

19 Principales grupos de bacilos gramnegativos no exigentes

G. Algorta, F. Schelotto

Introducción

El gran grupo de bacilos Gram negativos no exigentes incluye diferentes familias y géneros, muchos de ellos muy frecuentes en patología médica. Comparten algunas características tales como poseer en su pared externa un lipopolisacárido (LPS), que les otorga características patogénicas particulares, tóxicas, la llamada endotoxina de las bacterias Gram negativas.

Muchos de ellos son ubicuos, encontrándose muy difundidos entre los animales y la naturaleza, pudiendo causar enfermedad en el hombre y los animales como es el caso de *Salmonella*; otros, aunque bien adaptados al medio ambiente, son patógenos humanos exclusivos, por ejemplo *Vibrio cholerae*; por último, otros se encuentran bien adaptados a su huésped, como por ejemplo *Shigella*. Algunos de estos bacilos Gram negativos poseen atributos de virulencia bien definidos, comportándose como patógenos primarios, *Yersinia pestis*, *Salmonella typhi*, responsables de la Peste y la Fiebre tifoidea respectivamente. Otros, tales como *Acinetobacter* y *Pseudomonas* producen infecciones oportunistas. Es de destacar que algunos de ellos, como *Escherichia coli*, forman parte de la flora normal del tubo digestivo y permanecen en él sin causar enfermedad, siempre y cuando no se modifiquen las condiciones de su hábitat.

En este capítulo se hará énfasis en aquellas familias, géneros y especies que se encuentran más frecuentemente relacionados con la patología humana.

Enterobacteriaceae

Esta familia comprende un número muy variado de géneros y especies bacterianos cuyo hábitat natural es el tubo digestivo del hombre y los animales. No todos los bacilos Gram negativos que tienen este hábitat forman parte de la familia *Enterobacteriaceae*. Se los encuentra en el suelo, agua, frutas, vegetales y otras plantas, y en los animales, desde los insectos al hombre. La familia está definida por un conjunto de características fenotípicas (bioquímicas, fisiológicas e inmunológicas) a las que se han agregado posteriormente otros elementos establecidos por técnicas de hibridación de ácidos nucleicos que miden distancias evolutivas y han definido mejor la interrelación de todos los microorganismos integrantes de la familia.

Son bacilos Gram negativos rectos, con un diámetro de 0.3 a 1.5 micras. Si son móviles, presentan flagelos peritricos. No forman esporos. Desarrollan en presencia o en ausencia de oxígeno (aerobios-anaerobios facultativos). Desarrollan rápidamente en medios simples, no siendo exigentes desde el punto de vista nutricional. Algunos desarrollan en glucosa como

única fuente de carbono, mientras otros requieren el agregado de vitaminas o minerales en el medio de cultivo. Son quimioorganotrofos, poseen metabolismo fermentativo y respiratorio. Son catalasa positivos y oxidasa negativos; reducen los nitratos a nitritos. El contenido de Guanina + Citosina del DNA total es de 38 a 60 moles %. En los medios de cultivo forman colonias lisas, convexas y circulares de bordes definidos. Algunas especies desarrollan colonias más mucoides que otras (por ejemplo *Klebsiella*).

CARACTERES BIOQUÍMICOS

Los bacilos Gram negativos que integran esta familia pueden identificarse por medio de la expresión fenotípica de algunos caracteres genéticos. Los métodos utilizados tienen como principio:

- La investigación de la fermentación de azúcares o alcoholes en un medio peptonado con el agregado de un indicador de pH para detectar la producción de metabolitos ácidos.
- La investigación de la utilización de un substrato como única fuente de C.
- La investigación de producción de ciertas enzimas sobre substratos generadores de color.
- La investigación de la producción de un metabolito, producto final característico de una vía metabólica.
- La investigación de la aptitud de desarrollar en presencia de un inhibidor.

CARACTERES ANTIGÉNICOS

Los microorganismos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* poseen una estructura antigénica compleja.

Los antígenos O, antígenos somáticos

Son la parte más externa del LPS y están formados por unidades polisacáridas repetidas. Algunos contienen un único azúcar. Son termoestables y alcohol-estables, detectándose por aglutinación simple. La naturaleza de los grupos terminales y el orden en que estos azúcares están dispuestos en las unidades repetitivas determina la especificidad de los numerosos antígenos O. Un mismo microorganismo puede poseer varios antígenos O. Cada género está asociado a grupos antigénicos específicos, por ejemplo la mayoría de los serotipos de *Shigella* comparten uno o más antígenos O con *Escherichia coli* (*Shigella* y *E. coli* pertenecen al mismo género). Por otra parte *E. coli* puede tener reacciones cruzadas con especies de los géneros *Klebsiella* y *Salmonella*. En *E. coli* algunos antígenos somáticos están asociados con fenotipos virulentos específicos, por ejemplo *E. coli* O:111 y O:119 son frecuentemente agentes etiológicos de diarrea aguda en los niños pequeños.

Los antígenos K, externos a los antígenos O

Algunos constituyen una verdadera cápsula visible al microscopio, como sucede con *Klebsiella*, mientras que en *E. coli* por ejemplo, su estructura no es visible al microscopio óptico y se los denomina antígenos de envoltura por comportarse como si envolvieran la bacteria volviendo inaglutinable el antígeno O de la pared. Son de naturaleza polisacárida. Otros antígenos de envoltura pero de naturaleza proteica se presentan como fimbrias.

Los antígenos H, flagelares

Son de naturaleza proteica. Esta proteína que constituye los flagelos es llamada flagelina. Este antígeno es termolábil y destruido por el alcohol. El contenido de aminoácidos y el

orden en que estos se encuentran en las flagelinas determina la especificidad de los diversos antígenos. Como ya fue mencionado, los flagelos bacterianos están compuestos de un solo tipo de proteína. En *Salmonella* existe variación de fase. Como resultado de ello, la proteína flagelar puede ser de dos tipos por medio de un mecanismo de regulación genética (inversión sitio específico), que involucra:

- dos genes que codifican las dos proteínas, pero solo uno se expresa en cada momento;
- un gen represor de uno de estos genes;
- y la inversión de un segmento de DNA que modifica la dirección de la transcripción.

CARACTERÍSTICAS PATOGENICAS

Se ha asociado a cepas de *Enterobacteriaceae* con abscesos, neumonías, meningitis, septicemia, infecciones de heridas, infecciones de las vías urinarias e intestinales. Son el componente mayor de la flora normal intestinal, pero son relativamente poco frecuentes en otros sitios del organismo. Algunas especies son importantes como causa de infecciones nosocomiales. Significan el 50% de todos los aislamientos clínicos y el 80% de los bacilos Gram negativos. Representan el 50% de los casos de septicemia y más del 70% de las infecciones urinarias.

Hasta 1940 solo *Salmonella* y *Shigella* estaban relacionadas con gastroenteritis humana. Actualmente es bien conocido que algunas variantes patogénicas de *E. coli* son causa significativa de enfermedad diarreica y que cepas invasivas de *Yersinia enterocolitica* son causa de diarrea y adenitis mesentérica.

Clásicamente se han descrito a las especies no relacionadas con enfermedad diarreica, como agentes de infecciones oportunistas, capaces de producir enfermedad en el hospedero inmunocomprometido o por transposición de flora. Es importante destacar, algunas excepciones ya mencionadas. Por otra parte salvo *Shigella* que raramente causa infecciones fuera del tracto gastrointestinal, muchas especies de *Enterobacteriaceae* causan frecuentemente infecciones extraintestinales.

ESCHERICHIA COLI

Es llamada así en honor del pediatra que la aisló y caracterizó en 1885. Junto a otras especies de incidencia excepcional, forma el género *Escherichia*. Constituye la especie dominante de la flora aerobia del tubo digestivo, más de 10 serotipos coexisten normalmente en el mismo individuo. Son estas mismas bacterias integrantes de la flora normal las que pueden causar en diversas circunstancias infecciones abdominales, septicemias, meningitis, etc. El poseer determinadas características antigénicas, como el antígeno de envoltura K1, muy parecido por su composición en ácido siálico al antígeno capsular de *Neisseria meningitidis* del grupo B, daría a este germen potencialidades invasivas. El 80% de *E. coli* aisladas de meningitis del recién nacido poseen este antígeno K1.

Por otra parte el poseer plásmidos que portan genes que codifican para la producción de diferentes adhesinas, enzimas o enterotoxinas otorga a *E. coli* características patogénicas particulares y la capacidad en una u otra circunstancia, dependiendo de la o las proteínas producidas, de dar infecciones urinarias o gastrointestinales.

Los caracteres bioquímicos para la identificación de esta especie se describen en la tabla correspondiente. Es habitualmente fermentador de la lactosa, urea y citrato negativo, indol positivo y móvil.

Desde el punto de vista antigénico en *E. coli* se han descrito más de 150 serogrupos O. Poseen antígenos de envoltura polisacáridos K, que, como es habitual en el mundo bacteriano, permiten a la bacteria resistir más fácilmente la fagocitosis que las bacterias no capsuladas.

Asimismo se describen más de 56 antígenos H que permiten completar su clasificación en serotipos O:H. De lo dicho se desprende que una tipificación antigénica completa es resorte de laboratorios especializados y no forma parte del trabajo corriente de los laboratorios.

Patogenia

Como ya fue mencionado *E. coli* puede integrar la flora normal, causar diarrea, infección urinaria, meningitis, etc. Pero una cepa que causa diarrea no causara infección urinaria ni meningitis. La versatilidad de este microorganismo esta dado porque *E. coli* ha adquirido conjuntos diferentes de genes de virulencia. *E. coli* es un excelente ejemplo de que el poseer un conjunto de genes es lo que hace que una bacteria sea patógena, y no la designación de género o especie.

