

20 Principales grupos de bacilos Gram positivos aerobios

M. Macedo, M. Vola

Comprende un amplio conjunto de bacterias agrupadas por sus características morfológicas y tintoriales. Característicamente, dentro de este grupo se encuentran bacterias capaces de esporular. *Clostridium* spp y *Bacillus* spp son capaces de sobrevivir en medios hostiles mediante la formación de una estructura muy resistente, la endospora (también llamada espora o ésporo), la estructura con vida más resistente a los agentes físico-químicos, y por lo tanto, a la esterilización y desinfección. Como veremos, esto tiene grandes implicancias médicas, en la industria alimentaria, en los procesos de esterilización e increíblemente, en el bioterrorismo. La endospora puede, en condiciones favorables, germinar y dar lugar a la célula vegetativa. Deben diferenciarse las esporas bacterianas, que constituyen una forma de resistencia y no tienen función reproductora, de las de los hongos, que tienen función reproductora, son externas, numerosas y que no confieren resistencia. Recuérdese que una espora bacteriana da lugar a una única célula vegetativa.

Si bien dentro de los bacilos Gram positivos (BGP) se encuentran algunos de los patógenos más agresivos para el ser humano, la gran mayoría de las especies bacterianas de este grupo no son patógenos primarios. Muchos forman parte de la flora normal del cuerpo humano (piel, tracto gastrointestinal, cavidad oral) y se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente. Por este motivo, se debe ser cuidadoso en la interpretación del hallazgo de un BGP en un estudio microbiológico, ya que frecuentemente se trata de contaminantes.

De acuerdo a su comportamiento frente al oxígeno los BGP se dividen en:

- a) aerobios: *Bacillus* spp, *Listeria* spp, *Corynebacterium* spp, *Erysipelothrix* spp, etc.
- b) anaerobios: *Clostridium* spp, *Eubacterium* spp, *Propionibacterium* spp, *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* spp, *Mobiluncus* spp, etc.

En este capítulo nos referiremos únicamente a los BGP aerobios de importancia médica. Éstos pueden ser clasificados según su morfología en:

1. Esporulados: *Bacillus* spp
2. No esporulados:
 - 2a. regulares: *Listeria* spp.; *Erysipelothrix* spp.
 - 2b. irregulares: *Corynebacterium* spp.; *Nocardia* spp.

Esporulados

BACILLUS

Características generales

Este género es prototipo de la familia *Bacillaceae*. Son BGP grandes y esporulados, no exigentes y en general móviles. Incluye bacterias aerobias y anaerobias facultativas. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza; algunos forman parte de la flora normal y suelen ser contaminantes del laboratorio.

El manual Bergey's de sistemática bacteriana describe 34 especies, pero *Bacillus anthracis* es el más importante en microbiología médica y veterinaria. Existe una gran diversidad de contenido G+C en su genoma, 32-62 mol % dentro del género, lo que refleja su gran heterogeneidad. Ciertos miembros del género tienen implicancias médicas por la producción de antibióticos como polimixina y bacitracina, además de uso industrial en la producción de solventes, enzimas, vitaminas, etc.

Bacillus anthracis

El carbunco o ántrax (evitar la confusión con el término carbunco) fue una de las primeras infecciones bacterianas para las cuales se estableció definitivamente la causa. Dio lugar al desarrollo de la primera vacuna bacteriana que fue desarrollada por Louis Pasteur. Es una enfermedad que afecta sobretodo a animales herbívoros, en particular ovinos y bovinos. El hombre la adquiere de forma accidental: en el contexto agrícola como una infección cutánea local, en el contexto industrial (manipuladores de cuero y pelo de animal) como una neumonía (poco frecuente). Es entonces, una zoonosis y una enfermedad laboral.

Por producir endosporas altamente resistentes y ser capaz de producir infecciones respiratorias graves, es un arma biológica potencial. De hecho, es conocido el episodio de bioterrorismo que ocurrió en Estados Unidos hace algunos años, que dio lugar a varias muertes y que alarmó enormemente al mundo entero.

Morfología y fisiología de *B. anthracis*

Microscopía: bacilos rectos de extremos cuadrados de 3-5 μm de largo y 1-1.2 μm de ancho, aislados o en pares. Es inmóvil a diferencia de la mayoría de las otras especies del género. Cuando desarrolla *in vivo* presenta cápsula, pero para demostrarla *in vitro* debe cultivarse en medios especiales (por ej. medios con bicarbonato e incubación a 6% de CO_2). La endospora es elíptica, ubicada centralmente, y no modifica el soma bacteriano; no se produce en tejidos de animales vivos, pero si en cultivos de varios días, suelos o animales muertos.

Macroscopía: luego de 24 horas de cultivo, las colonias son grandes (2-3 mm de diámetro), sobreelevadas, blanco-grisáceas, opacas y de bordes irregulares, en aspecto de "cabeza de medusa". Tienen una consistencia membranosa con dificultad para emulsionarlas. No producen hemólisis.

Características del cultivo: se realiza en aerobiosis, crecen bien en cualquier medio, pero se visualiza mejor la morfología de las colonias en agar sangre al 5%, pH 7-7,4 y 37 °C.

