

## **Bacterias Gram negativas exigentes: *Neisserias, Haemophilus, Bordetella y Brucella***

María Eugenia Torres

### **I. *Neisserias***

El género *Neisseria* comprende dos especies patógenas para el hombre; siendo éste el único reservorio conocido: *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*. Otras especies de *Neisseria* no patógenas, se encuentran habitualmente formando parte de la flora normal de la orofaringe.

La familia *Neisseriaceae* comprende varios géneros: *Neisseria, Moraxella, Acinetobacter* y otros.

*Branhamella catarrhalis* (estrictamente *Moraxella catarrhalis*), inicialmente incluido en esta familia ha sido actualmente reclasificado como un subgénero de *Moraxella*. Las técnicas de identificación de este germen son similares a las de la familia *Neisseriaceae*. Su crecimiento en medios simples a temperatura de 22°C, su incapacidad de fermentar hidratos de Carbono y la producción de una desoxirribonucleasa permiten su identificación.

Un gran porcentaje de cepas producen β-lactamasas. Este germen que sido implicado en los últimos años como agente de diversas enfermedades infecciosas, entre ellas otitis media en niños, exacerbación de bronquitis crónica y neumonía, sobre todo en pacientes con enfermedad respiratoria subyacente.

El género *Acinetobacter* está compuesto por bacterias cocoides o cocobacilos Gram negativos, oxidasa negativos no exigentes. Forman colonias lisas, blancas o grisáceas a veces hemolíticas, similares a las de las enterobacterias. Los miembros de este género habitan en el agua y el suelo, también formando parte de la flora normal humana de la piel. Estos sitios suelen ser el reservorio de la bacteria en hospitales y causar brotes, en los que el germen se comporta como oportunista. Las puertas de entrada al organismo son en general tubos endotraqueales, sondas, catéteres y otros cuerpos extraños. Suelen presentar resistencia a múltiples antibióticos.

### **MORFOLOGÍA**

Las bacterias del género *Neisseria* son cocos Gram negativos, inmóviles que se agrupan en pares en diplococos, cuya forma se ha comparado a granos de café. El citoplasma y la ultraestructura son muy similares en *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae* y comparten 80% de sus secuencias de bases del ADN. Aunque son Gram negativas, contienen endotoxinas, y tienen ultraestructuralmente una pared celular típica de las bacterias Gram negativas se parecen a los cocos piógenos en su patogenicidad y su sensibilidad

intrínseca a la Penicilina. Ambas especies pueden colonizar las mucosas sin causar síntomas. La enfermedad causada por *N. gonorrhoeae* es, en general, localizada, y muy raramente diseminada; en cambio *N. meningitidis* produce enfermedad grave, diseminada, muchas veces fatal. Esto podría deberse a que *N. meningitidis* presenta una cápsula polisacáridica bien definida. Ambas especies poseen fimbrias o pili, las cuales han sido relacionadas con la virulencia.

### **METABOLISMO**

Son aerobios, y las especies patógenas son exigentes desde el punto de vista de sus requerimientos nutricionales (agar sangre o agar chocolate), de temperatura (crecen a 37° pero no a 22°) y atmosféricos (atmósfera con 5 a 7 % de CO<sub>2</sub>). Son oxidasa positivos. Estos requerimientos de cultivo, así como el patrón de fermentación de distintos azúcares (en especial glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa y fructosa) se utilizan para diferenciar las distintas especies de *Neisserias* (tabla 1)

Las reacciones de fermentación de azúcares se realizan en medio semisólido CTA (agar cisteína tripticasa) con 1% de cada carbohidrato; produciéndose sólo pequeñas cantidades de metabolitos ácidos en las reacciones positivas.

*B. catarrhalis* produce desoxirribonucleasa, lo que permite diferenciarla de *Neisseria*.

Las especies patógenas del género *Neisseria* son bacterias extremadamente sensibles a las condiciones ambientales adversas como las temperaturas extremas, cambios de pH y desecación; lo que debe ser tenido en cuenta en la recolección y el transporte de las muestras clínicas al Laboratorio.

### ***Neisseria meningitidis*:**

Este germen causa principalmente meningitis, meningococcemia y más raramente otros cuadros clínicos.

### **Estructura antigénica**

La presencia de cápsula esta asociada a la virulencia. Las cepas que colonizan las membranas mucosas sin producir enfermedad en general no son capsuladas. Sobre la base de diferencias antigénicas del polisacárido capsular se han identificado al menos trece **serogrupos**. Estos son: A, B, C, D, 29E, H, I, K, L, W135, X, Y, y Z. Estos antígenos capsulares pueden ser puestos en evidencia por distintas técnicas (aglutinación de partículas de látex o

contraelectroforesis) ya sea en una cepa aislada o directamente en el líquido cefalorraquídeo.

La mayoría de las enfermedades invasivas son producidas por los serogrupos A, B, C, W135 e Y. Han sido descritas epidemias de meningitis causadas por el serogrupo A, mientras que los grupos B y C causan fundamentalmente enfermedad en forma esporádica o endémica.

La estructura de estos polisacáridos ha sido extensamente estudiada y se conoce para la mayoría de los serogrupos. El antígeno capsular del grupo A consiste en fosfato N-acetil-O-acetilmanosamina, el polisacárido del serogrupo B es el ácido N-acetilmurámico 2→8 α ligado que contiene ácido siálico y el del serogrupo C es el ácido neuramínico O-acetilo 2→9 α acetilo ligado.

La identificación y purificación de estos antígenos ha dado como resultado la producción de vacunas efectivas para los serogrupos A, C, Y y W135.

El polisacárido capsular del grupo B, por sí solo no es inmunogénico. Se han encontrado similitudes antigénicas entre este polisacárido y los de otras bacterias no relacionadas como *E. coli* K1 (que causa meningitis en el recién nacido).

En base a antígenos subcapsulares (componentes de la pared celular) las cepas de *N. meningitidis* se clasifican a su vez en serotipos, subtipos e inmunotipos.

Hay 5 clases de proteínas de membrana externa (Omp, por sus siglas en inglés) mayores que se designan con cifras del 1 al 5 y que se diferencian por su peso molecular, mapa peptídico y patrón electroforético. El **serotipo** se basa en reacciones serológicas utilizando anticuerpos monoclonales anti proteína 2 o 3 (una cepa tiene proteína 2 ó 3 pero no ambas a la vez). El **subtipo** se define en diferencias antigénicas de la Omp 1. El **inmunotipo** se define sobre la base de diferencias antigénicas del LPS.

Cada serogrupo contiene cepas con una variedad de tipos, subtipos e inmunotipos; no hay tipos restringidos a un determinado serogrupo.

Por ejemplo, a la fecha hay aproximadamente 20 serotipos, 7 subtipos y 8 inmunotipos dentro del serogrupo B; pero hay muchas cepas no tipificables. De acuerdo a una convención, una cepa puede ser designada

B:15:P1.3:L3,8 serogrupo B  
serotipo 15  
subtipo 3  
inmunotipo 3 y 8

Estos sistemas se utilizan en laboratorios de referencia con fines epidemiológicos, para caracterizar las cepas

que circulan en una comunidad en un determinado momento y para desarrollar vacunas.

Otros métodos para tipificar cepas se basan en la movilidad electroforética de enzimas metabólicas producidas por *N. meningitidis*. Este método, denominado electroforesis de enzimas multilocus es útil para caracterizar el genoma y agrupar cepas por su relación genética. Existen al menos 78 tipos electroforéticos en esta clasificación.

#### **Atributos de virulencia:**

El polisacárido capsular parece ser el factor mayor que contribuye a la virulencia. La presencia de cápsula le confiere a la bacteria la capacidad de sobrevivir en el torrente sanguíneo ya que esta impide la fagocitosis; sólo cuando el paciente ha desarrollado anticuerpos anticapsulares específicos la bacteria puede ser opsonizada, esto es lisada con la colaboración del sistema del complemento.

**Endotoxina:** Básicamente es similar a otros lipopolisacáridos en su estructura. Se caracteriza por ser un LPS fuertemente inductor del fenómeno de Shwartzman-Sanarelli, con una potencia notablemente superior a la del LPS de otros Gram negativos. Durante el crecimiento de *N. meningitidis* se liberan al medio grandes cantidades de LPS que dañan al endotelio causando una importante respuesta inflamatoria y necrosis vascular.

**Proteasa de IgA:** Es producida por todos los serogrupos y liberada al medio. Es una endopeptidasa con una gran afinidad por la IgA humana.

**Sustancias quelantes del hierro:** El hierro es esencial para el metabolismo de la bacteria y ella compete con el huésped por él por medio de estos factores.

**Pili:** Como es sabido son filamentos proteicos, pequeños que se extienden desde la superficie de la bacteria y cuyo papel es fundamental en la patogenia ya que median la adherencia a las superficies mucosas. Aunque han sido menos estudiados que los pili de *N. gonorrhoeae*, serían similares en cuanto a su estructura. Median la adherencia de *N. meningitidis* a la mucosa nasofaríngea y son importantes en la determinación del estado de portador. También ha sido postulado que intervendrían en traspasar la barrera hematoencefálica e interactuar con las meninges. Las bases moleculares de estas interacciones no han sido aún del todo aclaradas, pero parece tratarse de una interacción con un receptor específico tanto en lo anatómico (epitelio nasal anterior) como para la especie humana.

#### **PATOGENIA**

*N. meningitidis* ingresa a través de las vías aéreas

superiores y se establece en la mucosa nasofaríngea. No ha sido aún aclarado como el germen atraviesa la mucosa e ingresa a la circulación.