Se ha propuesto para *E. coli* agente de diarrea una clasificación de acuerdo a sus mecanismos de virulencia, los llamados virotipos. Aunque arbitraria, esta clasificación es muy útil. Se describen 5 virotipos. *E. coli* enterotoxigenico (ETEC), *E. coli* enteroagregativo (EAggEC), *E. coli* enteropatogénico (EPEC), *E. coli* enterohemorrágico (EHEC), y *E. coli* enteroinvasor (EIEC).

E. coli enterotoxigénico (ETEC)

Se parece mucho a *V. Cholerae*; la enfermedad que produce es similar, pero más leve. Adhiere a la mucosa del intestino delgado, no la invade, y elabora toxinas que causan diarrea. No hay cambios histológicos en las células de la mucosa y hay muy poca inflamación. Clínicamente hay diarrea acuosa, vómitos y raramente fiebre. Es la llamada infección no inflamatoria del intestino delgado.

Esta clase de *E. coli* causante de diarrea está integrada por numerosos serogrupos y serotipos (O:6, O:8, O:25, O:78, etc.), ya que los determinantes patogénicos (fimbrias y toxinas) están codificados en plásmidos transferibles. Su identificación es compleja, ya que requiere la detección de su DNA característico (por sondas o PCR), o la demostración por ELISA de la producción de toxinas en cepas que pueden encontrarse en forma minoritaria en el coprocultivo.

Factores de virulencia

Para adherirse a las células de la mucosa ETEC produce diversos tipos de pili. Un tipo de ellos, los llamados factores antigénicos de colonización I y II (CFA/I y CFA/II) y otros, parece contribuir fuertemente a la colonización por estos microorganismos. Los receptores para estas adhesinas están aun en estudio, pero se piensa que son glicoproteínas. Los genes que codifican para CFA están frecuentemente localizados en plásmidos.

La diarrea producida por cepas de ETEC es causada por la acción de dos diferentes toxinas: toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST). Hay dos LT y su estructura y mecanismo de acción es el de la toxina colérica. Tienen diferencias en la excreción de la célula bacteriana y en la regulación genética de su síntesis. ST es una familia de pequeñas toxinas polipeptídicas. Los genes que codifican para LT y ST son portados por plásmidos. A menudo el mismo plásmido lleva los genes de las adhesinas y toxinas.

E. coli enteroagregativo (EAggEC)

Son agentes de diarrea persistente en niños. Las cepas de EAggEC se parecen a ETEC en que se unen a las células intestinales, no son invasivas y no causan modificaciones histológicas

en las células de la mucosa. Difieren de ETEC en que no adhieren en forma uniforme sino que lo hacen en pequeños agregados.

Factores de virulencia

Estas cepas poseen unas estructuras fibrilares muy delgadas que se presumen son los pili de adherencia. Aunque es posible que estos pili promuevan la adherencia de estas bacterias entre sí, más que la adherencia a la célula del hospedero (forma de adherirse en agregados).

Producen una toxina similar a ST llamada EAST (ST enteroagregativa). Otra toxina producida por EAggEC es una toxina muy similar a una hemolisina producida por cepas de *E. coli* que causan infecciones urinarias. Esta toxina no hidroliza eritrocitos pero produce poros en las membranas celulares del hospedero.

E. coli enteropatógeno (EPEC)

EPEC es causa de diarrea severa en niños pequeños, de gran trascendencia en países subdesarrollados. EPEC exhibe un patrón de adherencia en parches, pero no forma el mismo tipo de agregados que EAggEC. A diferencia de las anteriores, la adherencia de EPEC produce alteraciones importantes en la ultraestructura de las células del huésped. Las células a las que EPEC está adherida alargan las microvellosidades donde EPEC no se encuentra y éstas desaparecen en el sitio donde la bacteria está adherida. Este fenómeno se refiere como de unión y borrar, y es el resultado de un reordenamiento de actina en la vecindad de la bacteria adherida.

EPEC es más invasora que las anteriores y se produce una reacción inflamatoria.

Esta clase de *E. coli* está integrada por varios serogrupos, en general los serogrupos asociados con EPEC están limitados a este virotipo (existen excepciones).

Factores de virulencia

La diarrea producida por EPEC es una enfermedad más compleja y se piensa que sucede en tres etapas. En un inicio, hay una asociación de la célula bacteriana a la célula del hospedero llamada unión no íntima, mediada por pili. Este pili llamado Bfp parece no ser la única adhesina de EPEC. Posteriormente a través de un sistema dependiente de contacto llamado sistema de secreción tipo III la bacteria infecta proteínas desde el citoplasma bacteriano directamente desde el citoplasma de la célula eucariota, produciendo alteraciones en la función de la célula eucariota con activación de enzimas celulares y aumento de los niveles de Ca^{++} intracelular, probablemente debido a fosforilación de proteínas del citoesqueleto y la activación de enzimas despolimerizantes de actina. La bacteria se asocia entonces más próximamente con la célula del hospedero (unión íntima) produciéndose un reagrupamiento de actina en la vecindad de la superficie celular. Histológicamente la deformación de algunas microvellosidades y la destrucción de otras se acompaña de la formación de estructuras similares a pedestales en la célula, por debajo del sitio de adherencia de la bacteria. Estos pedestales son fibras densas de actina. La unión íntima está mediada por una proteína de membrana externa llamada intimina, que adhiere a receptores translocados por la bacteria al enterocito junto a otras señales proteicas (TIR: *translocated intimin receptor*). Otras proteínas se encuentran también involucradas en este proceso. Algunas bacterias son posteriormente internalizadas dentro de vesículas fagocíticas. Los genes que codifican los pili Bfp están localizados en plásmidos EAF, pero la mayor parte de los factores patogénicos están codificados en el cromosoma bacteriano.

E. coli enterohemorrágico (EHEC)

Se ha reconocido recientemente a EHEC como responsable de cuadros graves. Estas cepas causan una enfermedad que clínicamente se parece a la disentería producida por *Shigella*, aunque no invade las células de la mucosa. La enfermedad producida por EHEC puede complicarse con síndrome urémico hemolítico (SUH) que puede llevar al paciente a la muerte por falla renal aguda. O157:H7 es el serotipo característico de este grupo de EHEC.

Los cultivos STEC abundan en el intestino de bovinos y otros animales. Pertenecen habitualmente a serotipos no frecuentes en infección humana, pero pueden transferir sus atributos patogénicos a cepas adaptadas al hombre. Un factor importante de diseminación de estas bacterias es la posibilidad de contaminación de la carne durante la faena. La mala cocción de la carne mezclada en hamburguesas y usada en la preparación de comidas rápidas ha llevado a la existencia de brotes de diarrea o SUH causados por STEC O157 en países desarrollados. En nuestro país, se han estudiado en los últimos años algunas decenas de pacientes con SUH, presentándose en forma de casos aislados, sin relación aparente entre ellos.

Factores de virulencia

VTEC posee adhesinas fimbriales codificadas en un plásmido de virulencia de 60 mda., y genes cromosómicos y plasmídicos que median en los enterocitos del colon un efecto de fijación y borramiento de las microvellosidades similar al que produce EPEC en el intestino delgado. A diferencia de EPEC, EHEC produce toxinas iguales o parecidas a la toxina Shiga, por lo cual se los llama también STEC (*Shiga Toxin E. Coli*). Estas sustancias proteicas constituyen una familia de exotoxinas (VT1, VT2, VT2vha, VT2vhb, etc.) llamadas también verotoxinas por su acción citotóxica sobre cultivos de células Vero de laboratorio. Cada bacteria puede codificar una o más variantes. La diarrea con sangre y el SUH asociado a STEC son principalmente debidas a la producción de toxinas Stx, aunque existen otros factores participantes como la enterohemolisina y otros productos microbianos. Las citotoxinas son producidas localmente y contribuyen a la patología intestinal, pero pasan a la sangre produciendo efectos sistémicos que derivan principalmente de la alteración endotelial microangiopática, que favorece la fragmentación globular, la glomerulopatía y otras alteraciones parenquimatosas.

Los genes que codifican para las STX se encuentran en fagos temperados, lo que permite a otras cepas productoras de diarrea adquirir capacidad toxigénica y producir una forma grave de enfermedad.

E. coli enteroinvasor (EIEC)

EIEC produce una enfermedad indistinguible de la disentería producida por *Shigella*. Los pasos en la invasión y diseminación célula a célula parecen ser idénticos a los de *Shigella*. A diferencia de ésta no produce toxinas, por lo cual no se han descrito casos de SUH en relación a estas cepas. Al igual que *Shigella* muchos de los genes involucrados residen en un gran plásmido de virulencia.

La mayoría de estos gérmenes son inmóviles, anaerogénicos, no decarboxilan la lisina y no utilizan la lactosa (lactosa negativos). Pertenecen a un conjunto de serogrupos característicos, bien estudiados por la escuela microbiológica brasileña.

E. coli uropatogénico

Las infecciones del tracto urinario comienzan generalmente con la colonización de la uretra por cepas originarias del colon previa colonización de la vagina. Una de las mayores defensas del huésped es la acción lavadora de la orina. Las bacterias que no se pueden adherir van a

ser lavadas más rápidamente de la vejiga de lo que tardan en multiplicarse. Por otra parte las bacterias que adhieren están más cerca de la mucosa y tienen mayores facilidades para provocar respuesta inflamatoria. Numerosas adhesinas de *E. coli* uropatógeno han sido estudiadas. Los pili tipo 1 contribuyen a la colonización de la vagina y parecen intervenir muy poco en la adherencia al resto del aparato urinario. La adhesina más importante, sobre todo en cepas que causan infección renal es pili P. Hay diversidad antigénica en estos pili pero todos reconocen el mismo carbohidrato como receptor, globobiosa. Este azúcar se encuentra unido a una ceramida anclada en la membrana de las células del huésped. Estas cepas pueden poseer otras adhesinas que no son pili, por ejemplo adhesinas afimbriales (AFAI, AFAIII) o la adhesina Dr, que reconoce al antígeno del grupo sanguíneo Dr como receptor. En general las cepas de *E. coli* uropatógeno producen múltiples adhesinas por combinación de diferentes tipos de pili o diferentes serotipos del mismo pili. Esto podría permitir a las bacterias adaptarse a diferentes superficies mucosas y ambientales, brindándole un mecanismo de evasión de las defensas del hospedero.