Resistencia: la célula vegetativa es comparable con otras bacterias no esporuladas pero, debido a su capacidad para esporular, es sumamente resistente. Las esporas permanecen viables durante años en el ambiente. Esta propiedad fue demostrada por experimentos de guerra biológica realizados en Escocia, que consistieron en la dispersión de 4×10^{14} esporas, cuya persistencia se demostró por más de 20 años, lo que requirió posteriormente la desinfección de la zona con formaldehído. Pueden ser destruidas si son sometidas a esterilización, siendo la

estructura viva más resistente (solo los priones son más resistentes, pero difícil considerarlos como estructuras vivas). En base a esto esporas de especies de *Bacillus* distintas a *B. anthracis*, son utilizadas como controles biológicos de esterilización (ver capítulo de Esterilización, desinfección y antisepsia).

Estructura antigénica

Poseen tres antígenos principales:

- Polipéptido capsular de gran peso molecular formado casi exclusivamente por ácido D-glutámico. Esta es la única especie bacteriana de importancia médica que posee cápsula peptídica en lugar de polisacárida. Existe un único determinante antigénico. Por razones no muy bien conocidas los anticuerpos anticápsula no son protectores. Los genes que codifican esta estructura se encuentran en un gran plásmido.
- Antígeno somático polisacárido, es un componente de la pared celular. Los anticuerpos no son protectores. Reacciona en forma cruzada con la sangre de tipo A y *Streptococcus pneumoniae* tipo 14.
- Toxinas: factor edema y toxina letal.

Determinantes de patogenicidad de *B. anthracis*

No todas las cepas de *B. anthracis* son capaces de producir carbunco. Los principales atributos de virulencia de las cepas que producen enfermedad están codificados en dos plásmidos y son:

- Toxinas
Produce dos toxinas modelo A-B, que poseen idéntica subunidad B. La subunidad B se conoce como antígeno protector. Es la porción de la toxina que se fija al sitio blanco y permite el ingreso a la célula.
 - Toxina edema: su subunidad A es el componente enzimáticamente activo; se denomina factor edema. Es una adenilato-ciclase calmodulina-dependiente. Es responsable del importante edema en los sitios de infección, la inhibición de la función de los neutrófilos y obstaculiza la producción de factor de necrosis tumoral (TNF) e interleuquina 6 (IL-6) por parte de los monocitos.
 - Toxina letal: su porción A, llamada factor letal, es una metaloproteasa que inhibe la señalización transduccional intracelular. Estimula la liberación de TNF e IL-1 por parte de los macrófagos; este mecanismo parece contribuir a la muerte por bacteriemia.
- Cápsula
Al igual que sucede con otras bacterias la cápsula es un importante factor de virulencia al inhibir la fagocitosis.

Infección clínica de *B. anthracis*

Epidemiología

La infección veterinaria tiene una alta tasa de mortalidad por sepsis. En los humanos es una enfermedad actualmente poco frecuente. Dependiendo de la vía de transmisión, produce dos clases de infecciones principales: una cutánea relativamente benigna y una respiratoria que compromete la vida del paciente. La infección cutánea se produce por contacto directo con animales infectados. La infección respiratoria requiere la vía inhalatoria, la cual, para ser efectiva, requiere que los esporos bacterianos sean aerosolizados. Por este motivo, esta vía raramente ocurre de manera natural y despierta la sospecha de intencionalidad (bioterrorismo), aunque se han asociado casos de ántrax inhalatorio con el procesamiento a gran

escala de pelos y lana de animales contaminados realizado en espacios pequeños y cerrados. Excepcionalmente se produce una forma gastrointestinal por la ingesta de esporas bacterianas, a partir de carne contaminada. No se transmite de persona a persona.

Patogenia

El carbunco cutáneo se produce por contacto de la piel con material infectado. Los esporos ingresan a través de una lesión de la piel. Al ser ingeridos por los macrófagos en el sitio de entrada, los esporos germinan y las células se multiplican produciendo cápsula y toxinas.

El carbunco pulmonar ocurre cuando las esporas ingresan a la vía aérea y se depositan en los espacios alveolares, donde son fagocitadas por los macrófagos alveolares. En el interior de los mismos germinan y producen las toxinas, para ser luego transportadas por la circulación linfática a los ganglios mediastinales. Alcanzan el torrente sanguíneo pudiendo causar shock séptico. La germinación puede ocurrir hasta 60 días después del ingreso de las esporas a la vía respiratoria; de ahí la importancia de que la profilaxis antibiótica en casos de exposición se prolongue por 60 días. Se estima que la dosis inhalatoria letal para los seres humanos es de 2500 a 55000 esporas.

Manifestaciones clínicas

La infección cutánea, que comprende el 95% de los casos humanos, se manifiesta por una pápula indolora de centro color negro-azulado con un gran borde edematoso. Sin tratamiento tiene un 20% de mortalidad.

La infección pulmonar es una severa infección respiratoria que evoluciona a la insuficiencia respiratoria aguda y tiene una muy alta tasa de mortalidad (100% sin tratamiento).

Sensibilidad antibiótica

Es sensible a penicilina (aunque existen informes de unos pocos casos resistentes), eritromicina, tetraciclina, gentamicina, cloranfenicol y quinolonas.

Prevención

El control del carbunco humano depende fundamentalmente del control del carbunco animal. Así, deben tomarse medidas como la vacunación del ganado y manejo adecuado del ganado muerto, ropa y material de trabajo, etc.

Inmunización activa

Se dispone de vacuna elaborada con subunidades B, obtenidas por filtración. Actualmente no se usa en forma sistemática, solo es utilizada en situación de mayor riesgo (personal militar, sobre todo). A nivel veterinario se utiliza una vacuna de mayor eficacia, elaborada a partir de esporas vivas, de cepa no capsulada. Esta en estudio una vacuna recombinante de subunidades B.