La enfermedad meningocócica es el resultado de la invasión del torrente sanguíneo. Los pacientes susceptibles son aquellos que carecen de anticuerpos anticapsulares específicos, que son bactericidas. Los individuos con anticuerpos anticapsulares específicos - producidos posiblemente como respuesta a la colonización previa por *N. meningitidis* o bien a antígenos relacionados de otros gérmenes de la flora normal- resisten a la capacidad del germen de invadir el torrente circulatorio. Los anticuerpos son opsoninas y determinan que el germen sea destruido.

Una vez en el torrente circulatorio se multiplican y con gran rapidez pueden llegar a concentraciones que están entre las más elevadas que se conocen. Incluso las bacterias pueden ser vistas en frotis de la capa leucocitaria.

El ingreso de *N. meningitidis* al torrente circulatorio puede llevar a una entidad denominada "purpura fulminans" con coagulación intravascular diseminada, manifestaciones cutáneas -petequias y equimosis-, meningitis, shock y muerte. La coagulación intravascular diseminada, el shock y la fiebre son respuestas a la endotoxina mediadas por el factor de necrosis tumoral y la interleuquina 1. Así, estos signos son consecuencia directa de la capacidad de *N. meningitidis* de sobrevivir y multiplicarse en el torrente circulatorio.

Los aspectos clínicos serán desarrollados con más detalle en el capítulo de Meningitis aguda supurada.

#### **DIAGNOSTICO MICROBIOLÓGICO**

Frente a un cuadro clínico compatible con meningitis se deberá realizar una punción lumbar para obtener datos de la composición citoquímica del líquido cefalorraquídeo y para estudio microbiológico. Debe recordarse la labilidad de los gérmenes que causan meningitis y transportar la muestra de inmediato al laboratorio. Una vez en el laboratorio de bacteriología, el LCR será sometido a examen directo, cultivo y detección de antígenos capsulares de los distintos agentes de meningitis.

El examen directo con coloración de Gram es sencillo y rápido. Permite una orientación inicial de la terapéutica siempre y cuando lo realice un técnico experimentado.

El cultivo se realizara en agar sangre, agar chocolate y medios de enriquecimiento; deben recordarse los requerimientos de atmósfera del germen.

A las colonias sospechosas se les realiza coloración de

Gram, prueba de oxidasa y propiedades bioquímicas.

El laboratorio puede además realizar la determinación del serogrupo mediante antisueros específicos.

Las cepas pueden conservarse congeladas a -70° C para estudios posteriores.

#### **SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS:**

La Penicilina continúa siendo el tratamiento de elección para la meningitis meningocócica. Esta droga es bactericida y atraviesa la barrera hematoencefálica. En el momento actual no parece ser necesario realizar estudios de susceptibilidad en forma rutinaria ya que son sensibles a la Penicilina.

Se han descrito raros casos de cepas con alteraciones a nivel de las proteínas fijadoras de Penicilina (PBP) que hacen aumentar la concentración inhibitoria mínima a la droga.

#### **PROFILAXIS**

Los sujetos que han estado en contacto con el paciente deben ser sometidos a quimioprofilaxis para evitar casos secundarios. Esta se realiza con Rifampicina por períodos cortos ya que esta droga es efectiva en eliminar el estado de portador.

**Vacunas:** Se dispone de vacunas para los serogrupos A y C que han sido utilizadas en caso de epidemias en diversos países, incluso el nuestro. En Estados Unidos existen vacunas tetravalentes anti A, C, Y y W135. En general son poco eficaces en menores de 2 años. Se estima que esto podría mejorar si se obtienen vacunas conjugadas con proteínas. La vacuna para prevenir la enfermedad por el serogrupo B continúa siendo un problema ya que el polisacárido capsular es poco inmunógeno y este es el serogrupo que causa la mayor parte de los casos en países desarrollados. Los investigadores han orientado su atención a otros antígenos como las proteínas de membrana externa para estimular la inmunidad. Se han desarrollado diversas vacunas basadas en estos antígenos de *N. meningitidis* grupo B pero no se han logrado, a la fecha, niveles de eficacia que permitan recomendar su uso.

Las indicaciones para la vacunación serían:

- Niños y adultos con defectos de sus mecanismos de defensa tales como anesplenía o déficit de los componentes terminales del complemento.
- Prevención de los casos secundarios al contacto con el paciente. Estos casos secundarios pueden desarrollarse incluso semanas más tarde que el caso índice.
- Viajeros a áreas endémicas (*N. meningitidis* serogrupo A en el África sub-sahariana,

región conocida como "cinturón de la meningitis").

- Epidemias

Debe recordarse que es obligatorio notificar a las autoridades sanitarias por la vía más rápida todos los casos de meningitis (de esta y otras etiologías) ya que integra las enfermedades del grupo A, de notificación inmediata.

### ***N.gonorrhoeae***

Descrito en 1879 por Neisser en pus uretral, es el agente etiológico de la gonorrea.

Comparte las características del género en cuanto a la morfología celular. Para aislarlo de mucosas que presentan flora normal como uretra anterior o cuello uterino se requiere de medios especiales, enriquecidos con factores X (hemina) y V (NAD) que además contengan antibióticos para inhibir la flora. Existen diversos suplementos de antibióticos, el más conocido es el medio de Thayer-Martin que contiene Vancomicina, Colistina y Nistatina. El resto de los requerimientos de temperatura, humedad y atmósfera así como las propiedades bioquímicas utilizadas para su identificación son similares a los de *N. meningitidis*.

### **CARACTERÍSTICAS COLONIALES**

Luego de 18 a 24 horas de incubación se producen colonias cuyo aspecto puede diferir si se trata de un aislamiento reciente o si se han efectuado sucesivos pasajes "*in vitro*". Se distinguen cuatro formas principales; las colonias T1 y T2 se producen en cultivos primarios y son pequeñas y convexas. Luego de varios subcultivos se obtienen colonias más grandes y aplanadas llamadas T3 y T4. Esto se atribuye a la pérdida de la expresión de los pili. Cualquier tipo de colonia pueden diferir también en su opacidad. Esto depende de la presencia en la pared celular de una molécula llamada proteína II.

### **TIPIFICACIÓN DE CEPAS**

Se dispone de varios métodos para caracterizar cepas de *N. gonorrhoeae* con fines epidemiológicos.

Los más desarrollados son los métodos serológicos y la auxotipificación que pueden usarse por separado o en combinación. También los perfiles de resistencia a antimicrobianos se utilizan con fines epidemiológicos.

Los métodos serológicos se basan en diferencias en antígenos de superficie como proteína I o pili y en general se realizan por técnicas de coaglutinación.

**Auxotipificación:** Por el crecimiento de *N. gonorrhoeae* en medios de cultivo químicamente definidos se han podido conocer las necesidades de ciertos factores de crecimiento y sobre estas bases se han definido los llamados auxotipos. Estas son

características estables de una determinada cepa que se utilizan como marcadores en estudios sobre virulencia, capacidad invasiva y sensibilidad a antimicrobianos.

Se ha observado que algunas cepas precisan para su desarrollo la presencia de arginina, hipoxantina y uracilo, lo que se denomina auxotipo AHU o bien Arg-Hyx-Ura-. En general este auxotipo se corresponde con cepas muy sensibles a la Penicilina y a la vez muy resistentes a la acción bactericida del suero humano normal, dando muchas veces infecciones diseminadas.

### **Antígenos de superficie. Determinantes de patogenicidad:**

Por técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida se separan diversas proteínas de superficie de *N. gonorrhoeae*.

\* **Pili:** Son apéndices que emergen como proyecciones desde la superficie de la bacteria. Están constituidos por subunidades proteicas o pilina. Son un factor importante en la virulencia y su función principal es mediar la adherencia de la bacteria a las células del huésped, especialmente a las microvelocidades del epitelio columnar. Se cree que los pili capacitan a la bacteria para vencer fuerzas de repulsión electrostática que existen normalmente entre las bacterias y las células del huésped. También le confieren al germen una mayor resistencia a la fagocitosis. *N. gonorrhoeae* puede variar de fase, es decir, presentar alternativamente formas con pili o sin ellos; en un proceso estrechamente regulado desde el punto de vista genético.

Además de esta variación de fases, los pili pueden presentar una importante variación antigénica, esto es cambios antigénicos en la proteína de los pili expresada. La variación antigénica está determinada por la inserción o delección de unos pocos residuos de aminoácidos y ocurre a nivel del extremo carboxi terminal de la pilina. Este proceso también está controlado en el cromosoma bacteriano, por diversos genes. La porción variable, terminal, de la pilina es justamente el blanco de la respuesta inmunitaria por lo que la variación antigénica a ese nivel representa un mecanismo de escape para evadir las defensas del huésped.

Por su papel fundamental en la patogenia, los pili han sido objeto de múltiples investigaciones como candidatos al desarrollo de vacunas; pero su extremo grado de variabilidad antigénica han hecho perder el entusiasmo en una vacuna de este tipo.

\* **Proteína I:** Es la mayor de las proteínas de membrana externa de *N. gonorrhoeae*, con un peso molecular de 32 a 37 kilodaltons.

Actúa como porina, formando un canal hidrofílico a través de la membrana externa. Es posible que también intervenga en la fagocitosis, paso importante en la patogenia de la gonorrea.

A diferencia de otras proteínas de membrana externa de este germen, esta es expresada en forma constante, por lo que ha sido utilizada como sistema para tipificar cepas. Existen dos subclases de proteína I, denominadas IA y IB. Cada una de ellas tiene decenas de variantes, lo que define serovariedades. Habitualmente, en una determinada región geográfica sólo unas pocas serovariedades son prevalentes.