En cuanto a la respuesta inflamatoria, hay evidencias de que LPS junto a pili P actúan sinérgicamente provocando esta respuesta. Por otra parte, algunas cepas uropatógenas de *E. coli* producen una exotoxina llamada hemolisina, porque lisaba eritrocitos, aunque luego se vio que también lisaba otras células. Esta hemolisina (HlyA) pertenece a una gran familia de hemolisinas llamadas RTX. Todas ellas actúan creando poros en las membranas celulares de los eucariotas. En el ratón las cepas que poseen HlyA y pili P colonizan la vejiga, el riñón y matan dos tercios de los ratones testados, por otra parte cepas isogénicas que producen solo pili P, colonizan pero no causan daño renal ni muerte. Las cepas que no poseen pili y no producen hemolisina no colonizan. Al menos en el modelo animal la hemolisina media el daño renal.

Los genes que codifican para pili P están agrupados en el cromosoma. El conjunto contiene genes para la subunidad mayor (pap A), para las proteínas del tipo (pap E, F, G), para proteínas de procesamiento y ensamblado (pap C, D, H, J, K) y proteínas reguladoras (pap B, I). Salvo el gen I los demás forman un operón transcrito desde un solo promotor. Por otra parte los genes para hlyA también están agrupados y en proximidad de los genes para pili. A las regiones que contienen los genes de virulencia se las ha llamado islas de patogenicidad.

SHIGELLA

Como ya fue mencionado *Shigella* son bacterias estrictamente humanas. Como sucede frecuentemente esta adaptación se produce con pérdida de funciones. *Shigella*, que por hibridación se encuentra tan cercano a *E. coli* que podrían pertenecer a una misma especie, a diferencia de éste son auxotrofos, inmóviles, poco glucidolíticos, y prácticamente no producen gas en la fermentación de glucosa. Los caracteres bioquímicos se describen en la tabla correspondiente.

En base a los caracteres bioquímicos y antigénicos se describen cuatro especies. *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. sonnei*. Estas especies se subdividen en serotipos sobre la base de un factor somático O característico.

Shigella produce una enfermedad inflamatoria aguda del colon con diarrea sanguinolenta, que en su presentación más característica se manifiesta como una disentería o diarrea disenteriforme. Este síndrome clínico está caracterizado por deposiciones de poco volumen con mucus, pus y sangre; cólicos y tenesmo, acompañados de fiebre; además es característica la presencia de abundantes leucocitos en el frotis de materias fecales. Se trasmite de persona a persona directamente por las manos contaminadas o indirectamente por alimentos o agua contaminados con heces humanas. Se necesita una dosis infectante pequeña para causar

enfermedad; frecuentemente unas pocas centenas de bacterias ingeridas son suficientes para provocarla. En el adulto sano es una enfermedad autolimitada aunque molesta; en los niños pequeños y de poblaciones marginadas puede ser una enfermedad grave que lleve al niño a la muerte. Se trata de una enfermedad más frecuente en poblaciones con mal saneamiento. Puede ser esporádica o dar lugar a brotes extensos, e incluso a epidemias en instituciones cerradas como cárceles u organizaciones para discapacitados. La eliminación fecal de los gérmenes puede prolongarse por varias semanas. Un porcentaje de los enfermos pueden complicarse, presentando alteraciones hidroelectrolíticas, neurológicas (letargia, cefalea, convulsiones) o fallo renal (HUS), esto último cuando se trata de *S. dysenteriae* 1.

Patogenia

Shigella es un buen modelo de enfermedades en las cuales la bacteria invade las células del hospedero, se replica en su citoplasma y se disemina de célula a célula. Existen dificultades al no poseer un modelo animal claro, salvo el mono, para estudiar los factores de virulencia. La mayoría de las investigaciones han utilizado cultivos celulares (células HeLa, macrófagos o fibroblastos de pollo), el test de la queratoconjuntivitis de Sereny realizado en el ojo del cobayo y ensayos en asa ileal aislada de conejo. En estudios realizados en células HeLa, la bacteria se adhiere en una primer etapa a las células del hospedero. Probablemente los receptores sean proteínas llamadas integrinas. Esta adherencia provoca reorganización de la actina (proteína mayor del citoesqueleto de la célula del huésped), polimerización y formación de filamentos no solubles en la vecindad de la unión bacteriana. Esto provoca la formación de pseudópodos y de esta forma células normalmente no fagocíticas de la mucosa ingieren las bacterias adheridas. Esta invasión es mejor descrita como fagocitosis inducida. Jugando el papel activo la célula del hospedero, la bacteria tiene un papel relativamente pasivo luego de la estimulación inicial. Luego de ingeridas, las bacterias se liberan de su vesícula de endocitosis y se multiplican en el citoplasma de las células. Posteriormente las bacterias utilizan filamentos de actina en su vecindad y comienzan a moverse a través de la célula del hospedero. Eventualmente las bacterias pueden diseminarse a células adyacentes. Esto se ha llamado ICS (diseminación intercelular, en inglés: *intercellular spread*). En este movimiento se polimerizan filamentos de actina en uno de los extremos de la bacteria, creando colas similares a cometas que propelen las bacterias a través del citoplasma. Una proteína bacteriana alojada en la membrana externa, llamada IcsA se requiere para este movimiento. IcsA se localiza en un extremo de la bacteria y tiene actividad ATPasa. Eventualmente la bacteria puede tomar contacto con la membrana que separa dos células, protruir y escapar a la célula vecina.

En trabajos realizados en células polares, *Shigella* no se une a los polos apicales de estas células diferenciadas. Las integrinas se encuentran solo en la superficie basal de la mucosa. Por lo que otro modelo se ha propuesto para la entrada inicial de *Shigella*. Esta se haría en tres etapas. En primer lugar, *Shigella* atraviesa la mucosa a través de las células M de las placas de Peyer, células fagocíticas naturales cuyo papel principal es tomar antígenos del lumen intestinal por fagocitosis y presentarlos al tejido linfóide subyacente de las placas de Peyer. En una segunda etapa, *Shigella* usa sus invasinas para invadir las células de la mucosa desde abajo, donde están ubicadas las integrinas, para, en una tercera etapa, diseminarse a células adyacentes, causando la muerte de estas células e inflamación.

La forma como se produce la muerte de las células no está del todo aclarada. Por un lado, cuando las bacterias están multiplicándose en forma intracelular disminuyen los niveles de ATP de la célula y aumentan dramáticamente los niveles de piruvato, indicando una alteración del metabolismo energético. Por otra parte, *Shigella* puede inducir la muerte celular programada

en los macrófagos, un fenómeno llamado apoptosis, lo que sugiere otra vía de muerte celular y, por supuesto, de inflamación. El LPS contribuiría también al daño celular.

Shigella dysenteriae fue aislada por primera vez por Shiga en 1896, durante una epidemia de disentería en Japón. Produce una toxina, denominada toxina de Shiga, que está asociada al espacio periplásmico y se libera durante la lisis bacteriana. Esta posee una subunidad denominada A que tiene acción enzimática y 5 subunidades chicas B, cuya acción es de fijación a la célula intestinal, endotelial, etc., a través de receptores glicolípidos Gb3 de la membrana celular. Una vez que ingresa a la célula por endocitosis, A inhibe la síntesis proteica, clivando un residuo adenina de la subunidad 28 S del ribosoma eucariota, e inhibiendo la función del factor de elongación 1. Se ha visto que la toxina no es esencial para la invasión ni para la muerte de la célula intestinal. Sí se piensa que juega un rol fundamental en la patogenia del SUH.

En nuestro país, *S. dysenteriae* es una bacteria rara. Los 2 aislamientos que tenemos registrados en los últimos 30 años no corresponden al tipo 1. Los casos de SUH que se diagnostican localmente no parecen deberse a este germen, sino a VTEC. *S. boydii* se aísla también en forma esporádica. Las especies de *Shigella* prevalentes en nuestra población son *S. sonnei*, que es lactosa positiva tardía, y forma en agar MacConkey colonias relativamente grandes y rosadas, confundibles con otras enterobacterias, y *S. flexneri*, que predomina todos los años. Muchas de las cepas de *S. flexneri* recuperadas de los niños montevideanos son resistentes a la ampicilina, al cotrimoxazol, o a ambos productos, utilizados tradicionalmente para el tratamiento de estas infecciones. *S. sonnei* sigue siendo habitualmente sensible.

Muchos de los genes que intervienen en la adherencia, invasión de la mucosa y diseminación se encuentran en un gran plásmido de virulencia. Los genes que intervienen en la invasión son llamados *Ipa*. Dos de las proteínas codificadas por estos genes, *IpaB* y *IpaC* se encuentran expuestas en la superficie de la bacteria y pueden encontrarse libres en el líquido extracelular. Otras proteínas no están aun bien estudiadas. *IpaB* no sólo intervendría en la invasión sino que también lo haría en la liberación en el citoplasma por lisis de las vesículas, probablemente por formación de poros en la pared de las mismas. Algunos loci cromosómicos contribuyen a la invasión pero codifican sobretodo proteínas reguladoras. Otros genes involucrados en las etapas posteriores de la patogénesis de *Shigella* se encuentran también en el cromosoma (por ej.: toxina Shiga).

