JAVIER
SERAFIN

Microbiología Veterinaria

Editor Jefe
Nestor Oscar Stanchi

Editores
Pablo Eduardo Martino
Elida Gentilini
Enso Hugo Reinoso
María Gabriela Echeverría
Nélida Amelia Leardini
Julio Alberto Copes

INTER-médica
Editorial

XXI – 2007

Buenos Aires, República Argentina

Edición en español legalmente autorizada por los editores y protegida en todos los países. Todos los derechos reservados. Esta publicación no se podrá reproducir, almacenar en sistemas de recuperación, transmitir en forma alguna, por medio mecánico, electrónico, fotocopiador, grabador, CD ROM u otro, ni en su totalidad ni en parte, sin autorización escrita del editor. El infractor puede incurrir en responsabilidad penal y civil. Su infracción se halla penada por las leyes 11.723 y 25.446.

NOTA

La medicina veterinaria es un campo en cambio constante. Se deben seguir las precauciones de seguridad convencionales, pero a medida que las nuevas investigaciones y la experiencia clínica expanden nuestros conocimientos puede ser necesario o apropiado implementar cambios en la terapéutica y la farmacoterapia. Se aconseja a los lectores comprobar la información más actualizada del producto provista por el fabricante de cada fármaco que se va a administrar para verificar la dosis recomendada, el método y la duración de la administración y las contraindicaciones. Es responsabilidad del profesional que prescribe, confiando en su experiencia y el conocimiento sobre el paciente, determinar las dosificaciones y el mejor tratamiento para cada caso. Ni el editor ni el autor asumen ninguna responsabilidad debido a lesiones o daños a personas o a la propiedad derivados de esta publicación.

Queda hecho el depósito que previene la ley 11.723
ISBN N° 978-950-555-321-1

Derechos Reservados por:
Nestor Oscar Stanchi © 2007
nestorstanchi@yahoo.com.ar

Diseño: Dr. Nestor Oscar Stanchi
Revisión de estilo: Prof. Nora B. Vázquez

© 2007 - by Editorial Inter-Médica S.A.I.C.I.
Junín 917 - Piso 1° "A" - C1113AAC
Ciudad Autónoma de Buenos Aires - República Argentina
Tels.: (54-11) 4961-7249 - 4961-9234 - 4962-3145
FAX: (54-11) 4961-5572
E-mail: info@inter-medica.com.ar
E-mail: ventas@inter-medica.com.ar
http://www.inter-medica.com.ar
www.seleccionesveterinarias.com

Microbiología Veterinaria/Nestor Oscar Stanchi ... [et al.]; con la colaboración de Pablo Eduardo Martino ... [et al.]; edición a cargo de Nestor Oscar Stanchi ... [et al.].-
1ra. ed. - Buenos Aires: Inter-Médica, 2007.
594 p.: il.; 28x20 cm.

ISBN 978-950-555-321-1

1. Microbiología Veterinaria. I. Stanchi, Nestor Oscar II. Martino, Pablo Eduardo, colab. III. Stanchi, Nestor Oscar, ed.
CDD 636.089

Impreso en Gráfica Guadalupe
Jorge Esq. Corrientes - Rafael Calzada
Pcia. de Bs. As.
Impreso en Argentina - Printed in Argentina

Este libro se terminó de imprimir el 20 de abril de 2007.
Tirada 2000 ejemplares

PREFACIO

Como sólida confirmación del éxito de *Temas de Microbiología Veterinaria*, de 1996, se ofrece hoy a la comunidad académica la edición del libro *Microbiología veterinaria*. Los editores han resuelto en esta obra, con un excelente trabajo integrador y la convocatoria de un aumento significativo de la calidad y cantidad de autores, la demanda que significa algo más de un lustro del desarrollo científico de la microbiología.

Existe un equilibrio, que ya fue determinante en el valor agregado de la primera edición, entre la actualización y profundización de los conocimientos básicos, necesarios para la comprensión de los problemas de patología animal, y su integración global en la microbiología clínica, alimentaria y ambiental.

Este nuevo trabajo, cumpliendo con el ideario planteado en el prefacio del primero, cimentado en la elección de un grupo de autores de excelencia, ha permitido a los editores duplicar la estructura de los contenidos. Su gran valor, es que en esta expansión la obra se pone cada vez más lejos de ser un compendio enciclopedista y se consolida como un texto "amable" para los estudiantes y un intermedio irremplazable para los especialistas. El alcance de la información y la estructura aseguran la cobertura de la problemática local y la validez competitiva para su expansión en la comunidad hispanoparlante.

En el prefacio de *Temas de Microbiología Veterinaria*, Roberto Cacchione puntualizó el valor armónico de la obra, en la integración de los problemas de salud humana y animal. Predijo el éxito, entre otros aspectos, en virtud de la particular capacidad de la presentación para la resolución de problemas prácticos de las zoonosis. Es una tarea honrosa y realmente emotiva asistir de cerca, como me toca en este caso, al crecimiento ordenado de la ciencia y la capacidad profesional en nuestro país. Nada hay más importante que el tremendo esfuerzo que significa la producción de esta herramienta insustituible en el desarrollo académico: generar un excelente libro de texto.

Ramón A. de Torres

PREFACIO DE *TEMAS DE MICROBIOLOGIA VETERINARIA* DE 1996

La etapa que transita la microbiología de fines del siglo XX permite disponer de métodos diagnósticos precisos, de técnicas que conceden resultados seguros y rápidos, pudiendo además echar mano a recursos auxiliares que la técnica moderna pone a su disposición. Todos estos procedimientos de los que puede hacerse uso constituyen un valioso auxiliar para el diagnóstico aplicable a la clínica animal y humana, al otorgar bases científicas sólidas y de empleo práctico.

Además, proporcionan conocimientos útiles para el pronóstico de una enfermedad y, en buena medida, permiten manejar tratamientos y medidas de profilaxis que resulten más oportunas.

Todas éstas son las aspiraciones que pretende este nuevo libro: ofrecer a los profesionales de la rama biomédica, tanto a los de nivel general como a los especialistas, conocer en general los fundamentos de los métodos habituales disponibles para ser utilizados para el bienestar de la comunidad, ejercer su profesión con un criterio científico seguro y esperar resultados satisfactorios.

Esta obra científica, realizada por un núcleo progresista de profesionales veterinarios, enriquece la bibliografía de Hispanoamérica sobre tan importante tema y es un fiel exponente de los avances efectivos contemporáneos en la materia. Abarca métodos y técnicas de aplicación diaria en la clínica humana y veterinaria, y requiere para su aprovechamiento y utilidad poseer conocimientos e ideas básicas y generales de las patologías más frecuentes que a nivel de estudiantes y de profesionales conocen sobradamente.

Se espera de esta primera edición que el libro que se ofrece logre plasmar las inquietudes que inspiraron a sus autores y colaboradores, otorgando un nuevo elemento de consulta con novedades científicas dentro de la microbiología moderna, y que esta versión resulte de verdadero provecho y enorme utilidad dadas sus excelentes cualidades didácticas, con conocimientos actualizados y de realización en la práctica general.

Roberto A. Cacchione

PROLOGO

Han transcurrido más de ocho años desde la edición del libro aparecido como *Temas de Microbiología Veterinaria*. La recepción y los buenos comentarios, así como las críticas constructivas nos han obligado a plantearnos la necesidad de revisarla y ampliarla a la mayoría de los temas que el estudiante de las ciencias médicas necesita para su formación básica. Además, si bien el libro está orientado a las ciencias veterinarias, también los editores lo consideramos de utilidad para las ciencias biomédicas en general. Se han incorporado capítulos de la microbiología general, la bacteriología, y se ha modificado en parte la micología. El agregado de los temas de la virología complementa esta obra para su uso por parte del estudiante de ciencias biológicas con énfasis en veterinaria. La microbiología veterinaria está estrechamente emparentada con la microbiología clínica en medicina humana; gran parte de los autores y editores de esta obra ejercen su actividad profesional estudiando la microbiología humana, veterinaria y de alimentos. De allí es que se ha cambiado el título de la obra, ahora como *Microbiología Veterinaria* contemplando la mayoría de los temas que abarcan los programas de estudio de los estudiantes de varias ramas de esta ciencia.

Como se mencionó en el prólogo del libro *Temas de Microbiología Veterinaria* "...en el caso de los estudiantes latinoamericanos consideramos que el enfoque debe ser dirigido a encarar la problemática que involucra a los países que componen la región", hemos querido mantener en ésta el mismo espíritu, aunque no podemos dejar de lado que la globalización afecta también a las enfermedades y sus causas. Un foco de enfermedad puede iniciarse en Asia y en pocas horas personas y/o animales podrán estar en Europa o América diseminando dicha enfermedad. De allí es que intentamos mencionar las enfermedades emergentes que podrían afectar a la región.

Hemos también cumplido la meta propuesta de 1996: "...que futuras ediciones incorporen nuevos capítulos" y también "...deseamos aprender nosotros, para perfeccionarnos en búsqueda de brindar lo mejor a los educandos". Hemos aprendido mucho e intentamos volcarlo en este nuevo libro.

Nuestro agradecimiento a todos aquellos que han hecho posible la realización de este material.

Los editores

Colaboradores

Carlos F. Amasino

Bacteriólogo Clínico e Industrial. Doctor en Ciencias Veterinarias. Profesor Titular Cátedra de Enfermedades Infecciosas. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Miguel Angel Ayala

MédicoVeterinario. Bacteriólogo Clínico e Industrial. Jefe de Trabajos Prácticos y Responsable del Servicio Externo de Diagnóstico Serológico de la Cátedra de Animales de Laboratorio y Bioterio. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Lucila Emilia Bautista

Médica Veterinaria y Bacterióloga Clínica e Industrial, Universidad Nacional de La Plata. Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Pablo Cesar Baldi

Bioquímico, Doctor de la Universidad de Buenos Aires. Profesor Adjunto Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Investigador Adjunto del CONICET.

Sándor Belák

DVM, PhD, DSc. Profesor y Jefe de Joint R&D Division, Departamentos de Virología. Instituto Nacional Veterinario y Universidad Sueca de Ciencias Agrícolas. Uppsala, Suecia

Luis Bentancor

Médico Veterinario, Departamento de Desarrollo. Instituto de Sanidad Ganadera.

Raúl A. Bowden †

M.V., Dr. Sci. Profesor Ordinario Adjunto Area Inmunoquímica y Biotecnología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNICEN, Tandil, Argentina.

Bibiana Brihuega

Investigadora INTA. Asociación Argentina de Zoonosis.

Celina Buscaglia

Médica Veterinaria, Master de Ciencias en Patología Comparada, PhD. Profesora Adjunta Cátedra de Zootecnia Especial III (Aves y Pilíferos). Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. Investigadora Adjunta CIC de la Prov. de Buenos Aires.

Roberto Caffarena †

Profesor Titular Cátedra de Patología y Producción Avícola. Facultad de Veterinaria. Montevideo. Uruguay.

María del Pilar Cagliada

Médica Veterinaria. Bacterióloga Clínica e Industrial. Jefa de Trabajos Prácticos y Responsable del Laboratorio y del Servicio Externo de Diagnóstico Microbiológico de la Cátedra de Animales de Laboratorio y Bioterio. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Francisco Capano

Profesor Adjunto del Curso de Enfermedades Infecciosas. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República. Montevideo. Uruguay.

Cecilia Carbone

Médica Veterinaria. Profesora Titular Cátedra de Animales de Laboratorio y Directora del Bioterio. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Carol Cardona

DVM, PhD, Universidad de California, Davis, Rm. 1383 Surge III, Universidad de California, Davis, Davis, CA. Estados Unidos.

Graciela Carloni

Médica Veterinaria. Doctora de la Universidad de Buenos Aires. Profesora Adjunta Regular de Microbiología de la

Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires.

Juliana Cassataro

Licenciada en Ciencias Biológicas. Doctora de la Universidad de Buenos Aires. Ayudante de Primera. Area Inmunología. Facultad de Medicina Universidad de Buenos Aires. Cátedra de Microbiología. Orientación Bacteriología. Becaria Posdoctoral CONICET.

Fernanda Castro

Técnica en Laboratorio. Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de la Patagonia San Juan Bosco.

María Catena

Médica Veterinaria Doctora en Ciencia Animal. Profesora Adjunta del Area de Enfermedades Infecciosas del Departamento SAMP de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNCPBA. Docente-investigadora del Núcleo Consolidado SAMP de la UNCPBA.

Raúl Oscar Cerdá

Jefe de Trabajos Prácticos. Cátedra de Patología de Aves y Pilíferos. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Diego J. Comerci

Licenciado en Ciencias Biológicas. Doctor en Biología Molecular y Biotecnología, Investigador del Grupo Pecuario de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA). Profesor Adjunto de Microbiología General del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas de la Universidad de Gral. San Martín (IIB-UNSAM).

Julio Alberto Copes

Profesor Adjunto. Cátedra de Tecnología de los Alimentos. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Susana Beatriz Córdoba

Jefa de Trabajos Prácticos. Cátedra de Micología. Universidad Nacional de La Plata. Instituto Nacional de Microbiología ANLIS Carlos Malbrán.

Graciela Ana Denamiel

Médica Veterinaria. Jefa de Trabajos Prácticos. Cátedra de Microbiología Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires.

Silvina Díaz

Licenciada en Genética de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones y Doctora en Ciencias Naturales de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata.

María Gabriela Echeverría

Médica Veterinaria. Bacterióloga Clínica e Industrial. Doctora en Ciencias Veterinarias. Profesora Adjunta. Cátedra de Virología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Investigadora Adjunta (CONICET).

Silvia Estein

Médica Veterinaria. Departamento de Sanidad Animal y Medicina Preventiva. Facultad de Ciencias Veterinarias, Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNICEN) Tandil.

Carlos Alberto Fossati

Doctor en Bioquímica de la Universidad Nacional de La Plata. Profesor Adjunto a Cargo de Inmunología. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. Investigador Principal CONICET.

Cecilia Mónica Galosi

Bacterióloga Clínica e Industrial. Doctora en Ciencias Veterinarias. Jefa de Trabajos Prácticos. Cátedra de Virología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Investigadora CIC.

Eleatrice María de las Mercedes Gatti

Médica Veterinaria. Doctora en Bacteriología Clínica e Industrial. Jefa de Trabajos Prácticos. Cátedras de Microbiología y Micología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Elida Gentilini

Médica Veterinaria. Doctora de la Universidad de Buenos Aires. Directora de la Maestría en Salud Animal. Profesora Regular Adjunta de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires.

Gabriela Giacoboni

Doctora en Ciencias Veterinarias. Bacterióloga Clínica e Industrial. Profesora Adjunta. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Guillermo H. Giambartolomei

Bioquímico. Doctor de la Universidad de Buenos Aires. Investigador CONICET. Jefe de Trabajos Prácticos. Cátedra de Inmunología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

Eduardo Juan Gimeno

Médico Veterinario. Doctor en Ciencias Veterinarias. Master Science, PhD. Profesor Titular Cátedra de Patología General y Profesor Asociado de Patología Especial. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Investigador CONICET.

Andrea Giordano

Jefa de Trabajos Prácticos. Cátedra de Clínica de Pequeños Animales. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Guillermo Giovambattista

Licenciado en Biología y Doctor en Ciencias Naturales de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata.

Fernando A. Goldbaum

Bioquímico y Doctor en Inmunología. Investigador Independiente del CONICET. Fundación Instituto Leloir.

Carlos Mario Gómez

Médico Veterinario. Bacteriólogo Clínico e Industrial. Profesor Titular Cátedra Inmunología II. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Jefe de Departamento Sueros y Vacunas. Laboratorio Central de Salud Pública. Ministerio de Salud. Provincia de Buenos Aires.

Sandra Gabriela Gómez de Saravia

Doctora en Ciencias Naturales. Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA). CICBA. Facultad de Ciencias Naturales y Museo.

Ester Teresa González

Licenciada en Ciencias Biológicas. Doctora en Bacteriología Clínica e Industrial. Profesora Adjunta Cátedra de Virología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Patricia Sandra Guiamet

Doctora en Ciencias Naturales y Bacterióloga Clínica e Industrial. Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA). Departamento de Química. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP-CONICET. Cátedra de Microbiología Aplicada. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP.

Miguel A. Herrero Loyola

Médico Veteterinario. Profesor Adjunto. Cátedra de Patología de Aves y Pilíferos. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Verónica It Carollo

Médica Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Isabel N. de Kantor

Doctora en Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Responsable del Laboratorio de Referencia en Micobacterias (CEPANZO /INPPAZ) OPS/OMS y OIE.

Mariana Eva Kienast

Médica Veterinaria y Doctora en Ciencias Veterinarias de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Irene Lager

Laboratorio de Virología. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina.

Nélida Amelia Leardini

Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Especialista en Microbiología Clínica de la Universidad de Buenos Aires. Profesora Titular de Microbiología de la Universidad CAECE (Centro Altos Estudios de Ciencias).

Oscar Roberto Linzitto

Doctor en Ciencias Veterinarias. Bacteriólogo Clínico e Industrial. Profesor Adjunto Cátedra de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Juan Pedro Lirón

Licenciado en Genética de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones y Doctor en Ciencias Naturales de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata.

Clara López

Magíster en Salud Pública. Universidad de Buenos Aires. Jefa de Trabajos Prácticos. Area Veterinaria en Salud Pública. Carreras de Veterinaria y Licenciatura en Gestión

de Agroalimentos. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires.

Alejandro J. Mariñelarena

Investigador Adjunto CIC Buenos Aires. Instituto de Limnología "Dr. R. Ringuelet". La Plata. Buenos Aires.

Pablo Eduardo Martino

Doctor en Ciencias Veterinarias. Profesor Cátedra de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Investigador Científico (CIC).

Juan José Martino †

Médico Veterinario. Bacteriólogo Clínico e Industrial. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Shankar P. Mondal

DVM. MS. Universidad de California. Davis. Rm. 1383 Surge III. Universidad de California. Davis. Davis. Estados Unidos.

Fabiana Moredo

Médica Veterinaria. Jefa de Trabajos Prácticos. Cátedra de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Ana Rita Moreira

Médica Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Balcarce.

Jorge Moreno-López

DVM. PhD. Dr. Hc. Profesor de Virología. Universidad Sueca de Ciencias Agrícolas, SLU. Suecia.

Gabriela Mariel Nuñez

Licenciada en Biología y Bacterióloga Clínica e Industrial. Cátedra de Micología Médica e Industrial. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación y Tecnología del Cuero del Instituto Nacional de Tecnología Industrial.

Florencia Laura Pantozzi

Médica Veterinaria. Bacterióloga Clínica e Industrial. Jefa de Trabajos Prácticos. Cátedra de Microbiología Especial. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Fernando Alberto Paolicchi

Médico Veterinario. Universidad del Centro de la Pcia. de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Magíster en Ciencias Biológicas (MSc). Universidad de Chile. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Profesor Universidad Nacional de Mar del Plata. Facultad de Ciencias Agrarias. Area de Especialización Bacteriología y Patología Veterinarias.

Alberto Ernesto Parma

Doctor en Bioquímica. Diploma Internacional en Biotecnología Universidad Kent, Inglaterra; Profesor Titular de Inmunoquímica y Biotecnología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Centro. Investigador Principal CIC.

María Elisa Pavan

Centro de Investigaciones Médicas "Albert Einstein". Buenos Aires. Argentina.

Marcelo Ricardo Pecoraro

PhD. Profesor Adjunto. Cátedra de Virología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Pilar Peral García

Licenciada en Biología y Doctora en Ciencias Naturales de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata.

Carlos Juan Perfumo

Médico Veterinario. Bacteriólogo Clínico e Industrial. Doctor en Ciencias Veterinarias. PhD en Ciencias Médicas Veterinarias. Graduado, Escuela de Agricultura y Ciencias Naturales. Universidad de Tokyo. Profesor Asociado. Cátedra de Patología Especial. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Miguel Angel Petruccelli

Doctor en Ciencias Veterinarias. Director del Servicio Central de Microscopia Electrónica. Profesor Titular. Cátedra de Patología de Aves y Pilíferos. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Miguel Víctor Píscopo

Médico Veterinario. Profesor Adjunto, Cátedra de Patología de Aves y Pilíferos. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Enrique Leo Portiansky

Doctor en Ciencias Veterinarias. Master of Sciences en Inmunología. Profesor Adjunto. Cátedra de Patología General Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Enso Hugo Reinoso

Bacteriólogo Clínico e Industrial. Farmacéutico. Profesor Titular de Micología. Carrera de Microbiólogo Clínico e Industrial. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Jorge Enrique Renner

Médico Veterinario. Ex Profesor Titular Cátedra de Clínica de Grandes Animales. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

María Verónica Ripoli

Licenciada en Biología y Doctora en Ciencias Naturales de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata.

Teresa Rojas Flores

Licenciada en Biología. Profesora del Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. Cuba.

María Isabel Romano

Doctora en Bioquímica UBAcas (MSc). Investigadora Independiente CONICET. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Instituto de Biotecnología. Laboratorio de Micobacterias.

Sergio Adrián Samus

Médico Veterinario. Bacteriólogo Clínico e Industrial. Laboratorio LADIPREVET.

José Manuel Sánchez-Vizcaíno

Profesor Catedrático del Area de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. España.

Heiji Sato

Profesor de Microbiología. Escuela de Medicina Veterinaria. Universidad de Kagoshima. Kagoshima. Japón.

Alfredo C. Seijo

Médico Infectólogo. Jefe del Servicio de Zoonosis del Hospital FJ Muñiz. Profesor Adjunto de Infectología. Universidad Favaloro.

Nestor Oscar Stanchi

Bacteriólogo Clínico e Industrial. Doctor en Ciencias Veterinarias. Profesor Titular Cátedra de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Profesor Microbiología General. Carrera Magíster en Tecnología y Sanidad de los Alimentos. Facultades de Ciencias Veterinarias y Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. Profesor Adjunto Cátedra de Microbiología e Inmunología. Facultad de Odontología. Universidad Católica de La Plata. Coordinador Carrera de Veterinaria. Universidad Católica de Cuyo (San Luis).

Horacio Raúl Terzolo

Médico Veterinario. Universidad de Buenos Aires. Doctor en Filosofía (PhD). Especializado en Bacteriología Veterinaria. Universidad de Edimburgo. Escocia. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación Experimental Agropecuaria de Balcarce. Laboratorio de Bacteriología.

Marcela Sara Testa

Médica Veterinaria. Laboratorio LADIPREVET.

Marta Beatriz Tobía

Bacterióloga Clínica e Industrial. Profesora Adjunta. Cátedras de Microbiología Especial y Microbiología Aplicada. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Herbert Trenchi

Profesor Adjunto de Patología y Producción Avícola. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República. Montevideo. Uruguay.

María del Luján Tunes

Jefa de Trabajos Prácticos. Cátedra de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Alejandro Rafael Valera

Médico Veterinario. Jefe de Trabajos Prácticos. Cátedra de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Germán Blas Vigo

Médico Veterinario. Bacteriólogo Clínico e Industrial. Jefe de Trabajos Prácticos. Cátedra de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Egle Etel Villegas Castagnasso

Licenciada en Biología de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata.

Jorge C. Wallach

Médico Especialista en Enfermedades Infecciosas. Médico Especialista en Tisioneumonología y en Medicina del Trabajo. Doctor en Medicina Interna. Docente Cátedra de Enfermedades Infecciosas. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.

Jorge Zorzópulos

Doctor en Bioquímica. Director del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Fundación Pablo Cassará. Investigador Principal del CONICET.

CONTENIDO

PARTE I MICROBIOLOGIA GENERAL

Capítulo 1. Historia de la microbiología 3

In memoriam † Juan Jose Martino

Pablo Eduardo Martino

Capítulo 2. La ciencia microbiológica 6

Nestor Oscar Stanchi

La microbiología. Clasificación. Las bacterias y su taxonomía. Principales grupos bacterianos. Cómo escribir nombres científicos. Nombres comunes. Nombre de la especie. Nomenclatura binomial.

Capítulo 3. Evolución microbiana 10

María Elisa Pavan, Jorge Zorzópulos

Evolución dentro de los dominios.

Capítulo 4. Citología bacteriana 16

Nestor Oscar Stanchi, Elida Gentilini

Material nuclear. Estructuras citoplásmicas. Estructuras externas. Membrana celular. Pared celular. Componentes especiales de la pared celular. Protoplastos, esferoplastos y formas L. Cápsula. Slime o polisacárido extracelular. Biofilm. Glicocalix. Membrana de envoltura de bacterias gramnegativas. Flagelos. Pili, pelos o fimbrias. Endosporas. Morfología y agrupación bacteriana. Tamaño. Reproducción asexual. Reproducción sexual.

Capítulo 5. Conceptos sobre metabolismo y nutrición bacteriana 25

Oscar Roberto Linzitto

Fases del metabolismo y producción de la energía. Enzimas. Caminos metabólicos de las bacterias. Fosforilación a nivel de sustrato: fermentaciones. Transporte de electrones por fosforilación. Respiración: fosforilación oxidativa. Esquemas y balance de la fosforilación oxidativa. Cadenas de electrones ramificadas. Mecanismo de la ATP-sintasa dependiente de protones. Respiraciones anaeróbicas. Bacterias fotosintéticas. Fotofosforilación. Componentes del aparato fotosintético. Funcionamiento de un fotosistema. Nutrición bacteriana. Introducción. Requerimientos y factores nutricionales de la célula bacteriana. Factores de crecimiento.

Capítulo 6. Material de laboratorio microbiológico 32

Nestor Oscar Stanchi

Material de vidrio. Instrumental. Aparatos. Uso de materiales descartables.

Capítulo 7. Microscopia 35

Miguel Angel Petruccelli

Historia del microscopio. Iluminación en campo brillante. Iluminación sobre campo oscuro. Microscopios de fluorescencia. Microscopia electrónica.

Capítulo 8. Observación microscópica 40

María del Luján Tunes

Medición del aumento del microscopio. Medición de objetos. Métodos de observación microscópica –Observación en fresco. Método simple (entre porta y cubreobjetos). Observación previa coloración. Tinciones acidorresistentes. Métodos de rutina. Métodos especiales.

Capítulo 9. Toma de muestras 49

María del Luján Tunes

Ciclo diagnóstico. Concepto de enfermedad infecciosa. Concepto de muestra. Remisión de las muestras. Muestras para cultivo aeróbico.Metodología aconsejada según el tipo de muestra. Especial referencia en pequeños animales.

Capítulo 10. Cultivo bacteriano 62

Lucila Emilia Bautista, Nestor Oscar Stanchi

Metabolismo bacteriano. Cultivo de microorganismos. Desarrollo o crecimiento. Curva de crecimiento bacteriano. Factores que influyen sobre el crecimiennto bacteriano. Cultivo de microorganismos aerobios in vitro. Medios de cultivo. Aislamiento. Técnicas de cultivo. Morfología y aspecto de las colonias y poblaciones microbianas. Cultivo de microorganismos anaerobios.

Capítulo 11. Marcha bacteriológica 71

Lucila Emilia Bautista, Nestor Oscar Stanchi

Decisión. Recolección de la muestra. Transporte. Observación microscópica. Antibiograma. Pruebas serológicas. Protocolo de envío de muestras al laboratorio de microbiología.

Capítulo 12. Conceptos de esterilización 78

Nestor Oscar Stanchi, Elida Gentilini, Carlos Mario Gómez

Introducción. Agentes físicos: Calor. Frío. Filtración. Ultrapresión. Ultrasonido. Radiaciones. Agentes químicos.

Capítulo 13. Pruebas inmunoserológicas de diagnóstico en microbiología..... 88

Enrique Leo Portiansky

Introducción. Pruebas inmunoserológicas. Interpretación de las pruebas serológicas. Comentario final.

Capítulo 14. Genética bacteriana 103

Elida Gentilini

Cromosoma bacteriano. Estructura del DNA. Replicación del DNA. Código genético. Síntesis proteica. Regulación de la expresión genética. Represión por catabolitos. Intercambio genético entre las bacterias. Plásmidos. Bacteriófagos. Transposones. Mecanismos de transferencia genética. Mutación. Introducción a las técnicas de biología molecular. Tecnología del DNA recombinante. PCR.

Capítulo 15. Animales de laboratorio..... 121

Cecilia Carbone, María del Pilar Cagliada, Miguel Angel Ayala

Introducción y conceptos generales. Definición de animal de laboratorio. Bienestar animal. Categorización. Biología y manejo de las especies más comunes de laboratorio.

Capítulo 16. Conceptos generales de virología 136

Nestor Oscar Stanchi, Elida Gentilini, María Gabriela Echeverría

Introducción. Tamaño. Estructura. Acidos nucleicos. Simetría de la cápside. Envoltura. Clasificación de los virus. Propiedades de los virus. Ciclo de infección de un virus. Replicación del ácido nucleico viral. Ciclo de infección de los virus bacterianos. Lisogénesis. Otros agentes parásitos obligados: rickettsias y clamidias.

Capítulo 17. Técnicas de estudio y diagnóstico virológico 145

Nestor Oscar Stanchi, María Gabriela Echeverría

Introducción. El cultivo viral. Siembra del material para estudio virológico: inoculación. Detección directa. Observación directa de partículas.

Capítulo 18. Técnicas de análisis molecular..... 153

Guillermo Giovambattista, María Verónica Ripoli, Silvina Díaz, Egle Etel Villegas Castagnasso, Verónica It Carollo, Juan Pedro Lirón, Mariana Eva Kienast, Pilar Peral García

Electroforesis. Técnicas de hibridación en filtros por transferencia Southern blot. Clonación de secuencias de DNA. Purificación de DNA plasmídico. Secuenciación de DNA. Nuevas metodologías de análisis genético.

Capítulo 19. Antimicrobianos 162

Elida Gentilini

Desarrollo histórico. Propiedades de un antibiótico ideal. Resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos. Mecanismos básicos de acción antibiótica. Antifúngicos.

PARTE II BACTERIOLOGIA

Capítulo 20. Estreptococos 179

Graciela Ana Denamiel

Introducción. Historia. Especies. Hábitat. Características morfológicas y composición química. Características culturales y metabólicas. Estreptococos de interés en veterinaria. Clasificación antigénica. Diagnóstico de laboratorio. Resistencia. Lisogenia. Mecanismos de patogenicidad. Importancia.

Capítulo 21. Enterococos..... 186

Graciela Denamiel

Introducción. Historia. Hábitat. Características morfológicasy metabólicas. Diagnóstico. Clasificación antigénica. Resistencia. Factores de patogenicidad. Importancia.

Capítulo 22. Estafilococos..... 190

Elida Gentilini

Introducción. Historia. Hábitat. Morfología. Características de cultivo. Características bioquímicas. Productos celulares relacionados con la patogenicidad. Resistencia. Estafilococos coagulasa negativos. Clasificación serológica, bacteriofágica o lisotipo. Modo de infección y transmisión. Importancia del estudio de los estafilococos en veterinaria. Diagnóstico de laboratorio. Epidemiología. Tratamiento.

Capítulo 23. Enterobacterias 195

Marta Beatriz Tobía, Florencia Laura Pantozzi

Introducción. Descripción de la familia. Pared celular de las enterobacterias. Características antigénicas. Hábitat natural. Significado clínico. Clasificación.

Capítulo 24. Escherichia 197

Alberto Ernesto Parma

Introducción. Epidemiología. Clasificación. Morfología y características generales. Respuesta inmune. Patogénesis y aspectos clínicos. Diagnóstico de laboratorio. Serología. Tratamiento. Profilaxis.

Capítulo 25. Klebsiella 203

María del Luján Tunes

Tribu *Klebsiella*. Géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Hafnia* y *Pantoea*. Clasificación. Factores de virulencia. Identificación bioquímica básica. Tratamiento. Profilaxis.

Capítulo 26. Salmonella 210

María del Luján Tunes, Germán Blas Vigo

Introducción. Clasificación. Características morfológicas. Antígenos involucrados en la serotipificación. Poder patógeno. Diagnóstico de laboratorio. Nociones de patogenia. Tratamiento.

Capítulo 27. Shigella 215

María del Luján Tunes

Introducción. Clasificación. Características morfológicas. Características culturales. Factores de virulencia. Poder patógeno. Patogenia. Diagnóstico de laboratorio.

Capítulo 28. Yersinia 218

Nestor Oscar Stanchi

Y. enterocolitica. Crecimiento. Epidemiología. Diagnóstico de laboratorio. Patología. Sintomatología. Tratamiento. *Y. pseudotuberculosis*. *Y. pestis*. Factores de patogenicidad. Diagnóstico. Prevención y tratamiento.

Capítulo 29. Vibrio 222

Nélida Amelia Leardini

Introducción. Estudios genómicos de *Vibrio cholerae*. Ecología y microbiología de *Vibrio cholerae*. Epidemiología. Patogénesis. Factores de virulencia. Recolección y transporte de muestras. Cultivo, aislamiento e identificación. Tratamiento. Perspectivas futuras. Infecciones por *Vibrio* en peces.

Capítulo 30. Aeromonas 227

Nélida Amelia Leardini

Introducción. Epidemiología. Taxonomía. Patogénesis. Diagnóstico de laboratorio. Infecciones por *Aeromonas* en animales. *Aeromonas salmonicida*. Enfermedades bacterianas en reptiles. Estomatitis infecciosa. Infecciones respiratorias. Enfermedades de anfibios.

Capítulo 31. Plesiomonas 232

Nélida Amelia Leardini

Introducción. Epidemiología. Patogénesis. Identificación. Terapéutica.

Capítulo 32. Pseudomonas 235

Elida Gentilini

Pseudomonas aeruginosa. Hábitat. Morfología. Fisiología. Resistencia a los antibióticos. Poder patógeno. Resistencia a agentes físicos y químicos. Diagnóstico de laboratorio. Epidemiología. Tratamiento y control.

Capítulo 33. Actinobacillus 239

Fabiana Moredo, Carlos Juan Perfumo

Introducción. Epidemiología. Clasificación. Morfología y características generales. Estructura. Antígenos: serotipos. Factores de virulencia. Patogénesis y respuesta inmune. Aspectos clínicos. Diagnóstico de laboratorio. Tratamiento. Profilaxis.

Capítulo 34. Haemophilus, Histophilus y Avibacterium 244

Horacio Raúl Terzolo, Ana Rita Moreira

Introducción. Epidemiología. Morfología y características generales. Respuesta inmune. Patogénesis. Aspectos clínicos y patológicos. Diagnóstico. Tratamiento y desinfección. Profilaxis.

Cap 35. Erysipelothrix 254

Germán Blas Vigo

Introducción. Epidemiología. Clasificación. Morfología y características generales. Estructura antigénica. Respuesta inmune. Patogénesis. Diagnóstico de laboratorio. Tratamiento. Profilaxis.

Capítulo 36. Listeria 258

Nélida Amelia Leardini

Introducción. Caracteres del género. Distribución natural. Significación clínica. Mecanismos de transmisión. Estructura antigénica. Sensibilidad a los agentes antimicrobianos.

Procedimientos de cultivo, aislamiento e identificación. Listeriosis. Prevención de la contaminación de los alimentos. Advertencias generales para reducir riesgos. Advertencias para grupos de riesgo. Prácticas higiénicas útiles para todas las enfermedades de origen alimentario.

Capítulo 37. Pasteurella 267

Oscar Roberto Linzitto

Taxonomía. Hábitat. Características morfológicas. Características culturales. Características bioquímicas. Características antigénicas y serológicas. Características patogénicas y especies afectadas. Factores patogénicos. Transmisión. Signos clínicos. Patología. Características patogénicas experimentales. Diagnóstico. Tratamiento, prevención y control. Aspectos de salud pública.

Capítulo 38. Campylobacter 274

Horacio Raúl Terzolo, María Catena

Introducción. Epidemiología. Morfología y características generales. Respuesta inmune. Patogénesis. Aspectos clínicos. Diagnóstico de laboratorio. Tratamiento. Profilaxis.

Capítulo 39. Brucella 281

In memoriam † Raúl A. Bowden

Pablo C. Baldi, Juliana Cassataro, Diego J. Comerci, Silvia Estein, Carlos A. Fossati, Guillermo H. Giambartolomei, Fernando A. Goldbaum, Jorge C. Wallach

Introducción. Epidemiología. Clasificación. Morfología. Características culturales. Respuesta inmune. Patogenia. Aspectos clínicos. Diagnóstico de laboratorio. Tratamiento. Profilaxis. Descontaminación.

Capítulo 40. Bacillus 294

Luis Bentancor

Bacillus anthracis. Características morfológicas. Características fisiológicas. Resistencia. Patogenia. Diagnóstico. Prevención. Tratamiento. *Bacillus cereus*. *Bacillus subtilis*. Otras especies de *Bacillus*. Otros géneros.

Capítulo 41. Micobacterias 300

Isabel N. de Kantor

Introducción. Epidemiología. Clasificación. Morfología y características generales. Patogénesis. Respuesta inmune. Aspectos clínicos. Diagnóstico de laboratorio. Tratamiento.

Capítulo 42. Paratuberculosis 307

Fernando Paolicchi, María Isabel Romano

Introducción. Epidemiología. Aspectos clínicos. Morfología y características generales. Inmunopatología. Diagnóstico de laboratorio. Programa de control.

Capítulo 43. Micoplasmas 313

Raúl Oscar Cerdá

Introducción. Epidemiología. Clasificación. Morfología. Inmunidad. Patogénesis. Aspectos clínicos. Diagnóstico de laboratorio. Tratamiento. Profilaxis.

Capítulo 44. Formas-L bacterianas 318

Heiji Satò

Introducción. Clasificación. Inducción de las formas-L. Morfología y ultraestructura. Reproducción y reversión. Aspecto genético de las formas-L. Patogenicidad. Investigaciones futuras.

Capítulo 45. Leptospiras 320

Nestor Oscar Stanchi, Bibiana Brihuega, Eleatrice María de las Mercedes Gatti

Introducción. Epidemiología. Clasificación. Morfología y características generales. Modo de transmisión. Respuesta inmune. Patogénesis. Aspectos clínicos. Diagnóstico bacteriológico. Tratamiento. Profilaxis.

Capítulo 46. Borrelia 326

Nestor Oscar Stanchi

Introducción. Epidemiología. Clasificación. Morfología. Respuesta inmune. Patogenicidad. Aspectos clínicos. Diagnóstico de laboratorio. Tratamiento. Profilaxis.

Capítulo 47. Bordetella 328

Carlos Juan Perfumo

Introducción. Clasificación. Entidades producidas por la infección por *Bordetella bronchiseptica*. Factores de patogenicidad (virulencia). Regulación genética de los factores de patogenicidad. Patogenia en las distintas especies. Diagnóstico. Control de la infección mediante medicación. Control de la infección mediante vacunación.

Capítulo 48. Neisseria 331

Nélida Amelia Leardini

Introducción. Descripción. Hábitat de especies aisladas en animales. Distribución natural. *Neisseria meningitidis*. Epidemiología. Morfología. Identificación. Tipificación. Sensibilidad a los antimicrobianos. Prevalencia de *Neisseria*. Comensales y géneros relacionados.

Capítulo 49. Moraxella 336

Nélida Amelia Leardini

Introducción. *Moraxella lacunata*. *Moraxella bovis*. Epidemiología. Diagnóstico de laboratorio. Tratamiento.

Capítulo 50. Acinetobacter 340

Nélida Amelia Leardini

Introducción. Epidemiología. Taxonomía. Identificación. Sensibilidad a los antimicrobianos.

Capítulo 51. Bacterias anaerobias 343

Graciela Carloni

Géneros de bacterias anaerobias de interés veterinario. Bacilos anaerobios no esporulados gramnegativos.

Capítulo 52. Clostridium 347

Graciela Carloni

Generalidades. Toxinas. Genética. Resistencia. Prevención. Diagnóstico de laboratorio. Especies patógenas de importancia en veterinaria. *C. chauvoei. C. septicum. C. novyi. C. haemolyticum. C. sordelli. C. perfringens. C. botulinum. C. tetani. C. difficile. C. spiriforme. C. colinun.*

Capítulo 53. Chlamydia 356

In memoriam † Roberto Caffarena

Herbert Trenchi, Francisco Capano

Introducción. Epidemiología. Clasificación. Morfología y características generales. Respuesta inmune. Patogénesis. Aspectos clínicos. Diagnóstico de laboratorio. Tratamiento. Profilaxis.

Capítulo 54. Rickettsias 363

Alfredo C. Seijo

Introducción. Etiología. Epidemiología y ecología. Anatomía patológica. Manifestaciones clínicas. Las fiebres manchadas en Argentina. Diagnóstico. Tratamiento. Prevención y profilaxis.

Capítulo 55. Coxiella 367

Alfredo C. Seijo

Etiología. Epidemiología. Manifestaciones clínicas. Diagnóstico. Tratamiento. Profilaxis.

Capítulo 56. Nocardia 370

Eleatrice María de las Mercedes Gatti

Introducción. Epidemiología. Clasificación. Morfología y biología. Diagnóstico. Tratamiento. Profilaxis.

PARTE III VIROLOGIA

Capítulo 57. Adenovirus 375

Irene Lager

Introducción. Epidemiología. Clasificación. Morfología. Respuesta inmune. Patogénesis. Aspectos clínicos. Diagnóstico de laboratorio. Tratamiento. Profilaxis.

Capítulo 58. Herpesvirus 378

Cecilia Mónica Galosi

Características de la familia viral. Replicación. Patogénesis. Respuesta inmune. Diagnóstico de laboratorio. Herpesvirus de importancia en medicina veterinaria. Herpesvirus equino (Rinoneumonitis-aborto). Herpesvirus bovino (Rinotraqueítis infecciosa bovina-encefalitis). Herpesvirus suino (Seudorrabia, Enfermedad de Aujeszky). Herpesvirus canino.

Capítulo 59. Papilomavirus 382

Jorge Moreno-López

Estructura. Replicación viral. Patogénesis. Diagnóstico. Respuesta inmune. Control. Enfermedades de mayor importancia en veterinaria. Virus papiloma del bovino. Sintomatología y patología. Patogénesis e inmunología. Diagnóstico de laboratorio. Epidemiología, prevención y control. Papilomatosis equina y sarcoides. Papilomatosis canina.

Capítulo 60. Poxvirus 386

Sergio Adrián Samus, Marcela Sara Testa

Introducción. Clasificación. Replicación viral. Patogénesis. Respuesta inmune. Diagnóstico.

Capítulo 61. Circovirus 388

Celina Buscaglia

Características de la familia viral. Virus de la anemia infecciosa de los pollos (VAIP). Morfología, composición química y DNA viral. Replicación viral. Patogénesis. Respuesta inmune. Diagnóstico de laboratorio. Enfermedad de mayor importancia en veterinaria. Profilaxis y tratamiento.

Capítulo 62. Asfarvirus 390

José Manuel Sánchez-Vizcaino

Características de la familia viral. Replicación viral. Patogénesis. Respuesta inmune. Diagnóstico de laboratorio. Enfermedad de mayor importancia en veterinaria. Otras enfermedades de importancia producidas por asfarvirus en animales domésticos.

Capítulo 63. Parvovirus 395

Sergio Adrián Samus, Marcela Sara Testa

Introducción. Clasificación. Replicación viral. Virus de importancia veterinaria. Parvovirus canino. Parvovirus porcino. Respuesta inmune. Parvovirus de la panleucopenia felina.

Capítulo 64. Reovirus 397

Miguel Víctor Piscopo

Introducción. Características del virus. Replicación viral. Patogénesis. Respuesta inmune. Métodos diagnósticos. Teno-

sinovitis vírica. Transmisión. Período de incubación. Signos clínicos. Síndrome de malabsorción en pollos. Diarrea neonatal de los terneros. Enteritis viral en cerdos. Lengua azul.

Capítulo 65. Togavirus 400

María Gabriela Echeverría

Características de la familia viral. Replicación viral. Patogénesis. Respuesta inmune. Diagnóstico de laboratorio. Encefalomielitis equina.

Capítulo 66. Rhabdovirus 403

Carlos F. Amasino

Características de la familia viral. Virus de la rabia. Replicación viral. Patogénesis. Respuesta inmune. Virus de calle y virus fijo. Diagnóstico virológico. Sintomatología. Epidemiología. Mortalidad. Fuente de infección. Profilaxis. Tratamiento. Virus de la estomatitis vesicular. Virus de la fiebre efímera bovina o enfermedad de los tres días. Rhabdovirus de los peces.

Capítulo 67. Ortomixovirus 409

Marcelo Ricardo Pecoraro

Características de la familia viral. Replicación viral. Influenza equina. Patogénesis. Respuesta inmune. Diagnóstico. Prevención de la enfermedad.

Capítulo 68. Paramixovirus 413

Jorge Moreno-López

Clasificación. Estructura. Replicación viral. Patogénesis. Respuesta inmune. Persistencia viral. Diagnóstico de laboratorio. Enfermedades de mayor importancia en veterinaria. Parainfluenza-3. Virus respiratorio sincicial bovino. Peste bovina (rinderpest). Peste de rumiantes menores. Enfermedad de Newcastle. Moquillo canino (Distemper canino). Virus Sendai en ratones. Epidemias de morbillivirus en focas, delfines y ballenas. Paramixovirus emergentes. Rubulavirus porcino.

Capítulo 69. Picornavirus 420

Ester Teresa González

Características de la familia. Clasificación. Estructura. Replicación viral. Patogénesis. Respuesta inmune. Diagnóstico de laboratorio. Algunos picornavirus de interés veterinario. Rinovirus. Enterovirus. Aftovirus.

Capítulo 70. Arterivirus 425

María Gabriela Echeverría

Características de la familia viral. Replicación viral. Patogénesis. Respuesta inmune. Diagnóstico de laboratorio. Arteritis viral equina. Síndrome reproductivo y respiratorio porcino.

Capítulo 71. Coronavirus 429

Shankar P. Mondal, Carol Cardona

Clasificación. Morfología y estructura. Organización del genoma. Propiedades biológicas y fisicoquímicas. Replicación viral. Patogénesis. Diagnóstico de laboratorio. Enfermedades de importancia veterinaria. Virus de la bronquitis infecciosa aviar. Virus de la gastroenteritis transmisible porcina. Coronavirus bovino. Virus de la peritonitis infecciosa felina. Coronavirus canino. Coronavirus del pavo. Hepatitis viral murina. Torovirus bovino.

Capítulo 72. Birnavirus 440

Miguel A. Herrero Loyola, Miguel Angel Petruccelli

Características de la familia viral. Replicación viral. Patogénesis. Respuesta inmune. Diagnóstico de laboratorio. Enfermedad infecciosa bursal. Necrosis pancreática infecciosa.

Capítulo 73. Calicivirus 443

María Gabriela Echeverría

Características de la familia viral. Replicación viral. Patogénesis. Respuesta inmune. Diagnóstico de laboratorio. Exantema vesicular suino. Calicivirus felino. Enfermedad hemorrágica del conejo.