Otros *Bacillus* de importancia

B. cereus: es agente de toxiinfección alimentaria, es capaz de producir una enterotoxina termoestable que produce vómitos y una termolábil responsable del síndrome diarreico. El arroz y otros vegetales son los principales vehículos de transmisión. En Uruguay, entre 1995 y 2001, se notificaron 3 brotes de enfermedad transmitida por alimentos (ETA). Morfológicamente es similar a *B. anthracis* pero se diferencia por ser móvil y resistente a la penicilina. Produce una β -lactamasa y es también resistente al trimetoprim-sulfametoxazol.

Es agente también de infecciones oculares.

B. stearothermophilus: se utiliza como control biológico en el autoclave.

B. subtilis: presente en el aire y polvo, es un contaminante del laboratorio pero puede producir enfermedad en inmunodeprimidos. Se utiliza como control biológico en el horno Pasteur y esterilización con ETO gas.

B. thuringiensis: es utilizado como pesticida por producir una toxina letal para ciertos insectos.

No esporulados regulares

LISTERIA

Género de cocobacilos cortos ubicuos en la naturaleza. El más importante en microbiología médica es *L. monocytogenes*, ya que es el principal patógeno humano. Excepcionalmente se han reportado infecciones por *L. ivanovii* (en animales es responsable de abortos). Las mujeres embarazadas son especialmente susceptibles a las infecciones por *Listeria*, también afecta a otros individuos con alteraciones del sistema inmune, en especial de la inmunidad celular: personas añosas, recién nacidos, cirróticos, trasplantados, personas afectas de cáncer, las que reciben terapia inmunosupresora, etc.

L. monocytogenes

Morfología y fisiología

Microscopía: cocobacilos, Gram positivos, de 0,5 - 2 μm por 0,5 μm , que se presentan aislados o agrupados en cadenas cortas; móviles por presentar de 1 a 5 flagelos a 28°C.

Macroscopía: colonias pequeñas (0,5 - 1,5 cm.), translúcidas. En agar sangre produce colonias similares a *Streptococcus* spp. Las cepas patógenas producen un halo muy estrecho de β -hemólisis; frecuentemente es necesario remover las colonias para visualizar la hemólisis.

Fisiología y características bioquímicas: son aerobios facultativos, pero su crecimiento es estimulado con la disminución en la tensión de O_2 y CO_2 al 5-10%. Su crecimiento óptimo es a 30-37°C pero puede proliferar a 4°C en unos días; esta característica fisiológica es útil para su aislamiento selectivo, ya que otras bacterias de interés médico no son capaces de desarrollar a tan bajas temperaturas (técnica de enriquecimiento en frío). Por otra parte, le confiere a la bacteria una ventaja ya que es capaz de desarrollar en alimentos refrigerados y así dar origen a infecciones a partir del consumo de los mismos. No son exigentes nutricionalmente. Son catalasa positivos (a diferencia de los *Streptococcus* spp), fermentan azúcares como la glucosa, manosa y ramnosa, pero no el manitol (a diferencia de otras especies no patógenas); también hidrolizan la esculina. Tienen cuatro flagelos, los que se pierden cuando ingresan al ser humano. Cuando se siembran en medios semisólidos en tubo y se incuban a 25°C, muestran una movilidad característica en aspecto de "sombrija", la cual no se observa cuando se incuba a 37°C.

Estructura antigénica

Los determinantes antigénicos más caracterizados son el antígeno O (somático) y antígeno H (flagelar) que permiten la clasificación en diferentes serotipos. Hasta la fecha se han descrito 13 serotipos. La mayoría de las infecciones humanas son producidas por un serotipo en particular (4b), mientras que en alimentos predominan otros serotipos diferentes. La serotipificación es útil en estudios epidemiológicos.

Determinantes de patogenicidad

Explicarían en parte la capacidad de *L. monocytogenes* de proliferar dentro de las células ya que es un microorganismo intracelular facultativo (principalmente en macrófagos y células epiteliales).

- Productos solubles excretados: listerolisina O (LLO), es una hemolisina. Su prototipo es la estreptolisina O y la pneumolisina, de los estreptococos. Rompe la membrana del fagosoma y permite la reproducción de la bacteria en un medio menos hostil, el citoplasma de la célula huésped. Además, inhibe el procesamiento del antígeno mediado por macrófagos. Recientemente se ha demostrado que genera un influxo de calcio extracelular que estimula el ingreso de la bacteria en las células epiteliales. Codificada por el gen *hly*.
- Internalinas: se conocen dos proteínas, A y B, que están involucradas en el ingreso a las células.
- Sideróforos: componentes bacterianos que captan hierro, mineral indispensable para la supervivencia bacteriana.
- Otros: fosfolipasas, etc.

Infección clínica

Epidemiología

De distribución mundial, ubicuo en la naturaleza se encuentra en diferentes animales, suelos, plantas y agua. Al parecer su hábitat primario es el suelo y la materia vegetal en descomposición. Además se halla en el intestino del 5 al 10% del hombre, sin causar enfermedad. Es un importante patógeno veterinario y se transmite al hombre por el consumo de alimentos contaminados de origen animal. Es por lo tanto, otro ejemplo de zoonosis y ETA. Tiene una tasa de mortalidad mayor a la de otras bacterias de transmisión alimentaria.