SALMONELLA

La mayoría de los serotipos de *Salmonella* habitan el intestino del hombre y los animales. Hay algunos serotipos que se encuentran adaptados a una sola especie animal, como por ejemplo *Salmonella typhi*, responsable de la fiebre tifoidea, que se encuentra solamente en el hombre. Las características patogénicas son tan variadas como su hábitat natural. Las salmonelosis se pueden dividir según las presentaciones clínicas en:

- Formas digestivas, gastroenteritis, el más frecuente de los cuadros clínicos causados por *Salmonella*. Estas son las diarreas del niño pequeño y las clásicas toxiinfecciones alimentarias, consecutivas a la ingestión de alimentos contaminados con una cepa de *Salmonella*.
- Formas septicémicas, graves, prototipo de las cuales es la fiebre tifoidea.
- Formas diversas de gravedad variable: meningitis, osteítis, etc.; mucho menos frecuentes.

La clasificación de *Salmonella* es compleja. Dentro del género *Salmonella* prácticamente una única especie tiene importancia en patología humana y animal y una única subespecie

llamada *Salmonella enterica* subespecie *enterica*, pero se describen aproximadamente 2000 serotipos dentro de esta subespecie, por lo que corrientemente se los llama por el nombre del serotipo, por ejemplo *Salmonella typhi*, ya mencionada, o *Salmonella enteritidis*.

Salmonella son móviles y, salvo los serotipos bien adaptados a una especie animal, son prototrofos. Las características bioquímicas se describen en la tabla correspondiente.

Desde el punto de vista antigénico, poseen antígenos O somáticos, antígenos de envoltura y antígenos flagelares H con dos especificidades antigénicas expresadas alternativamente, como ya fue descrito.

Presentaciones clínicas

Gastroenteritis: los síntomas aparecen 6 a 24 horas luego de la ingestión del alimento o agua contaminados, y pueden durar hasta una semana o más. Náuseas, vómitos, dolor abdominal y diarrea, son los síntomas principales. La severidad varía de una persona a otra, pudiendo llegar a presentar dolores que hagan pensar en apendicitis y diarreas severas, inclusive con sangre. La mayoría de los casos ocurren en niños menores de 10 años y los síntomas pueden ser más severos en este grupo. La infección puede volverse sistémica. La infección sistémica es más frecuente en lactantes o enfermos inmunocomprometidos (cáncer, SIDA). En adultos inmunocompetentes, ello ocurre sólo con *S. typhi*, y a veces con *S. choleraesuis* y otras, pero en los niños puede ocurrir con muchos serotipos. Esto fue estudiado y descrito por la escuela microbiológica uruguaya, que contribuyó históricamente al estudio de las gastroenteritis infantiles y sus agentes etiológicos (identificación de *Salmonella montevideo*, *S. cerro*, *S. berta* y otras). Funciona actualmente en el Instituto de Higiene, Departamento de Bacteriología y Virología, el Centro Nacional de Salmonelas, que realiza la identificación bioquímica y antigénica de cepas aisladas en el país o en el exterior, y que contribuye al estudio y control de los últimos brotes. En general se trata de una enfermedad molesta pero poco peligrosa, aunque durante los grandes brotes se ven algunos enfermos graves y pueden morir algunos pacientes.

S. enteritidis y *S. typhimurium* son los serotipos más frecuentes aislados en toxiinfecciones alimentarias. Diversos alimentos están involucrados, los derivados cárnicos y huevos son algunos de los más frecuentes. Las técnicas modernas en la cría de las aves, el hacinamiento y las dietas hiperprotéicas llevan a altos niveles de portación intestinal de *Salmonella*. En los mataderos es frecuente la contaminación de las carcasas y de las superficies de los huevos. Se ha demostrado también la transmisión transovárica de *Salmonella* de las gallinas a sus huevos. La idea de que huevos de cáscara sana son seguros es por lo tanto falsa. La enfermedad resulta del consumo de alimentos contaminados mal cocidos o de contaminación cruzada con alimentos crudos en las cocinas. Con escasa frecuencia esto último puede ocurrir a partir de portadores humanos del germen que manipulan alimentos, (el hombre puede excretar *Salmonella* durante meses después de la infección clínica, o en forma permanente con reservorio habitualmente biliar, como puede suceder con *S. typhi*).

Otra forma de propagación de la enfermedad, no desdeñable, dejando de lado las toxiinfecciones alimentarias, es la transmisión interhumana, de persona a persona por medio de las manos contaminadas.

S. typhi es el serotipo específico que causa la fiebre tifoidea. El hombre la adquiere por consumir alimentos o agua contaminados por heces humanas. La contaminación de los alimentos puede también ocurrir durante su preparación con manipuladores de alimentos portadores de *S. typhi* y que eliminan gran número de bacterias en sus materias fecales. Infectados asintomáticos y portadores que han padecido la enfermedad previamente, son los que mantienen la fuente de infección. En los países desarrollados y aquellos que han logrado buenos niveles

de saneamiento y educación no es un problema de salud pública. El período de incubación es de 1 semana a 1 mes. Puede presentar diarrea. Posteriormente el paciente presenta fiebre y anorexia que puede durar hasta 2 o 3 semanas. La enfermedad sin tratamiento antibiótico puede llevar al paciente a la muerte.

Patogenia

Es sorprendente lo limitado del conocimiento en la patogenia de las infecciones causadas por *Salmonella*. *S. typhi* atravesaría la mucosa por medio de las células M, se multiplicaría en la submucosa y de allí se diseminaría. Las bacterias se multiplican en hígado y bazo y pasarían desde allí a la circulación general. Se han visto, en otros serotipos, bacterias dentro de las células mucosas absorptivas y en macrófagos asociados a la mucosa. No es claro el mecanismo por el que se produce la diarrea.

S. typhimurium produce en el ratón un cuadro muy similar al de la fiebre tifoidea en el hombre por lo que se lo ha aceptado como un buen modelo para su estudio.

Salmonella, al igual que otros patógenos digestivos, induce a las células del huésped a englobarlos, pero de modo algo diferente a la fagocitosis inducida ya descrita para otros patógenos. Luego de adherida la bacteria a la superficie celular, se produce un pliegue en la célula, que la rodea y la introduce en una vesícula de endocitosis. Hay intensa polimerización de actina en la vecindad y luego de introducida, ésta desaparece. La bacteria no escapa de la vesícula ni entra en el citoplasma, se multiplica en este fagosoma para ser posteriormente liberadas. Por otra parte, estas bacterias pueden sobrevivir a la fagocitosis, resisten la muerte por el complemento. Al menos 200 genes se encuentran involucrados. *S. typhimurium* posee un plásmido de virulencia cuya presencia otorga a la bacteria la capacidad de causar enfermedad sistémica en el ratón. En *S. typhi* todos los genes son cromosómicos. Los genes de virulencia de *Salmonella* están regulados por un gran número de factores ambientales, tales como falta de nutrientes, anaerobiosis, pH, etc. El LPS tiene un papel importante en la respuesta inflamatoria durante la invasión de la mucosa y es responsable de los síntomas de la infección sistémica.

KLEBSIELLA

La principal especie de este género es *Klebsiella pneumoniae*, muy expandida en la naturaleza. Se la aísla frecuentemente de materias fecales del hombre y los animales, pero también de aguas, vegetales y alimentos. Son bacilos Gram negativos inmóviles, a menudo capsulados. La cápsula es de naturaleza polisacárida. Las propiedades bioquímicas se describen en la tabla correspondiente.

Desde el punto de vista antigénico, es útil en epidemiología la determinación de los antígenos capsulares. Existen más de 70 tipos capsulares diferentes. Pueden existir reacciones cruzadas con antígenos capsulares de otras especies bacterianas. El poseer cápsula otorga a estas bacterias un aspecto colonial mucoide.

Se trata de patógenos oportunistas, pueden provocar diversos cuadros clínicos en el hombre: infecciones urinarias, bacteriemias, neumonías, infecciones hepatobiliares, etc. Un porcentaje elevado de aislamientos de *Klebsiella*, particularmente aquellos de infecciones nosocomiales, contienen plásmidos de resistencia a los antibióticos. Puede ser resistencia a betalactámicos, aminoglucósidos, etc.

ENTEROBACTER - SERRATIA

Estos dos géneros comprenden diversas especies presentes en general en el tubo digestivo

Tabla 1. Propiedades bioquímicas de Enterobacteriaceae

	Salmonella	Citrobacter	Shigella	E. coli	Klebsiella pneumoniae	Enterobacter	Erwinia	Serratia	Proteus vulgaris	Proteus mirabilis	Morganella	Providencia	Edwardsiella	Yersinia enterocolitica
Movilidad	+	+	-	+o-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	- a 37°C
Gas en glucosa	+	+	-	+	+	+	d	d	+	+	+	d	+	-
Lactosa	-	+oX	-	+oX	+	+oX	d	-oX	-	-	-	-	-	-(+)
Test ONPG	-	+	d	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	d
SH2	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
Ureasa	-	-(+)	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+
Ph.alanina deaminasa PDA	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
Indol	-	-	d	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	d
LDC	+	-	-	d	+	d	-	+	-	-	-	-	+	-
Citrato de Simmons	+	+	-	-	+	+	+	+	d	d	-	+	-	-
Manitol	+	+	d	+	+	+	+	+	-	-	-	d	-	+
Adonitol	-	-	-	-	+	d	-	d	-	-	-	d	-	-
Sacarosa	-	d	-	d	+	+	d	+	+	X	-	d	-	d
Salicina	-	d	-	d	+	+	d	+	+	d	-	-	-	X
Dulcitol	+	d	d	d	d	-	d	-	-	-	-	-	-	-
RM	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	+	+	+	+	-	d	-	-	-	+ a 28°C
Malonato	-	-	-	-	+	d	d	-	-	-	-	-	-	-
ADH	-(+)	-	-	d	-	d	-	-(+)	-	-	-	-	-	-
ODC	d	-	d	d	-	+	-	+	-	+	+	-	+	d

+ : positivo, - : negativo, X: irregularmente positivo, (+): positivo tardío, d: diferentes reacciones, ONPG: orotonitrofenil-B-D-galactopyrnanósido, PH-alanina DA: fenilalanina deaminasa, LDC: lisina decarboxilasa, ODC: oronitina decarboxilasa, ADH: arginina dihidrolasa, RM: rojo de metilo, VP: Voges-Proskauer

del hombre y los animales, en el suelo, vegetales y en aguas. Las características bioquímicas se describen en la tabla correspondiente.