Capítulo 74. Flavivirus 447

Alejandro Rafael Valera

Características de la familia viral. Clasificación. Replicación viral. Patogénesis. Respuesta inmune. Diagnóstico de laboratorio. Enfermedades de mayor importancia en veterinaria. Diarrea viral bovina. Enfermedad de las mucosas. Peste porcina clásica. Virus del Nilo Occidental.

Capítulo 75. Retrovirus 452

Ester Teresa González

Clasificación. Estructura viral. Replicación. Patogénesis. Inmunidad. Algunos retrovirus de interés veterinario. Virus de la leucosis aviar. Virus de la anemia infecciosa equina. Virus de la leucosis bovina. Virus de la inmunodeficiencia felina. Virus de la inmunodeficiencia bovina.

Capítulo 76. Diagnóstico molecular de las enfermedades virales 457

Sándor Belák

Introducción. La primera generación de PCR. PCR anidada para la detección de ADV- Seudorrabia o PRV. Detección y filogenia de cinco alfaherpesvirus rumiantes muy relacionados. Sistemas de PCR generales. Desarrollo de PCR en tiempo real (Real Time PCR). PCR múltiple (PCR multiplex). PCR para la detección de proteínas (DNA tags). Precauciones para prevenir los falsos positivos y falsos negativos en PCR clásica.

PARTE IV MICOLOGIA

Capítulo 77. Hongos o eumycetos 465

Enso Hugo Reinoso, Teresa Rojas Flores, Susana Beatriz Córdoba, Gabriela Mariel Nuñez

Célula de eumyceto: pared celular. Membrana celular o plasmolema (membrana citoplasmática). Micelio. Formas especiales del micelio vegetativo. Conceptos sobre fisiología y metabolismo fúngico. Crecimiento fúngico. Elementos minerales utilizados por los hongos.

Capítulo 78. Reproducción de los hongos 471

Enso Hugo Reinoso, Gabriela Mariel Nuñez, Fernanda Castro

Micelio de fructificación. Reproducción asexual. Reproducción sexual. Formación de esporas sexuales. Clasificación de los hongos.

Capítulo 79. Técnicas, materiales, medios de cultivo y reactivos usados en micología médica 480

Enso Hugo Reinoso, Teresa Rojas Flores, Eleatrice María de las Mercedes Gatti

Materiales de uso rutinario en micología médica. Toma de muestra para diagnóstico de micosis superficiales. Métodos diagnósticos de laboratorio. Medición de objetos. Conteo total de microorganismos. Microcultivos.

Capítulo 80. Micosis superficiales 484

Enso Hugo Reinoso, Susana Beatriz Córdoba, Andrea Giordano, J. Enrique Renner

Clasificación. Etiología. Fuentes de infección. Puertas de entrada. Clasificación de las micosis. Dermatofitosis o dermatoficias (tiñas). Introducción. Reproducción y aspectos taxonómicos. Epidemiología. Fisiopatología de las infecciones por dermatofitos. Condiciones que favorecen el desarrollo de los dermatofitos. Metodología para el estudio de las dermatofitosis. Diagnóstico de laboratorio de las dermatofitosis. Pruebas fisiológicas y siembra en sustratos especiales. Género *Microsporum*. Género *Trichophyton*. Candidiasis (Candidosis, moniliasis). Pitirosporosis. Muestra fotográfica de las micosis superficiales.

PARTE V ALIMENTOS Y MISCELANEA

Capítulo 81. Priones. Encefalopatías espongiformes transmisibles 503

Eduardo Juan Gimeno

Introducción. Características principales de las EET. Listado de las EET. Patología. Aspectos clínicos. Etiología. Patogénesis. Diagnóstico. Epidemiología.

Capítulo 82. Ecología microbiana 511

Alejandro J. Mariñelarena

Introducción. La evolución de la biosfera. La estrategia bacteriana. Conceptos de ecología y su aplicación a los microorganismos. Ecología acuática microbiana.

Capítulo 83. Ecología microbiana en los alimentos 516

Julio Alberto Copes

Factores intrínsecos. Potencial de oxidorreducción. Factores extrínsecos.

Capítulo 84. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) 524

Julio Alberto Copes

Presentación de las ETA. Infecciones causadas por alimentos. Intoxicaciones causadas por alimentos. Toxiinfecciones causadas por alimentos. Alimentos de alto riesgo. Alimentos de bajo riesgo. Síntomas generales que producen las ETA en los consumidores. ETA de origen bacteriano.

Capítulo 85. Campylobacter: especies zoonóticas 528

Gabriela Giacoboni, Clara López

Introducción. Epidemiología. Reservorios. Transmisión. Clasificación. Morfología y características generales. Respuesta inmune. Patogénesis. Aspectos clínicos. Diagnóstico de laboratorio. Tratamiento.

Capítulo 86. Bioseguridad en el laboratorio 533

Nestor Oscar Stanchi

Introducción. Normas de bioseguridad. Riesgo de las sustancias químicas de laboratorio. Efectos tóxicos de los solventes. Eliminación de materiales. Eliminación de desechos. Pautas complementarias de la bioseguridad en el laboratorio.

Capítulo 87. Enfermedades de etiología microbiana en animales peliferos 541

Pablo Eduardo Martino

Introducción. Visón. Nutria o coipo. Zorros de mutación. Turón o Fitch. Chinchilla. Conejo. Micosis y toxinas de hongos en animales peliferos. Enfermedades de etiología microbiana en animales de zoológico. Reptiles. Mamíferos. Aves.

Capítulo 88. Tratamiento biológico de efluentes **547**

Alejandro J. Mariñelarena

Introducción. Metabolismo bacteriano. Tratabilidad. Pretratamiento de efluentes líquidos. Tratamientos biológicos.

Capítulo 89. Biofilms (biopelículas): biocorrosión y biodeterioro de materiales **552**

Patricia Sandra Guiamet, Sandra Gabriela Gómez de Saravia

Tratamiento del problema: mecanismos de control. Alteraciones más frecuentes por acción del biodeterioro. Aspectos microbiológicos. Toma de muestras. Prevención del biodeterioro.

Capítulo 90. Informática en el laboratorio de microbiología **557**

Nestor Oscar Stanchi

Introducción. La informatización administrativa. La informática en el laboratorio de microbiología. Otras utilidades de las computadoras.

Apéndice
Medios de cultivo y reactivos de laboratorio **559**

Indice **569**

Un poco de ciencia aleja de Dios,
pero mucha ciencia
devuelve a EL.

Louis Pasteur
1822-1895

PARTE I
MICROBIOLOGIA GENERAL

Capítulo 1

HISTORIA DE LA MICROBIOLOGIA

In memoriam †Juan José Martino
Pablo Eduardo Martino

Los microorganismos proporcionaron alimentos y bebidas al hombre durante más de 8000 años sin que se tuviera noción de ello. El arte de la fermentación, o sea la capacidad de las levaduras para producir alcohol en forma de cerveza, ya lo conocían los sumerios y babilonios 6000 años A.C., y 4000 años A.C. los egipcios descubren que el CO_2 generado de esta actividad podía fermentar el pan.

Por su parte, los romanos hicieron aplicación de los microorganismos a procesos metalúrgicos (lixiviación bacteriana de minas para extracción de metales). Incluso el eminente filósofo inglés Francis Bacon tenía una mínima comprensión de la importancia práctica de los microorganismos en el siglo XVII.

La teoría de los gérmenes en la infección de las heridas o del *contagium animatum* se había expresado en la antigüedad. Marcus Terentius Varro (116 A.C.) opinaba que el aire de los pantanos era nefasto por hallarse colmado de pequeñísimos animalitos que penetran por la nariz y en todo el cuerpo. En la Edad Media encontramos expresada esta opinión en los escritos de Giovanni da Vigo (siglo XV-XVI), de Rapallo. También Ambrosio Paré sustentaba la opinión de incriminar a los "miasmas del aire". En su *Wundarznei*, sostenía el alquimista y médico suizo Paracelso (1493-1541) que la supuración era provocada por agentes perjudiciales del exterior mientras Girolamo Fracastoro de Verona, el precursor de Galileo y contemporáneo de Copérnico, emitía su teoría sobre las enfermedades contagiosas (*De Contagione*) en 1546 y así descubría la naturaleza de la infección ya en el siglo XVI. El avance en la medicina y en la bacteriología dependió en gran medida de la evolución paralela de los instrumentos físicos ópticos auxiliares (el microscopio) con los cuales podían ser observados los microorganismos, y también de los principios químicos necesarios para la interpretación de las propiedades bioquímicas y genéticas de éstos. A partir de la invención del microscopio compuesto por el holandés Zacharias Jansen de Middleburgo, alrededor de 1600, la microscopia científica lograba realizar sus adelantos casi exclusivamente con ayuda de lentes simples que hoy llamaríamos lupas.

El primero que vio efectivamente bacterias procedentes del organismo humano fue Anthony van Leeuwenhoek (1632-1723), el holandés constructor amateur de microscopios, con su exacta descripción de los infusorios (protozoarios), *Bacillus* móviles, micrococos, espiroquetas y microparásitos (crisálidas de pulgas, ácaros). No cabe duda de que en la serie de cartas de Leeuwenhoek a la Real Sociedad de Londres se encuentran ya reproducciones de los *animalitos* que más tarde se bautizaron como bacterias. En los comienzos de la bacteriología se consideraba a los agentes patógenos como seres vegetales, pues la palabra *bacteria* equivale a *hongo*. Por otro lado, el filósofo inglés Robert Hooke hace también un aporte fundamental a la observación microscópica de especies fúngicas en su libro publicado en 1665.

El sabio jesuita Athanasius Kircher (1601-1680), en ocasión de la epidemia de peste bubónica de 1656, creyó ver pequeños *gusanillos* en la sangre y pus de bubones de los pestosos. Además vio, con sus microscopios simples, los *mínima animacula* en la tierra y en el agua, lo que lo coloca entre los primeros microbiólogos. Con el descubrimiento de parásitos animales y vegetales, la noción especulativa de la naturaleza parasitaria de las enfermedades, puramente imaginaria, cedió su paso a la investigación empírica decisiva hacia el descubrimiento de los agentes patógenos.

En la segunda mitad del siglo XIX se suceden los más asombrosos y decisivos descubrimientos en la microbiología. El químico Louis Pasteur (1822-1895), en Francia, y el físico John Tyndall (1820-1893), en Inglaterra, demostraron la falsedad de la noción de la generación espontánea, ya rechazada por el monje fisiólogo Lazzaro Spallanzani en 1780, y probaron que la vida microbiana existente procedía de vida preexistente. Pasteur demostró, al esterilizar la leche, la existencia de gérmenes que soportaban durante largo tiempo temperaturas de 100 °C o más, y pensó con acierto que la doctrina de la producción espontánea de las enfermedades era un prejuicio religioso ("el acto único de la creación" que cuenta la Biblia) y que era nefasta para el progreso terapéutico. Reconoció también en los microbios importantísimas fuerzas auxiliares en la administración de la naturaleza: "Sin ellos la tierra se vería cubierta de materia orgánica muerta".

Joseph Lister, eminente cirujano inglés (1872-1912), es el fundador del tratamiento antiséptico de las heridas sobre la base de ácido fénico. Partió de la idea de que, así como la putrefacción de sustancia orgánica era producida por gérmenes, según Pasteur, también la supuración en las heridas debía obedecer a éstos, y sospechó que también aquí eran sobre todo gérmenes flotantes en el aire los que infectaban las heridas.

Pasteur pudo demostrar que la fermentación y la putrefacción no eran el resultado de una descomposición de sustancias orgánicas, sino que se trataba de la acción de organismos animados de baja organización. Más tarde trabajó con sus discípulos en los líquidos de cultivo y con los métodos de inoculación y filtración (bujía de porcelana de Ch. E. Chamberland).

Para llegar a una doctrina racional de las epidemias, J. Henle (1809-1885), por su parte, aceptaba sencillamente que los *miasmas y contagios* podían considerarse bajo el nombre común de *materia infectante*.

El médico de campo alemán Robert Koch (1843-1910) fue autor de la *Aetiologie der milzbrand-Krankheit* en 1876 (Etiología del Carbunco), la que constituye el fundamento de la asepsia moderna, porque ha puesto la última piedra en la bacteriología de las infecciones en las heridas al aportar la prueba de la comprobación de los gérmenes como los causales y el conocimiento de las vías de infección. También introdujo notables perfeccionamientos de la técnica bacteriológica: desarrolló métodos para el cultivo puro de las bacterias, promulgó los famosos 4 postulados que llevan su nombre y además, mediante fijación del material de experimento en capas muy delgadas por medio del teñido de colorantes de anilina y gracias al desarrollo de la microfotografía, consiguió reconocer las diferencias morfológicas de los pequeños seres vivos mejor que antes. Años después usaría el condensador de Abbé y la inmersión de aceite. Muchos de los estudiantes disci-

pulos de Koch también hicieron significativas contribuciones al desarrollo de la microbiología.

En 1870, Pasteur recomienda la desinfección física por calor seco antes que la química, y en 1880, Koch comprobó que el calor seco a 125 °C puede destruir todos los gérmenes no productores de esporas. En Alemania también se observan otras investigaciones decisivas en el campo de la bacteriología: las del botánico E. Haller (1841-1904) sobre la etiología del tifus, del *Cholera nostras*, de las viruelas y de otras enfermedades; las de T. Klebs (1834-1913) sobre el *Microsporum septicum* en heridas de guerra, y las de F. Cohn (1828-1898), quien reconoció las deficiencias de la técnicas bacteriológicas y dedujo de aquí la disimilitud de criterios reinantes, a la vez que descubrió las endosporas en las bacterias. Además, este último se dio cuenta de que no todas las bacterias podían ser consideradas en un solo grupo, sino que había que distinguir entre especies "patógenas y saprógenas".

Repetidas veces la bacteriología se ha enriquecido gracias a las ciencias afines, como por ejemplo con la introducción del micrótomo y cortes en serie por los anatómicos Welcher y Stilling, y los métodos de Koch: introducción y perfeccionamiento del ensayo de animales, la técnica de tinción, conservación, fotografía y cultivo de bacterias (cultivos en medios solidificables y transparentes), como ya hemos visto.

En 1878, los alemanes Carl Zeiss y Ernst Abbé incorporaron el aceite de cedro concentrado como medio ideal de inmersión además de lograr la corrección de la aberración esférica y cromática. Este perfeccionamiento del sistema óptico y de las técnicas de iluminación redundó en beneficio de la investigación bacteriológica, que tomó grandes vuelos hacia 1860-1870. Mientras Abbé mejoraba los lentes del microscopio, Zeiss construía lo que se dio en llamar el microscopio moderno.

J. Schroeter, alemán, en 1868 empleó por primera vez un medio de cultivo sólido (rebanadas de papa) para aislar el *Bacillus prodigiosus* (*Serratia marcescens*). Ya en 1861, Pasteur había comprobado la existencia de bacterias anaerobias, y en 1889, S. Kitasato (1856-1931) indicó los métodos de cultivo para ellas.

En el siglo XIX, las únicas bacterias que se conocían eran las que producían enfermedades. En 1854, el médico inglés J. Snow demostró que el cólera se difundía mediante el suministro de agua. Pero el impulso decisivo se inició en el año 1876 con la comprobación del agente productor del carbunco por R. Koch. Rápidamente se suceden los descubrimientos: en 1878 y 1880, *Vibrión séptico* y *Pasteurella* de las aves por Pasteur; 1880 Bacilo tífico por Eberth y Koch; en 1882, Bacilo de la tuberculosis por R. Koch y Bacilo del muermo por Fr. Löffler; en 1885, bacilo tetánico por H. V. Carter y *Bacterium coli* por Th. Escherich; 1889 *Brucella melitensis* por D. Bruce; en 1905, *Vibrio cólera* por F. Gottchlich; en 1915, *Spirochaeta icterogenes* por Uhlenhuth, etcétera.

Otros acontecimientos muy importantes acompañan a aquellos sucesos: el desarrollo del autoclave que proclama el uso del vapor para esterilizar, la técnica de Gram por Hans Christian Gram en 1884, las placas de Petri, las inoculaciones de Pasteur contra la rabia, el descubrimiento de la antitoxinas y del complemento.

En cuanto a los hongos, ya en 1721 Micheli publica un trabajo sobre los hongos microscópicos y en el año 1841 fue conocida en Francia por D. Gruby la naturaleza criptogámica de las pústulas de tiña y el hongo del *Herpes tonsurante*. En 1837 se supo por Agostino Bassi de Lodi que el hongo *Botrytis bassiana* era el causante de la muscardina (epidemia de los gusanos de seda).

Entre 1900 y 1920 irrumpe el campo de la virología con el descubrimiento de virus de las plantas y animales. Así, al realizar investigaciones acerca de la glosopeda (Fiebre aftosa), F. Löffler y Frosch descubrieron en 1898 otro grupo completamente nuevo de agentes patógenos: "los virus filtrables". En 1905 se descubre el virus de la viruela de la vaca (por A. Negri, en 1909), el de la poliomielitis (por Landsteiner) y en 1911 el del sarampión (por A. Anderson) y los bacteriófagos, entre otros acontecimientos.

La consecuencia directa del perfeccionamiento del microscopio (creación del ultramicroscopio en 1903 por F.W. Siedentopf y del microscopio electrónico en 1931 por M. Knoll y E. Ruska, la luz ultravioleta, y la microscopia de polarización) es el considerable progreso en el estudio de virus, bacteriófagos y estructuras bacterianas. También la microcinematografía adaptada al microscopio llega al terreno de la bacteriología a principios de siglo a partir de las célebres películas de J. Comandon (en París) acerca de espiroquetas y tripanosomas en campo oscuro, y más tarde llega la invención del microscopio de contraste de fase. Por otro lado, en 1914 se aplicó por primera vez la utilidad de los microorganismos en el tratamiento de aguas residuales y lodos activados.

En 1928, A. Fleming, en su laboratorio de Londres, observó que el hongo *Penicillium notatum* mataba sus cultivos de *Staphylococcus aureus*: el advenimiento de la penicilina señaló el comienzo de la era de los antibióticos, a la vez que Kluyver y Van Niel trabajaban sobre el metabolismo comparado bacteriano. En 1935, W. Stanley en Nueva York cristalizó partículas virales, y probó que hay organismos que no cambian y aparecen como modelos estándar.

Entre 1940 y 1960 se desencadenan incesantes avances: Beadle y Tatum aíslan mutantes, Avery muestra la transformación bacteriana y surge la genética molecular. En 1962, J. Watson en Estados Unidos compartió el premio Nobel por descubrir la estructura de doble hélice de la molécula de DNA. La biología no volvería a ser la misma. Ahora, los investigadores orientan sus técnicas de mapeo y secuenciamiento genético hacia bacterias y virus. J. King y sus colaboradores, en Estados Unidos, fueron los primeros en determinar que la *cola* de un tipo de virus bacteriano o fago se ensambla dentro de la célula. Sin virus la biología molecular sería inimaginable. A partir de la década de 1960 se descubre el interferón, la regulación genética de la producción de enzimas, el código genético, y surgen los primeros estudios de recombinación de DNA que conducen a la ingeniería genética. En efecto, en 1973 se descubrió que podían cortarse moléculas de DNA con enzimas de restricción, reunir las piezas con otra enzima (DNA ligasa) y reintroducir el DNA recombinante en *E. coli* con la ayuda de un plásmido vector. Los recientes avances en el campo de la biología molecular han creado un ambiente de expectación en las posibles aplicaciones microbiológicas a un amplio espectro de procesos industriales.

En la era de la ciencia a gran escala, cuando los objetivos de la investigación se convierten en prioridades nacionales y los presupuestos para cada laboratorio pueden alcanzar cientos de millones de dólares, en 1975, Köhler y Milstein obtienen por primera vez anticuerpos monoclonales, y en 1989, R. Weinberg, al estudiar cómo los virus invaden los núcleos de sus células hospedadoras, intenta revelar los mecanismos genéticos de la proliferación del cáncer. Durante la década de 1980 se observan, además, otros avances de envergadura: mientras los análisis del RNA conducen al reconocimiento de las *Archaebacteria*, los estudios moleculares generan nuevos sistemas filogenéticos de clasificación.

Las actuales aplicaciones del diseño por computadora que permiten examinar los componentes estructurales de virus a nivel tridimensional y luego compararlos con las configuraciones moleculares de diversos compuestos conducen a importantes descubrimientos en la investigación antiviral. Hoy se estudia la relación precisa entre virus y genes. H. Hartman, microbiólogo de Berkeley, California,

dice que los virus son importantes en el origen de las especies ya que pueden alterar los genes de una población infectada. Estamos ahora, con respecto a los virus, donde los bacteriólogos del siglo XIX estaban con respecto a las bacterias. Más recientemente, S. Sonea y M. Pannisset, microbiólogos de Montreal, han redactado un manifiesto para una nueva bacteriología al enunciar su teoría de que todas las bacterias están interconectadas por organismos semejantes a los virus en una asociación genética a escala mundial.

En los últimos tiempos hemos asistido al desarrollo industrial de la biotecnología basada en la ingeniería genética, y se ha extendido el uso de sondas y marcadores genéticos para la genotipificación de los microorganismos.

David Baltimore (Premio Nobel de Microbiología) ha dicho que desarrollar la ciencia microbiológica es un poco como levantar un mapa de la selva virgen. En cualquier caso, parece ser que lo que hemos visto hasta ahora es sólo la punta de un enorme y muy interesante témpano.

BIBLIOGRAFIA

Atlas, RM. Microbiology. Fundamentals and applications. 2nd edition. MacMillan Publishing Company, New & London. 1988.

Bulloch W. The history of bacteriology. Oxford Univ Press. London, 1938.

Demain A. Industrial Microbiology. Scientific American, Nov. 1981

Hall S. Smithsonian (USA) 1990.

Paulsen F. Los descubrimientos de los agentes patógenos. Actas Ciba. Enero 1936.

Capítulo 2

LA CIENCIA MICROBIOLOGICA

Nestor Oscar Stanchi

LA MICROBIOLOGIA

La Microbiología ocupa un lugar prominente entre las ciencias médicas. Se encuentra sin duda alguna entre las áreas de las ciencias biológicas más apasionante y que más ha crecido en los últimos años.

Los microorganismos son considerados generalmente como agentes productores de enfermedades. En medicina veterinaria, además del daño que los microorganismos producen en la salud animal, su importancia radica en que muchas enfermedades son zoonosis, es decir, enfermedades que afectan tanto a los animales como al hombre, muchas otras son capaces de producir importantes pérdidas económicas, disminuyendo al tiempo la calidad alimenticia del hombre. Pero no todos los microorganismos son causantes de daño o enfermedad, la mayoría de ellos son apatógenos, además muchos son muy útiles para la alimentación (producción de yogurt, quesos, vinos), industria (curtiembre), producción de medicamentos (antibióticos) y ecología (degradación de distintos compuestos), entre otras.

Los microorganismos se encuentran distribuidos en la naturaleza formando parte del suelo, aire y agua; en los organismos vivos en la piel, mucosas, intestinos, la llamada "flora[1]" normal o microorganismos nativos. La microbiología como ciencia se fundamenta entonces en el estudio de estos microorganismos.

La ciencia microbiológica. La microbiología es la rama de la biología que estudia cuatro grupos de microorganismos:

* Bacterias (estudiado por la bacteriología)
* Virus (estudiado por la virología)
* Levaduras
* Mohos (ambos estudiados por la micología)

Dentro de estos grupos se pueden hacer subdivisiones que involucran a ciertos microorganismos con características diferentes.

Algunos autores incluyen dentro de la microbiología a los parásitos unicelulares, pero para la mayoría de los centros de estudio de las ciencias veterinarias, los parásitos son tratados por la rama específica que le compete: la parasitología.

La microbiología, y dentro de ella la bacteriología, tiene divisiones. Cada división posee características propias, debido a que hay diversos tipos bacterianos hallados en diferentes hábitat. Como toda clasificación, es arbitraria; mientras que el límite entre algunas de las partes de la bacteriología es neto, en otras es confuso. Desde el punto de vista práctico se podría clasificar a la microbiología en:

* general
* industrial
* ecológica
* sistemática
* agrícola
* médico/sanitaria

Todas son igualmente importantes, pero la microbiología general, la médico/sanitaria y la industrial son las que nos ocupan en primera instancia. Podría diferenciarse en la segunda una microbiología veterinaria y otra humana, aunque en la práctica ambas están estrechamente relacionadas.

CLASIFICACION

Como se verá en el capítulo de evolución microbiana, el dominio que involucra a los microorganismos sujetos del estudio de la microbiología clínica es Bacteria. En la actualidad, casi todas las clasificaciones dejan a un lado a los minerales, lo que, en lugar de simplificar la taxonomía de los entes naturales, lo único que consigue es dejar a los virus en tierra de nadie, pues no pueden considerarse estrictamente un ser vivo (tabla 2-1). Como se puede analizar en el mismo capítulo, las bacterias y hongos se encuentran en diferentes reinos o dominios.

Tabla 2-1. Los reinos vivos de la naturaleza

Haeckel (1894) Tres reinos	Whittaker (1969) Cinco reinos	Woese (1977) Seis reinos	Woese (1990) Tres Dominios
Protista	Monera	Eubacteria	Bacteria
		Archaebacteria	Archaea
	Protista	Protista	Eukaria
Plantae	Fungae	Fungae	
	Plantae	Plantae	
Animalia	Animalia	Animalia	

Las bacterias verdaderas que incluyen a aquellas que producen enfermedad en los animales y el hombre pertenecen a las **eubacterias o bacteria.** Por el otro, las bacterias del ambiente están incluidas en un segundo grupo: las **archaebacteria o archaea**. Morfológicamente los dos reinos de microorganismos aparecen como similares y por ello se los ha unido en los **procariotes**. Las otras formas de vida se refieren como **eucariotes**, que incluyen a plantas, animales y hongos.

Procariotes — Bacteria
Procariotes — Archaeae

Eucariotes

Las células procariotas, en contraste con la eucariotas, no están compartimentadas. No están presentes las membranas nucleares, las mitocondrias, el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi

[1] La palabra "flora" hace referencia al tiempo en que las bacterias estaban clasificadas junto con los hongos; es más correcto el uso de la palabra microbiota.

ni fagosomas ni lisosomas. Además poseen un solo cromosoma circular, fijo en una invaginación de la membrana celular llamada mesosoma. Finalmente los ribosomas procarióticos son de 70S (S unidad Svedberg), mientras que los ribosomas eucarióticos son más grandes (80S). Las subunidades ribosómicas procarióticas son de 30S y 50S (los eucariotas son mayores). La subunidad ribosómica de 30S tiene un RNA de 16S, mientras que la subunidad de 50S contiene RNA de 23S y 5S; por el contrario, los RNA ribosomales de los eucariotes son mayores (18S). La membrana bacteriana no contiene esteroles (excepto en los *Mycoplasmas*).

Aunque disímiles en muchos aspectos importantes, y a pesar de que muchas algas y hongos no son microscópicos, los organismos que comprenden a los procariotas, protistas y hongos son estudiados convencionalmente en conjunto por la microbiología. También abarca a los virus, viroides y priones que no encuadran en ninguno de los taxones de los sistemas vivientes.

LAS BACTERIAS Y SU TAXONOMIA

La **taxonomía** es la ciencia de la clasificación. Está dividida en tres partes: nomenclatura, clasificación e identificación. **La nomenclatura** es el sistema de nombres aplicados a los diferentes microorganismos de acuerdo con reglas internacionales. La **clasificación** es el agrupamiento de los microorganismos de acuerdo con las características que comparten. **La identificación** es el proceso por el cual los microorganismos desconocidos son clasificados.

Clasificación fenotípica

El proceso tradicional de clasificación de organismos desconocidos según el tradicional proceso de las propiedades observables fenotípicas compartidas ocurre en varios niveles y con diferentes grados de precisión. Por ejemplo, todos los microorganismos gramnegativos pueden ser clasificados en un enorme grupo de cientos de diferentes organismos, que pueden no estar relacionados pero que comparten la característica de ser gramnegativos.

Clasificación filogenética

Agrupa los microorganismos de acuerdo con su relación genética.

Para la mayoría de los propósitos prácticos, el esquema de clasificación fenotípica es suficientemente sofisticado para agrupar a un microorganismo en un grupo de bacterias similares.

PRINCIPALES GRUPOS BACTERIANOS

Las bacterias son **procariotas** que constan de cuatro divisiones[2] o categorías principales:

Eubacterias gramnegativas[3] que tienen pared celular. Estos microorganismos poseen una pared compleja consistente en una membrana externa y una fina capa de peptidoglicano, que contiene ácido murámico. Usualmente son gramnegativos, las células pueden ser esféricas, ovales, bacilos rectos o curvos, helicoidales o filamentosos. La reproducción es por fisión binaria, aunque algunos grupos muestran brotes y hay un grupo raro, los Pleurocapsales, que muestran fusión múltiple. Las mixobacterias muestran cuerpos de fructificación y mixosporas, algunos miembros son parásitos intracelulares obligados.

Eubacterias grampositivas que tienen pared celular. Estos son procariotes con un perfil de pared celular de grampositivos, aunque no siempre colorean como tal. Las células también son esféricas, bacilos o filamentos, pero muchas muestran verdaderas ramas. La reproducción es generalmente por fisión binaria, algunas producen esporas y formas en descanso (endosporas o esporas en hifas).

Eubacterias que carecen de pared celular. Estos son procariotes que han perdido su pared celular, son llamados *Mycoplasmas* e incluyen la clase Mollicutes, que no sintetizan los precursores de los peptidoglicanos. Están encerrados en la membrana plasmática. Las células son altamente pleomórficas, aunque formas filamentosas con proyecciones en forma de ramas son comunes. La reproducción puede ser por brotación, fragmentación y/o fisión binaria. Las células se tiñen como gramnegativas, usualmente no son móviles, y las colonias suelen tener el típico aspecto de "huevo frito". Los organismos recuerdan a las formas L-bacterianas, aunque se diferencian de éstas ya que no revierten a la forma primaria.

Archaeobacterias. Son microbios terrestres y acuáticos, que ocurren en ambientes anaerobios, hipersalados, en ambientes geotermales y como simbiontes en el intestino animal. Algunas especies crecen por encima de los 100 °C. Una característica única para bacterias es la presencia de lípidos de glicerol isopranil éter. La pérdida de mureína en las células hace a las archeobacterias insensibles a los antibióticos β lactámicos. Con la coloración de Gram pueden aparecer como positivos (con pseudomureína) o negativos.

Cada una de ellas se divide en clases, órdenes, familias (fam) o grupos morfológicos si no se dispone de fam, género (gen) y especie (sp).

Familia: es un grupo de géneros relacionados.
Género: es un grupo de especies relacionadas.
Especie: es un grupo de cepas relacionadas.
Tipo o subespecie: es un grupo de cepas dentro de la especie (ejemplo: biotipos, serotipos)
Cepa: una línea o aislamiento particular de una especie.

El comité internacional en sistemática de procariotes (*The International Committee on Systematics of Prokaryotes* -ICSP) y el código internacional de nomenclatura de bacterias (*International Code of Nomenclature of Bacteria*) son los organismos responsables de otorgar nombres a los procariotas (eubacterias, archaebacterias y archaea).

En el siglo XIX y primera mitad del XX, se siguieron los métodos de clasificación botánicos (*Botanical Code of Nomenclature*), debido a que las bacterias habían sido tradicionalmente consideradas hongos, los Schizomycetes. Obviamente, los métodos eran diferentes. En el primer Congreso Internacional de Microbiología, en 1930, se propuso establecer un código propio de nomenclatura bacteriana y se creó en el Segundo Congreso en Londres, en 1936, un borrador del código del *International Committee for Bacteriological Nomenclature* [posteriormente llamado *International Committee on Systematic Bacteriology* (ICSB), y ahora el ICSP]. Aquí se determina que a) los nombres deben ser estables, esto está asegurado por la retención del primer nombre con que fue publicado, principio de prioridad; b) los nombres deben se inambiguos; c) los nombres deben ser necesarios, esto está asegurado por la publicación de la descripción de los organismos y la eliminación de aquellos nombres superfluos.

[2] Corresponde al Phylum (en zoología).

[3] Por su afinidad tintórea con el violeta de genciana, algunos microorganismos se resisten a perder el colorante producido por acción del alcohol (decoloración). Estos microorganismos son los llamados grampositivos, mientras que otros, que son decolorados con facilidad, son denominados gramnegativos.

La edición más reciente del Código Internacional en Nomenclatura de Bacterias (*International Code of Nomenclature of Bacteria)*, Revisión 1990, fue publicada en 1992 por la *American Society for Microbiology*. Unos pocos agregados se han hecho desde entonces. Además se han realizado algunos movimientos para unificar la nomenclatura de plantas, animales y bacterias. Esto está propuesto en el *BioCode*: establecer una terminología común es, por supuesto, el primer paso.

COMO ESCRIBIR NOMBRES CIENTIFICOS

Los nombres científicos deben escribirse o imprimirse de ciertas maneras con el fin de reducir equivocaciones entre científicos que trabajan en países diferentes, subdisciplinas o incluso entre distintos períodos de tiempo.

Se designan nombres científicos oficiales para cada taxón de todos los organismos vivientes.

Un taxón es un grupo de organismos definidos por las similitudes particulares de reproducción, anatómicas, o genéticamente determinadas.

Cada taxón tiene nombre. Estos nombres casi siempre son únicos, pero a veces el mismo nombre es usado de manera inadvertida tanto para las plantas como para los animales, o para dos familias muy distantemente relacionadas.

Se colocan nombres taxonómicos en una jerarquía con un número indefinido de niveles.

Como se mencionó, los niveles taxonómicos básicos son dominio, reino, filum, clase, orden, familia y especie binomial (género + el epíteto específico).

El código de nomenclatura reconoce los grupos taxonómicos siguientes: clase (*clases*), subclase (*subclases*), orden (abreviación ord.), suborden (abreviación subord.), familia (abreviación fam.), subfamilia (abreviación subfam.), tribu, subtribu, género (abreviación gen.), subgénero (abreviación subgen.), especie (abreviación sp.), y subespecie (abreviación subsp.).

Los niveles intermedios son indicados por una variedad amplia de prefijos; por ejemplo: subreino, subfilum, infraclase, superfamilia. Algunas jerarquías incluyen un nivel entre el sub o infra familia y género, llamado "tribu", aunque no se ha publicado una nomenclatura para la categoría de subfamilia y subtribu.

El término variedad (abreviación var.), utilizado por ciertos autores, es un sinónimo de subespecie, pero luego de la aparición de la edición de 1975 del Código de Nomenclatura, su utilización ha sido proscripta.

Toda la nomenclatura está realizada en palabras latinas o latinizadas, y estas palabras se escriben tradicionalmente en itálica o están subrayadas en un manuscrito. Sin embargo, no hay en el Código de Nomenclatura una guía concerniente a la utilización de itálica o subrayado en este nivel. La ausencia de guía permite su libre elección. En este libro hemos optado por la no utilización de letra itálica siguiendo los lienamientos de la taxonomía animal: "los nombres científicos a nivel taxonómico siempre se capitalizan (mayúscula) de género hacia arriba pero no se ponen en bastardilla (itálica o cursiva), ni subrayan cuando están escritos a mano".

El nombre científico para un taxón de organismos es exactamente el mismo en todos los idiomas y lugares.

NOMBRES COMUNES

En el caso de plantas y animales, los nombres comunes no están definidos oficialmente y el nombre común de una sola especie de animal puede diferir entre idiomas, regiones o incluso entre los grupos étnicos de las personas en una sola comunidad. También, muchos animales de especies diferentes pueden compartir el mismo nombre común. Generalmente no se capitalizan los nombres comunes (excepto como requisito gramatical).

Los nombres científicos son a menudo "castellanizados": se cambian sus terminaciones al formato español. Se tratan nombres castellanizados como nombres comunes y no deben capitalizarse. Ejemplo, Eukarya se vuelve eucariotas.

Excepción: se capitalizan las partes de los nombres comunes para algunos virus porque ellos están basados en un lugar o en el nombre de persona. Ejemplos de: Virus de Nilo Occidental.

En algunos casos el nombre común es idéntico al nombre científico. Cuando uno de estos nombres idénticos al género y al nombre común se piensa aplicar a un género particular, debe capitalizarse y debe ponerse en bastardilla o cursiva. Pero cuando está refiriéndose a un animal específicamente identificado con una forma del cuerpo que podría pertenecer a cualquiera de varios géneros particulares, debe escribirse en minúscula y no debe ponerse en bastardilla. Cuando el género particular no se identifica, el nombre debe escribirse en minúscula y no debe ponerse en bastardilla.

NOMBRE DE LA ESPECIE

El término especie en uso científico apropiado significa un taxón definido de organismos dentro de un género particular.

No hay ninguna norma absoluta para la cantidad de material genético o las diferencias morfológicas que deben existir entre dos individuos para ponerlos en especies separadas.

NOMENCLATURA BINOMIAL

El nombre de una especie siempre debe tener dos partes: un género nombre y un epíteto específico. Por ejemplo: el epíteto específico "melitensis" nunca debe ser escrito por sí mismo, sino siempre como *Brucella melitensis* o *B. melitensis*.

El nombre del género debe ser único, esto es, nunca debe ser aplicado a cualquier otro tipo de organismo, mientras que el epíteto específico no tiene que ser único y muchas especies tiene los mismos o similares epítetos específicos.

El nombre del género siempre se capitaliza y se pone en bastardilla (o subrayado si es manuscrito). Ejemplo correcto: *Bacillus*, siendo incorrecto bacillus o Bacillus.

El epíteto específico no se capitaliza, incluso cuando está basado en un nombre del lugar o de personas por otra parte capitalizado. Ejemplos: los epítetos basados en *Leptospira noguchi* "noguchi" no se capitalizan (en los nombres de algunas plantas basados en las personas o lugares son capitalizados por botánicos).

El nombre completo de la especie puede pero no necesariamente tiene que incluir la subespecie o la variedad nombrada siguiendo el epíteto específico. Cuando se usan estos nombres adicionales también deben ponerse en bastardilla (o subrayados) y no se capitalizan. El nombre del género puede reducirse a su primera parte después de que ha estado por completo impreso antes en el mismo documento. La parte importante que se abrevia también se pone en bastardilla. Por ejemplo: después de usar *Borrelia burgdorferi* en un documento, uno puede referirse a ésta en el resto del documento como *B. burdgorferi*. Sin embargo, si otras especies son nombradas con un nombre de género que empieza con "b" en el mismo documento, deben escribirse completos dondequiera que ambos nombres del género aparezcan.

En animales y plantas, el binomio de la especie, cuando es usado propiamente y en una publicación científica, debe tener con

él los últimos nombres del autor que lo describió. El autor que lo describió es el científico (o científicos) que le asignó un nombre la primera vez y quien reúne los otros requisitos para establecer el nombre oficial para ese tipo de animal o planta.

Aspectos a tener en cuenta en la clasificación

Funcionalmente, las bacterias se dividen en varias "secciones" sobre la base de:

* la coloración de Gram
* los requerimientos de O_2
* la formación de esporos
* el patrón metabólico

La considerable diversidad de las especies bacterianas hace que su estudio involucre la comparación de múltiples cepas dentro de cada especie. Estas comparaciones están basadas principalmente en dos aspectos: análisis químico y molecular.

Químico: hay distintos métodos para el estudio de la composición estructural de las bacterias (ácidos grasos más comunes, carbohidratos, proteínas, etcétera.). La caracterización de los productos metabólicos secretados (alcoholes volátiles, ácidos grasos de cadena corta, etcétera.) son también útiles.

Molecular: es ideal para comparar secuencias de DNA bacteriano. El estudio del genoma completo se ha realizado en algunas bacterias. La similitud históricamente se ha basado en el contenido porcentual de Guanina + Citosina (% GC). El secuenciamiento del RNA ribosómico de 16S (16S RNA) se ha convertido en el estándar de oro en la bacteriología sistemática.

A modo de recordatorio, el peso molecular es actualmente denominado Masa Molecular Relativa. Esta es la suma de todas las masas atómicas relativas de los átomos en una molécula; es entonces la relación de la proporción de la masa media por molécula de una composición isotópica especificada de una substancia a un duodécimo de la masa de un átomo de carbono 12. Por lo tanto, surge la pregunta sobre cuál es la unidad de masa atómica. La respuesta es simple: no la tiene. Las masas atómicas son masas relativas, esto significa que no tienen unidad. De allí que consideramos incorrecta la unidad Dalton o sus diferentes múltiplos: kDalton, entre otros.

Por lo general, el estudio rutinario de los microorganismos lleva a evaluar los productos metabólicos o su capacidad de atacar diferentes sustratos orgánicos o inorgánicos. La marcha bacteriológica que suele aplicarse a las muestras microbiológicas nos permitirá arribar a un diagnóstico certero.

BIBLIOGRAFIA

The Collins English Dictionary, 2000 HarperCollins Publishers.
http://www.carlton.paschools.pa.sk.ca/chemical/molemass/avogadro
http://www.carlton.paschools.pa.sk.ca/chemical/molemass/moles2.htm
http://www.the-icsp.org/Code_history.htm
http://www.inform.umd.edu/PBIO/nomcl/mcne.html
http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/systematique/nomenclature.html
http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm
http://www.bacterio.cict.fr

EVOLUCION MICROBIANA

María Elisa Pavan,
Jorge Zorzópulos

Hablar de evolución microbiana es hablar de la evolución de la mayor parte de los seres vivos. Sin embargo, desde el comienzo del desarrollo de la evolución como una disciplina formal, hecho que podemos ubicar el 24 de noviembre de 1859, cuando Darwin publicó su más famoso libro *On the Origin of Species by Means of Natural Selection*[1], los estudios evolutivos estuvieron dirigidos casi exclusivamente a dilucidar la historia de los animales y las plantas. Esto no se debió a un capricho de los biólogos empecinados en no tener en cuenta la inmensa cantidad de organismos dejados de lado por esta elección, sino a su impotencia para estudiarlos, ya que los microorganismos por un lado no poseen la riqueza de caracteres morfológicos que sirven para agrupar y relacionar a los animales y las plantas y, por otro lado, han dejado escasos restos fósiles que sirvan para rastrear su historia.

Para fines de la década de 1970, la situación cambió dramáticamente cuando se demostró la utilidad del análisis de las secuencias de los RNA ribosomales (rRNA) para establecer relaciones filogenéticas entre microorganismos. El concepto de cronómetro molecular utilizado en estos estudios ya había sido postulado en 1965 por Zuckerckandl y Pauling, pero su utilidad pasó desapercibida para los microbiólogos por muchos años. Este concepto puede ser enunciado en una forma muy simple de la siguiente manera: el número de mutaciones que diferencia macromoléculas homólogas (ácidos nucleicos o proteínas) pertenecientes a organismos distintos es una medida inversa a la relación filogenética entre dichos organismos. Estas relaciones pueden ser estimadas matemáticamente y como resultado se pueden construir árboles genealógicos que ordenan a los distintos organismos de acuerdo con su historia evolutiva. Utilizando macromoléculas muy conservadas y universales como los rRNA fue posible extender este tipo de estudios al total de los organismos vivientes (fig. 3-1).

Una de las consecuencias más extraordinarias de este análisis fue el descubrimiento de la existencia de un grupo de microorganismos procarióticos que hasta el momento se creía relacionado con las bacterias. Este grupo se denomina *Archaea* (originalmente llamado *Archaebacteria*) y posee el más alto rango taxonómico, denominado, en la actualidad, dominio.

Existen tres dominios en donde se agrupan el total de los seres vivos: *Bacteria*, *Archaea* y *Eucarya* (fig. 3-1). El rRNA en cada dominio tiene características propias tanto en su secuencia como en su estructura espacial.

De acuerdo con el análisis filogenético de genes que se han duplicado antes de la divergencia de los tres linajes primarios, la raíz del árbol genealógico universal pudo ser situada tentativamente entre los dominios *Bacteria* y *Archaea*, por lo cual la separación de *Archaea* y *Eucarya* parecería corresponder a un evento de diversificación secundario.

Las ramas más profundas (las más cercanas a la raíz) de los dominios *Bacteria* y *Archaea* (figs. 3-2 y 3-3) contienen organismos termófilos y anaeróbicos, lo que indica que la vida comenzó a desarrollarse en un ambiente coherente con dichas características. Este evento debió tener lugar hace más de 3500 millones de años, ya que se han descubierto microfósiles en paleosedimentos que evidencian la existencia de microorganismos por aquel entonces.

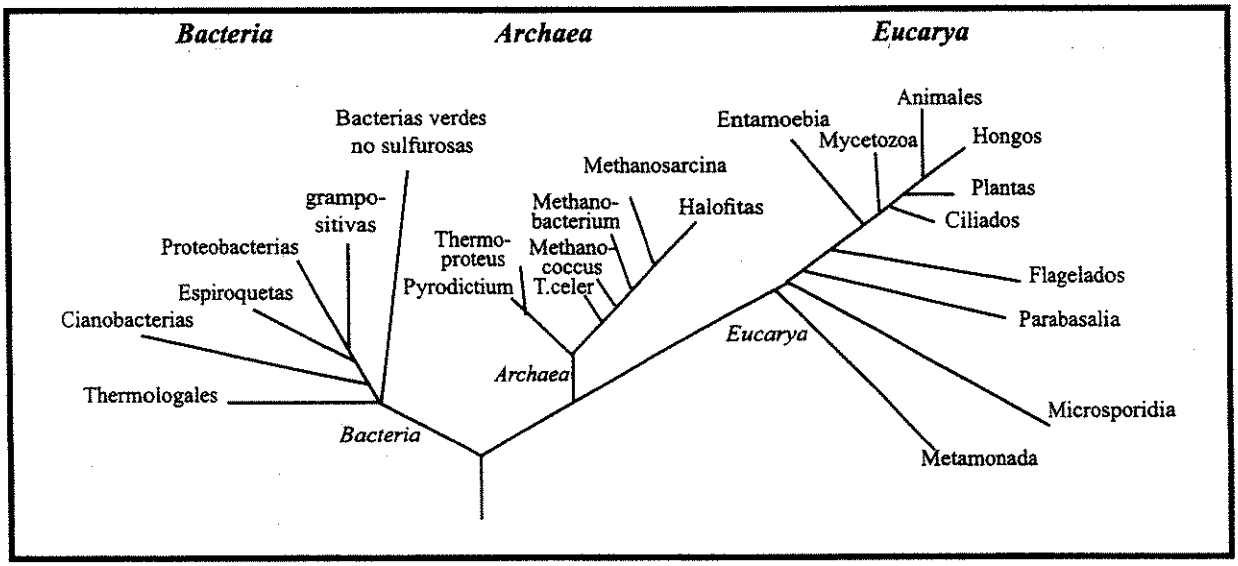


Figura 3-1. Arbol filogenético universal. El orden de ramificación y la longitud de las ramas se basan en la comparación de secuencias de rRNA. La raíz fue establecida comparando pares de genes que se duplicaron antes de la emergencia de los tres dominios.

[1] El origen de las especies por medio de la selección natural.