Patogenia

Es importante recordar que la inmunidad del huésped es en general efectiva contra *Listeria* y que se desarrolla enfermedad dependiendo de la dosis infectante (se requiere altas dosis, mayor a 10^9), de los determinantes de virulencia, y de la inmunidad celular del huésped.

Ingresan por vía digestiva e inducen la fagocitosis por parte del enterocito, siendo incluidas en un fagosoma (antes de formarse el fagolisosoma), del cual escapan rápidamente para multiplicarse en el citoplasma de la célula huésped. Una de las proteínas responsables de esto es la LLO. En el interior del citoplasma celular son capaces de polimerizar los filamentos de actina en uno de los polos bacterianos. De esta forma es impulsada hacia la periferia, a la membrana citoplasmática, formando allí protrusiones o pseudópodos lo que le permite luego penetrar en otra célula adyacente. Así, es capaz de moverse célula a célula sin estar expuesta a los anticuerpos, el complemento o los polimorfonucleares. Por ello es más importante la inmunidad celular que la humoral.

Finalmente alcanzan el torrente circulatorio y de allí alcanzan otros órganos, teniendo predilección por el sistema nervioso central y la placenta.

La infección connatal se trasmite de diferente manera. Las mujeres embarazadas infectadas pueden transmitir la infección al feto por vía transplacentaria. No se ha demostrado claramente la transmisión en el canal de parto.

Manifestaciones clínicas

Se describen dos tipos de listeriosis: materno-fetal y no materno-fetal.

En el primer caso, la mujer embarazada sufre infecciones en general leves y autolimitadas

(excepto cuando se produce corioamnionitis) que pueden incluso pasar desapercibidas, o que se manifiestan por malestar general, cefaleas, mialgias, fiebre de bajo grado. En cambio la infección en el feto es grave y puede dar lugar a óbito o al parto prematuro de un recién nacido infectado. El espectro de manifestaciones clínicas en el recién nacido es similar al producido por *Streptococcus agalactiae*, son: un cuadro de instalación precoz de sepsis, y un cuadro de instalación tardía que se manifiesta en general por meningitis. Es discutido si este último ocurre cuando la transmisión se produce en el canal de parto, ya que esta vía de infección no se ha demostrado claramente.

La principal forma de presentación de la listeriosis no materno-fetal es la bacteriemia sin foco evidente. Le sigue en frecuencia la meningitis. En los últimos años, varias investigaciones han sugerido que *Listeria* puede causar gastroenteritis, incluso en adultos inmunocompetentes. Debido a que por lo menos un 5% de personas sanas son portadoras intestinales de *Listeria*, es difícil determinar si son agentes etiológicos de diarrea. Otras infecciones mucho menos frecuentes incluyen: endocarditis, infecciones localizadas (conjuntivitis, infecciones de piel, linfadenitis), abscesos profundos, etc.; se descartó como agente de infección cervicovaginal clínica.

Sensibilidad antibiótica

Es sensible a penicilina, ampicilina, eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol y rifampicina. Es moderadamente sensible a las quinolonas y las cefalosporinas de tercera generación carecen de efectividad *in vitro*. Recientemente aparecieron cepas resistentes a cloranfenicol, macrólidos y rifampicina. Para el tratamiento es necesario que estos antibióticos penetren las células, y en casos de meningitis que atraviesen la barrera hematoencefálica; para esto se utiliza ampicilina con un aminoglucósido como gentamicina.

Prevención

No se dispone de vacunas. La profilaxis depende de las medidas de control que se aplican para cualquier enfermedad de transmisión alimentaria, con especial cuidado en las mujeres embarazadas y personas inmunocomprometidas.

ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE

La enfermedad humana por este agente es muy poco frecuente y se limita a trabajadores de la pesca, de mataderos, carniceros, etc., configurando una enfermedad laboral. Es un microorganismo ampliamente distribuido en la naturaleza. Es un bacilo Gram positivo, microaerófilo y exigente, que no produce cápsula ni esporas. Es inmóvil, catalasa negativo, produce H₂S y alfa hemólisis. Como uno de los mecanismos de patogenicidad presenta hialuronidasa y neuraminidasa.

Produce una celulitis "erisipeloides" caracterizada por una lesión eritematosa púrpura, dolorosa, no supurada, pruriginosa. En general el proceso es autolimitado y rara vez causa enfermedad sistémica. Produce además endocarditis. Es sensible a penicilina (puede sustituirse por eritromicina en alérgicos).

No esporulados irregulares

CORYNEBACTERIUM

Es un género con numerosas especies (más de 46), algunas de ellas forman parte de la flora normal de mucosas y piel del ser humano; excepcionalmente algunas de ellas causan enfer-

medad en pacientes inmunodeprimidos. La especie patógena por excelencia es *C. diphtheriae*, responsable de una grave enfermedad: la difteria.

Son bacilos pleomórficos, no esporulados y no ácido-alcohol resistente. La mayoría fermentan la glucosa y son catalasa positivos. Su genoma contiene de 51 a 68 mol % de G + C, y mediante el estudio del 16s rARN se lo encontró estrechamente relacionado con *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*.

Corynebacterium diphtheriae

Es por excelencia la especie más importante del género. Se describen cuatro biotipos: *gravis*, *mitis*, *belfanti* e *intermedius*; su importancia es epidemiológica.