Son patógenos oportunistas. Al igual que *Klebsiella* los aislamientos hospitalarios generalmente presentan resistencias a múltiples antibióticos.

PROTEUS-MORGANELLA-PROVIDENCIA

Estos tres géneros forman un grupo caracterizado por poseer la capacidad de desaminar oxidativamente los aminoácidos formando ácidos cetónicos. Habitan el tubo digestivo del hombre y los animales, encontrándose también en el suelo, vegetales y aguas. Las especies más frecuentemente aisladas en cada género son *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii* y *Providencia rettgeri*.

Son bacilos Gram negativos muy polimorfos, móviles. *Proteus spp.* poseen una movilidad extrema que les permite invadir los medios sólidos bajo forma de "hauch". Las propiedades bioquímicas se describen en la tabla correspondiente.

Desde el punto de vista patogénico, son agentes de infecciones del tracto urinario, pudiendo causar infecciones sistémicas en huéspedes inmunocomprometidos. *P. mirabilis* ha sido más estudiado, encontrándose factores de virulencia para el aparato urinario, tales como adhesinas y una hemolisina; se ha sostenido por años el papel de la ureasa producida por *Proteus* y *Morganella* en la patogenia de pielonefritis.

YERSINIA

Este género comprende varias especies, entre ellas *Y. pestis*, agente de la peste o plaga bubónica o neumónica, comúnmente llamada la muerte negra, enfermedad de los roedores, transmitida ocasionalmente al hombre por las pulgas, con pandemias históricas desde el siglo VI, donde mató a un tercio de la población en Europa. Luego de la edad media han habido brotes en diversas partes del mundo, sobre todo en relación con las guerras. Se han denunciado casos en 1995 y comienzos de 1996 en India, Madagascar y otros países africanos, en Brasil y Perú. *Y. pestis* es endémica en algunas regiones tales como Irán y el oeste de Estados Unidos.

Otra especie, *Y. enterocolítica* es muy ubicuitaria. Algunos biotipos están relacionados con enterocolitis en el hombre. Raramente presenta infecciones sistémicas, sin embargo, las bacterias atraviesan con frecuencia la mucosa y se multiplican en los nódulos linfáticos mesentéricos. Debido a los intensos dolores abdominales el cuadro puede confundirse con apendicitis. Ocasionalmente puede haber una artritis reactiva 2 a 6 semanas luego de la infección. Esto se ve frecuentemente en pacientes con antígeno HLA-B27 de histocompatibilidad. *Y. enterocolítica* posee la característica de crecer mejor *in vitro* a 28 °C que a 37 °C, y de desarrollar también a 4 °C, siendo esta última la causa de la existencia de brotes de infección intestinal a partir de agua o alimentos conservados (leche, pescado, carnes, especialmente porcina), o de infección parenteral con origen en derivados sanguíneos refrigerados.

Son relativamente frecuentes como agentes de gastroenteritis en países fríos (Canadá, Suecia, Bélgica). En el nuestro son escasos los aislamientos clínicamente significativos.

Y. enterocolítica posee un plásmido de virulencia de 40-45 mda. que le confiere expresión de ciertas proteínas de superficie, invasividad, resistencia al suero humano normal, y otras propiedades. También *Y. pestis* posee al menos un gran plásmido de virulencia.

Vibrionaceae

La familia *Vibrionaceae* agrupa diferentes géneros de bacilos Gram negativos con un hábitat primario acuático. Se los encuentra en el mar en aguas frescas y en relación con animales acuáticos. Diversas especies son patógenas para el hombre, peces, así como otros vertebrados e invertebrados.

Aunque la familia fue definida inicialmente en un intento de agrupar especies oxidasa positivas y móviles por flagelos polares, para diferenciarlas de los integrantes de la familia *Enterobacteriaceae*, se vio que todos estos microorganismos comparten atributos distintivos que sugieren un origen evolutivo común.

Son bacilos Gram negativos, rectos o curvos. Móviles por flagelos polares. No forman esporos. Quimioorganotrofos, desarrollan en medios simples, son anaerobios facultativos, capaces de tener un metabolismo fermentativo o respiratorio. La mayoría oxidasa positivos. La

Tabla 2. Propiedades bioquímicas de *Vibrionaceae*

	Vibrio	Aeromonas	Plesiomonas
Manitol	+	+	-
O129	S	R	R
Tween 80 estearasa	+	+	-
LDC	+	-	+
ODC	(+)	-	+
ADH	-	(+)	+
Inositol	-	-	(+)

+: positivo, -: negativo, (+): positivo tardío, S: sensible, R: resistente.

Tabla 3. Propiedades bioquímicas de *V. cholerae*

Oxidasa	+
LDC	+
ODC	+
ADH	-
Manitol	+
Inositol	-
Sacarosa	+
VP	d
Gelatinasa	+
NaCl gr%	0-5

LDC: lisina decarboxilasa, ODC: ornitina decarboxilasa, ADH: arginina dehidrolasa, VP: Voges-Proskauer.

mayoría de las especies requiere 2-3% de ClNa o agua marina para desarrollar. El porcentaje G + C del ADN va de 38 a 63%.

Los géneros que forman esta familia son: *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* y *Plesiomonas*, teniendo importancia médica especies de los géneros *Vibrio*, *Aeromonas* y *Plesiomonas*. Las propiedades bioquímicas se describen en la tabla correspondiente.

Por muchos años la única especie que interesó a los microbiólogos fue *V. cholerae*, agente del cólera epidémico. Otras especies tales como *V. parahemolyticus* pueden causar toxiinfecciones alimentarias en el hombre luego de la ingestión de productos del mar; siendo la primera causa de diarrea en el Japón, donde se consume pescado crudo. Otras especies de *Vibrio* y *Plesiomonas shigelloides* también están relacionadas con gastroenteritis. Por otra parte, *Aeromonas hydrophila* es responsable de infecciones de heridas que han sido expuestas a aguas poluidas, y ocasionalmente, puede provocar infecciones sistémicas en enfermos inmunodeprimidos.

VIBRIO CHOLERAЕ

Es el agente del cólera, una enfermedad epidémica grave que ha matado millones de personas y continúa siendo un importante problema de salud en todo el mundo. Conocida desde la antigüedad, permanece endémica en las regiones del delta del Ganges y en el Sudeste Asiático. A partir del comienzo del siglo XIX la enfermedad se ha expandido en todo el mundo en ondas sucesivas, junto a grandes movimientos poblacionales. La historia moderna del cólera comienza en 1817 con la primera de las 7 pandemias. El continente americano estuvo libre de cólera desde el comienzo del siglo XX, la última epidemia en Uruguay fue en 1895. Luego de cada introducción todas duraban unos años y parecían haber desaparecido. En 1950 sólo había cólera en Asia.

En 1961 *V. cholerae* O:1 biotipo el Tor se diseminó fuera de Indonesia, primero a otros países asiáticos y Medio Oriente luego en la década de 1970 a África, Sureste europeo e islas del Pacífico. En enero de 1991 se notificaron los primeros casos de cólera en Perú. En unas semanas se diseminó rápidamente en el país. La enfermedad afectó todas las edades con una muy alta incidencia y al principio alta mortalidad. Esta última fue disminuyendo a medida que se implementó la asistencia médica. Entre 1991 y 1992 el número acumulativo de casos en Perú, representó el 2,5% de la población. Dada la alta incidencia de la epidemia y asumiendo que además muchas de las infecciones fueron asintomáticas, luego de 2 años, la mayoría de la población había estado infectada. Hacia 1993 todos los países de América Central y América del Sur, salvo Uruguay, habían reportado casos. Y todos los afectados en 1991 continuaron reportando en los siguientes años. El comportamiento es de oscilación estacionaria, apareciendo el mayor número de casos en los meses cálidos. Luego de la diseminación epidémica inicial, es posible que el cólera persista en algunas áreas por años en un estado de endemia.

Es indiscutible que la mejor forma de controlar el cólera en las poblaciones es el poseer agua potable y un adecuado saneamiento, que, junto a la educación, son los pilares fundamentales del control de estas epidemias y además contribuyen al desarrollo de estas poblaciones. De todas formas, desde 1880 se ha tratado de desarrollar vacunas; los intentos más recientes se dirigen a la utilización de vacunas orales, atenuadas, buscando una respuesta IgA secretoria.

V. cholerae es un bacilo Gram negativo, curvo, con forma de coma. Desarrolla bien en medios simples. Aunque su desarrollo está estimulado por la presencia de sodio, esta especie, a diferencia de las otras especies del género, desarrolla en medios sin el agregado de ClNa. *V. cholerae* tolera condiciones de alcalinidad y es capaz de desarrollar a pH 10. Estas propiedades se utilizan para aislar el germen de las muestras clínicas, de alimentos o del agua. Las cepas epidémicas de *V. cholerae* se dividen en dos biotipos: clásico y el Tor.