Tanto en el dominio *Archaea* como en el *Bacteria* los organismos no poseen núcleo definido, poseen (salvo algunas pocas excepciones) una pared rígida y sus genes se agrupan en operones. Debido a la existencia de la pared, la nutrición se produce básicamente por difusión de los nutrientes hacia el interior de la célula.

La energía en el dominio *Archaea* se obtiene, en general, por actividades metabólicas tales como la reducción de azufre y sus compuestos oxidados, la metanogénesis, o la fotosíntesis basada en el pigmento denominado bacteriorrodopsina. De éstas, la más primitiva parece haber sido la reducción del azufre, ya que está presente en las ramas más profundas de este dominio.

En el dominio *Bacteria*, la energía es aportada, en gran parte, por la fotosíntesis basada en las clorofilas. Las cianobacterias poseen un aparato fotosintético particularmente eficiente y son las únicas

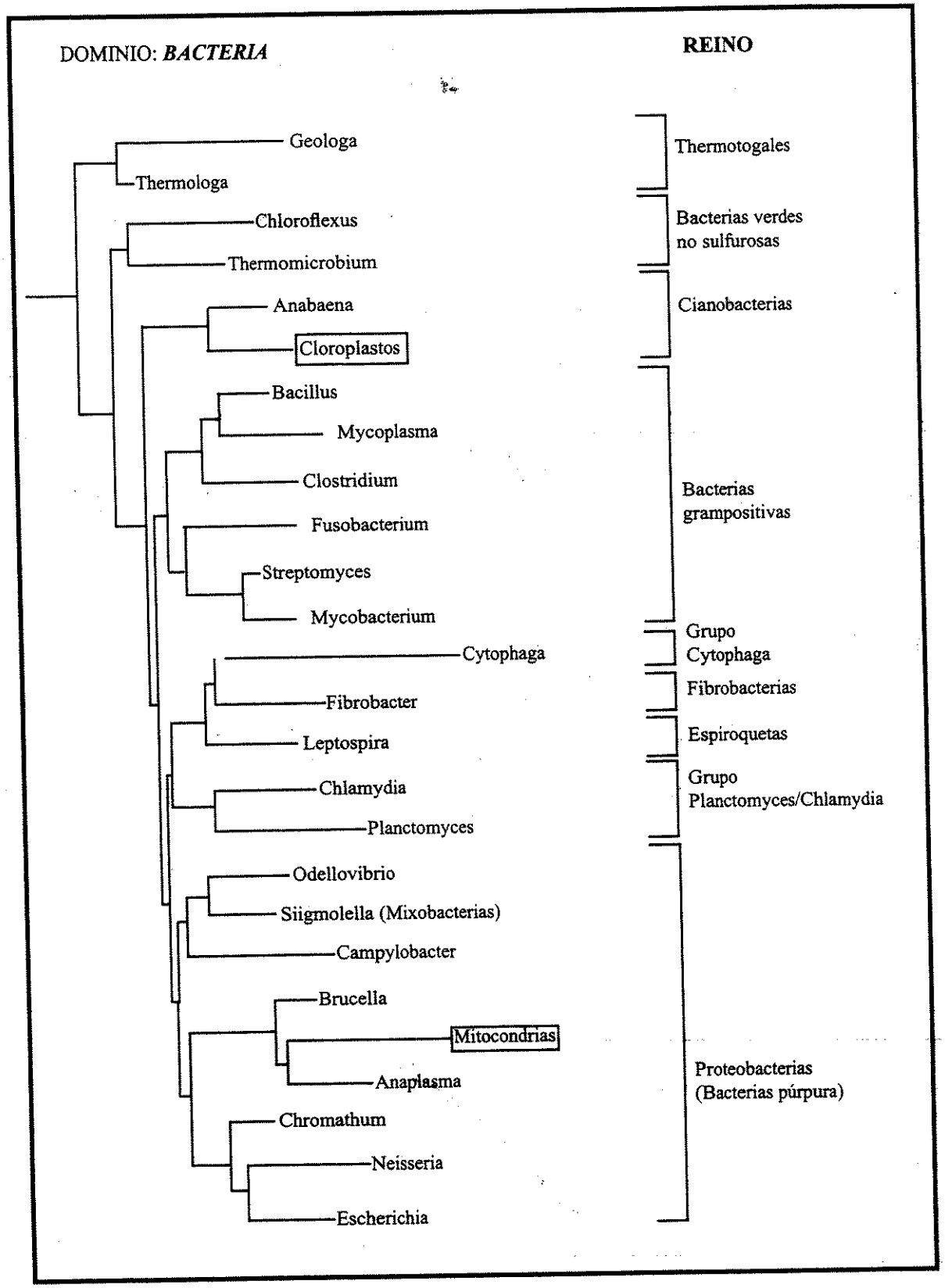


Figura 3-2. Diversidad en el dominio *Bacteria*.

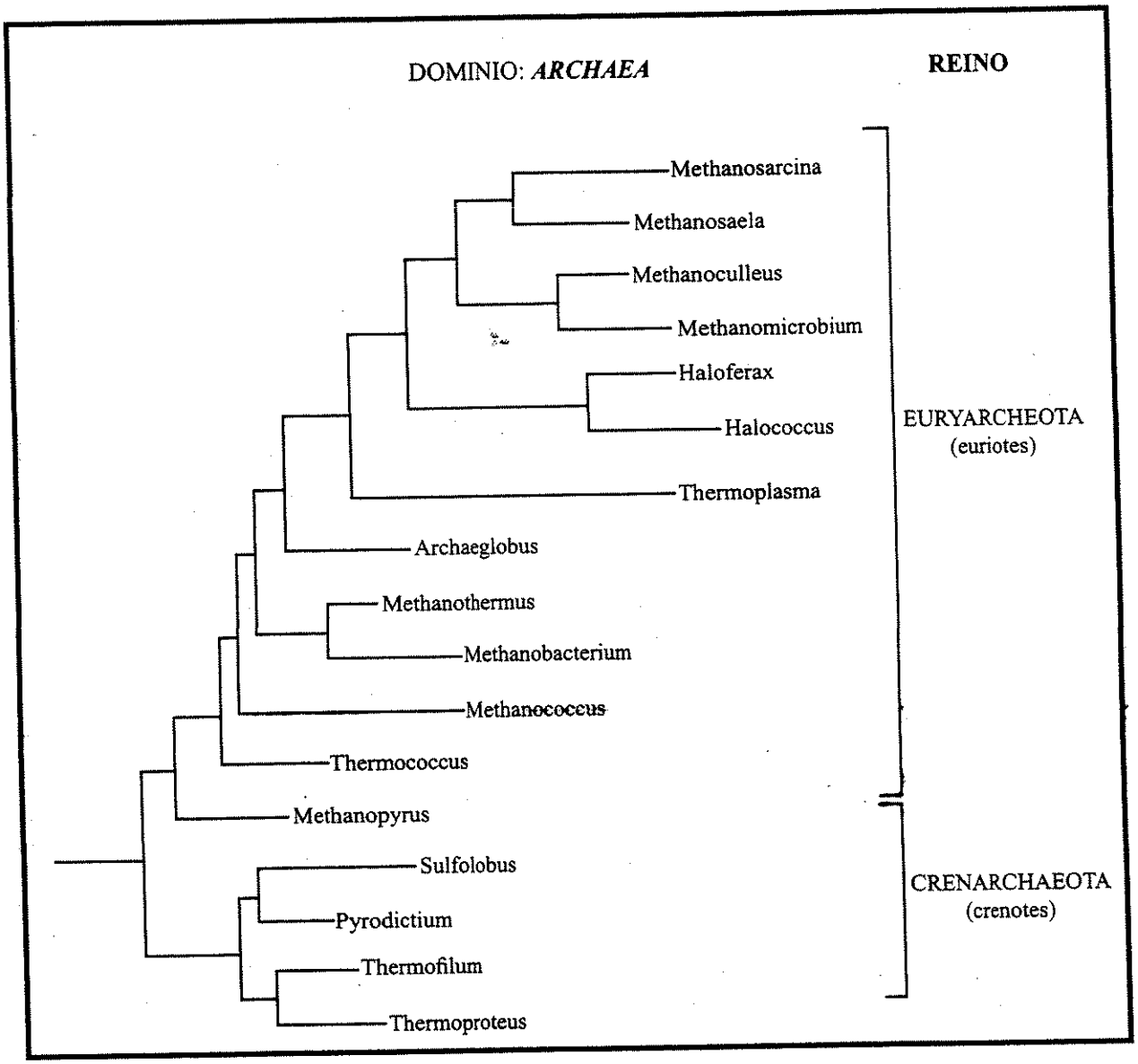


Figura 3-3. Diversidad en el dominio *Archaea*. Los fenotipos característicos son Termofilia Extrema (*Sulfolobus*, *Thermoplasma*); Halofilia Extrema (*Haloferax*, *Halococcus*) y Metanogénesis (*Methanococcus*, *Methanomicrobium*).

bacterias que generan oxígeno durante la fotosíntesis. La aparición de esta rama de las bacterias contribuyó de manera decisiva a la acumulación de oxígeno en la atmósfera y posibilitó la evolución de los organismos con metabolismo netamente aeróbico. Prácticamente toda la capacidad fotosintética de los seres vivos proviene de forma directa o indirecta de las bacterias ya que los eucariotes fotosintéticos obtuvieron ese carácter por endosimbiosis (actualmente se acepta que los cloroplastos son el resultado de un evento de endosimbiosis entre una cianobacteria y un organismo eucariótico). A partir de la fotosíntesis en el dominio *Bacteria* también se originó la respiración que, a posteriori, fue adquirida por los eucariotes. Asimismo, como en el caso de los cloroplastos, las mitocondrias también resultaron de un evento de endosimbiosis, pero en esta ocasión entre una proteobacteria y un organismo eucariótico.

Algunos de los eventos macroevolutivos más notables en el dominio *Bacteria* están relacionados con cambios sustanciales en la estructura de la pared celular. La pared ancestral debió poseer una estructura similar a la que poseen actualmente los integrantes de la mayor parte de los reinos bacterianos. Esta estructura consta de una capa rígida de peptidoglucano y una membrana externa básicamente conformada por lipoproteínas, fosfolípidos y lipopolisacáridos. En las bacterias grampositivas, la membrana externa ha desaparecido y la capa de peptidoglucano se encuentra hipertrofiada. Esta pared así modificada es más permeable y permite un gran intercambio de moléculas con el ambiente. Esto permitió la evolución de sistemas de intercambio de señales celulares, de digestión externa y de producción de antibióticos que rara vez se encuentra en otros grupos de bacterias.

En el dominio *Bacteria* la multicelularidad se encuentra como un ensayo en las mixobacterias. El complejo ciclo de vida de estas bacterias constituye uno de los ejemplos más extraordinarios de convergencia evolutiva con el de los integrantes del Phylum Mycetozoa del dominio *Eucarya* (fig. 3-4).

La diversificación que presuntamente dio lugar a los dominios *Archaea* y *Eucarya* resultó en esta última rama en la evolución de organismos sin pared (por lo menos en su fase vegetativa). La ausencia de esta barrera dejó a la membrana citoplasmática en relación directa con el ambiente y posibilitó el desarrollo de un nuevo modo de nutrición por fagocitosis. El perfeccionamiento de este proceso por selección es muy probable que haya resultado en la evolución del citoesqueleto y el retículo endoplásmico.

Los primeros organismos eucarióticos nacieron en pleno período anaeróbico, hace más de 2000 millones de años; obtenían energía a través de la glucólisis, no contenían mitocondrias, cloroplastos ni peroxisomas y carecían de aparato de Golgi. Algunos taxones actuales representan este período. En conjunto, estos organismos han sido agrupados en el reino *Archezoa*. Los ribosomas de todos ellos son de tipo 70S, como los universalmente presentados en los dominios *Bacteria* y *Archaea*. Otro evento macroevolutivo muy importante en el dominio *Eucarya* corresponde a la adquisición de las mitocondrias. Estas se encuentran por primera vez en la rama perteneciente al Phylum *Percolozoa* (fig. 3-4). Los ribosomas siguieron siendo del tipo 70S y el Golgi aún no se desarrolló. Esta última estructura celular aparece en integrantes del Phylum *Parabasalia* donde los dictiosomas se encuentran muy bien desarrollados. Los ribosomas aún son del tipo 70S. En contraste, en el Phylum *Euglenozoa*, los ribosomas son 80S, considerados tradicionalmente como los ribosomas típicos eucarióticos. Algunos integrantes de este grupo poseen cloroplastos, pero éstos parecen haber sido obtenidos por simbiosis secundaria. Más probablemente, el evento de endosimbiosis primaria que originó estos plástidos pueda ser

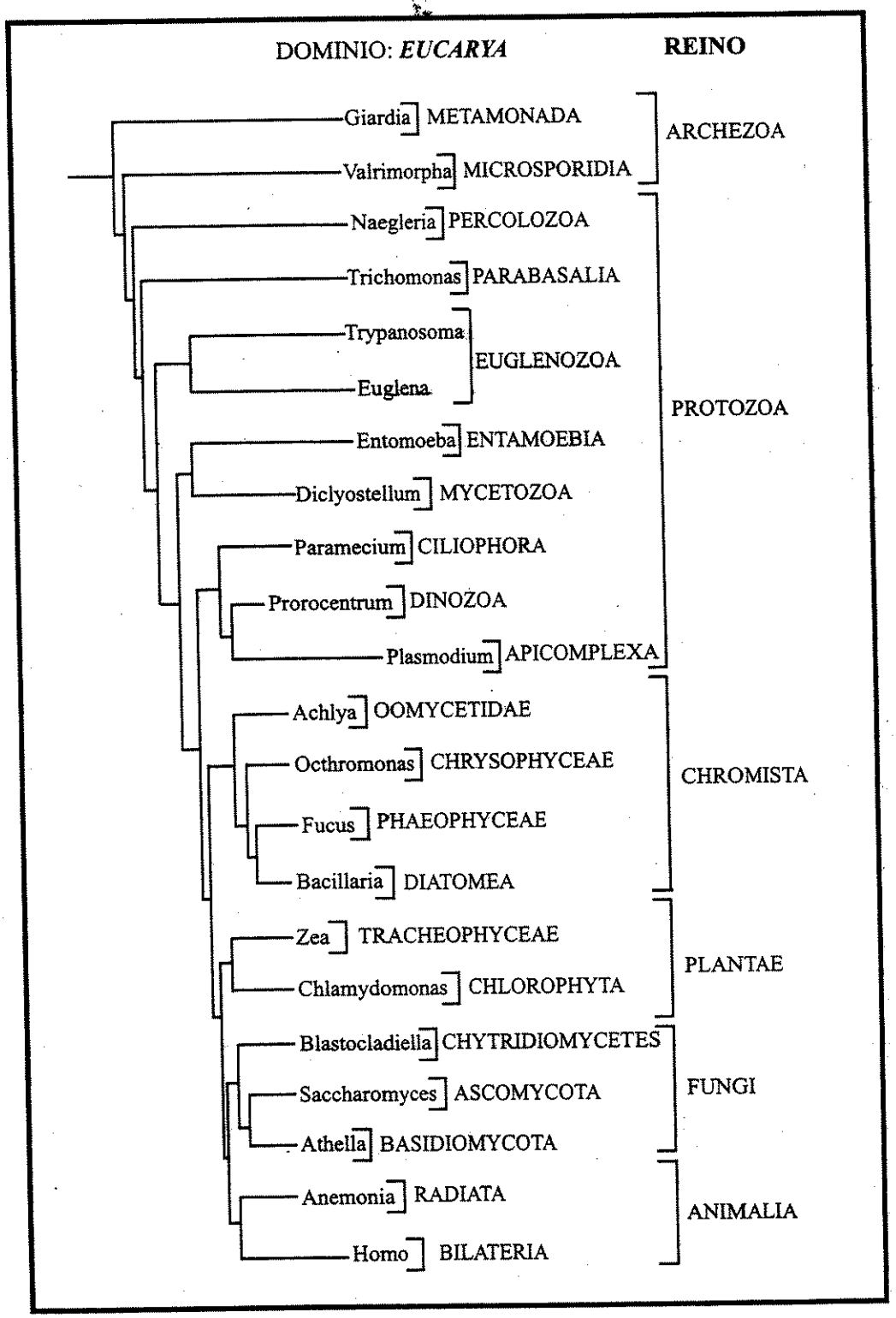


Figura 3-4. Diversidad en el dominio *Eucarya*.

situado de forma inmediata antes de la aparición de la rama que contiene a los ciliados y dinoflagelados.

Los primeros ensayos de multicelularidad en los eucariotes se encuentran en el Phylum *Mycetozoa*, antiguamente clasificados como hongos pero claramente diferenciados de éstos mediante el análisis del rRNA (fig. 3-4).

Una hipótesis para explicar el surgimiento de los dominios y los principales taxa incluidos en ellos

Desde Darwin en adelante, los evolucionistas han sostenido la hipótesis de que todos los seres vivientes en la tierra descienden de un ancestro común. Ese ancestro común estaría representado en el árbol universal por su raíz de acuerdo con la visión de los evolucionistas moleculares actuales. En realidad no existe un único árbol universal sino una serie de árboles construidos sobre la base de distintas macromoléculas universales que en general coinciden en su topología pero que también suelen presentar diferencias muy marcadas en cuanto a la ubicación de algún o algunos taxones. Por ejemplo, algunos genes correspondientes a la sulforreducción agrupan a *Archaeoglobus*, un arqueón, con bacterias, y algunos genes correspondientes a fenil tRNA sintetasas agrupan al *Treponema pallidum*, una bacteria, con arqueones. En la literatura científica es posible encontrar actualmente muchos otros ejemplos de este tipo. Las incongruencias observadas se atribuyen a la existencia de intercambios genéticos entre organismos filogenéticamente distantes. Este tipo de intercambio genético se denomina "transferencia horizontal" y el secuenciamiento de numerosos genomas enteros ha confirmado la existencia de este tipo de intercambio a lo largo de la evolución. En algunos casos, este intercambio abarcó bloques genómicos prominentes.

Por otro lado, en el árbol universal basado en el rRNA (16S) es posible observar la súbita aparición de fenotipos sumamente complejos. Dos ejemplos notables de este fenómeno son:

a) La emergencia de la fotosíntesis en la división *Cloroflexus-Thermomicrobium* en *Bacteria*.
b) La emergencia de la metanogénesis en *Archaea*.

La transferencia horizontal puede una vez más ser postulada como la causa de esta abrupta interrupción de fenotipos complejos en una rama que puede estar evolucionando, de acuerdo con otros criterios, en forma parsimoniosa. Sin embargo, en los casos nombrados no existe ningún taxón en el árbol universal desde donde los genes correspondientes pudieran haber sido transferidos.

La relación entre dominios es también controvertida. Las filogenias basadas en genes metabólicos tienden a agrupar *Bacteria* con *Archaea*, mientras que las basadas en genes informativos tienden a agrupar *Archaea* con *Eucarya*. Por otro lado, el análisis filogenético de algunos genes duplicados pareciera indicar que la raíz del árbol universal se sitúa entre *Bacteria* y *Archaea*, lo que definiría a *Archaea* y *Eucarya* como taxones hermanos. Una dificultad no menor para aceptar esta postulación es la enorme diferencia fenotípica entre organismos pertenecientes a las ramas más profundas de estos dos dominios. Por ejemplo, los arqueones de estas ramas no poseen núcleo, son hipertermofílicos, tienen lípidos característicos del dominio correspondiente y una pared constituida por glicoproteínas. En contraste, los eucariontes de las ramas más profundas poseen núcleo, son mesofílicos, tienen lípidos con estructura semejante a los lípidos bacterianos y, por lo menos en su fase vegetativa, carecen de pared. Parecería que existen numerosos eslabones perdidos entre estos dos dominios, lo que torna dificultoso el poder imaginar la existencia de un ancestro común a ambos.

Gran parte de estas anomalías pueden explicarse si se considera la siguiente hipótesis sobre el nacimiento y desarrollo de los dominios.

Existió una población de "células primitivas" durante un período temprano de la evolución de la vida sobre la tierra. Estas "células primitivas" no poseían pared ni membrana nuclear y estaban sometidas a frecuentes eventos de fusión celular seguida de recombinación genética legítima e ilegítima.

Esta población celular presentaba, en conjunto, una enorme diversidad de fenotipos. Algunas de las células eran fotosintéticas, otras metanogénicas, algunas respiraban, otras fermentaban, etcétera. En concordancia con esta diversidad fenotípica, la población de "células primitivas" poseía un pool de genes comunes a todas sus células (de tipo universal), un pool de genes actualmente característicos del dominio *Bacteria*, un pool de genes actualmente característicos del dominio *Archaea*, un pool de genes actualmente característicos del dominio *Eucarya*, y un gran pool de otros genes, algunos de los cuales están representados en algún grupo particular de organismos actuales.

En determinado momento, en una célula, evolucionó la mureína debido a una combinación particular de genes. En ese momento nació el dominio *Bacteria* debido a que la emergencia de la pared celular disminuyó drásticamente el intercambio genético con otros miembros de la población de "células primitivas". Otro evento de aislamiento genético posibilitado por la evolución de una pared glicoproteica trajo como consecuencia el nacimiento del dominio *Archaea* y la evolución de la membrana nuclear el nacimiento del dominio *Eucarya*. Es importante señalar que siendo estos eventos independientes podrían haber ocurrido en cualquier orden temporal.

EVOLUCION DENTRO DE LOS DOMINIOS

Con respecto al proceso de diversificación dentro de cada dominio, el presente modelo postula que este ocurrió como consecuencia de un proceso que involucró la pérdida de la pared de una célula perteneciente a un linaje dado y la fusión de ésta con otra también carente de pared originada en otro linaje. Este segundo linaje podría pertenecer: a) al mismo dominio que incluye al primero, b) a otro dominio, o c) por lo menos por cierto tiempo a la población de "células primitivas". Esta fusión debió ser seguida de recombinación (mayormente ilegítima) y regeneración de una nueva pared celular muy probablemente diferente a las de las células parentales. Cuando estas células quiméricas fueron viables, determinaron el surgimiento de nuevas divisiones dentro de los dominios. Esta hipótesis es congruente con información disponible sobre las diferencias estructurales entre células de distintas divisiones. Por ejemplo, varias divisiones de bacterias tales como grampositivas y Planctomyces poseen paredes bien diferenciadas. También existen cambios muy marcados en la pared celular asociados a la diversificación dentro del dominio *Archaea*, como por ejemplo, en las divisiones Metanobacteriales, Halococcus y Methanosarcina.

Si todos o la mayor parte de los genes informativos (incluyendo los rRNA) en la nueva línea celular son del tipo común a las células de uno de los dominios, el nuevo linaje aparecerá en cualquier árbol universal basado en ellos como perteneciente a ese dominio. Por lo tanto, un árbol que represente la diversificación de organismos en vez de moléculas no tendrá nodos sino discontinuidades que representarán a organismos cuyos genomas estarán sólo parcialmente relacionados.

Es de notar que si en la fusión celular hubieran intervenido una célula perteneciente a uno de los dominios establecidos y una célula de la población de "células primitivas", nuevos fenotipos complejos podrían haber sido súbitamente introducidos en el dominio. Este podría haber sido el caso de la fotosíntesis en *Bacteria* y la metanogénesis en *Archaea*.

Si la fusión celular es el principal motor de la diversificación macroevolutiva, los organismos pertenecientes a taxones hermanos poseen genomas que están sólo parcialmente relacionados y en consecuencia las genealogías basadas en genes deberían ser consideradas sólo como una aproximación imperfecta de la genealogía de los organismos. Desde el punto de vista taxonómico sería importante saber cuánto del genoma de un linaje dado ha contribuido para formar el genoma de un linaje derivado. Si se contara con un índice que midiera esta contribución, se podría establecer un criterio general para decidir a qué taxón un organismo dado pertenece. Por ejemplo, podría establecerse que un organismo pertenece a un taxón si el 60% (o cualquier porcentaje que se considere razonable) de sus genes poseen una filogenia que lo incluye en ese taxón.

Cualquiera que sea la definición que finalmente se adopte, es claro que la relación que resulte entre los organismos de acuerdo con ella no representará toda la información sobre la "historia natural" de los organismos en estudio. Tal información sólo puede surgir del análisis exhaustivo de los genomas completos.

BIBLIOGRAFIA

Cavalier-Smith T. Kingdom Protozoa and its 18 phyla. Microbiol Rev. 1993, 57(4):953-994.

Fox GE, Stackebrandt E. The phylogeny of prokaryotes. Science 1980, 209:457-463.

Gogarten JP, Kibak H. Evolution of de vacuolar H^+-ATPase: Implications for the origin on eukaryotes. Proc Natl Acad Sci USA 1989, 86:6661-6665.

Iwabe N, Kuma K, Haegawa M, Osawa S, Miyata T. Evolutionary relationship of archaebacteria, eubacteria and eukaryotes inferred from phylogenetic trees of duplicated genes. Proc Natl Acad Sci USA 1989, 86:9355-9359.

Olsen GJ. Microbiología Evolutiva. Ed. Asociación Argentina de Microbiología. DAMyC. Argentina, 1991.

Schopf JW. Microfossils of the Early Archean Apex chert: new evidence of the antiquity of life. Science 1993, 260:640-646.

Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. Proc Natl Acad Sci USA 1990, 87: 4576-4579.

Woese CR, Pace NR. Probing RNA structure, function and history by comparative analysis. In The RNA World. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993.

Zorzópulos J. Microbiología Evolutiva. Ed. Asociación Argentina de Microbiología. Argentina, 2001.

Zuckerkandl E, Pauling L. Molecules as documents of evolutionary history. J Theor Biol. 1965, 8:357-366.

Zorzópulos J, Birth of the domains Bacteria, Archaea and Eucarya and of major taxa within them: a hypothesis. Rev Arg Microbiol 2003; 35: 175-182.

CITOLOGIA BACTERIANA

Nestor Oscar Stanchi,
Elida Gentilini

Las bacterias pueden considerarse como los microorganismos de menor tamaño (aproximadamente 1 µm)[1] que contienen la maquinaria necesaria para crecer y autorreplicarse a expensas de los alimentos. Son morfológicamente más simples que las células de los organismos superiores.

Si bien en sus estructuras internas las bacterias son más simples que las células animales, analizando su superficie resulta que ésta es más compleja. Las bacterias carecen de núcleo organizado (por lo tanto, son procariotes).

Se describirá a la célula bacteriana analizando, en primer lugar, su estructura interna.

MATERIAL NUCLEAR

El material nuclear procariote a diferencia del eucariote (*eu* = verdadero) está constituido de DNA pero carece de membrana nuclear y de sistema mitótico, aunque sí se puede observar una región de concentración del ácido nucleico. El DNA bacteriano se encuentra naturalmente "muy enrollado" y puede extraerse como una molécula continua con un peso molecular (PM) de aproximadamente 3 x 10^9. Puede considerarse por tanto un cromosoma único de aproximadamente 1 mm de longitud cuando está desenrollado.

El DNA aparece, como se mencionó, "super enrollado" o "enroscado" en un centro de RNA que sirve para sostener el DNA en su forma compacta. Tiene una estructura como "cuentas de collar" semejantes a la cromatina eucariota pero no se observan histonas básicas. Se encuentra insertado en un punto de una invaginación de la membrana celular denominado mesosoma (véase Membrana celular). Esta inserción desempeña un papel clave en la segregación de dos cromosomas homólogos después de la autorreproducción cromosómica (división celular).

Los estudios con microscopia electrónica (ME) han revelado que en la célula bacteriana el citoplasma contiene RNA densamente agregado, por lo que cuando se utilizan colorantes, el citoplasma resulta ser basófilo como el núcleo[2].

Resumiendo: las bacterias entonces carecen de los típicos cromosomas, del aparato mitótico, nucléolo, histona y membrana nuclear.

ESTRUCTURAS CITOPLASMICAS

Las células procariotas carecen de plástidos autónomos como las mitocondrias y los cloroplastos. Las enzimas citocrómicas se encuentran localizadas en la membrana celular.

Inclusiones

Con frecuencia, las bacterias almacenan materiales de reserva en forma de gránulos citoplásmicos insolubles[3] que se depositan como polímeros neutrales osmóticamente inertes. Estos gránulos constituyen la fuente de carbono para la síntesis de proteína y ácidos nucleicos.

También muchas bacterias acumulan reservas en gránulos metacromáticos[4] de fosfato inorgánico ([PO3-]n) (gránulos de meta fosfato polimerizado), que se denominan gránulos de volutina.

Ribosomas

El citoplasma bacteriano contiene numerosos ribosomas (alrededor de 15.000). Los ribosomas están compuestos de dos subunidades, una de ellas de gran tamaño (50 S; S= cociente de sedimentación) y otra pequeña (30 S). Cuando una célula se halla entregada a la síntesis proteica, los ribosomas se agrupan en cadenas que reciben el nombre de polisomas.

ESTRUCTURAS EXTERNAS

Para poder explicar la estructura externa de las bacterias, es necesario primero mencionar que las bacterias pueden dividirse de acuerdo con su capacidad o no de retener un colorante en dos clases de bacterias. Esta clasificación, de importancia en la taxonomía bacteriana, está basada en la coloración de Gram que se verá en otro capítulo. De allí que las bacterias capaces de retener el colorante cristal violeta se denominan grampositivas y aquellas que no lo retienen se denominan gramnegativas negativas.

Bacterias gramnegativas

Presentan tres capas principales: una interna (75 Å), la membrana citoplásmica, una capa delgada (20-30 Å) densa a los electrones y que corresponde a la pared celular, y una capa externa

---

[1] 1 mm = 1000 µm = 1.000.000 nm = 10.000.000 Å
1 µm = 1000 nm = 10.000 Å
1 nm = 10 Å

[2] Cuando se emplean técnicas de tinción exclusivas para DNA se suelen ver dos o más regiones nucleares, debido a que la división celular es más lenta que la división del material nuclear.

[3] En ausencia de una fuente de nitrógeno, el material que proviene de la fuente de carbono es convertido por algunas bacterias en el polímero -ácido poli-beta-hidroxibutírico y en otras en varios polímeros de glucosa semejante al glucógeno que colectivamente se conoce como granulosa. El yodo pone de manifiesto el glucógeno (rojo) y la granulosa (azul) semejante al almidón; el elevado PM (peso molecular) de esta sustancia permite el almacenamiento de elementos nutritivos sin que por ello aumente la osmolaridad del citoplasma.

[4] Metacromático: se tiñen de un color distinto al del colorante (por ej., Corinebacterias).

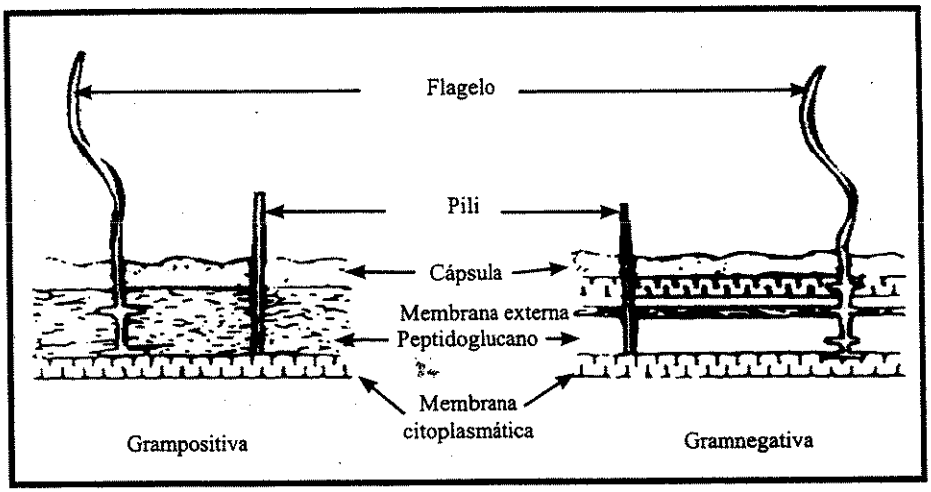


Figura 4-1. Envoltura celular de bacterias grampositivas y gramnegativas.

(60-180 Å); esta última recibe también el nombre de membrana externa o capa L, y recuerda tanto por su composición como por su aspecto trilaminar a las típicas membranas biológicas.

Bacterias grampositivas

Presentan dos capas: la membrana citoplásmica (75 Å) y la pared celular gruesa (200 a 800 Å).

La figura 4-1 muestra la envoltura celular de las bacterias grampositivas y gramnegativas.

MEMBRANA CELULAR

Es una membrana unitaria típica de fosfolípidos y proteínas. Las membranas de los procariotas se distinguen de los eucariotas por la ausencia de esteroles, siendo la única excepción los Mycoplasmas, los cuales los incorporan en sus membranas al crecer en medios que contienen esteroles. El contenido de proteínas varía entre un 60% y 70% (20% de las proteínas totales de la bacteria), y presenta también un 20-30% de lípidos e hidratos de carbono en pequeñas cantidades. Las proteínas parecen ser de orden catalítico o transporte, pero no estructurales.

La membrana citoplásmica constituye una barrera osmótica, que es atravesada intermitentemente por sistemas específicos de transporte con permeabilidad selectiva y transporte de solutos hacia el interior de la célula.

En la membrana citoplásmica se hallan enzimas con distintas funciones; en la tabla 4-1 se mencionan las más importantes.

Mesosomas

La membrana plasmática, principalmente en grampositivas, presenta invaginaciones (una o más), de gran tamaño y forma irregular. Estas invaginaciones pueden ser de tipo laminar o vesicular.

Mesosomas laminares (de tabique): forman paredes transversas durante la división celular, el cromosoma bacteriano está fijado al mesosoma tabicado.

Mesosomas vesiculares (laterales): intervienen en la función de secreción.

PARED CELULAR

La pared celular se encuentra externamente y rodeando a la membrana plasmática. Los cortes con ME de bacterias grampositivas presentan una cubierta externa gruesa (200-800 Å) que rodea a la membrana plasmática. En las bacterias gramnegativas, la pared celular es más fina (20 a 30 Å).

La presión osmótica interna de la mayoría de las bacterias fluctúa entre 5 y 20 atmósferas como resultado de una concentración de solutos adquiridos mediante transporte activo. Esta presión sería suficiente para hacer explotar la célula si no fuese por la presencia de la pared celular.

	Mem. plasmática	Pared celular	Mem. externa
Grampositivo	75 Å	200 a 800 Å	-
Gramnegativo	75 Å	20 a 30 Å	60 a 180 Å

Tabla 4-1. Membrana citoplasmática: enzimas y sus funciones

1) Citocromos y otras proteínas que intervienen en los procesos de transporte de electrones y en la fosforilación oxidativa en las especies aerobias*.
2) Enzima que interviene en el complejo proceso de la síntesis lipídica.
3) Enzimas que actúan en las fases de biosíntesis de la pared (en el acoplamiento de las subunidades con las moléculas portadoras y su polimerización subsiguiente).
4) DNA replicasa (biosíntesis de DNA).
5) Enzimas que no han pasado aún al espacio periplásmico o al exterior y que luego serán secretadas como exoenzimas hidrolíticas.

* Microorganismos que crecen en presencia de oxígeno.

La pared celular debe su fuerza a una envoltura compuesta por una sustancia denominada **mureína, mucopéptido o peptidoglucano**. La composición del peptidoglucano de la pared celular es igual en bacterias grampositivas como en gramnegativas[5].

COMPONENTES ESPECIALES DE LA PARED CELULAR

Grampositivas

La mayoría contiene abundante cantidad de:

1) Acido teicoico[6]: constituye el antígeno[7] (Ag) primordial de superficie de aquellas especies grampositivas que la poseen. Se desconoce cuál es la función del ácido teicoico pero proporciona una elevada densidad de cargas eléctricas orientadas regularmente hacia la envoltura celular, lo que afecta el paso de iones.
2) Polisacáridos: se sabe que por hidrólisis se liberan en ciertas especies de grampositivas azúcares neutros tales como manosa, arabinosa, galactosa, rammnosa, glucosamina y azúcares ácidos.

Gramnegativas

Las paredes celulares de las bacterias gramnegativas contienen polímeros que se encuentran fuera de la envoltura de peptidoglucano: lipoproteína, membrana exterior y lipopolisacárido.

1) Lipoproteína: las moléculas de una lipoproteína[8] sirven para entrecruzar la membrana exterior y el peptidoglucano.
2) Membrana exterior: es típicamente una doble capa de fosfolípidos, relativamente permeable a pequeñas moléculas hidrófilas e hidrófobas. Bloquea la penetración de moléculas grandes (de allí la resistencia a muchos antibióticos). También bloquea el escape de enzimas hidrolíticas excretadas, que se acumulan entre la capa de peptidoglucano y la membrana exterior.
3) Lipopolisacárido (LPS): los LPS de la pared celular consisten en un complejo lípido denominado lípido A[9], responsable de su toxicidad, al cual se le fija un polisacárido[10] responsable de la antigenicidad, constituido por un centro y una serie terminal de unidades repetidoras que forman una especie de piel molecular sobre la superficie celular y representa un antígeno principal de superficie de la célula bacteriana, denominado Ag O. El lípido A parece ser indispensable para la cubierta celular, ya que hasta el momento no se han hallado mutantes que carezcan de él (fig. 4-2).

El LPS es extremadamente tóxico para los animales. Se lo denomina endotoxina y sólo es liberado cuando la bacteria es lisada. En las enterobacterias, el lípido A es siempre el mismo,

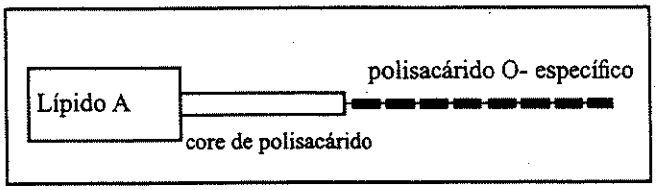


Figura 4-2. Estructura del lipopolisacárido (LPS).

mientras que el polisacárido es muy variable y da lugar a centenares de Ag O que aparecen en las distintas cepas. Estos Ag poseen una enorme importancia diagnóstica.

Bacterias ácido alcohol resistentes

Un tipo diferente de bacterias con referencia a su coloración son las bacterias ácido alcohol resistentes. Esta coloración se verá más adelante, pero en este capítulo se debe mencionar que en estos microorganismos las envolturas son mucho más complejas. El ácido micólico (ramas de un ácido graso de cadena larga) está covalentemente unido por medio de un polisacárido al peptidoglucano. Aparecen otros ácidos micólicos que contienen compuestos y otros complejos lipídicos en una fina membrana cerosa por fuera de la pared de peptidoglucano. En este grupo se encuentran las micobacterias, nocardias y corinebacterias.

PROTOPLASTOS, ESFEROPLASTOS Y FORMAS L

Puede lograrse el crecimiento de cepas bacterianas carentes de pared celular mediante hidrólisis con lisozima (que hidroliza al espinazo de peptidoglucano). Es necesario que crezcan en medios osmóticos protectores, y tal tratamiento libera protoplastos de las células grampositivas y esferoplastos (que contienen la membrana exterior) en las células gramnegativas.

Si las células son capaces de crecer y dividirse, se las denomina formas L (Lister); son difíciles de cultivar. Algunas formas L son capaces de regresar a la forma bacilar normal después de eliminar el estímulo inductor.

CAPSULA

La cápsula consiste en un "limo" excretado, habitualmente es un polisacárido[11] (geles hidrófilos). Las mutaciones afectan su producción y las células forman colonias[12] lisas o mucoides, mientras que las células no encapsuladas producen colonias rugosas. La cápsula protege a las bacterias patógenas frente a la fagocitosis por las células blancas de la sangre (fagocitos) o por protozoarios, y de los virus[13] que deben fijarse a la pared celular, por lo que su papel en la determinación de la virulencia de un germen es esen-

[5] El peptidoglucano es un polímero complejo que consiste para fines descriptivos en tres partes: a) un "espinazo" compuesto de N-acetil glucosamina y ácido N-acetil murámico alternantes; b) un conjunto de cadenas laterales tetrapeptídicas idénticas fijadas al ácido N-acetil murámico y c) un conjunto de puentes peptídicos transversos idénticos. Las cadenas tetrapeptídicas y los puentes transversos varían de sp a sp. La mayoría de las bacterias tienen L-alanina en las cadenas tetrapeptídicas laterales. Además, la mayoría de las bacterias gramnegativas portan ácido diamino pimélico, mientras que las bacterias grampositivas pueden portar ácido diamino pimélico, L-lisina o cualquiera de los diversos L-aminoácidos.

[6] Son polímeros hidrosolubles que contienen residuos de ribitol o glicerol unidos mediante enlaces fosfodiéster.

[7] Sustancia no reconocida por el organismo que provoca la formación de una respuesta inmune (por ej., con formación de anticuerpos).

[8] Está elaborado con residuos de ácido diamino pimélico de las cadenas laterales tetrapeptídicas de peptidoglucano. El componente lipídico está ligado por enlaces electrovalentes a la membrana exterior.

[9] El lípido A consiste en una cadena de unidades de glucosamin disacárido conectadas mediante puentes de pirofosfato a los cuales se han fijado numerosos ácidos grasos de cadena larga, el ácido β-hidroxi-mirístico, un ácido graso con 14 átomos de C. Otros ácidos grasos varían según la especie bacteriana.

cial. El mecanismo íntimo por el cual se impide que se produzca el fenómeno de la fagocitosis es poco conocido.

La cubierta capsular no muestra ningún detalle estructural vista con ME.

Las cápsulas verdaderas, en general, están compuestas en su mayor proporción por complejos de polisacáridos con mucina. Son estructuras organizadas, firmemente ancladas a la pared celular, por lo que suele ser difícil su eliminación completa mediante lavados sucesivos in vitro.

SLIME O POLISACARIDO EXTRACELULAR[10]

El *slime* no es considerado como una cápsula por su laxa unión a la pared bacteriana, siendo posible separarlo de las bacterias por lavados sucesivos intensos. Es importante considerar que las condiciones de crecimiento, en especial la composición química del medio de cultivo, condicionan la producción y secreción de *slime*, por lo cual se deduce que es el resultado de la expresión de genes inducibles y no constitutivos. El *slime* está formado por una trama densa de hidratos de carbono complejos secretados por los propios microorganismos. Es capaz de incluir a una comunidad de millones de microorganismos que constituyen un biofilm, aun cuando éste esté constituido por más de un género bacteriano.

BIOFILM

El biofilm es una estructura constituida por proteínas del hospedador, plaquetas, agregados bacterianos y polisacáridos extracelulares. No contribuye a la adherencia inicial de las bacterias, pero sí favorece la persistencia. Por ME se observa que es una estructura multilaminar. El biofilm puede formarse sobre diversas superficies, dependiendo de los nutrientes y las condiciones físicas mínimas requeridas por los microorganismos. Los microorganismos infecciosos capaces de crecer incluidos en biofilms constituyen focos de resistencia bacteriana a los tratamientos antibióticos y al sistema inmunológico. Algunas bacterias productoras de biofilms se encuentran implicadas con severas infecciones en humanos, como por ejemplo: *Pseudomonas aeruginosa* (fibrosis quística pulmonar, cistitis, entre otras) y *Staphylococcus epidermidis* (septicemias en personas con prótesis articular, válvulas cardíacas, catéteres y cánulas intravenosas).

GLICOCALIX

Es el material dentro del biofilm que contiene polisacáridos extracelulares y agregados bacterianos.

MEMBRANA DE ENVOLTURA DE BACTERIAS GRAMNEGATIVAS

De interés especial como un componente de la pared de la célula gramnegativa, la membrana exterior es una estructura por fuera de la hoja del peptidoglucano. Para la bacteria, la membrana exterior es la primera barrera de permeabilidad, pero principalmente debido a su contenido de lipopolisacárido, posee muchas características interesantes e importantes de las bacterias gramnegativas. La membrana exterior es una bicapa lipídica intercalada con proteínas y se parece en su superficie a la membrana plasmática. La cara interna de la membrana exterior está compuesta de fosfolípidos similares a los fosfoglicéridos que componen la membrana plasmática. La cara exterior de la membrana exterior puede contener algún fosfolípido pero principalmente está formada por un tipo diferente de molécula anfifílica, compuesta de lipopolisacárido (LPS). Las proteínas de la membrana exterior normalmente cruzan la membrana y fijan la membrana exterior a la hoja del peptidoglucano subyacente.

La molécula de LPS que constituye la cara exterior de la membrana exterior está compuesta de una región hidrófoba, llamada lípido A, que se une a una región hidrofílica del polisacárido lineal y consiste en el "core" polisacárido y el polisacárido O-específico.

Los lipopolisacáridos bacterianos son tóxicos para los animales. Cuando se inyectan en pequeña cantidad, las endotoxinas activan los macrófagos para producir pirógenos, activan la cascada del complemento causando inflamación y activan los factores sanguíneos que producen coagulación intravascular y hemorragia. Las endotoxinas pueden jugar un papel en la infección de cualquier bacteria gramnegativa. El componente tóxico de la endotoxina (LPS) es el lípido A. El polisacárido O-específico puede mantener ligandos para la adhesión bacteriana y puede conferir un poco de resistencia a la fagocitosis. La variación en el volumen exacto de azúcar del polisacárido de O (también llamado antígeno O) suma los múltiples tipos antigénicos (serotipos) entre el patógeno bacteriano gramnegativo. Por consiguiente, aunque el lípido A es el componente tóxico en el LPS, los polisacáridos contribuyen no obstante a la virulencia de bacterias gramnegativas.

FLAGELOS

Estructura: son apéndices filiformes/filamentosos, finos, ondulados y largos; miden de 3 a 12 µm compuestos en su totalidad por proteína (flagelina), su diámetro es de 12 a 13 nm y no pueden verse con el microscopio óptico, a menos que se empleen técnicas de coloración especiales. Son los órganos responsables de la locomoción bacteriana (fig. 4-3). El tipo de ondulación de los flagelos es exclusiva de cada cepa bacteriana (característica genética estable). Se conocen distintos tipos de distribuciones (fig. 4-4):

átricos: carecen de flagelos
monótricos: con un solo flagelo polar
anfítricos: con un flagelo en cada polo
lofótricos: mecha de flagelos en un polo celular
anfilofótricos: mechas de flagelos en ambos polos celulares
perítricos: flagelos distribuidos en toda la célula

Un flagelo bacteriano está constituido por una sola clase de proteína globular soluble (subunidad proteica), denominada flagelina

[10] El polisacárido está compuesto de numerosos monosacáridos (por ej., desoxohexosas, didesoxihexosas). Cadenas laterales específicas: en un LPS dado cada cadena lateral contiene la misma secuencia repetida, en la que la subunidad es un trisacárido lineal o un tetra o pentasacárido ramificado.

[11] La cápsula del neumococo tipo 3 (*Streptococcus pneumoniae*), por ejemplo, está compuesta de un polímero de glucosa y ácido glucurónico de alto PM, mientras que la de *Bacillus anthracis* está formada por un polipéptido, el ácido D-glutámico. La cápsula de algunas bacterias (por ej., *Bacillus megaterium*) contiene proteínas y carbohidratos.

