGGTGAAATCCCACGGCTCAACCGTGGAACTGCCCTTGATA
D.legallii H1 AGGCTGTATGTAAGTCAGGGGTGAAATCCCACGGCTCAACCGTGGAACTGCCCTTGATA
*****:.*.*****.*****.*****.*****

D.piger ATCC29098 CTGCACCACTCGAATCCGGGAGAGGGTGGCGGAATCCAGGTGTAGGAGTGAATCCGTA
D.desulf Essex6 CTGCACCACTCGAATCCGGGAGAGGGTGGCGGAATCCAGGTGTAGGAGTGAATCCGTA
DS-1 CTGCACCACTCGAATCCGGGAGAGGGTGGCGGAATCCAGGTGTAGGAGTGAATCCGTA
D.legallii H1 CTGCACCACTCGAATCCGGGAGAGGGTGGCGGAATCCAGGTGTAGGAGTGAATCCGTA
*****.***.*****.*****.*****

D.piger ATCC29098 -GATATCTGGAGGAACA-TCAGTGGCC-AGGCGGCCACCTGGACCGGTATTGACGCTGA
D.desulf Essex6 -GATATCTGGAGGAACA-TCAGTGGCC-AGGCGGCCACCTGGACCGGTATTGACGCTGA
DS-1 -GATATCTGGAGGAACA-TCAGTGGCC-AGGCGGCCACCTGGACCGGTATTGACGCTGA
D.legallii H1 CGATATCTGGAGGAACA-TCAGTGGTCA-AGGCGGCCACCTGGACCGGTATTGACGCTGA
*****.*****.*.*****.*****.*****

D.piger ATCC29098 GGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGA
D.desulf Essex6 GGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGA
DS-1 GGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGA
D.legallii H1 GGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGA
*****.*****.*****.*****.*****

```

Resultados

```

D.piger ATCC29098      TGGATGCTAGATGTCGGGATGATGTCFCGGTGTCTAGTAAACGCGTTAAGCATCCCCG
D.desulf Essex6       TGGATGCTAGATGTCGGGAGTATTCTTCGGTGTCTAGTAAACGCGTTAAGCATCCCCG
DS-1                  TGGATGCTAGATGTCGGGAGTATTCTTCGGTGTCTAGTAAACGCGTTAAGCATCCCCG
D.legallii H1        TGGATGCTAGATGTCGGGGGTGCCCCFCGGTGTCTAGTAAACGCGTTAAGCATCCCCG
*****.**:*****

D.piger/ATCC29098     CTGGGGAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTCAAAGAAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGG
D.desulf/Essex6       CTGGGGAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTCAAAGAAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGG
DS-1                  CTGGGGAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTCAAAGAAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGG
D.legallii/H1        CTGGGGAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTCAAAGAAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGG
*****

D.piger ATCC29098     TGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTACCTAGGTTTGACATCTGG-
D.desulf Essex6       TGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTACCTAGGTTTGACATCCAC-
DS-1                  TGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTACCTAGGTTTGACATCTGGG
D.legallii H1        TGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTACCTAGGTTTGACATCCACG
*****.*****

D.piger ATCC29098     GGAACCCCTCCGAAAGTGAAGGGTGCCTTCGGGGAGCCCAAGACAGGTGCTGCATGGC
D.desulf Essex6       GGAACCCCTCCGAAAGTGAAGGGTGCCTTCGGGGAGCCGTGAGACAGGTGCTGCATGGC
DS-1                  GGAACCCCTCCGAAAGTGAAGGGTGCCTTCGGGGAGCCCAAGACAGGTGCTGCATGGC
D.legallii H1        -GAAACCCCTTTGAAAGTGAAGGGTGCCTTCGGGGAGCCGTGAGACAGGTGCTGCATGGC
*****.*****

D.piger ATCC29098     TGTCGTAGCTCGTGTCTGATGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATG
D.desulf Essex6       TGTCGTAGCTCGTGTCTGATGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATG
DS-1                  TGTCGTAGCTCGTGTCTGATGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATG
D.legallii H1        TGTCGTAGCTCGTGTCTGATGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATG
*****

D.piger ATCC29098     CATAGTTGCCAGCAAGTAAAGTTGGGCACTCTATGCAGACTGCCCGGGTTAACCGGGAGG
D.desulf Essex6       CATAGTTGCCAGCAAGTAAAGTTGGGCACTCTATGCAGACTGCCCGGGTTAACCGGGAGG
DS-1                  CATAGTTGCCAGCAAGTAAAGTTGGGCACTCTATGCAGACTGCCCGGGTTAACCGGGAGG
D.legallii H1        CATAGTTGCCAGCAAGTAAAGTTGGGCACTCTATGCAGACTGCCCGGGTTAACCGGGAGG
*****.******

D.piger ATCC29098     AAGGTGGGACGACGCTCAAGTCATCATGGCCCTTACACCTAGGGCTACACAGTACTACA
D.desulf Essex6       AAGGTGGGACGACGCTCAAGTCATCATGGCCCTTACACCTAGGGCTACACAGTACTACA
DS-1                  AAGGTGGGACGACGCTCAAGTCATCATGGCCCTTACACCTAGGGCTACACAGTACTACA
D.legallii H1        AAGGTGGGACGACGCTCAAGTCATCATGGCCCTTACACCTAGGGCTACACAGTACTACA
*****.******

D.piger ATCC29098     ATGGCGGCACAAAGGGGAGCGATACCGTGAGGTGGAGCCAATCCCAAAAACCGTCC
D.desulf Essex6       ATGGCGGCACAAAGGGGAGCGATACCGTGAGGTGGAGCCAATCCCAAAAACCGTCC
DS-1                  ATGGCGGCACAAAGGGGAGCGATACCGTGAGGTGGAGCCAATCCCAAAAACCGTCC
D.legallii H1        ATGGCGGCACAAAGGGGAGCGATACCGTGAGGTGGAGCCAATCCCAAAAACCGTCC
*****.*****.******

D.piger ATCC29098     AGTCCGATTGCAGTCTGCAACTCGACTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATTCGAGAT
D.desulf Essex6       AGTCCGATTGCAGTCTGCAACTCGACTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATTCGAGAT
DS-1                  AGTCCGATTGCAGTCTGCAACTCGACTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATTCGAGAT
D.legallii H1        AGTCCGATTGCAGTCTGCAACTCGACTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATTCGAGAT
*****.*****.*

D.piger ATCC29098     CAGCATACTCGGGTGAATGCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAAA
D.desulf Essex6       CAGCATGCTCGGGTGAATGCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAAA
DS-1                  CAGCATGCTCGGGTGAATGCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAAA
D.legallii H1        CAGCATGCTCGGGTGAATGCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAAA
*****.*****