Estructura antigénica

Se puede dividir en base a sus antígenos somáticos. Se describen al menos 139 serogrupos diferentes. Todos comparten un mismo antígeno flagelar. Las cepas pertenecientes al serogrupo O:1 hasta 1992 fueron las únicas asociadas con cólera epidémico. Desde 1992 un nuevo serogrupo O:139 ha sido relacionado con cólera epidémico en India y Bangladesh. Los biotipos son aplicables solamente a *V. cholerae* O:1. Las cepas pertenecientes a los otros serogrupos se asocian a casos de diarrea ocasional o enfermedades extraintestinales. Las cepas del serogrupo O:1 se dividen clásicamente en 3 serotipos: Ogawa, Inaba e Hirojima. Las cepas aisladas pueden sufrir conversiones de Inaba a Ogawa, por lo que los serotipos son de escaso interés epidemiológico.

Patogenia

V. cholerae causa enfermedad en el hombre porque es capaz de colonizar el intestino delgado luego de ingerido. Se adhiere a la superficie mucosa y produce una enterotoxina, la toxina colérica que actúa en las células mucosas intestinales. Esta acción está dirigida a alterar el balance hidroelectrolítico de estas células, disminuyendo la entrada de sodio y aumentando la salida de cloro y agua hacia la luz intestinal, resultando en diarrea importante y desbalance electrolítico, que puede llevar al paciente a la muerte por shock hipovolémico. Con un buen soporte de líquido y electrolitos el paciente sobrevive, siendo una enfermedad autolimitada.

Factores de virulencia

Hasta hace cinco años se creía entender muy bien los mecanismos patogénicos de *V. cholerae*.

Estos se explicaban por tres factores: flagelo, que permitía a la bacteria nadar hasta la mucosa intestinal; pili, que mediaba la adherencia a las células de la mucosa; y la toxina colérica, que producía diarrea severa. Investigaciones recientes demuestran una mayor complejidad en este modelo. Primero, la regulación de los factores de virulencia ha demostrado ser mucho más compleja de lo esperado, con muchos cambios adaptativos al huésped humano. Segundo, muchas cepas producen otras toxinas además de toxina colérica, aunque esta es indiscutiblemente la causa más importante de los síntomas en el cólera. Tercero, las células del huésped no son sólo blancos pasivos de la acción de la toxina.

Colonización de la mucosa del intestino delgado.

Además de las evidencias descritas de que la motilidad flagelar puede ayudar a *V. cholerae* a alcanzar la mucosa intestinal, la mayoría de las investigaciones han sido dirigidas a ver lo que sucede cuando *V. cholerae* alcanza la mucosa. Una contribución importante a la colonización es la presencia de largos filamentos formando un agrupamiento en la superficie de la bacteria. Cepas que carecen de estos pili son avirulentas. Se los ha llamado Tcp pili (pili coregulado con la toxina). Tres genes están involucrados en la regulación de la expresión de los genes de la pilina, y al menos cuatro lo están en la secreción y ensamblaje. Son un conjunto de 15 genes que tienen origen fágico y forman una isla de patogenicidad. A diferencia de lo que sucede en otras bacterias estos pili están localizados solamente en una porción de la superficie celular. Por otra parte, *V. cholerae* produce una hemaglutinina que podría contribuir a la adherencia, además de otra posible adhesina codificada por unos genes llamados factores de colonización accesorios (acf). *V. cholerae* secreta una proteasa originalmente llamada mucinasa que no parece tener un papel importante en la virulencia.

Toxina colérica

No hay dudas sobre la relevancia de esta toxina como factor de virulencia. Es una toxina que actúa por ADPribosilación tipo A-B. Posee una subunidad A (enzimática), y 5 subunidades B idénticas (unión). Tienen un peso molecular de 27 y 11,7 kDa respectivamente. La subunidad A debe ser clivada para ser enzimáticamente activa en A1 y A2. Los genes que codifican la subunidad A (ctxA) y la subunidad B (ctxB) son parte del mismo operón y se encuentran en el cromosoma, en un segmento móvil que tiene origen fágico. Los pili Tcp, constituyen los receptores del fago codificante de la toxina. El gen ctxB es más activamente transducido, produciéndose en exceso. Las subunidades A y B transducidas son secretadas al espacio periplásmico donde son ensambladas. Una proteína (TcpG) que actúa en la formación del pili, intervendría también en la liberación de la toxina. La toxina excretada en la proximidad de las células de la mucosa intestinal, se adhiere a la célula del hospedero por unión a los gangliósidos Gm1 celulares, que son oligosacáridos que contienen ácido siálico unido covalentemente a una ceramida. El oligosacárido es reconocido por la subunidad B. Luego la toxina cambiaría su configuración y, presumiblemente por reducción de un puente disulfuro, el fragmento A1 es liberado de la toxina y entra a la célula del hospedero por un mecanismo aun no aclarado.

El fragmento A1 ADPribosila una proteína de membrana llamada Gs. Gs son proteínas de la familia GTP hidrolizantes que regulan muchos aspectos de la función de las células eucariotas. Las proteínas G están compuestas de tres subunidades (G α , G β , G γ). La asociación y disociación de estas subunidades, junto a la hidrólisis de GTP, activa o desactiva la proteína G. Gs es la proteína G que regula la actividad de la adenilciclase de la célula del hospedero de una forma hormonodependiente y esto determina los niveles de AMP cíclico (cAMP)

de las célula. La forma activa de Gs (unida a GTP) aumenta la actividad de la adenilciclase, mientras que la inactiva vuelve la adenilciclase inactiva. Normalmente la forma activa se produce en respuesta a una estimulación hormonal y luego de un tiempo se convierte a la forma inactiva. La ADPribosilación de Gs cortocircuita este control natural, dejando a Gs activada y los niveles de cAMP descontroladamente elevados. La variedad de efectos que se producen incluye la alteración de las actividades de los transportadores de sodio y cloro. Esto lleva a un desbalance iónico que causa la pérdida de agua asociada al cólera. En células polarizadas como las de la mucosa intestinal, la adenilciclase se localiza en la membrana basolateral, por lo que la toxina unida a la superficie apical debe actuar al otro lado de la célula. Diversos modelos buscan explicar este mecanismo, aunque queda claro que la acción de la toxina es un proceso complicado que involucra A1, Gs, adenilciclase y otras proteínas del hospedero. Cualquiera sea los pasos que se produzcan en esta interacción, la célula del hospedero es un participante activo en la acción de la toxina.

OTRAS TOXINAS

A pesar que la toxina colérica es indiscutiblemente la toxina más importante en la patogenia de *V. cholerae*, este germen produce otras toxinas. En ensayos para producir vacunas se vio que cepas desprovistas de A1 eran capaces de seguir produciendo la enfermedad en voluntarios, administradas en forma oral. Recientemente se han clonado los genes que codifican para la producción de dos enterotoxinas: toxina Zot y toxina Ace. El descubrimiento de estas nuevas toxinas abre grandes expectativas sobre factores de virulencia aun no determinados.

Bacilos Gram negativos no fermentadores

Este gran grupo de bacilos Gram negativos incluye gérmenes pertenecientes a diferentes familias y otros géneros de incierta clasificación. *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, son algunos de ellos, en general desprovistos de grandes atributos de virulencia demostrables, no producen enfermedad en el individuo sano, pero pueden comportarse como oportunistas en enfermos inmunodeprimidos.

PSEUDOMONAS

De las numerosas especies de *Pseudomonas* descritas sólo unas pocas tienen importancia en patología humana. *Pseudomonas mallei* y *P. pseudomallei* causan enfermedad severa en el hombre, pero se aíslan raramente en el hemisferio occidental. Por otra parte *P. cepacia* es un oportunista poco frecuentemente asociado con enfermedad en el hombre.

Nos referiremos en particular a la especie *Pseudomonas aeruginosa* por su frecuencia en patología humana y por estar mejor estudiada que otros. Es un microorganismo versátil, ampliamente distribuido en el suelo, agua, plantas e intestino de animales. Puede causar enfermedad en el hombre, ciertos animales, plantas e insectos. El agua contaminada puede ser una fuente de infección para el hombre. Es susceptible a la desecación, pero sus habilidades metabólicas le permiten sobrevivir y multiplicarse en líquidos y ambientes húmedos de los hospitales. Sus requerimientos nutricionales son variados, se ha aislado *P. aeruginosa* de aguas termales, e incluso de soluciones desinfectantes en el hospital.

La mayoría de las infecciones humanas están restringidas a los pacientes hospitalizados, que adquieren el microorganismo de fuentes ambientales (infección exógena) por contacto con vectores humanos o inanimados.

P. aeruginosa desarrolla bien en medios simples, utilizándose para su aislamiento los medios de cultivo de uso corriente en el laboratorio clínico. La identificación de cepas de *P. aeruginosa* típicamente productoras de pigmento no es difícil, pero las cepas no pigmentadas pueden presentar un problema. La mayoría se identifican por la producción de un pigmento, pyocyanina, soluble en agua, azul, no fluorescente. *P. aeruginosa* produce además otro pigmento, pyoverdina, soluble en agua, verde-amarillento, fluorescente; otras especies del género *Pseudomonas* también producen pyoverdina. Otros pigmentos, menos frecuentes pueden ser producidos por *P. aeruginosa*.

La morfología colonial y el olor frutado de aminoacetofenona son elementos de una identificación sencilla, y aunque existen caracteres de identificación confirmatorios, son de uso poco corriente.

Son bacilos Gram negativos, rectos o ligeramente curvos, móviles, con un solo flagelo polar. Oxidasa y catalasa positivos, aerobios estrictos, no fermentan glucosa, utilizan diversos azúcares oxidativamente con producción de ácido. Uno de los caracteres más constantes es su capacidad de desarrollar a 42 °C. Producen varias enzimas, proteasas, lipasas, lecitinasas.