Como respuesta a la infección se producen anticuerpos opsonizantes anti proteína I en suero y secreciones. Estos anticuerpos pueden ser protectores si la reinfección es causada por una cepa con la misma serovariedad de proteína I.

Por otra parte, se sabe que las cepas portadoras de proteína I subclase A se asocian más a menudo con enfermedad diseminada y mayor resistencia al poder bactericida del suero humano, en tanto que las cepas IB tienden a producir enfermedad localizada (uretritis, cervicitis) y a ser resistentes a los antibióticos.

**\*Proteína II:** Es una familia de proteínas de membrana externa, de 24 a 30 kilodaltons de peso molecular que manifiestan una extensa variación antigénica de cepa a cepa e incluso dentro de una misma cepa. Esta proteína no siempre es expresada por la bacteria, cuando está presente, le otorga la capacidad de formar colonias opacas "in vitro". Desde el punto de vista funcional es importante ya que su presencia aumenta la capacidad de adherencia a células epiteliales y a neutrófilos. Cuando esta proteína no se expresa la bacteria forma colonias transparentes. Este tipo de colonias, en forma característica se obtienen de sujetos asintomáticos y de pacientes con formas diseminadas de la enfermedad.

**\* Proteína III:** A diferencia de las anteriores es estable en su composición. Existen proteínas similares en *N. meningitidis* y en otras bacterias. Es una proteína poco inmunogénica y tiene la capacidad de bloquear anticuerpos dirigidos contra otros antígenos de superficie. Su papel en la patogenia no se comprende aún. La proteína P.III tiene funciones de porina (al igual que P.I) que permite el ingreso a la bacteria de nutrientes de bajo peso molecular por difusión.

**\* Adhesinas:** Se ha postulado la presencia de otras moléculas con capacidad de adhesión, distintas de los pili pero no han sido bien caracterizadas todavía.

**\* Proteínas cuya expresión es inducida por condiciones del ambiente:** Llamadas proteínas de stress o de shock térmico. Son producidas por esta y

muchas otras bacterias como respuesta a condiciones desfavorables. Su función no está del todo aclarada pero se encuentran anticuerpos para ellas en ciertos pacientes.

**\* Proteínas reguladoras del Hierro:** Son una familia de proteínas, la mayor de ellas de 37 kilodaltons. Al igual que *N. meningitidis* y otras bacterias que viven en las mucosas, *N. gonorrhoeae* debe adquirir el Hierro de los depósitos del huésped; por lo tanto la presencia de este tipo de proteínas representa una ventaja para su supervivencia. Estas sustancias le permiten al germen adquirir el Hierro de la transferrina y la lactoferrina humanas y tal vez también de la hemoglobina. Pueden desarrollarse anticuerpos específicos contra ellas.

**\* Proteasa de Ig A:** Esta proteína cliva la inmunoglobulina A1 humana en la región bisagra, con lo que la inactiva. Se especula que este sería un mecanismo importante para inactivar la Ig A secretoria.

**\* Proteínas H.8:** Son dos lipoproteínas (LiP y Laz) de membrana externa que se detectan por anticuerpos monoclonales. Su función no se ha aclarado y se cree que H.8 Laz interviene en el transporte de electrones en la respiración bacteriana. Inducen la formación de anticuerpos no protectores.

**Lipooligosacárido:** Al igual que las en otros gérmenes Gram negativos actúa como endotoxina pero carece de las largas cadenas de polisacáridos que se encuentran en las

enterobacterias. Median la mayoría de los efectos tóxicos observables en los modelos experimentales.

Como los pili, el LOS presenta variaciones entre diversas cepas y en pasajes sucesivos de una misma cepa.

**Cápsula:** Algunos autores han descrito su presencia pero no se la aislado ni se ha aclarado su papel en la patogenia.

**Plásmidos:** La mayoría de las cepas presentan un plásmido de 2,6 megadaltons de función no conocida (plásmido críptico). Se han identificado al menos 5 plásmidos diferentes que codifican  $\beta$ -lactamasas y que se caracterizan por diferencias en su peso molecular. También se ha descrito un plásmido conjugativo que media la resistencia de alto nivel a la Tetraciclina (tet M).

**Patogenia de la infección por *N. gonorrhoeae*:**

El germen se disemina de persona a persona por contacto directo y estrecho con secreciones infectadas, habitualmente contacto sexual. Afecta en forma selectiva al epitelio no cornificado. La vaginitis no es una manifestación de la gonorrea en la mujer en edad

genital activa, pero sí en la etapa prepuberal o postmenopáusica.

No está del todo aclarado como el germen asciende por la vía genital, y se ha postulado que esto estaría favorecido por contracciones uretrales y uterinas, o tal vez vehiculizados por el esperma. Las mucosas producen IgA secretoria que podría ser clivada por la proteasa. Una vez que entra en contacto con la mucosa se producen una serie de complejas interacciones moleculares que finalmente determinan la invasión de esas células.

Dado que se trata de un patógeno exclusivamente humano hay pocos modelos experimentales animales que permitan aclarar detalles de la patogenia de la enfermedad.

Los estudios han sido realizados en voluntarios humanos, con cepas mutantes y en ciertos cultivos celulares o modelos de cultivo de tejidos (explantes). Por ejemplo cultivos de trompas de Falopio han sido usados para estudiar la colonización.

Dos tipos de células epiteliales se encuentran en este órgano: células ciliadas y no ciliadas.

Cuando el germen es incubado en estos explantes, ocurren una serie de eventos:

#### **1. Adhesión a células no ciliadas:**

El primer paso en la infección es la colonización del epitelio columnar. Al igual que otras bacterias, en el proceso de adherencia e invasión intervendrían fenómenos de polimerización de moléculas de actina. Algunos componentes de superficie de *N. gonorrhoeae* están involucrados en estas etapas iniciales. Los pilis median la adhesión inicial (no estrecha o distante) a las células epiteliales. Cepas mutantes que carecen de ellos, aún son capaces de invadir las células epiteliales, por lo que en esta etapa, seguramente intervienen además otros factores. La familia de proteínas de membrana externa P.II (o también Opa, por opacidad) parecen mediar, al menos en parte una segunda etapa de adherencia íntima, y contribuir a la invasión. Las proteínas de membrana externa llamadas P.I parecen impedir la unión fagolisosómica en los polimorfonucleares y reducir su metabolismo oxidativo, por lo que determina la capacidad de ciertas cepas de sobrevivir -al menos un pequeño porcentaje de bacterias- dentro de los fagocitos.

#### **2. Endocitosis del germen, disminución progresiva del movimiento ciliar y pérdida de las cilias de las células adyacentes, causada por el lipooligosacárido (LOS):**

Las células no ciliadas engloban a las bacterias por medio de pseudópodos. Esta fagocitosis, llevada a cabo

por fagocitos "no profesionales" se conoce como endocitosis dirigida por el parásito. Las células ciliadas mueren y son selectivamente eliminadas de la superficie del epitelio. Esta etapa no requiere de la presencia del germen intacto y puede ser reproducida solamente con el LOS o fragmentos de peptidoglican.

El LOS desencadena la respuesta inflamatoria, con gran liberación de factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) el cual a su vez determina la escarificación del epitelio de las trompas de Falopio. Probablemente el LOS sea el responsable de la mayoría de los síntomas de la gonorrea. Esta molécula contribuye a la resistencia al suero y a una mayor capacidad de producir enfermedad sistémica (probablemente debido a una menor capacidad de activar el complemento).

#### **3. Transporte de la bacteria a través de la célula epitelial:**

Las bacterias son transportadas en una vacuola de endocitosis, dentro de la que aún pueden replicarse y se acentúan los procesos de citotoxicidad determinados por el LOS. Dentro de la vacuola el germen se halla protegido de los macrófagos, de los anticuerpos y de los antimicrobianos.

#### **4. Liberación del germen al espacio subepitelial:**

Las bacterias son transportadas hacia el sector basal de la célula, las vacuolas se fusionan con la membrana basal y descargan los gérmenes en el tejido conectivo subepitelial. Allí es que causan inflamación local (como consecuencia de lo cual se produce un exudado, rico en polimorfonucleares y que contiene numerosas bacterias intra y extracelulares) o bien ingresan a los vasos sanguíneos para dar la forma diseminada de la enfermedad.

#### **Sobrevida de *N. gonorrhoeae* en el torrente circulatorio:**

El suero humano normal tiene la capacidad de destruir bacterias Gram negativas circulantes, a diferencia de las Gram positivas que son resistentes a ese poder bactericida.

Este efecto depende fundamentalmente de la presencia del complemento y no se requieren anticuerpos específicos.

Las cepas de *N. gonorrhoeae* que se asocian a la forma diseminada de la enfermedad suelen ser más resistentes al poder bactericida del suero humano normal. Esto probablemente sea debido al agregado de residuos de ácido siálico a nivel de la pared del germen.

El ácido siálico es un componente de la superficie de muchas células humanas, inclusive eritrocitos y se cree que la presencia de éste en la superficie de la bacteria enmascararía a los antígenos responsables de

desencadenar la lisis bacteriana.

### **Clínica:**

El espectro de manifestaciones clínicas comprende desde infecciones localizadas en el aparato genitourinario (uretritis, cervicitis) infecciones loco-regionales (enfermedad inflamatoria pélvica, epididimitis) hasta la enfermedad diseminada, con invasión del torrente sanguíneo y eventualmente invasión de órganos a distancia. Estos aspectos serán tratados brevemente en este capítulo.