D.piger ATCC29098     GTCGGTTTTACCGAAGCCGGTAGCCAACTAGCAATGAGGAGCCCGTCTACG
D.desulf Essex6       GTCGGTTTTACCGAAGCCGGTAGCCAACTAGCAATGAGGAGCCCGTCTACG
DS-1                  GTCGGTTTTACCGAAGCCGGTAGCCAACTAGCAATGAGGAGCCCGTCTACG
D.legallii H1        GTCGGTTTTACCGAAGCCGGTAGCCAACTAGCAATG-----
*****.*****.*

```

Figura 37. Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos del gen ARNr 16S. La búsqueda de homología entre las diferentes secuencias se realizó con el programa Blast. El alineamiento múltiple de las secuencias se realizó con el programa Clustal Omega (en el servidor <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Entre paréntesis se proporcionan los números de acceso correspondientes al *GenBank*:

Desulfovibrio desulfuricans Essex 6 (NR104990.1), *Desulfovibrio piger* ATCC 29098 (NR041778.1) y *Desulfovibrio legallii* H1 (NR108301.1).

El alineamiento múltiple de las secuencias homólogas (ADNr 16S) de la cepa DS-1 y otras especies del género *Desulfovibrio*, permitió la construcción del árbol filogenético (**Figura 38**) y el posterior análisis filogenético.

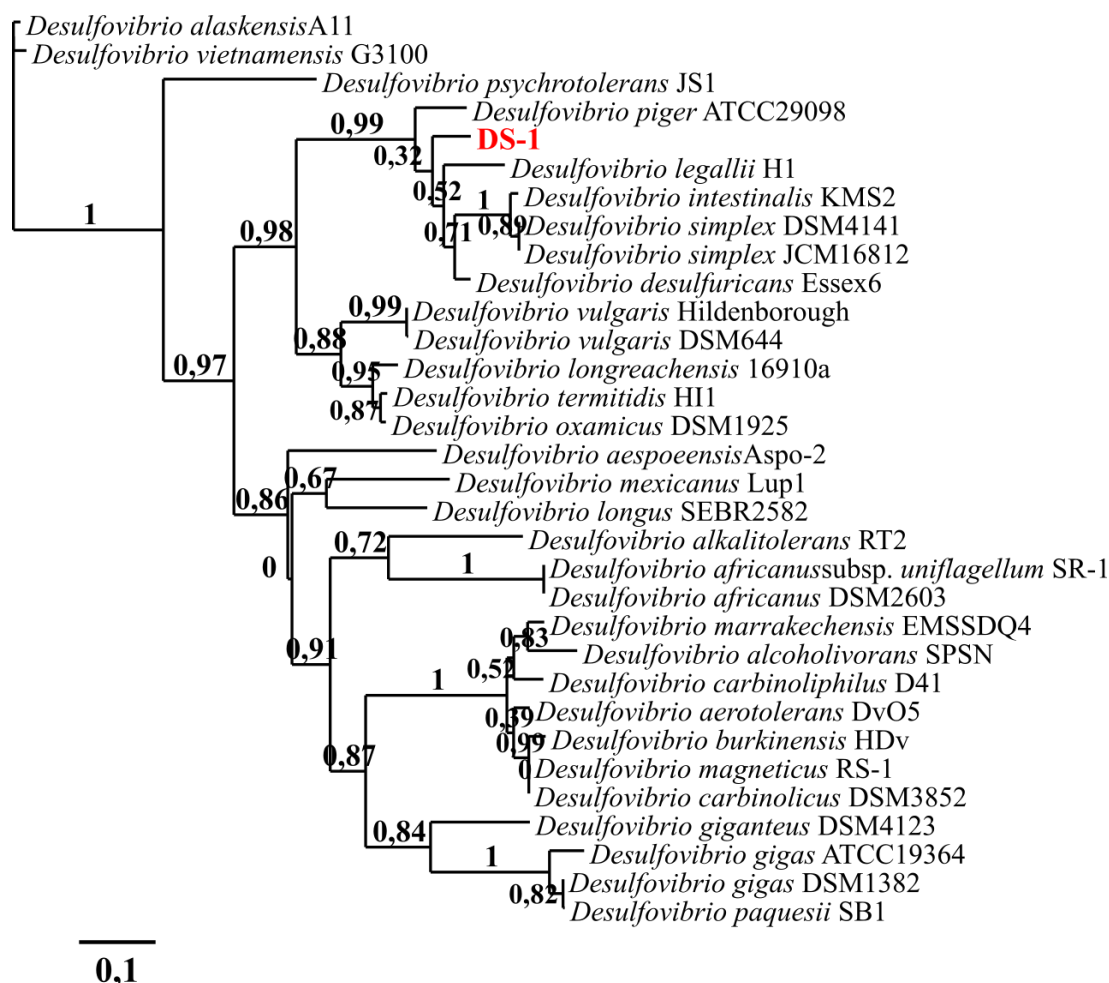


Figura 38. Análisis filogenético en el que se resalta la posición de la cepa DS-1 respecto a otras especies del género *Desulfovibrio*. El alineamiento múltiple de la secuencia de nucleótidos del ADNr 16S, de la cepa DS-1 y otras especies del género *Desulfovibrio*, se realizó con el programa Clustal Omega y el árbol filogenético se realizó usando el servidor Phylogeny.fr (Dereeper, A. et al., 2008). Entre paréntesis se proporcionan los números de acceso correspondientes al *GenBank* de cada una de las secuencias de los diferentes microorganismos: *D. desulfuricans* Essex 6 (NR104990.1), *D. piger* ATCC 29098 (NR041778.1), *D. legallii* H1 (NR108301.1), *D. simplex* DSMZ

4141 (NR117110.1), *D. simplex* JCM 16812 (NR113296.1), *D. intestinalis* KMS2 (NR026413.1), *D. oxamicus* DSMZ 1925 (NR043567.1), *D. longreachensis* 16910a (NR029364.2), *D. vulgaris* Hildenborough (NR074446.1), *D. vulgaris* DSMZ 644 (NR041855.1), *D. termitidis* HI 1 (NR026255.1), *D. alkalitolerans* RT2 (NR043069.1), *D. magneticus* RS-1 (NR074958.1), *D. africanus* subsp. *uniflagellum* SR-1 (NR122091.1), *D. africanus* DSMZ 2603 (NR026351.1), *D. carbinolicus* DSMZ 3852 (NR043038.1), *D. gigas* DSMZ 1382 (NR121705.1), *D. burkinensis* HDv (NR024895.1), *D. paquesii* SB1 (NR043145.1), *D. alcoholivorans* SPSN (NR037130.1), *D. gigas* ATCC 19364 (NR043856.1), *D. mexicanus* Lup1 (NR028776.1), *D. alaskensis* A11 (NR029338.2), *D. giganteus* DSMZ 4123 (NR117122.1), *D. marrakechensis* EMSSDQ4 (NR042704.1), *D. phychrotolerans* JS1 (NR042581.1), *D. aespoensis* Aspo-2 (NR074871.1), *D. longus* SEBR 2582 (NR025765.1), *D. aerotolerans* DvO5 (NR043163.1), *D. carbinoliphilus* D41 (NR043620.1) y *D. vietnamensis* G3 100 (NR026303.1). Los valores de la escala representan el grado de diferencia entre las secuencias (0,1 muestra la diferencia del 10% entre dos secuencias). Los números en los nodos indican la probabilidad de que las especies se asocien juntas tras 300 replicados (*bootstrap*) del alineamiento (0,32 indica el 32% de probabilidad).

El árbol filogenético no mostró un claro agrupamiento de DS-1 con las secuencias de varias especies del género *Desulfovibrio* (Figura 38). Sin embargo, las más cercanas fueron *D. piger* y *D. legallii*.

5.3.2. Identificación de las especies del género *Desulfovibrio* mediante amplificación por PCR de genes específicos.

Para identificar a qué especie del género *Desulfovibrio* corresponden las cepas bacterianas aisladas, se procedió a la amplificación mediante PCR de los genes ARNr 16S específicos en dichas especies bacterianas, empleando el ADN genómico de cada cepa como molde (Figura 39). Los oligonucleótidos específicos usados como cebadores se describen en la **Tabla 2** del apartado 4.3.3.1 de **Materiales y Métodos**.

Como se muestra en la **Figura 39**, en todos los aislados, los resultados obtenidos a partir de todos los aislados tras la amplificación nos permitieron la identificación de *D. fairfieldensis* (Tabla 7).

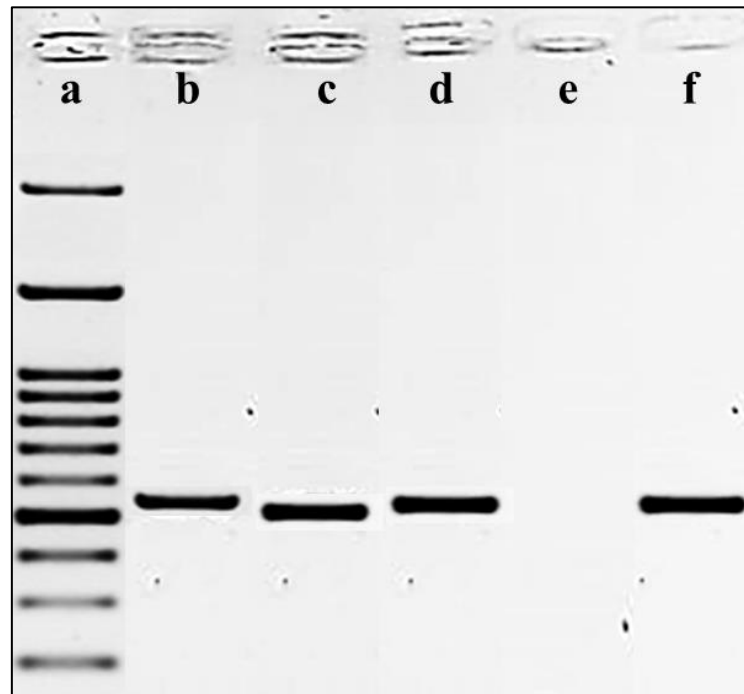


Figura 39. Productos de amplificación, por PCR, de fragmentos del gen ARNr 16S de *D. fairfieldensis*. A partir del ADN genómico de todas las cepas aisladas se realizó una amplificación por PCR utilizando los cebadores Fair-F y P687-R para *D. fairfieldensis*. En la imagen se muestra un ejemplo. **a.** Marcador de peso molecular (100 pb Ladder); **b.** ADN genómico de DS-4; **c.** ADN genómico de DS-16; **d.** ADN genómico de DS-28; **e.** Control negativo (sin ADN genómico); **f.** ADN genómico de la cepa de colección *D. fairfieldensis* ATCC 700045. El tamaño esperado de la banda fue de 534 pb.

Tabla 7. Resultados de la PCR específica de especie de los aislados obtenidos.

Nº AISLADOS	RESULTADO PCR
33	<i>D. fairfieldensis</i>

Resultados

Como se puede constatar, las 33 cepas aisladas se identificaron como pertenecientes a la misma especie del género *Desulfovibrio*: *Desulfovibrio fairfieldensis*, al mostrarse positivas para los cebadores específicos de ésta y negativas para las otras especies.

5.4. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *Desulfovibrio* MEDIANTE LA TÉCNICA MALDI TOF MS.

Del total de las cepas bacterianas anaerobias sulfatorreductoras aisladas (BASR), 30 de ellas fueron sometidas a la técnica MALDI-TOF para la identificación a nivel de especie. De las cepas analizadas, 17 fueron obtenidas a partir de cerdo blanco y 13 de cerdo ibérico.

Los resultados obtenidos en el análisis, tras comparar los espectros de masas obtenidos, con los de las cepas de colección que se incluyeron en la base de datos de BDAL Bruker Daltonics, más la aportación de una cepa de campo de *D. fairfieldensis*, se muestran en las **Tabla 8 y Tabla 9**.

Tabla 8. Resultados de la técnica MALDI-TOF para los aislados obtenidos a partir del cerdo ibérico.

CEPA	Identificación MALDI-TOF	Puntuación MALDI-TOF^a	Identificación por PCR
DS-1	<i>D. fairfieldensis</i>	2,530	<i>D. fairfieldensis</i>
DS-2	<i>D. fairfieldensis</i>	2,549	<i>D. fairfieldensis</i>
DS-4	<i>D. fairfieldensis</i>	2,569	<i>D. fairfieldensis</i>
DS-8	<i>D. fairfieldensis</i>	2,510	<i>D. fairfieldensis</i>
DS-19	<i>D. fairfieldensis</i>	2,318	<i>D. fairfieldensis</i>
DS-25	<i>D. fairfieldensis</i>	2,702	<i>D. fairfieldensis</i>
DS-30	<i>D. fairfieldensis</i>	2,511	<i>D. fairfieldensis</i>
DS-31	<i>D. fairfieldensis</i>	2,616	<i>D. fairfieldensis</i>
DS-32	<i>D. fairfieldensis</i>	2,653	<i>D. fairfieldensis</i>
DS-33	<i>D. fairfieldensis</i>	2,568	<i>D. fairfieldensis</i>
DS-34	<i>D. fairfieldensis</i>	2,599	<i>D. fairfieldensis</i>
DS-35	<i>D. fairfieldensis</i>	2,566	<i>D. fairfieldensis</i>
DS-38	<i>D. fairfieldensis</i>	2,537	<i>D. fairfieldensis</i>

^a **Puntuación MALDI-TOF:** puntuación asignada por el programa *MALDI Biotyper Real Time Classification* que representa la fiabilidad de los resultados (<1,799: Identificación no fiable; 1800-1999: Probable identificación en el género; 2,000-2,299: Identificación segura de género, probable especie; $\geq 2,300$: Alta probabilidad en la identificación de la especie).

Tabla 9. Resultados de la técnica MALDI-TOF para los aislados obtenidos a partir del cerdo blanco.

CEPA	Identificación MALDI-TOF	Puntuación MALDI-TOF^a	Identificación por PCR
DS-6	<i>D. fairfieldensis</i>	2,485	<i>D. fairfieldensis</i>
DS-7	<i>D. fairfieldensis</i>	2,517	<i>D. fairfieldensis</i>
DS-9	<i>D. fairfieldensis</i>	2,609	<i>D. fairfieldensis</i>
DS-11	<i>D. fairfieldensis</i>	2,334	<i>D. fairfieldensis</i>
DS-12	<i>D. fairfieldensis</i>	2,633	<i>D. fairfieldensis</i>
DS-13	<i>D. fairfieldensis</i>	2,463	<i>D. fairfieldensis</i>
DS-14	<i>D. fairfieldensis</i>	2,608	<i>D. fairfieldensis</i>
DS-15	<i>D. fairfieldensis</i>	2,569	<i>D. fairfieldensis</i>
DS-16	<i>D. fairfieldensis</i>	2,68	<i>D. fairfieldensis</i>
DS-17	<i>D. fairfieldensis</i>	2,515	<i>D. fairfieldensis</i>
DS-21	<i>D. fairfieldensis</i>	2,654	<i>D. fairfieldensis</i>
DS-23	<i>D. fairfieldensis</i>	2,66	<i>D. fairfieldensis</i>
DS-24	<i>D. fairfieldensis</i>	2,556	<i>D. fairfieldensis</i>
DS-26	<i>D. fairfieldensis</i>	2,586	<i>D. fairfieldensis</i>
DS-29	<i>D. fairfieldensis</i>	2,636	<i>D. fairfieldensis</i>
DS-36	<i>D. fairfieldensis</i>	2,507	<i>D. fairfieldensis</i>
DS-37	<i>D. fairfieldensis</i>	2,632	<i>D. fairfieldensis</i>

^a **Puntuación MALDI-TOF:** puntuación asignada por el programa *MALDI Biotyper Real Time Classification* que representa la fiabilidad de los resultados (<1,799: Identificación no fiable; 1800-1999: Probable identificación en el género; 2,000-2,299:

Resultados

Identificación segura de género, probable especie; $\geq 2,300$: Alta probabilidad en la identificación de la especie).

Basándonos en los resultados obtenidos tras el análisis de las cepas aisladas a partir de cerdo blanco e ibérico (**Tablas 8 y 9**), la identificación por la técnica MALDI-TOF obtuvo puntuaciones $\geq 2,300$ en el 100 % de las cepas (30), coincidiendo con la entrada de la cepa de campo que incorporamos a la base de datos de BDAL Bruker Daltonics. Sin embargo, no se logró ninguna identificación fiable de las cepas aisladas a nivel de género ni de especie con respecto a las cepas de colección.

Comparando los resultados de la identificación de las cepas por la técnica MALDI-TOF con los obtenidos por la técnica de PCR, el 100% de las cepas coincidió en el resultado a nivel de género y especie.

5.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS MEDIANTE TÉCNICAS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA.

5.5.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) e interpretación.

Concentración mínima inhibitoria (CMI) es la concentración más baja de antimicrobiano que inhibe el crecimiento bacteriano. Este estudio se realizó por duplicado obteniendo los mismos resultados en ambos casos.

A continuación se muestran los valores de CMI obtenidos de todas las cepas aisladas encuadradas en dos grupos; 20 pertenecientes al grupo de cerdos blancos y 13 al grupo de los cerdos ibéricos (se incorporan los 5 aislados de ibérico x duroc a este grupo) (**Tabla 10**).

Como se dijo anteriormente, se consideran cepas sensibles las que presentan un valor menor o igual al de CMI75, de sensibilidad intermedia (IS) las que se encuentran con valores superiores a la CMI75 y menores o iguales a CMI90 y resistentes (AMR) las cepas con valores mayores al de CMI90.

Tabla 10. Valores de concentración mínima inhibitoria (CMI).

AMOXICILINA

Origen	N	Rango	CMI50	CMI75	IS (%)	CMI90	AMR (%)
cerdo blancos	20	1-8	4	8	0	8	0
cerdo ibéricos	13	0,5-8	2	4	0	8	0
TOTAL	33	0,5-8	4	8	0	8	0

WT≤8

CMI>8

AMOXICILINA-ÁCIDO CLAVULÁNICO

Origen	N	Rango	CMI50	CMI75	IS (%)	CMI90	AMR (%)
cerdo blanco	20	0,25-2	1	1	15	2	0
cerdo ibérico	13	0,25-1	0,5	1	0	1	0
TOTAL	33	0,25-2	1	1	13,6363636	2	0

WT≤1

CMI>2

CEFOTAXIMA

Origen	N	Rango	CMI50	CMI75	IS (%)	CMI90	AMR (%)
cerdo blanco	20	4-16	8	8	15	16	0
cerdo ibérico	13	4-16	8	8	23,0769231	16	7,69230769
TOTAL	33	4-16	8	8	18,1818182	16	3,03030303

WT≤8

CMI>16

CIPROFLOXACINA

Origen	N	Rango	CMI50	CMI75	IS (%)	CMI90	AMR (%)
cerdo blanco	20	0,25-16	2	2	25	8	10
cerdo ibérico	13	0,25-16	1	2	23,0769231	8	7,69230769
TOTAL	33	0,25-16	2	2	24,2424242	8	9,09090909

WT≤2

CMI>8

CLINDAMICINA

Origen	N	Rango	CMI50	CMI75	IS (%)	CMI90	AMR (%)
cerdo blanco	20	0,125-4	0,5	4	0	4	0
cerdo ibérico	13	0,125-4	1	4	0	4	0
TOTAL	33	0,125-4	0,5	4	0	4	0

WT≤4

CMI>4

IMIPENEM

Origen	N	Rango	CMI50	CMI75	IS (%)	CMI90	AMR (%)
cerdo blanco	20	0,03-0,06	≤0,03	0,03	15	0,06	0
cerdo ibérico	13	≤0,03	≤0,03	≤0,03	0	0,03	0
TOTAL	33	0,03-0,06	≤0,03	0,03	9,09090909	0,06	0

WT≤0,03

CMI>0,06

METRONIDAZOL

Origen	N	Rango	CMI50	CMI75	IS (%)	CMI90	AMR (%)
cerdo blanco	20	0,25-4	1	2	10	2	10
cerdo ibérico	13	0,125-4	1	1	0	2	0
TOTAL	33	0,125-4	1	2	6,06060606	2	6,06060606

WT≤ 2

CMI>2

Los valores de las CMI obtenidos en nuestro trabajo para cada grupo de animales (cerdos ibéricos y cerdos blancos), sometidos a los antimicrobianos elegidos, son muy parecidos en ambos casos.

Teniendo en cuenta ambos valores de CMI, se catalogan las cepas como sensibles (S), si el valor es menor o igual al de CMI75, intermedias (I), las que se encuentran en valores superiores a la CMI75 y menores o iguales a la CMI90 o resistentes (R), las cepas con valores superiores al de CMI90.

Resultados

De esta manera, a continuación se muestra en las **Tablas 11 y 12**, las CMIs (expresadas en $\mu\text{g/ml}$) que presentan las 33 cepas aisladas (agrupadas por el mismo resultado) y las cepas de colección para cada uno de los antimicrobianos empleados. Además se catalogan como sensibles, intermedias o resistentes tras establecer nuestros puntos de corte según lo explicado anteriormente.

Resultados

Tabla 11. CMI de los antimicrobianos empleados y resultados de sensibilidad para las 33 cepas aisladas.

AMX			AMC			CTX			CIP			CLI			IMI			MTZ			
Nº Cepas	CMI (µg/ml)	Cut off value	Nº Cepas	CMI (µg/ml)	Cut off value	Nº Cepas	CMI (µg/ml)	Cut off value	Nº Cepas	CMI (µg/ml)	Cut off value	Nº Cepas	CMI (µg/ml)	Cut off value	Nº Cepas	CMI (µg/ml)	Cut off value	Nº Cepas	CMI (µg/ml)	Cut off value	
1	0,5	S	9	0,25	S	12	4	S	5	0,25	S	6	0,125	S	18/12	0,03	S/I*	1	0,125	S	
6	1	S	6	0,5	S	15	8	S	6	0,5	S	8	0,25	S	3	0,06	I	4	0,25	S	
6	2	S	15	1	S	5	16	I	5	1	S	4	0,5	S	Rango 0,03-0,06			6	0,5	S	
8	4	S	3	2	I	1	32	R	9	2	S	4	1	S				12	1	S	
9/3	8	S/I*	Rango 0,25-2			Rango 4-32			3	4	I	11	4	S				7/1	2	S/I*	
Rango 0,5-8									2	8	I	Rango 0,125-4						2	4	R	
									3	16	R				Rango 0,125-4						
									Rango 0,25-16												

S (sensible); I (intermedia); R (resistente).

*Depende del grupo al que pertenezca las cepas aisladas: presenta sensibilidad (S) en cerdo blanco y resistencia intermedia (I) en cerdo ibérico.

En fucsia: mayor número de cepas con perfil idéntico para cada antibiótico.

Tabla 12. CMI de los antimicrobianos empleados y resultados de sensibilidad para las cepas de colección.

Cepas de colección	AMX		AMC		CTX		CIP		CLI		IMI		MTZ	
	CMI	Cut off value	CMI	Cut off value	CMI	Cut off value	CMI	Cut off value	CMI	Cut off value	CMI	Cut off value	CMI	Cut off value
<i>D. desulfuricans</i> subsp. <i>desulfuricans</i> DSMZ 6949	1	S	0,25	S	8	S	0,5	S	0,125	S	0,06	I	2	S
<i>D. desulfuricans</i> subsp. <i>desulfuricans</i> DSMZ 642	1	S	0,25	S	16	I	0,5	S	0,25	S	0,06	I	2	S
<i>D. fairfieldensis</i> ATCC 700045	1	S	0,125	S	8	S	0,5	S	1	S	0,06	I	2	S
<i>D. legallii</i> DSMZ 19129	2	S	0,25	S	16	I	0,125	S	0,5	S	0,06	I	2	S
<i>D. vulgaris</i> DSMZ 15375	0,5	S	0,25	S	32	R	0,125	S	0,5	S	0,06	I	2	S
<i>D. vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> DSMZ 644	1	S	0,125	S	32	R	0,5	S	0,5	S	0,06	I	2	S
<i>D. intestinalis</i> DSMZ 11275	0,5	S	0,25	S	32	R	0,5	S	0,25	S	0,06	I	4	R

En el presente trabajo de investigación, para la amoxicilina, el 36,4% de las cepas aisladas obtuvieron una CMI de 8 µg/ml, el 24,2% presentaron una CMI de 4 µg/ml en, el 18,2% mostraron una CMI de 1 µg/ml y otro 18,2% de 2 µg/ml y el resto de las cepas tuvieron una CMI de 0,5 µg/ml. Según los valores de *cut off value* propuestos y teniendo presente que el número de cepas es escaso para establecer estadísticamente los valores de CMI₇₅ y CMI₉₀ para cada antimicrobiano estudiado, 30 cepas fueron sensibles a la acción del antimicrobiano (rango de CMI de 0,5-8 µg/ml) como todas las cepas de colección y únicamente 3 cepas de cerdo ibérico se consideraron con resistencia intermedia.

Para la amoxicilina-ácido clavulánico, 30 de las 33 cepas aisladas fueron sensibles a este antimicrobiano presentando un rango de 0,25-1 µg/ml así como las cepas de colección. Las 3 cepas restantes con una CMI de 2 µg/ml, se consideraron intermedias.

Para la cefotaxina, el 82% de las cepas aisladas de *Desulfovibrio* mostraron una CMI ≤ 8 µg/ml, considerándolas cepas sensibles, las que presentaron valores de CMI de 16 µg/ml, fueron intermedias (5) y las de CMI de 32 µg/ml resistentes (1). En el caso de las cepas de colección ocurrió lo mismo, siendo *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* DSMZ 6949 y *D. fairfieldensis* ATCC 700045 sensibles, *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* DSMZ 642 y *D. legallii* DSMZ 19129 intermedias y las dos cepas de *D. vulgaris* y *D. intestinalis* resistentes.

Para la ciprofloxacina, las cepas que se encontraron en un rango de CMI de 0,25-2 µg/ml, se consideraron sensibles (75,8%) y todas las cepas de referencia, las de CMI de 4-8 µg/ml, intermedias y las de CMI de 16 µg/ml, resistentes.

Para la clindamicina, todas las cepas fueron sensibles incluyendo las de colección, presentando una rango de CMI de 0,125-4 µg/ml.

Para el imipenem, el rango de CMI fue muy bajo (0,03-0,06 µg/ml), contándose una diferencia con respecto a los grupos de cerdos blancos e ibéricos. En los primeros, se presentó una CMI de 0,03 µg/ml considerando a estas cepas como sensibles (18) y una CMI de 0,06 µg/ml, siendo estas intermedias (3). Sin embargo, las cepas aisladas a partir de cerdos ibéricos, únicamente presentaron una CMI de 0,03 µg/ml, siendo estas

Resultados

intermedias (12). En el caso de las cepas de colección el 100% se consideraron intermedias según este criterio.

Para el metronidazol, 30 cepas fueron sensibles a la acción de este antimicrobiano con un rango de CMI de 0,125-2 $\mu\text{g/ml}$, una, procedente de cerdo ibérico, fue intermedia con una CMI de 2 $\mu\text{g/ml}$, y dos de cerdo blanco, con una CMI de 4 $\mu\text{g/ml}$ fueron consideradas como resistentes. En las cepas de colección, todas fueron sensibles excepto *D. intestinalis* DSMZ 11275 que se consideró resistente con una CMI de 4 $\mu\text{g/ml}$.

Posteriormente se realizó un estudio estadístico de Odds Ratio para observar la relación de las dos razas (ibérica y blanca) con respecto a la resistencia (intermedia, en función de la CMI75 y absoluta con la CMI90 como referencia) en los distintos antimicrobianos estudiados.

Este análisis únicamente fue estadísticamente significativo para el metronidazol para el que existe un riesgo de sensibilidad de entre 1,096 y 2,571 veces más probable en cerdos ibéricos que en cerdos blancos.

Realizando una representación gráfica de los valores de CMI para este antimicrobiano (metronidazol) (**Figura 40**), se observó que los valores de CMI de las bacterias aisladas de cerdo blanco se encontraban ligeramente desplazados hacia mayores concentraciones, si bien la diferencia no fue muy significativa.

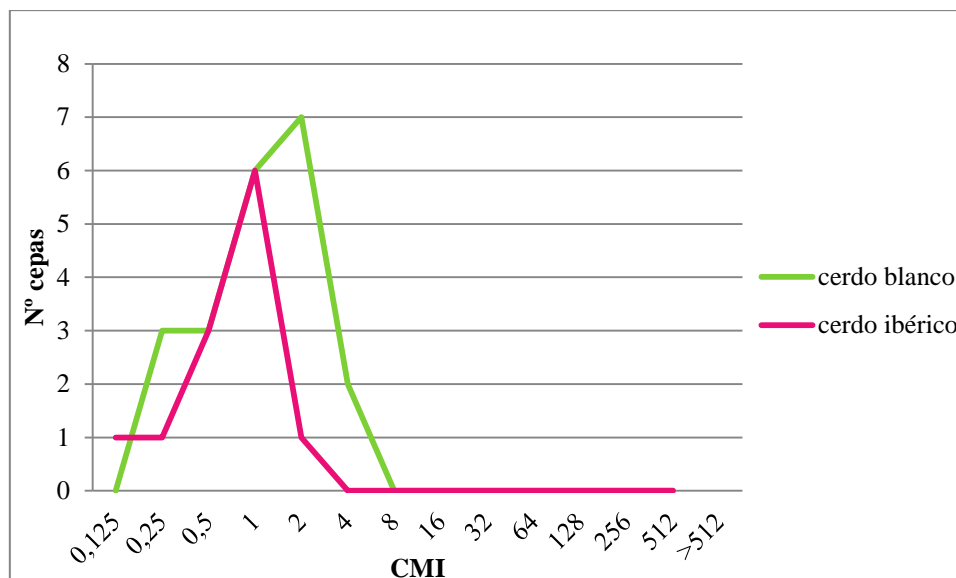


Figura 40. Representación del número de cepas aisladas a partir de cerdo ibérico o blanco con respecto a los valores de CMI obtenidos para el metronidazol.

5.5.2. Perfiles de resistencia.

Se considera multirresistente (MDR) a toda cepa que muestra resistencia a cuatro o más antimicrobianos. Al analizar el número de antimicrobianos a los que las cepas muestran resistencia simultánea se puede comprobar que en ningún caso existe multirresistencia, considerando como punto de corte la CMI90, siendo tres cepas de cerdo blanco (DS-10, DS-12 y DS-16) resistentes a dos antimicrobianos (ciprofloxacina y metronidazol) y dos de cerdo ibérico (DS-8 y DS-38) resistentes a ciprofloxacina y cefotaxima, siendo este último un betalactámico, como se observa en la **Tabla 13**. Por lo tanto, no se aprecia una diferencia significativa de resistencias entre ambos grupos.

Tabla 13. Perfiles de resistencia obtenidos tras los ensayos de sensibilidad frente a 7 antimicrobianos, considerando como punto de corte CMI90.

PERFIL	N	ORIGEN	CEPA
CIP	2	Porcino ibérico	DS-8
		Porcino blanco	DS-10
CIP-MTZ	1	Porcino blanco	DS-12
MTZ	1	Porcino blanco	DS-16
CTX	1	Porcino ibérico	DS-38

El resto de cepas (28) son sensibles a todos los antimicrobianos.

Sin embargo, al considerar como punto de corte el valor de CMI75, el porcentaje de multirresistencia es del 3,03% (cepa DS12 de cerdo blanco). Sin embargo, se aprecia que el porcino ibérico presenta valores de resistencia intermedia mayores con respecto al grupo de porcino blanco, puesto que todas las cepas presentan sensibilidad intermedia al menos a un antimicrobiano, como se detalla en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Perfiles de resistencia obtenidos tras los ensayos de sensibilidad frente a 7 antimicrobianos, considerando como punto de corte CMI75.

PERFIL	N	ORIGEN	CEPA
IMI	6	Porcino ibérico	DS19, DS30, DS31, DS32, DS33 y DS34
CIP-IMI	3	Porcino ibérico	DS1, DS2 y DS8
AMX-IMI	1	Porcino ibérico	DS4