[12] Las bacterias, cuando crecen en medios de cultivo sólidos, lo hacen formando colonias. Su aspecto puede ser liso, mucoide o rugoso.

[13] Virus bacterianos o fagos: son virus que parasitan a las bacterias (se verán más adelante).

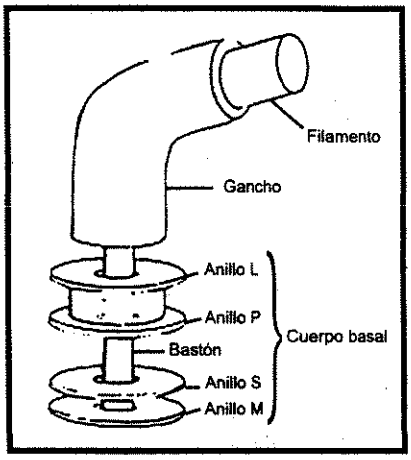


Figura 4-3. Estructura basal del flagelo bacteriano. Los anillos L-P no se encuentran en las bacterias grampositivas.

(PM 40.000), formada por agregación de subunidades que originan una estructura cilíndrica hueca. Los flagelos bacterianos, al ser mucho más delgados que los cilios de las células de los vertebrados o los flagelos de los protozoos, no contienen las subfibrillas que se hallan en estas estructuras, sino que se presentan en formas de cadenas íntimamente enrolladas, por lo general como triple hélice. Si se provoca la pérdida de los flagelos mecánicamente (agitación), en 3 a 6 minutos se forman de nuevo por síntesis.

Las flagelinas de diferentes especies bacterianas difieren presumiblemente unas de otra en la estructura primaria (antígeno H -Ag H-). El flagelo se inserta en el cuerpo de la célula bacteriana mediante una estructura compleja que consiste en un gancho y un cuerpo basal. El cuerpo basal porta una serie de anillos, un par en las bacterias grampositivas y dos pares en las bacterias gramnegativas.

Motilidad: los flagelos bacterianos son rotores helicoidales semirrígidos a los cuales la célula les imprime movimientos de giro. Se supone que el anillo S está insertado en la pared celular, y el anillo M en la membrana celular. La rotación del anillo S en relación con el anillo M fijo proporcionaría a los flagelos el movimiento rotatorio necesario. La naturaleza exacta del "motor" que produce esta rotación es desconocida.

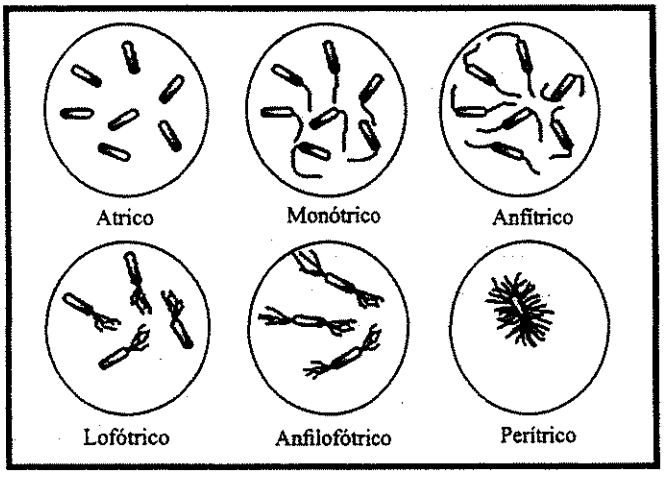


Figura 4-4. Distribución de los flagelos en las bacterias.

Se conoce que existen distintas conductas tácticas en los procariotes; la movilidad puede desarrollarse como estímulo a la respuesta del ambiente. Por ejemplo: la quimiotaxis por la cual las bacterias pueden ser sensibles a calidad o cantidad de ciertos químicos del ambiente y nadar hacia él (si son nutrientes) o alejarse (si son sustancias dañinas). Otros tipos de respuestas tácticas incluyen la fototaxis (mediada por la luz), aerotaxis (mediada por el aire) y la magnetotaxis (mediada por cargas eléctricas). La ocurrencia de conductas tácticas brinda evidencia de ventajas de supervivencia ambiental de las bacterias que poseen flagelos en comparación con aquellas que carecen de ellos.

PILI, PELOS O FIMBRIAS

Muchas bacterias gramnegativas poseen apéndices superficiales rígidos denominados pili, pelos o fimbrias. Sólo una pocas bacterias grampositivas las poseen, incluyendo algunas archaea. Son estructuras más cortas y finas que los flagelos y a semejanza de éstos se ha demostrado que constan sólo de proteína (pilina). En una misma célula puede haber pilis de distinto grosor (de 75 a 100 Å) y longitud (varios μm, aunque más cortos que los flagelos). Al igual que los flagelos parecen originarse de los cuerpos basales en la membrana citoplásmica.

Básicamente se clasifican en pilis sexuales (aquellos involucrados en la conjugación[14] bacteriana) y pilis comunes o fimbrias (relacionados con la adherencia celular). En situaciones médicas tienen un determinante principal de virulencia bacteriana debido a que permiten a los patógenes adherirse a los tejidos (colonizar) y resistir el ataque de las células fagocíticas.

Un grupo de bacterias grampositivas, los estreptococos, poseen una capa exterior de fimbrias proteicas extendidas llamada proteína M. Esta proteína resulta el principal antígeno (Ag) de superficie de los estreptococos y es esencial para su establecimiento en el hospedador.

ENDOSPORAS

Cuando las bacterias se hallan en condiciones desfavorables de nutrición comienzan a morir, pero hay un grupo de microorganismos que en iguales circunstancias pueden continuar viviendo (aunque en estado latente), debido a la formación en su interior de un organismo especial, el esporo, espora o endospora[15] (sinónimos), que constituye una verdadera forma de resistencia bacteriana.

Las esporas, al igual que las semillas de las plantas, no poseen actividad metabólica alguna. Las esporas son células muy refractivas y extraordinariamente deshidratadas, muy resistentes al calor, condiciones ambientales adversas y agentes químicos.

Los miembros de tres géneros de bacterias son capaces de formar endosporos. Los más comunes son los bacilos grampositivos del género aerobio obligado *Bacillus*, los del género anaerobio obligado *Clostridium*, y el tercero es un coco grampositivo del género *Sporosarcina.*

Morfológicamente, la espora puede no modificar el cuerpo bacteriano (*Bacillus*) o, si es más grande que éste, lo modifica (*Clostridium*). Dentro de la célula bacteriana, los esporos pueden hallarse en un extremo, subterminales o en el centro de la bacteria.

Estos microorganismos sufren un ciclo de diferenciación en respuesta a condiciones ambientales; bajo causas de deficiencia

[14] La conjugación es una forma de "reproducción" bacteriana.

[15] No hay que confundir con las exósporas que producen los hongos, sea por gemación o por septación de sus largas células (hifas).

nutricional, cada célula forma una única espora interna, la cual es liberada cuando la célula progenitora sufre autólisis. Cuando regresa a condiciones nutricionales favorables y es activada, la espora germina para producir una célula vegetativa única.

Una característica en el caso de las esporas es que poseen un enorme contenido en Ca^{++}, el que se acompaña a cantidades equivalentes de ácido dipicolínico, sustancia que es capaz de quelar[17] el Ca^{++}. La resistencia al calor se debe en parte a su estado deshidratado y al dipicolinato cálcico.

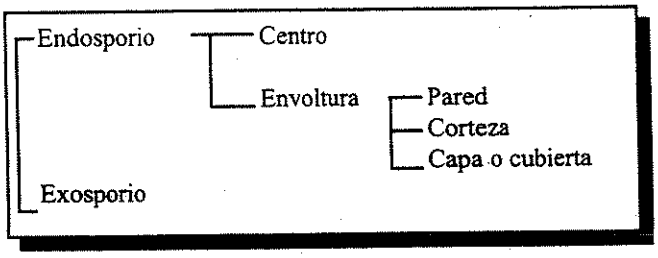


Figura 4-5. Esquema de la estructura de las endosporas.

Proceso de esporulación

El proceso comienza cuando las condiciones nutricionales son desfavorables (especialmente nitrógeno y/o carbono), activándose genes para la formación de la espora y desactivándose con función vegetativa.

Se inicia la formación con la migración de una región nuclear condensada hacia uno de los extremos de la célula. Morfológicamente comienza a formarse un núcleo terminal mediante el crecimiento invaginante de la membrana celular, la que lleva a producir una estructura membranosa doble (figs. 4-5 y 4-6). Las dos membranas de la espora van a formar capas especiales que constituirán la envoltura celular; éstas son la pared de la espora, la corteza y la capa o cubierta, todas junto con el núcleo terminar formarán parte del endosporio (fig. 4-5). El exosporio se encuentra por fuera de las membranas.

1) Núcleo o centro: el centro es el protoplasto de la espora, contiene un cromosoma, el aparato sintetizador de proteínas y un sistema generador de energía basado en degradación de la glucosa.
2) Envoltura:
   a) Pared de la espora: la capa más interna que rodea a la membrana interna de la espora es llamada pared de la espora. Contiene mureína normal y se transforma en la pared celular de la célula vegetativa germinante.
   b) Corteza: entre la pared de la espora y la capa o cubierta, se sintetiza la corteza, formada por un tipo especial de peptidoglucano de tipo laxo.
   c) Capa o cubierta: está compuesta de una proteína semejante a la queratina que contiene muchos enlaces disulfuros; debido a su impermeabilidad es responsable de la resistencia relativa a los agentes químicos y a los colorantes.
3) Exosporio: es una proteína de la membrana que contiene algo de glúcidos.

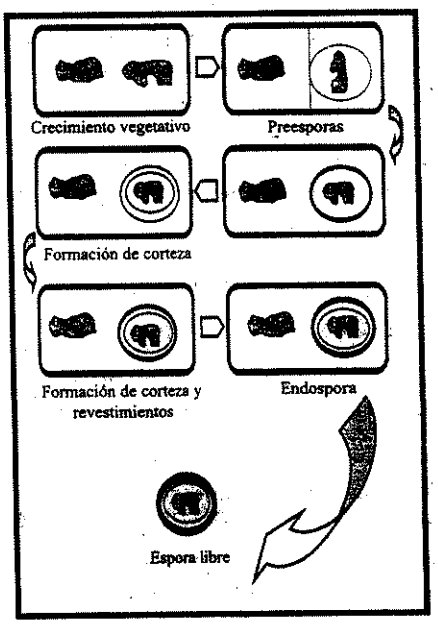


Figura 4-6. Proceso de esporulación.

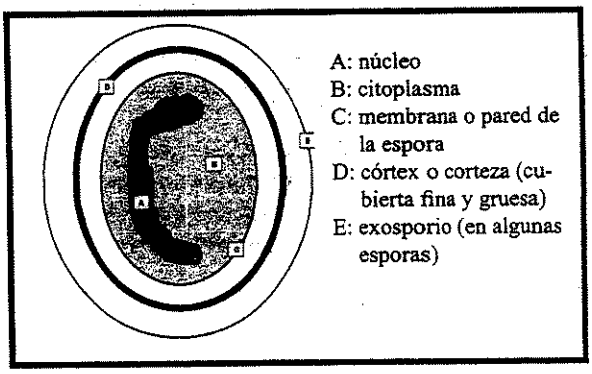


Figura 4-7. Estructura de la espora bacteriana.

Tabla 4-2. Algunas propiedades de los pilis o fimbrias bacterianas

Especie bacteriana	Número típico por célula	Distribución en la superficie celular	Función
Escherichia coli (F o pili sexual)	1-4	Uniforme	Media la transferencia de DNA durante la conjugación.
Escherichia coli (pili común)	100-200	Uniforme	Adherencia a la superficie de células epiteliales del tracto gastrointestinal.
Streptococcus pyogenes (fimbria más la proteína M)	?	Uniforme	Adherencia, resistencia a la fagocitosis, variabilidad antigénica.
Pseudomonas aeruginosa	10-20	Polar	Adherencia a la superficie.

Proceso de germinación

Este proceso consta de tres etapas: la activación, la iniciación y la excreción.

1. Activación: aun cuando sean colocadas en medios ricos, las esporas no germinarán si no es dañada su pared por algún medio (ácido, calor, abrasión, por una lesión mecánica o química de la corteza, o por la acción de una enzima), lo que permite que la célula capte agua y pierda su elevado contenido en Ca dipicolinato.
2. Iniciación: una vez activada iniciará la germinación si las condiciones ambientales son favorables. Se capta agua, se libera el dipicolinato cálcico y varios constituyentes de las esporas son degradados por las enzimas hidrolíticas.
3. Excrecencia: la degradación de la corteza y de las capas exteriores resulta en la aparición de una nueva célula vegetativa que consiste en el protoplasto de la espora con su pared circunvecina.

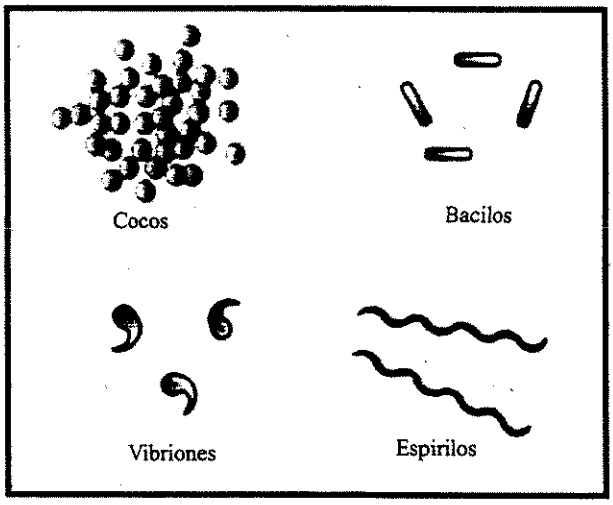


Figura 4-8. Clasificación morfológica de las bacterias.

MORFOLOGIA Y AGRUPACION BACTERIANA

Básicamente las bacterias pueden clasificarse, teniendo en cuenta su morfología (fig. 4-8), en cuatro clases diferentes:

Cocos: son bacterias esféricas que se presentan aisladas o reunidas en diferente disposición. No todos los cocos son perfectamente esféricos, algunos de ellos tienen forma lanceolada, otros presentan una escotadura o son de forma oval. Reunidos de a pares,

Tabla 4-3. Resumen de las partes constitutivas y características de las bacterias

Estructura	Función	Composición química predominante
Flagelo	Movimiento.	Proteína.
Pili	Media la transferencia de DNA durante la conjugación.	Proteína.
Pili sexual		
Pili fimbria	Adhesión a la superficie.	Proteína de protección contra la fagocitosis.
Cápsula	Adhesión a la superficie. Protección contra la fagocitosis, ocasionalmente muerte y digestión. Reserva de nutrientes y protección contra la desecación.	Usualmente polisacárido. Posible polipéptido.
Pared celular		
Grampositivas	Previene la lisis osmótica del protoplasto bacteriano y confiere rigidez y forma a la célula.	Peptidoglucano (mureína) complejo con ácidos teicoicos.
Gramnegativas	Previene la lisis osmótica del protoplasto bacteriano y confiere rigidez y forma a la célula. La membrana externa es una barrera de permeabilidad asociada a un LPS y proteínas con varias funciones.	Peptidoglucano (mureína) rodeado de fosfolípidos y una mebrana externa proteica y lipopolisacarídica.
Membrana plasmática	Barrera de permeabilidad, transporte de solutos, generación de energía, localización de numerosos sistemas enzimáticos.	Fosfolípidos y proteínas.
Ribosomas	Sitio de síntesis proteica.	RNA y proteína.
Inclusiones	Frecuentemente reservas de nutrientes, además de funciones especializadas.	Altamente variable, carbohidratos, lípidos, proteínas o sustancias inorgánicas.
Cromosoma	Material genético de la célula.	DNA.
Plásmido	Material genético extracromosómico.	DNA.

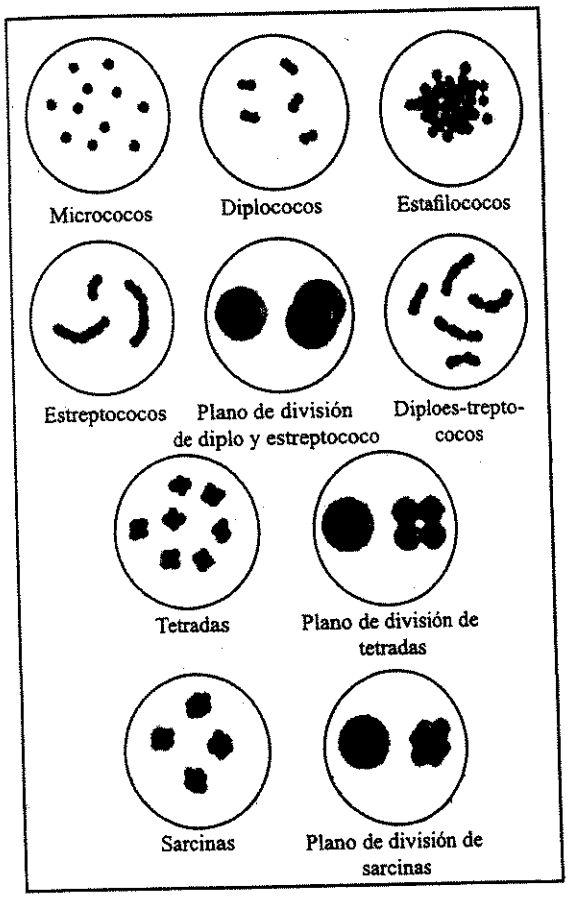


Figura 4-9. Cocos. Morfología y agrupación.

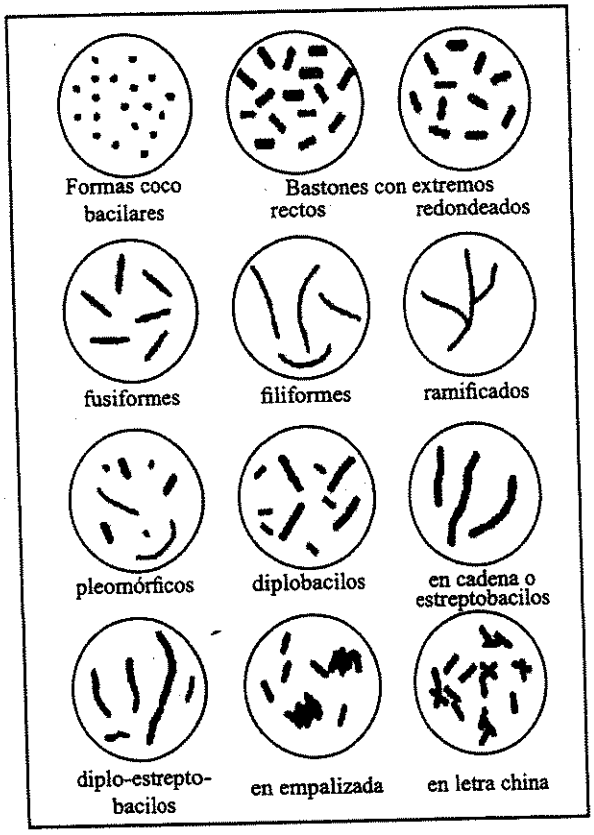


Figura 4-10. Bacilos. Morfología y agrupación.

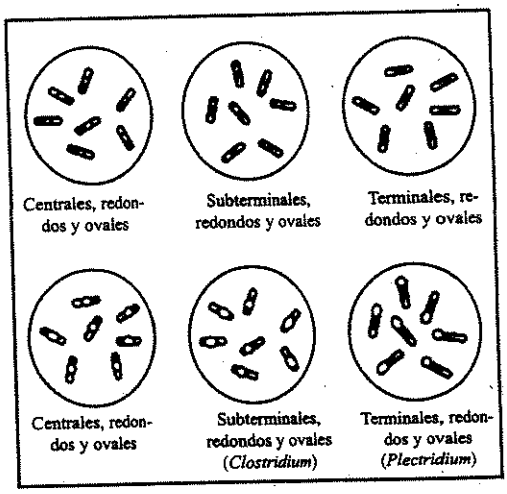


Figura 4-11. Bastones con esporos no deformantes (superiores) y deformantes (inferiores).

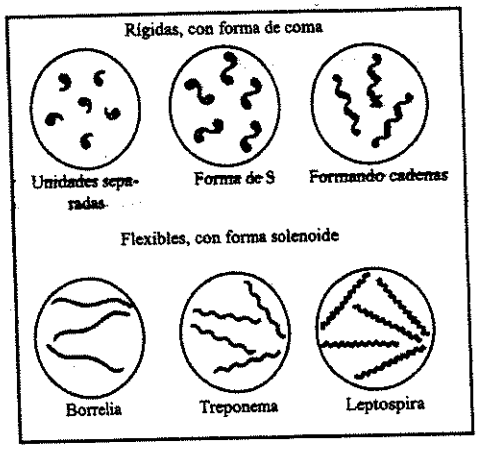


Figura 4-12. Bacterias con morfología curva.

constituyendo los llamados **diplococos**, si forman cadenas de longitud variable (tres o más cocos) se denominan **estreptococos**; si se agrupan irregularmente sobre un solo plano, forman los llamados **estafilococos**; si forman grupos de cuatro elementos se llaman **tetradas** o **tetrágenos**; finalmente, si la agrupación en cuatro elementos la hacen en dos planos (masas cúbicas), a éstas se las denomina **sarcinas**. Esta disposición variada se debe a los diferentes planos en que se efectúa la reproducción (figs. 4-9 a 4-12).

Bacilos: son bacterias en forma de bastón, que pueden presentarse, a semejanza de los cocos, aisladas, reunidas por sus extremos formando los **diplobacilos**, o en cadenas largas de **estreptobacilos**; cuando se agrupan por sus lados pueden formar una estructura semejante a una **empalizada** o dar una imagen similar a **"letras chinas"**. Los extremos pueden ser rectos, redondeados o aguzados.

Vibriones: las bacterias que poseen una morfología semejante a un bacilo pero de forma retorcida sobre su eje longitudinal se denominan vibriones. Normalmente no alcanzan a cumplir una vuelta completa alrededor de su eje.

Espirilos: estos microorganismos, a semejanza de los vibriones, son bacilos retorcidos sobre su eje longitudinal pero cumplen varias vueltas alrededor de su eje (fig. 4-12).

TAMAÑO

Como se mencionó al hablar de citología bacteriana, las bacterias son organismos de pequeño tamaño. Los organismos esféricos miden como promedio 0,8 a 1 μm de diámetro y aquellos de forma de bastón o alargada (bacilos) miden de 1,0 a 1,5 μm de ancho por 2 hasta 8 μm de longitud.

REPRODUCCION ASEXUAL

La mayoría de las bacterias se reproduce por un proceso simple de reproducción asexual denominado fisión binaria. En este proceso cada célula incrementa su tamaño y se divide en dos células iguales. Durante esta reproducción hay un incremento ordenado de las estructuras y componentes celulares, la replicación y segregación del DNA bacteriano y la formación de un septum o pared que atraviesa y divide la célula en dos. La división está evidentemente coordinada por actividades asociadas a la membrana celular. Se cree que la molécula de DNA está unida a un punto de la membrana donde se replica. Las dos moléculas de DNA permanecen unidas al punto de la membrana una al lado de la otra, mientras que un nuevo material de membrana es sintetizado entre ambos puntos. Esto conduce a las dos moléculas de DNA en direcciones opuestas mientras que la nueva pared celular y la membrana van separando los dos cromosomas en compartimientos distintos. Cuando la formación del septum está completa, la célula se separa en dos células hijas. El tiempo requerido para que la célula se divida se llama tiempo de generación. Este tiempo depende de la naturaleza de la bacteria, y puede variar de 15 minutos hasta varios días.

REPRODUCCION SEXUAL

La reproducción sexual de las bacterias será tratada en el capítulo de genética microbiana.

BIBLIOGRAFIA

Davis B, Dulbecco R. Tratado de Microbiología. 3ra. ed. Salvat Editores. Barcelona. 1988.

Jawetz E. Manual de Microbiología Médica. 17° ed., Ed. El Manual Moderno. México, 2002.

Lennette E. Manual de Microbiología Clínica. 4ta. ed., Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires. 1987.

Capítulo 5

CONCEPTOS SOBRE METABOLISMO Y NUTRICION BACTERIANA

Oscar Roberto Linzitto

Se entiende por metabolismo bacteriano el conjunto de reacciones bioquímicas catabólicas y anabólicas que ocurren en una bacteria, destinadas a transformar las sustancias nutritivas para obtener energía, que será utilizada en los componentes estructurales, funcionales y reproductivos. El catabolismo y el anabolismo son procesos interdependientes que interactúan de manera acoplada y sirven para dar origen a todas las reacciones bioquímicas, que se utilizarán en el trabajo celular.

Se denomina anabolismo al conjunto de reacciones de síntesis de compuestos estructurales, como las proteínas de la membrana plasmática, y funcionales, como las enzimas. Por otro lado, el catabolismo es el conjunto de reacciones de degradación de compuestos orgánicos destinados a formar la materia prima para sintetizar otros compuestos y para transformar la energía. Las reacciones químicas que suceden dentro de los organismos pueden ser exorgánicas (con liberación de energía) o endorgánicas (con consumo de energía) y en su conjunto constituyen el metabolismo bacteriano.

FASES DEL METABOLISMO Y PRODUCCION DE LA ENERGIA

En las bacterias, al igual que en otros tipos celulares, la conservación intracelular de energía ocurre principalmente por medio de la síntesis del adenosintrifosfato (ATP), los métodos usados para generar el ATP son en especial la fosforilación del sustrato, la fosforilación oxidativa y la fotofosforilación. Estos procesos implican una serie de reacciones de oxidorreducción, que liberan energía y que se acoplan al trabajo celular. La obtención de los nutrientes y la energía permiten distinguir los diferentes tipos de bacterias.

La función del ATP es suministrar energía al hidrolizarse en ADP y P. Esta energía puede usarse para diferentes actividades de las bacterias. El ATP es un nucleótido compuesto por la adenina (base nitrogenada), un azúcar (ribosa) y tres grupos fosfato.

Una de las fases del metabolismo es el catabolismo, en el que se cambia la energía según las leyes de la termodinámica y las transformaciones son totalmente eficaces. Los procesos en los que se descomponen las moléculas grandes en pequeñas ocurren con los de proteínas, lípidos y carbohidratos que son descompuestos enzimáticamente. El producto de esta descomposición o degradación lo forman las moléculas más simples y pequeñas como, por ejemplo, el ácido láctico, el ácido acético, el dióxido de carbono, el amoníaco y la urea. De estas reacciones químicas de degradación se obtiene la energía química liberada que se conserva temporalmente en las estructuras de estas grandes moléculas. Esta energía se conserva en forma de molécula conocida como ATP, que es de vital importancia en el metabolismo de cualquier organismo vivo.

El anabolismo es la fase del metabolismo durante la cual se sintetizan nuevas moléculas que la bacteria o célula necesita para mantenerse o dividirse: lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos propios (DNA y RNA), que forman parte funcional o estructural del organismo. Estos procesos los lleva a cabo el microorganismo a partir de los constituyentes primarios que se obtienen de los nutrientes. Sin embargo, tales procesos de síntesis requieren de energía y ésta la proporciona el ATP que fue generado durante el catabolismo. Cuando se requiere energía durante el anabolismo, ésta se desprende de los enlaces del ATP liberando unas 8 kcal de energía. Así, el anabolismo y el catabolismo, se realizan simultáneamente y cada uno está regulado en forma precisa, ya que ambos procesos son interdependientes.

ENZIMAS

El metabolismo está altamente regulado y depende del accionar de un conjunto de catalizadores biológicos de naturaleza proteica denominados enzimas, que transforman a los nutrientes orgánicos complementados en algunos casos con sustancias inorgánicas. Las enzimas están constituidas por aminoácidos, con sus correspondientes grupos carboxilo y amino. Son de un tamaño molecular aproximado de 10^4 a 10^6. El accionar de las enzimas es esencial en el metabolismo bacteriano y permite entender diversos procesos, como la fermentación y la respiración bacteriana. Las enzimas tienen la propiedad de reconocimiento de manera específica de sus sustratos. Como base de estas propiedades, obedecen a rutas preprogramadas: como vías biosintéticas (anabolismo) o como vías catabólicas (catabolismo). La actividad de las enzimas se demostró a partir de un extracto libre de células, donde se logró reproducir la fermentación alcohólica. Ellas actúan de manera específica, a través de su sitio activo, produciendo un efecto catalítico sobre las moléculas del sustrato y provocando su ruptura o escisión. Este es un proceso rápido, eficiente y regulado por la aparición del producto final, resultante de la reacción química. La eficiencia de una enzima es extremadamente alta, ellas pueden catalizar la transformación de hasta 10^6 moléculas por minuto. Tienen un alto grado de especificidad de unión a la molécula del sustrato y la convierten en un producto específico. Estos procesos, están regulados por diversos factores como la cantidad del sustrato, el pH, la temperatura, el producto final de la reacción química y la regulación genética del proceso. Algunas enzimas tienen asociadas otras moléculas. La mayoría de las vitaminas son coenzimas. Por ejemplo, la niacina es aun precursor usado en la síntesis de NAD+ y el ácido pantoténico es una parte de la coenzima A. Las vitaminas son cruciales en el catabolismo y son necesarias en pequeñas cantidades.

Actividad enzimática

Las enzimas que llevan a cabo las diferentes reacciones en el metabolismo funcionan en forma secuencial, lo que quiere decir que el producto de una reacción enzimática será a su vez degradado por la siguiente enzima de la cadena de reacciones de alguna vía metabólica, proceso que se conoce como de sistemas multienzimáticos. La complejidad de este sistema es variable; en algunos casos, las enzimas se encuentran en el interior de la célula y las moléculas que van a ser degradadas, en el exterior; y ellos interaccionan libremente. Estos

sistemas funcionan con base en la difusión libre de los productos del metabolismo (metabolitos) en el interior de la bacteria.

Existen sistemas multienzimáticos organizados espacialmente en la membrana celular; esto permite que las reacciones ocurran de una manera organizada, funcionando juntas como una perfecta obra de alta ingeniería. La interacción íntima entre sus componentes facilita la difusión de los metabolitos y, por lo tanto, la velocidad a la que ocurren las reacciones es también muy alta. El metabolismo se presenta asociado a la membrana impermeable, un complejo multienzimático que promueve la síntesis de ATP, luego de lograr que los protones del interior celular sean sacados al exterior de la membrana de la bacteria.

Las enzimas de la membrana componen la cadena respiratoria, utilizan los compuestos provenientes del catabolismo del ciclo de Krebs, que al ceder un electrón y sumado a un protón formará un hidrógeno, éste será transportado al lado exterior de la membrana en donde pierde el electrón y se libera al medio el protón. Luego de varios ciclos similares, se acumularán gran cantidad de protones y se generará una diferencia elevada de éstos, que tenderán a sostener el equilibrio, y la energía liberada permitirá que se sintetice el ATP.

CAMINOS METABOLICOS DE LAS BACTERIAS

Las bacterias en su conjunto disponen de diferentes vías metabólicas para generar su propia energía y los elementos propios para su supervivencia en la naturaleza; éstas son:

- Fermentaciones a través de la vía de Embden-Meyerhof o a través de fosfoquetolasa y vías de Entner-Doudoroff.
- Respiración anaeróbica que usa otra sustancia distinta al O_2 como un aceptor final de electrones de energía.
- Litotrofia: uso de sustancias inorgánicas como fuentes de energía.
- Fotosíntesis anoxigénica: fotofosforilación en la ausencia de O_2.
- Metanogénesis: metabolismo arcaico que usa H_2 como fuente de energía y produce metano.
- Fosforilación no fotosintética mediada por la luz: metabolismo que convierte energía de la luz en energía química.

FOSFORILACION A NIVEL DE SUSTRATO: FERMENTACIONES

La fosforilación a nivel de sustrato está asociada a un proceso metabólico denominado fermentación, durante el cual el sustrato orgánico reducido es catabolizado y a partir de esto se genera el ATP. Esta degradación del sustrato genera cofactores reducidos e intermediarios oxidados que producen un cofactor para el siguiente ciclo. El rendimiento en ATP es bajo en comparación con la respiración aeróbica, el organismo necesita degradar más cantidad de sustrato.

Las fermentaciones se dan en determinados microorganismos anaerobios obligados o anaerobios facultativos (cuando crecen en ausencia de O_2). Hay una gran variedad de fermentaciones microbianas, y cada tipo libera uno o varios productos de fermentación característicos, como lactato, etanol, metanol, succinato, butanol, butirato, acetato, acetona, butilenglicol, formiato y CO_3H_2.

Las células pueden producir fundamentalmente ATP de dos maneras: por fosforilación de sustratos y transporte de electrones por fosforilación. La manera más simple, más antigua, menos evolucionada de hacer ATP es por el nivel de fosforilación de sustratos.

En fermentación láctica por *Lactobacillus*, el sustrato (glucosa) se oxida a piruvato, y éste se reduce a ácido láctico.

En procariotes existen tres vías principales de glucólisis: la clásica vía de Embden-Meyerhof, la vía de la fosfoquetolasa o heteroláctica relacionada con la desviación de hexosa-pentosa; y la vía de Entner-Doudoroff.

Sea una bacteria fermentadora o no, probablemente degraden azúcar a través de una o más de estas vías.

Los microbiólogos de diagnósticos usan los perfiles metabólicos de la fermentación bacteriana para la identificación de bacterias en género y especie o subespecies a través de la fermentación o no de azúcares, o analizando el producto final de un metabolito, y es por ello que se debe comprender la vía de Embden-Meyerhof y el ciclo de tricloroacético (CTA), porque son dos vías metabólicas utilizadas por gran número de organismos.

1. Fermentación homoláctica. El ácido láctico es el único producto del final (*Lactobacillus* y la mayoría de los *Streptococcus*). Las bacterias son usadas para fermentar leches y productos lácteos fermentados.
2. Fermentaciones ácidas mixtas. Principalmente la vías de las Enterobacteriaceae. Los productos finales son una mezcla de lactato, acetato, formato, succinato y etanol.
   2a. Fermentación de butanediol. Forma ácidos mixtos y gases además, 2,3 butanediol de la condensación del 2 piruvato.
3. Las fermentaciones ácidas butíricas, así como la fermentación de la butanol-acetona, son desarrolladas por los clostridios.
   3a. Fermentación de la butanol-acetona. Se descubrieron butanol y acetona como los principales productos finales de la fermentación por el *Clostridium acetobutylicum*.
4. La fermentación ácida propiónica. Esta es una fermentación rara llevada a cabo por bacterias ácidas propiónicas que incluyen corinebacterias, *Propionibacterium* y *Bifidobacterium*.

TRANSPORTE DE ELECTRONES POR FOSFORILACION

La respiración, la fotosíntesis, la litotrofia y posiblemente otros tipos de metabolismo bacteriano requieren que los electrones tomados del sustrato se descarguen en un sistema de transporte de electrón (STE) contenido dentro de una membrana. Los electrones se ceden a un aceptor final en la membrana (como O_2 en la respiración aeróbica), mientras su opuesto a través del STE produce la extrusión de protones y el establecimiento de una fuerza motora de protón (fmp) a través de la membrana. Un componente esencial es la enzima ATPasa unida a la membrana, donde utiliza la fmp y genera ATP.

RESPIRACION: FOSFORILACION OXIDATIVA

La respiración es la obtención de energía por oxidación de sustratos orgánicos en bacterias quimiorganotrofas o de compuestos inorgánicos en bacterias quimiolitótrofas, donde las coenzimas reducidas (por ej., NADH) transfieren los electrones a un aceptor final oxidado, no directamente (como en la fermentación), sino a través de una cadena transportadora de electrones. Si el aceptor final es el O_2, se denomina respiración aeróbica, y si es distinto del oxígeno, se llama respiración anaeróbica. Es decir, cuando un compuesto orgánico utiliza el CTA para la oxidación del sustrato y el resultado final es la formación de dióxido de carbono,

asociados a la membrana celular y la cadena transportadora de electrones relacionada con un aceptor final de electrones. En su pasaje por la cadena transportadora, los electrones generan liberación de energía para la síntesis de ATP por el mecanismo de fosforilación por transporte de electrones, que a su vez induce una fuerza movilizadora de protones a través de la membrana, donde el aceptor final es el O_2, finalmente reducido a H_2O.

Aprovechando todos estos procesos la enzima ATPasa utiliza la fuerza movilizadora de protones para sintetizar ATP. Un sustrato como la glucosa es oxidado completamente a CO_2 por vías combinadas de glucólisis y CTA. Los electrones provenientes de la glucosa, removidos por el NAD y transportados por el STE, cruzan la membrana y reducen el O_2, y se conforma una fuerza motora de protones que es usada por la ATPasa para generar el ATP, por el mecanismo de la fosforilación oxidativa.

ESQUEMA Y BALANCE DE LA FOSFORILACION OXIDATIVA

El mecanismo de la fosforilación oxidativa se explica sobre la base de la teoría quimiosmótica de Mitchell, según la cual una serie de moléculas transportadoras situadas en la membrana citoplásmica de las bacterias sufren oxidaciones y reducciones reversibles, y los principales tipos de componentes de las cadenas transportadoras de electrones (como flavoproteínas, proteínas no hémicas, quinonas, ubiquinonas, menaquinonas, citocromos) intervienen en estos procesos. Constituyen un transporte en el que los electrones ingresan a la célula y los protones salen de ella, siendo la membrana impermeable al reingreso de éstos.

CADENAS DE ELECTRONES RAMIFICADAS

Muchas cadenas respiratorias aerobias muestran ramificaciones alternativas, sobre todo a nivel de los citocromos terminales. El papel principal de estas ramificaciones es lograr flexibilidad en la ruta de transferencia de electrones, de manera que se obtengan rendimientos máximos en ciertos sustratos y condiciones de crecimiento para minimizar los efectos nocivos de otros.

MECANISMO DE LA ATP-SINTASA DEPENDIENTE DE PROTONES

Las ATP-asas de membrana pueden funcionar también en sentido inverso al de síntesis, es decir, como ATP-hidrolasas: se produce hidrólisis de ATP y extrusión de protones al exterior. Por lo tanto, en este sentido de funcionamiento, se genera un gradiente de protones a expensas de gasto de ATP intracelular. Esto muestra una vez más que el ATP y el gradiente de protones se pueden considerar como formas diferentes e interconvertibles de energía celular.

Las ATP-asas productoras de gradientes de protones existen en bacterias no respiratorias, que carecen de cadenas transportadoras de electrones, como las bacterias anaerobias del ácido láctico, que obtienen su ATP por fosforilación a nivel de sustrato, en sus procesos de fermentación y, a su vez, parte del ATP lo convierten, por las ATP-asas hidrolíticas, en una fuerza protón-motriz que se usa para transporte de nutrientes y para alimentar al motor flagelar.

RESPIRACIONES ANAEROBICAS

Como ya hemos dicho, en algunas bacterias, al final de la STE puede existir un aceptor diferente del oxígeno (respiración anaerobia). Los aceptores y sus respectivos productos reducidos son nitratos, sulfatos, fumarato, succinato, CO_2 o CH_4, Fe_3^+ o Fe_2^+; con estos aceptores se obtiene menos energía. El uso de nitratos, sulfatos y CO_2 como aceptores finales de electrones (y no como material a incorporar al metabolismo plástico) se denomina metabolismo desasimilativo, para distinguirlo del asimilativo. El producto reducido se excreta al ambiente de la bacteria.

El uso desasimilativo de nitrato se llama desnitrificación, y ocurre por medio de una serie de fases donde el N va cambiando su estado de oxidación:

NO_3- a NO_2- (nitrito), NO (óxido nítrico) o N_2O (óxido nitroso) o N_2 (dinitrógeno).

Hasta la llegada de las actividades industriales humanas, todo el dinitrógeno de la atmósfera procedía de estos procesos desnitrificantes.

El uso de sulfato como aceptor de electrones sólo lo hacen las bacterias sulfatorreductoras, por una ruta especial en la que el sulfato primero tiene que activarse con ATP (formando la adenosina-fosfo-sulfato, APS). La mayoría son quimiorganotrofos, pero algunos pueden usar H_2 donador de electrones (quimiolitotrofos).

Las arqueobacterias metanogénicas son los únicos seres vivos capaces de obtener energía acoplando la oxidación del hidrógeno molecular con el uso de CO_2 como aceptor de electrones (actuando en estas condiciones como quimiolitotrofos).

Tipos de quimiorganotrofos

La obtención de energía por fosforilación oxidativa a partir de donadores *inorgánicos* de electrones sólo ha evolucionado en ciertos grupos de procariotas. Cada grupo fisiológico usa un tipo de donador inorgánico: bacterias de hidrógeno, bacterias de hierro, bacterias del azufre, bacterias desnitrificantes de dos tipo nitrosas y nítricas. El mecanismo para generar el ATP es similar al de quimiorganotrofas respiradoras. Los electrones extraídos del donador exógeno (en este caso, inorgánico) pasan a una cadena transportadora de electrones hasta un aceptor final, que suele ser el oxígeno.

Quimiotrofos dependientes

Los organismos quimiotrofos dependen de los fotótrofos, de manera directa o indirecta, al tomar complejas moléculas orgánicas; ellos puedan oxidarlas y generar energía a partir de ellas. La energía es generada por fosforilación a nivel del sustrato o por fosforilación a nivel del transporte de electrones.

Quimiotrofos independientes

Recientes investigaciones revelan la presencia de microorganismos que viven en la profundidades de los mares y océanos, en áreas de erupción de lava, donde se forman vientos hidrotermales. Los microorganismos que viven en dichas zonas no dependen de plantas o de la energía lumínica del sol, generan su energía por oxidación y reducción química en los respiraderos del fondo del mar y fabrican su material celular a partir CO_2 por los mismos mecanismos usados por organismos fotótrofos.

BACTERIAS FOTOSINTETICAS

Son las bacterias que utilizan la luz como fuente de energía. Estas desempeñan un papel fundamental en la naturaleza, son responsables de la producción de materia orgánica en los lagos y de importancia en la cadena biológica. Estos organismos son muy

antiguos y están relacionados con las primeras células fotosintéticas que existieron en la Tierra, entre las que se pueden citar las algas verdeazules y las bacterias fotosintéticas verdes y púrpuras.

Las algas verdeazules se pueden encontrar en la tierra, los ríos, los lagos y los océanos. Estos organismos pueden vivir utilizando dióxido de carbono como única fuente de carbono y algunos fijan el nitrógeno atmosférico.

Las bacterias fotosintéticas verdes que producen azufre (sulfurosas) habitan en ambientes desprovistos de oxígeno, en el fondo de algunos lagos, y les dan un color verde característico a estas aguas.

Las bacterias púrpuras sulfurosas se encuentran en algunos lagos y en manantiales de aguas termales sulfurosas, habitan en ambientes carentes de oxígeno y utilizan azufre en su metabolismo.

Las bacterias púrpuras no sulfurosas utilizan la luz en ausencia de oxígeno, pero pueden utilizar oxígeno durante los períodos de oscuridad. Tienen en su interior una compleja organización de moléculas conocidas como pigmentos antena o cromatoforos que captan la luz solar y conservan la energía en forma de energía química.

La capacidad de llevar a cabo el proceso de fotosíntesis se encuentra en una gran variedad de organismos, como algunas bacterias, plantas y algas.

FOTOFOSFORILACION

Los organismos fotosintéticos usan energía de la luz para convertir el CO_2 en material celular, la fotosíntesis oxigénica y la anoxigénica. Pueden coexistir ambos mecanismos de obtención de energía a partir de la luz visible en procesos de fotofosforilación cíclica y acíclica. En la fotofosforilación cíclica no hay aporte externo de un agente reductor o agente oxidante, la energía fotónica es transformada en un gradiente de protones, que genera ATP, no se originan equivalentes de reducción (NADPH), y, por lo tanto, no hay asimilación de dióxido de carbono. En la fotofosforilación acíclica, un donador exógeno de electrones permitirá, por acción de la luz, que se produzcan equivalentes de reducción (NADPH o NADH) que se usarán para la reducción de CO_2 hasta materia orgánica produciendo un gradiente de protones, convertible en ATP.

COMPONENTES DEL APARATO FOTOSINTETICO

El aparato fotosintético está constituido por el complejo capturante de energía fototónica en la bacterioclorofila y a través de la cadena transportadora de electrones que generan energía útil. Las bacterioclorofilas son tetrapirroles cíclicos quelados con Mg^{++} que forman parte tanto de los pigmentos antena como de los centros de reacción. Al excitarse con la luz, se oxida y puede ceder electrones. Los carotenoides forman parte del complejo antena. Sus funciones son captar la luz y proteger de los efectos nocivos de ésta. En las oxifotobacterias, las ficobiliproteínas están organizadas en las denominadas ficobilisomas. Las principales ficobiliproteínas son la ficocianina, la ficoeritrina y la aloficocianina; constituyen el complejo antena en las cianobacterias, las feofitinas y las bacteriofeofitinas. Son similares a las respectivas bacterioclorofilas, excepto que no están queladas con Mg^{++}. Quinonas especiales complejadas con Fe.

FUNCIONAMIENTO DE UN FOTOSISTEMA

El complejo antena es un conjunto de pigmentos (desde unos 50 hasta miles) captadores de fotones que transfieren energía de unos a otros, en un flujo de excitones en dirección al centro de reacción, en un proceso conocido como resonancia inductiva. El centro de reacción tiene cuatro bacterioclorofilas, dos de ellas asociadas con proteínas del centro de reacción, dos bacteriofeofitinas, dos ubiquinonas y un Fe, que constituye el complejo Q.Fe. El fotón llega a una bacterioclorofila, se excita, el electrón es captado por la biofitina que a su vez lo cede a la quinona más cercana y ésta lo transfiere a otra quinona ubicada por fuera del sistema de reacción. El electrón pasa a la cadena transportadora de electrones, y provoca una translocación de protones fuera de la membrana, activa la ATP-asa y origina la producción de ATP, con lo cual da lugar a la fotofosforilación.

NUTRICION BACTERIANA

INTRODUCCION

Las bacterias, al igual que otros seres vivos, requieren del medio ambiente elementos nutricionales, con la finalidad de obtener energía para la biosíntesis y el funcionamiento celular. Los elementos químicos del ambiente que son utilizados para el crecimiento bacteriano se denominan nutrientes o requerimientos nutricionales. Las fuentes de los requerimientos nutricionales definen el perfil del microorganismo en la naturaleza. La mayoría de las bacterias pueden sintetizar sus complejas moléculas a partir de minerales básicos, pero otras requieren de moléculas orgánicas elaboradas como vitaminas, compuestos orgánicos como aminoácidos, ácidos grasos, ácidos nucleicos y carbohidratos. Los elementos nutritivos se pueden clasificar de diversas maneras, de acuerdo con las necesidades nutricionales de los microorganismos. Se pueden encontrar en forma de soluciones, gases, iones inorgánicos, pequeñas moléculas y macromoléculas. Ellos se utilizarán para fines estructurales y funcionales en la célula bacteriana.