Morfología y fisiología de C. diphtheriae

Microscopía: bacilo delgado en forma de clava, mide 1,5-5 μm de ancho y 0,5-1 μm de largo; es Gram positivo, no esporulado e inmóvil. Aparecen agrupados formando estructuras que semejan letras chinas. Con azul de metileno se observan gránulos metacrómicos característicos que los diferencian de otras especies de *Corynebacterium*.

Macroscopía: las colonias típicas son pequeñas, blanco grisáceas brillantes. En medios selectivos con telurito se ven grisáceas a negras. La presencia y el tipo de hemólisis es variable.

Es un microorganismo anaerobio facultativo, pero crece mejor en medios aerobios. Es exigente desde el punto de vista nutricional. Su pared celular está compuesta por ácido mesodiaminopimélico (no L-lisina), polímeros de arabino galactano y ácidos micólicos de cadena corta (por ello su posición taxonómica y su relacionamiento con *Nocardia*, *Mycobacterium* y *Rhodococcus*).

Resistencia: dentro de los bacilos no esporulados *C. diphtheriae* es uno de los más resistentes a la luz, desecación y congelamiento. Pero son susceptibles a los desinfectantes de uso habitual.

Estructura antigénica

Los más caracterizados son:

- Antígeno K: son proteínas termolábiles localizadas sobre la superficie, son uno de los principales factores de virulencia. Responsables de la especificidad de tipo.
- Antígeno O: es un polisacárido que contiene arabinogalactanos y es el antígeno responsable de la reactividad cruzada con *Mycobacterium* y *Nocardia*.
- Factor de cordón: glicolípido un muy importante factor de virulencia.
- Toxina

Determinantes de patogenicidad

Los más importantes son:

- Factor de cordón: contiene los ácidos micólicos propios de *C. diphtheriae*, tiene actividad similar al de *Mycobacterium* spp; en las células del ratón provoca rotura de las mitocondrias, disminución de la respiración y la muerte.
- Antígeno K: antes mencionado, responsable de inmunidad antibacteriana, hipersensibilidad e inmunidad antitóxica. Provee invasividad junto al factor de cordón.
- Neuraminidasa y N-acetilneuraminato liasa.
- Exotoxina: es el principal determinante de patogenicidad y explica casi todos los síntomas sistémicos de la enfermedad.

Dicha toxina es producida por las cepas de *C. diphtheriae* infectadas por un bacteriófago

temperado que transporta el gen estructural para la toxina; en general es un fago β tox^+ . La expresión del gen *tox* está sumamente regulada por factores genéticos y fisiológicos. La toxina sólo se produce a niveles máximos cuando declina el crecimiento bacteriano, cuando las concentraciones de hierro en el medio disminuyen. Esto parece estar regulado de forma que cuando hay hierro en el medio se forma un complejo represor-hierro que se une específicamente al operador *tox* del fago β . En condiciones de baja concentración de hierro en el medio, el complejo se disocia y el gen *tox*, se desreprime y se sintetiza la toxina. La toxina se sintetiza a nivel de los polisomas de la membrana de *C. diphtheriae* y es secretada co-traduccionalmente como una cadena polipeptídica no tóxica. Adquiere su toxicidad al actuar la tripsina que pone al descubierto sus sitios enzimáticos activos. Es un modelo A-B de toxina: la subunidad B (sitio de unión a la célula eucariota) unida a la subunidad A (sitio enzimático activo) por un puente disulfuro. Acción: la toxina ingresa a la célula y al llegar al citoplasma altera la síntesis proteica. La subunidad A produce una ADP-ribosilación del factor de elongación EF-2 de los ribosomas celulares, lo que produce su inhibición. Los ribosomas al poseer un solo EF-2 quedan inhibidos por una sola subunidad A. Se produce así la inhibición de la síntesis proteica lo que lleva rápidamente a la lisis celular, produciendo necrosis e inflamación local de la mucosa. Además, esta toxina es la responsable de los efectos sistémicos de la enfermedad ya que produce toxicidad cardíaca, del sistema nervioso central y periférico, y daño renal.

Infección clínica de *C. diphtheriae*

Epidemiología

La difteria es una enfermedad de distribución mundial, pero con una incidencia notablemente variable según el grado de inmunización en la región. En nuestro país, la vacunación se incluyó en el PAI (programa ampliado de inmunización) por lo que todos los niños están vacunados; lo que disminuye la frecuencia y la severidad de la enfermedad. La vacunación ha logrado que no existan casos notificados en nuestro país actualmente, el último caso se notificó hace alrededor de 30 años. El ser humano es el único huésped natural de *C. diphtheriae*. Los portadores asintomáticos y los individuos en etapa de incubación son las principales fuentes de infección.

Inmunidad

Se adquiere por la presencia en sangre de la antitoxina (anticuerpos antitoxina), adquirida de manera pasiva (como los lactantes de hasta 6 meses) o por inmunización activa (infección natural o vacunación). El estado inmune de una persona puede ser evaluado por medio de la prueba de Schick, similar al PPD utilizado en la tuberculosis.

Patogenia

Se trata de una enfermedad toxigénica. La bacteria no tiene gran capacidad de invasión y en general persiste en la superficie de las mucosas y la piel, desde donde produce la toxina con actividad sistémica.