CIP	3	Porcino blanco	DS6, DS7 y DS11
CTX-CIP-IMI	1	Porcino blanco	DS10
AMC-CIP-IMI-MTZ	1	Porcino blanco	DS12
AMC-CTX	1	Porcino blanco	DS14
AMC-IMI-MTZ	1	Porcino ibérico	DS16
CTX	1	Porcino blanco	DS18
CTX-IMI-MTX	1	Porcino ibérico	DS25
AMX-CTX-IMI	2	Porcino ibérico	DS35 y DS38

El resto de cepas (12) son sensibles a todos los antimicrobianos.

5.5.3. Identificación y análisis de expresión de beta-lactamasas.

Para la determinación cualitativa de la actividad enzimática, todas las cepas fueron sometidas al test de actividad beta-lactamasa en placa, pero este procedimiento no resultó concluyente puesto que al ser las colonias de desulfobrio marronáceas se confundía con el color de la cefalosporina cromogénica nitrocefín (5g/ml Cayman®) y no se apreciaba grandes cambios de color. Por este motivo, se sometieron todas las cepas a la prueba enzimática, utilizando de nuevo el nitrocefín como sustrato, en

Resultados

presencia y ausencia del inhibidor clavulanato. No se observó expresión de la actividad beta-lactamasa en ninguna de las cepas.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN.

6.1. ETIOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA.

6.1.1. Etiología.

En el apartado **1.4.7** de la **Introducción**, se indicó que los desulfovibrios apenas han sido estudiados en el mundo animal, en general, ni en el ganado porcino, en particular, tanto en las micropoblaciones normales como en su implicación en los procesos infecciosos. La situación se acentúa aún más en el caso concreto de *D. fairfieldensis*.

Los 33 aislados que se han obtenido de esta especie bacteriana a partir de heces provenientes de cerdos con disentería, son los primeros que se describen dentro de la comunidad científica.

En el año 1997, **Lin, C. et al.** estudiaron la micropoblación bacteriana normal del ciego y del colon del ganado porcino. Encontraron que dentro de las bacterias anaerobias sulfatorreductoras, las pertenecientes al género *Desulfovibrio* eran las predominantes en todos los casos analizados, pero no identificaron las especies a las que correspondían. Además, no aislaron las cepas sino que detectaron la presencia de estas bacterias en esos lugares mediante la técnica de la PCR realizada a partir del contenido del intestino grueso, empleando oligonucleótidos para caracterizar el gen que codifica el ARNr 16S.

Shukla, S.K. et Reed, K.D. (2000), por su parte, aislaron *D. desulfuricans* en cultivo puro a partir de la sangre de un perro que padecía una bacteriemia. Fue el primer aislamiento de este microorganismo a partir de un animal doméstico que padecía un proceso infeccioso.

Más tarde, **Innes, V.L. et al.**, en el año 2007, estudiaron heces de gatos sanos y de otros que padecían la enfermedad intestinal inflamatoria. Apreciaron que las

poblaciones de *Desulfovibrio spp.* eran bastante más elevadas en los animales enfermos que en los sanos. Tampoco identificaron las especies de desulfovibrios.

En el 2014, **Honneffer, J.B. et al.**, revelan que en las enfermedades gastrointestinales, como “La enfermedad intestinal inflamatoria”, se observan con frecuencia cambios en la micropoblación intestinal, que disminuye en algunos grupos como los de los *phyla Firmicutes* y *Bacteroidetes*, pero aumenta en el *phylum Proteobacteria (Desulfovibrio)*. **Li, Z., et al.** (2014), estudiaron la micropoblación bacteriana del tracto gastrointestinal del corzo chino. Apreciaron que entre las bacterias predominantes del colón, se encontraban las del género *Desulfovibrio*.

Los estudios se encuentran más avanzados en la especie humana. *D. fairfieldensis* se aisló por primera vez en el año 1996 por parte de **Tee, W. et al.** a partir del contenido de un absceso hepático procedente de un hombre de 82 años de edad. Después, se aisló de la sangre de personas con bacteriemia (**McDougall et al.**, 1997; **Urata, T. et al.**, 2008), de la orina de un enfermo con infección urinaria (**La Scola, B. et Raoult, D.**, 1999), de la sangre de un ser humano que padecía peritonitis y apendicitis perforada, considerando que *D. fairfieldensis* tiene propiedades únicas que le confieren un potencial patógeno invasivo en el ser humano (**Loubinoux, J. et al.**, 2000) y de las lesiones de enfermos que padecían periodontitis (**Loubinoux, J. et al.**, 2002a).

El número de personas sanas que albergan bacterias anaerobias sulfatorreductoras en el intestino grueso es variable; se estima que oscila entre el 24% y el 100% (**Florin, T.H.J. et al.**, 1990; **Loubinoux, J. et al.**, 2002b; **Rey, F.E. et al.**, 2013; **Scanlan, P.D. et al.**, 2009; **Zinkevich, V. et Beech, I.B.**, 2000). Todos los investigadores coinciden en señalar que dentro de éstas, las bacterias del género *Desulfovibrio* son las más abundantes. La especie de este género aislada con mayor frecuencia por parte de **Dzierzewicz, Z. et al.** (1997) a partir de seres humanos, tanto sanos como con padecimiento de procesos infecciosos en el intestino grueso, fue *D. desulfuricans*. Por el contrario, **Scanlan, P.D. et al.** (2009) y **Rey, F.E. et al.** (2013) coinciden en señalar que la especie dominante es *D. piger*. Ninguno de estos investigadores detectó la presencia de *D. fairfieldensis*.

Loubinoux, J. et al. (2002b) al estudiar mediante PCR heces provenientes de 41 personas sanas y de 110 pacientes con disturbios intestinales, observaron que *D. piger*

apareció en 39 ocasiones, *D. fairfieldensis* en 19 y *D. desulfuricans* en una. También constataron que *D. piger* se encontró en el 55% de las personas que padecían enfermedad inflamatoria intestinal, en el 25% de aquellas otras que padecían diferentes procesos intestinales y en el 12% de las personas sanas investigadas.

Goldstein, E.J.C. et al. (2009), tras realizar una intervención quirúrgica colorrectal, apreciaron una infección posterior en la línea de incisión. A partir de este lugar aislaron *D. fairfieldensis*. Estos resultados confirman los obtenidos en el presente trabajo, pues reflejan que esta especie bacteriana también puede encontrarse en el intestino grueso, tanto de individuos sanos como de enfermos. Además, el hecho de encontrar en este trabajo una especie bacteriana perteneciente al género *Desulfovibrio* en el 35% de los casos analizados, también está en relativa concordancia con los resultados obtenidos en las investigaciones similares efectuadas en la especie humana. De todo ello, se infiere que el cerdo (especie animal omnívora, al igual que el hombre) contiene en su intestino grueso bacterias del género de referencia en porcentajes similares a los descritos para el hombre.

6.1.2. Epidemiología.

Se aislaron 33 cepas bacterianas pertenecientes al género *Desulfovibrio* a partir de 94 muestras tomadas de cerdos con un cuadro compatible con la disentería. Las cepas de referencia se aislaron en cocultivo con otras pertenecientes al género *Brachyspira* (**San Juan, C.,** 2015). Por ello, todos los aspectos epidemiológicos referentes a las bacterias del género *Desulfovibrio* son idénticos a los de las especies patógenas del género *Brachyspira*.

La disentería porcina tiene una distribución mundial y se considera que está presente en la mayoría de los países con una producción porcina elevada (**Hampson, D.J. et al.,** 2006a). La incidencia de la enfermedad varía entre los diferentes países y regiones. Sigue siendo un problema endémico relativamente frecuente e importante en muchos países de la Unión Europea, América del Sur y Sureste Asiático. En los Estados Unidos se ha producido una disminución de la incidencia en los últimos 20 años (**Hampson, D.J.,** 2012). En España, en el año 2006, **Carvajal, A. et al.** (2006)

demonstraron que *B. hyodysenteriae* estuvo presente en el 30% de las explotaciones porcinas españolas que tuvieron problemas de diarrea en animales adultos o de cebo. Nuestro estudio muestra una gran similitud con el realizado por estos investigadores, pues apreciamos que *B. hyodysenteriae* fue la especie más aislada, encontrándose en el 38% de las muestras analizadas (San Juan, C., 2015). Además, en 10 muestras se aisló *B. hyodysenteriae* junto con cepas pertenecientes a la especie *D. fairfieldensis*.

La disentería porcina se transmite exclusivamente por vía fecal/oral. Puede afectar a cerdos de todas las edades, aunque se observa con mayor frecuencia en animales de cebo, entre los 15 y los 70 kilos de peso (Hampson, D.J. *et al.*, 2006a). Algo parecido sucedió en nuestro estudio, aunque la enfermedad se presentó con mayor porcentaje (65%) en cerdos con edades entre los 2-4 meses.

La principal fuente de infección se produce generalmente al ingerir heces contaminadas procedentes de cerdos enfermos o portadores que eliminan esta especie bacteriana sin provocar manifestaciones clínicas aparentes. La presencia de cerdos que son portadores asintomáticos es muy importante en la transmisión de la enfermedad. En este sentido, los animales que han padecido la enfermedad y que llevan más de 70 días sin presentar síntomas, son capaces de transmitir la infección al cabo de un periodo de tiempo comprendido entre 10 y 16 días tras mezclarlos con cerdos sanos (Songer, J.G. *et Harris, D.L.*, 1978).

La infección se transmite a los animales presentes en granjas libres de la enfermedad fundamentalmente por la llegada de cerdos portadores, aunque los roedores y las aves también pueden desempeñar un papel muy importante (Martínez-Lobo, F.J. *et al.*, 2013; Råsbäck, T. *et al.*, 2007).

Teniendo en cuenta las consideraciones sobre los mecanismos de transmisión de esta enfermedad por los diferentes autores, se infiere que el régimen de explotación de los animales se asocia a la aparición de esta enfermedad, presentando una mayor incidencia y prevalencia en el régimen intensivo, seguido del semiextensivo y del extensivo, relacionándolo en nuestro caso con la raza: cerdos blancos, cruce de ibérico (75%) con duroc (25%) e ibérico puro respectivamente. Sin embargo, en nuestro trabajo, no se observa una gran diferencia, debido a que la mayor parte de los animales muestreados comprenden edades entre los 2-4 meses, momento en el que todos los animales siguen el mismo control sanitario, sin distinguir el régimen de explotación.

La transmisión se favorece por la elevada resistencia de *B. hyodysenteriae* en el medio ambiente, especialmente cuando la bacteria se encuentra inmersa en materia orgánica y en condiciones de temperatura baja y humedad elevada. Puede sobrevivir hasta dos meses en las fosas de purines y en ambientes húmedos, lo que favorece la transmisión indirecta mediante vectores mecánicos y fómites (Hampson, D.J. *et al.*, 1997; Råsbäck. T. *et al.*, 2007). En el presente trabajo de investigación, encontramos una asociación de los aislados con las estaciones del año, siendo la primavera la estación en la cual se concentran el mayor número. Sin embargo, con el calentamiento global y el cambio climático, ya no existen tantas diferencias entre las estaciones, por lo que la resistencia de estas bacterias (desulfovibrios y brachispiras) puede alargarse durante todo el año. De las muestras tomadas a animales con un cuadro compatible con la disentería, en los meses de otoño, invierno y primavera, los porcentajes fueron muy similares, 32%, 36% y 28%, respectivamente, mientras que en verano fue del 4%.

El periodo de incubación de la enfermedad es variable, pudiendo ser de 5 días o alargarse hasta las cuatro semanas, pero en general se sitúa entre los 10 y los 14 días (Jacobson, M. *et al.*, 2004; Olson, L.D., 1974). Cuando estos microorganismos llegan a una granja libre de la enfermedad, y no se efectúa un tratamiento inmediato, la morbilidad se sitúa en torno al 90% del efectivo de la granja y la mortalidad puede alcanzar el 30% (Harris, D.L. *et Glock, R.D.*, 1981).

Para desencadenar la disentería porcina, *B. hyodysenteriae* necesita colaborar con otros microorganismos presentes habitualmente en el ciego y en el colon (Hampson, D.J. *et al.*, 2006a). Además, la gravedad de esta enfermedad parece aumentar si *B. hyodysenteriae* colabora con otras bacterias anaerobias que forman parte de la micropoblación bacteriana intestinal normal, como *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides vulgatus* y *Fusobacterium necrophorum* (Harris, D.L. *et al.*, 1978; Joens, L.A. *et al.*, 1981; Whipp, S.C. *et al.*, 1979). Por ello, no es descartable que los aislados obtenidos en este de trabajo de *D. fairfieldensis* pudieran colaborar en la génesis de la enfermedad con las braquispiras, especialmente cuando se encuentran en la línea de agotamiento en la placa de cultivo con *B. murdochii* o *B. innocens*, cuyas cepas poseen pocos factores de virulencia.

6.2. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO.

6.2.1. Caracterización de los aislados.

6.2.1.1. Pruebas bioquímicas.

En la **Tabla 15** se exponen los resultados obtenidos tras someter los 33 aislados a las diferentes pruebas bioquímicas, teniendo como referencia los de la cepa de colección *D. fairfieldensis* ATCC 700045; se aprecia que los resultados son idénticos en la mayoría de las cepas investigadas. En la **Tabla 16** se detallan los mismos resultados conseguidos por **Warren, Y.A. et al.**, (2005) tras investigar cinco cepas de *D. fairfieldensis* aisladas de líquidos peritoneales, dos de infecciones abdominales, una de infección pélvica, una de bacteriemia y una de cáncer colorrectal.

Posteriormente en la **Tabla 17** se muestran los resultados obtenidos por **Pimentel, J.D. et Chan, R.C.** (2007) tras aislar una cepa de *D. fairfieldensis* a partir de una bacteriemia asociada a un cuadro de coledocolitiasis.

Tabla 15. Resultados de las pruebas bioquímicas y de la resistencia a los antimicrobianos de las cepas de *D. fairfieldensis* aisladas en el presente trabajo y los de la cepa *D. fairfieldensis* ATCC 700045 tipo.

Cepa	Desulfoviridin Test	Catalasa	Spot indol	Nitratos	Urea	SIM	Creci en 20% de bilis	Movilidad	K	V	C
<i>D. fairfieldensis</i>	+	+(90,90%)	-(96,97%)	-(93,94%)	-	+	+	+	S (96,97%)	R	R
<i>D. fairfieldensis</i> ATCC 700045	+	+	-	-	-	+	+	+	S	R	R

(): % de cepas con resultado +/- . Sin () el 100% de cepas con el mismo resultado.

K: kanamicina. V: vancomicina. C: colistina.

S: sensible. R: resistente.

Tabla 16. Resultados de las pruebas bioquímicas y de la resistencia a los antimicrobianos de las cepas de *D. fairfieldensis* aisladas por Warren *et al.* (2005).

Cepa	Desulfoviridin Test	Catalasa	Spot indol	Nitratos	Urea	SIM	Creci en 20% de bilis	Movilidad	K	V	C
<i>D. fairfieldensis</i>	+	+	-	+	-	+	+	+	S	R	R

+/-: 100% de las cepas con ese resultado.

K: kanamicina. V: vancomicina. C: colistina.

S: sensible. R: resistente.

Tabla 17. Resultados de las pruebas bioquímicas y de la resistencia a los antimicrobianos de las cepas de *D. fairfieldensis* aisladas por Pimentel, J.D. *et Chan, R.C.* (2007).

Cepa	Desulfoviridin Test	Catalasa	Spot indol	Nitratos	Urea	SIM	Movilidad	K	V	C
<i>D. fairfieldensis</i>	+	+	-	-/+ (50%)	-	+	+	S	R	R

(): % de cepas con resultado +/- . Sin () el 100% de cepas con el mismo resultado.

K: kanamicina. V: vancomicina. C: colistina.

S: sensible. R: resistente.

Del estudio comparativo se colige que el comportamiento de las cepas aisladas en los tres trabajos es prácticamente idéntico. Tan solo se produjeron pequeñas diferencias en las pruebas de la catalasa, Spot indol, reducción de los nitratos y sensibilidad a la kanamicina.

Se comparan los resultados obtenidos de las cepas de colección, usadas como referencia para identificar las cepas aisladas por las pruebas bioquímicas, *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* DSMZ 6949, *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* DSMZ 642, *D. vulgaris* DSMZ 15375 y *D. vulgaris* subsp. *vulgaris*

DSMZ 644, con las 3 cepas de *D. desulfuricans* (2 de líquido peritoneal y 1 de sangre) y 2 cepas de *D. vulgaris* (1 de líquido peritoneal y 1 de abdomen) aisladas por Warren, Y.A. *et al.* (2005). En cuanto a *D. desulfuricans* se observa un comportamiento muy parecido con la cepa tipo *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* DSMZ 642, difiriendo en la urea y en el crecimiento en bilis. Sin embargo, con respecto a la *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* DSMZ 6949 las diferencias se establecen en las pruebas de la catalasa, reducción de los nitratos, urea y en el crecimiento en el medio de cultivo de bilis al 20%. Para *D. vulgaris*, la compatibilidad con la cepa tipo *D. vulgaris* subsp. *vulgaris* DSMZ 644 es del 100% en todas las pruebas bioquímicas, presentando diferencias con *D. vulgaris* DSMZ 15375 en las pruebas de la catalasa, Spot indol y la reducción de los nitratos.

Ichiishi, S. *et al.* (2010) aislaron 4 cepas de *D. intestinalis* a partir de mujeres que padecían cáncer de cuello uterino, que sometieron a las pruebas bioquímicas, usando como cepas de referencia *D. desulfuricans* MB ATCC 27774 y *D. intestinalis* DSMZ 11275 (Tabla 18).

Tabla 18. Resultados de las pruebas bioquímicas y de la resistencia a los antimicrobianos de las cepas de referencia y las de *D.intestinalis* aisladas por Ichiishi, S. *et al.* (2010).

Cepa	Desulfovirdin Test	Catalasa	Nitratos	Urea	SIM	Creci en 20% de bilis	Movilidad
<i>D. intestinalis</i> (4)	+	+	+	+	+	-	+
<i>D. desulfuricans</i> MB ATCC 27774	+	+	+	-	+	+	+
<i>D. intestinalis</i> DSMZ 11275	+	+	-	+	+	-	+

(): % de cepas con resultado +/- . Sin () el 100% de cepas con el mismo resultado.

Se observa que las cuatro cepas aisladas difieren con la cepa tipo de *D. intestinalis* DSMZ 11275 en la reducción de los nitratos y algunas con la producción de ureasa.

Comparando con nuestros resultados, *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* DSMZ 6949 y *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* DSMZ 642 únicamente varían en la prueba de la catalasa y la reducción de nitratos respectivamente, mientras que *D. intestinalis* DSMZ 11275 presenta diferencias en varias pruebas: la catalasa, la producción de urea y el crecimiento en bilis, con respecto a los resultados obtenidos por **Ichiishi, S. et al.** (2010) para esta misma cepa.

Warren, Y.A. et al. (2005) y posteriormente **Pimentel, J.D. et Chan, R.C.** (2007) tras los estudios realizados, concluyen que las pruebas bioquímicas son muy eficaces para identificar las bacterias anaerobias sulfatorreductoras, como son las del género *Desulfovibrio*. Afirman que las pruebas de la catalasa y la producción de ureasa son claves para diferenciar las especies del género *Desulfovibrio*, en concreto entre *D. fairfieldensis*, catalasa positiva y ureasa negativa y *D. desulfuricans*, al contrario. Sin embargo, en nuestro trabajo no se constata esta aseveración. Por ello, consideramos que las pruebas bioquímicas son necesarias para identificar a las BASR y, en su caso, a las bacterias del género *Desulfovibrio*, pero no son pruebas concluyentes o definitivas a la hora de diferenciar las especies. Por este motivo, se emplea la secuenciación del gen que codifica la síntesis de ARNr 16S y la amplificación por PCR; pruebas diagnósticas de referencia o *gold standard* que permiten corroborar la identificación de las distintas especies del género *Desulfovibrio*.

6.2.1.2. Curva de crecimiento.

El conocimiento de la curva de crecimiento de las bacterias del género *Desulfovibrio* aporta mucha información para la realización de las distintas técnicas de sensibilidad antimicrobiana. Sin embargo, es la primera vez que se describe. Al no disponer de referencias de otros autores, se realizaron tres curvas con tres medios de cultivos distintos (Brain Heart Infusion suplementado con 2% de piruvato y 0,5% de Sulfato magnésico, Mueller-Hinton y caldo Brucella suplementado con hemina,

vitamina K₁ y sangre desfibrinada de oveja) y con tres cepas, por triplicado, como se describe en el apartado **4.2.7.** de **Materiales y Métodos**, para observar el comportamiento que estas bacterias presentan al alcanzar la fase exponencial, en un tiempo determinado.

Así, teniendo en cuenta las curvas que se muestran en el apartado **5.2.2.** de **Resultados**, se puede apreciar que cuanto más enriquecido está el medio de cultivo, antes crecen las bacterias y llegan a la fase exponencial. Con el medio de BHI enriquecido las bacterias aisladas del género *Desulfovibrio* comienzan su fase exponencial a las 72-78 horas terminando a las 126 horas, con el medio de cultivo Mueller-Hinton la fase exponencial comienza a las 90 horas y termina a las 144 horas y con el caldo Brucella comienza a las 66-72 horas y finaliza a las 120 horas.