\* Uretritis y cervicitis: Son las manifestaciones más comunes de la gonorrea. En el hombre se manifiesta por disuria y corrimiento uretral purulento, luego de un período de incubación de 2 a 5 días. En la mujer la sintomatología suele ser mucho menos específica y, de estar presente se traduce en flujo cervical purulento, disuria; más raramente absceso de las glándulas de Bartholino. Los síntomas se intensifican con el período menstrual, lo que en forma teórica podría deberse a una mayor disponibilidad de Hierro por parte del germen.

\* Portadores asintomáticos: Un porcentaje no desdeñable de individuos que entran en contacto con *N. gonorrhoeae*, especialmente mujeres, desarrollan una infección asintomática. Como se comprenderá estos portadores asintomáticos representan un reservorio importante de la enfermedad.

\* Otras localizaciones:

\* Orquiepididimitis: En el hombre el dolor y edema a nivel de testículo y epidídimo reflejan el compromiso de éstos órganos.

\* Enfermedad inflamatoria pélvica: En la mujer está determinada por la progresión de la infección al aparato genital alto (endometrio, trompas, peritoneo) Esta entidad puede responder a otras etiologías (*C. trachomatis*, infecciones por flora mixta proveniente de la vagina). La inflamación de la mucosa tubaria y posterior cicatrización puede determinar una obstrucción permanente de la luz tubaria. Esta secuela trae aparejadas infertilidad y embarazo ectópico.

\* Proctitis: Se caracteriza por dolor, tenesmo, sangrado y exudado, a veces con producción de abscesos rectales o perianales.

\* Faringitis: Es habitualmente asintomática y requiere planes especiales de drogas para eliminar el estado de portador.

\* Conjuntivitis: Es en general una infección que el recién nacido adquiere al pasar por el canal del parto (oftalmía neonatorum); aunque puede verse a otras edades. Sin tratamiento, puede conducir a la ceguera. Su incidencia se ha reducido en forma notable con la instilación profiláctica y obligatoria de gotas de nitrato

de plata en la conjuntiva de todos los recién nacidos (Credé).

\* Enfermedad gonocócica diseminada: es una rara complicación que se registra con una frecuencia menor al 1% de los casos de gonorrea. Es más frecuente en mujeres y, como ya se mencionó, es causada por cepas pertenecientes al auxotipo AHU. Las manifestaciones incluyen monoartritis, tenosinovitis, fiebre y lesiones de piel (máculas o pústulas, hemorrágicas o necróticas) que afectan sobre todo extremidades y son debidas a arteritis séptica. Más raramente se produce meningitis, pericarditis o endocarditis.

### **Diagnóstico microbiológico:**

El examen directo de las secreciones uretrales con coloración de Gram es muy sensible y específico para el diagnóstico de uretritis gonocócica. Permite observar un exudado con abundantes polimorfonucleares y diplococos Gram negativos intra y extra leucocitarios. Su valor es menor en otras localizaciones. El cultivo es indispensable para realizar las pruebas bioquímicas de identificación y estudios de susceptibilidad. Eventualmente las cepas deberán ser conservadas para estudios epidemiológicos ulteriores en laboratorios de referencia. La inoculación en medios de cultivo, una vez obtenida la muestra debe hacerse en forma inmediata o utilizar medios de transporte que aseguren la viabilidad del germen. Las muestras provenientes de las mucosas deberán ser sembradas en medios selectivos ya mencionados para inhibir la flora normal. Las muestras de sectores del organismo habitualmente estériles (sangre, líquido sinovial, etc.) son sembradas en agar chocolate enriquecido con hemina y NAD. Una vez obtenidas las colonias se identifican por su morfología con la coloración de Gram, reacción positiva de oxidasa, patrón de fermentación de azúcares en medio agar tripticasa cisteína (CTA).

### **Sensibilidad a los antimicrobianos:**

Si bien la Penicilina fue la droga de elección para el tratamiento de la gonorrea por muchos años, en el momento actual, la alta prevalencia de cepas resistentes determina que esta droga no pueda ser utilizada para el tratamiento empírico de la enfermedad. La resistencia a los antimicrobianos puede deberse a múltiples mecanismos y ser:

- plasmídica: debida a la presencia de  $\beta$ -lactamasas en especial tipo TEM 1. Este tipo de resistencia puede ser detectada en el laboratorio por técnicas rápidas como por ejemplo mediante el uso de una Cefalosporina cromógenica. Probablemente sea el mecanismo de resistencia más frecuente. La resistencia a la Tetraciclina también es codificada por un plásmido (tet

M).

- cromosómica: que puede deberse tanto a una disminución de la afinidad de las proteínas fijadoras de Penicilina (PBP) por la droga como a una alteración en la permeabilidad de las porinas de la membrana externa de la bacteria. Esta resistencia requiere de otros estudios de susceptibilidad para ser detectada. Una cepa puede combinar más de un mecanismo de resistencia. También ha sido descrita la resistencia cromosómica para otras drogas, como por ejemplo Tetraciclinas y Espectinomocina.

Las drogas recomendadas en el momento actual son Ceftriaxona y Ciprofloxacina aunque ya se han comunicado resistencias al menos "*in vitro*".

Para el tratamiento, además de la susceptibilidad del germen, se deben considerar factores tales como sitio anatómico afectado, presencia de complicaciones y posibilidad de otros patógenos asociados. Los planes terapéuticos recomendados para cada caso se tratarán en otro capítulo.

#### **Profilaxis. Posibles candidatos al desarrollo de vacunas**

Muchos de los antígenos de superficie antes mencionados resultan atractivos para desarrollar vacunas que prevengan la adherencia y colonización de las células epiteliales del huésped. Desde hace tiempo se sabe que los pacientes que padecen gonorrea pueden experimentar reinfecciones y que una infección pasada determina una respuesta inmune vigorosa (sobre todo de anticuerpos) pero que no confiere protección frente a nuevas infecciones. Tanto los pilis como otras proteínas de superficie se hallan regulados por complejos mecanismos genéticos que, como ya se dijo, le otorgan a la bacteria la posibilidad de controlar la presencia o ausencia de esas moléculas (variación de fases) o controlar su composición (variación genética).

La razón por la que una persona no desarrolla una respuesta protectora a la reinfección probablemente sea que *N. gonorrhoeae* es capaz de variar sus antígenos de superficie, especialmente la pilina. Para el caso de esta proteína la bacteria tiene un repertorio antigénico que puede ser tan grande como 1 millón de variantes antigénicas diferentes. Esta variación de los antígenos de superficie serviría para dos propósitos:

- evasión de la respuesta de anticuerpos del huésped;
- alteración de la especificidad de la unión a las células con la consiguiente adaptación a nuevos tipos celulares.

Los mecanismos moleculares para estas variaciones antigénicas son diversos e incluyen recombinaciones

genéticas, cambios en la composición de los oligosacáridos del LOS, entre otros. El LOS puede experimentar en ciertas cepas la adición de residuos de ácido siálico y por lo tanto no activar el complemento, como ya se dijo, y probablemente impida el acceso de anticuerpos a la superficie de la bacteria.

Resumiendo: Los pilis no parecen ser buenos candidatos vacunales ya que presentan regiones muy variables y las regiones relativamente conservadas no son accesibles a los anticuerpos. Por su variabilidad la proteína II, al igual que la pilina no son buenos candidatos. La proteína I no presenta gran variabilidad intra cepa pero si es muy variable entre diferentes cepas.

Actualmente se trata de buscar antígenos de superficie altamente conservados. El desarrollo de una vacuna contra gonorrea probablemente sea uno de los mayores desafíos que enfrentan los investigadores.

En tanto no se disponga de una vacuna los esfuerzos para prevenir la enfermedad deben basarse en:

- diagnóstico precoz y tratamiento adecuado;
- notificación de los contactos debe recordarse que se trata de una enfermedad de denuncia obligatoria al Ministerio de Salud Pública (Grupo C, de notificación directa al Programa de Enfermedades de Transmisión Sexual);
- a nivel de Salud Pública promover la educación que lleve a modificaciones en las conductas sexuales, incluyendo el uso de preservativo;
- Uso de colirio de nitrato de plata en todo recién nacido para prevenir la enfermedad ocular (obligatorio por ley).

#### **II. *Haemophilus*:**

Los miembros del género *Haemophilus* son bacilos Gram negativos, pequeños, pleomórficos. Integran la flora normal de las mucosas del aparato respiratorio superior. La mayoría de las especies son no patógenas o oportunistas, aunque algunas de esas especies son patógenos primarios como *H. influenzae*, *H. aegyptus* y *H. ducreyi*.

*Haemophilus influenzae* es la especie tipo, y puede causar enfermedades graves, invasivas. En esta especie existen cepas capsuladas y no capsuladas. El antígeno capsular permite distinguir seis serotipos que se designan con letras de la **a** hasta la **f**. Antes que se dispusiera de una vacuna eficaz, *H. influenzae* serotipo b era una de las causas más importantes de meningitis y neumonía bacteriana en niños pequeños.