Patogenia

Las defensas inespecíficas del huésped son en general suficientes para prevenir la infección por *P. aeruginosa*, pero brechas en esta barrera permiten a *P. aeruginosa* invadir y causar infecciones de diversa gravedad. Producen el 10% de las infecciones nosocomiales, infectan heridas y quemaduras y causan infecciones pulmonares, sobre todo, neumonía nosocomial e infecciones respiratorias en pacientes con fibrosis quística. La fibrosis quística es una enfermedad genética asociada a un defecto en la secreción de cloro, caracterizada por la producción de mucina con una alteración de su composición iónica, inusualmente espesa. Esto lleva a una menor eficiencia de la mucina para limpiar las bacterias del pulmón y las vías aéreas y puede impedir el movimiento de las células fagocíticas. Estos hechos explican la susceptibilidad de los pacientes con fibrosis quística a la colonización con *P. aeruginosa*. Si los enfermos son tratados los síntomas pueden desaparecer pero las bacterias permanecen, presentando infecciones recurrentes. Las condiciones del paciente se ven agravadas con la infección a *P. aeruginosa* por las dificultades terapéuticas que se plantean debido a su alta resistencia a los antimicrobianos.

Factores de virulencia

P. aeruginosa posee los mismos tipos de factores de virulencia que otras bacterias capaces de causar enfermedad en el hombre inmunocompetente. Pero algo interesante es ¿por qué *P. aeruginosa* no es un patógeno franco y sólo es capaz de producir infecciones oportunistas? Es probable que *P. aeruginosa* sea ineficiente en su habilidad para llevar a cabo los primeros pasos de la infección; puede colonizar pero no invadir piel y mucosas sanas y tampoco dar infecciones persistentes con producción concomitante de factores tóxicos que dañen los tejidos del huésped.

Adhesinas

Produce al menos dos tipos de adhesinas proteicas, pili y adhesinas no pili. Los pili son pili tipo 4, similares a los de *N. gonorrhoeae* y se parecen también a los pili Tcp de *V. cholerae*. Permiten a la bacteria adherirse a las células epiteliales, preferentemente a receptores asialo-GM1. *P. aeruginosa* produce una neuraminidasa que saca los residuos de ácido siálico de GM1, creando sitios de unión para la pilina. Por otra parte, *P. aeruginosa* es capaz de unirse a la mucina

y lo hace por medio de las adhesinas no pili. Además del gen que codifica para la proteína estructural del pili otros genes codifican proteínas ensambladoras y reguladoras.

Exoenzima S

Es una enzima excretada que puede actuar como exotoxina. Tiene actividad de ADPribosilación como otras toxinas, pero aplicada en forma exógena no daña las células del huésped. Luego de internalizada intervienen proteínas de las células del huésped en la activación de la toxina para lograr su máxima actividad. Se sostiene que actuaría dificultando la acción de los fagocitos lo que facilitaría la sobrevivencia de *P. aeruginosa* en el torrente sanguíneo y órganos. En el pulmón actuaría inhibiendo la muerte intrafagocítica de las bacterias y promoviendo la infiltración fagocítica en el área. También puede presentar efecto tóxico directo en los pulmones.

Exotoxina A

Esta exotoxina tiene el mismo mecanismo que la toxina diftérica. Es una toxina A-B con tres unidades funcionales:

- dominio R (región de unión al receptor celular);
- dominio T (región que media la translocación de la porción enzimática al interior de la célula);
- dominio C (región catalítica).

Los dominios R y T se localizan en la cadena B y el dominio C en la cadena A. La cadena A es enzimáticamente activa por ADPribosilación del factor de elongación 2 (EF-2) de la síntesis proteica, que lo vuelve inactivo. Su receptor es una glicoproteína de las células del hospedero. La mayoría de los aislamientos clínicos la producen, y actuaría produciendo daño en los tejidos y disminuyendo la actividad de los fagocitos.

Elastasas

Elastina es el 30% de las proteínas del tejido pulmonar. Además está presente en la pared de los vasos sanguíneos. Es responsable de las propiedades elásticas de estos órganos que se expanden y contraen. *P. aeruginosa* tiene actividad elastolítica, produce dos enzimas que actuarían concertadamente: LasA y LasB. LasA actuaría clivando la elastina y permitiendo la acción de LasB, que es una zinc metaloproteasa, uno de cuyos substratos es la elastina. Estas enzimas actuarían en las etapas tempranas de la enfermedad, por daño directo de los tejidos, pero no en infecciones crónicas, debido a la presencia de anticuerpos antielastasas. También pueden intervenir degradando componentes del complemento e inhibidores de $\alpha 1$ proteinasa (inhibe el daño de los tejidos por las proteasas de los polimorfonucleares). En las infecciones crónicas, altos niveles de anticuerpos producidos pueden llevar a la formación de complejos inmunes y su depósito en el pulmón activar complemento y atraer polimorfonucleares (PMNs). Los PMNs producen su propia elastasa, más potente que LasA-LasB. Pequeñas cantidades de LasA pueden facilitar la degradación de la elastina pulmonar causada por la elastasa de los PMNs.

Otras enzimas extracelulares

Produce varias enzimas además de las mencionadas. Una lipasa alcalina y dos fosfolipasas, no bien estudiadas. Por otra parte, pyocianina puede funcionar como factor de virulencia. Puede dañar el tejido endotelial *in vitro*, lo que sugiere una acción *in vivo*. Un atributo de virulencia muy importante es la producción de alginato. Es un polímero de ácido manurónico

y gularónico que forma un gel viscoso alrededor de la bacteria. Las colonias que lo producen tienen aspecto mucoso. Para las bacterias marinas esto es un atributo importante para su supervivencia. *P. aeruginosa* ha adaptado esto a su supervivencia en el pulmón. En medios de cultivo ricos pierde esta propiedad. Esta capa que rodea a la bacteria y a las colonias de bacterias en el pulmón puede actuar como adhesina y probablemente, previene la ingestión fagocítica de la bacteria. Los genes que intervienen en su codificación están agrupados en un sector del cromosoma y organizados en un operón, poseen un sistema de regulación extremadamente complejo.

El LPS también varía durante la transición mucoso-no mucoso. En cepas no mucosidades el antígeno O del LPS tiene cadenas largas y carga negativa mientras que las cepas mucosidades tienen cadenas más cortas y una composición de azúcares que lo hacen mucho más neutro; esto sería importante en la alta resistencia a algunos antibióticos que presenta *P. aeruginosa*, situación problemática en pacientes internados, pero dramática en los pacientes con fibrosis quística, que muchas veces presentan infecciones por *P. aeruginosa* resistente a todos los antibióticos disponibles.

Práctico de bacilos Gram negativos

B. Amorín

- **CASO 1:** paciente de 30 años, sexo femenino, que comienza hace cuatro días con fiebre, disuria, polaquiuria y tenesmo. El día de la consulta agrega dolor en fosa lumbar izquierda. Al examen físico se presenta dolorida, febril (39 °C axilar). Abdomen: dolor en puntos ureterales superior y medio. Tacto vaginal: punto ureteral inferior positivo.

Diagnóstico clínico: infección urinaria.

Práctico: se observarán placas de agar sangre y agar Mac Conkey, sembradas con la orina de la paciente, en las cuales se podrán apreciar colonias bacterianas. Se realizará, a partir de ellas, siembra con punta en medios de TSI (Triple azúcar hierro), citrato, urea y SIM (Movilidad-Indol-Sulfídrico), (ver descripción de medios y procedimiento al final del capítulo). Se mostrarán tiras reactivas comerciales, método que determina distintos parámetros urinarios, entre ellos esterasas leucocitarias.

Discusión: se hablará de posibles etiologías, factores determinantes de las infecciones urinarias (gérmenes, mecanismos de agresión y vías de llegada), factores predisponentes (anatómicos, higiénicos y malformaciones). Se discutirá cómo se realiza la toma de muestra, el transporte, el procedimiento a emplear para sembrar un urocultivo.

- **CASO 2:** paciente de 30 años, sexo femenino, con antecedentes personales de ser portadora de litiasis renal, que se encuentra internada desde hace varias horas con el diagnóstico de infección urinaria. A las 48 h del ingreso presenta picos febriles de 39 °C, chuchos de frío y mal estado general. Al examen físico: depresión de conciencia, fascies tóxica, piel pálida y sudorosa. FC: 120 cpm, oliguria. Examen abdominal: hepatomegalia. Con el diagnóstico de sepsis a punto de partida urinario se comienza inmediatamente con el tratamiento.

Práctico: se observarán placas de agar sangre sembradas a partir del hemocultivo en caldo de la paciente. Las colonias se sembrarán en medios de TSI, citrato, urea y SIM.

Discusión: se discutirá el significado de la sepsis, como se expresa clínicamente, el punto de partida de la infección, diseminación y multiplicación del germen, mediadores y efectos fisiopatológicos de la sepsis, y se mencionarán que antibióticos se pueden utilizar en estos casos.

- **CASO 3:** paciente de 52 años, con antecedentes personales de ser un alcoholista crónico, es traído al hospital. Al examen físico se encuentra somnoliento, en mal estado general. Febril (38,5 °C axilar) y taquicárdico. Frecuencia respiratoria 36 rpm. Pleuropulmonar: el hemitórax derecho se moviliza menos con la respiración. A la percusión dolor y matidez en dos tercios superiores de dicho hemitórax. A la auscultación: murmullo alveólovesicular abolido en esa topografía y soplo tubario. La radiografía de tórax muestra una imagen homogénea que ocupa los dos tercios de la superficie del hemitórax derecho, con borramiento del fondo de saco pleural.

Diagnóstico: neumonía aguda con derrame pleural. El cultivo del esputo y los hemocultivos fueron positivos para un bacilo Gram negativo.

Práctico: observaremos placas de agar sangre y medio Mac Conkey. Las colonias sospechosas se sembrarán en TSI, citrato, FA y SIM. Se observarán frotis teñidos con tinta china para observación de la cápsula.

Discusión: discutiremos los agentes etiológicos, factores predisponentes y los mecanismos defensivos a nivel del aparato respiratorio.