De esta manera, se colige que el caldo Brucella enriquecido es el más eficaz a la hora de cultivar estas bacterias. Por otro lado, es el medio de cultivo de elección para el desarrollo de las técnicas de sensibilidad antimicrobiana para las bacterias anaerobias, descrito en el documento **M11-8** del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) y con el que nuestras cepas presentan una fase exponencial en un tiempo óptimo, menor que con los demás medios de cultivo. Esto es muy importante, ya que se evitan mayores alteraciones o contaminaciones y se aligera el procedimiento en el laboratorio. Por lo tanto, se elige el caldo Brucella como medio de cultivo por excelencia para testar la sensibilidad antimicrobiana.

6.2.2. Técnicas moleculares: secuenciación ARNr 16S y PCR.

Puesto que es la primera vez que se aíslan cepas del género *Desulfovibrio* a partir de muestras procedentes del cerdo, se decide secuenciar el ADNr 16S de la cepa DS-1 y comparar el ADN que codifica el ARNr 16S (ADNr 16S). Los ARNr son funcionalmente constantes, están universalmente distribuidos y su secuencia está moderadamente bien conservada a través de amplias distancias filogenéticas. La variación de la secuencia en los genes que los codifican permite profundizar en el análisis evolutivo. Sin embargo, es el grado de semejanza de las secuencias del gen que

codifica la síntesis del ARNr 16S de dos organismos lo que indica su parentesco evolutivo relativo.

El ARNr 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en los estudios de filogenia y taxonomía bacterianas dando lugar al sistema de clasificación vigente y permite la identificación rápida y precisa de las bacterias (**Hampson, D.L. et La, T., 2006; Madigan, M.T. et al., 2012**). En nuestro estudio, tras la secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S, no se logró una identificación clara a nivel de especie de la cepa DS-1. El árbol filogenético no mostró un claro agrupamiento de DS-1 con secuencias de varias especies del género *Desulfovibrio*. Sin embargo las más cercanas fueron *D. piger* y *D. legalli*; dichas especies comparten un 95% y 96 % de similitud en la secuencia del gen que codifica el ARNr 16S, respectivamente (**Hampson, D.L. et La, T., 2006**). Por lo tanto esta técnica se considera eficaz en la identificación a nivel de género pero no a nivel de especie. Así, es empleada por numerosos científicos para identificar cepas de *Desulfovibrio* aisladas de distintas muestras humanas (**Gaillard, T. et al., 2011; Goldstein, E.J. et al., 2003; Hagiwara, S. et al., 2014; Koyano, S. et al., 2015; Langendijk, P.S. et al., 2001c; Liderot, K. et al., 2010; Loubinoux, J. et al., 2000; McDougall, R. et al., 1997; Morin, A.S. et al., 2002; Pimentel, J.D. et Chan, R.C., 2007; Schoenborn, L. et al., 2001; Tee, W. et al., 1996; Urata, T. et al., 2008; Vaso, S. et al., 2014; Verstrecken, I. et al., 2012**) y relacionadas con el mundo animal (**Fox, J.G. et al., 1994; Frohlich, J., 1999; Gebhart, C.J. et al., 1993; Howard, B.H. et Hungate, R.E., 1976; McOrist, S. et al., 1995; Shukla, S.K. et Red, K.D., 2000**).

Posteriormente, se procede a identificar las especies bacterianas aisladas mediante la amplificación por PCR de los genes ARNr 16S específicos, demostrándose que las 33 cepas pertenecen a la especie *D. fairfieldensis*, hecho que no pudo ser constatado con la secuenciación, debido a la poca cantidad de secuencias genómicas disponibles en la base de datos, no encontrándose ninguna asociada a *D. fairfieldensis* para comparar con las cepas investigadas. El procedimiento descrito lo llevaron a cabo **Lin, C. et al., (1997), Liz, Z. et al., (2014), Loubinoux, J. et al., (2002a) y Vianna, M.E et al., (2008)**.

6.2.3. Identificación de las especies del género *Desulfovibrio* mediante la técnica MALDI-TOF MS.

Desde hace veinte años, la espectrometría de masas se ha utilizado como una poderosa herramienta para el análisis y la caracterización de proteínas. Sin embargo, esta tecnología, en concreto la técnica MALDI-TOF MS, se ha introducido recientemente en el campo de la microbiología clínica de rutina. La técnica MALDI-TOF MS permite un diagnóstico más fácil y rápido de las bacterias patógenas que los métodos fenotípicos convencionales o los métodos moleculares de identificación, con una rentabilidad y una fiabilidad incuestionable (Cassagne, C. *et al.*, 2014; Seng, P. *et al.*, 2010).

Actualmente, los métodos más habituales para la detección e identificación de las especies del género *Desulfovibrio* implican la aplicación de la técnica de la PCR sobre cultivos puros para la identificación directa de los desulfovibrios aislados a partir de distintos procesos infecciosos (Loubinoux, J. *et al.*, 2003), mostrando una alta sensibilidad y especificidad, seguida de métodos de identificación específicos (pruebas bioquímicas, técnicas moleculares, etc.). La identificación de las especies del género *Desulfovibrio*, se puede realizar utilizando la técnica de la PCR dirigida al gen que codifica el ARNr 16S (Fox, J.G. *et al.*, 1994; Frohlich, J. 1999; Gaillard, T. *et al.*, 2011; Gebhart, C.J. *et al.*, 1993; Goldstein, E.J. *et al.*, 2003; Hagiwara, S. *et al.*, 2014; Koyano, S. *et al.*, 2015; Langendijk, P.S. *et al.*, 2001c; Liderot, K. *et al.*, 2010; Loubinoux, J. *et al.*, 2000; McDougall, R. *et al.*, 1997; McOrist, S. *et al.*, 1995; Pimentel, J.D. *et Chan*, R.C. 2007; Schoenborn, L. *et al.*, 2001; Shukla *et Red* 2000; Urata, T. *et al.*, 2008; Vaso, S. *et al.*, 2014; Verstreken, I. *et al.*, 2012); así como una serie de técnicas de caracterización molecular, tales como la AP-PCR (PCR con oligonucleótidos arbitrarios) (Dzierzewicz, Z. *et al.*, 2003) o la PCR-DGGE (acrónimo de *denaturing gradient gel electrophoresis*) (Ahmed, S. *et al.*, 2007).

Por otra parte, las pruebas bioquímicas han sido el enfoque tradicional en la identificación de las especies del género *Desulfovibrio* (Ichiishi, S. *et al.*, 2010; Pimentel, J.D. *et Chan*, R.C. 2007; Warren *et al.*, 2005) aunque sirven para poner de manifiesto las bacterias sulfatorreductoras, no discriminan de manera taxativa todas las

especies del género *Desulfovibrio*, pues presentan perfiles bioquímicos muy parecidos (Warren *et al.*, 2005).

Debido a que la mayoría de los procedimientos mencionados anteriormente son muy laboriosos y requieren mucho tiempo, en los últimos años, la técnica MALDI-TOF MS ha sido descrita como una herramienta útil para la identificación de diversas especies bacterianas (Djelouadji, Z. *et al.*, 2012; Huber, H. *et al.*, 2011; Stephan, R. *et al.*, 2010), incluyendo *Desulfovibrio spp.* (Koyano, S. *et al.*, 2015; Schmitt, B.H. *et al.*, 2013; Vasoo, S. *et al.*, 2014). Schmitt, B.H. *et al.* (2013) llevaron a cabo la evaluación de la técnica MALDI-TOF MS, como método de identificación para las bacterias anaerobias, en las que se incluía una especie del género *Desulfovibrio*: *D. fairfieldensis*. Sin embargo, no fue identificada por esta técnica puesto que la base de datos no contenía ningún espectro de masas que correspondiera con bacterias de este género. Tras ellos, solamente hay descritos dos estudios donde si bien no someten sus aislados de *Desulfovibrio spp.* a esta técnica, justificando que en la base de datos MALDI-TOF no se incluyen estas bacterias, sí proponen esta técnica como una herramienta útil y efectiva para la identificación de estos microorganismos en los laboratorios de microbiología clínica, reduciendo el tiempo en la identificación con respecto a otras técnicas convencionales (Koyano, S. *et al.*, 2015; Vasoo, S. *et al.*, 2014). Así, pues, estos autores sugieren que la técnica MALDI-TOF es efectiva y útil siempre y cuando las bacterias que se pretenden identificar, en este caso *Desulfovibrio spp.*, se encuentren incluidas en la base de datos, algo que se hace necesario para llevar a cabo la rápida selección del tratamiento antibiótico adecuado. En este sentido, se plantea la necesidad de demostrarlo y es por ello la relevancia que tiene el presente trabajo de investigación.

Nuestro trabajo de investigación es el primero que evalúa la conveniencia de esta tecnología en la identificación microbiana de aislados clínicos de *Desulfovibrio spp.*, creando un panel de entradas para este género bacteriano incorporado a la base de datos BDAL Bruker Daltonics. Además, es la primera vez que esta técnica se aplica en España para la caracterización de bacterias pertenecientes al género *Desulfovibrio*; al igual que es la primera vez que se analizan cepas de *Desulfovibrio* aisladas a partir de cerdo blanco e ibérico.

En los estudios anteriormente citados, la idea de emplear la técnica MALDI-TOF MS se centraba en cepas de *Desulfovibrio spp.* de origen humano. Por el contrario, la base de datos del presente trabajo de investigación se centró en muestras de origen animal, analizando un total de 30 cepas del género *Desulfovibrio* aisladas a partir de cerdo blanco (n=17) e ibérico (n=13), previamente identificadas mediante la técnica de PCR.

Para crear la base de datos BDAL Bruker Daltonics fueron aportadas todas las cepas de colección, además de una entrada para *D. fairfieldensis* de una cepa de campo para completar el panel de entradas de este género bacteriano. La calidad y la fiabilidad de la identificación por la técnica MALDI-TOF MS depende de la calidad y la cantidad de espectros de referencia presentes en la base de datos (Seng, P. *et al.*, 2009). Debido a que la base de datos creada sólo incluía las distintas especies del género *Desulfovibrio* de las cepas de colección, en los primeros análisis se observó una heterogeneidad de las muestras con respecto a estas cepas, obteniendo puntuaciones < 1,799 (identificación no fiable), ocurriendo lo contrario tras la inclusión de una de las cepas de campo en la base de datos, estableciendo una homogeneidad con el resto de cepas aisladas.

Después de las incorporaciones realizadas (cepas de colección y cepa de campo) a la base de datos de BDAL Bruker Daltonics, se procedió al análisis de los aislados clínicos mediante la técnica MALDI-TOF MS (**Tablas 8 y 9**, apartado **5.4. de Resultados**):

Todos los aislados fueron correctamente identificados a nivel de género. La capacidad discriminativa para la identificación a nivel de género de la técnica MALDI-TOF MS también ha sido demostrada en varios estudios realizados sobre otros géneros bacterianos como *Bacteroides*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Streptococcus*, *Enterococci*... (Saffert, R.T. *et al.*, 2011; Seng, P. *et al.*, 2009; van Veen, S.Q. *et al.*, 2010). El 100% de los aislados evaluados, fueron identificados de forma fiable.

Además, se identificó con gran probabilidad a nivel de especie (valores $\geq 2,300$) el 100% de las cepas estudiadas. Este porcentaje de identificaciones a nivel de especie, es superior al 82% obtenido previamente en un estudio con bacilos gramnegativos (Saffert, R.T. *et al.*, 2011), el 85,6% en un estudio con bacterias gramnegativas, grampositivas y levaduras (van Veen, S.Q. *et al.*, 2010) o el 84,1% en un estudio con bacterias aerobias y anaerobias (Seng, P. *et al.*, 2009). Otros autores ponen de

manifiesto porcentajes similares a los nuestros, como **Ferreira, L. et al.** (2010) (91,8%), **Benagli, C. et al.** (2011) (97,3%) y **Bessède, E. et al.** (2011) (97,3%).

Al comparar los resultados de la identificación de las cepas mediante la técnica MALDI-TOF con los obtenidos por la técnica de la PCR, se constató que en el 100 % de los casos coincidieron los resultados a nivel de especie. Sobre esta base, se llevó a cabo la incorporación de la entrada a la base de datos del MALDI-TOF MS para *D. fairfieldensis* de la cepa de campo. Sin embargo, no sucedió este hecho en la primera identificación de las cepas aisladas con respecto a las cepas de colección. Por ello, la aparición de resultados discrepantes entre ambos análisis puede deberse a que se hayan producido falsos negativos en la PCR, como sucedió en el estudio de **Prohaska, S. et al.** (2014).

Aunque la secuenciación del gen que codifica la síntesis del ARNr 16S es considerada la mejor técnica para la identificación de las especies del género *Desulfovibrio*, debido a que es una técnica muy laboriosa, costosa y necesita mucho tiempo para su desarrollo, la técnica MALDI-TOF MS se plantea como una buena alternativa por ser un método rápido y con alta exactitud. Para mejorar la identificación de las bacterias del género *Desulfovibrio* mediante la técnica MALDI-TOF MS se hace necesario incorporar a la base de datos los espectros de masas de las distintas especies o cepas de este género (para cubrir la variabilidad intraespecífica) así como la detección de biomarcadores especie-específicos en el espectro de masas que permitan la diferenciación de las especies más estrechamente relacionadas.

6.3.SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA.

Hoy en día, debido al poco conocimiento sobre esta bacteria y por consiguiente a la falta de vacunas comerciales, las enfermedades causadas por las especies del género *Desulfovibrio* directamente o en colaboración con otras bacterias, sólo se pueden combatir mediante el uso adecuado de antibióticos. Sin embargo, no está aún descrito ningún antibiótico más efectivo que otro para luchar contra estos microorganismos. Por ello, elegimos los siete más empleados por los autores que trabajan con las bacterias pertenecientes al género *Desulfovibrio*; estos son: amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, cefotaxima, ciprofloxacina, clindamicina, imipenem y metronidazol (Gaillard, T. *et al.*, 2011; Goldstein, E.J.C. *et al.*, 2003; Hagiwara, S. *et al.*, 2014; Ichiishi, S. *et al.*, 2010; Johnson, C.C. *et Finegold, S.M.*, 1987; Koyano, S. *et al.*, 2015; La Scola, B. *et Raoult, D.*, 1999; Liderot, K. *et al.*, 2010; Lozniewski, A. *et al.*, 1999; Loubinoux, J. *et al.*, 2000; Mc Dougall, R. *et al.*, 1997; Morin, A.S. *et al.*, 2002; Nakao, K. *et al.*, 2009; Pimentel, J.D *et Chan, R.C.*, 2007; Porschen, R.K. *et Chan, P.*, 1977; Tee, W. *et al.*, 1996; Urata, T. *et al.*, 2008; Vasoo, S. *et al.*, 2014; Verstreken, I. *et al.*, 2012; Warren, Y.A. *et al.*, 2005).

Tampoco existe un método estandarizado para llevar a cabo las pruebas de sensibilidad antimicrobiana de las bacterias del género *Desulfovibrio*. Los más usados para el diagnóstico clínico son los métodos de difusión en disco y el E-test (Ichiishi, S. *et al.*, 2010; La Scola, B. *et Raoult, D.*, 1999; Mc Dougall, R. *et al.*, 1997; Pimentel, J.D *et Chan, R.C.*, 2007; Porschen, R.K. *et Chan, P.*, 1977; Tee, W. *et al.*, 1996; Urata, T. *et al.*, 2008; Vasoo, S. *et al.*, 2014; Verstreken, I. *et al.*, 2012). Los métodos recomendados para las bacterias anaerobias por los organismos oficiales de Europa (EUCAST) y Estados Unidos (CLSI), en general para las bacterias anaerobias, son la dilución en agar y la microdilución en caldo.

Así, pues, en nuestro trabajo de investigación, para el estudio de la sensibilidad antimicrobiana *in vitro* de los aislados obtenidos a partir de cerdos se empleó el método de la microdilución en caldo propuesto por el CLSI (M11-A8, 2012) ya que proporciona resultados fiables y repetibles para las bacterias anaerobias y en particular para las del género *Desulfovibrio*. Johnson, C.C. *et Finegold, S.M.* (1987); Urata, T. *et al.* (2008) y Hagiwara, S. *et al.* (2014), hacen uso de este método, mientras que los

investigadores **Lozniewski, A. et al.** (1999); **Loubinoux, J. et al.** (2000); **Lozniewski, A. et al.** (2001) y **Tran, Ch. M. et al.** (2013) usan el método de dilución en agar.

6.3.1. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y *cut off value*.

Los valores de las CMI obtenidos en nuestro trabajo para cada grupo de animales (cerdos ibéricos y cerdos blancos), sometidos a los antimicrobianos elegidos, fueron muy parecidos en ambos casos. Puesto que no existen valores de consenso de *breakpoints*, CMI, WT ni, en nuestro caso, un número de aislados suficientes para determinarlos, como afirman **Kahlmeter, G. et al.** (2006), decidimos establecer como valores de referencia las CMI75 y CMI90 (**Píriz, S.**, 1989).

Teniendo en cuenta ambos valores de CMI, se catalogaban las cepas como sensibles (S), si el valor es menor o igual al de CMI75, intermedias (I), las que se encontraban en valores superiores a la CMI75 y menores o iguales a la CMI90 o resistentes (R), las cepas con valores superiores al de CMI90. Así se muestra en las **Tablas 11 y 12** del apartado **5.5.1.** de los **Resultados**.

6.3.2. Interpretación de los valores de CMI: cepas R, I y S.

Comparando los resultados obtenidos con estudios anteriores realizados por otros investigadores con cepas de origen humano, se constata que, tras investigar la sensibilidad de los desulfovibrios aislados a los diferentes antimicrobianos mediante la técnica de difusión en disco y el E-test, presentan resistencias en el grupo de las penicilinas (>256 µg/ml), ciprofloxacina (>32 µg/ml) e imipenem (30 µg) y sensibilidad al metronidazol (0,06 µg/ml) y a la clindamicina (2 µg) (**Tee, W. et al.**, 1996). Este último resultado también lo encuentran **Jonhson, C.C. et Finegold, S.M.** (1987) y **Porschen, R. K. et Chan, P.** (1977).

McDougall, R. et al. (1997) muestran unos resultados que difieren con las investigaciones anteriores, donde la cepa de *D. desulfuricans* aislada es sensible a la

ciprofloxacina (0,5 µg/ml) y al imipenem (0,125 µg/ml), sin embargo, coinciden en la sensibilidad al metronidazol (0,06 µg/ml), a la clindamicina (0,125 µg/ml) y a la amoxicilina-ácido clavulánico (1 µg/ml). Además la cepa es resistente a las penicilinas y a la cefotaxima.

La Scola, B. et Raoult, D. (1999) coinciden con **McDougall, R. et al.** (1997), tras aislar cepas de *D. fairfieldensis* y con **Ichiishi, S. et al.** (2010), en cuatro cepas de *D.intestinalis* aisladas, en la sensibilidad a la ciprofloxacina (0,38 µg/ml), al metronidazol (0,06 µg/ml) y a la clindamicina (0,75 µg/ml), a pesar de que los últimos investigadores observan valores de CMI menores para los 3 antimicrobianos. Con el mismo método que utilizan los investigadores citados anteriormente (E-test), demuestran también la resistencia a la amoxicilina (>256 µg/ml). **Lozniewski, A. et al.** (1999), empleando el método dilución en agar, presentan resultados muy similares a los de **La Scola, B. et Raoult, D.** (1999), donde los desulfovibrios aislados se muestran resistentes a la amoxicilina y cefotaxima pero sensibles a la acción de la amoxicilina-ácido clavulánico, al imipenem y al metronidazol.

Loubinoux, J. et al. (2000), investigaron la sensibilidad antimicrobiana por el método de dilución en agar de un aislado de *D. fairfieldensis*, que resultó resistente a la amoxicilina (>32 µg/ml), a la cefotaxima (256 µg/ml) y a la amoxicilina-ácido clavulánico (16 µg/ml) difiriendo así con los autores antes mencionados anteriormente, y sensibles a la clindamicina (0,5 µg/ml), al metronidazol (0,25 µg/ml) y al imipenem (0,5 µg/ml). **Goldstein, E.J.C. et al.** (2003) coinciden con estos dos últimos resultados. **Pimentel, J.D. et Chan, R.C.** (2007) obtienen los mismos resultados que **Loubinoux, J. et al.** (2000), incorporando además la sensibilidad a la ciprofloxacina. Como se observa, los valores de CMI, sobre todo, en el caso de la amoxicilina y del metronidazol varían bastante al que establecen los demás autores.

En 2001, **Lozniewski, A. et al.** y posteriormente **Nakao, K. et al.** (2009), aislan 16 y 23 cepas del género *Desulfovibrio* respectivamente y mediante el método de dilución en agar consiguieron resultados iguales a los que anteriormente **Lozniewski, A. et al.** (1999) obtuvieron para la amoxicilina, cefotaxima, amoxicilina-ácido clavulánico, imipenem y metronidazol. Sin embargo, los valores de CMI fueron superiores. Además incorporaron al estudio la ciprofloxacina (64 µg/ml) (>32 µg/ml), presentando resistencia y la clindamicina (4 µg/ml) y (0,19 µg/ml) mostrando sensibilidad en todas