REQUERIMIENTOS Y FACTORES NUTRICIONALES DE LA CELULA BACTERIANA

Los microorganismos requieren para su desarrollo y actividad celular de una serie de elementos básicos, que a continuación se enumeran:

Fuente de energía: puede ser la luz solar o artificial, o sustancias inorgánicas, como el azufre, el monóxido de carbono, el amonio o sustancias provenientes de la materia orgánica, como los hidratos de carbono, las proteínas y los lípidos. Según los requerimientos energéticos, las bacterias se clasifican en:

1. ***Fototrofas:*** organismos que usan la energía radiante como fuente energética. Cuando la energía es obtenida por radiaciones fotónicas y el aceptor de la energía es una sustancia inorgánica, se denominan bacterias fotolitotrofas, y cuando el aceptor es una sustancia orgánica, quimiofototrofas.
2. ***Litotrofas:*** cuando el microorganismo utiliza compuestos inorgánicos simples. Se desconoce el número total de microbios que son capaces de usar sustancias inorgánicas, como fuente de energía y son denominadas literalmente "comedoras de rocas". El hábitat común de las bacterias litotróficas incluye los volcanes, los respiraderos en las profundidades de los océanos, la atmósfera, las minas, el agua de mar, el agua fresca, las

aguas residuales, básicamente en todos los lugares. La energía producida por bacterias litrotróficas es baja en relación con el sustrato oxidado, se necesita gran cantidad de sustrato para ser metabolizado y cubrir las necesidades energéticas de los microorganismos. Los organismos litotróficos tienen gran importancia e impacto en el movimiento cíclico del nitrógeno, el azufre y el carbono a través de la biosfera.

- **Autotrofas:** usan el carbono como única fuente en forma de CO_2. Las bacterias autotróficas no son dependientes de compuestos orgánicos preformados como fuente de carbono. Estas bacterias sintetizan glucosa a partir de una fuente inorgánica de carbono y oxígeno (dióxido de carbono) y una fuente de hidrógeno (agua, gas sulfhídrico, hidrógeno); sobre la base de estos compuestos producen todas las moléculas necesarias para crecer, vivir y reproducirse.
- **Heterotrofas:** son organismos que usan el carbono, a partir de compuestos orgánicos. Las bacterias heterótrofas, también denominadas quimiorganotróficas, requieren la presencia de una fuente de carbono orgánica preformada en su medio de cultivo, como sustrato oxidable para la producción de energía en forma de ATP, para su posterior utilización en la síntesis de sus componentes estructurales y funcionales. La glucosa es la fuente de carbono más común, a partir de la cual otros compuestos orgánicos pueden ser sintetizados. Otros azúcares como galactosa, manitol, lactosa, rafinosa, aminoácidos y lípidos también pueden ser utilizados como fuente primaria o alternativa de carbono. La gran mayoría de las bacterias heterotróficas viven como saprófitas. Los heterotrofos, aunque no usan el CO_2 como fuente de C ni como aceptor de electrones, necesitan pequeñas cantidades para las carboxilaciones en determinadas rutas anabólicas y catabólicas.
- **Mixotrofas:** son aquellas bacterias cuyo metabolismo energético es litotrofo, pero requieren sustancias orgánicas como nutrientes para su metabolismo biosintético. La interrelación entre organismos autotróficos y heterotróficos crea los diferentes ciclos de la materia, que son de gran importancia para la conservación de la vida en la Tierra.

Nitrógeno: obtenido del gas nitrógeno, urea, amonio, nitratos, nitritos o sustancias nitrogenadas como proteínas o ácidos nucleicos. Representa el 14% del peso seco del organismo, es constituyente de coenzimas, nucleótidos, aminoácidos y ácidos nucleicos. Los mecanismos de obtención de nitrógeno del medio son la asimilación, fijación o reducción, a través de un ciclo por el cual compuestos orgánicos e inorgánicos de nitrógeno son utilizados metabólicamente y reciclados entre bacterias, plantas y animales. Procesos de amonificación, mineralización, nitrificación, denitrificación y fijación del nitrógeno son realizados primariamente por las bacterias. El nitrógeno es asimilado por las plantas bajo la forma de nitrato o amoníaco, o bien por otros organismos bajo la forma de aminoácidos. El nitrógeno inorgánico puede ser utilizado en forma de nitrato; la mayoría de las bacterias lo reducen por acción de las enzimas nitratorreductasas a nitritos y éstos por las nitritorreductasas a compuestos de amonio, que constituirán parte de los aminoácidos. Los organismos superiores utilizan las proteínas vegetales como nutrientes y las devuelven al medio en desechos amoniacales; éstos son transformados por determinado tipo de bacterias, que a su vez sintetizan nitratos a partir del amoníaco, que son utilizados por la plantas.

Carbono: utilizado en forma de monóxido o dióxido de carbono, metano o compuestos de material orgánico, para fuente de energía. El carbono representa el 50% del peso seco de los microorganismos y constituye gran parte de los componentes celulares. El anhídrido carbónico (CO_2) es requerido por todo tipo de bacterias: las autótrofas lo requieren como fuente de carbono; las heterótrofas, aunque no usan el CO_2 como fuente de C ni como aceptor de electrones, necesitan pequeñas cantidades para las carboxilaciones en determinadas rutas anabólicas y catabólicas.

Oxígeno: todas las células usan el oxígeno en una forma encubierta o no y muchas requieren oxígeno gaseoso. Para determinado grupo de microorganismos, el oxígeno libre puede ser mortal. Representa el 20% del peso en seco microbiano, su fuente de obtención es el agua, los compuestos orgánicos, el dióxido de carbono y el O_2 ambiental. Es parte constituyente del material celular del agua intracelular y es el aceptor de electrones en la respiración aeróbica. Sobre la base de la utilización del oxígeno, las bacterias se pueden clasificar en varios tipos.

- **Aerobios obligados:** requieren oxígeno para el desarrollo y el metabolismo.
- **Anaerobios obligados:** crecen en total ausencia de oxígeno.
- **Anaerobios facultativos:** se desarrollan en presencia o ausencia de oxígeno. Utilizan el oxígeno como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria; en ausencia de aquél obtienen la energía por fermentación o respiración anaerobia.
- **Anaerobios aerotolerantes:** crecen en presencia o ausencia de oxígeno, pero obtienen energía por fermentación.
- **Microaerófilos:** se desarrollan con bajas tensiones de oxígeno. Obtienen energía por metabolismo aeróbico o anaeróbico.
- **Capnoicos**: crecen con una mayor tensión entre 5 y 10% de CO_2.

Fósforo: constituye el 3% del peso en seco, requiere de fuentes de fosfatos orgánicos e inorgánicos y forma parte constituyente de los ácidos nucleicos, las proteínas, los fosfolípidos, los lipopolisacáridos, el ácido teicoico y las coenzimas. Las bacterias pueden usar los fosfatos orgánicos a través de las enzimas fosfatasas, sin depender exclusivamente de ellos, y pueden utilizar igualmente los fosfatos inorgánicos. Los fosfatos orgánicos son degradados por fosfatasas extracelulares o periplásmicas.

Azufre: representa el 1% del peso en seco, se obtiene del SO_4, H_2S, S, azufre de compuestos orgánicos (aminoácidos azufrados) y forma parte constitutiva de la cisteína, la metionina, la glutatión y numerosas coenzimas. Tiene un papel muy importante en la estructura terciaria de las proteínas.

Magnesio: representa aproximadamente el 0,5% del peso en seco del microorganismo, se obtiene de sales y constituye un catión celular inorgánico y cofactor de ciertas reacciones enzimáticas. El ion magnesio (Mg^{++}) estabiliza los ribosomas, las membranas y los ácidos nucleicos; actúa como cofactor en muchas reacciones bioquímicas.

Potasio: representa el 1% del peso seco, se obtiene de sales de potasio y su función celular consiste en ser catión inorgánico y cofactor de ciertas enzimas, activando las que intervienen en la síntesis de proteínas, asociado al ácido teicoico de la pared celular de las bacterias grampositivas.

Calcio: muchos microorganismos requieren calcio en cantidades importantes y otros en pequeñas trazas. Aproxima-

damente el 0,5% del peso en seco del organismo se obtiene de sales de calcio y cumple funciones como catión celular inorgánico, cofactor de ciertas enzimas y constituyente de las endosporas. En bacterias fotosintéticas, el Ca^{++} es un cofactor de ciertas enzimas, como las proteinasas.

Agua: las bacterias requieren importante cantidad de agua. Es el principal componente del protoplasto bacteriano; el medio donde suceden las reacciones químicas y el producto resultante de algunas de ellas. La disponibilidad de agua se mide por un parámetro denominado.

- **Actividad de agua o potencial de agua**, indicativo del agua libre que se expresa como $a_w = P_s/P_w$ donde P_s es la presión parcial de vapor de agua en la solución problema y P_w es la presión parcial de vapor del agua destilada. Si deseamos conocer la actividad de agua en un líquido determinado, se mide en primer lugar la humedad relativa que hay por encima del líquido problema y se aplica la fórmula precitada. En un caso hipotético $P_s = 90$, se aplica la fórmula $a_w = 90/100 = 0,90$.
  Las bacterias tienen valores de a_w normalmente entre 0,90 y 0,99. Las bacterias xerófilas son capaces de vivir a a_w muy bajos (en torno a 0,75).
  La fuente del agua puede ser exógena, de gran importancia, que se difunde a través de la membrana, o endógena, producto de las reacciones de oxidorreducción. El agua es un solvente en el cual las moléculas son disueltas y la capacidad del agua es un factor crítico que afecta el crecimiento celular. Depende de su presencia en la atmósfera (humedad relativa), en solución o sustancia.
  El poder de actividad del agua es afectado por la presencia de solutos como las sales o azúcares, que son disueltos en el agua. La alta concentración del soluto de una sustancia baja la actividad del agua y viceversa. Los microorganismos viven en un rango de a_w de 1,0 a 0,7.

Cloruro de sodio (NaCl): es el soluto más común en la naturaleza a una variada concentración. Los microorganismos que tienen afinidad al NaCl se denominan **halófilos.**

- **Halófilos moderados:** requieren 1-6% de NaCl.
- **Halófilos extremos:** requieren entre 15-30% de NaCl.
- **Halotolerantes:** son las bacterias capaces de crecer con mínima a moderada concentración de NaCl.
- **Xerófilos:** son los organismos que viven en ambientes secos.

Hierro: se obtiene de sales de hierro y forma parte de los citocromos en procesos de respiración y de ciertas proteínas no hemáticas, y como cofactor para algunas reacciones enzimáticas, es utilizado como ion ferroso (Fe^{++}) en sales insolubles. Forma parte de los magnetosomas de ciertas bacterias que lo utilizan para orientarse. En otras bacterias se encuentra en estructuras denominadas sideróforos.

Manganeso: es cofactor de ciertas enzimas, y a veces puede sustituir al Mg^{++}.

Cobalto: se requiere casi exclusivamente para la vitamina B_{12} (de hecho, si se suministra esta vitamina al medio, la bacteria se vuelve independiente del Co^{++} libre).

Cinc: interviene en la estabilización de complejos enzimáticos como las DNA y RNA polimerasas.

Molibdeno: participa en las llamadas molibdoflavoproteínas, implicadas en la asimilación de nitratos.

Se debe recordar que muchos de estos elementos son fundamentales en las reacciones enzimáticas celulares como cofactores. Como el Mn, Co, Zn, Cu, y Mo.

FACTORES DE CRECIMIENTO

Hay bacterias que requieren para crecer pequeñas cantidades de ciertos compuestos orgánicos elementales que son incapaces de sintetizar a partir de variados nutrientes. Estos componentes se denominan factores de crecimiento y juegan un rol específico en la biosíntesis celular. La falta de estos factores de crecimiento puede producir un bloqueo o desaparición de caminos metabólicos que imposibilita el crecimiento celular. Estos factores se categorizan en tres tipos:

Aminoácidos: constituyentes elementales para la síntesis de proteínas.

Bases púricas y pirimídicas: requeridas para la síntesis de ácidos nucleicos (DNA y RNA).

Vitaminas: necesarias como coenzimas y como grupo funcional de ciertas enzimas.

Otros tipos de bacterias no requieren un factor de crecimiento, porque a través de su fuente de carbono y energía sintetizan todos los elementos esenciales como aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas, por su propio metabolismo. Algunas bacterias (por ej., *Lactobacillus*) requieren purinas, pirimidinas, vitaminas y numerosos aminoácidos. Estos compuestos deben ser agregados

Tabla 5-1. Tipo nutricional, fuente de energía y carbono

Tipo nutricional	Fuente de energía	Fuente de carbono	Ejemplos
Fotoautotrofas	Luz	CO_2	Algunas algas y bacterias fotosintéticas (cianobacterias).
Fotoheterotrofas	Luz	Compuestos orgánicos	Algunas bacterias fotosintéticas y algas.
Quimioautotrofas o Litotrofas	Química	Compuestos inorgánicos: H_2, NH_3, NO_2, H_2S, CO_2	Unas pocas *Bacterias* y muchas *Archaea*.
Quimioheterotrofas o Heterotrofas	Química	Compuestos orgánicos	Compuestos orgánicos. La mayor parte de *Bacterias*, algunas *Archaea*, Hongos, Protozoos, etc.

en el medio de cultivo utilizado para su crecimiento. Los factores de crecimiento no son metabolizados directamente como fuente de carbón o energía, sino que son asimilados por las bacterias para su papel específico en el metabolismo. En relación con los factores de crecimiento se pueden distinguir dos tipos de microorganismos:

Protótrofos: microorganismos que sintetizan sus propios factores de crecimiento.

Auxótrofos: microorganismos que requieren una fuente exógena de factores de crecimiento debido a su incapacidad para elaborarlos.

BIBLIOGRAFIA

Metabolismo

Anraku Y. Bacterial electron transport chains. Ann Rev Biochem. 1988; 57: 101-132.

Baarber J. Photosynthetic reaction centres: a common link. Trends Biochem Sci. 1987; 12: 321-326.

Harder W, Dijkhuisen L. Physiological responses to nutrient limitation. Ann Rev Microbiol. 1983; 37: 1-23.

Herrero A, Flores E. Las cianobacterias: fotosíntesis y fijación de nitrógeno. En "Microbiología 1990", 1990; p. 112-121. Universidad de Sevilla.

Hooper AB, Dispirito AA. In bacteria which grow on simple reductants, generation of a proton gradient involves extracytoplasmic oxidation of substrate. Microbiol Rev. 1985; 49: 140-157.

Lessie TG, Phibbs PV Jr. Alternative pathways of carbohydrate utilization in Pseudomonads. Ann Rev Microbiol. 1984; 38: 359-387.

Neidhart FC, Ingraham JL, Schaechter M. Physiology of the bacterial cell: a molecular approach. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. cap. 5. 1990.

Nelson N, Taiz L. The evolution of H+-ATPases. Trends Biochem Sci. 1989; 14: 113-116.

Poole RK, Ingledew WJ. Pathways of electrons to oxygen. En: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology (F.C. Neidhart, ed.). American Society for Microbiology. Washington, D.C. 1987, p. 170-200.

Rees DC, Komiya H, Yeates TO, Allen JP, Feher G. The bacterial photosynthetic reaction center as a model for membrane proteins. Ann Rev Biochem. 1989; 58: 607-633.

van Verseveld HW, Bosma G. The respiratory chain and energy conservation in the mitochondrion-like bacterium *Paracoccus denitrificans*. Microbiological Sci. 1987; 4: 329-333.

Youvan DC, Marss BL. Mecanismo molecular de la fotosíntesis. Inv. y Ciencia 1987; 131 (agosto): 34-41.

Nutrición bacteriana

Bastarrechea F, Servin-Gonzales L, Covarrubias AA. Regulación de la asimilación de compuestos nitrogenados en *Escherichia coli*: Bioquímica y Biología Molecular. Salvat, Barcelona, 1986.

Campbell WH, Kinghorn JR. Functional domains of assimilatory nitrate reductases and nitrite reductases, Trends Biochem. Sci. 1990, 15:315-319.

Fischer HM. Genetic regulation of nitrogen fixationin bacteria. Microbiological Reviews. 1994, 58: 352-386.

Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock Biología de los Microorganismos. 10° Edición. Ed. Prentice Hall. Madrid, 2003.

Prescott MT, Harley JP, Klein. Microbiología. 4ta. edición. McGraw-Hill Interamericana, 1999.

Pumarola A, Rodríguez Torres A, García Rodríguez JA, Piédrola G. Microbiología y Parasitología Médica, 2ª Edic. Edit. Salvat. Barcelona. 1987.

Schlegel HG, Bowien B. (Eds). Autotrophic Bacteria. Science-Tech Publishers. Madison WI. 1989.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Introducción a la Microbiología. Traducción autorizada de la 3ra. edición. Ed. Acribia. S.A. Zaragoza. 1993.

Capítulo 6

MATERIAL DE LABORATORIO MICROBIOLOGICO

Nestor Oscar Stanchi

El material de uso corriente en el laboratorio implica un número muy grande de elementos, sin embargo, bajo los aspectos generales de la microbiología, que son netamente prácticos, se mencionarán aquellos más frecuentes. Los materiales resaltados en **negrita** son indispensables en el laboratorio microbiológico.

Material de vidrio

- **Tubo de hemólisis**: son cortos y finos, se utilizan sobre todo en algunas pruebas serológicas y para medio de cultivo de tipificación bacteriana como BAM y Kligler. Cantidad mínima para un laboratorio que se inicia: 100.

- **Tubo de ensayo**: el más usado es de 16 cm x 18 mm de diámetro, aunque existen de varios tamaños y pueden poseer reborde; deben ser fabricados con vidrio de buena calidad, neutro, transparente e incoloro, no opacificable con los continuos lavados. Se destinan a la contención de los distintos tipos de medios de cultivo. Cantidad mínima para un laboratorio que se inicia: 100.

- **Tubo de centrífuga**: miden 10 cm x 10 mm, pueden tener fondo redondo o cónico y se emplean para decantar suspensiones. Cantidad mínima para un laboratorio que se inicia: 20.

- Campana de Durham: son pequeños tubos que se utilizan en las pruebas bioquímicas de identificación bacteriana, específicamente en la prueba del ataque a la glucosa; la campana se coloca en posición invertida dentro del medio líquido sin burbujas de aire y el gas producido se recolecta en su interior.

- **Portaobjetos**: láminas de vidrio rectangulares de bordes biselados, de 76 x 25 x 1 mm; deben ser totalmente transparentes y libres de rayaduras que retengan colorante e induzcan a error. Cantidad mínima para un laboratorio que se inicia: 100.

- **Cubreobjetos**: láminas delgadas de vidrio con medidas que oscilan entre 15 y 22 mm de lado y 0,17 y 0,20 mm de espesor. Cantidad mínima para un laboratorio que se inicia: 2 cajas.

- **Placa de Petri**: recipientes circulares compuestos por dos tapas de diferente tamaño, con 6, 8 o 10 cm de diámetro y 15 o 20 mm de altura; se las emplea para cultivos. Comercialmente se encuentran también placas de plástico descartables. Cantidad mínima para un laboratorio que se inicia: 60 (8 a 10 cm de diámetro).

- **Erlenmeyer**: recipiente de paredes finas, base plana, cuerpo cónico y cuello cilíndrico corto; empleado para preparar y/o contener medios de cultivo o líquidos en general. Cantidad mínima para un laboratorio que se inicia: 1 de 1 litro y 2 de 500 ml.

- **Pipetas**: existen varias clases:
  - aforadas: sólo poseen uno o dos enrases y carecen de graduaciones intermedias; miden volumen total. Prácticamente no se usan más.
  - **graduadas**: tienen una escala graduada numerada que indica el volumen contenido; pueden ser de enrase simple o doble. Para el laboratorio de bacteriología, con enrase simple son más prácticas. Si se desea medir con precisión, las de doble enrase son más exactas. Cantidad mínima para un laboratorio que se inicia: 10 de 1 ml, 10 de 5 ml y 10 de 10 ml.
  - Pasteur: se forma por calentamiento y estiramiento de un tubo de vidrio ablandado a la llama; tiene de 4 a 8 mm en su parte tubular, que al estirarse se torna capilar; por no tener graduación se usan para siembras o medición de pH.
  - de bola: llamadas así por poseer entre los tercios superior y medio una dilatación que permite trasvasar mayor volumen de líquidos.
  - **automática**: instrumento de precisión para transferencia de líquidos en volúmenes que van desde 1 µl a 10 ml; se asemejan a una jeringa con un tubo capilar, generalmente de plástico de diferente capacidad e intercambiable, y con sistemas de desplazamiento de fluidos variable (aire o con émbolo); el dispensador puede ser de canal único o múltiple. Son útiles para sembrar pequeños volúmenes, especialmente para laboratorios que realizan serología. Inconveniente: son caras. Cantidad mínima para un laboratorio que se inicia: no son indispensables, pero de acuerdo con el presupuesto son más prácticas las de volumen variable que las fijas, aunque más caras. Se recomendaría una de 50-200 µl y otra de 10 µl.

- **Propipeta:** es una pera de goma que contiene válvulas que permiten el llenado y vaciado de pipetas de vidrio sin necesidad de aspirar mediante la boca (indispensables para la bioseguridad en el laboratorio). También hay peras de goma sin válvulas. Cantidad mínima para un laboratorio que se inicia: 2. No son muy caras y evitan las infecciones adquiridas en el laboratorio.

- Varilla de vidrio: son varillas macizas y se utilizan para homogeneizar medios de cultivo, suspensiones, etc.

- Espátula de Drigalsky: se obtiene calentando el extremo de una varilla o pipeta Pasteur y acodándola en forma triangular; se la utiliza para siembra en superficies extensas de medios de cultivo.

Instrumental

- Membranas filtrantes: constituidas por derivados de celulosa (nitrato y acetato) o poliamida de Nylon 66, son de alta calidad y de estructura regular; actúan por verdadero efecto tamiz, ya que separan las partículas si éstas son mayores que los poros de la membrana. Según su constitución resisten o no la acción de ciertos elementos (solventes) y en el comercio se encuentran marcas como Sartorius, Millipore, Ultipor, Pall Co., etc.

- Portafiltros: son soportes encargados de contener los filtros para su uso; pueden ser metálicos o sintéticos, son autoclavables y sus tamaños varían según la finalidad y el uso (muestreo de aguas con jeringa, filtración de medios de cultivo a Kitasato, etc.).

- **Mango de Kolle:** constituido por una varilla metálica con un mango aislante de ebonita; en el extremo opuesto se fija un alambre fino de platino o níquel-cromo (nicrom), de calentamiento rápido a la llama y que según su terminación se denomina: Ansa o Asa (extremo en anillo), **aguja** o **ansa recta** (extremo aguzado) y **espátula** (extremo aplanado); este instrumento se utiliza en siembras. Cantidad mínima para un laboratorio que se inicia: 1 ansa en aguja y 1 ansa en anillo.

- **Mechero de Bunsen:** formado por una base y un tubo metálico vertical; el gas penetra por un tubo lateral, y existe un orificio que permite la entrada de aire. Para fabricar pipetas Pasteur, en el pico se coloca un accesorio aplanado ("mariposa") que aumenta la superficie de acción de la llama. Cantidad mínima para un laboratorio que se inicia: 1.

- **Trípode**: elemento metálico constituido por un aro sostenido por tres pies; se emplea como apoyo para recipientes que deben ser sometidos a la acción del calor. Conviene mandarlos a hacer a algún herrero, salen más baratos que los comprados en las casas destinadas a su venta. Cantidad mínima para un laboratorio que se inicia: 1.

- Telas metálicas o difusoras: constan de un tramado de alambre con amianto en su parte central; se utilizan colocándolas sobre el trípode, entre la llama y el recipiente a calentar, con lo que se amortigua el efecto del fuego directo. Cantidad mínima para un laboratorio que se inicia: 1

- Policubeta: placa múltiple de 96 celdas con fondo redondeado, cónico o plano, construidas en poliestireno y esterilizables por radiación; poseen una gran claridad óptica y medidas estándar que permiten su utilización en variados equipos; se emplean en microanálisis por lo general de tipo serológico (hemaglutinación, inhibición de la hemaglutinación, fijación de complemento, etc.).

Aparatos

- pHmetro: instrumento destinado a medir el pH de distintos medios, entre ellos, los de cultivo. Su manejo no es complejo pero requiere cuidado para no romper el electrodo. Mucho más práctico es comprar **tiras de pH**; en el comercio se venden en rangos de pH, por lo que una que abarque de 5 a 9 cubrirá la mayoría de las reacciones del laboratorio. Se utliza sólo una pequeña cantidad; 0,5 cm es suficiente. Cantidad conveniente para un laboratorio que se inicia: 1 tira.

- **Balanza**: aparato de precisión empleado para pesar diversos elementos; existen distintos tipos:
  - **granataria:** consta de dos platillos y se emplean pesas de 1 a 1000 g. Cantidad mínima para un laboratorio que se inicia: 1. Este elemento es algo caro, sin embargo, las granatarias son las más económicas. No sirven para pesar con precisión pero en bacteriología se pesan principalmente medios de cultivo en donde pueden tolerarse las pequeñas desviaciones que producen este tipo de balanzas.
  - analítica: de gran precisión; dos platillos; capacidad máxima de 200 g y precisión de 0,1 a 0,2 mg.
  - analítica eléctrica o electrónica: tiene las mismas ventajas que la anterior pero posee un solo platillo; la lectura se realiza en una escala óptica digital iluminada.

- **Baño térmico (Baño María):** consta de un recipiente con agua en el que se colocan gradillas metálicas con el material a calentar; el calor se obtiene por medio de una resistencia eléctrica y se controla a través de un termostato; se verifica la temperatura con un termómetro. No es un elemento indispensable en bacteriología, pero sí lo es si se realizan pruebas serológicas y bioquímica sanguínea.

- **Estufa de cultivo:** caja rectangular de triple pared con dos puertas frontales (la interna es de vidrio), estantes interiores, fuente calórica (resistencia eléctrica). Por mantener una temperatura óptima de 35 a 37 °C es el equipo indicado para desarrollar microorganismos en el laboratorio. Cantidad mínima para un laboratorio que se inicia: 1.

- **Horno o estufa de esterilización:** gabinete metálico aislado con fibra de vidrio o amianto, eléctrico, temperatura de hasta 300 °C; esteriliza por calor seco; puede adaptarse un horno de cocina que funcione bien (sin pérdidas de calor); en este caso, conviene destinarlo sólo a esterilización.

- **Autoclave de Chamberland:** está formado por una caldera cilíndrica de doble pared, una fuente calórica (eléctrica o gas) y, en la parte superior, una corona de bulones con los que se cierra; en la tapa se encuentran un manómetro, una válvula de seguridad, una espita y un aro de caucho que otorga hermeticidad al cierre; en el interior (a cierta altura del fondo) hay una placa cribada o rejilla en donde se deposita el material a esterilizar para que no se contacte con el agua colocada por debajo.

  En la actualidad existen autoclaves automáticos que no varían en su fundamento pero sí difieren en su estructura y manejo. En este caso, el autoclave presenta una marmita, espita, manómetro y tapa de cierre hermético (que se ajusta con una llave central), pero además tiene ficha de encendido eléctrico, temporizador o "timer", regulador automático de la temperatura y espita de salida inferior; también tiene una alarma o timbre para anunciar la finalización del proceso de autoclavado. Cantidad mínima para un laboratorio que se inicia: 1. Si el trabajo es poco, puede iniciarse con una olla a presión grande.

- **Congeladoras:** empleadas para conservar virus, bacterias o sueros por largo tiempo, su temperatura es de -10 °C a -80 °C; si se desea conservar sustancias por debajo de ese límite, deben emplearse termos especiales con N_2 líquido que producen temperaturas de –196 °C. Si bien no es indispensable, la posibilidad de tener un freezer de –20 °C es importante para conservar varios elementos de laboratorio.

- **Centrífuga:** equipo empleado para separar líquido de partículas en suspensión aplicando la fuerza centrífuga y aprovechando las diferentes densidades de los elementos; los tubos deben equilibrarse antes de la centrifugación; existen diversos tipos con variaciones en capacidad, velocidad de centrifugado, etc. Si bien no es estrictamente necesario para bacteriología, es importante para analizar ciertos elementos, como por ejemplo, orina, en los cuales el sedimento es de fundamental importancia para correlacionar los hallazgos bacteriológicos.

- Campana de flujo laminar: son campanas "barridas" por aire estéril en las que el aparato aspira aire contaminado, lo filtra y lo expulsa a través de la campana impidiendo la introducción

de microorganismos en el medio ambiente; este equipo hace innecesario el uso de la llama del mechero y los trabajos bacteriológicos no son afectados por la corriente de aire.

USO DE MATERIALES DESCARTABLES

En la actualidad, muchos de los elementos mencionados en este capítulo, han sido remplazados por materiales descartables. Tal es el caso de las cajas de Petri, pipetas, ansas, etc. Además, dependiendo de la complejidad del laboratorio, los medios pueden comprarse directamente plaqueados o en tubos, evitando en este caso la necesidad de esterilización. Obviamente, esta metodología de trabajo, implica mayores costos, pero si el volumen de muestra es bajo, muchas veces justifica su uso, ya que no es necesario la compra de medios deshidratados.

Capítulo 7

MICROSCOPIA

Miguel Angel Petruccelli

HISTORIA DEL MICROSCOPIO

Fue un holandés fabricante de anteojos, Zacharías Jansen, quien, alrededor del año 1600 inventó el microscopio, lo que a la postre determinó un gran avance para la medicina de la época. Robert Hooke, en 1665, con un microscopio construido por él, descubrió la circulación sanguínea de los peces y la célula vegetal.

Otro microscopista holandés, A. Van Leeuwenhoek, entre los años 1673 y 1723, realizó estudios con diminutas lupas por él talladas, alcanzando hasta 270 aumentos. De esta manera aportó valiosa información a los estudios histológicos de la época.

Fue con el advenimiento de los microscopios compuestos cuando la microscopia logró un progreso considerable. Incesantes perfeccionamientos, tanto de la fuente de iluminación como de los oculares, permitieron que, en 1868, Ernst Abbé y Carl Zeiss realizaran objetivos apocromáticos, es decir, corregidos de esfericidad y acromatizados para tres diferentes colores.

El mismo Abbé fue quien descubrió las ventajas de los objetivos de inmersión y el aceite de cedro como el líquido más apropiado para su utilización. Al mismo tiempo, demostró que se había alcanzado el máximo de resolución para la luz visible y, por lo tanto, que el poder resolutivo del microscopio dependía de la abertura numérica y de la longitud de onda de la luz.

Microscopio simple o lupa

Se llama microscopio simple o lupa a aquel formado por una lente positiva o convergente, que colocada delante de un objeto determina la formación de una imagen agrandada de aquél.

Microscopio compuesto

El microscopio compuesto está formado primordialmente por dos sistemas ópticos, objetivo y ocular; ambas lentes positivas que se sitúan en los extremos de un tubo con un eje óptico común.

El objeto a estudiar se coloca delante del objetivo, lente de gran potencia que forma una imagen real pero invertida del objeto. El ocular, que actúa como una lupa o microscopio simple, forma una imagen real, agrandada y derecha de la imagen.

Básicamente el microscopio está integrado por el estativo y el sistema óptico. El primero está formado a su vez por el tubo, la platina, la columna y el pie.

El tubo es el encargado de sostener el ocular en la parte superior; hoy en día existen tubos monoculares, binoculares y trioculares con una opción para cámara fotográfica o cámara de televisión.

En la parte inferior del tubo se encuentra el revólver donde van atornillados los objetivos; esto permite al operador cambiar fácilmente de objetivo con un simple movimiento giratorio y, por lo tanto, cambiar de aumentos.

La platina es una plataforma rígida ubicada en forma perpendicular al eje óptico, y permite dos movimientos perpendiculares entre sí. La platina se aleja o acerca al objetivo mediante dos tornillos, uno macrométrico que permite una aproximación y uno micrométrico con el que se logra el foco exacto.

La columna sostiene el tubo con su sistema óptico, la platina y, por debajo de ella, el condensador, el diafragma y el sistema de iluminación. Asimismo se encuentra unida al pie que sostiene todo el microscopio.

La parte óptica está formada por los objetivos y los oculares situados por encima de la platina y por el condensador, el diafragma, el espejo y la fuente de iluminación por debajo de aquélla. En muchos microscopios modernos, el espejo ha sido eliminado, pues la luz incide directamente sobre el condensador.

La función del condensador es concentrar la luz en un cono de manera que ésta atraviese el objeto a observar, transformando los haces de luz divergentes en convergentes al salir de él y penetrar en el objetivo.

Generalmente los condensadores están provistos de un diafragma de iris, con el que se regula la cantidad de luz que se desea recibir.

Existen distintos modelos de condensadores: el condensador de Abbé y los más comunes, los condensadores aplanático-apocromático (fig. 7-1), es decir, los que corrigen para tres colores del espectro y totalmente la aberración de esfericidad.

ILUMINACION EN CAMPO BRILLANTE

Posiblemente, el método más eficaz de iluminación en campo brillante sea el de Köhler. Mediante él se logra iluminar al espécimen con un cono luminoso uniforme en todo su campo angular, enfocado en su diámetro mínimo en el plano del espécimen. El cono luminoso deberá estar confinado al área del espécimen, y coaxial con el objetivo y el ocular del microscopio. Resumiendo, consiste en alinear o centrar los distintos componentes para obtener una iluminación adecuada sobre el espécimen a observar.

ILUMINACION SOBRE CAMPO OSCURO

Este tipo de iluminación se utiliza para la observación de partículas u organismos muy pequeños e invisibles con el método de iluminación en campo brillante. Es conocido que un objeto se diferencia del medio por el contraste que ofrece con éste mismo. Si estas partículas invisibles son iluminadas en forma transversal, se hacen visibles. Esto sucede pues los rayos de luz de la fuente no penetran directamente en el objetivo, sino que lo hacen los difundidos por el objeto iluminado, los que se observan brillantes sobre un campo oscuro.

Esta iluminación sobre campo oscuro se logra modificando los condensadores, de modo tal que impida el paso de los rayos de luz centrales, pasando sólo los marginales en forma oblicua sobre el preparado. Así, la luz se difunde sobre las partículas a observar y penetra en el objetivo. Este es el llamado condensador paraboloide (fig. 7-2A). Sobre la base del mismo principio, el condensador cardioide (fig. 7-2B) posee una pieza semiesférica de cristal en su parte central, la cual es plateada en la parte inferior y negra en la superior; de esta manera, los rayos de luz se reflejan

en la cara plateada. Estos sufren una segunda reflexión sobre las paredes exteriores del condensador desde donde se proyectan en forma oblicua hacia el preparado.

MICROSCOPIOS DE FLUORESCENCIA

Los microscopios de fluorescencia utilizan la propiedad que poseen ciertas sustancias de emitir, bajo la acción de radiaciones de onda corta, otras de longitud de onda más larga.

Los primeros microscopios de fluorescencia construidos por K. Reichert (1911) utilizaban un arco voltaico de carbón, como emisor de luz ultravioleta. Esta, una vez filtrada para seleccionar los rayos de luz requeridos, pasaba a través de un condensador de campo oscuro; así, sobre un fondo oscuro, la parte fluorescente de la muestra se observaba brillante.

Existen dos tipos básicos de equipos de fluorescencia: de luz transmitida y de luz incidente o epifluorescencia; se diferencian en la manera en que los rayos de luz inciden sobre la muestra.

Los microscopios modernos están dotados de lámparas de mercurio de alta presión, aunque ellas no emitan luz ultravioleta. Esto se debe a que los fluorocromos utilizados hoy en día no requieren longitudes de onda ultravioleta para excitarse.

Básicamente los equipos de fluorescencia transmitida funcionan como los microscopios de luz visible, es decir, la muestra es iluminada desde abajo, pasando previamente por un filtro que selecciona la longitud de onda apropiada (fig. 7-4). Una vez que la luz atraviesa la muestra, otro filtro absorbe las radiaciones no requeridas, y permite sólo el paso de la luz fluorescente.

En los microscopios con epifluorescencia, la luz es guiada desde arriba mediante un espejo dicroico,[1] previo paso por un filtro excitador, a través del objetivo, para que incida sobre la muestra (fig. 7-5). Esta emite longitudes de onda visibles. Mediante una barrera de filtros colocada entre el objetivo y el ocular, se eliminan las longitudes de onda no requeridas, y se obtiene así un fondo oscuro sobre el que brillan las partículas fluorescentes.

Las técnicas de inmunofluorescencia se desarrollan utilizando fluorocromos, los cuales se conjugan con determinados anticuerpos para la detección de antígenos, sean éstos fijos o libres, en un espécimen determinado.

Los fluorocromos más usados son la fluoresceína (coloración amarillo-verdosa) y la tetrametilrhodamina (coloración roja), ambas fácilmente conjugables con las inmunoglobulinas.

MICROSCOPIA ELECTRONICA

En 1924, Busch demostró que un haz de electrones podía ser enfocado cuando pasaba a través de un campo magnético producido por un solenoide. Esta característica del haz de electrones fue aprovechada por Ruska y Knoll para construir en 1931 el primer microscopio electrónico (ME). Con este nuevo microscopio lograron una ampliación de sólo 17x; sin embargo establecieron las bases para la óptica de los electrones. Así, en 1932, se logró una resolución de 50 nm, y en 1940 se llegó a los 3 nm.

Los modernos microscopios electrónicos poseen una resolución del orden de los 0,2 nm. Paralelamente, se han desarrollado otros instrumentos de óptica electrónica, como por ejemplo el microscopio electrónico de barrido, el cual revela detalles tanto de superficie como intracelulares; el microscopio electrónico analítico, el cual revela datos cuali y cuantitativos de los constituyentes

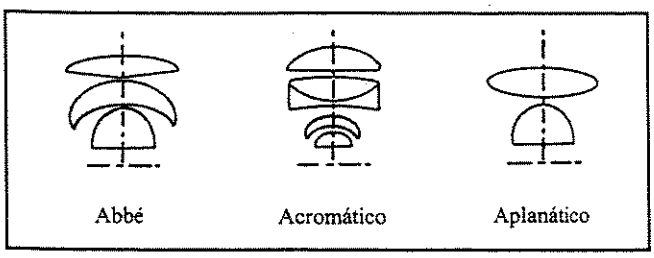


Figura 7-1. Tipos de condensadores.

intracelulares, y el microscopio electrónico de alto voltaje, el que puede estudiar secciones gruesas con una resolución de 0,1 nm.

En el microscopio electrónico de transmisión (MET), un haz homogéneo de electrones pasa dentro de una columna con alto vacío, a alta velocidad, a través de una muestra lo suficientemente delgada como para transmitir no menos del 50% de los electrones que inciden sobre ella.

El microscopio de luz y el electrónico son similares en cuanto a sus componentes. Los dos poseen tres sistemas principales: el sistema de iluminación, el de imagen y el de traslación de imagen. El sistema de iluminación está compuesto por la fuente de radiación y lentes condensadoras (bobinas electromagnéticas) que enfocan el haz de electrones en el plano de la muestra; después de pasar a través de ella, el haz de electrones entra en el sistema de imagen, el cual está compuesto por un cierto número de lentes. Estas producen la ampliación final de la imagen. Las lentes que intervienen son la lente objetivo, que produce una imagen intermedia, y la lente de proyección, que produce la imagen final ampliada. Esta puede ser observada en una pantalla fluorescente o registrarse en una placa fotográfica. Esto último comprende el sistema de traslación de imagen (fig. 7-6).

El microscopio electrónico de barrido (MEB) permite no sólo la observación de detalles con una alta resolución, sino obtener una imagen sobre la superficie de cualquier objeto, y existen muy pocas restricciones en cuanto al tipo y tamaño de la muestra a observar.

El MEB es básicamente similar al MET; se agrega a éste un detector de electrones que recoge los que rebotan sobre la muestra, produciendo una señal que pasa por un amplificador de video y de allí al monitor de televisión donde se observa la muestra (fig. 7-6).

La imagen tridimensional que se observa en la pantalla se forma punto por punto y línea por línea mediante los electrones secundarios que son emitidos por la muestra, que es explorada en forma intermitente y en toda su superficie por un haz principal.

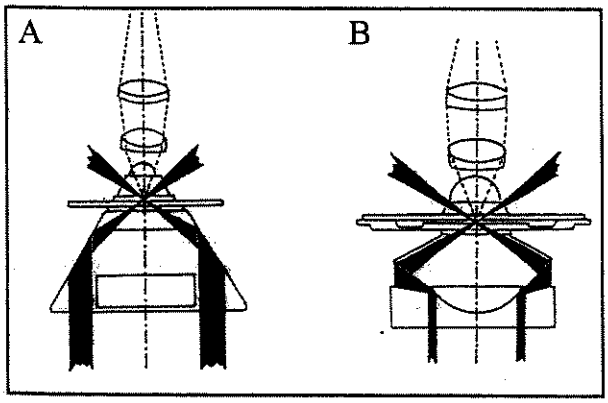


Figura 7-2. *A*, Condensador paraboloide; *B*, Condensador cardioide.

1 Dicroico: sustancia que ofrece distinto color, según se mire por reflexión o refracción.

Nuevas técnicas en microscopia electrónica

El uso de la ME ha permitido importantes avances en el estudio de las estructuras celulares. Sin embargo, el completo conocimiento de la organización celular pudo ser entendido estudiando tanto la estructura como la actividad bioquímica de los constituyentes citoplasmáticos. Un paso importante en este camino fue introducido con las técnicas de histoquímica para la detección de enzimas con el ME.

Las técnicas inmunohistoquímicas combinan moléculas de metales pesados con anticuerpos; estas partículas electrodensas son fácilmente observables con el ME, lo que permite la localización de antígenos.

En la actualidad, la utilización del ME en la biología molecular permite la observación de los ácidos nucleicos (DNA, RNA), cromosomas, estructuras de la cromatina, etc.

Todas estas técnicas deben ser vistas como un procedimiento más a ser utilizado en conjunción con otros, para investigar los distintos aspectos de la biología.

Microscopio de barrido efecto túnel

El primer prototipo de microscopio de efecto túnel fue construido por G. Binning y H. Röhrer (IBM, Zurich), pero recién en 1981 pudieron resolverse todos los problemas inherentes a su funcionamiento.

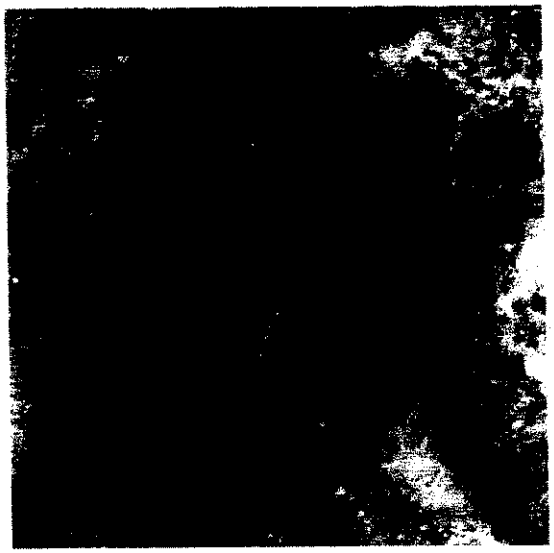


Figura 7-3. Fotomicrografía tomada con el microscopio electrónico de transmisión. Virus de la viruela aviar (Avipoxvirus). Servicio Central de Microscopia Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP.

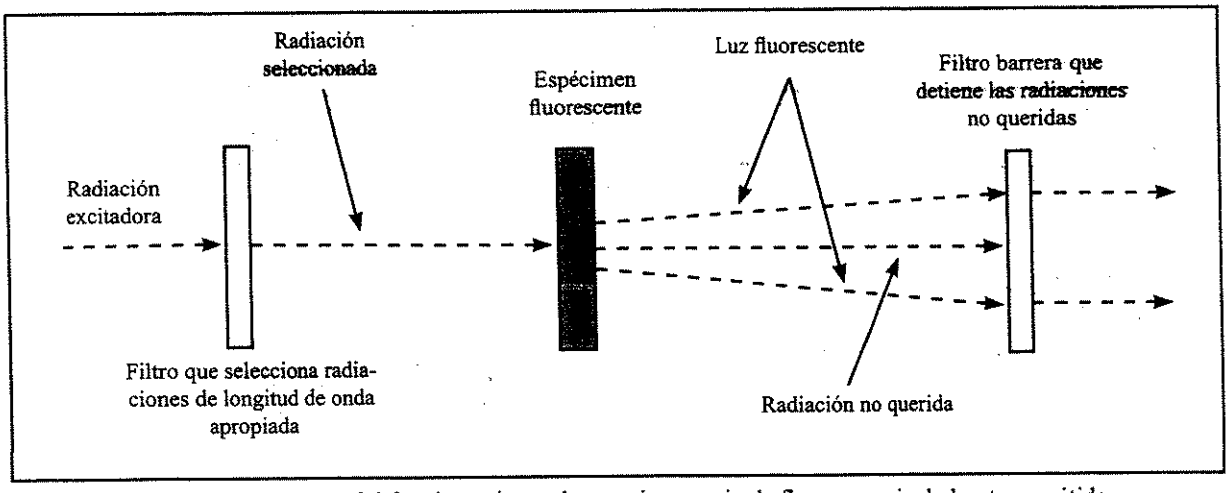


Figura 7-4. Esquema del funcionamiento de un microscopio de fluorescencia de luz transmitida.

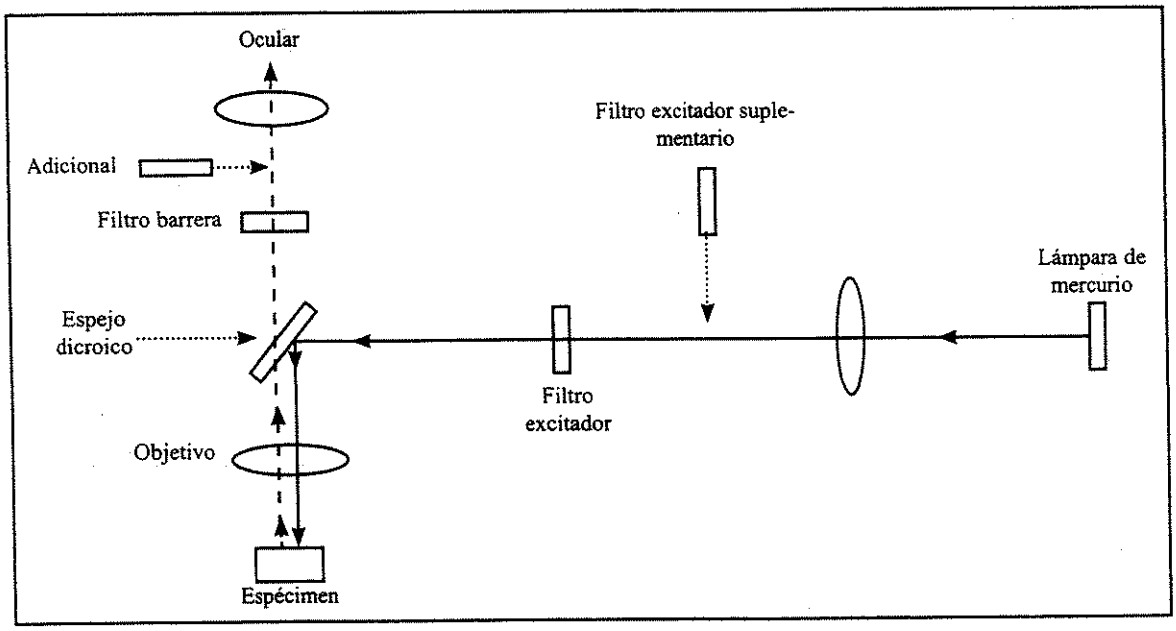


Figura 7-5. Esquema del funcionamiento de un microscopio con epifluorescencia.