La infección respiratoria se transmite principalmente por las gotitas de Pflügge y las lesiones cutáneas altamente infectantes son fuente de enfermedad faríngea y cutánea. Dicha transmisión se ve favorecida por el hacinamiento y el frío. Los microorganismos se establecen en la orofaringe y amígdalas y se reproducen con rapidez. Luego comienzan a secretar la exotoxina que produce necrosis local y gran respuesta inflamatoria con la producción de exudados fibrinosos, que se van organizando y forman una pseudomembrana gruesa y muy adherente.

Dicha pseudomembrana junto con el edema y las importantes adenomegalias locales producen obstrucción respiratoria alta (crup). Las manifestaciones sistémicas de la enfermedad se deben a la toxicidad cardíaca y del sistema nervioso periférico que produce la toxina.

Manifestaciones clínicas

- Enfermedad respiratoria: es una amigdalitis con fiebre y malestar general. Puede ser leve o muy grave cuando compromete nasofaringe y tráquea; las pseudomembranas, características de esta faringoamigdalitis, y el edema que se forman pueden llevar a la asfixia y a la muerte del paciente.
- Cutánea: se produce más frecuentemente en zonas cálidas del mundo.
- Complicaciones: disfunción miocárdica, afección de los pares craneanos y polineuritis periférica; todas lesiones reversibles.

Sensibilidad antibiótica

Es sensible a penicilina y eritromicina, como alternativa para pacientes alérgicos. Debe ser administrada tempranamente junto con la antitoxina.

Prevención

Inmunización activa

En nuestro país se realiza mediante la vacunación con la vacuna pentavalente en el 1^{er} año de vida que contiene toxoide diftérico, tetánico y gérmenes muertos de *B. pertussis*, además de polisacárido capsular de *H. influenzae* y antígenos del virus de la hepatitis B. Luego se hace refuerzo administrada solamente junto al toxoide tetánico. El toxoide diftérico se prepara a partir de la toxina diftérica tratada con formalina al 0,3% a 37°C.

NOCARDIA

Pertenece a la familia *Nocardiaceae*, suborden *Corynebacterineae*, perteneciente a los *Actinomycetes*. En el suborden se encuentran además otras familias como *Mycobacteriaceae* y *Corynebacteriaceae*. Comparte con estas dos familias los componentes de su pared: ácidos micólicos, galactosa, arabinosa, ácido mesodiaminopimélico, etc.

Comprende numerosas especies, pero las especies que infectan al hombre son: complejo *N. asteroides* y *N. brasiliensis*. Las infecciones producidas por este microorganismo son infrecuentes, pero está aumentando el número de casos reportados. Causa infecciones localizadas tanto como diseminadas en humanos, frecuentemente inmunodeprimidos, y en animales.

Morfología y fisiología

Macroscopía y microscopía: son cocobacilos ramificados que frecuentemente forman hifas aéreas (formando colonias algodonosas), parcialmente ácido-alcohol resistentes. Las colonias son de color naranja, de superficie y bordes irregulares, con un característico olor a tierra mojada, variable según la especie.

Son aerobios y moderadamente exigentes desde el punto de vista nutricional. Son de crecimiento lento, los cultivos en agar infusión, en Sabouraud, en Lowenstein-Jensen o en agar sangre pueden ser examinados al cabo de algunos días. Se pueden utilizar medios selectivos con antibióticos.

Infección clínica

La nocardiosis es una infección mundialmente distribuida. Afecta fundamentalmente a pacien-

tes inmunodeprimidos, pero no en forma exclusiva. La resistencia del huésped a la infección depende del número y de la capacidad fagocítica y lítica de los polimorfonucleares y otras células de defensa. El hecho que la enfermedad afecte de forma importante a los pacientes VIH positivos reafirma la importancia de la inmunidad celular en este tipo de infecciones.

La transmisión de la enfermedad se produce por la inhalación de partículas contaminadas, ocasionando nocardiosis pulmonar, o mediante inoculación cutánea directa en donde se produce celulitis y linfangitis. No existe evidencia aún de transmisión persona-persona.

La infección se manifiesta clínicamente por:

- Nocardiosis pulmonar: es una neumonía de evolución aguda o subaguda con formación de abscesos y cavitación. Habitualmente provocada por *N. asteroides*
- Nocardiosis cutánea y subcutánea: puede producir el clásico micetoma (enfermedad crónica de la piel y el tejido celular subcutáneo que destruye progresivamente la piel, el celular subcutáneo, las fascias, el músculo, llegando al hueso) además de celulitis, pústulas, etc. En general causada por *N. brasiliensis*.
- Nocardiosis sistémica: a partir de las dos formas anteriores pueden producirse bacteriemias y afectar el sistema nervioso central, la piel y tejido subcutáneo, los riñones, articulaciones, huesos, corazón y ojos. Tanto la infección pulmonar como la sistémica no son infecciones autolimitadas por lo que requieren de correcto tratamiento antibiótico y muchas veces cirugía.

Determinantes de patogenicidad

La composición diferente de su pared y la presencia de factor de cordón o dimicolato de trehalosa parecen permitirle la vida en el interior celular. También los niveles altos de lactosa y superóxido dismutasa.