las cepas. **Gaillard, T. et al.** (2011) en el tratamiento de un caso clínico en que el aislaron *D. fairfieldensis*, donde administran al paciente amoxicilina-ácido clavulánico y ciprofloxacina durante 8 días, observan que la bacteria es resistente a la acción de estos antimicrobianos. De aquí se colige que los resultados que obtienen **Lozniewski, A. et al.** (2001) y **Nakao, K. et al.** (2009) es sus estudios *in vitro* presentan una íntima relación con la realidad. Sin embargo, el empleo del imipenem, el metronidazol y la clindamicina fue muy efectivo, por lo que la cepa era sensible a estos antimicrobianos, coincidiendo con **Porschen, R. K. et Chan, P.** (1977), **Jonhson, C.C. et Finegold, S.M.** (1987), **Tee, W. et al.** (1996), **McDougall, R. et al.** (1997), **La Scola, B. et Raoult, D.** (1999), **Lozniewski, A. et al.** (1999), **Loubinoux, J. et al.** (2000), **Lozniewski, A. et al.** (2001), **Goldstein, E.J.C. et al.** (2003), **Warren, Y.A. et al.** (2005), **Pimentel, J.D. et Chan, R.C.** (2007), **Urata, T. et al.** (2008), **Nakao, K. et al.** (2009), **Ichiishi, S. et al.** (2010), **Liderot, K. et al.** (2010). Tres años más tarde, **Vasoo, S. et al.** (2014), tras realizar el E-test a 36 cepas aisladas de *Desulfovibrio spp.* obtuvieron los mismos resultados que **Lozniewski, A. et al.** (2001) y **Nakao, K. et al.** (2009) para la amoxicilina-ácido clavulánico, el imipenem, el metronidazol, la clindamicina pues resultaron sensibles, como mostraron **Koyano, S. et al.** (2015) con *D. desulfuricans* que sometieron a la sensibilidad antimicrobiana mediante el método de microdilución en caldo, y para la ciprofloxacina (>32 µg/ml) que fueron resistentes.

Morin, A.C. et al. (2002), aislaron 13 cepas de *Desulfovibrio spp.* que sometieron junto con la cepa de colección *D. desulfuricans* ATCC 27774 a la prueba de sensibilidad antimicrobiana, obteniendo resultados dispares, para amoxicilina, cefotaxima y metronidazol. Así, la cepa de colección es sensible a los tres antimicrobianos, mientras que las 13 cepas aisladas se presentan como sensibles, intermedias o resistentes dependiendo del caso, por tener un amplio rango (AMX: 0,25-128 µg/ml, CTX: 1-128 µg/ml y CIP: 0,5-64 µg/ml).

Warren, Y.A. et al. (2005), estudiaron la sensibilidad antimicrobiana de diferentes cepas de origen humano por dilución en agar: 10 cepas de *D. fairfieldensis*, 2 cepas de *D. piger*, 3 de *D. desulfuricans* y 3 de *D. vulgaris*. Apreciaron gran semejanza con los resultados conseguidos por **Lozniewski, A. et al.** (1999), **Loubinoux, J. et al.** (2000) **Lozniewski, A. et al.** (2001), constatando que las cepas fueron resistentes a la acción de las penicilinas y cefalosporinas (128 µg/ml), intermedias a la amoxicilina-ácido clavulánico (8 µg/ml) y sensibles a la clindamicina (0,25 µg/ml), el

metronidazol (0,25 µg/ml) y al imipenem (1 µg/ml). El rango presentado por el grupo de las penicilinas es inferior al apreciado en nuestro estudio, pues son consideradas por estos autores resistentes.

Urata, T. et al. (2008), estudiaron la sensibilidad antimicrobiana de una cepa de *D. fairfieldensis* por la técnica E-test, coincidiendo en los resultados con los conseguidos por parte de **Warren, Y.A. et al.** (2005) en la sensibilidad a la acción de la clindamicina (0,25 µg/ml), el metronidazol ($\leq 0,016$ µg/ml) y al imipenem (3 µg/ml). Sin embargo, difieren con estos investigadores en la acción de la amoxicilina-ácido clavulánico (2/1 µg/ml), al mostrarse la cepa sensible a este antimicrobiano.

Liderot, K. et al. (2010) y **Hagiwara, S. et al.** (2014), demostraron al realizar el estudio de sensibilidad antimicrobiana mediante distintas técnicas (E-test, microdilución en caldo) que las cepas de *D. desulfuricans* que aislaron se mostraban sensibles al grupo de las penicilinas y amoxicilina ($< 0,5$ µg/ml), amoxicilina-ácido clavulánico ($\leq 2/1$ µg/ml), como **Urata, T. et al.** (2008) y **Verstreken, I. et al.** (2012), clindamicina (0,25 µg/ml), al metronidazol ($\leq 0,016$ µg/ml) (**Verstreken, I. et al.**, 2012) y al imipenem (0,5 µg/ml) como **Warren, Y.A. et al.** (2005) y **Tran, Ch. M. et al.** (2013) y cefotaxima (1 µg/ml).

Como se dijo anteriormente, todos los autores con los que se discuten los resultados del presente trabajo, investigan cepas aisladas a partir de pacientes humanos que padecían diversos procesos infecciosos. Además estos investigadores interpretan los valores de las CMIs siguiendo el criterio de los *breakpoints* del grupo de las bacterias anaerobias, establecidos en el documento M100-S24 (**CLSI, 2014**), por lo que nuestros resultados se comparan obligadamente con este criterio.

Sobre esta base, podemos comparar nuestra interpretación de los resultados de las CMIs con el criterio de los *breakpoints* establecidos por EUCAST (2016), para el grupo de bacterias anaerobias gran negativas que incluye muchos y muy diversos géneros como *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Bilophila* y *Moviluncus* y por los estándares interpretativos de CMI de la tabla de anaerobios del documento M100-S24 (CLSI, 2014).

Para la amoxicilina ambos laboratorios mantienen el mismo criterio: se consideran sensibles las bacterias que presenten una CMI $\leq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$, intermedias las de CMI igual a 1 $\mu\text{g/ml}$ y resistentes las de CMI ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$. Según estos criterios, únicamente habría 1 cepa sensible, 6 intermedias y el resto resistentes, por lo que el porcentaje de cepas resistentes a la acción del antimicrobiano se encontraría próximo al 100%. En el sentido de lo apuntado, **La Scola, B. et Raoult, D.** (1999), **Lozniewski, A. et al.** (1999), **Loubinoux, J. et al.** (2000), **Lozniewski, A. et al.** (2001) y **Morin, A.C. et al.** (2002), al estudiar la sensibilidad antimicrobiana de los desulfovibrios aislados a partir de procesos infecciosos humanos, observaron valores de CMI superiores a los nuestros. Además al someter las especies más relevantes desde el punto de vista clínico del género *Desulfovibrio* a los estudios de sensibilidad antimicrobiana, mediante los dos criterios, observamos que son sensibles o intermedias presentando CMIs ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo, según el *cut off value* que se establece entre CMI75 y CMI90 el 91% de las cepas y todas las de colección son sensibles, siendo el resto intermedias. La disparidad que surge entre nuestros resultados con los de otros autores, justificó la realización de la actividad enzimática, que resultó negativa.

Para la amoxicilina-ácido clavulánico, EUCAST considera como sensible unos valores de CMI ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$, intermedia de CMI 4/8 $\mu\text{g/ml}$ y resistente de CMI > 8 $\mu\text{g/ml}$ al igual que CLSI, estableciendo este último más margen en la sensibilidad (< 2 $\mu\text{g/ml}$) y en la resistencia hasta ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$. En consecuencia, todas nuestras cepas son sensibles a la acción de la amoxicilina-ácido clavulánico, incluidas las cepas de colección (CMI $\leq 0,25$ $\mu\text{g/ml}$), coincidiendo con **McDougall, R. et al.** (1997), **Lozniewski, A. et al.** (1999), **Urata, T. et al.** (2008), **Liderot, K. et al.** (2010), **Verstreken, I. et al.** (2012), **Hagiwara, S. et al.** (2014), **Vasoo, S. et al.** (2014) y **Koyano, S. et al.** (2015), pero no con **Loubinoux, J. et al.** (2000), **Lozniewski, A. et al.** (2001), **Warren, Y.A. et al.** (2005), **Pimentel, J.D. et Chan, R.C.** (2007) y **Gaillard, T. et al.** (2011). Según nuestro punto de corte, las interpretaciones de los valores de las CMI son muy parecidas a las que establece EUCAST y CLSI a pesar de que sus *breakpoints* son más altos.

Para la cefatoxima, solo se tendrá en cuenta el criterio de CLSI, puesto que en EUCAST no se define el *breakpoint* por el bajo número de casos existentes. Son sensibles las bacterias con CMI ≤ 16 $\mu\text{g/ml}$, intermedias con CMI 32 $\mu\text{g/ml}$ y resistentes con CMI ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$. Así, pues, la mayoría de nuestros aislados, según CLSI, se consideran sensibles, como concluyeron **Liderot, K. et al.** (2010) y **Hagiwara, S. et al.**

(2014). En contraposición, los resultados obtenidos con las cepas de *Desulfovibrio spp.* aisladas por **McDougall, R. et al.** (1997), **Lozniewski, A. et al.** (1999), **Loubinoux, J. et al.** (2000), **Lozniewski, A. et al.** (2001), **Warren, Y.A. et al.** (2005), **Pimentel, J.D. et Chan, R.C.** (2007) y **Nakao, K. et al.** (2009) ponen de manifiesto resistencias a la cefatoxima, con valores de CMI muy altos con respecto al criterio de *breakpoint* establecido. En el caso de nuestras cepas de colección se observan unos valores de CMI superiores al obtenido con las cepas aisladas a partir de cerdos, que para CLSI serían sensibles e intermedias pero que según nuestro criterio son intermedias y resistentes en su mayoría.

Para la ciprofloxacina, ninguno de los dos laboratorios autorizados establece estándares de interpretación de CMI para este antimicrobiano, sin embargo nos valemos del *breakpoint* CLSI para otro antimicrobiano, el moxifloxacino, de la misma familia de las fluoroquinolonas, donde las bacterias serán sensibles a $CMI \leq 2 \mu\text{g/ml}$, intermedias con $CMI 4 \mu\text{g/ml}$ y resistentes con $CMI \geq 8 \mu\text{g/ml}$. Comparando este criterio con el nuestro, se observa una igualdad con respecto a los valores de sensibilidad y de resistencia intermedia, no siendo así en la resistencia, que en nuestro caso la catalogamos superior ($CMI \geq 16 \mu\text{g/ml}$). De esta manera, tanto la mayoría de las cepas de campo asiladas como todas las de colección son sensibles, teniendo en cuenta ambos criterios. El mismo criterio utilizan **McDougall, R. et al.** (1997), **La Scola, B. et Raoult, D.** (1999), **Morin, A.C. et al.** (2002), **Pimentel, J.D. et Chan, R.C.** (2007) y **Ichiishi, S. et al.** (2010), mientras que por el contrario, **Tee, W. et al.** (1996), **Lozniewski, A. et al.** (2001), **Liderot, K. et al.** (2010), **Gaillard, T. et al.** (2011) y **Vasoo, S. et al.** (2014) definen la resistencia de las cepas de *Desulfovibrio spp.* a la acción de la ciprofloxacina con $CMI > 32 \mu\text{g/ml}$.

Para la clindamicina, según nuestro criterio, las 33 cepas aisladas y todas las cepas de colección, son sensibles ($CMI 0,125 \mu\text{g/ml}-4 \mu\text{g/ml}$), mientras que según EUCAST y CLSI, 11 de las cepas, con una CMI de $4 \mu\text{g/ml}$, serían intermedias, al establecer los estándares interpretativos CMI; S $\leq 2 \mu\text{g/ml}$; I= $4 \mu\text{g/ml}$; R $\geq 8 \mu\text{g/ml}$. **Porschen, R. K. et Chan, P.** (1977), **Jonhson, C.C. et Finegold, S.M.** (1987), **Tee, W. et al.** (1996), **McDougall, R. et al.** (1997), **La Scola, B. et Raoult, D.** (1999), **Loubinoux, J. et al.** (2000), **Warren, Y.A. et al.** (2005), **Pimentel, J.D. et Chan, R.C.** (2007), **Urata, T. et al.** (2008), **Nakao, K. et al.** (2009), **Ichiishi, S. et al.** (2010), **Liderot, K. et al.** (2010), **Verstreken, I. et al.** (2012), **Tran, Ch. M. et al.** (2013),

Hagiwara, S. et al. (2014), **Vasoo, S. et al.** (2014) y **Koyano, S. et al.** (2015) presentan en sus estudios los mismos resultados que los obtenidos por nosotros, donde todas las cepas aisladas de *Desulfovibrio spp.* son sensibles a la clindamicina con valores de CMI ≤ 5 $\mu\text{g/ml}$. Únicamente **Lozniewski, A. et al.** (2001), a partir de los 16 aislados de *Desulfovibrio spp.* investigados obtienen valores intermedios con una CMI de 4 $\mu\text{g/ml}$, al igual que nuestras 11 de las 33 cepas estudiadas en este trabajo de investigación.

Para el imipenem, el criterio de CLSI y EUCAST es el mismo, considerando sensibles las cepas con una CMI ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$, intermedias las que presenten valores iguales a 8 $\mu\text{g/ml}$ y resistentes ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$. Según este criterio todas nuestras cepas, incluidas las de colección, son sensibles, pues todas poseen valores de CMI $\leq 0,06$ $\mu\text{g/ml}$ como obtienen en sus estudios **McDougall, R. et al.** (1997), **Lozniewski, A. et al.** (1999), **Loubinoux, J. et al.** (2000), **Lozniewski, A. et al.** (2001), **Goldstein, E.J.C. et al.** (2003), **Warren, Y.A. et al.** (2005), **Pimentel, J.D. et Chan, R.C.** (2007), **Urata, T. et al.** (2008), **Liderot, K. et al.** (2010), **Tran, Ch. M. et al.** (2013), **Hagiwara, S. et al.** (2014), **Vasoo, S. et al.** (2014) y **Koyano, S. et al.** (2015), exceptuando a **Tee, W. et al.** (1996) que observó mediante la técnica de difusión en disco que la cepa aislada de *D. desulfuricans* era resistente. Sin embargo, según nuestro criterio, todas las cepas con una CMI de 0,06 $\mu\text{g/ml}$ (3 y todas las de colección) y algunas con una CMI de 0,03 $\mu\text{g/ml}$, las pertenecientes a cerdos ibéricos (12) son consideradas intermedias.

Para el metronidazol, EUCAST establece como *breakpoints* que las cepas son resistentes a partir de CMI >4 $\mu\text{g/ml}$, mientras que CLSI dice que son sensibles las de CMI ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$, intermedias las de CMI de 16 $\mu\text{g/ml}$ y resistentes las ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$. Si comparamos los valores obtenidos de CMI, al someter nuestros aislados a la acción de este antimicrobiano, observamos que por ambos criterios todas son sensibles incluyendo las cepas de colección (rango de CMI de 0,125-4 $\mu\text{g/ml}$). Los mismos resultados obtuvieron **Tee, W. et al.** (1996), **McDougall, R. et al.** (1997), **La Scola, B. et Raoult, D.** (1999), **Lozniewski, A. et al.** (1999), **Loubinoux, J. et al.** (2000), **Lozniewski, A. et al.** (2001), **Goldstein, E.J.C. et al.** (2003), **Warren, Y.A. et al.** (2005), **Pimentel, J.D. et Chan, R.C.** (2007), **Urata, T. et al.** (2008), **Nakao, K. et al.** (2009), **Ichiishi, S. et al.** (2010), **Liderot, K. et al.** (2010), **Verstreken, I. et al.** (2012), **Tran, Ch. M. et Tanaka, K.** (2013) y **Vasoo, S. et al.** (2014).

Resumiendo, de manera general, los resultados de sensibilidad antimicrobiana que se obtienen con las 33 cepas aisladas de *Desulfovibrio fairfieldensis* a partir de cerdos blancos e ibéricos con diarreas mucohemorrágicas, se asemejan en la mayoría de los casos con el resto de autores al investigar cepas de origen humano, anteriormente citados, desde el punto de vista interpretativo, es decir en catalogar las cepas como sensibles, intermedias o resistentes, teniendo como referencia el criterio de CLSI y EUCAST. Sin embargo, éstos presentan en sus estudios valores de CMI superiores a los nuestros.

Es importante puntualizar que no se observan diferencias significativas de sensibilidad antimicrobiana a nivel de especie bacteriana del género *Desulfovibrio*.

Además, estos laboratorios de referencia (CLSI y EUCAST) establecen los *breakpoints* superiores a los puntos de corte o *cut off value* que nosotros determinamos en nuestro estudio.

Todo ello nos hace pensar que las bacterias del género *Desulfovibrio* aisladas a partir de seres humanos, presentan más resistencias a los antimicrobianos, con CMIs superiores que los aislados obtenidos a partir de cerdos con diarrea. Probablemente, esto se deba a la continua administración de antibióticos de amplio espectro al ser humano, destacando la acción de la amoxicilina y cefotaxima, sin conocer el agente etiológico para un correcto y efectivo uso. Aunque esto pudiera suceder igual en la clínica veterinaria, las cepas aisladas en este trabajo se obtuvieron a partir de cerdos que no estaban tratados con ningún antimicrobiano de los estudiado. **Allen, H.K. et Stanton, T.B.** (2014) observan la necesidad de que el uso de antibióticos se limite a aplicaciones controladas en medicina humana y veterinaria. Además establecen que el uso de antibióticos en la alimentación para el rápido crecimiento de animales de consumo provoca una evolución en sus bacterias intestinales, aumentando la prevalencia y la diversidad de los genes de resistencia a los antibióticos. Esto repercute en la salud del ser humano y en la seguridad de una fuente importante de proteínas. Por ello es fundamental conocer los efectos de los antibióticos, que ayudarán a superar los retos de la gestión de la salud animal y la inocuidad de los alimentos. Sin embargo, el empleo de antibióticos como promotores del crecimiento está prohibido desde el año 2006 en la Unión Europea y el de profilácticos está muy limitado, indicando el uso controlado de cada antimicrobiano para cada enfermedad y especie animal (**OIE**, 2015).

Por otra parte, los *breakpoints* y los estándares interpretativos de los valores de CMI's dados por CLSI y EUCAST, se establecen a partir de numerosos estudios de un grupo amplio de bacterias anaerobias, mientras que el *cut off value* es único de nuestro estudio para las 33 cepas de bacterias del género *Desulfovibrio*. Por este motivo, se pueden considerar sesgados ambos criterios, el primero por la falta de especialización en las bacterias del género *Desulfovibrio* (La Scola, B. et Raoult, D., 1999; Lozniewski, A. et al., 2001; Morin, A.C. et al., 2002; Nakao, K. et al., 2009) y el segundo (*cut off value*), o por haber errado en considerar cepas resistentes con punto de corte CMI75, o bien por el insuficiente número de microorganismos estudiados. Así se explica que no haya producción de beta-lactamasas por parte de las cepas sospechosas (sensibilidad intermedia para la amoxicilina y sensibles a amoxicilina-ácido clavulánico).

En cuanto a los perfiles de resistencia, tras considerar la CMI75 como punto de corte, observamos que 12 cepas de las 33 muestran sensibilidad a todos los antimicrobianos utilizados, presentando resistencias intermedias a seis antimicrobianos (imipenem, ciprofloxacina, cefotaxima, amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico y metronidazol) siendo mayor en el grupo de cerdos ibéricos. En cambio para la CMI90, 28 cepas son sensibles a todos los antimicrobianos y las 5 cepas restantes presentan resistencias parecidas entre ambos grupos, tres de cerdo blanco resistentes a la ciprofloxacina y el metronidazol y dos de cerdo ibérico resistentes a la ciprofloxacina y la cefotaxima. De esta manera, suponiendo que el punto de corte correcto es CMI90, algunas cepas resultan resistentes a la cefotaxima, como se observa en los perfiles de resistencia. Por ello, habría que plantearse investigar más en profundidad a los antimicrobianos beta-lactámicos y en particular a la cefotaxima, pudiendo realizar otros mecanismos de resistencia como la bomba de flujo o las proteínas fijadoras de penicilinas (PBP, acrónimo de *penicillin binding proteins*). Sin embargo, el único mecanismo probado para las bacterias del género *Desulfovibrio* es el de las beta-lactamasas (Goldstein, E.J. et al., 2003; La Scola, B. et Raoult, D., 1999; Lozniewski, A. et al., 2001; Mc Dougall, R. et al., 1997; Morin, A.S. et al., 2002; Nakao, K. et al., 2009).

6.3.3. Sensibilidad a los antimicrobianos en relación al sistema de explotación.

Los perfiles de resistencia obtenidos resultan paradójicos si comparamos el grupo de cerdos blancos con el de ibéricos. En este trabajo de investigación se establece que la raza y el régimen de explotación están asociados en muestras procedentes de cerdos enfermos que presentan diarreas mucohemorrágicas. Así la raza ibérica se relaciona con el sistema extensivo y la raza blanca con el intensivo.

Teniendo en cuenta los aspectos y características de ambas explotaciones, se observa que en los sistemas intensivos se originan mayor cantidad de procesos infecciosos, por lo que teóricamente estos animales, tras la administración de una gran cantidad de antimicrobianos, presenten más resistencias antimicrobianas que en el caso de los cerdos ibéricos en extensivo (**Palomo, G., 2011**).

Sin embargo, el sistema de explotación difiere significativamente en la fase de producción de cría, cuando los cerdos ya son adultos (> 4 meses). Anteriormente, los lechones al destete (2-4 meses) se les realiza un plan sanitario (antibioterapia, vacunaciones y desparasitaciones), sin distinguir entre cerdos de raza blanca, ibérica o cruzada, por lo que las resistencias son las mismas. El Comité Internacional de la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) de mayo de 2015 considera la administración de una serie de agentes antimicrobianos para la medicina veterinaria. En esta lista, para suidosis, se considera uno de los más importantes la colistina, antimicrobiano efectivo para combatir un amplio grupo de bacterias, sobre todo las gramnegativas que provocan infecciones digestivas. Se elige este antimicrobiano para que los animales entren en la siguiente fase de producción asépticos. Sin embargo, no se tiene en cuenta que existen en algunas bacterias resistencias a este antimicrobiano (**Rhouma, M. et al., 2016**), como ocurre con las bacterias de los géneros *Brachyspira* y *Desulfovibrio*, tal y como demostraron **Warren, Y.A. et al., 2005**, **Pimentel, J.D et Chan, R.C., 2007** e **Ichiishi, S. et al., 2010**; y se corrobora en el presente trabajo de investigación. El empleo indiscriminado de colistina, pues, provoca un continuo