- **CASO 4:** paciente de 4 años que recibe quimioterapia por leucemia linfocítica aguda (en remisión). Ingresa por fiebre de 41 °C rectal y fatiga. Al examen físico: pálido, polipneico y taquicárdico. Frialdad periférica y sudoración. En el cuello presenta una vía venosa central, sin signos inflamatorios. Pleuropulmonar: sin particularidades. El resto del examen físico fue normal. Luego de las tomas para hemocultivo se inició antibioticoterapia por vía i/v. En las horas siguientes su estado se agrava, requiriendo intubación orotraqueal, asistencia respiratoria mecánica y reposición de fluidos.

Diagnóstico: shock séptico. Los hemocultivos fueron positivos para *Pseudomonas aeruginosa*.

Práctico: se observarán en placas de agar sangre, TSA y Mac Conkey, las colonias sospechosas, y se sembrarán con punta en TSI y el medio OF (óxido-reducción). También realizaremos la prueba de oxidasa.

Discusión: enfatizaremos en los factores predisponentes que explican en este niño la infección por *Pseudomonas aeruginosa*; qué otros cuadros clínicos puede ocasionar, sus mecanismos patogénicos y la terapéutica antibiótica que se emplea en estos casos.

- **CASO 5:** paciente de 20 años, sexo masculino, internado en el CTI por sufrir politraumatismos al chocar con su moto. Por presentar traumatismo de tórax con neumotórax e

insuficiencia respiratoria, requirió un tubo de drenaje bajo agua, intubación orotraqueal y conexión a un ventilador mecánico. A los 4 días de internación se presenta febril con 40 °C, fascies tóxica, palidez cutaneomucosa. Taquicardia. Presión arterial de 70/50. Abdomen: hepatoesplenomegalia.

Diagnóstico: shock séptico. Se realizaron tres hemocultivos que fueron negativos. Se realiza fibrobroncoaspiración de secreciones respiratorias, donde se aísla bacilo Gram negativo.

Práctico: se procederá a la observación del crecimiento en placas de agar sangre y de TSA. Las colonias sospechosas se sembrarán con punta en TSI. Realizaremos la prueba de oxidasa y mostraremos otro método de diagnóstico comercial que es fácil de realizar y rápido.

MEDIOS Y PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Para el cultivo de los bacilos Gram negativos se utilizarán diferentes tipos de medios:

- Medios simples: son aquellos que contienen pocas sustancias nutritivas. Ejemplo: agar nutriente.
- Medios ricos: son aquellos a los cuales se añaden ingredientes nutritivos, habitualmente de composición química no bien definida, como peptona, extracto de carne, extracto de levadura, líquidos orgánicos; que permiten el desarrollo de una gran variedad de microorganismos de la más amplia exigencia nutricional. Ejemplo: agar sangre.
- Medios diferenciales: son aquellos a los que se agrega un indicador de pH de distinta índole y que contienen un azúcar degradable por la bacteria, el cual cambiará de color (viraje del indicador) cuando un grupo de organismos determinado se desarrolla en él utilizando ese carbohidrato. Ejemplo: agar-lactosa-rojo-fenol.
- Medios selectivos y diferenciales: son medios a los que se agrega por ej. lactosa, rojo neutro y otras sustancias tales como cristal violeta, que permite el crecimiento de bacilos Gram negativos e inhibe el desarrollo de los Gram positivos. Ejemplo: agar Mac Conkey.

Medios de identificación

Se incluyen bajo este nombre todos aquellos medios que ponen en evidencia distintas propiedades fisiológicas de las bacterias, por ejemplo: reacciones bioquímicas o enzimáticas, movilidad, producción de pigmento, etc.

Prueba de la oxidasa

Pone en evidencia la enzima indofenol-oxidasa, mediante la oxidación de un colorante previamente reducido, que cambia de color en su presencia. Permite diferenciar entre bacilos Gram negativos no fermentadores, como *Pseudomonas*, que son oxidasa positivos, de aquellos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Se toma una porción de una colonia pura de 24 horas, con una pipeta pasteur, se deposita sobre una tira de papel impregnada en el reactivo de oxidasa.

LECTURA: Reacción positiva: aparición de un color rojo violáceo entre los 10 y 60 segundos.

Metabolismo energético (oxidativo-fermentativo)

El medio utilizado se denomina OF, que es semisólido y tiene azul de bromotimol como indicador de pH, y una baja concentración de glucosa. Se siembra en dos tubos en profundidad con una punta, un tubo sin vaselina y el otro con vaselina. Se incuba a 37 °C por 24 h.

Ver tabla 4

Tabla 4.

Tipo de metabolismo	Tubo abierto	Tubo cerrado
oxid./ferm.	amarillo en todo el tubo	amarillo en todo el tubo
oxidativo	amarillo en superficie	no viraje
inactivo	no viraje	no viraje

Metabolismo de los carbohidratos

Se explora por la adición al medio (que puede ser sólido, semisólido o líquido), de el o los carbohidratos deseados más un indicador de pH. Ejemplo: TSI. Este medio sirve de guía como primera aproximación al estudio de bacilos Gram negativos. Es un medio sólido con una concentración de lactosa y sacarosa al 1% y de glucosa al 0,1%, peptonas, sulfato ferroso y rojo fenol como indicador de pH (pH ácido = amarillo, pH alcalino = rojo, pH neutro = rojo pálido). Se reparte en tubos dejando una superficie inclinada (*slant*), y un fondo (*butt*) de 3 a 4 cm de profundidad. Se siembra por puntura y en superficie. Se incuba a 37 °C por 18-24 horas.

LECTURA: se lee el cambio de pH (viraje del indicador) desde la superficie al fondo, la producción de gas (burbujas) y de gas sulfhídrico; registrándolo del modo siguiente: por ej. A/A gas (+) H₂S (-).

Si el único carbohidrato utilizado es la glucosa, se observará la superficie roja y el fondo amarillo (K/A). La superficie alcalina indica que luego de la degradación aeróbica de la glucosa, debido su baja concentración en el medio, el organismo comienza a utilizar las peptonas como nutrientes, cuyos productos finales son alcalinos. En el fondo, la degradación de la glucosa produce metabolitos ácidos que viran el indicador al amarillo y no pueden ser transferidos al ambiente. Si además de usar la glucosa, la bacteria utiliza la lactosa o la sacarosa, se produce una reacción ácida tanto en la superficie como en el fondo del tubo. Si ninguno de los azúcares es metabolizado, se observa un viraje al rojo por la utilización de las peptonas del medio. Si hay producción de gas sulfhídrico el medio se observa de color negro.

Metabolito proteico

Puede ser explorado estudiando los procesos de desaminación y decarboxilación de varios aminoácidos, como por ejemplo, la prueba de la desaminación de la fenilalanina a ácido fenil pirúvico por actividad enzimática microbiana. Es un medio sólido repartido en tubo inclinado, se siembra en superficie con asa y se incuba a 37 °C por 18 a 24 h. Para la lectura se agrega al cultivo 4 o 5 gotas de cloruro férrico al 10%.

LECTURA: la reacción es positiva si se observa un color verde en la superficie. Es negativa si no hay cambios, observándose un color amarillo característico del cloruro férrico.

Prueba del citrato

Determina la capacidad de un germen de utilizar el citrato como única fuente de carbono y energía. El desarrollo bacteriano provoca un viraje del indicador de pH (azul de bromotimol) del verde (neutro) al azul (alcalino), porque los gérmenes producen metabolitos alcalinos a

partir de las sales de amonio contenidas en el medio. Es un medio sólido repartido en tubo inclinado; se siembra en superficie y se incuba 24 a 48 h a 37 °C.

LECTURA: reacción positiva: se observa un intenso color azul. Reacción negativa: no hay desarrollo ni cambio de color.

Prueba de la ureasa

Determina la habilidad de un microorganismo de hidrolizar la urea formando dos moléculas de amoniaco por acción de la enzima ureasa. La alcalinización del medio por el hidróxido de amonio hace virar el indicador de pH (rojo fenol). Es un medio líquido, de color naranja pálido que se siembra con asa, y se incuba a 37 °C por 24 horas.

LECTURA: reacción positiva: cuando hay viraje del indicador al rosa intenso. Reacción negativa: el color permanece incambiado.

SIM

Es un medio semisólido que contiene 0,3% de agar. Se siembra con punta en profundidad. Se incuba 24 horas a 37 °C. Se observan tres características:

- Movilidad, cuando el desarrollo se produce en todo el medio causando turbidez difusa; o inmovilidad, cuando el desarrollo se produce sólo a lo largo de la línea de siembra.
- Producción de sulfhídrico: se observa un precipitado de color negro.
- Producción de indol a partir del triptofano: al agregar un reactivo (Kovacs o Ehrlich) se forma un anillo rojo intenso en la superficie del medio.

Bibliografía

- Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilgert CM. editores. Zinsser Microbiología. 20ª ed. BsAs. Panamericana; 1994.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC (h). editores. Diagnóstico Microbiológico, Texto Atlas Color. 5ª ed. Bs As. Panamericana. 1999.
- Salyers AA, Whitt DD. editors. Bacterial Patogenesis, a molecular approach. 2ª ed. Washington, D.C. ASM Press. 2001.
- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. editors. Bailey & Scott´s. Diagnostic Microbiology. 11ª. ed. St. Louis, Missouri. Mosby. 2002.
- Mandell GL, Douglas, Bennett JD. editors. Enfermedades infecciosas, Principios y Práctica. 5ª ed. Bs.As. Panamericana. 2002.
- Murray PR. Baron EJ. Jorgensen JH. Pfaller MA. Tenover FC. Tenover FC. Editors. Manual of Clinical Microbiology. 8ª. ed. Washington, D.C. ASM Press. 2003.