Sensibilidad antibiótica

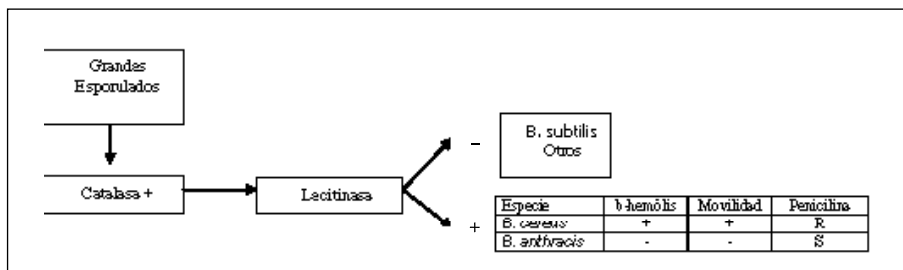
Son sensibles a las sulfonamidas, trimetoprim-sulfametoxazol y dapsona con sulfato de estreptomina. Son sensibles además a ampicilina, que muestra actividad sinérgica con imipenem, con cefalosporinas de tercera generación y con trimetoprim-sulfametoxazol. Se tratan habitualmente con sulfas o con cotrimoxazol.

RHODOCOCCUS

Es otro género bacteriano que integra la familia *Nocardiaceae* y comparte muchas de sus características biológicas. Crece formando colonias rosadas extendidas sobre agar infusión-sangre con o sin sustancias selectivas agregadas. Produce infecciones oportunistas, en especial de pulmón y de partes blandas, en pacientes inmunocomprometidos (VIH positivos), con frecuente invasión sanguínea.

Identificación de bacilos Gram positivos (BGP)

Al igual que para la identificación de cualquier especie bacteriana, lo primero a realizar es un frotis con tinción de Gram. Luego debemos conocer los requerimientos atmosféricos de la cepa a identificar, ya que sabemos que este grupo posee tanto bacterias aerobias como aerobias facultativas y anaerobias. Para esto sembramos en un caldo de tioglicolato. Realizaremos posteriormente un cultivo en medios agar simple, agar sangre y las diferentes pruebas bioquímicas.



* Lecitinasa: se siembra la bacteria en agar yema de huevo (agar TSA con el agregado de 10% de yema de huevo) y se observa luego un halo de opacificación del medio alrededor de la colonia

Con las características observadas, nos orientamos al género (por ej.: la presencia de esporos en un BGP aerobio o facultativo nos orienta a *Bacillus*; la presencia de cocobacilos pequeños nos orienta a *Listeria*; los bacilos irregulares en letras chinas o empalizadas nos orientan al género *Corynebacterium*).

GÉNERO BACILLUS

Microscopía: se observan bacilos Gram positivos grandes (1 por 3 a 10 μm) de extremos rectos, aislados, en pares o cadenas con tinción de Gram. Se observan áreas claras sin teñir que corresponden a endosporas, ovoides, de posición subterminal, que no deforman el soma bacteriano. Pueden teñirse con técnicas de coloración especiales como el verde de Malaquita. La endospora solo se observa a partir de cultivos viejos o mediante técnicas que provoquen la esporulación, no a partir de muestras clínicas. Lo opuesto sucede con la expresión de la cápsula, que se pierde al ser cultivada en medios artificiales.

Macroscopía: para su observación deben ser cultivados en medios ricos y simples tales como agar sangre, agar chocolate y agar nutriente. Su morfología es variable según la especie:

- *B. anthracis*: colonias grandes, grises, opacas, chatas, de bordes irregulares que remedan una cabeza de medusa. Son no hemolíticas.
- *B. cereus*: colonias grandes, blancogrisáceas, opacas, beta hemolíticas.
- *B. subtilis*: colonias grandes, chatas, con pigmento naranja, pueden ser beta hemolíticas

Para su cultivo a partir de muestras clínicas con contaminantes pueden realizarse técnicas que eliminan las formas de vida vegetativa y solo permiten la sobrevivencia de esporas; estas técnicas son shock de calor o shock de alcohol. También se utilizan medios selectivos como el PLET para *B. anthracis*.

Algunas pruebas para identificación de especie

Es un desafío para el microbiólogo diferenciar *B. anthracis* de las muchas especies no patógenas que se encuentran en el ambiente como contaminantes. Las pruebas más comúnmente realizadas son las que se observan en el diagrama (en la parte superior): lecitinasa, movilidad, susceptibilidad a la penicilina, y otras como indol, nitratos, citrato, voges proskauer, etc.; además de la observación de la macroscopía y microscopía, bastante características de cada especie en particular.

También se pueden utilizar técnicas de biología molecular como análisis de los fragmentos de restricción o métodos inmunológicos para detección de las toxinas.

GÉNERO LISTERIA

Microscopía: cocobacilos (0,4 por 1,0 a 2,0 μm), dispuestos al azar. Pueden parecerse a *Corynebacterium* y a los estreptococos.

Macroscopía: no son exigentes desde el punto de vista nutricional pero conviene cultivarlas en agar sangre. Para las muestras provenientes de alimentos o muestras clínicas de sitios no estériles existen numerosos medios de enriquecimiento. Pueden ser cultivadas a 35°C. El enriquecimiento se suele hacer a temperaturas menores. La movilidad en medio semisólido se observa mejor a 25°C y no a 35 o 37°C. En agar simple se observan colonias pequeñas, grises translúcidas, circulares, de bordes lisos. En agar sangre producen β -hemólisis estrecha.

Requerimientos atmosféricos: se observa turbidez a lo largo de todo el tubo de tioglicolato, por lo que concluimos que es anaerobia facultativa.