incremento del poder patógeno de los desulfovibrios, ya que aunque son bacterias poco competitivas y no originan enfermedad por sí solas sino en asociación con otras, al encontrarse en condiciones óptimas producen un efecto mayor y más deletéreo, originando con mayor facilidad procesos infecciosos diarreicos. Para solucionar la situación de disbiosis intestinal provocada por la colistina, **Honneffer, J.B. et al.** (2014) aseveran que la administración de probióticos puede lograr el equilibrio de la micropoblación intestinal en los casos de enfermedad gastrointestinal.

A raíz de todo lo descrito anteriormente, se pueden explicar los resultados obtenidos en el presente trabajo, en el que no se aprecian diferencias significativas en cuanto a las resistencias antimicrobianas de los desulfovibrios aislados, tanto de cerdos blancos como de cerdos ibéricos.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES.

1. Hasta el día de hoy, no se ha descrito ningún caso de aislamiento de bacterias pertenecientes al género *Desulfovibrio* a partir del ganado porcino, por lo que las cepas de *D. fairfieldensis* obtenidas en el desarrollo de este trabajo de investigación son las primeras conseguidas por parte de la comunidad científica internacional.

2. El aislamiento de bacterias pertenecientes a la especie *D. fairfieldensis*, pone de manifiesto que estos microorganismos pueden formar parte de la micropoblación bacteriana intestinal normal de un porcentaje elevado de animales de la especie porcina. Fenómeno que se ha constatado en el ser humano.

3. El hallazgo de estas bacterias, muy poco estudiadas en el campo de la Microbiología Veterinaria, alerta de la posibilidad de su implicación en el desarrollo de diversos procesos infecciosos polimicrobianos y monomicrobianos, tanto en el cerdo como en otras especies animales.

4. El aislamiento de los desulfovibrios mediante los métodos tradicionales a partir de las heces de cerdos sanos, resulta muy difícil debido a que estas bacterias se encuentran en los animales de referencia por debajo del número mínimo necesario para su crecimiento en los medios de cultivo específicos en condiciones de anaerobiosis.

5. No existen diferencias importantes en cuanto a la frecuencia de aparición de las bacterias del género *Desulfovibrio* que se aíslan a partir de heces diarreicas procedentes tanto de cerdo ibérico como de cerdo blanco afectados de disentería. Por lo que se colige, que la raza y el hábitat no influyen de una manera directa en el aumento del número de desulfovibrios presentes en el intestino del ganado porcino que padece este proceso infeccioso.

6. La presencia de *D. fairfieldensis* en las líneas de agotamiento de las placas de cultivo sembradas con heces provenientes de cerdos que padecían disentería, junto con cepas bacterianas pertenecientes al género *Brachyspira*, induce a pensar que los desulfovibrios pueden colaborar con las braquispiras en el desencadenamiento de la enfermedad; en especial con aquellas especies consideradas apatógenas, como *B. murdochii* y *B. innocens*.

7. El análisis de la secuencia del gen que codifica la síntesis del ARNr 16S es la columna vertebral de la filogenia bacteriana, por su elevado grado de conservación. Sin embargo, para los desulfovibrios, esta técnica puede considerarse sensible y específica sólo para poner de manifiesto la pertenencia de las cepas bacterianas al género *Desulfovibrio*. La identificación de las especies requiere la amplificación por la PCR de los genes ADNr 16S específicos.

8. La técnica MALDI-TOF MS demostró ser un método efectivo y útil para la validación de las especies del género *Desulfovibrio*. Por ello, constituye una alternativa diagnóstica a las pruebas bioquímicas o a la técnica de la PCR, para la identificación de estos microorganismos, siempre que se encuentren incluidos en la base de datos.

9. La sensibilidad a los antimicrobianos mostrada por las cepas de *D. fairfieldensis* de origen porcino es similar a la descrita por otros autores en estudios similares realizados con cepas de origen humano. Los antimicrobianos más efectivos para inhibir el crecimiento de estas bacterias son: el imipenem, el metronidazol y la clindamicina.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA.

Ahmed, S., Macfarlane, G.T., Fite, A., McBain, A.J., Gilbert, P. and Macfarlane, S. (2007). Mucosa-associated bacterial diversity in relation to human terminal ileum and colonic biopsy samples. *Applied and Environmental Microbiology*. **73:** (22), 7435.

Allen, H.K. and Stanton, T.B. (2014). Altered egos: antibiotic effects on food animal microbiomes. *Annual Review of Microbiology*. **68:** 297-315.

Attene-Ramos, M.S., Wagner, E.D. and Plewa, M.J. (2006). Evidence that hydrogen sulfide is a genotoxic agent. *Mol. Cancer Res.* **4:** (1), 9-14.

Baron, E.J., Bennion, R., Thompson, J., Strong, C., Summanen, P., McTeague, M. and Finegold, S.M. (1992). A microbiological comparison between acute and complicated appendicitis. *Clinical Infectious Diseases*. **14:** 227-231.

Barton, L.L. and Fauque, G.D. (2009). Biochemistry, physiology and biotechnology of sulfate-reducing bacteria. *Advances in Applied Microbiology*. **58:** 41-98.

Barton, L.L. and Hamilton, W.A. (2007). Sulphate-reducing bacteria: environmental and engineered systems Cambridge University Press. New York. USA.

Barton, L.L., Fardeau, M.L. and Fauque, G.D. (2014). Hydrogen sulfide: A toxic gas produced by dissimilatory sulfate and sulfur reduction and consumed by microbial oxidation. *Metal Ions Life Sciences*. **14:** 237-277.

Beerens, H. and Romond, C. (1977). sulfate-reducing anaerobic bacteria in human faeces. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **30:** 1770-1776.

Benagli, C., Rossi, V., Dolina, M., Tonolla, M. and Petrini, O. (2011). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. *PLoS ONE*. **6:** (1) e16424.

Bertolino, S.M., Rodrigues, I.C.B., Guerra-Sá, R., Aquino, S.F. and Leao, V.A. (2012). Implication of volatile fatty acid profile on the metabolic pathway during continuous sulfate reduction. *Journal of Environmental Management*. **103**: 15-23.

Bessède, E., Angla-Gre, M., Delagarde, Y., Sep Hieng, S., Ménard, A. and Mégraud, F. (2011). Matrix-assisted laser-desorption/ionization biotyper: experience in the routine of a University hospital. *Clinical Microbiology and Infection*. **17**: (4) 533-538.

Blanco, M., Moran, F. and Pérez, C. (2006). Resistencia bacteriana. Valoración de antibacterianos. *Manual de Microbiología Veterinaria para Estudiantes de Veterinaria*. S. Vadillo, S. Píriz, E. Mateos and J. Valle. Madrid, Universidad de Extremadura-Librería Técnica Figueroa: 133-145.

Bizzini, A., Durussel, C., Bille, J., Greub, G. and Prod'hom, G. (2010). Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. **48**: (5) 1549-1554.

Boone, D.R., Castenholz, R.W. and Garrity, G.M. (2001). The *Archea* and the Deeply Branching and Phototrophic *Bacteria*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Edition. Volume One. Springer. USA.

Boopathy, R., Robichaux, M., LaFont, D. and Howell, M. (2002). Activity of sulfate-reducing bacteria in human periodontal pocket. *Canadian Journal of Microbiology*. **48**: 1099-1103.

Brenner, D.J., Krieg, N.R. and Staley, J.T. (2005). The *Proteobacteria*. Part C. The *Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Edition. Volume Two. Springer. USA.

Brown, L.L. and Løe, H. (1993). Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. *Periodontology 2000*. **2**: 57-71.

Calderaro, A., Bommezzadri, S., Piccolo, G., Zuelli, C., Dettori, G. and Chezzi, C. (2005). Rapid isolation of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* from pigs. *Veterinary Microbiology*. **105:** (3-4) 229-234.

Calderaro, A., Merialdi, G., Perini, S., Ragni, P., Guégan, R., Dettori, G. and Chezzi, C. (2001). A novel method for isolation of *Brachyspira* (*Serpulina*) *hyodysenteriae* from pigs with swine dysentery in Italy. *Veterinary Microbiology*. **80:** (1) 47-52.

Campbell, A.G., Campbell, J.H., Schwientek, P., Woyke, T., Sczyrba, A., Aliman, S., Beall, C.J., Griffen, A., Leys, E. and Podar, M. (2013). Multiple single-cell genomes provide insight into functions of uncultured *Deltaproteobacteria* in the human oral cavity. *PLoS ONE*. **8:** (3), e59361.

Campos, M.J. (2011). Estudio de la resistencia a quinolonas y cefalosporinas en cepas del género *Salmonella* aisladas de casos clínicos humanos. *Tesis Doctoral*, Universidad de Extremadura.

Canela, M.C. and Jardim, W.F. (1997). The fate of Hg⁰ in natural waters. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **8:** (4), 421-426.

Carvajal A., de Arriba M.L., Rodríguez H., Vidal A.B., Duhamel G.E. and Rubio P. (2006). Prevalence of *Brachyspira* species in pigs with diarrhoea in Spain. *The Veterinary Record*. **158:** (20), 700-701.

Cassagne, C., Pratlong, F., Jeddi, F., Benikhlef, R., Aoun, K., Normand, A.C., Faraut, F., Bastien, P. and Piarroux, R. (2014). Identification of *Leishmania* at the species level with matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection*. **20:** (6) 551-557.

Chan, Y.K., Estaki, M. and Gibson, D.L. (2013). Clinical consequences of diet-induced dysbiosis. *Annals of Nutrition and Metabolism*. **63:** (suppl. 2), 28-40.

Christophersen, C.T., Morrison, M. and Conlon, M.A. (2011). Overestimation of the abundance of sulfate-reducing bacteria in human feces by quantitative PCR targeting the *Desulfovibrio* 16S rRNA gene. *Applied and Environmental Microbiology*. **77**: (10), 3544-3546.

CLSI (2012). Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; M11-A8, vol. 32, no. 5. CLSI, Wayne, PA.

CLSI (2014). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; M100-S4, vol. 34, no. 1. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA.

Colombo, M.J., Ha, J., Reinfelder, J.R., Barkay, T. and Yee, N. (2013). Anaerobic oxidation of Hg⁰ and methylmercury formation by *Desulfovibrio desulfuricans* ND132. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **112**: 166-177.

Couturier, M.R., Mehinovic, E., Croft, A.C. and Fisher, M.A. (2011). Identification of HACEK clinical isolates by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. **49**: (3) 1104-1106.

Croix, J.A., Carbonero, F., Nava, G., Russell, M., Greenberg, E. and Rex, H. (2011). On the relationship between sialomucin and sulfomicin expression and hydrogenotrophic in the human colonic mucosa. *PLoS ONE*. **6**: (9), e24447.

Croxatto A., Prod'hom G. and Greub G. (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*. **36**: (2) 380-407.

Cypionka, H. (2000). Oxygen respiration by *Desulfovibrio* species. *Annual Review of Microbiology*. **54**: 827-848.

De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H. and Whitman, B. (2009). The *Firmicutes*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition. Volume Three. Springer. USA.

Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.M. and Gascuel, O. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research*. **36:** (Web Server issue) W465-469.

Deplancke, B. and Gaskins, H.R. (2003). Hydrogen sulfide induces serum-independent cell cycle entry in nontransformed rat intestinal epithelial cells. *The FASEB Journal*. **17:** 1310-1312.

Devereux, R., He, S.H., Doyle, C.L., Orkland, S., Stahl, D.A., LeGall, J. and Whitman, W.B. (1990). Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family. *Journal of bacteriology*. **172:** (7), 3609-3619.

Djelouadji, Z., Roux, V., Raoult, D., Kodjo, A. and Drancourt, M. (2012). Rapid MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Leptospira* organisms. *Veterinary Microbiology*. **158:** (1-2) 142-146.

Dolla, A., Kurtz, D.M., Texeira, M. and Voordouw, G. (2007). Biochemical proteomic and genetic characterization of oxygen survival mechanisms in sulphate-reducing bacteria of the genus *Desulfovibrio*. In: Barton, L.L., Hamilton, W.A. 2007. Sulphate-reducing bacteria: environmental and engineered systems. Cambridge University Press. New York. USA, 185-214.

Dzierzewicz, Z., Cwalina B., Gawlik, B., Wilczok, T. and Gonciarz, Z. (1997). Isolation and evaluation of susceptibility to sulphasalazine of *Desulfovibrio desulfuricans* strains from the human digestive tract. *Acta Microbiologica Polonica*. **46:** (2), 175-187.

Dzierzewicz, Z., Gawlik, B., Cwalina, Gonciarz, K., Ziolkowski, G., Gonciarz, Z. and Wilczok, T. (1994). Activity of sulphate reducing bacteria in the human digestive tract. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences. Biological sciences*. **42:** 171-176.

Dzierzewicz, Z., Szczerba, J., Lodowska, J., Wolny, D., Gruchlik, A., Orchel, A. and Weglarz, D. (2010). The rol of *Desulfovibrio desulfuricans* lipopolysaccharides in modulation of periodontal inflammation through stimulation of human gingival fibroblasts. *Archives of Oral Biology*. **55**: 515-522.

Earley, H., Lennon, G., Balfe, A., Kilcoyne, M., Clyne, M., Joshi, L., Carrington, S., Martin, S.T., Coffey, J.C., Winter, D.C. and O'Connell, P.R. (2015). A preliminary study examining the binding capacity of *Akkermansia muciniphila* and *Desulfovibrio* spp., to colonic mucin in health and ulcerative colitis. *PLoS ONE*. **10**: (10), e0135280, 1-14.

Emanuele, E., Orsi, P., Boso, M., Broglia, D., Brondino, N., Barale, F., Ucelli di Nemi, S. and Politi, P. (2010). Low-grade endotoxemia in patients with severe autism. *Neuroscience Letters*. **471**: 162-165.

EUCAST (2000). EUCAST Definitive Document E.DEF 2.1, August 2000: Determination of antimicrobial susceptibility test breakpoints. *Clinical Microbiology and Infection*. **6**: (10), 570-572.

EUCAST (2003). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*. **9**: (8), 1-7.

EUCAST (2016). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0.

Fauque, G.D. and Barton, L.L. (2012). Hemoproteins in dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes. *Advances in Microbial Physiology*. **60**: 1-90.

Feberwee, A., Hampson, D.J., Phillips, N.D., La, T., van der Heijden, H.M.J.F., Wellenberg, G.J., Dwars, R.M. and Landman, W.J.M. (2008). Identification of *Brachyspira hyodysenteriae* and other pathogenic *Brachyspira* species in chickens from laying flocks with diarrhea or reduced production or both. *Journal of Clinical Microbiology*. **46**: (2), 593-600.

Feio, M.J., Beech, I.B., Carepo, M., Lopes, J.M., Cheung, C.W.S., Franco, R., Guezennec, J., Smith, J.R., Mitchell, J.I., Moura, J.J.G. and Lino, A.R. (1998). Isolation and characterization of a novel sulphate-reducing bacterium of the *Desulfovibrio* genus. *Anaerobe*. **4**: 117-1130.

Ferreira, L., Sánchez-Juanes, F., González-Ávila, M., Cembrero-Fuciños, D., Herrero-Hernández, A., González-Buitrago, J.M. and Muñoz-Bellido, J.L. (2010). Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. **48**: (6), 2110-2115.

Finegold, S.M. (2011). *Desulfovibrio* species are potentially important in regressive autism. *Medical Hypotheses*. **77**: 270-274.

Florin, T.H.J., Gibson, G.R., Neale, G. and Cummings, J.H. (1990). A role for sulphate reducing bacteria in ulcerative colitis? *Gastroenterology*. **98**: A170.

Fox, J.G., Dewhirst, F.E., Fraser, G.J., Paster, B.J., Shames, B. and Murphy, J.C. (1994). Intracellular *Campylobacter*-like organism from ferrets and hamsters with proliferative bowel disease is a *Desulfovibrio* sp. *Journal of Clinical Microbiology*. **32**: (5), 1229-1237.

Frohlich, J., Sass, H., Babenzien, H.D., Kuhnigk, T., Varma, A., Saxena, S., Nalepa, C., Pfeiffer, P. and Konig, H. (1999). Isolation of *Desulfovibrio intestinalis* sp. nov. from the hindgut of the lower termite *Mastotermes darwiniensis*. *Canadian Journal of Microbiology*. **45**: 145-152.

Fude, L., Harris, B., Urrutia, M.M. and Beveridge, T.J. (1994). Reduction of Cr (VI) by a consortium of sulfate-reducing bacteria (SRB III). *Applied Environmental Microbiology*. **60**: 1525-1535.

Gaillard, T., Pons, S., Darles, D., Beausset, O., Monchal, T. and Brisou, P. (2011). *Desulfovibrio fairfieldensis* bacteremia associated with acute sigmoiditis. *Médecine et Maladies Infectieuses*. **41**: 267-268.

García, P., Allende, F., Legarraga, P., Huilcaman, M. and Solari, S. (2012). Bacterial identification based on protein mass spectrometry: a new insight at the microbiology of the 21st century. *Revista Chilena de Infectología*. **29:** (3) 263-272.

Gebhart, C.J., Barns, S.M., McOrist, S., Lin, G.F. and Lawson, G.H.K. (1993). Ieal symbiont intracellularis, an obligate intracellular bacterium of porcine intestines showing a relationship to *Desulfovibrio* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **43:** (3), 533-538.

Gibson, G.R. (1990). Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. *The Journal of Applied Bacteriology*. **69:** 769-797.

Gibson, G.R., Cummings, J.H. and MacFarlane, G.T. (1991). Growth and activities of sulfate-reducing bacteria in gut contents from healthy subjects and patients with ulcerative colitis. *FEMS Microbiology Ecology*. **86:** 103-112.

Gibson, G.R., MacFarlane, G.T. and Cummings, J.H. (1988). Occurrence of sulphate-reducing bacteria in human faeces and the relationship of dissimilatory sulphate reduction to methanogenesis in the large gut. *The Journal of Applied Bacteriology*. **65:** 103-111.

Gibson, G.R., MacFarlane, S. and MacFarlane, G.T. (1993). Metabolic interactions involving sulphate-reducing and methanogenic bacteria in the human large intestine. *FEMS Microbiology Ecology*. **12:** 117-125.

Gilmour, C.C., Elias, D.A., Kuchen, A.M., Brown, S.D., Palumbo, A.V., Schadt, C.W. and Wall, J.D. (2011). Sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans* ND132 as a model for understanding bacterial mercury methylation. *Applied and Environmental Microbiology*. **77:** (12), 3938-3951.

Goldstein, E.J.C., Citron, D.M., Peraino, V.A. and Cross, S.A. (2003). *Desulfovibrio desulfuricans* bacteremia and review of human *Desulfovibrio* infections. *Journal of Clinical Microbiology*. **41:** (6), 2752-2754.

Goldstein, E.J.C., Citron, D.M., Merriam, C.V. and Abramson, M.A. (2009). Infection after Elective Colorectal Surgery: Bacteriological Analysis of Failures in a Randomized Trial of Cefotetan vs. Ertapenem Prophylaxis. *Surgical infections*. **10:** (2), 111-8.

Haffajee, A.D. and Socransky, S.S. (1994). Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology 2000*. **5:** 78-111.

Hagiwara, S., Yoshida, A., Omata, Y., Tsukada, Y., Takahashi, H., Kamewada, H., Koike, S., Okuzumi, K., Hishinuma, A., Kobayashi, K. and Nakano, M. (2014). *Desulfovibrio desulfuricans* bacteremia in a patient hospitalized with acute cerebral infarction: case report and review. *Journal of Infection and Chemotherapy*. **20:** 274-277.

Hampson, D.J., Atyeo, R.F. and Combs, B.G. (1997). Swine dysentery. En: Hampson, D.J., Stanton, T.B. (Eds). *Intestinal Spirochaetes in Domestic Animals and Humans*. CAB International. Wallingford. pp. 175-209.

Hampson, D.J. and La, T. (2006). Reclassification of *Serpulina intermedia* and *Serpulina murdochii* in the genus *Brachyspira* as *Brachyspira intermedia* comb. nov. and *Brachyspira murdochii* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **56:** (5) 1009-1012.

Hampson, D.J., Stephens, C.P. and Oxberry, S.L. (2006a). Antimicrobial susceptibility testing of *Brachyspira intermedia* and *Brachyspira pilosicoli* isolates from Australian chickens. *Avian Pathology*. **35:** (1), 12-16.

Hampson, D.J. (2012). Brachyspiral colitis. In: Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramírez, A., Schwartz, J.H. and Stevenson, G.W. Diseases of swine. 10th edition. Wiley-Blackwell. Iowa state. USA, 680-696.

Hao, O.J., Chen, J.M., Huang, L. and Buglass, R.L. (1996). Sulfate-Reducing Bacteria. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. **26:** (1), 155-187.