El microscopio de efecto túnel, como su nombre lo indica, se aprovecha de dicho efecto, uno de los más sorprendentes resultados de la mecánica cuántica. Para ésta, una partícula como un electrón no está ubicada exactamente en un lugar, sino que puede interpretarse como una onda más o menos extendida, y no se le puede atribuir una posición puntual, sino una nube de posiciones en las cuales la partícula podría encontrarse. Semejante ubicuidad permite que un electrón pueda con cierta probabilidad escapar de un átomo, remontando las poderosas cadenas electromagnéticas que lo amarran a él, como si hubiera practicado un túnel a través de la barrera de potencial que lo tiene confinado.

El microscopio de efecto túnel se aprovecha de estas habilidades escapatorias de los electrones. Una sonda (un electrón extremadamente fino) se acerca a una distancia muy corta (unos diez millonésimos de milímetro) de la superficie del metal a observar, entre la punta de la superficie reina el más estricto vacío y una pequeña diferencia de potencial eléctrico. Los electrones de la superficie del metal, debido a su ubicuidad cuántica, pueden, con cierta probabilidad, abandonar los átomos de origen para dirigirse a la sonda intrusa, cavando un túnel cuántico a través del vacío que los separa de ella, y estableciendo así una "corriente túnel" que la sonda se ocupa de registrar. Ahora, como la intensidad de esa "corriente túnel" depende de la distancia entre la sonda y la superficie, conociendo una, se conoce la otra, a medida que la sonda barre la superficie, la intensidad de la "corriente túnel" va informando sobre el relieve y la topografía del metal, brindando una imagen muy clara de los valles y montañas producidos por la estructura atómica ultrafina de éste.

La resolución del microscopio de efecto túnel es espectacular –menos de un décimo del radio promedio de un átomo–, ha permitido obtener mapas muy precisos de superficies de metales o de semiconductores, en los que cada átomo puede distinguirse de su vecino (ayuda inapreciable para las necesidades de la mi-

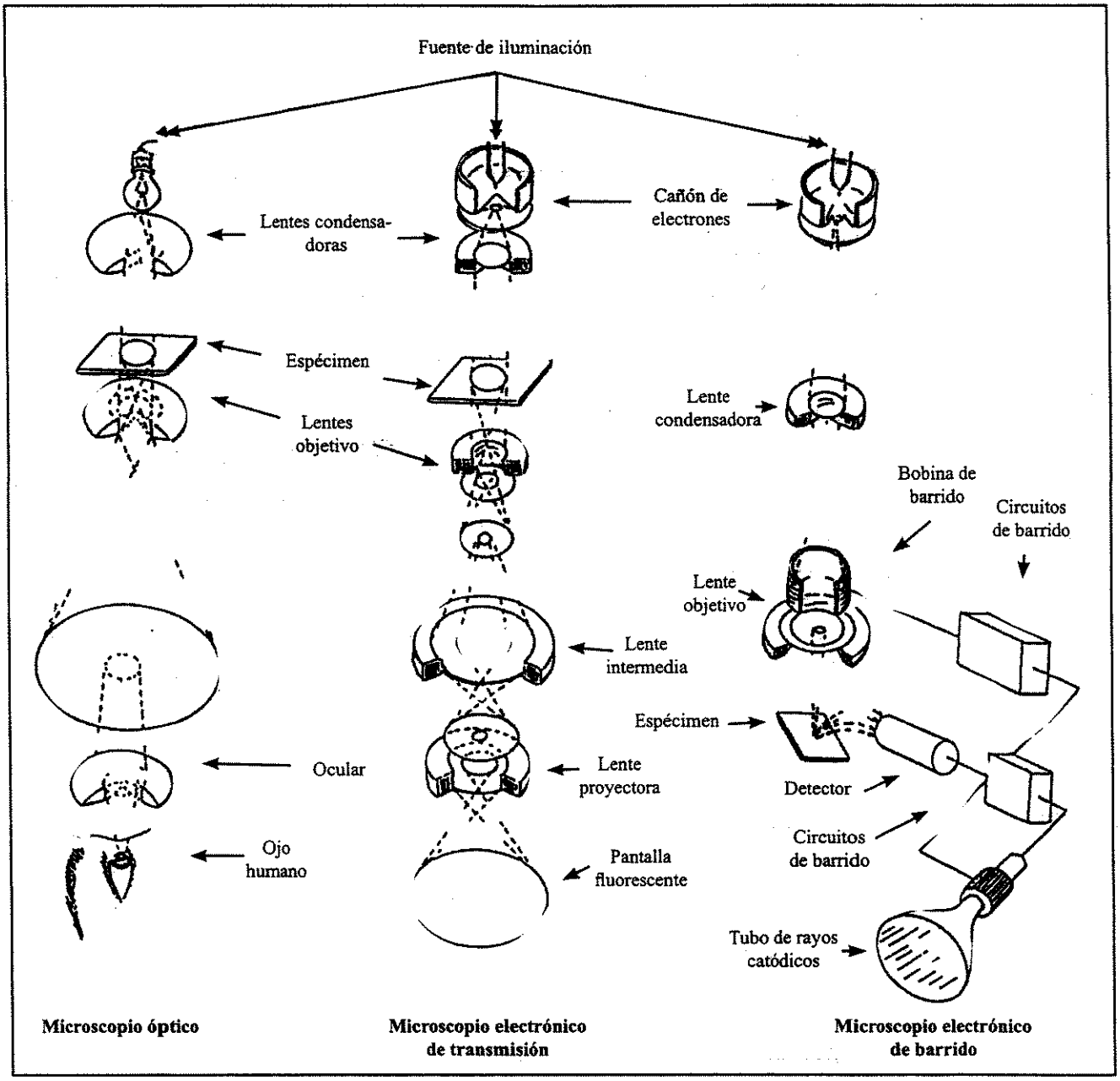


Figura 7-6. Esquema comparativo de la formación de imágenes en distintos microscopios.

croelectrónica moderna), y ha proporcionado también imágenes atómicas de moléculas de DNA.

Microscopios de fuerza atómica

Los denominados "microscopios de fuerza atómica" (G. Binning y H. Röhrer, 1985) también son capaces de reconstruir tal relieve pero no hacen acopio del efecto túnel sino de la fuerza electromagnética entre la sonda y los electrones de la muestra a analizar; la sonda entra en contacto con la muestra y detecta los efectos atractivos o repulsivos de las fuerzas atómicas. La resolución es similar a la del efecto túnel pero se utiliza para materiales no conductores, como la mayoría de las muestras biológicas.

BIBLIOGRAFIA

Aguilar Paris J. Teoría y Práctica del microscopio. Ed. Saber. Valencia. España. 1965.

Bancroft JD, Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone, Edinburgh. Second edition. 1982.

Cicardo VH. Biofísica. López Libreros Editores S.R.L. Buenos Aires. Argentina, 8va. edición. 1987.

Hyatt AD, Eaton BT. Immuno-gold Electron Microscopy in Virus Diagnosis and Research. CRC Press. NW Boca Ratón Florida USA. 1993.

Sommerville J, Scheer U. Electron Microscopy in Molecular Biology. IRL Press. Oxford England. 1987.

Capítulo 8

OBSERVACION MICROSCOPICA

María del Luján Tunes

Desde que tiene memoria el hombre ha tratado siempre de mejorar su capacidad visual, utilizando para ello diversos medios de acuerdo con las posibilidades brindadas por sus conocimientos según la época.

En primer lugar, se emplearon múltiples cristales con fines religiosos y para el encendido del fuego, elemento que los antiguos consideraban sagrado. Con el transcurso del tiempo, varios estudiosos iniciaron investigaciones buscando mejorar la visión de individuos afectados por diversas patologías oculares; basándose en el estudio del cristalino, lograron su cometido mediante el uso de cristales y de lentes colocados cerca de los ojos del paciente, con lo que comienza el uso de lupas y de anteojos.

Estos estudios fueron perfeccionándose y las lentes fueron acoplándose, permitiendo contemplar por aproximación óptica cuerpos muy lejanos por medio del telescopio.

Finalmente, el ensamblado de distintas lupas dentro de un tubo metálico facilitó la observación y el estudio de elementos cercanos pero sumamente pequeños para el ojo humano, procedimiento que dio origen al primer microscopio hacia fines del siglo XVI. En el capítulo anterior se han visto la principales características del microscopio óptico y electrónico.

La lente objetivo del microscopio está constituida por un tubo metálico cónico-cilíndrico en el que está incluido un sistema de lentes que previene la excesiva curvatura de la lente frontal. Por su corrección óptica se diferencian cuatro clases de lentes objetivos, a saber:

Acromáticos: estas lentes objetivos dan focos diferentes para los distintos colores del espectro; los colores verde y azul se encuentran en el mismo foco, mientras que los demás tienen focos distintos pero muy próximos entre sí, hecho ocasionado por el índice de refracción diferente para cada radiación. Se denomina "aberración cromática" a la aparición de irisaciones que se presentan cuando la luz blanca se descompone en estas lentes objetivos. Pese a ello, en una observación microscópica corriente con un objeto iluminado adecuadamente, esta aberración cromática provoca inconvenientes mínimos.

Apocromáticos: estos objetivos logran corregir casi totalmente la aberración cromática pues hacen coincidir tres colores en un mismo foco, y los demás tienen focos tan cercanos entre sí que prácticamente no son detectables por la retina. Con esta clase de lente el campo microscópico aparece de tono uniforme, sin irradiaciones parásitas.

Monocromáticos: los objetivos de esta clase tienen lentes confeccionadas con cuarzo fundido y transparente para los rayos UV. Se emplean para la realización de microfotografías, en donde se utilizan radiaciones espectrales de muy escasa longitud de onda.

De corrección: en varias oportunidades, la presencia de cubreobjetos provoca la desviación de los rayos luminosos. Este defecto es corregido por las lentes de este objetivo especial, debido a la distancia que separa la lente frontal de las demás. En la actualidad, los cubreobjetos presentan un espesor estándar (entre 0,15 y 0,17 mm), lo que deriva en la exclusión de este método correctivo.

Las lentes objetivos poseen las siguientes propiedades:

Poder definidor: es la aptitud de formar imágenes claras que permite la observación de los objetos con sus contornos netos y precisos.

Poder de resolución: es la capacidad de exponer de forma diferenciada e independiente dos puntos muy cercanos entre sí. Esta facultad microscópica esencial permite revelar los detalles más finos de la estructura de los objetos; depende de la apertura numérica y de la longitud de onda de la luz utilizada, y debe recordarse que a mayor poder resolutivo se obtendrá una mayor definición del objeto en estudio.

Teniendo en cuenta que la luz visible tiene una longitud de onda fija, se considera que la resolución es tarea de la apertura numérica de la lente, y que a mayor apertura numérica más pequeño será el objeto resuelto.

También debe considerarse que la apertura numérica depende de la cantidad de rayos luminosos que abarca el objetivo y de la clase de medio atravesado por el rayo de luz. Cuando dicho medio es aire (como cuando se emplean objetivos secos débil y fuerte), el máximo de apertura numérica es de 1,0. Si el estudio debe realizarse con aumentos mayores (objetivos de inmersión), la apertura numérica debe incrementarse y esto se consigue mediante el uso de aceite de inmersión, que posee un índice de refracción mayor al del aire y permite aperturas numéricas de 1,2 y 1,4. Los equipos capaces de estas aperturas numéricas, siempre que utilicen luz visible, brindarán un poder de resolución no mayor a 0,25 μm, lo que determina que partículas de tamaño menor a esta medida no pueden diferenciarse entre sí.

La **apertura numérica** gobierna directamente el poder de resolución (a mayor apertura, mayor resolución), mientras que la longitud de onda actúa de manera inversa (a menor longitud de onda, mayor poder resolutivo).

Aumento: se denomina así a la relación entre el tamaño del objeto y la imagen formada por el objetivo. Por ejemplo: al observar un objeto de 1 de lado y obtener una imagen de 10 de lado, el aumento lineal será de 10, aunque geométricamente la superficie de la imagen será 100 veces mayor que la del objeto en estudio.

Distancia frontal: se denomina así a la distancia media entre la cara superior de la lente frontal y la cara superior del cubreobjetos, en un enfoque realizado correctamente.

Poder de penetración: es la capacidad de permitir la observación simultánea de varios planos, por encima y por debajo del plano enfocado. Este poder lo tienen todos los objetivos, aunque no con la misma intensidad. El poder de penetración es inversamente proporcional al aumento y a la apertura numérica.

Finalmente, por su uso se distinguen dos clases de lentes objetivos:

Seco: es toda aquella lente que se utiliza directamente sin la interposición de ninguna clase de sustancia entre ella y el objeto. Pueden ser acromáticas o apocromáticas y el aumento varía entre x4 y x45.

De inmersión: esta clase de lente debe ser utilizada previa interposición de un líquido entre la lente frontal y el objeto en observación. Cuando se interponen líquidos de distinto índice de refracción que la lente frontal (por ej., agua), el objetivo se denomina de inmersión ordinaria; cuando el líquido interpuesto tiene un índice de refracción similar al de la lente frontal (por ej., aceite de cedro), el objetivo se designa de inmersión homogénea.
En la observación por inmersión se aumentan unas 1000 veces el tamaño original del objeto en estudio, siendo el límite máximo de unos 2000 aumentos.

El aumento total del microscopio compuesto es el producto del aumento de las lentes objetivo y ocular, debido a que inicialmente el aumento del objeto lo produce la lente objetivo, la imagen obtenida es transmitida a la lente ocular y finalmente ésta se encarga de provocar el aumento definitivo.

El condensador, sistema de lentes ubicado por debajo de la platina, es un elemento de gran importancia para una correcta observación microscópica, especialmente en el momento de examinar la muestra con objetivo de x100.

Es sabido que para su observación el objeto debe hallarse iluminado, y el condensador es el encargado de dirigir el enfoque del rayo luminoso sobre el elemento en estudio, al mismo tiempo que permite graduar la cantidad de luz que llega hasta aquél. El ascenso o descenso del condensador con respecto al objeto permite la elección del foco exacto o más adecuado para la observación.

La cantidad de luz que debe llegar al objeto en estudio puede regularse mediante el aumento o la disminución de la apertura del diafragma iris incluido en el condensador. Esto se debe a que la luz que pasa por éste debe situarse en el espacio abarcado por el objetivo para evitar así una iluminación periférica inútil.

El brillo excesivo de la luz debe ser controlado mediante filtros de neutralización o por la disminución del voltaje de la fuente de luz. Debe recordarse que una correcta iluminación facilita el análisis de la muestra, sobre todo cuando se trabaja con objetivos de inmersión.

MEDICION DEL AUMENTO DEL MICROSCOPIO

El aumento que da un microscopio depende de cuatro factores: aumento del objetivo, aumento del ocular, longitud óptica del tubo y diferente distancia de visión.

Para conocer el aumento, que se origina de la combinación óptica utilizada, se pueden consultar las tablas proporcionadas por la fábrica del equipo, pero si no se cuenta con ellas, se puede aplicar el procedimiento que se describe a continuación.

Con micrómetro-objetivo

Colocar sobre la platina un **micrómetro-objetivo**, portaobjetos que tiene grabada con diamante una serie de líneas paralelas separadas entre sí por una distancia exacta de 0,01 mm.

Luego enfocar el **micrómetro-objetivo**, colocando sobre la lente superior del ocular un vidrio deslustrado que recogerá la imagen del micrómetro y sobre la cual puede medirse con un compás la distancia que separa las líneas paralelas. Luego, por simple cálculo, se establece la relación entre el objeto y su imagen, determinando así el aumento del microscopio.

Con ocular-micrométrico

Esta lente tiene colocado en su diafragma un vidrio, el cual tiene grabada una escala milimétrica (en décimas de milímetro).

El procedimiento consiste en superponer ambas escalas y observar cuál es la primera coincidencia de divisiones. Por ejemplo, si dos divisiones del objetivo (0,02 mm) corresponden a 10 divisiones del ocular, cada división del ocular es igual a:

$$0{,}02/10 = 0{,}002 \text{ mm} = 2 \text{ µm}$$

MEDICION DE OBJETOS

Para obtener el tamaño de los objetos observados, después de determinar el aumento del microscopio bastará con sustituir el micrómetro-objetivo con el objeto a medir propiamente dicho. Luego se determina la cantidad de divisiones de la lente ocular ocupadas por dicho objeto.

METODOS DE OBSERVACION MICROSCOPICA – OBSERVACION EN FRESCO

Este método permite la observación de bacterias vivas, su morfología verdadera, su agrupación, motilidad y hasta reproducción según la técnica empleada.

No puede determinarse la estructura bacteriana ni su constitución química.

METODO SIMPLE (ENTRE PORTA Y CUBREOBJETOS)

En esta técnica, se coloca una gota de cultivo (o se suspende una fracción de colonia en una gota de agua destilada) en el portaobjetos y luego se aplica sobre ésta un cubreobjetos; este último puede ser fijado al portaobjetos con parafina para evitar la rápida evaporación del líquido y además para evitar su desplazamiento al observar con inmersión.

El empleo de aceite de inmersión se hace obligado cuando se trabaja con lentes objetivos de x100, debido a que con este aumento se necesita que el rayo de luz atraviese sin desviarse una sustancia que tenga un índice de refracción similar al del cristal de la lente; por esto, si el rayo luminoso atravesara una capa de aire intermedia entre el objeto y la lente, la visualización sería deficiente por su índice de refracción distinto.

En este caso, la gota de aceite de inmersión se coloca sobre el cubreobjetos para permitir que la lente objetivo se "sumerja" en el aceite, facilitando la correcta visualización de las estructuras en estudio.

Gota pendiente

En esta técnica, la gota de suspensión bacteriana se coloca en el cubreobjetos; posteriormente, éste se coloca en posición invertida y con un rápido movimiento sobre el portaobjetos especial elegido, por lo que la gota de líquido queda suspendida del cubreobjetos. En este caso, el aceite de inmersión también se coloca sobre el cubreobjetos.

Este método permite eventualmente observar la reproducción de las bacterias.

Portaobjetos utilizados:
Portaobjetos de Koch: posee una depresión o excavado central (fig. 8-1).

Célula de Boettcher: la depresión central tiene fondo plano y está rodeada de un canal periférico más profundo que impide una posible fuga de líquido (fig. 8-2).

Célula de Ranvier: consta de un cilindro o anillo de vidrio adherido a la superficie del portaobjetos; sobre ella se coloca el cubreobjetos con el material (fig. 8-3).

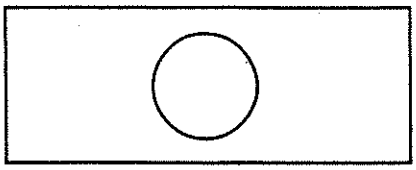


Figura 8-1. Portaobjetos excavado de Koch.

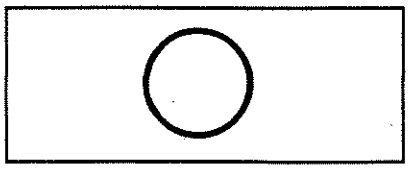


Figura 8-2. Célula de Boettcher.

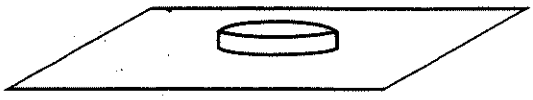


Figura 8-3. Célula de Ranvier.

Negativa

En este método simple y rápido para detectar bacterias encapsuladas y que puede definirse como falso fondo oscuro, la muestra se suspende en una gota de colorante (por ej., nigrosina) que no llega a teñir las bacterias pero sí el espacio interbacteriano, con lo que los microorganismos se destacan por contraste.

La nigrosina puede ser remplazada por colargol o tinta china, pero la observación debe realizarse de inmediato antes que el material se seque. El aceite de inmersión se aplica sobre el cubreobjetos.

Fondo oscuro

Este procedimiento es utilizado para observar objetos por medio de su iluminación periférica, lo cual permite al observador detectar la presencia de elementos de soma muy delgado y con un índice de refracción muy cercano al del agua, tal como sucede con algunas espiroquetas.

El fundamento de este método se basa en el principio Tyndall, que consiste en el empleo de condensadores especiales que, gracias a un diafragma central, sólo dejan pasar los rayos luminosos periféricos que se refractan o reflejan en la superficie espejada interior del condensador e inciden de manera oblicua sobre el objeto. Tras chocar con el soma bacteriano, el rayo luminoso se desvía de su curso original y penetra en la lente objetivo, permitiendo la visualización de las distintas morfologías como partículas brillantes en su periferia sobre un fondo totalmente oscuro.

Es importante recordar que para una correcta visualización con este método, se utilizan dos gotas de aceite de inmersión: la primera colocada sobre el condensador y contactando con la parte inferior del portaobjetos. Esta puede ser remplazada por glicerina o glicerina/H_2O en partes iguales. La segunda, sobre el cubreobjetos y contactando con la lente objetivo. Es posible también observar los microorganismos con aumentos menores (objetivos de 10X a 45X) sin necesidad de colocar la gota superior de aceite.

Esta distribución del aceite convierte en una sola "masa" al conjunto formado por condensador-portaobjetos-cubreobjetos-objetivo y, al carecer de aire intercalado entre estos elementos, la dirección del rayo de luz no puede ser desviada.

Para lograr la coincidencia del foco de los rayos periféricos con el plano del objeto a observar es conveniente utilizar portaobjetos de 1 mm y cubreobjetos de 0,17 mm de espesor.

El condensador que se utilice para este tipo de observación microscópica debe ser elegido entre las tres variedades que se describen a continuación.

Paraboloide: está constituido por una lente plano-convexa cuya superficie exterior es un paraboloide de resolución. Posee un diafragma central que impide la iluminación directa y permite que sólo ingresen al condensador los rayos luminosos periféricos. Estos rayos inciden en las caras laterales del paraboloide y se dirigen al objeto de forma oblicua; si no encuentran ninguna partícula, se pierden en el espacio; en caso contrario, chocan con la partícula, se desvían y penetran en el objetivo.

Cardioide: este condensador posee una iluminación mucho más intensa que el anterior, lo que permite aplicarlo también en ultramicroscopia. Su diafragma central inferior no detiene los rayos de luz en forma absoluta y éstos, al pasar, se desvían después de chocar con la superficie esférica central y sobre la cara cóncava de la superficie cardioide, para luego penetrar de forma oblicua en el objeto.

Alterno: es un condensador a espejos con tres superficies y una superficie plana que origina iluminación difusa. También presenta dos diafragmas, uno central y otro periférico, que regulan la entrada de luz. Este condensador puede aplicarse tanto para fondo oscuro como para microscopia de fondo iluminado.

OBSERVACION PREVIA COLORACION

A diferencia de las técnicas en fresco, la observación microscópica previa coloración se realiza con bacterias muertas, su morfología presenta alteraciones debido a los métodos de fijación empleados y la aplicación de los colorantes, y no pueden observarse la motilidad bacteriana ni su reproducción.

Como ventaja, la tinción nos permite tener una idea general sobre las distintas estructuras celulares detectables y su constitución química, según el método de coloración aplicado.

Es importante recordar que los métodos de tinción emplean sustancias colorantes, es decir, sustancias que poseen color y son capaces de transmitirlo a otros elementos. Ejemplos de sustancias colorantes son: Violeta de genciana, Safranina, Azul de metileno y Fucsina fenicada de Ziehl, entre otros.

Por otra parte existen las sustancias coloreadas, que son productos que poseen color pero que son incapaces de transmitirlo a otros elementos. Ejemplos de sustancias coloreadas son: Rojo de fenol, Rojo de metilo, Azul de bromotimol y Fucsina ácida, entre otros.

Características de la coloración simple

Simple: es una técnica que emplea un solo colorante, de manera que todos los elementos incluidos en la muestra toman el mismo color.

Directa: en este caso, sólo el colorante actúa sobre la muestra.

Progresiva: cuanto más tiempo se aplica el colorante sobre la muestra, más la tiñe.

Características de la coloración compuesta

Compuesta: esta técnica se denomina así por emplear dos colorantes. Primeramente se aplica el colorante principal, que será tomado y retenido por las bacterias positivas, y luego se aplica el colorante de contraste o secundario, el cual será tomado por las bacterias negativas.

Indirecta: el método incluye el uso de un mordiente que incrementa la fijación del colorante principal al material (por ej., Lugol, ácido fénico, calor).

Regresiva: se aplican decolorantes para eliminar el colorante principal de las estructuras que lo han tomado pero que no son capaces de retenerlo, con lo cual se permite la toma del colorante de contraste. Así se diferencian las bacterias positivas y negativas. Ejemplos de decolorantes son: alcohol, alcohol acetona, alcohol ácido, etc.

Pasos previos a la tinción

Salvo técnicas especiales, la técnica previa a las coloraciones de rutina incluye invariablemente los siguientes pasos:

1. **Extendido**: implica la colocación de la muestra sobre el portaobjetos, siguiendo todas las reglas de esterilidad y bioseguridad correspondientes.
2. **Secado**: se lo aplica para eliminar el exceso de líquido de la muestra, pero esto no produce la muerte de las bacterias en ella contenidas. Debe recordarse que una bacteria deshidratada no es una bacteria muerta.
3. **Fijado**: en este paso sí se produce la muerte bacteriana por degradación de sus proteínas somáticas por acción de agentes químicos o del calor, según el método utilizado. De todas formas, hay que considerar el tipo de muestra a fijar debido a que en ciertas oportunidades el vehículo en que se hallan las bacterias permite su sobrevida aún después de la fijación (por ej., *Mycobacterium tuberculosis* en esputo).

Los métodos de fijación pueden ser físicos o químicos. El ejemplo clásico de fijador físico es el agresivo método de Koch (tres pasajes sobre la llama del mechero) que produce rápida coagulación proteica del soma bacteriano y la consiguiente deformación de la morfología. Ejemplo de fijador químico es el metanol al 95% (deforma menos los somas bacterianos pero debe ser aplicado por lo menos durante 1 minuto).

TINCIONES ACIDORRESISTENTES

Algunas células microbianas poseen envolturas compuestas por ácidos grasos de cadenas largas, como los ácidos micólicos, que actúan como una barrera que impide el ingreso del cristal violeta y otros colorantes básicos (en el caso de micobacterias, incluso la penetración de los antibióticos y el ingreso de nutrientes; esto último causa su lento desarrollo por los métodos clásicos de cultivo).

Por calentamiento o por tratamiento con sustancias detergentes puede ser favorecida la penetración del colorante primario; una vez que éste ingresó por la fuerza, la bacteria no puede ser decolorada por la mezcla alcohol-ácido. Estos métodos son útiles para ciertos géneros o especies particulares, como *Mycobacterium*, *Rhodococcus* y casi todos los agrupados dentro de los actinomicetes aerobios. También se emplean para teñir oocitos de algunos parásitos.

METODOS DE RUTINA

1. Simple
Materiales: solución hidroalcohólica de azul de metileno.
Técnica: extendido, secado y fijado clásicos.
Coloración: azul de metileno 1 min. Lavado con agua, secado y observación.
Interpretación: todas las bacterias se tiñen con el colorante aplicado.

2. Gram
Materiales
Colorante principal: solución hidroalcohólica de violeta de genciana.
Mordiente: solución de Lugol.
Decolorante: alcohol acetona.
Colorante de contraste: solución madre de safranina.
Solución de safranina para uso inmediato (dilución 1:5 o 1:10).
Técnica: extendido, secado y fijado clásicos.
Coloración

Violeta de genciana	1 min
Lavado con agua	
Lugol	1 min
Lavado con agua	
Alcohol acetona	10 seg
Lavado con agua	
Safranina	45 seg

Lavado con agua, secado y observación.
Interpretación: positivos, color **violeta**; negativos, color **rojo.**

Fundamento: este método, creado por el bacteriólogo danés Christian Gram en 1844, es el método tintorial diferencial por excelencia usado rutinariamente en el laboratorio para catalogar las bacterias en dos grandes grupos: grampositivas y gramnegativas; además, permite tener una idea aproximada de la constitución química de sus paredes celulares y de la subsiguiente sensibilidad a los antimicrobianos, que será determinada a posteriori mediante la práctica adecuada. Antiguamente se supuso que las bacterias Gram positivas tenían en su composición ribonucleato de magnesio, sustancia que con el violeta de genciana y el Lugol formaba un compuesto coloreado estable a la decoloración.

En la actualidad se ha determinado que la diferenciación por la técnica de Gram se debe a la constitución química de la pared bacteriana. Las bacterias grampositivas poseen una pared celular gruesa, constituida por peptidoglucano (también llamado mureína, en proporción del 80% al 90% y dispuesto en varias capas) y dos clases de ácido teicoico (ácido teicoico y ácido lipoteicoico), además de un porcentaje no muy elevado de lípidos. Por su parte, la pared de las bacterias gramnegativas posee una capa con menor proporción de peptidoglucano (del 10% al 20%) como único constituyente, pero además se encuentra rodeada de una membrana externa formada por la asociación de fosfolípidos, lipopolisacáridos y lipoproteínas. Estos lípidos se hallan en mayor proporción que en las bacterias grampositivas.

Cuando en la coloración se aplica el violeta de genciana, el colorante es tomado por la pared de todas las bacterias presentes en la muestra, tanto positivas como negativas, pero en el paso de diferenciación por decoloración, las bacterias grampositivas sólo sufren una deshidratación que disminuye la permeabilidad (por el cierre de los poros de la capa de peptidoglucano) y el complejo colorante-Lugol es retenido en su pared. Por el contrario, la decoloración en las bacterias gramnegativas provoca la disolución de esta cubierta lipídica y aumenta la permeabilidad de la pared, el alcohol arrastra fuera de las células los lípidos unidos al complejo colorante-Lugol y las bacterias quedan incoloras, permitiendo su contracoloración con safranina.

3. Ziehl Neelsen

Materiales

Colorante principal: fucsina fenicada de Ziehl.
Decolorante: alcohol ácido.
Colorante de contraste: solución acuosa de azul de metileno.
Técnica: extendido, secado y fijado clásicos.

Coloración

Fucsina fenicada de Ziehl (en caliente)	5 min
Lavado con agua	
Alcohol ácido	2 min
Lavado con agua	
Azul de metileno	1 min

Lavado con agua, secado y observación.
Interpretación: positivos, color **rojo**; negativos, color **azul**.

Fundamento: las bacterias ácido-alcohol resistentes se caracterizan por poseer un elevado tenor de lípidos en su composición, que puede llegar al 40% de la materia seca. El que se halla en mayor proporción es el ácido micólico, que puede ser considerado como el sustrato de este método de tinción.
Estas bacterias son difíciles de teñir con técnicas clásicas, por lo que se usa el colorante principal en caliente; después de adquirir la coloración, son absolutamente resistentes a la decoloración con alcohol-ácido, y este fenómeno se produciría porque el colorante es más soluble en los lípidos bacterianos que en las sustancias decolorantes.
Es importante tener en consideración en la técnica de Ziehl Neelsen que se cuenta con dos mordientes, uno de tipo físico (el calor aplicado con el hisopo encendido) y otro de tipo químico (el ácido fénico incluido en el colorante principal).

4. Kinyoun
Materiales
Colorante principal: fucsina de Kinyoun.
Decolorante y colorante de contraste: igual que en Ziehl Neelsen.
Técnica: extendido, secado y fijado clásicos.
Coloración

Carbolfucsina	5 min
Lavado con agua	
Alcohol ácido	3 min
Lavado con agua	
Azul de metileno	1 min

Lavado con agua, secado y observación.
Interpretación: positivos, color **rojo**; negativos, color **azul**.
Fundamento: como esta técnica se realiza "en frío" es aceptable la teoría que sostiene que la retención del colorante principal en el soma bacteriano se debe a la permeabilidad selectiva de la membrana citoplasmática –debida a la composición química y el espesor de la envoltura–, lo cual permite la permanencia de la carbolfucsina, aun lavando con ácido y alcohol.

METODOS ESPECIALES

5. Hiss
Materiales
Colorante: solución hidroalcohólica de violeta de genciana.
Solución de lavado: solución de sulfato de cobre.
Técnica: extendido, secado al aire, fijado no por calor.
Coloración
Violeta de genciana (calentar con hisopo hasta emisión de vapores blancos).
Sulfato de cobre al 20% (lavado por arrastre).
Secado con papel de filtro y observación.
Interpretación: cápsulas, como halos color **celeste**; bacterias, color **azul violeta**.
Fundamento: éste es uno de los tantos métodos empleados para visualizar la cápsula bacteriana por medio de la tinción. Las características particulares de esta técnica se deben a que la cápsula y los demás componentes de la célula bacteriana no tienen la misma afinidad por los colorantes, y el lavado con solución de sulfato de cobre actuaría como un elemento diferenciador en la intensidad de color.

6. Moeller
Materiales
Colorante principal: fucsina fenicada de Ziehl.
Mordiente: solución de ácido crómico.
Decolorantes: solución de ácido sulfúrico al 5%.
Alcohol.
Colorante de contraste: solución madre de azul de metileno.
Solución hidroalcohólica de azul de metileno.
Técnica: extendido, secado y fijado clásicos.
Coloración

Acido crómico (en caliente)	5 min
Lavado con agua	
Fucsina de Ziehl Neelsen (en caliente)	10 min
Lavado con agua	
Acido sulfúrico al 5% (lavar por arrastre)	
Alcohol (lavar por arrastre)	
Lavado con agua	
Azul de metileno	1 min

Lavado con agua, secado y observación.
Interpretación: esporos, color **rojo**; bacterias, color **azul**.

Fundamento: este método se caracteriza por su agresividad para lograr la tinción de las esporas bacterianas, cuya cubierta es permeabilizada con el mordiente en caliente al principio de la técnica. Su inmediata tinción con fucsina fenicada de Ziehl (también en caliente) logra que las esporas tomen el colorante y lo retengan a pesar de la decoloración con ácido y alcohol, por lo cual se comportan como elementos ácido-alcohol resistentes. No sucede lo mismo con los somas bacterianos, los cuales quedan coloreados finalmente con el contracolorante.

7. Dorner

Materiales

Colorante: solución de carbolfucsina.

Técnica: en un tubo de ensayo, preparar una suspensión abundante de las bacterias en estudio en agua destilada.

Coloración: agregar igual volumen de solución de carbolfucsina de reciente filtración.

Hervir en baño María entre 5 y 10 min.

En un portaobjetos colocar igual volumen de la suspensión bacteriana hervida y de nigrosina.

Extender, secar con calor suave y observar.

Interpretación: esporas, color **rojo**; bacterias: **casi incoloras** sobre fondo gris oscuro.

Fundamento: en este caso, el calor facilita la penetración del colorante en el interior de las esporas, las cuales resaltan con su color rojo sobre un fondo gris otorgado por la nigrosina.

8. Gray

Materiales

Colorante principal: fucsina fenicada de Ziehl Neelsen.

Mordiente

Técnica: extender una gota de agua destilada cubriendo aproximadamente 2 cm^2.

A partir de un cultivo joven, tomar parte de una colonia con una aguja de inyecciones y tocar la gota de agua en varios puntos, mezclando con inclinaciones suaves del portaobjetos.

Secar al aire, sin calentar.

Coloración

Mordiente	10 min
Lavado suave con agua	
Fucsina de Ziehl Neelsen	entre 5 y 10 min

Lavado con agua, secado al aire y observación.

Interpretación: bacterias y cilias, color **rojo.**

Fundamento: debe recordarse que los flagelos, que son extensiones extremadamente finas, requieren de un manejo especial para poder ser visualizados por métodos de coloración, ya que son termolábiles, sumamente frágiles y se hallan fuera del poder de resolución del microscopio. El empleo de un mordiente fresco y eficaz brindará el resultado deseado al aumentar el tamaño de los flagelos por precipitación de dicha sustancia sobre la superficie ciliar. Posteriormente este precipitado sirve como capa coloreable, de manera que después de la aplicación del colorante, los flagelos se tornan observables como filamentos de variable número y disposición.

9. Casares Gil

Materiales

Colorante principal: fucsina fenicada de Ziehl.

Mordiente

Técnica: extendido y secado: igual que en técnica de Gray.

Coloración

Diluir partes iguales del mordiente y agua.

Filtrar y cubrir el preparado durante	1 min
Volcar	
Fucsina fenicada de Ziehl.	5 min

Lavar con agua, secar y observar.

Interpretación: bacterias y cilias, color **rojo.**

10. Giemsa

Materiales

Solución madre de Giemsa.
Solución buffer fosfato ácido de sodio (0,067 M).
Solución buffer fosfato disódico (0,067 M).
Agua amortiguada (pH 7,2).
Solución de trabajo de Giemsa (preparar antes de usar).

Técnica: extendido o impronta de tejidos según método clásico.
Secado al aire.
Fijado con alcohol etílico absoluto durante 5 min

Coloración

Solución de trabajo de Giemsa 1 hora
Lavado rápido con alcohol etílico 95°.
Secado y observación.

Interpretación: cuerpos de inclusión clamidiales de color **rojo púrpura.**

Fundamento: cuando se habla de Chlamydias y de Rickettsias se trata de elementos parasitarios intracelulares obligados, en cuyo caso hay que utilizar métodos de tinción que permitan la coloración de las células y su diferenciación con los cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos y basófilos típicos de estas bacterias.

11. Stamp

Materiales

Solución madre de fucsina.
Solución de carbolfucsina.
Solución madre de azul de metileno.
Solución hidroalcohólica de azul de metileno

Técnica: extendido o impronta de tejidos según técnicas clásicas.
Secado y fijado por calor.

Coloración

Solución de carbolfucsina diluida 1/5 5 min
Lavado con agua.
Decoloración con ácido acético al 0,5% 30 seg
Lavado con agua
Azul de metileno al 1% 20 seg
Lavado con agua, secado y observación.

Interpretación: cuerpos elementales clamidiales de color **rojo.**

12. Coloración de Dienes o PPLO

Materiales

Colorante

Coloración

Extender una gota del colorante en un cubreobjetos y dejar secar.
Cortar un trozo de agar con colonias de *Mycoplasma.*
Colocar el agar sobre un portaobjetos dejando las colonias hacia arriba.
Colocar el cubreobjetos sobre el agar, con el colorante hacia abajo y sin frotar.
Sellar el preparado con una mezcla de vaselina y parafina.
Observar en el microscopio con poco aumento.

Interpretación: colonias de *Mycoplasmas* con centro **azul oscuro** y periferia **azul claro**.

13. Auramina-rodamina

Materiales

Colorante principal: solución de auramina-rodamina.

Mezclar bien las soluciones (en caliente y agitando enérgicamente durante 5 min), filtrar con lana de vidrio y guardar en frasco con tapón de vidrio bajo refrigeración (se conserva por varios meses)

Decolorante: ácido clorhídrico al 3% en alcohol etílico de 70°.

Colorante de contraste: permanganato de potasio al 0,5%.

Técnica: extendido y secado.

Fijado por calor (en calentador de portaobjetos) durante 2 h a 65 °C.

Coloración

Solución de auramina-rodamina	15 min
Lavado con agua	
Acido clorhídrico al 0,5% en alcohol	2 a 3 min
Lavado con agua	
Permanganato de potasio al 0,5%	2 a 4 min

Lavado con agua, secado al aire y observación con microscopio de fluorescencia.

Interpretación: bacterias de color **amarillo-anaranjado**.

Fundamento: esta técnica es muy utilizada para detectar bacterias ácido-alcohol resistentes de manera rápida y eficaz. Dichas bacterias se tiñen de color amarillo-anaranjado y son fácilmente visualizadas sobre un fondo oscuro gracias al uso de luz UV; se necesita además un aumento menor que en los métodos habituales.

14. Naranja de acridina

Materiales

Colorante: naranja de acridina.

Solución madre de acetato de sodio.

Técnica: extendido o impronta, según métodos clásicos.

Secado al aire.

Fijado con metanol.

Coloración

Naranja de acridina	2 min

Lavado con agua, secado al aire y observación.

Interpretación: bacterias y hongos, **fluorescencia roja**; otras células, **fluorescencia amarillo-verdosa.**

BIBLIOGRAFIA

Finegold SM, Martin WJ. Bailey-Scott. Diagnóstico microbiológico. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires. 1983.

Finegold SM, Baron EJ, Wexler HM. A clinical guide to anaerobic infections. Wadsworth Anaerobe Laboratory, Los Angeles, California, 1992.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn (Jr.) WC. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Ed. Lippincott, Philadelphia. 1997.

Linzitto OR, Tunes M del L, Menéndez NA, Basualdo Farjat JA, Bautista E. Manual de Chlamydias y métodos de diagnóstico en el laboratorio microbiológico. Marzo de 2000.

Sebald M, Tacquet A, Bricout F. Técnicas en bacteriología. Ed. Jims, Barcelona. 1977.

Tunes M del L. Guías prácticas de Microbiología. Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, 1981.

Capítulo 9

TOMA DE MUESTRAS

María del Luján Tunes

CICLO DIAGNOSTICO

Cuando se produce una enfermedad, los pasos a seguir para llegar a un diagnóstico y tratamiento correcto son varios y se encuentran estrechamente relacionados entre sí.

Todo se inicia con la consulta al clínico por un proceso que afecta la salud del paciente y que, tras el primer examen, conduce a un diagnóstico tentativo de la enfermedad. Para acceder a un diagnóstico definitivo, se procede a realizar una serie de estudios complementarios que, cuando se trata de una enfermedad infecciosa, incluye la identificación del agente causal de la noxa.

Para una correcta identificación del microorganismo actuante o responsable de la patología deben seguirse los siguientes pasos básicos, que por lo general mantienen el mismo orden en la mayoría de los casos:

1. Toma de muestra.
2. Identificación tintorial.
3. Aislamiento y cultivo del microorganismo.
4. Identificación bioquímica.
5. Identificación serológica.
6. Determinación de la sensibilidad a antimicrobianos o antibiograma.
7. Estudios complementarios de identificación (fagotipificación, PCR, inoculación, etc.).

Estos pasos pueden alterar su secuencia si la muestra en estudio proviene de áreas normalmente estériles o colonizadas, o bien si corresponden al esquema identificatorio de bacterias especiales como *Mycobacterium tuberculosis*, tal como se observa en los esquemas correspondientes.

CONCEPTO DE ENFERMEDAD INFECCIOSA

En líneas generales, se entiende por infección la presencia de microorganismos en un organismo hospedador, y se pone en evidencia cuando dichos microorganismos provocan una respuesta visible en él. Cuando un microorganismo es capaz de causar una infección, es un microorganismo patógeno, y la agresividad con que dicho microorganismo patógeno provoca daños en el organismo se denomina virulencia.

La respuesta que el organismo hospedador tiene ante dicha agresión se denomina local cuando su extensión no sobrepasa los límites del sitio de la infección, originando infecciones de tipo agudo, crónico y granulomatoso, y generalizada o sistémica, cuando el compromiso del organismo es total.

CONCEPTO DE MUESTRA

Etimológicamente, el término muestra significa "parte de un todo que se toma para representar el conjunto".

Por ello, la toma correcta de las muestras para su posterior observación y cultivo permitirá la obtención de referencias acerca de las bacterias presentes en el organismo (por ej., variedad de formas y coloración), de los diferentes tipos celulares (por ej., células inflamatorias) y de la existencia de ciertas sustancias cuya presencia se detecta por la formación de cristales.

Origen de la muestra

El origen de las muestras que se manipulan en el laboratorio es variado, ya que éstas pueden provenir de cultivos realizados previamente o bien de material clínico. En este último caso, las muestras pueden clasificarse en forma muy general según el área de la cual provienen, por lo que se distinguen dos grandes grupos.

Las muestras de **áreas normalmente estériles** son aquellas que por lo general no presentan bacterias (sangre, orina renal y vesical, líquidos cefalorraquídeo (LCR), sinovial y peritoneal), mientras que las provenientes de **áreas normalmente colonizadas** son aquellas que habitualmente contienen bacterias que corresponden a la microbiota nativa de la zona (tractos respiratorio, digestivo, genital y auditivo, piel).

Se define como **microbiota normal, indígena o nativa** al conjunto de bacterias saprófitas (no patógenas) normalmente existentes en puntos determinados del organismo; y la **microbiota patógena** es la conformada por las bacterias de presencia ocasional en el organismo y cuya aparición está relacionada en forma directa con la producción de enfermedad.

Materiales utilizados para la recolección de muestras

Tanto el tipo como la calidad del material empleado para la toma de muestras son importantes, porque de una buena recolección de los especímenes depende el éxito del proceso de investigación.

Instrumentos

Hisopo: es uno de los elementos más empleados en la toma de muestras, pero no es aconsejable para investigar bacterias anaerobias. Está constituido por una torunda de material absorbente (algodón, alginato de calcio o poliéster) colocada en el extremo de un soporte de madera, poliéster o alambre de nichrome o aluminio. Aunque práctico y económico, el soporte de madera puede contener ciertas resinas que llegan a afectar la sobrevida bacteriana cuando el hisopo se impregna con la muestra, por lo que actualmente es remplazado por soportes de materiales inertes.

Jeringas: antiguamente reciclables de vidrio y en la actualidad remplazadas por las de material descartable, son de utilidad cuando las muestras deben tomarse por punción y posterior aspiración. Se adquieren ya estériles y listas para su uso, al igual que las agujas complementarias.

Bisturí: de utilidad en ciertos casos en que la obtención de la muestra debe efectuarse por punción y posterior drenaje (por ej., en abscesos).

Recipientes

Luego de la toma, la muestra puede ser conservada dentro del instrumento utilizado para su extracción (por ej., jeringa) o bien debe ser colocada en un recipiente a la espera de su procesado, que por lo general conviene que sea inmediato.

Los recipientes destinados a la conservación de las muestras para el estudio microbiológico deben ser indiscutiblemente estériles pues no puede permitirse que a la muestra se añada la carga bacteriana existente en dichos receptáculos. Entre éstos se distinguen:

Cápsulas o placas de Petri: son cajas circulares de vidrio (reciclable) o de material plástico preestéril (descartable), constituidas por dos tapas de diferente diámetro (6, 8 o 10 cm) y de poca profundidad (15 a 20 mm), lo que permite la colocación de una de las partes dentro de la otra; se las emplea básicamente para cultivos.