#### **Clasificación:**

El género *Haemophilus* pertenece a la familia *Pasteurellaceae*, bacilos Gram negativos exigentes desde el punto de vista nutricional. Estos gérmenes requieren para su desarrollo de uno o dos factores, llamados V (NAD) y X (hemina o protoporfirina), presentes en la sangre. El factor X es la protoporfirina IX para gérmenes que poseen una enzima quelante del Hierro (como *H. influenzae*) o la hemina para gérmenes que no la poseen (como *H. aegyptus*). Los microorganismos que requieren de factor V no crecen en agar sangre convencional. El factor V puede ser agregado al medio o proporcionado por otro microorganismo que crezca en su proximidad (por ej. una colonia de *Staphylococcus*) Este crecimiento alrededor de una colonia que le proporciona factores de crecimiento se denomina "satelitismo" y no es exclusivo de *Haemophilus*, sino también por ciertos *Streptococcus*.

#### **Identificación:**

Se hace sobre la base de los requerimientos de factor X y V, presencia o no de hemólisis, la fermentación de hidratos de carbono, y la producción de indol, ureasa y decarboxilasa de la ornitina. Estos tres últimos sirven para diferenciar biotipos de *H. influenzae*.

La tipificación de las cepas capsuladas de *H. influenzae* se realiza con sueros específicos contra los 6 serotipos existentes.

#### **Mecanismos de patogenicidad:**

Los factores que contribuyen a la patogenicidad de *H. influenzae* aún no se comprenden bien, en especial la colonización. Este germen no produce toxinas solubles. El mayor determinante de virulencia es, claramente, el polisacárido capsular que le confiere a la bacteria resistencia a la fagocitosis. Para el caso del serotipo b es un polímero de ribosil ribosa fostato. Este antígeno, como otros polisacáridos, no es procesado por el sistema inmune a través de las células T sino por una vía independiente de ellas. La capacidad de generar esta respuesta inmune no está desarrollada en niños de menos de 18 meses. Las vacunas recientes han convertido a este antígeno en T dependiente por medio de su unión o conjugación a proteínas. Estas vacunas conjugadas provocan respuesta aun en lactantes pequeños.

Otros posibles factores de virulencia son los pili, se ha demostrado que ciertas clases de pili permitirían la adherencia a células epiteliales, etapa fundamental en la colonización.

#### **Patogenia:**

*H. influenzae* es una bacteria muy adaptada al ser humano. Desde los primeros meses de vida puede ser

encontrada colonizando las mucosas del tracto respiratorio superior; en general se trata de cepas no capsuladas o de serotipos distintos del b.

La enfermedad por *Haemophilus influenzae* tipo b es desarrollada sólo por un pequeño porcentaje de niños que entran en contacto con enfermos o portadores desarrollan enfermedad. La inmunidad natural frente al serotipo b se adquiere a medida que aumenta la edad, pero no se ha aclarado que antígeno o antígenos la inducen. Muchas bacterias de la flora normal poseen epítopes que reaccionan en forma cruzada con el antígeno capsular b.

El germen ingresa por el epitelio de la vía aérea superior; la bacteria tiene la capacidad de invadir el epitelio. Una vez allí, la bacteria, dependiendo de factores del huésped y probablemente de su virulencia puede producir enfermedades confinadas a las mucosas o no invasivas o bien enfermedades invasivas, graves.

En la submucosa se produce una respuesta inflamatoria que a nivel del árbol respiratorio da como resultado bronquitis o neumonía. En algunos niños la bacteria invade la laringe causando inflamación y edema de las distintas estructuras y comprometiendo la vía aérea, lo que se denomina epiglottitis.

La meningitis es el resultado de la invasión del torrente circulatorio y del espacio subaracnoideo. Los gérmenes sobreviven en la sangre en tanto no aparezcan anticuerpos anticapsulares específicos. Estos anticuerpos son opsoninas y hacen que la bacteria sea destruida por macrófagos. Los individuos que carecen de bazo se hallan especialmente predispuestos a desarrollar enfermedades severas por esa y otras bacterias capsuladas.

Una vez en la sangre los gérmenes llegan a las meninges por las arterias cerebrales. Inicialmente hay inflamación de los plexos coroideos. Estos plexos están altamente vascularizados ya que es a ese nivel que se produce el líquido cefalorraquídeo y es por ello el sitio más lógico para atravesar la barrera hematoencefálica.

El daño que causa *H. influenzae* tipo b a nivel local le permite ingresar al líquido cefalorraquídeo, primero en los ventrículos laterales y luego en la cisterna magna. El líquido cefalorraquídeo se llena de un exudado inflamatorio. La obstrucción al flujo del LCR determina un aumento de la presión intracraneana que se traduce clínicamente por cefalea, vómitos y depresión de la conciencia.

La fagocitosis da como resultado la liberación de endotoxina y otros compuestos que aumentan aún más la respuesta inflamatoria.

La endotoxina es la responsable de la fiebre,

coagulación intravascular diseminada y tal vez otros fenómenos. *H. influenzae* tipo b, en forma característica, determina un daño mayor que otros gérmenes, con mayor porcentaje de niños que desarrollan secuelas tales como sordera, hidrocefalia obstructiva, ceguera y retraso mental.

Los cuadros clínicos ocasionados por *Haemophilus influenzae* de otros serotipos capsulares o no tipificables son otitis media, sinusitis, conjuntivitis, etc.

#### **Diagnóstico microbiológico:**

Las muestras deberán ser enviadas de inmediato al laboratorio y procesadas en él lo más pronto posible. Para el aislamiento debe incluirse la siembra en agar chocolate suplementado con factores X y V. La identificación del germen se basa en sus requerimientos nutricionales, la coloración de Gram de la colonia aislada, presencia de hemólisis y los requerimientos de factores X y V para diferenciar las especies más frecuentes.

Los aislamientos pueden ser sometidos a diversas pruebas bioquímicas para identificación o determinación de biotipos y serotipificación.

#### **Sensibilidad a los antibióticos:**

Debido a que surgieron cepas productoras de  $\beta$  lactamasas capaces de inactivar la Ampicilina esta droga ha dejado de ser de elección para el tratamiento de la enfermedad grave por *H. influenzae*.

También para este germen se ha descrito la resistencia a los  $\beta$  lactámicos debida a proteínas fijadoras de Penicilina con baja afinidad.

Otra droga que se utilizó -asociada a la Ampicilina- fue el Cloranfenicol, que atraviesa bien la barrera hematoencefálica y es bactericida para este germen; pero luego fueron reportadas cepas productoras de una enzima -Cloranfenicol acetil transferasa- que la inactivan; lo que determinó nuevamente cambios en los planes terapéuticos.

Actualmente, para el tratamiento de las infecciones graves por esta bacteria se recomienda Ceftriaxona o Cefotaxime que no son hidrolizados por la  $\beta$  lactamasa de *H. influenzae*. Para infecciones respiratorias altas (otitis, sinusitis, bronquitis) pueden utilizarse combinaciones de Ampicilina con inhibidores de las  $\beta$  lactamasas.

En el laboratorio, las cepas productoras de  $\beta$  lactamasa pueden ser rápidamente detectadas, luego de haber aislado el germen.

Para el caso de cepas provenientes de pacientes con enfermedades graves, invasivas, puede realizarse además un antibiograma por disco-difusión que es una adaptación de la técnica de Kirby Bauer a las

exigencias del germen y que es necesario para detectar cepas resistentes por mecanismos distintos a la producción de  $\beta$  lactamasas.

#### **Profilaxis. Vacunas:**

Actualmente en nuestro país es obligatoria la vacunación de lactantes y niños pequeños con vacuna anti *Haemophilus influenzae* tipo b. Estas vacunas están compuestas del polisacárido capsular (polímero de ribosilribosa fosfato) conjugado a proteína (toxide diftérico o tetánico). Estas vacunas se administran integradas al esquema de vacunación a los 2, 4, 6 meses y al año de edad.

A los contactos susceptibles (niños menores de 4 años, no vacunados) de pacientes con meningitis se debe administrar quimioprofilaxis para prevenir la aparición de casos secundarios. En este caso la droga utilizada es Rifampicina.

Persiste el problema de hallar una vacuna para cepas de *Haemophilus* distintas al serotipo b, que causan enfermedades de alta prevalencia como otitis o sinusitis, no sólo en la edad pediátrica.

Otras especies de **Haemophilus:**

#### ***Haemophilus aegyptus:***

Tradicionalmente asociado a conjuntivitis aguda en países de clima cálido, en los años 80 fue sindicado como el agente de una nueva entidad, la fiebre purpúrica brasilera. Esta es una enfermedad grave, que afecta sobre todo a niños y que cursa con conjuntivitis, fiebre, petequias, púrpura, shock y muerte hasta en el 70% de los casos. Las cepas responsables de este cuadro clínico se distinguen de otras de la misma especie por la presencia de ciertas proteínas de membrana externa y perfiles plasmídicos.

#### ***Haemophilus ducreyi:***

Es el agente del chancro blando, enfermedad de transmisión sexual que cursa con úlcera genital no indurada y adenopatías inguinales. Es una enfermedad muy poco frecuente en nuestro país.

### **III. Bordetella**

El género *Bordetella* comprende tres especies. *B. pertussis* es el agente de la tos convulsa o pertusis; *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* causan enfermedad con mucha menor frecuencia.

#### ***Bordetella pertussis:***

#### **Morfología y Metabolismo:**

Son bacilos Gram negativos cortos, ocasionalmente presentan formas filamentosas, son capsulados. Presentan gránulos metacromáticos bipolares al ser teñidos con azul de toluidina.

Son exigentes, especialmente en cultivos de aislamiento

inicial; su desarrollo se logra en medios suplementados con agar sangre, papa, glicerol y carbón activado (Bordet Gengou). Para el aislamiento a partir de muestras clínicas se agrega Penicilina para inhibir la flora orofaríngea. Como otros gérmenes exigentes, son muy sensibles a las temperaturas extremas y a la desecación.