Harris, D.L. and Glock, R.D. (1981). Swine dysentery. En: Leman, A.D., Glock, R.D., Mengeling, W.L., Penny, R.H.C., Scholl, E., Straw, B. (Eds). *Diseases of Swine*. (5th ed). Iowa State Press. Ames, Iowa.

Harris, D.L., Alexander, T.J., Whipp, S.C., Robinson, I.M., Glock, R.D. and Matthews, P.J. (1978). Swine dysentery: studies of gnotobiotic pigs inoculated with *Treponema hyodysenteriae*, *Bacteroides vulgatus*, and *Fusobacterium necrophorum*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **172**: 468-471.

Hartemink, R. and Rombouts, F.M. (1999). Comparison of media for the detection of bifidobacteria, lactobacilli and total anaerobes from faecal samples. *Journal of Microbiological Methods*. **36**: 181-192.

Heggendorn, F.L., Souza Goncalves, L., Dias, E.P., Silva Junior, A., Machado Galvao, M. and Lutterbach, M.T.S. (2013). Detection of sulphate-reducing bacteria in human saliva. *Acta Odontologica Scandinavica*. **71**: 1458-1463.

Heggendorn, F.L., Souza Goncalves, L., Dias, E.P., Heggendorn, C. and Lutterbach, M.T.S. (2014). Detection of sulphate-reducing bacteria and others cultivable facultative bacteria in dental tissues. *Acta Stomatologica Croatica*. **48**: (2), 116-122.

Heggendorn, F.L., Souza Goncalves, L., Dias, E.P., Lione, V.O.F. and Lutterbach, M.T.S. (2015). Biocorrosion of endodontic files through the action of two species of sulfate-reducing bacteria: *Desulfovibrio desulfuricans* and *Desulfovibrio fairfieldensis*. *The Journal of Contemporary Dental Practice*. **16**: (8), 665-673.

Honneffer, J.B., Minamoto, Y. and Suchodolski, J.S. (2014). Microbiota alterations in acute and chronic gastrointestinal inflammation of cats and dogs. *World Journal of Gastroenterology*. **20**: (44), 16489-16497.

Howard, B.H. and Hungate, R.E. (1976). *Desulfovibrio* of the sheep rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. **32**: (4), 598-602.

Hu, H., Lin, H., Zheng, W., Tomanicek, S. J., Johs, A., Feng, X., Elias, D.A., Liang, L. and Gu, B. (2013). Oxidation and methylation of dissolved elemental mercury by anaerobic bacteria. *Nature Geoscience*. **6**: 751-754.

Huber, H., Giezendanner, N., Stephan, R. and Zweifel, C. (2011). Genotypes, antibiotic resistance profiles and microarray-based characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from livestock and veterinarians in Switzerland. *Zoonoses and Public Health*. **58**: (5) 343-349.

Ichiishi, S., Tanaka, K., Nakao, K., Izumi, K. and Mikamo, H. (2010). First isolation of *Desulfovibrio* from the human vaginal flora. *Anaerobe*. **16**: 229-223.

Imlay, J.A. (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annual Review of Biochemistry*. **77**: 755-776.

Inness, V.L., McCartney, A.L., Khoo, C., Gross, K.L. and Gibson, G.R. (2007). Molecular characterisation of the gut microflora of healthy and inflammatory bowel disease cats using fluorescence *in situ* hybridisation with special reference to *Desulfovibrio* spp. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. **91**: 48-53.

International Organization for Standardization (ISO) 20776-1 (2006). Clinical laboratory testing and *in vitro* diagnostic test systems. Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. Part 1: reference method for testing the *in vitro* activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. Disponible en: www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=41630.

Jacobson M., Fellström C., Lindberg R., Wallgren P. and Jensen-Waern M. (2004). Experimental swine dysentery: comparison between infection models. *Journal of Medical Microbiology*. **53**: (Pt 4), 273-280.

Jacobson, M., Gerth Löfstedt, M., Holmgren, N., Lundeheim, N. and Fellström, C. (2005). The prevalences of *Brachyspira* spp. and *Lawsonia intracellularis* in Swedish piglet producing herds and wild boar population. *Journal of Medical Microbiology*. **52:** (9) 386-391.

Jansson D.S. (2009). Genus *Brachyspira* in birds. *Tesis Doctoral*, Swedish University of Agricultural Sciences. (Uppsala).

Joens, L.A., Glock, R.D., Whipp, S.C., Robinson, I.M. and Harris, D.L. (1981). Location of *Treponema hyodysenteriae* and synergistic anaerobic bacteria in colonic lesions of gnotobiotic pigs. *Veterinary Microbiology*. **6:** 69-77.

Johnson, C.C. and Finegold, S.M. (1987). Uncommonly encountered, motile, anaerobic Gram-negative bacilli. *Reviews of Infectious Diseases*. **9:** (6), 1150-1162.

Jorand, F.P.A., Debuy, S., Kamagate, S.F. and Engels-Deutsch, M. (2015). Evaluation of a biofilm formation by *Desulfovibrio fairfieldensis* on titanium implants. *Letters in Applied Microbiology*. **60:** (3), 279-287.

Jousimies-Somer, H.R., Summanen, P., Citron, D.M., Baron, E.J., Wexler, H.M. and Finegold, S.M. (2002). Wadsworth-KTL anaerobic bacteriology manual. Sixth edition. Star Publishing Company. California. USA.

Kahlmeter, G., Brown, D.F.J., Goldstein F.W., MacGowan, A.P., Mouton, J.W., Odenholt, I., Rodloff, A., Soussy, C-J., Steinbakk, M., Soriano, F. and Stetsiouk, O. (2006). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Technical Notes on antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection*. **12:** (6), 501-503.

Karlsson M., Fellström C., Gunnarsson A., Landén A. and Franklin A. (2003). Antimicrobial susceptibility testing of porcine *Brachyspira* (*Serpulina*) species isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. **41:** (6) 2596-2604.

Khalil, N.A., Walton, G.E., Gibson, G.R., Tuohy, K.M. and Andrews, S.C. (2014). *In vitro* batch cultures of gut microbiota from healthy and ulcerative colitis (UC) subjects that sulphate-reducing bacteria levels are raised in UC and by protein-rich diet. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. **65**: (1), 79-88.

Klouche, N., Basso, O., Lascourreges, J.F., Cayol, J.L., Thomas, P., Fauque, G., Fardeau, M.L. and Magot, M. (2009). *Desulfocurvus vexinensis* gen. nov., sp. nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from a deep subsurface aquifer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **59**: 3100-3104.

Knoblauch, C., Sahn, K. and Jorgensen, B.B. (1999). Psychrophilic sulfate-reducing bacteria isolated from permanently cold arctic marine sediments: description of *Desulfofrigus oceanense* gen. nov., sp. nov., *Desulfofrigus fragile* sp. nov., *Desulfofaba gelida* gen. nov., sp. nov., *Desulfotalea psychrophila* gen. nov., sp. nov. and *Desulfotalea arctica* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **49**: 1631-1643.

Konsinska, K. and Miskiewicz, T. (1997). Degradation of organic substances by *Desulfovibrio desulfuricans* in liquid manure from industrial pig farming. *Biotechnology Letters*. **19**: (6), 515-519.

Koyano, S., Tatsuno, K., Okazaki, M., Ohkusu, K., Sasaki, T., Saito, R., Okugawa, S. and Moriya, K. (2015). A case of liver abscess with *Desulfovibrio desulfuricans* bacteremia. *Case Reports in Infectious Diseases*. ID 354168, 1-4.

Kuever, J. (2014). The Family *Desulfovibrionaceae*. In: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. 2014. The Prokaryotes. Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria. Fourth Edition. Springer-Verlag. Berlin, 107-133.

Kuever, J., Rainey, F.A. and Widdel, F. (2005). Family I. *Desulfovibrionaceae*. In: Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., Garrity, G.M. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition. Volume Two. Part C. Springer. USA, 926-943.

Kuhnigk, T., Branke, J., Krekeler, D., Cypionka, H. and König, H. (1996). A feasible role of sulfate-reducing bacteria in the termite gut. *Systematic and Applied Microbiology*. **19**: 139-149.

Kurokawa, K., Itoh, T., Kuwahara, T., Oshima, K., Toh, H., Toyoda, A., Takami, H., Morita, H., Sharma, V.K., Srivastava, P., Taylor, T.D., Noguchi, H., Mori, H., Ogura, Y., Ehrlich, D. S., Itoh, K., Takagi, T., Sakari, Y., Hayashi, T. and Hattori, M. (2007). Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Research*. **14**: 169-181.

La Scola, B. and Raoult, D. (1999). Third human isolated of a *Desulfovibrio* sp. Identical to the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis*. *Journal of Clinical Microbiology*. **37**: (9), 3076-3077.

Langendijk-Genevaux, P.S., Grimm, W-D. and van der Hoeven, J.S. (2001a). Sulfate-reducing bacteria in relation with other potential periodontal pathogens. *Journal of Clinical Periodontology*. **28**: 1151-1157.

Langendijk, P.S., Hagemann, J. and van der Hoeven, J.S. (1999). Sulfate-reducing bacteria in periodontal pockets and healthy oral sites. *Journal of Clinical Periodontology*. **26**: 596-599.

Langendijk, P.S., Hanssen, J.T.J. and van der Hoeven, J.S. (2000). Sulfate-reducing bacteria in association with human periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. **27**: 943-950.

Langendijk-Genevaux, P.S., Hanssen, J.T.J. and van der Hoeven, J.S. (2001b). Decrease of sulfate-reducing bacteria after initial periodontal treatment. *Journal of Dental Research*. **80**: 1637-1642.

Langendijk, P.S., Kulik, E.M., Sandmeier, H., Meyer, J. and van der Hoeven, J.S. (2001c). Isolation of *Desulfomicrobium orale* sp. nov. and *Desulfovibrio* strain NY682, oral sulfate-reducing bacteria involved in human periodontal disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **51**: 1035-1044.

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. and Higgins, D.G. (2007). ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics*. **23**: (21) 2947-2948.

Levett, P.N. (1990). Anaerobic bacteria. A functional biology. Open University Press. Philadelphia. USA.

Li, Q. and Zhou, J.M. (2016). The microbiota-gut-brain axis and its potential therapeutic role in autism spectrum disorder. *Neuroscience*. **324**: 131-139.

Li, W.C. and Tse, H.F. (2015). Health risk and significance of mercury in the environment. *Environmental Science and Pollution Research*. **22**: 192-201.

Liderot, K., Larsson, M., Borang, S. and Ozenci, V. (2010). Polymicrobial bloodstream infection with *Eggerthella lenta* and *Desulfovibrio desulfuricans*. *Journal of Clinical Microbiology*. **48**: (10), 3810-3812.

Li, Z., Zhang, Z., Xu, Ch., Zhao, J., Liu, H., Fan, Z., Yang, F., Wright, A.D.G. and Li, G. (2014). Bacteria and methanogens differ along the gastrointestinal tract of Chinese roe deer (*Capreolus pygargus*). *PLoS ONE*. **9**: (12), e114513.

Lin, C., Raskin, L. and Stahl, D.A. (1997). Microbial community structure in gastrointestinal tracts of domestic animals: comparative analyses using rRNA-targeted oligonucleotide probes. *FEMS Microbiology Ecology*. **22**: 281-294.

Linden, D.R. (2014). Hydrogen sulfide signaling in the gastrointestinal tract. *Antioxidants & Redox Signaling*. **20**: (5), 818-830.

Ljungdahl, L.G., Adams, M.W., Barton, L.L., Ferry, J.G. and Johnson, M.K. (2003). Biochemistry and physiology of anaerobic bacteria. Springer. New York. USA.

Lobo, S.A.L., Warren, M.J. and Saraiva, L.M. (2012). Sulfate-reducing bacteria reveal a new branch of tetrapyrrole metabolism. *Advances in Microbial Physiology*. **61**: (7), 267-295.

Loubinoux, J., Bisson-Boutelliez, C., Miller, N. and Le Faou, A.E. (2002a). Isolation of the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis* from human periodontal pockets. *Oral Microbiology Immunology*. **17**: 321-323.

Loubinoux, J., Bronowicki, J.P., Pereira, I.A.C., Mouguel, J.L. and Le Faou, A.E. (2002b). Sulfate-reducing bacteria in human feces and their association with inflammatory bowel diseases. *FEMS Microbiology Ecology*. **40**: 107-112.

Loubinoux, J., Jaulhac, B., Piemont, Y., Monteil, H. and Le Faou, A.E. (2003). Isolation of sulfate-reducing bacteria from human thoracoabdominal pus. *Journal of Clinical Microbiology*. **41**: (3), 1304-1306.

Loubinoux, J., Mory, F., Pereira, I.A.C. and Le Faou, A.E. (2000). Bacteremia caused by a strain of *Desulfovibrio* related to the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis*. *Journal of Clinical Microbiology*. **38**: (2), 931-934.

Lozniewski, A., Labia, R., Haristoy, X. and Mory, F. (2001). Antimicrobial susceptibilities of clinical *Desulfovibrio* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **45**: (10), 2933-2935.

Lozniewski, A., Maurer, P., Schuhmacher, H., Carlier, J.P. and Mory, F. (1999). First isolation of *Desulfovibrio* species as part of a polymicrobial infection from a brain abscess. *European Journal Clinical of Microbiology and Infectious Diseases*. **18**: 602-603.

MacFabe, D.F., Rodríguez-Capote, K., Hoffman, J.E., Franklin, A.E., Mohammad-Asef, Y., Roy Taylor, A., Boon, F. and Cain, D.P. (2008). A novel rodent model of autism: intraventricular infusions of propionic acid increase locomotor activity and induce neuroinflammation and oxidative stress in discrete regions of adult rat brain. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. **4**: (2), 146-166.

Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. (2004). Brock. Biología de los microorganismos. Pearson educación. (Madrid).

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A. and Clark, D.P. (2012). Brock Biology of Microorganisms. 13th Edition. Pearson Education. San Francisco. California. USA.

Mafra, D., Barros, A.F. and Fouque, D. (2013). Dietary protein metabolism by gut microbiota and its consequences for chronic kidney disease patients. *Future Microbiology*. **8:** (10), 1317-1323.

Magee, E.A., Richardson, C.J., Hughes, R. and Cummings, J.H. (2000). Contribution of dietary protein to sulfide production in the large intestine: an in vitro and a controlled feeding study in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **72:** 1488-1494.

Martín-Gómez, M. and Ballesteros-González, M. (2010). Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores. En: Ortega-Ortiz F. (Eds). *Biomarcadores: analítica, diagnóstico y terapéutica*. Monografía XXX de la Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 113-168.

Martínez-Lobo, F.J., Hidalgo, Á., García, M., Argüello, H., Naharro, G., Carvajal, A. and Rubio, P. (2013). First identification of "*Brachyspira hamptonii*" in wild European waterfowl. *PLoS ONE*. **8:** (12), e82626.

McDougall, R., Robson, J., Paterson, D. and Tee, W. (1997). Bacteremia caused by a recently described novel *Desulfovibrio* species. *Journal of Clinical Microbiology*. **35:** (7), 1805-1808.

McOrist, S., Gebhart, C.J., Boid, R. and Barns, S.M. (1995). Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov., sp. nov., the obligately intracellular bacterium of porcine proliferative enteropathy. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **45:** (4), 820-825.

Mergler, D., Anderson, H.A., Chan, L.H. M., Mahaffey, K.R., Murray, M., Sakamoto, M. and Stern, A.H. (2007). Methylmercury exposure and health effects in humans: a worldwide concern. *Journal of the Human Environment*. **36:** (1), 3-11.

Miller, C.S., Foley, J.D., Bailey, A.L., Campell, C.L., Humphries, R.L., Christodoulides, N., Floriano, P.N., Simmons, G., Bhagwandin, B., Jacobson, J.W., Redding, S.W., Ebersole, J.L. and McDevitt, J.T. (2010). Current developments in salivary diagnostics. *Biomarkers in Medicine*. **4:** (1), 171-189.

Moore, W.E. and Moore, L.V. (1994). The bacteria of periodontal diseases. *Periodontology 2000*. **5:** 66-77.

Morin, A.S., Poirel, L., Mory, F., Labia, R. and Nordmann, P. (2002). Biochemical-genetic analysis and distribution of DES-1, and ambler class A extended-spectrum β -lactamase from *Desulfovibrio desulfuricans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **46:** (10), 3215-3222.

Nakano, M. and Zuber, P. (2004). Strict and facultative anaerobes. Medical and environmental aspects. Horizon bioscience. Norfolk. England.

Nakao, K., Tanaka, K., Ichiishi, S., Mikamo, H., Shibata, T. and Watanabe, K. (2009). Susceptibilities of 23 *Desulfovibrio* isolates from human. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **53:** (12), 5308-5311.

Nomura F. (2015). Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): a revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1854:** (6) 528-537.

Olson, L.D. (1974). Clinical and pathological observations on the experimental passage of swine dysentery. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. **38:** (1) 7-13.

Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). (2015). Lista de agentes antimicrobianos de importancia para la medicina veterinaria. Disponible en: <http://goo.gl/cUHjy3>.

Palomo, G. (2011). Resistencia a los antimicrobianos en cepas de *Salmonella enterica* de origen animal. *Tesis Doctoral*, Universidad de Extremadura.

Parey, K., Fritz, G., Ermier, U. and Kroneck, P.M.H. (2013). Conserving energy with sulfate around 100 °C – structure and mechanism of key metal enzymes in hyperthermophilic *Archaeoglobus fulgidus*. *Metallomics*. **5**: 302-317.

Parks, J.M., Johs, A., Podar, M., Bridou, R., Hurt Jr, R.A., Smith, S.D., Tomanicek, S.J., Qian, Y., Brown, S.D., Brandt, C.C., Palumbo, A.V., Smith, J.C., Wall, J.D., Elias, D.A. and Liang, L. (2013). The genetic basis for bacterial mercury methylation. *Science*. 339: 1332-1335.

Patel, R. (2015). MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clinical Chemistry*. **61**: (1), 100-111.

Pimentel, J.D. and Chan, R.C. (2007). *Desulfovibrio fairfieldensis* bacteremia associated with choledocholithiasis and endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Journal of Clinical Microbiology*. **45**: (8), 2747-2750.

Píriz, S. (1989). Estudio microbiológico del pederro caprino en la provincia de Cáceres. *Tesis Doctoral*, Universidad de Extremadura.

Pitcher, M.C.L., Beatty, E.R. and Cummings, J.H. (2000). The contribution of sulphate reducing bacteria and 5-aminosalicylic acid to faecal sulphide in patients with ulcerative colitis. *Gut*. **46**: 64-72.

Porschen, R.K. and Chan, P. (1977). Anaerobic vibrio-like organisms cultured from blood: *Desulfovibrio desulfuricans* and *Succinivibrio* species. *Journal of Clinical Microbiology*. **5**: (4), 444-447.

Postgate, J.R. (1979). The sulphate-reducing bacteria. Cambridge University Press. New York. USA.

Prohaska, S., Pflüger, V., Ziegler, D., Scherrer, S., Frei, D., Lehmann, A., Wittenbrink, M.M. and Huber, H. (2014). MALDI-TOF MS for identification of porcine *Brachyspira* species. *Letters in Applied Microbiology*. **58**: (3), 292-298.

Rajilic´-Stojanovic´, M. and de Vos, W.M. (2014). The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiology Reviews*. **38**: 996-1047.

Råsbäck, T., Jansson, D.S., Johansson, K.-E. and Fellström, C. (2007). A novel enteropathogenic, strongly haemolytic spirochaete isolated from pig and mallard, provisionally designated "*Brachyspira suanatina*" sp. nov. *Environmental Microbiology*. **9**: (4) 983-991.

Ratray, R.M. and Craig, A.M. (2007). Molecular characterization of sheep ruminal enrichments that detoxify pyrrolizidine alkaloids by denaturing gradient gel electrophoresis and cloning. *Microbial Ecology*. **54**: 264-275.

Rettinger, A., Krupka, I., Grünwald, K., Dyachenko, V., Fingerle, V., Konrad, R., Raschel, H., Busch, U., Sing, A., Straubinger, R.K. and Huber, I. (2012). *Leptospira* spp. strain identification by MALDI TOF MS is an equivalent tool to 16S rRNA gene sequencing and multi locus sequence typing (MLST). *BMC Microbiology*. **12**: 185-185.

Rey, F.E., González, M.D., Meng Wu, J.Ch., Ahern, P.P. and Gordon, J.I. (2013). Metabolic niche of a prominent sulfate-reducing human gut bacterium. *PNAS*. **110**: (33), 13582-13587.

Rhouma, M., Beaudry, F., Thériault, W. and Letellier. A. (2016). Colistin in Pig Production: Chemistry, Mechanism of Antibacterial Action, Microbial Resistance Emergence, and One Health Perspectives. *Frontiers in Microbiology*. **7**:1789.

Robichaux, M., Howell, M. and Boopathy, R. (2003). Growth and activities of sulfate-reducing and methanogenic bacteria in human oral cavity. *Current Microbiology*. **47**: 12-16.

Rodrigues Hoffmann, A., Proctor, L.M. and Surette, M.G. (2016). The microbiome: the trillions of microorganisms that maintain health and cause disease in humans and companion animals. *Veterinary Pathology*. **53**: (1), 10-21.

Roediger, E.W., Duncan, A., Kapaniris, O. and Millard, S. (1993). Reducing sulfur compounds of the colon impair colonocyte nutrition: implications for ulcerative colitis. *Gastroenterology*. **104**: 802-809.

Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E. and Thompson, F. (2014). The Prokaryotes. Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria. Fourth Edition. Springer-Verlag. Berlin.