Culturette: equipo descartable aeróbico o anaeróbico, formado por un tubo que incluye un hisopo y una pequeña ampolla con medio de transporte.

Las muestras que se remiten al laboratorio para control bacteriológico, micológico o virológico no deben contener preservadores, pues se provoca la muerte de las bacterias, hongos y virus que se busca identificar. Los preservadores sólo se emplean con muestras para histopatología y parasitología. Además conviene recordar que ninguna muestra tomada para cultivo debería someterse a congelamiento.

Medios de transporte

También llamados medios de mantenimiento, mantienen el pH adecuado, evitan la deshidratación del material clínico y fuera del organismo facilitan la sobrevida de especies bacterianas susceptibles a la desecación, sin favorecer su multiplicación. Entre ellos se distinguen los medios de Stuart (modificado), modificado por Sachs, de Amies, de Cary y Blair, y el medio T.A.B.

Sobrevida bacteriana

El medio de Cary y Blair tiene la característica de mantener durante más tiempo la sobrevida bacteriana. Por ejemplo, a *Salmonella* y *Shigella* las mantiene durante 45 días; a *Vibrio cholerae*, durante 22 días, y a *Yersinia pestis*, durante 75 días. Además la conservación del medio a temperatura ambiental es de 18 meses.

También existen sustancias que añadidas oportunamente alargan la vida bacteriana. Tal es el caso del gel de sílice (también conocido como silica gel), que mantiene en sobrevida los *Streptococcus* del grupo A por 3 días.

REMISION DE LAS MUESTRAS

La remisión de la muestra al laboratorio debe hacerse con premura para realizar un procesado inmediato. Lo ideal es tomar la muestra dentro del mismo laboratorio, pero cuando la maniobra es imposible (paciente incapacitado para desplazarse o falta de laboratorio de referencia o consulta) hay que tener en cuenta si la remisión de la muestra para su procesado durará unos minutos, unas horas o si el destino final es más lejano. Todas las muestras deben hallarse correctamente rotuladas.

Remisión para procesado inmediato

Muestras con bacterias sensibles a los cambios de temperatura (por ej., LCR con *Neisseria meningitidis*).

Muestras variadas sospechosas de incluir bacterias anaerobias recolectadas con hisopos de algodón.

Remisión para procesado en horas

Muestras con abundante carga bacteriana (esputo, orina y muestras fecales) que pueden conservarse refrigeradas a 5 °C durante varias horas antes de ser cultivadas.

Muestras variadas recolectadas con hisopos de algodón sin que se sospeche la presencia de bacterias anaerobias.

Remisión a distancia para procesado diferido

Envío bajo refrigeración (por ej., para diagnóstico viral): caja de telgopor con refrigerante comercial (para remisión de muestras fecales y tisulares, LCR, muestras orofaríngeas, rectales y suero sanguíneo).

Envíos postales

Para muestras de hasta 50 ml deben emplearse dos recipientes impermeables colocados uno dentro del otro; el envase interno debe estar provisto de cierre hermético; el espacio intermedio entre ambos recipientes debe ocuparse con material absorbente, en prevención de derrames del envase interno; en el exterior deben llevar una etiqueta fácilmente visible que indique su riesgo biológico (figs. 9-1 y 9-2).

Todo este conjunto se introducirá en un envase para envío de cartón corrugado, madera o material similar, rotulado externamente con etiquetas especiales que especifiquen el tipo de material que se remite.

Las muestras fecales con bacterias patógenas (*Salmonella* y *Shigella*) se recolectan como una capa fina en tiras de papel de filtro o papel secante y se dejan secar a temperatura del laboratorio; luego se pliega el papel mediante el uso de una pinza y se lo coloca en una bolsa de polietileno, para finalmente envasarlo en un recipiente doble.

Si la muestra debe conservarse durante un tiempo antes de ser cultivada, se obliga el uso de una solución preservadora (por ej., solución fisiológica con glicerina), con la que se realiza una suspensión de 1 g de materia fecal en 10 ml de solución preservadora y se remite en frasco de vidrio grueso con tapa a rosca y dentro del envase doble.

Metodología utilizada para la toma de muestras

Las técnicas de toma de muestras varían según el órgano o sistema de origen de éstas y la sospecha del tipo respiratorio del o de los agentes patógenos actuantes, ya que en la muestra a tomar pueden encontrarse tanto bacterias aeróbicas como anaerobias.



Figura 9-1. Etiqueta de riesgo biológico.

MUESTRAS PARA CULTIVO AEROBICO

Las generalidades ya fueron descritas en los ítems anteriores.

Muestras para cultivo anaerobio

Esta clase de muestra podría considerarse especial, tanto por los requisitos necesarios para la toma de muestra como por su aislamiento obligado del oxígeno ambiental.

Selección de la muestra: se obliga el cultivo en anaerobiosis cuando se presentan heridas profundas o mordeduras, tejidos necrosados, líquidos procedentes de zonas normalmente estériles obtenidos por punción (sangre y líquidos peritoneal, sinovial, amniótico y pleural), abscesos en tejidos blandos o en órganos (cerebro, pulmón, hígado, etc.), además de materiales cuya morfología bacteriana sugiere la existencia de microorganismos anaerobios.

Correcta recolección anaeróbica de la muestra: para obtener acertadamente el material se aconseja no utilizar hisopos, sino aspirar con aguja y jeringa con la finalidad de minimizar la contaminación por la microbiota normal anaerobia de la zona. Los elementos que deben recolectarse de esta forma son pus (en abscesos cerrados), líquido pleural (por técnica de toracocentesis), orina (por punción vesical prepúbica), secreciones pulmonares (por técnica de aspiración transtraqueal), líquido peritoneal y material del sector sinusal (se remplaza la aguja por un catéter fino que se coloca en el pico de la jeringa).

Si eventualmente debieran emplearse hisopos, lo correcto es tomar la muestra con el método de dos tubos; uno de ellos con el medio de transporte previamente reducido o regenerado (por ej., medio de Cary y Blair) y el otro para contener la muestra en CO_2 libre de oxígeno, con la condición de realizar el cultivo lo más rápido posible. Por su parte, la Bio-Bag® anaeróbica permite el transporte del material en perfectas condiciones de anaerobiosis.

Debe tenerse en cuenta que, por ser los anaerobios bacterias integrantes de la microbiota normal de ciertos puntos del organismo, no deben cultivarse en anaerobiosis muestras provenientes de orofaringe, nariz, contenido gástrico, recto, materia fecal, esputo, y muestras obtenidas por broncoscopia, uretra, orina, vagina y cuello del útero.

Con respecto a la cantidad de muestra a tomar, hay que tener en cuenta su carga bacteriana: cuanto mayor sea la cantidad de bacterias presentes, menor será el volumen de muestra a tomar.

Otro tema de interés es la temperatura de conservación de la muestra, ya que hay bacterias que son sensibles a los cambios de temperatura (por ej., los microorganismos que pueden hallarse en LCR). Sin embargo, hay ciertas muestras que obligatoriamente necesitan ser refrigeradas si no se procesan de inmediato; tal es el caso de orina, materia fecal, hisopados de diversos orígenes, esputo y/o secreciones bronquiales, los que deben someterse a 5 °C si deben transcurrir unas horas hasta el procesado final.

Transporte anaeróbico de la muestra: tras la toma de muestra, es imprescindible salvaguardar la microbiota anaerobia del efecto letal del oxígeno ambiental. Por ello, debe volverse una costumbre el empleo de medios de transporte adecuados, como los siguientes:

***Tubo desgasificado*:** equipo compuesto por un tubo con tapón de goma de butilo ahuecado y tapa a rosca, que contiene medio de transporte no nutritivo con cisteína y resazurina, previamente reducido con CO_2.

***Tubo anaeróbico Bellco®*:** tubo de recolección de muestras para bacterias anaerobias; consta de una tapa doble y contiene una atmósfera de N_2 o de CO_2 con ausencia total de oxígeno; la muestra se inyecta a través del tapón de goma, previo "purgado" (eliminación del aire atmosférico) de la jeringa y de la aguja. El material se extrae del tubo de igual forma y con las mismas condiciones de anaerobiosis.

***Bio-Bag® anaeróbica*:** facilita el transporte de jeringas plásticas descartables con la muestra obtenida; además permite el traslado de hisopos contenidos en tubos sin medios de transporte ni humectantes de la muestra, así como también de trozos tisulares pequeños colocados en tubos o ampollas estériles.

***Transporte anaeróbico Vacutainer®*:** incluye sustancias reductoras.

***Culturette® anaeróbico*:** produce una atmósfera anaerobia favorable y además contiene medio de transporte que no permite la desecación de la muestra.

***Cultivo anaeróbico de la muestra*:** es conveniente que los medios estén recién preparados para que cumplan con los requisitos mínimos correspondientes; si los medios no son fabricados para utilizarlos de manera inmediata, se aconseja mantenerlos en atmósfera anaerobia para dilatar su vida útil, y si la conservación de los medios se realiza por más de 72 horas es preciso que la atmósfera anaerobia no contenga CO_2. Preservar los medios recién preparados en bolsa plástica y bajo refrigeración los conserva por unas 2 semanas.

Obviamente, un medio de cultivo anaeróbico no es suficiente para la multiplicación de esta clase de bacterias, porque además a estos microorganismos hay que brindarles una atmósfera anaerobia que permita su desarrollo. De todos los métodos conocidos (cámara anaeróbica, tubo PRAS y caja con guante), el más adecuado para su manejo en el laboratorio es el frasco o jarra anaeróbica (GasPak® o similares), que posee un catalizador y puede emplearse con sobres de mezclas reductoras o bien con gases como nitrógeno, hidrógeno (peligroso por ser explosivo), gases inertes o CO_2.

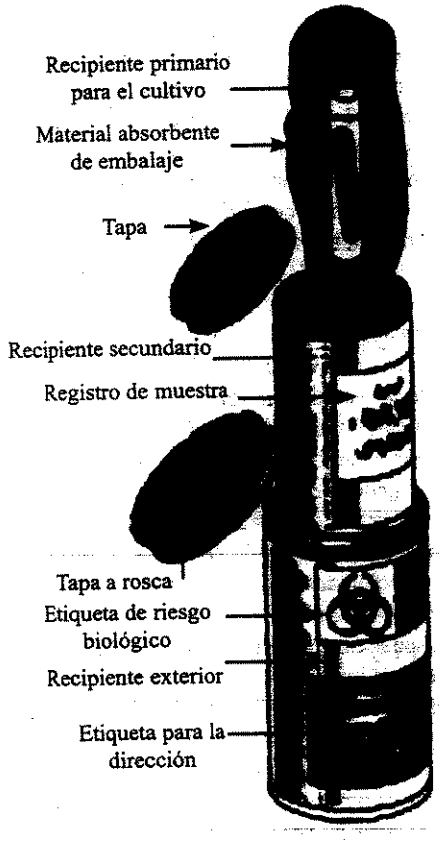


Figura 9-2. Envases para envío de muestras biológicas.

METODOLOGIA ACONSEJADA SEGUN EL TIPO DE MUESTRA

Especial referencia en pequeños animales

TRACTO RESPIRATORIO

En su mayoría, las infecciones del tracto respiratorio anterior (o superior) son secundarias a varios procesos precedentes, tales como abscesos dentales, infecciones virales, cuerpos extraños, traumatismos, infecciones micóticas y neoplasias. Luego de una inflamación del epitelio rinosinusal pueden hallarse colonizaciones provocadas hasta por la microbiota indígena o normal, que posteriormente prolonga el cuadro inflamatorio y puede llegar a derivar en procesos más agresivos, como condritis y osteomielitis.

Con respecto a las infecciones del árbol respiratorio posterior (o inferior), éstos pueden originarse en la aspiración de contenido gastrointestinal por reflujo o vómito, tal como sucede en ciertos cuadros neumónicos y bronconeumónicos.

Entre las bacterias con mayor porcentaje de responsabilidad en las patologías respiratorias se encuentran *Bordetella bronchiseptica*, *Mycoplasma*, *Chlamydia* y *Chlamydiophyla*, *Ehrlichia*, *Streptococcus*, *Pasteurella*, *Staphylococcus* y *Klebsiella* spp, además de *Escherichia coli*. También ciertos hongos pueden afectar el aparato respiratorio, como sucede con *Cryptococcus* y *Aspergillus*, y los adenovirus, el virus del distemper canino y otros virus pueden ocasionar patologías a este nivel.

Para hacer más comprensibles las distintas metodologías de toma de muestras en un sistema tan amplio como el respiratorio, éste ha sido subdividido de la siguiente forma:

Rinofaringe

Los cultivos bacteriológicos de la zona pueden ser de difícil interpretación debido a que no siempre se obtiene una clara idea del origen de la patología. La microbiota es variada y comprende tanto bacterias aerobias como bacterias anaerobias y hongos.

Las muestras pueden tomarse con variados elementos: hisopo (con aplicador de alambre cromado o de acero inoxidable), catéter blando rinofaríngeo, tubo con gotas de caldo o con equipo Culturette® para evitar la desecación de la muestra y la muerte bacteriana.

Aunque no es lo ideal, si la muestra se derrama a través de los orificios nasales, es necesario realizar una limpieza de la zona y posteriormente se toma la muestra mediante el hisopado de la cara interna de las ventanas nasales.

Lo correcto es tomar la muestra de la profundidad de la cavidad nasal. Según el tamaño de los orificios nasales será necesario el uso de un dilatador de éstos para evitar que el hisopo contacte con zonas periféricas no deseadas. También se previene la contaminación por medio del empleo de hisopos protegidos, previa sedación o inducción anestésica del animal enfermo.

Si la muestra a tomar es líquida y se encuentra en cantidad suficiente, puede aspirarse mediante una jeringa; en caso contrario, se puede llevar a cabo una irrigación con un volumen mínimo de solución salina para extraer el material por "lavado" de la mucosa nasal.

Cuando el punto de muestreo se encuentra en la porción rinofaríngea posterior, el hisopo puede ser doblado en ángulo recto cerca de la torunda, y al colocarlo por la boca y por detrás del velo del paladar se accede sin dificultad al sitio buscado. Debe recordarse no contactar con mucosas ajenas al punto de muestreo ni antes ni después del hisopado.

Orofaringe

En este caso, la muestra se toma con un hisopo con punta de poliéster y luego se transporta en un tubo con medio de Stuart.

Para tomar esta muestra debe mantenerse fija la cabeza del paciente y además se hace imprescindible el uso de un abrebocas adecuado a la especie animal a tratar. Se efectúa un hisopado de la zona afectada después de ejercer una suave tracción en la lengua del paciente para exponer perfectamente la garganta. No siempre se necesita de la sedación o inducción anestésica.

Después de tomar la muestra, el hisopo debe retirarse sin tocar la lengua, los carrillos y los labios.

Cuando se efectúa la toma de muestra en el humano en pos del aislamiento viral y la muestra debe ser remitida por correo, el hisopo debe refrigerarse, jamás congelarse. Dicha muestra se coloca dentro de una bolsa de polietileno que se sella. La bolsa sellada se introduce en una caja con hielo y el conjunto se coloca dentro de otra bolsa plástica especialmente adaptada para el envío postal de agentes etiológicos.

Sector laringotraqueal

En la zona laríngea, la infección más grave que pone en riesgo la vida del enfermo es la que afecta la epiglotis, cuya inflamación puede obstruir totalmente las vías aéreas y provocar la muerte del paciente si no se recurre a procedimientos drásticos como la traqueotomía o la intubación traqueal.

Cuando la epiglotis está comprometida no deben realizarse hisopados de la zona sin previa intubación o traqueotomía para evitar la asfixia por espasmo laríngeo reflejo. Estudios realizados en pacientes traqueotomizados por largo tiempo han demostrado una veloz colonización traqueal con diferentes especies bacterianas después de la maniobra mencionada. Esto dificulta la identificación del agente patógeno principal y su aislamiento de la microbiota colonizante, con el lógico inconveniente para implementar un tratamiento acertado.

La muestra se toma por técnica de aspiración translaríngea o transtraqueal percutánea. En ciertas ocasiones, una simple muestra de sangre permite el diagnóstico de forma más simple y rápida, según la bacteria involucrada en la enfermedad.

En caso de tomarse la muestra por lavado traqueal, ésta permitirá una evaluación de la carga microbiana y celular durante el proceso de enfermedad respiratoria posterior.

Lavado endotraqueal

En este caso es recomendable la inducción anestésica del paciente para poder realizar la intubación y/o manipulación y evitar reflejos de tos o movimientos que impidan la toma de muestra de manera rápida y eficaz, aunque también pueden emplearse sedantes.

Después de anestesiado el animal, se procede a intubarlo, y por dentro del tubo endotraqueal estéril se introduce un catéter urinario de calibre 3,5 francés (también estéril) hasta la carina, ubicada a nivel del cuarto espacio intercostal. Inmediatamente se añade solución salina para efectuar el lavado traqueal, sobre todo cuando la cantidad de secreciones no es muy abundante y el volumen aspirado por el catéter es mínimo.

Lavado transtraqueal

La aplicación de esta técnica no siempre implica la sedación del animal; normalmente basta ubicarlo en decúbito ventral con la nariz dirigida hacia arriba (en ángulo de 45° con respecto al plano horizontal) y dejando visible la zona ventral del cuello. Antes de la maniobra de toma de muestra debe depilarse la zona correspondiente, efectuar la asepsia de la piel y la posterior anestesia local.

Para llevar a cabo este método se necesita uno de los siguientes equipos básicos: un catéter endovenoso y una aguja calibre 18 o 22 para acceder a la luz traqueal, o bien un catéter calibre 14 corto y una sonda urinaria para caninos calibre 3,5 francés.

Este procedimiento es aplicable a cualquier tipo de animal y el catéter que se introduce en la tráquea debe llegar hasta la carina; obviamente, en casos de animales de gran porte, la penetración en la tráquea deberá realizarse a través de los anillos traqueales para permitir el acceso del catéter al punto indicado.

En el caso de animales de tamaño mediano, la aguja debe introducirse a través del ligamento cricotiroides, cuya ubicación se palpa como una depresión por encima del cartílago cricoides. Una vez realizada la asepsia de la zona y fijada la tráquea, se atraviesa el ligamento manteniendo el cono de la aguja o del catéter hacia arriba, para que la punta se introduzca en la tráquea hacia los bronquios grandes. Luego se procede a "enhebrar" el catéter endovenoso o la sonda urinaria por la luz de la aguja, y se lo introduce hasta la carina. De inmediato se procede a realizar la aspiración de las secreciones presentes.

Para efectuar el lavado se emplea solución salina de NaCl al 0,9% sin preservadores (solución fisiológica); las jeringas son de 12 ml (en total, unas 4 a 6 jeringas), cargadas con 5 ml de solución de lavado; después de inyectado el volumen de una jeringa, debe realizarse la aspiración enérgica del líquido introducido en la tráquea, que se aspira con las secreciones respiratorias. El volumen necesario para estudios bacteriológicos es de 1 a 2 ml de líquido turbio.

Secreciones bronquiales y de sacos alveolares

Por lo general, las diferentes especies animales no son capaces de realizar la expectoración de las secreciones bronquiales como lo hace el hombre, porque cuando dichas secreciones alcanzan la faringe automáticamente son deglutidas.

Estas secreciones pueden obtenerse sin contaminación orofaríngea mediante broncoscopia, la cual debe realizarse antes de instituir un tratamiento antimicrobiano. Este método permite la evaluación y la recolección de muestras de zonas localizadas del pulmón. Las muestras así conseguidas pertenecen a regiones más profundas que las obtenidas mediante la técnica de lavado traqueal.

Para implementar esta técnica se necesita la anestesia general del paciente, por lo cual está contraindicada en casos de afecciones respiratorias intensas. En este método se utiliza un endoscopio de fibra óptica flexible estéril y de 2 mm de luz, que puede introducirse en el árbol respiratorio con o sin tubo endotraqueal. El material para estudios bacteriológicos se recolecta por lavado, cepillado con hisopos protegidos o bien con muestras tisulares.

Lavado broncoalveolar

Se implementa cuando el material obtenido por lavado traqueal no es el esperado. Es importante recordar que la muestra obtenida por lavado broncoalveolar es típica de los procesos infecciosos de las vías respiratorias pequeñas, alveolares y hasta intersticiales.

Puede tomarse la muestra mediante el lavado con solución salina a través del broncoscopio o bien empleando un tubo endotraqueal y aspirando mediante un catéter. El líquido proveniente de esta región pulmonar es espumoso.

Es imprescindible efectuar el cultivo inmediato o con refrigeración previa de hasta 30 minutos sin riesgo de alterar la sobrevida bacteriana. Cuando la muestra debe remitirse al laboratorio y el procesado debe diferirse, es prudente recurrir al medio de transporte de Stuart (modificado) para preservar intacta la muestra.

En el laboratorio diagnóstico humano, esta técnica se aplica en pacientes que no pueden producir muestras apropiadas de esputo y en aquellos que padecen infecciones pulmonares a bacterias anaerobias, como abscesos pulmonares o neumonía por aspiración. Para un correcto análisis, deben desecharse las muestras constituidas por saliva, ya que lo importante es la obtención del esputo traqueobronquial por medio de tos profunda; el material se expectora directamente sobre una placa de Petri u otro recipiente adecuado estéril, siendo necesarios sólo de 1 a 3 ml de muestra purulenta o mucopurulenta, excepto para cuando se desea cultivar el bacilo de la tuberculosis. Si el cultivo se difiere, la tardanza no debe superar las 3 horas posteriores a la obtención de la muestra, que debe mantenerse bajo refrigeración estricta.

También es importante señalar que nunca es provechoso el cultivo del esputo en condiciones de anaerobiosis en pos de un diagnóstico de infección pulmonar anaerobia.

Asimismo puede implementarse la técnica de punción pulmonar directa, de aplicación frecuente en pediatría, cuando el paciente sufre de neumonía asociada a empiema; en este caso, el drenaje benéfico del líquido pleural otorga al laboratorista la oportunidad de obtener una muestra exacta de la microbiota patógena presente en el pulmón.

Punción torácica

Esta metodología se aconseja para pacientes con efusión pleural. Con el animal colocado en decúbito lateral o esternal, se puede conseguir líquido mediante la punción a 2/3 de la distancia existente entre la columna vertebral y las articulaciones condrocostales. Esta práctica necesita un paciente no sedado pero anestesiado en el punto de punción; tras la asepsia, se punza la piel con un catéter mariposa calibre 21 (o mayor, según la viscosidad del material a aspirar), acoplado a una llave de tres vías (que evita la penetración de aire a la cavidad) y a una jeringa. Para evitar la penetración de aire al tórax a través de un orificio de punción directa, con el catéter se atraviesa la piel a dos espacios intercostales del punto de penetración en la cavidad, de forma tal que cuando éste se retire, el desplazamiento lógico de la piel a su posición normal cubra el punto de punción.

En caso de no utilizar el catéter mariposa, pueden emplearse catéteres blandos endovenosos calibre 14 a 16, con 8 a 13 cm de largo, según el tamaño del animal.

Si la toracocentesis no es útil para la obtención de muestras, queda la opción de la colocación de un tubo torácico, en el quirófano y bajo técnicas quirúrgicas establecidas. Este método es útil en casos de piotórax.

TRACTO DIGESTIVO

En este aparato tan poblado en algunos sectores por una importante microbiota normal, hay bacterias que pueden originar diversas patologías. Entre ellas se destacan las bacterias *Helicobacter felis*, *Campylobacter jejuni* y *Clostridium perfringens*, *Salmonella*, *Shigella*, además de los protozoarios y patógenos.

Contenido esofágico

Es obligatorio el estudio de éste y del material de biopsias para detectar la presencia de las bacterias relacionadas directamente con procesos ulcerativos. En felinos se han encontrado tres especies de *Helicobacter*: *H. pylori* (típico de procesos en medicina humana), *H. felis* y *H. heilmanni*; estas dos últimas especies también se han hallado como causantes de patologías en caninos.

Contenido gástrico

La elevada acidez del jugo gástrico dificulta la obtención de bacterias viables. Cuando se hace necesario obtener material de

biopsias con posible colonización bacteriana, se requiere una inducción anestésica del paciente para facilitar la toma de muestra sin correr riesgos.

Contenido intestinal

Las muestras fecales se remiten al laboratorio para detectar bacterias esporuladas y patógenos específicos con antelación a la aplicación de enemas o soluciones de lavado intestinal. Cuando las muestras fecales son diarreicas deben tomarse con preservadores para el diagnóstico parasitológico. En caso de buscar diagnósticos bacteriológico y virológico, las heces diarreicas se recolectarán sin preservadores. Cuando la obtención fecal de manera espontánea se torna muy dificultosa, se hace necesario recurrir al hisopado rectal, aunque este método no permite una gran obtención de material para estudio.

Las muestras fecales se recolectan en recipientes plásticos o parafinados y su remisión al laboratorio debe ser inmediata. En caso de diferirse el procesado de la muestra hasta 3 horas, es prudente emplear los medios de transporte de Cary-Blair, de Amies o de Stuart. Si la demora supera ese lapso, se impone el uso de los medios de Cary-Blair o la mezcla de buffer de fosfato 0,033 M y glicerol por partes iguales, a pH 7 y bajo refrigeración.

Dichas muestras se tratarán de distinta manera según la finalidad del estudio a realizar. Si el diagnóstico implica el aislamiento de *Salmonella*, bastará remitir 1 g de muestra fecal para su siembra; cuando la finalidad es el aislamiento de *Campylobacter*, la muestra recién recolectada debe enviarse sin utilizar el método Culturette; la siembra debe ser inmediata en medios selectivos y la incubación se lleva a cabo a 40 °C. Una muestra de heces con elevado número de esporas por campo microscópico (más de 3 a 5 bacterias esporuladas por campo) sugiere una colitis clostridial, aunque es bueno recordar que muchos animales son naturalmente grandes eliminadores de esporas por esta vía. Finalmente, en caso de micosis intestinal (*Histoplasma* o *Candida* sp) es prudente sembrar el espécimen obtenido por raspado de la mucosa afectada o bien remitir el material de biopsia para su control histopatológico.

Es importante recordar que además de las bacterias mencionadas, en las muestras fecales diarreicas pueden hallarse *Helicobacter*, *Salmonella* y *Campylobacter* spp, agentes productores de colitis clostridial y bacterias enteropatógenas, junto con *Histoplasma*, parásitos nematodos y *Giardia* spp.

Líquido peritoneal

Este material se obtiene mediante la técnica de abdominocentesis, empleando una jeringa acoplada a una aguja o un catéter multifenestrado (por ej., catéter para diálisis). Si de esta forma no se recupera líquido peritoneal, debe recurrirse a una solución fisiológica salina estéril, que se administra intraperitonealmente a razón de 20 ml/kg. Luego de la aplicación, se masajea el abdomen y finalmente se procede a su aspiración. Como muestra se necesitan entre 5 y 10 ml de líquido obtenido por paracentesis.

Secreción biliar

En caso de proceso inflamatorio hepatobiliar puede obtenerse bilis por aspiración con laparotomía exploratoria previa. El abordaje de la vesícula por otros medios es demasiado dificultoso e inseguro como para ser intentado.

Material de abscesos hepáticos

También en este caso debe recurrirse a la cirugía. Cuando se detectan masas hepáticas, pueden realizarse la extirpación de la masa nodular o bien la aspiración del contenido nodular con aguja fina, previa laparotomía.

Intoxicación alimentaria

Las intoxicaciones de este tipo son de especial importancia en medicina humana, y son varias las bacterias responsables de esta patología. La presente es una breve reseña de los diferentes tipos bacterianos y las características principales de cada patología. Por lo general, el diagnóstico bacteriológico en estas intoxicaciones se lleva a cabo en dependencias oficiales.

Bacillus cereus

Su intoxicación cursa de dos formas distintas: la rápida, con 1 a 6 horas de incubación, origina vómitos y se produce por ingerir arroz; la lenta, con 6 a 24 horas de incubación, provoca diarrea y se origina en la ingesta de carne y verdura contaminadas. El diagnóstico se basa en el aislamiento del agente a partir de alimentos sospechosos, siempre en caso de brotes de intoxicación.

Clostridium botulinum

La intoxicación grave provocada por este *Clostridium* puede derivar en la muerte del paciente; se origina en la ingesta de conservas en mal estado, por esterilización deficiente y multiplicación bacteriana en anaerobiosis total con la subsiguiente producción de toxina termolábil y posterior cocción defectuosa. Se diagnostica por aislamiento de la bacteria a partir de los alimentos contaminados. Existe otra forma de intoxicación por esta bacteria denominada botulismo infantil.

Clostridium perfringens

La mayoría de las intoxicaciones se deben a *C. perfringens* tipo A. Por lo general son causadas por la cocción parcial o insuficiente de grandes trozos de carne, en especial carne arrollada o rellena. El primer síntoma que aparece es la diarrea después de 12 a 24 horas de incubación. Esta intoxicación, por lo general, dura poco tiempo y es leve, aunque puede llegar a producirse una enteritis necrosante grave. El diagnóstico implica el aislamiento y el recuento del *Clostridium* a partir de muestras fecales, con posterior tipificación serológica.

Salmonella spp *y Shigella* spp

Estas bacterias penetran en el organismo con los alimentos contaminados y sólo pueden ser aisladas en la etapa aguda de la enfermedad, es decir, dentro de los 3 primeros días del cuadro infeccioso. Pero es importante tener en cuenta que en casos de disentería crónica, la mejor forma de aislar la *Shigella* es mediante el cultivo inmediato del material obtenido por hisopado proctoscópico, ya que esta bacteria desaparece con suma facilidad de las muestras.

Staphylococcus

Se produce por la ingestión de alimentos contaminados con esta bacteria, la mayoría de los cuales son de origen cárneo o lácteo; en éstos la bacteria se ha multiplicado y producido una enterotoxina termoestable. Aparecen vómitos y diarrea entre las 2 y 6 horas de la ingesta, y permanecen hasta las 12 o 18 horas siguientes. Las muestras obtenidas de alimentos o a partir del enfermo se remiten para aislamiento y/o detección de la enterotoxina.

TRACTO URINARIO

Las infecciones urinarias afectan por igual a animales y humanos sin distinción de sexo y edad. Su aparición puede ser espontánea (generalmente, contaminación con materia fecal) o derivada de ciertas maniobras clínicas (sondaje uretral prolongado).

La orina en sí es un magnífico medio de cultivo para los microorganismos patógenos del tracto urinario, de forma tal que cuando las bacterias acceden a ella se multiplican rápidamente y pueden alcanzar (y también superar) la concentración de 10^6

UFC/ml. Por esta razón se debe procesar la muestra dentro de la primera hora de obtenida; en caso contrario, deberá mantenerse refrigerada hasta el momento de la siembra.

En medicina humana se considera que una infección urinaria arroja un recuento de 10^5 UFC/ml, y que la orina de personas no infectadas puede ser estéril o incluir hasta 10^3 UFC/ml.

Pero no siempre el recuento bacteriano es índice confiable de infección urinaria, pues se han visto casos de contaminaciones con bacterias de lento desarrollo y también infecciones localizadas por detrás (o por encima, según la especie) de obstrucciones uretrales por litiasis con bajo recuento bacteriano en la orina recién emitida. El recuento final también es influido por efecto de una medicación antibacteriana precisa o por un exceso de hidratación del paciente.

Las bacterias más frecuentemente halladas en este medio son *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Proteus* y *Streptococcus* spp, aunque también han sido aisladas *Mycoplasma* y *Ureaplasma* spp. Algunas de estas bacterias aparecen sobre todo en animales cateterizados y otras a posteriori de una uretrostomía.

Las infecciones que dichos microorganismos pueden provocar son varias, desde la primoinfección urinaria simple, pielonefritis, infecciones prostáticas, vaginitis, uretritis e infecciones que por simpatía afectan los órganos genitales de hembras y machos por igual.

Básicamente las muestras de orina puede tener dos orígenes, a saber: vesical y renal.

Orina vesical

Obtención de la muestra por micción espontánea

En animales, lo ideal es recolectar el chorro medio de la orina previa higiene genital del paciente, pero generalmente se trata de una maniobra bastante engorrosa para realizar y no siempre da buenos frutos. De todas formas, este tipo de muestra se halla contaminada con la microbiota existente en la uretra y la vagina o el prepucio, además de poseer una elevada carga celular. Los resultados en cultivos ejecutados con muestras obtenidas de esta forma no son confiables, pues en el 85% de los casos el desarrollo bacteriano se debe a la microbiota uretral normal.

En la mujer, la micción espontánea es la forma más común de obtener la muestra deseada. Presenta el inconveniente de su fácil contaminación, pese a que previamente debe realizarse la higiene de los genitales externos con jabón nuevo, enjuague con agua estéril y sin secado posterior de la zona higienizada. Se debe eliminar el chorro inicial de la orina porque "lava" la porción final de la uretra y la vagina; la muestra debe recolectarse en un recipiente estéril; se aconseja la obtención de dos muestras sucesivas (por interrupción voluntaria de la micción) a fin de conseguir un máximo porcentaje de seguridad en el recuento bacteriano final.

Con respecto al hombre, la muestra de orina se recolecta por micción espontánea dividiendo la emisión de orina en tres partes. La primera se utiliza para cultivo uretral, la segunda parte de la micción se emplea para cultivo de orina vesical, y la última porción (por masaje posprostático) permite la detección de infecciones urinarias bajas a nivel de la uretra o la próstata.

Obtención de la muestra por sondaje

Es la forma clásica de obtención de muestras de orina a nivel veterinario, pero no la aconsejada para realizar cultivos bacterianos debido a que la sonda arrastra y lleva a la vejiga toda la contaminación existente en la vagina y la uretra provocada generalmente por *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Pasteurella* sp como representantes de la microbiota normal, y por *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis* como miembros de la microbiota no indígena. De todas formas es una técnica útil y aplicable para obtener una buena cantidad de muestra, sobre todo para el estudio citológico y químico del espécimen, y siempre debe llevarse a cabo previa higiene genital.

En las hembras caninas, el sondaje se realiza más cómodamente con la paciente en estación, se coloca un espéculo vaginal o un espéculo nasal para obtener una buena dilatación que permita la manipulación sin inconvenientes; luego se introduce la sonda en la vagina, y por el piso de ésta se ubica el orificio uretral externo. Luego se introduce la sonda (urinaria de polipropileno 10 francés o catéter de Foley) en la uretra y finalmente se accede a la vejiga, hecho que se detecta por el flujo espontáneo de orina por la sonda.

En las hembras felinas, el sondaje se lleva a cabo sin poder visualizar el orificio uretral externo, por lo cual pueden emplearse un catéter Foley, una sonda de polipropileno 10 francés o bien un catéter metálico para perras. La posición que debe tomar la paciente es la de decúbito esternal y la sonda elegida se introduce en vagina realizando una leve presión hacia abajo, con lo que se accede a la vejiga tras intentos en general dificultosos y fallidos.

En los machos caninos, el sondaje se lleva a cabo tanto con el paciente en pie como en decúbito, según el tamaño del animal. Primero se procede a seleccionar el tipo de sonda, la cual puede ser un catéter de polipropileno 5, 8 o 10 francés o bien una sonda blanda para alimentación pediátrica 5 u 8 francés.

Posteriormente se debe realizar la retracción prepucial y la higiene de los genitales externos; luego se toma la punta del catéter (el resto queda retenido dentro de la bolsa de origen) y se la introduce en el orificio uretral externo, tras lo cual se la hace avanzar a lo largo del canal uretral hasta acceder a la vejiga. Finalmente se obtiene el flujo espontáneo de la orina a través de la sonda.

En los machos felinos, el sondaje se realiza con una sonda de polipropileno 3,5 francés "tomcat" colocando al paciente en decúbito dorsal. Por diversos factores (tamaño, carácter o castración previa del paciente) es aconsejable proceder a la sedación o inducción anestésica del gato. Luego debe retraerse el prepucio, fijarse el pene e higienizarlo. Al igual que para la manipulación de caninos machos, el catéter se extrae parcialmente de su envase y su punta se introduce en el orificio uretral externo. Para hacerlo avanzar dentro de la uretra, la sonda debe realizar un movimiento rotatorio. Una vez logrado el acceso a vejiga, la muestra de orina se obtiene por aspiración con una jeringa acoplada al catéter.

Obtención de la muestra por punción prepúbica

Sin discusión alguna, la forma más estéril de obtener la muestra de orina es mediante la técnica de punción prepúbica, técnica también conocida como cistocentesis antepúbica.

En este caso, el animal necesita una retención urinaria de 2 a 3 horas para poder presentar una vejiga distendida y palpable sin dificultad a nivel prepúbico. Es prudente y más seguro realizar la punción con ayuda ultrasonográfica, empleando (según el tamaño del paciente) una aguja calibre 22 o 23 de 25 a 38 mm de largo, adosada a una jeringa de 10 ml para colectar una buena cantidad de muestra.

El punto de penetración de la aguja varía según el animal a tratar; en perros machos, se ubica en la zona caudal al ombligo y entre 2 y 4 cm lateralmente a la vaina del recto; en hembras caninas, la zona de punción se ubica en sentido caudal respecto del ombligo y sobre línea blanca o media ventral; en gatos, tanto en machos como en hembras, se procede igual que en las perras.

En líneas generales, el animal no necesita sedarse ni anestesiarse; debe colocarse en decúbito dorsal con asistencia para una buena sujeción, y después de realizarse el rasurado y la asepsia de la zona cutánea se procede a palpar y fijar la vejiga con una mano; luego se atraviesa la piel con la aguja en dirección caudodorsal y

hacia la línea media, traspasando con suavidad los distintos planos anatómicos hasta acceder a la vejiga y aspirar la muestra.

Además de la posición en decúbito dorsal, la cistocentesis puede llevarse a cabo con el animal de pie o en decúbito lateral, excepto en perros y gatos de pequeño porte.

Orina renal

Esta clase de muestra es obtenida por pielocentesis, es decir, por aspiración desde la pelvis renal, método realizable si se cuenta con la guía de técnicas ultrasonográficas. La mencionada es la técnica de elección cuando se sospecha la existencia de una pielonefritis.

TRACTO GENITAL

En veterinaria es muy fácil encontrar infecciones bacterianas que afectan el tracto genital animal. Esto puede perjudicar directamente la fertilidad de las diferentes especies, además de presentarse como piómetras, metritis, vaginitis, abortos y mortinatos. Por lo general, el útero es un órgano que se conserva estéril y, como además el acceso por cateterismo a través del cuello uterino de las especies pequeñas es sumamente dificultoso, pueden tomarse como indicadores de infección genital los cultivos positivos de la región craneal de vagina, no así los vaginales caudales y vestibulares. Hay que recordar siempre que la gran población bacteriana normal del canal vaginal facilita la formación de procesos sépticos inesperados.

Por su parte, el tracto genital humano, en especial el femenino, presenta una variada microbiota bacteriana que se ve modificada por el pH de las secreciones y la cantidad de carbohidratos presentes en ellas. De esta forma se encuentra similitud entre la microbiota del cuello uterino y la del sector vaginal superior, mientras que la microbiota bacteriana presente en la zona genital externa tiene más semejanza con la microbiota cutánea de la región.

Las mismas bacterias incidentes a nivel del tracto urinario pueden provocar infecciones del tracto genital masculino o femenino. Por ello, además de la microbiota mencionada oportunamente, deben incluirse bacterias como *Brucella canis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis*, *Salmonella*, *E. coli*, *Campylobacter* y otros agentes responsables de abortos que se enumeran más adelante.

Tracto genital femenino

Secreciones vulvares

Las secreciones vulvares son aquellas que se notan cuando son eliminadas al exterior por la vulva, aunque su origen puede ser vaginal o uterino.

Normalmente son mínimas en volumen y su constitución hace que se clasifiquen en hemorrágica (en proestro y estro), mucopurulenta y purulenta (en inflamación o sepsis del aparato genital), uteroverdina y detritos celulares (en parto y posparto) y mucoide (en posparto). Por lógica, la cantidad de secreción se hace evidente en forma completa cuando existe muerte fetal después de superada la mitad de la gestación, pues se incrementan cuanto más avanzado es el desarrollo fetal.

Se considera que existe un proceso séptico cuando en las secreciones mucopurulenta y purulenta se visualizan bacterias, que incluso pueden ser las que habitualmente colonizan la vagina como microbiota normal.

Secreciones vaginales

Las muestras de la sección craneal de la vagina deben tomarse con hisopo protegido o dilatando el conducto con un espéculo esterilizado. Es importante tener en cuenta que la microbiota bacteriana vaginal es muy variada y entre sus integrantes se encuentran potenciales patógenos. Con respecto a su patogenicidad, hay que recordar que algunos son patógenos oportunistas y se aíslan existiendo signos clínicos, en cambio otros son patógenos verdaderos y se aíslan sin que existan indicios de enfermedad en las pacientes.

Secreciones uterinas

La piómetra puede o no producir un arrojamiento vulvar purulento, que por lo general se acompaña con bacteriuria. Por esa razón debe realizarse el cultivo de las secreciones originadas en una metritis cuando se ha confirmado la esencia séptica de ésta. De todas formas, como existen algunas posibilidades de recuperar un útero afectado por esta patología, la identificación del agente y de su espectro de sensibilidad a antimicrobianos es de interés más investigativo antes que clínico.

Abortos y mortinatos

Aunque la incidencia del aborto varía según la especie animal y es escasa en caninos y felinos, algunas bacterias provocan abortos (tempranos y/o tardíos) mientras que otras contaminan los fetos durante el pasaje por el canal vaginal, por el ombligo o por vía oronasal, provocando la muerte de los neonatos en pocos días. En caso de aborto deben remitirse al laboratorio los fetos y placentas completos, pero si la muerte es de neonatos, las muestras a remitir para su estudio deben pertenecer a órganos tales como hígado, bazo, pulmón, tubo gastrointestinal y contenido estomacal a fin de realizar los cultivos bacterianos y virales pertinentes, además de estudios histopatológicos.

Inmediatamente después de producido el aborto deben efectuarse controles clínico y de laboratorio de la hembra, que incluirán cultivos de muestras de la parte anterior de la vagina extraídas con hisopo protegido, con el que se investigará la contaminación con bacterias aerobias y anaerobias, además de detectar antígenos bacterianos, virales y parasitarios por métodos serológicos.

Se presenta aquí una breve reseña de las causas con más incidencia en abortos caninos.

Brucella canis

El aborto se produce entre los 45 y 59 días de gestación, es decir, en el último tercio de la preñez, con presentación de fetos autolizados en la necropsia. En ocasiones, las perras aparecen como infértiles y los cachorros pueden nacer vivos y morir poco después. Los estudios a realizar comprenden: cultivo bacteriológico de muestras de sangre y secreción vaginal, además de pruebas serológicas. Es productora de zoonosis.

Brucella abortus, B. suis y/o *B. melitensis*

Estas variedades bacterianas también provocan aborto en el último tercio de la gestación pero para que acontezca es necesario un contacto previo con ganado enfermo. En estos casos, también se visualizan fetos autolizados y es prudente realizar la serología correspondiente a cada uno de los tipos bacterianos mencionados. Producen zoonosis.

Salmonella spp

La infección con esta bacteria produce secreción vaginal purulenta y enfermedad sistémica en las perras, que pueden presentar factores predisponentes para la contaminación (hembras viejas con hiperplasia quística endometrial). En los casos de sobrevida de los cachorros, a posteriori se presentan cuadros septicémicos y conjuntivitis neonatal posparto con elevado riesgo de muerte. En las muestras obtenidas por necropsia de los fetos abortados se

observan placentitis y septicemia. Las pruebas a realizar abarcan cultivos de secreciones vaginales y tejidos fetales.

Campylobacter spp

En este caso especial debe existir una historia previa de diarrea a nivel canino y en los humanos en contacto con éste. Como en el caso anterior, hay factores predisponentes en las madres gestantes y pueden presentarse casos de sobrevida de los neonatos con elevado índice de mortalidad. Por necropsia se sospecha septicemia fetal, que se confirma mediante el cultivo en medios especiales de muestras de secreción vaginal y tejidos de fetos abortados.

Escherichia coli y/o Streptococcus spp

Con esta clase de contaminación se pueden encontrar secreción vaginal purulenta o enfermedad sistémica en las hembras. Los factores maternos predisponentes y las complicaciones en los neonatos son similares a las producidas en infecciones con *Salmonella* y *Campylobacter*. Se produce septicemia fetal y, por ende, se indica el cultivo de secreciones vaginales y tejidos fetales.

Mycoplasma y/o Ureaplasma spp

Ambas bacterias son consideradas integrantes normales de la microbiota urogenital y rinofaríngea en caninos. La mayor incidencia de infección con estas bacterias se da en casos de perras asintomáticas que conviven en condiciones de superpoblación o hacinamiento. Los animales enfermos presentan secreciones vaginales e infertilidad. Los cachorros pueden llegar a nacer vivos pero son sumamente débiles, con elevado índice de mortalidad neonatal. Por su parte, los fetos abortados presentan septicemia. Las muestras maternas a analizar en laboratorio incluyen secreciones vaginales obtenidas mediante hisopados protegidos de la parte anterior de la vagina, procesadas de inmediato o mantenidas en medio de transporte de Amies bajo estricta refrigeración. Las muestras provenientes de fetos abortados incluyen el feto íntegro y la placenta, también mantenidos bajo refrigeración en caso de necesitarse su transporte. Tanto las muestras maternas como las fetales se analizan por cultivo en medios especiales.

Herpesvirus canino

Los hallazgos clínicos para esta infección presentan un espectro amplio: perras asintomáticas, infértiles, con vesículas vaginales, abortantes en el último tercio gestacional y/o con nacimiento de cachorros muertos. El herpesvirus canino provoca aborto durante las 3 últimas semanas de gestación y muerte neonatal en las primeras 3 semanas de vida por complicaciones del cuadro septicémico producido. En los fetos abortados se presentan petequias y focos necróticos en el pulmón, el hígado, el riñón y las glándulas suprarrenales. En cuanto a los estudios a realizar en el laboratorio, es esencial aislar el virus en el período clave de las 6 semanas indicadas tanto de las madres como de los cachorros, aunque lo más utilizado es la serología materna para titulación de anticuerpos con intervalos de 2 semanas.

Distemper canino y/o adenovirus canino

Este virus provoca la enfermedad sistémica de las perras y los hallazgos de necropsia dependen del tipo de virus actuante en el proceso infeccioso; con respecto al laboratorio, las pruebas a realizar también dependen del virus involucrado en cada caso.

Mastitis

Se conoce con este nombre el proceso inflamatorio de las glándulas mamarias de las hembras de todas las especies animales; en casos graves, pueden producirse abscesos y/o gangrena glandular. Las bacterias más comúnmente halladas en esta patología son *Escherichia coli*, *Staphylococcus* y *Streptococcus* β hemolítico; éstas pueden aislarse por hisopado de las lesiones en la glándula, así como también de la leche que pueda obtenerse previo masaje de las mamas afectadas y eliminando la primera porción de la secreción láctea, a fin de "lavar" la microbiota contaminante del conducto glandular excretor.