La incubación se lleva a cabo a 35°C durante 3 a 7 días en ambiente húmedo, luego de lo cual las colonias se hacen visibles presentando un aspecto de "gotas de mercurio". La hemólisis es característica de las cepas virulentas. Es un germen aerobio estricto. No requiere de factores V ni X. Desde el punto de vista metabólico son relativamente inactivos: no fermentan prácticamente azúcares, no reducen nitratos, no producen indol, no poseen ureasa ni utilizan el citrato como fuente única de carbono.

#### **Variación de fases:**

Las cepas recién aisladas, virulentas producen colonias lisas o en fase I que al ser sometidas a sucesivos pasajes *in vitro* experimentan variación de fase hacia formas no virulentas (fases II y III) o avirulentas, no productoras de toxina y rugosas (fase IV).

#### **Patogenia:**

La patogenia de la tos convulsa no ha sido aún bien aclarada; las investigaciones en esta área, destinadas al desarrollo de una nueva vacuna, han llevado al conocimiento de diversos factores de virulencia tales como la toxina de **Pertussis**, adenilato ciclasa extracelular, hemaglutinina filamentosa, toxina dermonecrótica, citotoxina traqueal y hemolisina.

Adherencia

**B. pertussis** se caracteriza por una predilección por el epitelio respiratorio ciliado, produce múltiples adhesinas que median la unión a los cultivos a células de mamíferos y que le permiten adherirse de forma específica al epitelio respiratorio. De estas las más estudiadas son: la fitohemaglutinina (hemaglutinina filamentosa o Fha) y la toxina de **Pertussis**.

#### **\* Fitohemaglutinina (Fha):**

Es una proteína de alto peso molecular que forma estructuras filamentosas en la superficie de las células; aunque carecen de la organización de los pilis. Su nombre deriva de que aglutinan eritrocitos. Esta hemaglutinina se une a residuos de galactosa de glucolípidos sulfatados. Las células ciliadas presentan en sus membranas grandes niveles de estas sustancias, denominadas sulfátidos y esto puede explicar en parte la preferencia de **B. pertussis** en adherirse a ellas. También se une al receptor CR3 de los polimorfonucleares. Las mutaciones que afectan el gen

estructural de Fha (gen *fhaB*) reducen por lo tanto la capacidad del germen de colonizar la tráquea de ratones, pero aún así la infección puede establecerse y matar al animal. Esto hace presumir que no sólo Fha está involucrada en la adherencia. Los anticuerpos antiFha confieren cierto grado de inmunidad frente a nuevas infecciones.

#### **\* Toxina de Pertussis (Ptx):**

También llamada factor promotor de linfocitosis, esta toxina puede actuar tanto como toxina que como adhesina. La Ptx es una proteína (exotoxina) hexamérica, pequeñas cantidades de ella pueden ser liberadas al medio, pero la mayoría permanece unida a la superficie bacteriana. La toxina unida actúa como adhesina, ligándose en forma específica a dos compuestos: uno llamado lactosylceramida que se encuentra sobre todo en células respiratorias ciliadas y, por otra parte, a gangliósidos presentes en células fagocíticas.

Esta toxina es sin duda el factor mayor de virulencia. Es una proteína del tipo A-B cuya estructura hexamérica es similar a la de la toxina del cólera (aunque no idéntica), con una subunidad enzimática (S1) y 5 subunidades de unión (S2, S3, dos copias de S4 y S5). La subunidad S1 cataliza -al igual que la toxina colérica- la ribosilación del ADP de la célula del huésped a nivel de una proteína G lo que determina finalmente un aumento del nivel del cAMP. Esta aumenta los niveles de Gi activado. La proteína Gi pertenece a una familia de proteínas que regulan la actividad de la adenilato ciclasa de la célula eucariota. A diferencia de la toxina colérica que, actuando sobre la proteína Gs estimula la adenilato ciclasa, la toxina de **Pertussis** inhibe la desactivación de la adenilato ciclasa una vez que esta ha sido estimulada, actuando sobre Gi. Como se nota a pesar de las similitudes estructurales con la toxina colérica los cuadros clínicos que producen estas enfermedades son muy diferentes; lo que probablemente se vincule con el hecho de que estas bacterias tienen especificidad por distintos tipos de células.

Ptx es responsable del aumento de las secreciones respiratorias y la producción exagerada de mucus que se observa en la tos convulsa. También se la ha responsabilizado de la encefalopatía que puede ser vista en los casos de enfermedad severa. Esta toxina puede además sensibilizar a la histamina, activar a las células de los islotes del páncreas y causar la tos paroxística que se ve en las primeras etapas de la enfermedad.

#### **Adenilato ciclasa invasiva:**

**B. pertussis** produce una toxina que es capaz de producir AMP cíclico directamente, determinando una desregulación en la célula del huésped. Las cepas mutantes que carecen de esta toxina son avirulentas en modelos animales, aunque conservan la capacidad de colonizar las mucosas. Esto indica que esta toxina tiene un importante papel en los estadios tardíos de la enfermedad.

**Toxina dermonecrótica:**

Es una proteína termolábil que causa necrosis al ser inyectada por vía subcutánea en el ratón, y es letal a dosis altas. Su papel en la enfermedad no ha sido aclarado hasta el momento.

**Citotoxina traqueal:**

No es una proteína, sino un fragmento de peptidoglican que es liberado al medio como consecuencia de la lisis celular o el recambio natural de la pared celular durante el crecimiento bacteriano. Se ha demostrado que causa la lisis de células ciliadas y estimula la producción de interleuquina 1, causando fiebre en modelos animales. En cultivos *in vitro* de mucosa respiratoria humana también causa lisis, como ocurre en la enfermedad natural.

**Lipopolisacárido:**

Este germen es capaz de producir al menos dos tipos de LPS. Las dos moléculas difieren a nivel del lípido A y en porciones de las cadenas de carbohidratos. Al igual que otros LPS activa el complemento y estimula la liberación de citoquinas. Probablemente también sea el responsable de algunos efectos secundarios de la vacuna.

**Hemaglutininas:**

Existen dos tipos de moléculas con esta propiedad, las fimbrias y la toxina de **Pertussis**.

**Cuadro clínico:**

La tos convulsa o pertusis es una enfermedad severa de la infancia. Es sumamente contagiosa entre niños susceptibles. Entre sus manifestaciones locales se encuentran la bronquitis, con gran aumento de las secreciones respiratorias; éstas están compuestas por células epiteliales muertas, desprendidas de la mucosa respiratoria, células inflamatorias y bacterias. El flujo mucociliar está alterado por el daño de las células ciliadas y, debido a la sensibilización de los receptores de la tos, esta se desencadena fácilmente, en violentos accesos que le dan nombre a la enfermedad. La tos convulsa tiene además manifestaciones sistémicas como fiebre moderada y linfocitosis. Se ha estimado que alrededor del 20% de los casos son enfermedades atípicas, y esos pacientes son capaces de contagiar a otros individuos susceptibles. Después de la inhalación

de gotitas infectadas, los gérmenes colonizan el tracto respiratorio.

El período de incubación dura entre 5 y 21 días.

En forma clásica se diferencian tres etapas en el curso de la enfermedad:

- La etapa catarral o prodrómica dura 1 a 2 semanas; se trata de un cuadro clínico de infección inespecífica del aparato respiratorio superior.
- La segunda etapa dura entre 1 y 6 semanas, y se caracteriza por la progresión hacia la tos paroxística. En cada episodio de paroxismo, el niño presenta entre 5 y 20 accesos de tos seca, forzada, emetizante. El paciente no tiene tiempo de respirar entre los diferentes accesos y puede ocurrir hipoxia. La inspiración final tiene lugar a través de la glotis estrechada, lo que produce un estridor característico. La ingestión de alimentos puede precipitar episodios de tos e impedir la adecuada alimentación.
- La tercera etapa es la de convalecencia. La tos puede persistir durante varios meses y su curso no se altera con la administración de antibióticos.

Es una enfermedad potencialmente mortal en lactantes con enfermedades cardíacas o respiratorias subyacentes y puede ocasionar manifestaciones y secuelas neurológicas debido a la hipoxia.

**Diagnóstico:**

La tos convulsa es una enfermedad que, en países donde se aplica la vacuna DPT puede presentarse en forma atípica; por lo tanto se requiere alta sospecha clínica para establecer el diagnóstico. Incluso con cuadros clínicos muy característicos, otros agentes infecciosos pueden producir síndromes similares.

**Paraclínica:**

Los estadios tempranos de la enfermedad frecuentemente se asocian con una leucocitosis de 12000 a 20000 por mm<sup>3</sup> con 60% de linfocitos.

El diagnóstico etiológico definitivo se establece al aislar el germen del paciente; lo que se logra sobre todo al inicio del período catarral.

Habitualmente el aislamiento del germen no se realiza en forma rutinaria en laboratorios clínicos debido a que el diagnóstico suele ser tardío, con la aparición de la tos paroxística, el germen ya no se aísla de las vías respiratorias. La muestra apropiada es la extraída de la nasofaringe. El aislamiento del germen depende de un cuidadoso transporte y procesamiento en medios

adecuados. Para la identificación se realizan pruebas bioquímicas y serológicas, con antisueros específicos. También puede utilizarse, para el diagnóstico rápido en la muestra nasofaríngea, la inmunofluorescencia directa. Esta técnica puede emplearse además para la identificación de las cepas aisladas.