Algunas pruebas bioquímicas para identificación del género *Listeria*

- Catalasa positivos (excepto algunas cepas), oxidasa negativos.
- Fermentación de hidratos de carbono: glucosa positivos.
- Hidrólisis de la esculina positiva.
- TSI A/A sin gas ni sulfhídrico.
- Rojo de Metilo y Vogues Proskauer: ambos positivos.

Especie *L. monocitogenes*

- Fermentación de hidratos de carbono: xilosa negativo, manitol negativo, ramnosa positivo, salicina positivo.
- Hemólisis: beta, angosta. Es importante, ya que la diferencia de *L. innocua* (contaminante de alimentos pero no patógena) que no la posee; y de *L. ivanovii*, que posee una amplia zona de hemólisis beta.
- Catalasa positivo. Esta prueba es importante ya que permite diferenciar a *L. monocitogenes* de *Streptococcus* beta hemolíticos, que poseen características morfológicas similares.
- CAMP: se observa potenciación de la beta hemólisis en forma de cabeza de fósforo. Esto es debido a la presencia de alfa lisina y listeriolisina O (similar a la estreptolisina de *Streptococcus*). *L. seeligeri* también es positivo.
- SIM: a 37°C no se observa movilidad, a 25°C se observa movilidad en forma de paraguas.

Existen métodos inmunológicos para la detección de listerias a partir de alimentos pero aún no han sido desarrollados para muestras clínicas. Los métodos serológicos (para la detección de anticuerpos) aún no están bien desarrollados para diagnóstico clínico. Para la tipificación se pueden utilizar técnicas de biología molecular como: fagotipificación, ribotipificación, electroforesis en campos pulsados (de las técnicas más utilizadas al momento), entre otras.

CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE

Microscopía: se observan bacilos Gram positivos delgados, pleomórficos (en forma de clava), de alrededor de 1,5-5 μm de largo y 0,5-1 μm de ancho. Aparecen agrupados formando estructuras que semejan letras chinas. Con azul de metileno se visualizan los característicos gránulos metacromáticos.

Macroscopía: para su observación deben ser cultivadas por 24-48 h, en medios exigentes a 37°C y en una atmósfera enriquecida con 5% de CO₂. En agar sangre se observan colonias características: pequeñas, blanco grisáceas brillantes. Puede sembrarse en medio de Loeffler,

ya que si bien no se visualizan las colonias características, este medio aumenta la producción de gránulos metacromáticos. Para el cultivo directo de muestras clínicas se utilizan medios selectivos y diferenciales con telurito y cisteína como el CTBA o el Tinsdale. En estos medios las colonias se visualizan gris-negruscas, ya que reducen el telurito, y con un halo marrón alrededor de la colonia por poseer actividad cistinasa.

Luego pueden realizarse las siguientes pruebas: catalasa, metabolismo fermentador u oxidador, motilidad, producción de ureasa, reducción de nitritos, fermentación de diferentes hidratos de carbono, etc. Para comprobar si la cepa en cuestión posee la toxina deben realizarse pruebas que solo son realizadas por laboratorio de referencia:

- Prueba de Elek modificada: consiste en cultivar la cepa a estudiar en una placa de Petri con un medio especializado, junto con un disco impregnado en antitoxina; si la bacteria presenta la toxina, se visualiza luego de la incubación una zona de precipitación.
- Pruebas de biología molecular como PCR del gen *tox*; tiene la ventaja de poderse realizar directamente a partir de la muestra clínica. Otras pruebas como electroforesis en campos pulsados, análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción, ribotipificación, etc. son realizados para estudios epidemiológicos.
- ELISA: fue desarrollada recientemente para la detección de la toxina.

La cromatografía para la búsqueda de ácidos micólicos y otros componentes de la pared, también es utilizada en laboratorios de referencia para la identificación de cepas de *C. diphtheriae*.

GÉNERO NOCARDIA

Microscopía: bacilos Gram positivos delgados, dispuestos en cadenas cortas o largas. Puede realizarse una variante de coloración para bacilos ácido-alcohol resistentes (Kinyoun) en donde se pueden ver tanto ácido alcohol resistente (AAR) como no-AAR.

Las hifas aéreas pueden visualizarse tanto microscópicamente como macroscópicamente.

Macroscopía: observamos colonias secas, con un tinte anaranjado (*N. brasiliensis*) con particular olor a tierra mojada, dependiendo su aspecto de la especie, la temperatura y el tipo de medio de cultivo.

Para su cultivo pueden utilizarse medios tales como: agar Sabouraud dextrosa, agar cerebro-corazón infusión, agar sangre, Lowenstein Jensen y Middlebrook. Deben incubarse a 37°C, en donde se visualizarán colonias entre el segundo día de incubación y las 3 semanas.

Para la identificación se utilizan las características micro y macroscópicas además de requerimientos de cultivo, tipo de metabolismo de la glucosa, producción de arylsulfatasa, crecimiento en presencia de lisozima y caracterización molecular.

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. Tenenbaum FC. Tenover FC. Editors. Manual of Clinical Microbiology. 8ª ed. Washington, D.C. ASM Press. 2003.
- www.pasteur.fr. Interactions Bactéries-Cellules. Responsable P. Cossart.
- www.pasteur.fr. Listeria. Responsable P. Martin.
- Swartz M. Recognition and management of anthrax-An update. New England Journal of Medicine. 2001 Nov 29;345(22):1621-1626.
- Corti ME and Villafaña Fioti AM. Nocardiosis: a review. International Journal of Infectious Diseases. 2003, 7 (4); 243-250.