Rothkamp, A., Strommenger, B. and Gerlach, G.-F. (2002). Identification of *Brachyspira hyodysenteriae*-specific DNA fragments using representational difference analysis. *FEMS Microbiology Letters*. **210**: (2) 173-179.

Saffert, R.T., Cunningham, S.A., Ihde, S.M., Jobe, K.E.M., Mandrekar, J. and Patel, R. (2011). Comparison of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometer to BD Phoenix automated microbiology system for identification of Gram-negative bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*. **49**: (3) 887-892.

San Juan, C. (2015). Género *Brachyspira* en cerdo ibérico y jabalí. *Tesis Doctoral*, Universidad de Extremadura.

Sambrook, J. and Rusell, D.W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. (New York).

Scanlan, P.D., Shanahan, F. and Marchesi, J.R. (2009). Culture-independent analysis of desulfovibrios in the human distal colon of healthy, colorectal cancer and polypectomized individuals. *FEMS Microbiology Ecology*. **69**: 213-221.

Scheuhammer, A.M., Meyer, M.W., Sandheinrich, M.B. and Murray, M.W. (2007). Effects of environmental methylmercury on the health of wild birds, mammals and fish. *Journal of the Human Environment*. **36**: (1), 12-19.

Schmitt, B.H, Cunningham, S.A, Dailey, A.L, Gustafson, D.R and Patel, R. (2013). Identification of anaerobic bacteria by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with on-plate formic acid preparation. *Journal of Clinical Microbiology*. **51:** (3), 782-6.

Schoenborn, L., Abdollahi, H., Tee, W., Dyall-Smith, M. and Janssen, P.H. (2001). A member of the delta subgroup of proteobacteria from a pyogenic liver abscess is a typical sulfate reducer of the genus *Desulfovibrio*. *Journal of Clinical Microbiology*. **39:** (2), 787-790.

Schulthess, B., Brodner, K., Bloemberg, G.V., Zbinden, R., Böttger, E.C. and Hombach, M. (2013). Identification of Gram-positive cocci by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: comparison of different preparation methods and implementation of a practical algorithm for routine diagnostics. *Journal of Clinical Microbiology*. **51:** (6) 1834-1840.

Seng P., Drancourt M., Gouriet F., La Scola B., Fournier P.-E., Rolain J.M. and Raoult D. (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Infectious Diseases*. **49:** (4) 543-551.

Sherry, A., Gray, N.D., Ditchfield, A.K., Aitken, C.M., Jones, D.M., Roling, W.F.M., Hallmann, C., Larter, S.R., Bowler, B.F.J. and Head, I.M. (2013). Anaerobic biodegradation of crude oil under sulphate-reducing conditions leads to only modest enrichment of recognized. *International Biodeterioration & Biodegradation*. **81:** 105-113.

Shao, D., Kang, Y., Wu, S. and Wong, M.H. (2012). Effects of sulfate reducing bacteria and sulfate concentrations on mercury methylation in freshwater sediments. *Science of the Total Environment*. **424:** 331-336.

Shukla, S.K. and Reed, K.D. (2000). *Desulfovibrio desulfuricans* bacteremia in a dog. *Journal of Clinical Microbiology*. **38:** (4), 1701-1702.

Smith, S.D., Bridou, R., Johs, A., Parks, J.M., Elías, D.A., Hurt, R.A., Brown, S.D., Podar, M. and Wall, J.D. (2015). Site-directed mutagenesis of HgcA and HgcB reveals amino acid residues important for mercury methylation. *Applied and Environmental Microbiology*. **81:** (9), 3205-3217.

Socransky, S.S. and Haffajee, A.D. (1997). The nature of periodontal diseases. *Annals of Periodontology*. **2:** 3-10.

Songer, J.G. and Harris, D.L. (1978). Transmission of swine dysentery by carrier pigs. *American Journal of Veterinary Research*. **39:** (6) 913-916.

Stanton, T. B. and Jensen, N. S. (1993). Purification and characterization of NADH oxidase from *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*. *Journal of Bacteriology*. **175:** 2980-2987.

Stanton, T. B., Rosey, E. L., Kennedy, M. J., Jensen, N. S. and Bosworth, B. T. (1999). Isolation, oxygen sensitivity, and virulence of NADH oxidase mutants of the anaerobic spirochete *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*, etiologic agent of swine dysentery. *Applied and Environmental Microbiology*. **65:** 5028-5034.

Stephan, R., Ziegler, D., Pflüger, V., Vogel, G. and Lehner, A. (2010). Rapid genus- and species-specific identification of *Cronobacter* spp. by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. **48:** (8), 2846-2851.

Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. (2012). The human microbiome project consortium. *Nature*. **486:** 207-2014.

Sungur, E.I. and Cotuk, A. (2005). Characterization of sulfate reducing bacteria isolated from cooling towers. *Environmental Monitoring and Assessment*. **104:** 211-219.

Tanamachi, C., Hoyama, T., Wada, A. and Sagawa, K. (2011). A case of *Desulfovibrio desulfuricans* cultured from blood in Japan. Rinsho byori. *The Japanese journal of clinical pathology*. **59(5)**, 466-469.

Tee, W., Dyall-Smith, M., Woods, W. and Eisen, D. (1996). Probable new species of *Desulfovibrio* isolated from a pyogenic liver abscess. *Journal of Clinical Microbiology*. **34:** (7), 1760-1764.

Tran, C.M., Tanaka, K. and Watanabe, K. (2013). PCR-based detection of resistance genes in anaerobic bacteria isolated from intra-abdominal infections. *Journal of Infection and Chemotherapy*. **19:** (2), 279-90.

Tremlett, H., Fadrosch, D.W., Faruqi, A.A., Zhu, F., Hart, J., Roalstad, S., Graves, J., Lynch, S. and Waubant, E. (2016). Gut microbiota in early pediatric multiple sclerosis: a case-control study. *European Journal of Neurology*. **0:** 1-14.

Urata, T., Kikuchi, M. and Hino, T. (2008). Bacteremia caused by *Desulfovibrio fairfieldensis*. *Journal of Infection and Chemotherapy*. **14:** 368-370.

Vadillo, S., Píriz, S. and Mateos, E. (2002). Manual de microbiología veterinaria. McGraw-Hill. Interamericana. Madrid.

Van der Hoeven, J.S., van der Kieboom, C.W.A. and Schaeken, M.J. (1995). Sulfate-reducing bacteria in the periodontal pocket. *Oral Microbiology and Immunology*. **10:** 288-290.

van Veen, S.Q., Claas, E.C.J. and Kuijper, E.J. (2010). High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*. **48:** (3) 900-907.

Vasoo, S., Mason, E.L., Gustafson, D.R., Cunningham, S.A., Cole, N.C., Vetter, E.A., Steinmann, S.P., Wilson, W.R., Patel, R., Berbari, E.F. and Henry, N.K. (2014). *Desulfovibrio legallii* prosthetic shoulder joint infection and a review of antimicrobial susceptibility and clinical characteristics of *Desulfovibrio* infections. *Journal of Clinical Microbiology*. **52:** (8), 3105-3110.

Vázquez, M. and Martín, E. (1999). La búsqueda de vida extraterrestre. Serie McGraw-Hill de divulgación científica. McGraw-Hill. Madrid.

Verstreken, I., Laleman, W., Wauters, G. and Verhaegen, J. (2012). *Desulfovibrio desulfuricans* bacteremia in an immunocompromised host with a liver graft and ulcerative colitis. *Journal of Clinical Microbiology*. **50:** (1), 199-201.

Vianna, M.E., Holtgraewe, S., Seyfarth, I., Conrads, G. and Horz, H.P. (2008). Quantitative analysis of three hydrogenotrophic microbial groups, methanogenic archaea, sulfate-reducing bacteria, and acetogenic bacteria, within plaque biofilms associated with human periodontal disease. *Journal of Bacteriology*. **190:** (10), 3779-3785.

Vipperla, K. and O'Keefe, S.J. (2013). Intestinal microbes, diet, and colorectal cancer. *Current Colorectal Cancer Reports*. **9:** 95-105.

Viehman, S., Mills, D.K., Meichel, G.W. and Richardson, L.L. (2006). Culture and identification of *Desulfovibrio* spp. from corals infected by black disease on Dominican and Florida Keys reefs. *Diseases of Aquatic Organisms*. **69:** 119-127.

Vita, N., Valette, O., Brasseur, G., Lignon, S., Denis, Y., Ansaldi, M., Dolla, A. and Pieulle, L. (2015). The primary pathway for lactate oxidation in *Desulfovibrio vulgaris*. *Frontiers in Microbiology*. **6:** (606), 1-15.

Wallace, J.L. (2010). Physiological and pathophysiological roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract. *Antioxidants and Redox Signaling*. **12:** (9), 1125-1133.

Warneke, H.L., Kinyon, J.M., Bower, L.P., Burrough, E.R. and Frana, T.S. (2014). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for rapid identification of *Brachyspira* species isolated from swine, including the newly described "*Brachyspira hamptonii*". *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. **26:** (5) 635-639.

Warren, Y.A., Citron, D.M., Vreni Merriam, C. and Goldstein, E.J.C. (2005). Biochemical differentiation and comparison of *Desulfovibrio* species and other phenotypically similar genera. *Journal of Clinical Microbiology*. **43:** (8), 4041-4045.

Weglarz, L., Dzierzewicz, Z., Orchel, A., Szczerba, J., Jaworska-Kik, M. and Wilczok, T. (2003a). Biological activity of *Desulfovibrio desulfuricans* lipopolysaccharides evaluated via interleukin-8 secretion by Caco-2 cells. *Journal of Gastroenterology*. **38**: 73-79.

Weglarz, L., Dzierzewicz, Z., Skop, B., Orchel, A., Parfiniewicz, B., Wisniowska, B., Swiatkowska, L. and Wilczok, T. (2003b). *Desulfovibrio desulfuricans* lipopolysaccharides induce endothelial cell IL-6 and IL-8 secretion and E-selectin and VCAM-1 expression. *Cellular and Molecular Biology Letters*. **8**: 991-1003.

Weglarz, L., Parfiniewicz, B., Mertas, A., Kondera-Anasz, Z., Jaworska-Kik, M., Dzierzewicz, Z. and Swiatkowska, L. (2006). Effect of endotoxins isolated from *Desulfovibrio desulfuricans* soil and intestinal strain on the secretion of TNF- α by human mononuclear cells. *Polish Journal of Environmental Studies*. **15**: (4), 615-622.

Whipp, S.C., Robinson, I.M., Harris, D.L., Glock, R.D., Matthews, P.J. and Alexander, T.J. (1979). Pathogenic synergism between *Treponema hyodysenteriae* and other selected anaerobes in gnotobiotic pigs. *Infection and Immunity*. **26**: 1042-1047.

Wildschut, J.N., Caffrey, S.M., Voordouw, J.K. and Voordouw, G. (2012). Oxygen exposure increases resistance of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough to killing by hydrogen peroxide. *Antonie van Leeuwenhoek*. **101**: 303-311.

Willis, C.L., Gibson, G.R., Allison, C., Macfarlane, S. and Holt, J.S. (1995). Growth, incidence and activities of dissimilatory sulfate-reducing bacteria in the human oral cavity. *FEMS Microbiology Letters*. **129**: 267-272.

Wolny, D., Lodowska, J., Jaworska-Kik, M., Kurkiewicz, S., Weglarz, L. and Dzierzewicz, Z. (2011). Chemical composition of *Desulfovibrio desulfuricans* lipid A. *Archives of Microbiology*. **193**: 15-21.

Xie, G., Wang, X., Liu, P., Wei, R., Chen, W., Rajani, C., Hernández, B.Y., Alegado, R., Dong, B., Li, D. and Jia, W. (2016). Distinctly altered gut microbiota in the progression of liver disease. *Oncotarget*. **7**: (15), 19355-19366.

Yarandi, S.S., Peterson, D.A., Treisman, G.J., Moran, T.H. and Pasricha, P.J. (2016). Modulatory effects of gut microbiota on the central nervous system: how gut could play a role in neuropsychiatric health and diseases. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*. **22:** (2), 201-212.

Yurkiw, M.A., Voordouw, J. and Voordouw, G. (2012). Contribution of rubredoxin: oxygen oxidoreductases and hybrid cluster proteins of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough to survival under oxygen and nitrite stress. *Environmental Microbiology*. **14:** (10), 2711-2725.

Zhang-Sun, W., Augusto, L.A., Zhao, L. and Caroff, M. (2015). *Desulfovibrio desulfuricans* isolates from the gut of a single individual: structural and biological lipid A characterization. *FEBS Letters*. **589:** 165-171.

Zhao, Ch., Gao, Z., Qin, Q., Li, F. and Ruan, L. (2012). *Desulfobaculum xiamenensis* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Desulfovibrionaceae* isolated from marine mangrove sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **62:** 1570-1575.

Zhao, X., Rockne, K.J., Drummond, J.L., Hurley, R.K., Shade, C.W. and Hudson, R.J.M. (2008). Characterization of methyl mercury in dental wastewater and correlation with sulfate-reducing bacterial DNA. *Environmental Science and Technology*. **42:** 2780-2786.

Zinkevich, V. and Beech, I.B. (2000). Screening of sulfate-reducing bacteria in colonoscopy samples from healthy and colitic human gut mucosa. *FEMS Microbiology Ecology*. **34:** 147-155.

ANEXOS

9. ANEXOS.

1. Tabla de caracterización del cepario.
2. Tabla de caracterización de las cepas de colección.

Tabla de caracterización del cepario.

CEPA	ORIGEN	LUGAR	FECHA	RAZA	EDAD	RÉGIMEN	MUESTRA	Nº	BRACHYSPIRA	PRUEBAS BIOQUÍMICAS										PCR	MALDI TOF		CMI					PERFIL IS		PERFIL AMR	
										Desulfoviridin test	Catalasa	Spot indol	Nitratos	Urea	SIM	Creci en 20% de Bilis	Movilidad	Vancomicina	Kanamicina		Colistina	Puntuación	Identificación	AMX	AMC	CTX	CIP	CLI	IMI		MTZ
DS 1	Victor	SALAMANCA	17/11/2011	IBÉRICO	4 meses	extensivo	heces	1	<i>B.pilosicoli</i>	+	+	-	-	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>	2,53	<i>D.fairfieldensis</i>	4	1	4	4	4	0,03	0,5	CIP-IMI	
DS 2	Victor	SALAMANCA	25/11/2011	IBÉRICO	3 meses	extensivo	intestino grueso	2	<i>B. murdochii</i>	+	+	-	-	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>	2,549	<i>D.fairfieldensis</i>	4	1	8	8	4	0,03	0,13	CIP-IMI	
DS 4	Victor	SALAMANCA	07/06/2011	IBÉRICO	4 meses	extensivo	heces	2	<i>B.hyodysenteriae</i>	+	-	-	+	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>	2,569	<i>D.fairfieldensis</i>	8	0,25	4	2	4	0,03	0,25	AMX-IMI	
DS 6	Victor	BARCELONA	18/01/2012	BLANCO	3 meses	intensivo	heces	2	<i>B.intermedia</i>	+	+	-	-	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>	2,485	<i>D.fairfieldensis</i>	4	1	8	4	4	0,03	0,25	CIP	
DS 7	Segovia	MURCIA	03/02/2012	BLANCO	2 meses	intensivo	heces	3	<i>B. sp.</i>	+	+	-	-	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>	2,517	<i>D.fairfieldensis</i>	4	1	4	4	4	0,03	0,5	CIP	
DS 8	Larrasa	HUELVA	03/02/2012	IBÉRICO	2 meses	extensivo	heces	1	<i>B.innocens</i>	+	+	-	-	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>	2,51	<i>D.fairfieldensis</i>	4	1	8	16	4	0,03	1	IMI	CIP
DS 9	Victor	MURCIA	08/02/2012	BLANCO	3 meses	intensivo	heces	1	<i>B. sp.</i>	+	+	-	-	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>	2,609	<i>D.fairfieldensis</i>	8	1	4	2	4	0,03	2		
DS 10	Victor	SALAMANCA	09/03/2012	BLANCO	3-4 meses	intensivo	heces	1	<i>B. sp.</i>	+	+	-	-	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>			4	1	16	16	4	0,06	0,5	CTX-IMI	CIP
DS 11	Victor	SALAMANCA	08/06/2011	BLANCO	2-3 meses	intensivo	heces	5	<i>B.pilosicoli</i>	+	-	-	-	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>	2,334	<i>D.fairfieldensis</i>	8	1	4	8	4	0,03	1	CIP	
DS 12	Victor	MURCIA	14/03/2012	BLANCO	3 meses	intensivo	heces	1	<i>B. hyodysenteriae</i>	+	+	-	-	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>	2,633	<i>D.fairfieldensis</i>	8	2	4	16	4	0,06	4	AMC-IMI	CIP-MTZ
DS 13	Segovia	SEGOVIA	20/05/2012	BLANCO	2-3 meses	intensivo	heces	2	<i>B. sp.</i>	+	+	-	-	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>	2,463	<i>D.fairfieldensis</i>	8	1	8	1	0,5	0,03	2		
DS 14	Segovia	SEGOVIA	18/05/2012	BLANCO	madre	intensivo	heces	6	<i>B.hyodysenteriae</i>	+	+	-	-	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>	2,608	<i>D.fairfieldensis</i>	8	2	16	2	1	0,03	1	AMC-CTX	
DS 15	Victor	BARCELONA	26/05/2012	BLANCO	3 meses	intensivo	heces	1	<i>B.innocens</i>	+	+	-	-	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>	2,569	<i>D.fairfieldensis</i>	1	0,25	8	2	0,13	0,03	2		
DS 16	Victor	SALAMANCA	25/05/2012	BLANCO	adulto	intensivo	heces	3	<i>B.murdochii</i>	+	+	-	-	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>	2,68	<i>D.fairfieldensis</i>	4	2	8	0,5	0,13	0,06	4	AMC-IMI	MTZ
DS 17	Victor	MURCIA	30/05/2012	BLANCO	madre	intensivo	heces	1	<i>B.hyodysenteriae</i>	+	+	-	-	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>	2,515	<i>D.fairfieldensis</i>	2	0,25	8	2	0,13	0,03	2		
DS 18	Victor	MURCIA	30/05/2012	BLANCO	2,5 meses	intensivo	heces	1	<i>B. sp.</i>	+	+	-	-	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>			8	1	16	1	0,5	0,03	2	CTX	
DS 19	Victor	SALAMANCA	29/06/2012	IBÉRICO	adulto	extensivo	heces	1	<i>B.hyodysenteriae</i>	+	+	-	+	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>	2,318	<i>D.fairfieldensis</i>	2	0,25	8	2	1	0,03	0,5		
DS 21	Segovia	BADAJOS	10/10/2012	BLANCO	adulto	intensivo	heces	2	<i>B.hyodysenteriae</i>	+	+	-	-	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>	2,654	<i>D.fairfieldensis</i>	8	1	8	0,5	0,5	0,03	1		
DS 23	Segovia	GRANADA	01/10/2012	BLANCO	adulto	intensivo	heces	4	<i>B. sp.</i>	+	+	-	-	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>	2,66	<i>D.fairfieldensis</i>	2	0,25	8	2	0,25	0,03	0,5		
DS 24	Segovia	CUENCA	15/12/2012	BLANCO	3 meses	intensivo	heces	2	<i>B.pilosicoli</i>	+	+	-	-	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>	2,556	<i>D.fairfieldensis</i>	4	1	8	1	0,25	0,03	2		
DS 25	Victor	SALAMANCA	14/01/2013	IBÉRICO	madre	extensivo	heces	3	<i>B.hyodysenteriae</i>	+	+	-	-	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>	2,702	<i>D.fairfieldensis</i>	1	1	16	2	0,25	0,03	2	CTX-IMI-MTZ	
DS 26	Segovia	TOLEDO	20/03/2013	BLANCO	2,5 meses	intensivo	heces	2	<i>B. murdochii</i>	+	-	-	-	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>	2,586	<i>D.fairfieldensis</i>	1	1	8	0,3	1	0,03	1		
DS 28	Segovia	SEGOVIA	01/11/2013	BLANCO	3 meses	intensivo	heces	2	<i>B.innocens</i>	+	+	+	-	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>			8	0,5	4	2	0,25	0,03	1		
DS 29	Segovia	BADAJOS	04/04/2014	BLANCO	adulto (2 años)	intensivo	heces	8	<i>B. sp.</i>	+	+	-	-	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>	2,636	<i>D.fairfieldensis</i>	2	0,25	4	0,5	0,13	0,03	2		
DS 30	M.A. Hurtado	CÁCERES	25/04/2014	IBÉRICO&DUROC	2 meses	semiextensivo	heces	5	<i>B. innocens</i>	+	+	-	-	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>	2,511	<i>D.fairfieldensis</i>	1	0,5	4	0,3	0,25	0,03	1	IMI	
DS 31	M.A. Hurtado	CÁCERES	25/04/2014	IBÉRICO&DUROC	2 meses	semiextensivo	heces	5	<i>murdochii</i>	+	+	-	-	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>	2,616	<i>D.fairfieldensis</i>	1	0,5	4	0,3	0,5	0,03	1	IMI	
DS 32	M.A. Hurtado	CÁCERES	12/05/2014	IBÉRICO&DUROC	3-4 meses	semiextensivo	heces	11	<i>B.pilosicoli</i>	+	+	-	-	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>	2,653	<i>D.fairfieldensis</i>	2	0,5	4	0,3	0,13	0,03	1	IMI	
DS 33	M.A. Hurtado	CÁCERES	12/05/2014	IBÉRICO&DUROC	3-4 meses	semiextensivo	heces	11	<i>B.intermedia</i>	+	+	-	-	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>	2,568	<i>D.fairfieldensis</i>	0,5	0,5	4	0,3	0,25	0,03	1	IMI	
DS 34	M.A. Hurtado	CÁCERES	12/05/2014	IBÉRICO&DUROC	3-4 meses	semiextensivo	heces	11	<i>B.intermedia</i>	+	+	-	-	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>	2,599	<i>D.fairfieldensis</i>	1	0,5	8	0,5	0,25	0,03	1	IMI	
DS 35	M.A. Hurtado	CÁCERES	16/06/2014	IBÉRICO	4 meses	extensivo	heces	9	<i>B.hyodysenteriae</i>	+	+	-	-	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>	2,566	<i>D.fairfieldensis</i>	8	1	16	1	1	0,03	0,5	AMX-CTX-IMI	
DS 36	Segovia	SEGOVIA	18/01/2015	BLANCO	adulto	intensivo	heces	5	<i>B.innocens</i>	+	+	-	-	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>	2,507	<i>D.fairfieldensis</i>	8	0,25	8	1	0,13	0,03	1		
DS 37	Victor	SALAMANCA	30/10/2015	BLANCO	2,5 años	intensivo	heces	3	<i>B.hyodysenteriae</i>	+	+	-	-	-	+	+	R	S	R	<i>D.fairfieldensis</i>	2,632	<i>D.fairfieldensis</i>	2	0,25	8	0,5	0,13	0,03	0,25		
DS 38	Victor	SALAMANCA	15/11/2015	IBÉRICO	madre	extensivo	heces	7	<i>B. hyodysenteriae</i>	+	+	-	-	-	+	+	R	R	R	<i>D.fairfieldensis</i>	2,537	<i>D.fairfieldensis</i>	8	0,25	32	0,5	1	0,03	0,25	AMX-IMI	CTX

Tabla de caracterización de las cepas de colección.

CEPA	PRUEBAS BIOQUÍMICAS												CMI						PERFIL IS	PERFIL AMR	
	Desulfovirdin test	Catalasa	Spot indol	Nitratos	Urea	SIM	Creci en 20% de Bilis	Movilidad	Vancomicina	Kanamicina	Colistina	AMX	AMC	CTX	CIP	CLI	IMI	MTZ	>CMI75	≤CMI90	>CMI 90
<i>D. desulfuricans</i> subsp. <i>desulfuricans</i> DSMZ 6949	+	+	-	-	-	+	+	+	R	S	R	1	0,25	8	0,5	0,1	0,06	2		IMI	
<i>D. desulfuricans</i> subsp. <i>desulfuricans</i> DSMZ 642	+	-	-	+	-	+	+	+	R	S	R	1	0,25	16	0,5	0,3	0,06	2		CTX-IMI	
<i>D. fairfieldensis</i> ATCC 700045	+	+	-	-	-	+	+	+	R	S	R	1	0,125	8	0,5	1	0,06	2		IMI	
<i>D. legallii</i> DSMZ 19129	+	+	-	+	-	+	+	+	R	S	R	2	0,25	16	0,13	0,5	0,06	2		CTX-IMI	
<i>D. vulgaris</i> DSMZ 15375	+	+	-	+	-	+	+	+	R	S	R	0,5	0,25	32	0,13	0,5	0,06	2		IMI	CTX
<i>D. vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> DSMZ 644	+	-	+	-	-	+	+	+	S	S	R	1	0,125	32	0,5	0,5	0,06	2		IMI	CTX
<i>D. intestinalis</i> DSMZ 11275	+	-	-	-	-	+	+	+	R	S	R	0,5	0,25	32	0,5	0,3	0,06	4		IMI	CTX-MTZ