#### **Sensibilidad de *Bordetella* a los antimicrobianos:**

Eritromicina es la droga de elección para el tratamiento de la tos convulsa cuando este está indicado, aunque estudios *in vitro* indican que el germen es sensible a una amplia gama de agentes.

Todas las especies del género tienen iguales patrones de sensibilidad. Los antibióticos, en la segunda etapa de la tos convulsa no modifican los síntomas ni acortan la enfermedad, solamente disminuirían la diseminación y el contagio. Esto destaca la importancia de la profilaxis a través de la vacunación.

#### **Inmunidad:**

La protección contra nuevas infecciones no se correlaciona bien con los niveles de anticuerpos. En la inmunidad probablemente estén involucrados además mecanismos celulares como las células T citotóxicas. Apoyan esta teoría el hecho de que este tipo de mecanismos se ven en gérmenes con fases de vida intracelular y que *B. pertussis* es capaz de sobrevivir en ciertas líneas celulares derivadas de macrófagos. Debido a ello se ha postulado la existencia de una fase de crecimiento intracelular de este germen que, además de estos hechos, explicaría la persistencia del mismo en el huésped y el establecimiento del estado de portador.

#### **Vacunas:**

La vacuna DPT, que se administra a los lactantes, consiste en gérmenes enteros, muertos junto con los toxoides tetánico y diftérico. Ciertos efectos secundarios indeseables de esta vacuna están determinados por el componente pertusis y no por los otros (tetánico o diftérico).

Estos efectos secundarios son poco frecuentes, y se los puede agrupar en tres tipos:

- \* Fiebre, malestar general y dolor a nivel del sitio de inyección, son los más frecuentes y se atribuyen a la reacción inflamatoria provocada por el lipopolisacárido de la pared celular y otras sustancias.
- \* Convulsiones en aproximadamente 1 de cada 2000 niños vacunados; por ello la vacuna no se recomienda para niños con antecedentes de convulsiones.
- \* Con una frecuencia muchísimo menor se producen enfermedades neurológicas severas, como encefalopatía; tal vez con una tasa de

incidencia similar a la de poblaciones no vacunadas. La morbilidad por la enfermedad prolongada, la necesidad de hospitalización y la posibilidad de secuelas hacen comprender que los riesgos de la inmunización son mucho menores que los asociados a la enfermedad natural.

La vacuna a células enteras contiene diversos antígenos Ptx, FHA, LPS, y aglutinógenos. Los niños vacunados con vacunas a células enteras muestran un aumento en los niveles de anticuerpos anti FHA, Ptx, LPS, aglutinógenos y proteínas de membrana externa.

También se incrementan los títulos neutralizantes, sobre todo luego de tres dosis. Se han ensayado diversas vacunas acelulares. Una de las más conocidas es la desarrollada en Japón. Es una vacuna que contiene diversos antígenos FHA, aglutinógenos y toxoide pertusis. Su eficacia es similar a la vacuna a células enteras; alrededor del 78%. Si bien son más leves, no está desprovista de efectos secundarios. Se necesita adquirir más conocimientos acerca de epítopes que puedan ser útiles para desarrollar una vacuna acelular que no tenga efectos indeseables y cuyo costo permita usarla, aun en países subdesarrollados.

#### **IV. *Brucella***

Los integrantes del género *Brucella* producen enfermedad fundamentalmente en animales y ocasionalmente en humanos. Son parásitos intracelulares facultativos; con poca actividad metabólica. Se han descrito distintas especies que en ciertos casos presentan una adaptación marcada por los distintos huéspedes. *Brucella abortus* infecta sobre todo a bovinos, *B. suis* al ganado porcino, *B. melitensis* a cabras y *B. canis* a perros. De estas especies las tres primeras son transmisibles al hombre, siendo *B. abortus* y *B. suis* las que causarían enfermedad en nuestro medio. En el hombre, la brucelosis se caracteriza por presentar una fase bacteriémica aguda, seguida de una etapa crónica que puede durar años y que afecta diversos parénquimas.

#### **Morfología y metabolismo**

Son coccobacilos pequeños de 1,2 $\mu$  de longitud, Gram negativos, pero que a veces se tiñen de manera irregular. Son aerobios, inmóviles, no esporulados. Pueden tener cápsula. Al igual que otros parásitos intracelulares tienen necesidades nutricionales complejas. Para su desarrollo se requieren medios enriquecidos, como TSA agar soya-tripticasa con sangre. Son capnófilas.

En medios sólidos, las colonias se desarrollan

lentamente, haciéndose visibles en 3 a 5 días. Las cepas capsuladas dan colonias mucoides que se asocian a la virulencia. *In vitro*, con pasajes sucesivos las colonias se tornan rugosas, avirulentas.

En medios líquidos pueden no desarrollar turbidez, por lo que cuando se estudian hemocultivos se recomienda hacer subcultivos sistemáticos a ciegas, por ejemplo, a los 2, 7 y 14 días.

El medio de Castañeda utilizado para el cultivo de *Brucella* contiene a la vez un medio sólido y caldo en el mismo frasco (bifásico) que permite la observación directa de las colonias.

*Brucella* utiliza hidratos de carbono pero no producen grandes cantidades de ácido ni gas como para ser utilizados en su identificación. Pueden ser oxidasa y catalasa positiva, producir sulfuro de hidrógeno y reducir nitratos a nitritos.

Son sensibles a la acción del calor -mueren al pasteurizar la leche- y a pH ácido.

La diferenciación entre las especies se hace sobre la base de la especificidad de huésped, la sensibilidad a colorantes, la producción de sulfhídrico, presencia de ureasa y requerimientos de CO<sub>2</sub>. Dentro de cada especie existen biotipos. La identificación y biotipificación en general se reserva a laboratorios de referencia.

#### **Huésped:**

Existe cierta especificidad de huésped. En estos animales, se ha descrito la presencia de sustancias (una globulina y una lipoproteína) que suprimen el crecimiento de las variantes rugosas y por lo tanto favorecen la expresión de cepas lisas, virulentas.

Los animales resistentes carecen de estas sustancias, de modo que en ellos ocurre un pasaje hacia formas rugosas. Esto ha sido descrito también *in vitro* en medios que contienen D-alanina.

#### **Estructura antigénica:**

Dos antígenos denominados A y M se encuentran en distinta proporción en las 4 especies, por lo que existen reacciones cruzadas en las pruebas serológicas. Poseen además un antígeno de superficie denominado antígeno L, similar al antígeno Vi de *Salmonella*.

#### **Patogenia:**

Si bien cada especie tiene un huésped principal, cualquiera de las especies puede infectar gran variedad de animales y al hombre. La puerta de entrada es a través de las mucosas o la piel. Una de las más comunes es el ingreso a través del aparato digestivo por la ingestión de leche no pasteurizada o sus derivados. El contacto de la piel con tejidos de animales infectados o la inoculación accidental con vacunas son

otros factores que deben ser investigados.

Desde la puerta de entrada y por vía linfática los gérmenes llegan al conducto torácico y de allí a la circulación general que los distribuye por los diferentes órganos. Los sitios más afectados son el tejido linfático, hígado, bazo, médula ósea y sistema reticuloendotelial. Se producen en esos lugares nódulos granulomatosos que pueden evolucionar a la abscesación. Más raramente ocurre osteomielitis, meningitis o colecistitis. La anatomía patológica muestra granulomas, constituidos por células epitelioides y células gigantes, con zonas de necrosis central y fibrosis periférica.

#### **Clínica:**

En el ganado *Brucella* causa placentitis y aborto. Esto se ha vinculado a la presencia en las membranas fetales animales de eritrol, factor de crecimiento para el germen. La placenta humana no contiene eritrol y el aborto no es parte del cuadro clínico de la brucelosis humana.

#### **Cuadro clínico en el hombre:**

Las cuatro especies tienden a producir cuadros clínicos de diferente gravedad. Así *B. canis* y *B. abortus* causan cuadros más leves, sin complicaciones supurativas. La infección por *B. suis* tiende a evolucionar a la cronicidad, con gran producción de focos de caseum y tendencia a la supuración. La infección por *B. melitensis* (Fiebre de Malta) causa cuadros más graves. Luego de un período de incubación de una a seis semanas, en forma insidiosa o repentina se inicia la enfermedad, con fiebre, astenia marcada, mialgias, artralgias, sudoración, a lo que se agregan adenopatías, esplenomegalia y, raramente, ictericia.

En esta etapa los cultivos son positivos, si el paciente no ha recibido antibióticos. Los síntomas ceden en semanas o meses y las lesiones localizadas prosiguen su evolución.

Luego de la etapa aguda puede desarrollarse una etapa crónica con astenia, artralgias, mialgias y otros síntomas.

A veces se producen complicaciones serias tales como encefalitis, meningitis, neuritis periférica, espondilitis, artritis supurativa y endocarditis.

En esta etapa los cultivos son negativos y puede ser difícil establecer el diagnóstico. El título de anticuerpos aglutinantes puede ser alto.

#### **Diagnóstico:**

En el hombre, el diagnóstico de brucelosis se basa en la sintomatología, los antecedentes epidemiológicos y debe ser siempre confirmado en el laboratorio. Este diagnóstico se establece con certeza al aislar el germen de la sangre. Siempre se deben realizar hemocultivos

en casos sospechosos. También se puede aislar el germen de sitios como médula ósea, hígado, bazo, o incluso líquido cefalorraquídeo, dependiendo del curso de la enfermedad. Debe transmitirse al laboratorio la sospecha de brucelosis no sólo porque se requieren técnicas y procedimientos especiales para aislar el germen, sino porque las muestras deben ser manipuladas con ciertas normas de bioseguridad (nivel de bioseguridad 3) ya que se han reportado casos de transmisión por aerosoles al personal del laboratorio.

#### **Diagnóstico serológico:**

Se dispone de test de aglutinación usando antígenos de *B. abortus* que detectan anticuerpos circulantes (tanto IgG como IgM) contra *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*.

Las muestras de suero deben ser obtenidas lo antes posible, al inicio de la enfermedad y una segunda muestra a las 2 ó 3 semanas de evolución.

Anticuerpos tipo IgM se producen al inicio de la enfermedad, pero también en la etapa de cronicidad. La presencia de anticuerpos puede ser puesta en evidencia por técnicas de aglutinación, la prueba de Rosa de Bengala, inmunofluorescencia indirecta y otras. Títulos de 1:320 o más y títulos crecientes en muestras sucesivas permiten establecer el diagnóstico de brucelosis, mientras que la ausencia de anticuerpos aleja considerablemente esta posibilidad.

#### **Sensibilidad a los antimicrobianos:**

Dado que se trata de un patógeno intracelular, de lento crecimiento, los test de sensibilidad *in vitro* no sirven para predecir la respuesta a los antibióticos. Se utilizan asociaciones de drogas por períodos prolongados y que sean activas intracelularmente. Los regímenes más aceptados incluyen combinaciones de Tetraciclina (o Doxiciclina) con Rifampicina por 6 meses. Otras combinaciones posibles son tetraciclinas más aminoglucósidos o Rifampicina y Trimetoprim, en especial en niños.

#### **Epidemiología, profilaxis y control:**

Es fundamentalmente una zoonosis ocupacional.

Son patógenos animales y el contagio humano suele ser accidental, por contacto con tejidos, orina o leche de animales infectados.

La leche no pasteurizada, sus derivados y la exposición laboral, son los antecedentes más frecuentes (veterinarios, personal de mataderos). Ocasionalmente el contagio ocurre por vía aérea. Los hombres se ven afectados con más frecuencia que las mujeres.

Cierto porcentaje de infecciones pueden ser asintomáticas.

Las tasas de infección del ganado varían en los

diferentes países.

La profilaxis de la enfermedad se logra a través de la vacunación del ganado con cepas vivas avirulentas. Para el control de la Brucelosis bovina se utiliza una vacuna preparada con *B. abortus*, cepas 19, que confiere inmunidad al animal de por vida, y es de bajo costo.

El control de la enfermedad debe estar orientado a: evitar la diseminación, erradicar los reservorios animales, pasteurizar la leche y disminuir el riesgo laboral.

#### **V. *Helicobacter***

En 1982, Marshall y Warren publicaron un trabajo que informaba a cerca de la presencia de bacilos Gram negativos espirilares en biopsias gástricas de pacientes afectados de gastritis.

Originalmente esta bacteria se denominó *Campylobacter pyloridis*.

En 1989 se creó el género *Helicobacter* que agrupa varias especies, entre las cuales tres son patógenas para el hombre (*H. pylori*, *H. fennelliae* y *H. cinaedi*). Otras especies se encuentran en animales.

#### **Morfología, metabolismo:**

Este género comprende bacilos Gram negativos curvos o espirilares. En cultivos viejos adoptan forma de bacilos o cocobacilos. Poseen fagelos únicos o múltiples.

Se trata de gérmenes microaerófilos de lento desarrollo, cuya temperatura óptima de crecimiento es 37°C.

Presentan complejos requerimientos nutricionales y, habitualmente, son aislados en medios ricos con bases como agar brucella, suplementada con sangre y el agregado de antibióticos para inhibir otros gérmenes que puedan hallarse en la muestra.

Las colonias demoran 3 a 4 días en hacerse visibles.

Son catalasa y oxidasa positivos. *Helicobacter pylori* posee además una enzima ureasa que es útil para la identificación y el diagnóstico.

#### **Hábitat:**

Su distribución es mundial, ha sido aislado en pacientes de países desarrollados y no desarrollado; en adultos y niños pequeños.

La vía de transmisión no ha sido aún determinada, pero lo más probable es que sea fecal oral u oral oral.

En los países en desarrollo la infección se adquiere temprano en la infancia, mientras que en Estados Unidos la edad de adquisición es mucho más tardía.

La mayor incidencia de esta infección se asocia a malas condiciones socio económicas.

El hábitat natural de *H. pylori* es la mucosa gástrica

humana.

El estómago, con su pH ácido no es un sector propicio para el crecimiento bacteriano.

La enzima ureasa, producida en grandes cantidades por la bacteria, convierte la urea en amonio lo que crea condiciones más favorables para la sobrevivencia del germen.

Además, la forma de espirilo y la movilidad le conferirían la capacidad de resistir la peristalsis.

La adherencia por medio de adhesinas específicas también contribuiría a la persistencia de **H.pylori** en la mucosa gástrica.

Luego de adquirida la infección, la bacteria reside en la mucosa, sin invadir el epitelio.

Una respuesta inmune de tipo humoral se desencadena pero no es eficaz para curar la infección.

#### **Mecanismos patogénicos, papel en la enfermedad gastro duodenal:**

**H. pylori** produce diversas sustancias que intervendrían en la patogenia de esta infección: ureasa, citotoxinas, mucinasa, lipasa, fosforilasa A, adhesinas y hemolisinas.

El germen parece colonizar el estómago por años o décadas, causando inflamación gástrica leve y persistente; esta suele ser asintomática.

En ciertos casos, y por factores aún no aclarados, (probablemente debido a ciertas características del huésped o de la cepa involucrada) la respuesta inflamatoria progresa.

Entre los factores más estudiados que llevarían a la progresión de la inflamación están una citotoxina, una enzima con capacidad de producir vacuolización de las células y otras sustancias pro inflamatorias.

La asociación de gastritis crónica y úlcera péptica con la infección por **H. pylori** es muy fuerte.

Las tasas de infección por **H. pylori** son significativamente superiores en pacientes con úlcera péptica que en aquellos controles sanos.

También existe asociación de la infección por **H. pylori** y úlcera duodenal; luego de un seguimiento de 10 años se demostró que pacientes con gastritis crónica superficial tienen un riesgo 13 veces mayor de desarrollar úlcera duodenal que los que no tienen gastritis.

Por otra parte, el tratamiento de la infección lleva a la remisión de los síntomas o a la cura de la enfermedad, aunque no previene las recidivas.

La gastritis superficial puede progresar a gastritis crónica atrófica, y más tarde desarrollar adenocarcinoma gástrico, por lo que **H. pylori** sería un factor de riesgo para este tipo de tumores.

Se espera disponer, en un futuro no muy lejano, de modelos experimentales que permitan aclarar la patogenia de esta infección.

**TABLA1**

	glucosa	mitosa	sacarosa	lactosa	DNAsa
<i>N.meningitidis</i>	+	+	-	-	-
<i>N.gonorrhoeae</i>	+	-	-	-	-
<i>N.lactamica</i>	+	+	-	+	-
<i>N.sicca</i>	+	+	+	-	-
<i>N.mucosa</i>	+	+	+	-	-
<i>N.subflava</i>	+	+	v	-	-
<i>N.flavescens</i>	-	-	-	-	-
<i>B.catarhalis</i>	-	-	-	-	+

#### **Métodos de diagnóstico de la infección por H. pylori:**

**Bacteriología:** Se realiza a partir de biopsias de mucosa gástrica o duodenal. Dichas biopsias son homogeneizadas, utilizando para ello morteros y, a partir de ese homogeneizado, se realizan examen directo y cultivo en medios y condiciones de atmósfera y temperatura ya analizados.

Luego de 4 a 7 días las colonias aisladas son identificadas mediante microscopía y pruebas de oxidasa, catalasa y test de ureasa rápida.

A partir de esos cultivos se pueden realizar estudios de susceptibilidad a drogas.

La actividad de la enzima ureasa es tan importante que si se coloca un trozo de biopsia gástrica en caldo urea, la presencia de **H. pylori** se evidencia por la alcalinización del medio de cultivo en minutos a horas, lo que también se utiliza para el diagnóstico.

**Histología:** El estudio anatomopatológico de las biopsias ha demostrado ser muy sensible y específico para el diagnóstico de esta infección. Permite visualizar a las bacterias y sirve para determinar el tipo de lesión histológica (por Ej., gastritis crónica superficial, etc.) y otras lesiones asociadas.

Al igual que el cultivo tiene la desventaja de ser invasivo ya que se requiere de una endoscopia digestiva para obtener la muestra.

#### **Prueba de la urea marcada con carbono radiactivo:**

Consiste en administrar al paciente vía oral urea marcada con <sup>13</sup>C. De estar presente **H. pylori** en el tubo digestivo, la urea es hidrolizada a nivel gástrico por la ureasa liberando CO<sub>2</sub> marcado. Este es detectado por técnicas espirométricas.

#### **Serología:**

La respuesta de anticuerpos puede ser detectada en suero mediante diversas técnicas, en general

inmunoenzimáticas.

El valor de la serología no ha sido aún determinado y hasta el momento se ha utilizado para estudios de seroprevalencia.

**Tratamiento:**

Como en otros aspectos de esta infección, aún no se ha determinado el mejor plan terapéutico para erradicar la infección.

En general se han usado planes que combinan uno o dos antibióticos, activos a nivel gástrico con inhibidores de la bomba de protones.

Se ha utilizado Ampicilina, Amoxicilina, Metronidazol y macrólidos, y han sido descritas resistencia a varias drogas.