Tracto genital masculino

Semen

Se aconseja el cultivo cuali y cuantitativo del semen cuando en él se detecta la presencia de células inflamatorias (como estudio auxiliar en casos de infertilidad en machos) y también en procesos tales como prostatitis, epididimitis y orquitis de origen infeccioso. La recolección de la muestra debe realizarse con materiales aptos para este fin y estériles, aplicando además técnicas de asepsia, como la higiene del orificio prepucial y la eliminación del esmegma superficial con antelación a la toma del espécimen.

Antes de la recolección del semen es prudente efectuar un hisopado uretral con la finalidad de identificar las bacterias presentes en el conducto; estos microorganismos pertenecientes a la microbiota normal de la zona disminuirán en número a medida que se profundice el origen de la muestra, es decir que se hallarán en menor cantidad en la porción inicial de la segunda fracción obtenida.

Es preferible tomar la segunda y la tercera porción del eyaculado y cultivarlas por separado para establecer con más acierto la ubicación del proceso infeccioso. De esta forma, si la infección radica en los testículos y el epidídimo, el cultivo positivo será el de la segunda porción de la muestra, pero si la infección está ubicada en la próstata, el cultivo positivo será el de la tercera fracción del eyaculado.

Pero no debe pensarse que en este tipo de muestra la normalidad es la esterilidad. Se considera que las fracciones prostáticas y las de gran carga de espermatozoides de un perro normal pueden arrojar un recuento de hasta 100 UFC/ml, mientras que el plasma seminal de los felinos en apariencia normales llega a contener más de 10.000 UFC/ml.

Finalmente hay que recordar que las bacterias anaerobias no son un hallazgo clásico en este tipo de muestra, por lo cual no se solicita habitualmente su cultivo. Sólo se realizan cultivos anaeróbicos de muestras de semen si en los preparados citológicos aparecen bacterias pero el cultivo aeróbico es negativo. Las muestras para cultivo anaeróbico deben procesarse lo más rápido posible, previa remisión en Culturette® anaeróbico.

Próstata

Esta glándula está generalmente a salvo de las contaminaciones bacterianas gracias a la producción local de inmunoglobulinas secretorias, la elaboración del factor antibacteriano prostático y la micción frecuente que favorece el "barrido" de las bacterias que pudieran hallarse en la región. Cuando se produce una infección prostática es porque las bacterias han accedido a la glándula por vía uretral (ascendente) o bien por vía hematógena; en cualquier caso, los microorganismos encontrados con mayor frecuencia son *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Proteus*, siendo de hallazgo ocasional *Mycoplasmas* y bacterias anaerobias. En estos casos se procede a cultivar líquido prostático obtenido por diversas técnicas.

Aspiración con aguja fina

Es uno de los métodos para obtener líquido quístico prostático, siempre con guía ultrasonográfica; con esta técnica se aconseja suma prudencia en cuadros de abscesos o prostatitis aguda por el riesgo de rotura glandular y embolia séptica.

El paciente debe ser sedado previamente, anestesiado en forma local y colocado en decúbito dorsal. Como instrumental de aspiración se pueden emplear una aguja estéril calibre 20 o 22, o bien una aguja espinal con mandril de 6 a 15 cm de largo.

Con el transductor ecográfico preparado para la maniobra, se explora la próstata vía transabdominal para ubicar el quiste a punzar, cuyo tamaño debe ser mayor de 0,5 cm de diámetro; con bisturí se hace una mínima incisión en la piel en el punto de penetración de la aguja; con guía ultrasonográfica se controla la correcta dirección de la aguja de punción, la cual no debe tocar la uretra prostática, y se procede a la extracción de la muestra para su ulterior cultivo.

La interpretación de los resultados obtenidos es sencilla: las bacterias pertenecen a una patología radicada en la próstata y son patógenas.

Biopsia con aguja fina

Se realiza también con ayuda ultrasonográfica, y el desarrollo del método es similar al anterior. En vez de emplear una aguja espinal se utiliza una "Tru-Cut" u otra adecuada para biopsias. Esta técnica se emplea cuando no se detectan quistes, cuando los quistes son menores de 0,5 cm o cuando se busca obtener muestras de tejido prostático.

Cepillado uretral protegido

Con este método se elimina casi por completo la contaminación bacteriana proveniente de la uretra y la vejiga. Para llevarlo a cabo se utiliza un "cepillo microbiológico" fabricado sobre la punta de un alambre de 90 cm, ubicado dentro de un catéter tapado de doble vaina de un diámetro aproximado de 6 francés.

El procedimiento total permite la obtención de muestras para cultivo y estudio histopatológico; la técnica consta de los siguientes pasos:

* Obtención de muestra de orina por cistocentesis prepúbica.
* Hisopado uretral, previa higiene de los genitales externos e inmediatamente antes de la introducción del catéter. Por lo general se utiliza un hisopo de alginato de calcio colocado sobre un soporte flexible de aluminio. El extremo del hisopo se corta y se ubica dentro de un tubo de ensayo con solución Ringer lactato.
* Colocación del catéter envainado hasta el polo prostático caudal: la ubicación se determina por tacto rectal. Se masajea suavemente la próstata a través del recto durante 1 minuto y luego se introduce el catéter interno 1 cm dentro de la uretra prostática. De esta manera el "cepillo" debe ser movido hacia adelante y hacia atrás unas 5 o 6 veces, y se obtiene así una pequeña cantidad de líquido prostático desalojado de la glándula durante el masaje. Finalmente el "cepillo" y el material retenido en el catéter interno se remiten al laboratorio para su procesado.

La interpretación de los resultados obtenidos sugiere la presencia o ausencia de infección a nivel prostático, aunque podría producirse una contaminación del material cuando la microbiota colonizante de la uretra se encuentra en elevada proporción.

Eyaculación

La muestra por este método se utiliza para cultivo sólo si se acompaña del cultivo simultáneo de muestras de orina y de uretra. El líquido prostático eyaculado se obtiene por manipulación manual del pene o por la presencia de una hembra en celo. El volumen ideal a obtener es de 3 ml de líquido.

La interpretación de los resultados obtenidos por este método es confiable solamente cuando se realizan de manera simultánea cultivos de orina, de hisopado uretral y de eyaculado.

Para diagnosticar prostatitis, el recuento obtenido del eyaculado debe ser de 2 $\log_{10}$/ml mayor que el recuento bacteriano uretral. Por ejemplo, si la muestra uretral arroja un recuento de 100 UFC/ml (10^2 UFC/ml) y el recuento en la muestra de eyaculado es de 10.000 UFC/ml (10^4 UFC/ml), se diagnostica prostatitis porque el resultado es 2 $\log_{10}$/ml mayor que la cifra anterior. Si el resultado fuera sólo de 1000 UFC/ml (10^3 UFC/ml) no sería posible confirmar el diagnóstico.

Aspiración y biopsia testicular

Esta maniobra, que comprende la aspiración o biopsia testicular y la aspiración epididimaria, se reserva únicamente a los casos de infertilidad cuyo origen no fue establecido por métodos más rutinarios. Esta metodología permite la detección de lesiones localizadas inaparentes y también la evaluación de los pacientes con lesiones testiculares o epididimarias definidas por la diferenciación de espermatozoides, células inflamatorias o neoplásicas y componentes infecciosos.

Previa anestesia general del paciente por el abordaje quirúrgico del testículo, se aspiran alrededor de 25 g de tejido con aguja fina, siguiendo la metodología aplicada a otros elementos de características similares. La muestra tomada de esta forma aséptica se divide en dos partes, una de las cuales se remite a histopatología y la otra a bacteriología para su cultivo ulterior.

SISTEMA NERVIOSO

Las infecciones localizadas en este nivel pueden ser provocadas por bacterias anaerobias en general, así como también por *Ehrlichia canis* y *Rickettsia rickettsii*, bacterias con características vitales especiales por ser parásitos intracelulares obligados. Los protozoarios que también atacan el sistema nervioso son *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum*.

Por su parte, el ser humano es aparentemente más vulnerable a diferentes especies etiológicas ya que como responsables de infecciones en el sistema nervioso humano se encuentran, entre otros microorganismos, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* tipo B, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas*, *Proteus*, bacilos coliformes, *Clostridium perfringens*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pasteurella multocida*, *Actinomyces*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Bacteroides* y *Leptospira* spp, además de *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* y virus variados.

Líquido cefalorraquídeo

Mediante el análisis del LCR se puede apreciar el estado del encéfalo y la médula espinal, determinando por microscopia si éstos se encuentran colonizados por algún tipo de microorganismo y, por medio de cultivos, es posible identificar dicho agente infeccioso a fin de implementar el tratamiento adecuado.

El análisis del LCR se sugiere en todo tipo de afecciones neurológicas con o sin sintomatología evidente y con diagnóstico dudoso, habiéndose descartado procesos únicamente inflamatorios mediante mielografías. El LCR no debe analizarse desde el punto de vista microbiológico cuando el proceso se debe a traumas preexistentes o bien a anomalías del SNC.

Debe recordarse que el LCR es considerado como área normalmente estéril. Cuando presenta una invasión bacteriana, por lo general el líquido deja de ser transparente y se lo observa como un líquido purulento con aumento del recuento leucocitario, excepto cuando se trata de una infección de *Mycobacterium tuberculosis* o *Leptospira* spp con la cual el aspecto continúa siendo de apariencia normal.

Para llevar a cabo esta práctica es prudente anestesiar al animal de forma total para eliminar el peligro de daños por movimientos bruscos, así como también el riesgo de infecciones posteriores. Los motivos que pueden llegar a contraindicar el

estudio son los pacientes de riesgo para el uso de anestésicos y el padecimiento de coagulopatía grave, por la predisposición que tienen a sufrir de hemorragias.

Abordaje de la cisterna cerebelomedular

En veterinaria, la técnica usualmente indicada para obtener LCR es la de punción en la cisterna cerebelomedular, que puede remplazarse por la punción en el espacio L5-L6, sitio generalmente empleado para la realización de mielografías; este punto no permite al operador obtener el mismo volumen de LCR que la cisterna cerebelomedular, pero con respecto a la calidad de la muestra para análisis, no existen grandes diferencias entre ellas.

La zona a preparar asépticamente es la limitada por ambas orejas, la protuberancia occipital y C2; la posición del animal dependerá del operador, ya que si éste es diestro, el paciente debe ubicarse en decúbito lateral derecho con el cuello flexionado de forma tal que el eje medio craneal quede perpendicular al raquis y la nariz, levemente levantada, paralela a la camilla. Por palpación se ubican los bordes craneales de las alas del atlas y la protuberancia occipital externa; si se trazan dos líneas imaginarias, una de ellas debe unir ambos bordes craneales del atlas y la otra debe dirigirse desde la protuberancia occipital a lo largo del raquis; en la intersección de ambas líneas se tendrá ubicado el punto de punción para obtención de las muestras.

Se emplea una aguja espinal con mandril (o estilete) de 3,75 a 7,5 cm de largo, que debe introducirse entre 1 a 2 mm en posición perpendicular al raquis a través de la piel y tejidos circundantes. Para evitar daños medulares la aguja no debe lateralizarse. Después de penetrar hasta 2 mm, se retira el mandril para observar el LCR y se lo recoge en un tubo de ensayo estéril con EDTA para evitar su coagulación, en un volumen que depende del tamaño del paciente y oscila entre 0,5 y 3 ml como máximo.

La manipulación debe repetirse si la aguja impacta contra el hueso o si el líquido es hemorrágico, pero es importante tener en cuenta que si la sangre es producto de la enfermedad, toda la muestra debe hallarse mezclada con ella, mientras que si la presencia de sangre se debe al trauma de la punción, la hemorragia será hallada sólo en la primera parte de la muestra obtenida. En este segundo caso, la muestra sanguinolenta será descartada y el LCR puro se recolectará en un segundo tubo de ensayo. La muestra que contenga hasta 10 hematíes/µl puede ser aceptada para su estudio ya que esta cantidad de glóbulos rojos no interfiere en los resultados de los diversos análisis a realizar. Si el LCR contiene bacterias, es obligatoria su remisión al laboratorio para control bacteriológico.

Abordaje lumbar

La punción para esta técnica se realiza en el espacio L5-L6, previa colocación del paciente en decúbito lateral con el tronco en flexión. La aguja a utilizar debe tener 8,75 cm de largo y se introduce en el borde craneal de la apófisis espinosa de la vértebra L6, para luego penetrar con suavidad en el espacio subaracnoideo.

En grandes animales, esta técnica, conocida como *epidural*, puede realizarse en el espacio lumbosacro (*epidural alta*) o en el espacio sacrococcígeo (*epidural baja*), previo reconocimiento y ubicación de ambos espacios por palpación de las apófisis espinosas vertebrales o bien por ubicación de la zona de "articulación" sacrococcígea por medio de movimientos de ascenso y descenso de la cola del animal.

Biopsia neuromuscular

Es un método de elección para ratificar clínica y electrofisiológicamente la enfermedad neuromuscular, además de revelar su etiología, que puede ser de origen inflamatorio, tumoral o infeccioso. Las muestras de esta clase de biopsias deben ser procesadas por métodos especiales y congelarse de inmediato. Más tarde, de observarse la presencia de agentes microbianos, se procederá a la toma de muestra correspondiente para esta clase de estudio.

SISTEMA CIRCULATORIO

La bacteriemia o presencia de bacterias en sangre puede ser, según su persistencia, *transitoria* (por causas odontológicas), *intermitente* (cuadros de inmunosupresión o enfermedad de riesgo) y *continua* (en casos de endocarditis bacteriana), por lo cual los microorganismos pueden hallarse en el torrente sanguíneo normalmente estéril.

Entre las bacterias que pueden producir estas enfermedades se encuentran *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Clostridium* y *Bacteroides* spp, además de *Escherichia coli*.

En muchas oportunidades, el paciente presenta fiebre alta y recurrente (picos febriles), sin acompañamiento de ningún otro signo clínico. El pico febril es el momento aconsejado para la toma de muestra sanguínea, y se sugiere más de una extracción en diferentes picos febriles para asegurar el éxito del estudio.

Las muestras de sangre pueden tener dos orígenes diferentes: venoso o cardíaco.

Punción venosa

Para poder realizar la punción venosa y la consiguiente extracción de sangre, primero debe depilarse la zona a punzar para obtener una mejor visualización de la vena, sobre todo cuando se trata de animales de raza pequeña cuyo calibre venoso es mínimo.

También es prudente recordar que la punción venosa debe hacerse delicadamente, atravesando la piel con el bisel de la aguja hacia arriba, y recién cuando se ha traspasado la dermis se comienza la búsqueda del vaso sanguíneo; para una punción más exitosa, la aguja debe hallarse casi paralela a la superficie cutánea, pues de esta manera se evita la perforación violenta y el edema perivenoso consiguiente, puesto que en animales pequeños el calibre de los vasos es por lo general escaso.

En todos los casos se maneja el conjunto formado por la aguja (el calibre de uso habitual es 25/8, aunque en animales de mínimo porte se puede emplear el calibre 16/5) acoplada a la jeringa de hasta 10 ml de capacidad.

Las vías para punción venosa disponibles en pequeños animales son varias. En perros y gatos, por ejemplo, se puede realizar la práctica en las venas cefálica (también llamada radial anterior), safena, yugular y marginal de la oreja. En otros animales de laboratorio se utilizan preferentemente (y según la especie) la punción cardíaca, marginal de la oreja y coccígeas, mientras que en grandes animales la vena de elección es la yugular y ocasionalmente las coccígeas (también dependiendo de la especie).

En cuanto al ser humano, las venas de elección son las cefálicas, y en caso de no poder realizar el abordaje deseado, quedan por utilizar las venas del dorso de la mano.

A continuación se describen las técnicas de abordaje en las especies pequeñas.

Vena cefálica

El animal se coloca sobre la camilla en decúbito esternal. Tras depilar la cara anterior del antebrazo en su extremo proximal y realizar la asepsia cutánea, se ingurgita la vena por presión manual sobre ella y con leve desplazamiento del tejido hacia afuera para presentar mejor el vaso sanguíneo. Siguiendo las indicaciones ya descritas, se procede al abordaje venoso.

Vena safena

Para este abordaje, el animal debe colocarse en decúbito lateral, ya que la ingurgitación venosa se produce por presión sobre la zona tibial inferior, por debajo de la masa muscular posterior de la pierna. Como inconveniente, la vena safena es sumamente móvil y muy flexuosa, lo que dificulta una canalización rápida y segura; además, como se visualiza sobre la articulación del tarso, es bastante problemática para mantener la canalización abierta durante cierto tiempo.

Vena yugular

Por su calibre y caudal, es la mejor vena para obtener buenos volúmenes de sangre sin mayores dificultades. Para ello, el animal debe colocarse en el borde de la camilla en decúbito esternal, con la cabeza dirigida hacia arriba. Una vez depilada la zona y realizada la asepsia, se ingurgita la vena presionando la base del cuello en sentido lateral a la tráquea. Antes de iniciar la punción es prudente doblar la aguja para que al canalizar la vena no sea atravesada. Después de resaltar la vena, se debe canalizar con suavidad.

En grandes animales (equinos, bovinos) la ingurgitación yugular se produce presionando la vena en la gotera yugular, en la base del tercio medio del cuello. El calibre de aguja utilizado en estos animales debe ser mayor, sobre todo cuando se debe atravesar la piel dura del bovino. En ovinos es necesario realizar la depilación de la zona. En los porcinos, esta práctica está vedada por la cubierta adiposa que poseen.

Vena marginal de la oreja

Esta práctica es de elección cuando se manejan conejos, pero es aplicable también en animales como el Basset hound, que, además de tener brazos cortos y torcidos que obstaculizan el acceso a las venas cefálicas, posee una excelente y visible irrigación auricular. En este caso no es necesaria la depilación de la zona, simplemente se realiza la asepsia y se efectúa la punción venosa después de ingurgitar la vena elegida presionándola en la base del pabellón auricular.

Venas coccígeas

De fácil acceso en animales de gran porte, su ingurgitación se obtiene por presión venosa en la base de la cola. Esta técnica se emplea más en animales de laboratorio, como la rata y el ratón;se obtiene un aumento del caudal venoso al colocar la cola del animal dentro de un recipiente con agua tibia. Este procedimiento más que para obtener muestras se emplea para realizar inoculaciones experimentales.

Pericardiocentesis

Es el método de elección cuando el paciente padece de efusión cardíaca. Cuando se realiza del lado derecho del corazón se reducen los riesgos de traumas en el ámbito de los grandes vasos coronarios y del pulmón, gracias a la presencia de la escotadura cardíaca.

Por lo general el animal es sedado y la posición a adoptar es el decúbito esternal o el decúbito lateral izquierdo, aunque en ciertos casos puede permanecer de pie. El material a emplear en esta técnica está constituido por una aguja o un catéter mariposa calibre 19 a 21, o bien un catéter blando de tamaño adecuado según el porte del paciente (por ej., calibres de 12 a 20 y de 3,4 a 13,8 cm de largo); también se acopla una llave de tres vías entre los túbulos y la jeringa de aspiración. La aplicación de anestesia local (que llega hasta la pleura) se realiza cuando los catéteres son de gran tamaño y se trabaja con aguja.

La piel del paciente debe rasurarse, se lleva a cabo la asepsia de la zona y se busca el sitio de mayor golpe precordial, conocido como "choque de punta", para luego comenzar a introducir el catéter o la aguja hacia la zona cardíaca; generalmente la punta del catéter se orienta hacia el codo opuesto del paciente para facilitar el acceso al corazón; de todas formas, apenas la aguja penetra en la piel es prudente aplicar una presión negativa con la jeringa acoplada al equipo, a fin de observar el tipo de líquidos que se aspiran (el pleural es de color amarillento y el de efusión pericárdica por lo general es hemorrágico). Debe remarcarse que cuando la aguja o el catéter contactan con el corazón, se produce el movimiento acompasado del instrumento siguiendo el ritmo cardíaco.

Logrado el acceso al pericardio, la primera parte del líquido extraído se deriva a estudios microbiológicos y citológicos.

En caso de tener que extraer la muestra postmortem, antes de realizar la punción cardíaca "a cielo abierto" es necesario quemar la superficie cardíaca con una varilla de metal al rojo, con el fin de esterilizar la superficie del corazón. Seguidamente se procede a punzar y a tomar la muestra de sangre para su cultivo inmediato.

TEJIDOS CUTANEO, SUBCUTANEO Y MUSCULAR

La piodermia canina y felina tiene su origen más frecuente en la acción del *Staphylococcus intermedius*, aunque su forma profunda puede ser provocada por cualquier tipo de bacteria grampositiva o gramnegativa. En su mayor parte, los procesos infecciosos de los tejidos blandos, que en general incluyen heridas y abscesos, están contaminados con tipos bacterianos mixtos, y es importante tener en cuenta que cuando se trata de lesiones profundas hay que llevar a cabo cultivos bacterianos aeróbicos, anaeróbicos y también investigar la presencia de bacterias especiales.

Finalmente, entre otros agentes observables en las lesiones mencionadas, pueden mencionarse *Staphylococcus*, *Mycoplasma*, *Sporothrix*, *Nocardia*, *Actinomyces*, formas-L bacterianas y *Mycobacterium* spp atípico.

Las muestras deben ser recogidas por medio de técnicas de hisopado y/o aspiración, aplicando la metodología descrita oportunamente.

MUESTRAS OCULARES

Por lo general, las lágrimas mantienen la superficie ocular limpia y libre de cuerpos extraños, además de ejercer acción enzimática sobre los microorganismos que allí pudieran hallarse. En ojos sanos, la secreción es clara y transparente, pero en cuadros definidos de infección ocular, las secreciones se tornan purulentas y por ello no es necesario tomar gran cantidad de material.

La microbiota que puede aislarse de muestras oculares obtenidas por hisopado es variada, y entre los microorganismos más comunes se encuentran *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Moraxella*, *Haemophilus*, *Pseudomonas*, *Chlamydia (Chlamydophila)* y *Mycobacterium* spp, además de bacterias anaerobias, hongos, virus y parásitos.

MUESTRAS OTICAS

Hisopado del oído externo

Es la toma de muestra de rutina que se realiza tanto en el laboratorio como en el consultorio veterinario. Para obtener una muestra lo más exenta de contaminación posible, es aconsejable dilatar el conducto auditivo externo con un otoscopio, mientras que por su interior se hace pasar un hisopo estéril tratando de no tocar ningún elemento ajeno a la muestra en sí.

La muestra puede recogerse por contacto con la secreción ótica o bien por raspado de la mucosa interna del conducto, que puede llegar a tener menor cantidad de secreciones pero mayor población microbiana viable.

Muchos pacientes presentan alteraciones en un solo oído pero los microorganismos que se encuentran en el oído enfermo también se hallan en el oído sano; por otra parte, pueden obser-

varse casos en que la microbiota patógena de un oído difiere de la obtenida del otro, de manera tal que se deben llevar a cabo ambas identificaciones e instaurar los tratamientos correspondientes.

Las bacterias patógenas generalmente halladas en las muestras son *Staphylococcus, Proteus y Pseudomonas*, mientras que entre los hongos se distingue la levadura *Malassezia*. Cuando se realiza y colorea un extendido de material ótico se observa la presencia de diversas clases de bacterias pertenecientes a la microbiota auditiva normal, pero en un cuadro de otitis puede llegar a observarse que la microbiota patógena se encuentra incrementada de forma tal que permite obtener cultivos puros sin mayores inconvenientes.

Miringotomía

Se denomina así a la punción que se realiza para obtener material del oído medio para cultivo y citología, mediante la perforación de la membrana timpánica con una aguja espinal delgada calibre 22 o bien por medio de una sonda uretral para gato macho rígida de 12,6 cm y extremo cortado a bisel con una inclinación de 45-60°.

Considerando la membrana timpánica como la esfera de un reloj, la miringotomía se lleva a cabo a las 5.00 o 7.00 horas, es decir, en la porción ventral de la zona más distendida, en el sector inferior de adherencia del tímpano al anillo; esta ubicación de la zona de punción impide lesionar el epitelio germinal que recubre el mango del martillo.

Una vez perforado el tímpano, se introduce el catéter y se aspira con suavidad el material existente en la bulla; en caso de que la secreción sea demasiado densa o se encuentre seca, se pueden añadir 1 o 2 ml de solución salina normal para ser aspirados de inmediato.

SENOS PARANASALES Y REGION MASTOIDEA

La contaminación de la región mastoidea generalmente sobreviene a partir de una otitis media, y como microorganismos responsables de la noxa aguda se encuentran por lo común los cocos piógenos, mientras que para los cuadros crónicos las bacterias que suelen detectarse son anaerobias. Lo usual es recoger la muestra por medio de hisopos.

Por su parte, una sinusitis supurada puede tener su origen en una rinitis simple; casi siempre las responsables de esta patología son *Staphylococcus, Streptococcus, Klebsiella, Bacteroides* y *Haemophilus* spp. En este caso, la recolección sugerida es la correspondiente a la aplicada en heridas y abscesos, cuidando la técnica anaerobia.

SISTEMA MUSCULOESQUELETICO Y ARTICULACIONES

Cuando se habla de osteomielitis, discoespondilitis y poliartritis séptica, por lo general se las relaciona con bacterias como *Staphylococcus, Streptococcus, Proteus, Pseudomonas* spp y *E. coli*, e infecciones con microorganismos anaerobios; sin embargo, además de los agentes mencionados se involucran en estos procesos microorganismos como *Ehrlichia canis, Ehrlichia ewingii, Ehrlichia equi, Rickettsia rickettsii, Borrelia burgdorferi, Mycoplasma* sp y forma-L bacteriana.

Recolección de líquido sinovial

El análisis del líquido sinovial es un excelente método diagnóstico en enfermedades articulares en todas las especies animales, ya que permite establecer si el cuadro es sólo inflamatorio o si la noxa se encuentra instalada intraarticularmente.

Para llevar a cabo la artrocentesis, el animal puede ser sedado o anestesiado según sea necesario; la zona articular se prepara con rasurado y asepsia, tras lo cual se introduce la aguja de punción acoplada a una jeringa. El calibre de la aguja varía según la especie, el tamaño del animal y el tipo de articulación a abordar, ya que éstas pueden ser superficiales (por ej., articulación carpiana) o profundas (articulación coxofemoral); por ello, se parte de una aguja calibre 22 y 3,45 cm de largo o más. El volumen de líquido sinovial necesario para el estudio oscila entre 1 y 3 gotas, y por su rápida coagulación es necesario recolectarlo en un tubo con EDTA. El punto de punción se detecta por palpación de las zonas óseas y ligamentosa circundantes, considerando además que en muchos casos la bolsa sinovial hace protrusión y facilita así el acceso a su contenido.

Por último, debe recordarse que todo líquido sinovial con alto recuento celular debe cultivarse, ya sea de manera aeróbica o anaeróbica y también en busca de bacterias especiales como *Mycoplasma* sp. Si la muestra obtenida es mínima, es prudente aspirar con la misma jeringa un medio enriquecido como caldo tioglicolato, a fin de "enjuagar" para luego sembrar el resto de líquido sinovial que pudo haber quedado retenido en el equipo de extracción después de haber utilizado el material para la confección de los extendidos.

Debe recordarse que también pueden producirse artritis de origen micótico que, aunque de escasa frecuencia, se presentan por acción de *Coccidioides immitis, Blastomyces dermatitidis* o *Cryptococcus neoformans*. Es más frecuente hallar poliartritis reactiva inmunomediada con cultivos bacterianos y fúngicos negativos.

Biopsia de la membrana sinovial

También puede emplearse esta técnica para el estudio bacteriológico del material, sobre todo cuando se sospecha la presencia de artritis séptica. El material puede obtenerse por medio de la punción con aguja de biopsia o bien por artrotomía quirúrgica. Ambas muestras se caracterizan por su escaso tamaño y sólo pueden conseguirse sin dificultad a partir de la articulación de la rodilla.

BIBLIOGRAFIA

Finegold SM, Baron EJ, Wexler HM. A clinical guide to anaerobic infections. Wadsworth Anaerobe Laboratory, Los Angeles, California, 1992.

Finegold SM, Martin WJ. Bailey-Scott, Diagnóstico microbiológico. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, 1983.

Gotthelf LN. Enfermedades del oído en animales de compañía. Ed. Inter-Médica, Buenos Aires, 2001.

Guías de Trabajos Prácticos. Cátedra de Microbiología Especial. Carrera de Bacteriología Clínica e Industrial, Facultad de Cs. Veterinarias de la U.N.L.P. 1980.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn (Jr.) WC. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Ed. Lippincott, Philadelphia, 1997.

Ling GV. Enfermedades del aparato urinario de perros y gatos. Ed. Inter-Médica, Buenos Aires, 1996.

Nelson RW, Couto CG. Medicina interna de animales pequeños. Ed. Inter-Médica, segunda edición, 1998.

Sebald M, Tacquet A, Bricout F. Técnicas en bacteriología. Ed. Jims, Barcelona, 1977.

Tunes M del L. Guías prácticas de Microbiología. Cátedra de Microbiología, Facultad de Cs. Veterinarias de la U.N.L.P. 1981.

Tunes M del L, Linzitto OR. Principales vías de inoculación en embrión de pollo y otros animales de laboratorio. Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias de la U.N.L.P. 2002.

Capítulo 10

CULTIVO BACTERIANO

Lucila Emilia Bautista,
Nestor Oscar Stanchi

METABOLISMO BACTERIANO

Las bacterias deben tomar del medio exterior los nutrientes necesarios para construir sus elementos constitutivos (citoplasma, membrana, pared, etc.) y producir trabajo. Este trabajo está representado por las funciones vitales, como crecimiento, reproducción, movimiento. Los nutrientes son el sustrato (sustancia) sobre el que actúan enzimas que luego de una serie de reacciones obtiene energía en forma de ATP. Al conjunto de reacciones enzimáticas se lo conoce como "metabolismo bacteriano". Las reacciones de biosíntesis (anabolismo) se encadenan a las reacciones de degradación (catabolismo) por el ATP, ya que este compuesto interviene en la mayoría de los procesos de intercambio de energía. Según la fuente principal de carbono que utilicen, los microorganismos se clasifican en "autótrofos", cuando usan el CO_2 atmosférico, y "heterótrofos", cuando requieren de fuentes orgánicas de carbono. Las bacterias que se han adaptado a crecer en tejidos animales son heterótrofas y requieren compuestos orgánicos para vivir.

La transformación de la energía puede tener lugar aeróbica o anaeróbicamente. Existen tres vías principales de producción de ATP: la **respiración**, que tiene lugar en presencia de oxígeno y da como productos finales CO_2 y H_2O; es un proceso de oxidación de las células vivas por el cual el oxígeno en las bacterias aerobias es el aceptor de hidrógeno para el H_2 extraído del sustrato; luego, la **fermentación**, que tiene lugar sin oxígeno en condiciones anaerobias y remplaza a éste por otro aceptor de electrones como el nitrato o el sulfato; y por último, la **fotosíntesis**, que obtiene energía por absorción de luz visible a través de la clorofila, pero que no nos compete en el estudio de la microbiología veterinaria.

De acuerdo con los requerimientos de oxígeno las bacterias se clasifican en:

Bacterias aerobias estrictas: las que requieren oxígeno como aceptor terminal de electrones y no proliferan en condiciones de anaerobiosis (es decir, en ausencia de oxígeno). Ejemplo: *Mycobacterium bovis*.

Bacterias anaerobias estrictas: las que no emplean oxígeno para su proliferación y metabolismo, sino que obtienen su energía de reacciones fermentativas. Las especies de Bacteroides y *Clostridium tetani* son ejemplos de anaerobios.

Anaerobios aerotolerantes: pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno, pero la energía la obtienen por fermentación. Ejemplos: algunas especies de *Clostridium* y las bacterias acidolácticas.

Anaerobios facultativos: son bacterias que proliferan mediante procesos oxidativos, utilizando oxígeno como aceptor terminal de electrones, o en anaerobiosis, empleando reacciones de fermentación para obtener energía; sobreviven tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Especies de estreptococos, estafilococos y las enterobacterias (por ej., *Escherichia coli*) están entre los numerosos anaerobios facultativos que causan enfermedad.

Bacterias microaerófilas: son las que requieren de oxígeno como aceptor terminal de electrones pero con una tensión menor de O_2 a la requerida por los aerobios, en general de 1 a 12% de O_2. No proliferan en la superficie de un medio sólido en aire y proliferan apenas (si lo hacen) en anaerobiosis. Algunos estreptococos son microaerófilos.

Capnoico o capnófilo: se denominan así las bacterias que se desarrollan mejor en presencia de anhídrido carbónico.

CULTIVO DE MICROORGANISMOS

Se llama cultivo al proceso que consiste en propagar microorganismos brindándoles las condiciones ambientales adecuadas. Las bacterias adaptadas al hombre y a los animales tienen la capacidad de desarrollarse en medios nutritivos fuera del hospedador (in vitro). Los microorganismos en crecimiento y reproducción deben hacer réplicas de sí mismos, por lo que necesitan el aporte de todas las sustancias necesarias para recrear su composición química y realizar su metabolismo. Los nutrientes deben brindarles estos elementos en una forma accesible desde el punto de vista metabólico. Además, estos microorganismos requieren energía metabólica para sintetizar macromoléculas y conservar los gradientes químicos esenciales a través de sus membranas.

DESARROLLO O CRECIMIENTO

Está dado por la multiplicación bacteriana en el medio de cultivo, con una progresión geométrica a velocidad variable, según se trate de microorganismos de crecimiento rápido, mediano o lento. La mayoría de las bacterias poseen un tiempo de división de 20 minutos, por ejemplo, las enterobacterias; en otro extremo, *Mycobacterium bovis* tiene un tiempo de multiplicación de 12 horas.

Colonia

Cuando una bacteria crece sobre un **medio de cultivo sólido**, no puede moverse, y al multiplicarse en forma geométrica, las sucesivas generaciones de bacterias quedan ubicadas unas sobre otras hasta hacerse visibles macroscópicamente. Este crecimiento o clon originado a partir de una sola bacteria en medio sólido se denomina **colonia** y presenta aspectos particulares de acuerdo con el género y la especie bacteriana; al estudiar sus características se deben tener en cuenta la forma, el tamaño, el color, los bordes, la altura, la superficie y el aspecto o la consistencia.

Población

Es el desarrollo bacteriano en **medios de cultivo líquidos**, en donde no pueden diferenciarse entre sí los distintos microorganismos; las características más importantes son: turbidez del medio; formación de velo superficial (su consistencia, espesor y cantidad) y presencia de sedimento (su aspecto, cantidad y coloración).

CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO

Las bacterias, como organismos procariotas, se multiplican por fisión binaria. Este proceso dura entre 10 minutos y 24 horas, dependiendo del microorganismo, pero la mayoría de las bacterias de importancia médica tiene un tiempo de generación de entre 20 minutos y 2 horas.

En cada generación se duplica el número de individuos. Partiendo de un número inicial de bacterias N_0, al cabo de una generación tendremos $2 \times N_0$, en la siguiente generación, $2 \times 2 \times N_0$, y así sucesivamente; la población aumenta con el exponente de 2, por lo que se expresa como "crecimiento exponencial".

Primera generación: $2 \times N_0$
Segunda generación: $2 \times 2 \times N_0 = 2^2 \times N_0$
Tercera generación: $2 \times 2 \times 2 \, N_0 = 2^3 \times N_0$

Este crecimiento exponencial o logarítmico existiría en condiciones ideales si no hubiera agotamiento del medio de cultivo, acumulación de metabolitos tóxicos, variación de pH, etc. In vivo esto tampoco ocurre ya que las defensas del hospedador obstaculizan el desarrollo logarítmico. En el laboratorio, la curva de crecimiento bacteriano puede evaluarse en medio líquido.

Como se trata de un crecimiento exponencial, para obtener en el dibujo una línea recta se grafica el logaritmo del número de células viables en función del tiempo. Cuando un cultivo puro de bacterias se inocula a un medio de cultivo líquido se obtienen cuatro fases principales:

1. Fase de adaptación o latencia

Este retraso es el período de adecuación al nuevo medio de cultivo y la necesidad de acumular CO_2 y enzimas para iniciar su metabolismo. Es la demora para alcanzar una velocidad constante de desarrollo. Cuando el medio de cultivo nuevo es idéntico al que provienen las bacterias y éstas se encuentran en fase exponencial, esta fase no se produce.

2. Fase de crecimiento exponencial o logarítmico

Se inicia cuando la velocidad de crecimiento constante alcanza su mayor valor. Esta fase está influenciada por la genética de la bacteria y las condiciones del medio de cultivo, como pH, temperatura, composición del medio de cultivo, etc.

3. Fase estacionaria

Como el medio al que hacemos referencia no se renueva, comienzan a acumularse metabolitos tóxicos, se modifica el pH del medio y desciende el nivel de nutrientes, la velocidad de multiplicación se retrasa y hay un equilibrio entre bacterias vivas y muertas.

4. Fase de muerte

Cuando continúa el crecimiento en el medio de cultivo viejo se produce una inversión numérica con respecto a la fase exponencial. En este período son más las bacterias muertas que las vivas, hasta que se termina con la muerte de todas. Si se trata de bacterias con capacidad de esporulación, este fenómeno se produce en esta fase.

FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO

Temperatura

Los microorganismos tienen una temperatura óptima de crecimiento en donde adquieren una velocidad máxima de reproducción. Por encima de esta temperatura máxima las bacterias se alteran y mueren. Por debajo de la temperatura óptima las bacterias

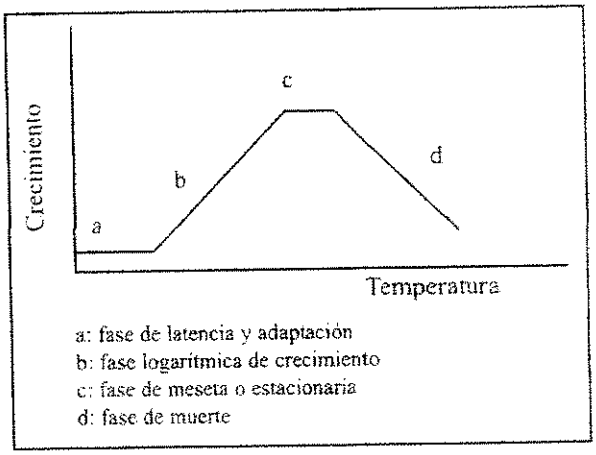


Figura 10-1. Gráfico del crecimiento bacteriano normal.

enlentecen su metabolismo pero siguen creciendo, hasta que a una temperatura menor detienen su desarrollo. De acuerdo con la temperatura óptima los microorganismos se clasifican en: **psicrófilos**, con rangos de entre 10 y 20 °C, como las bacterias marinas; **mesófilos**, con temperatura óptima entre 20 y 40 °C; **termófilos** entre 50 y 60 °C y **termotolerantes** con una temperatura óptima en el rango de los mesófilos pero que toleran hasta 50 °C. Los microorganismos que describiremos en nuestra materia son mesófilos, adaptados a la temperatura corporal del hombre y los animales.

pH

La mayoría de los microorganismos crecen en rangos de pH cercanos a la neutralidad, entre 6,8-7,4. Muy pocos toleran la acidez o son acidófilos como el *Acetobacter* o *Helicobacter*. Los hongos prefieren pH bajos como 5 o 6. Para mantener el pH de los medios de cultivo cuando las bacterias son sensibles, se requieren *buffers* como el bicarbonato o los fosfatos inorgánicos. El pH es un factor a tener en cuenta para un aislamiento selectivo.

Actividad del agua

La actividad del agua (A_w), o agua disponible, es fundamental para las reacciones bioquímicas de la bacteria, por eso la mayoría de los microorganismos no crecen en ambientes de hiperosmolaridad como soluciones azucaradas o hipersaladas. Algunas bacterias de importancia médica resisten las concentraciones altas de sal (*Staphylococcus*). Muchas bacterias marinas no crecen cuando la concentración de sal es inferior al 1%.

Nutrientes

La calidad y cantidad de nutrientes disponibles influye en la velocidad de crecimiento bacteriano y su carencia constituye un factor limitante del desarrollo.

Potencial de oxidorreducción (E_h)

Las bacterias aerobias necesitan un E_h de 0,2 a 0.4 y las anaerobias estrictas de –0,2 o menor. En cultivos líquidos mixtos, las bacterias aerobias consumen el O_2 y crean condiciones para el desarrollo de los anaerobios; en cultivo puro de anaerobios se deben agregar agentes reductores como tioglicolato, cisteína o ambientes libres de O_2.

CULTIVO DE MICROORGANISMOS AEROBIOS IN VITRO

Se entiende por **medio de cultivo** a una mezcla equilibrada de componentes nutricionales que reúnen las condiciones para

permitir la multiplicación in vitro de los gérmenes que allí se siembran. Contiene una fuente de carbono, nitrógeno y azufre, una fuente mineral, y factores de crecimiento que la bacteria es incapaz de sintetizar como ciertos aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas. Además durante el crecimiento se deben regular el pH, la temperatura, la aireación, la concentración de sales y la potencia iónica del medio.

Los requisitos para que una sustancia sea considerada medio de cultivo deben ser los siguientes:

- *pH*: generalmente cercano a la neutralidad (7,2-7,4).
- *Composición química*: debe responder a las exigencias nutricionales del organismo a cultivar.
- *Esterilidad*: el medio de cultivo ha de ser esterilizado para evitar que los gérmenes que normalmente lo contaminan en su preparación no interfieran en el desarrollo de la cepa que pretendemos cultivar.
- *Humedad*: requisito de todo medio sólido de reciente preparación; con el tiempo los medios se desecan y se hacen inapropiados para el desarrollo bacteriano.

Finalidades de un medio de cultivo

- Aislamiento de microorganismos en colonias puras.
- Estudio de características culturales.
- Estudios de actividades metabólicas.
- Preparación de vacunas y antígenos.
- Conservación de gérmenes en colección.
- Obtención de grandes masas microbianas para estudios físicos y químicos.
- Obtención de gérmenes con fines industriales (preparación de productos lácteos, vitivinícolas, antibióticos, enzimáticos y ensilajes).

MEDIOS DE CULTIVO

Composición y propiedades

Los medios de cultivo pueden tener una composición química definida o no definida. Antiguamente se utilizaban los extractos de carne o de otros tejidos que constituían una fuente de proteínas y azúcares. La falta de homogeneidad en la composición y en la preparación, los hacían de escasa confiabilidad para ser usados en estudios científicos debido a las pocas probabilidades de reproducir los resultados obtenidos. Para aportar la fuente de nitrógeno y carbono a los medios, en la actualidad se usan hidrolizados proteicos llamados **peptonas**, obtenidos generalmente por hidrólisis enzimática de leche, carne, levadura, etc., que mantienen sus propiedades en cuanto a aminoácidos y vitaminas. Existen diferentes tipos y calidades de peptonas por lo que debe prestarse atención en su elección.

El medio también posee cloruro de sodio que tiene como función nivelar la presión osmótica. Si el medio de cultivo requiere sangre, ésta se hemoliza si no hay una presión osmótica adecuada. Un medio de cultivo óptimo para la investigación microbiológica ha de contener, como mínimo, carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y sales inorgánicas. En muchos casos serán necesarias ciertas vitaminas y otras sustancias inductoras del crecimiento. Siempre han de estar presentes las sustancias adecuadas para ejercer de donantes o captadores de electrones para las reacciones químicas que tengan lugar. También los medios pueden tener indicadores de cambios de pH en las reacciones metabólicas.

Una fórmula básica de caldo peptonado es la siguiente:

Peptona	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Agua destilada csp.	1000 ml

Para lograr que un medio de cultivo sea sólido, a la fórmula básica se le agrega un solidificante. Este puede ser agar sílice, gelatina o gel poliacrílico. En la actualidad se utiliza el agar que es un polisacárido derivado de algas marinas, que se disuelve a temperatura de ebullición y vuelve a solidificarse a 42 °C. Se encuentra ya incorporado en los medios de cultivo comerciales, o puede agregarse a los caldos en una proporción del 2%.

La mayoría de los microorganismos crecen en un pH cercano a la neutralidad, por eso es importante verificar el pH del medio de cultivo luego de la esterilización. Para no contaminar todo el medio se fracciona una pequeña cantidad en un tubo y al final de la esterilización se toma el pH del medio fraccionado.

La esterilización se realiza generalmente por autoclave, vapor fluente o filtración. Para volúmenes de 500 ml se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos. Se aumenta el tiempo para mayores volúmenes. Cuando el medio tiene urea, hidratos de carbono o aminoácidos termolábiles, la temperatura de esterilización se reduce, o se usa la filtración.

El agregado de suplementos como sangre requiere técnicas asépticas, tanto en la extracción de la sangre como en la incorporación al medio de cultivo.

Antes de su uso los medios deben controlarse para verificar su esterilidad, incubándolos a 37 °C durante 24 horas. Las placas de agar sangre no se incuban porque pierden calidad, sólo se incuban algunas placas representativas del lote durante 1 semana y el resultado se extrapola al total del lote.

Clasificación de los medios de cultivo

Los medios de cultivo pueden clasificarse por su consistencia o por su finalidad. Se debe tener en cuenta que dentro de estos últimos, un mismo medio puede ser clasificado en más de una categoría; por ejemplo, el medio EMB es selectivo (impide el crecimiento de bacterias grampositivas) y es diferencial (permite diferenciar la actividad sobre la lactosa).

Por su consistencia

Líquido: también denominado caldo, posee elementos nutritivos esenciales disueltos generalmente en agua destilada.

Semisólido: su consistencia es leve y gelatinosa y se obtiene agregando agar al caldo en concentración del 0,7%; también se lo conoce como agar blando o agar punción. Se fracciona en tubos de hemólisis para siembra en puntura.

Sólido: llamado también agar estría y agar duro o placa, obtiene su consistencia por el agregado de una mayor cantidad de agar al caldo original, por lo general al 2%. En cultivos de rutina, el medio sólido se fracciona en placas de Petri o en tubos en los que el medio se deja solidificar en plano inclinado en un ángulo de 10° respecto a la horizontal. El resultado es el "agar en pico de flauta".

Por su finalidad

Medio de transporte: es un medio líquido o semisólido. Permite el mantenimiento de la muestra clínica sin modificaciones en cuanto a calidad y cantidad de microorganismos presentes, hasta su procesamiento en el laboratorio. No tiene nutrientes, sino agua, sales y un amortiguador de pH. Ejemplo: medio de Stuart.

Medio de enriquecimiento: es un medio líquido selectivo que permite el crecimiento preferencial de ciertas bacterias patógenas. Se usa cuando la muestra clínica tiene muchos

microorganismos, por ejemplo, el caldo tetrationato o caldo selenito para materia fecal que se emplea como medio de enriquecimiento preliminar en el aislamiento de salmonelas. En este medio crecen las bacterias mejor adaptadas y se inhibe el crecimiento de las bacterias coliformes y de los enterococos.

Medio mínimo: contiene la mínima cantidad de nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos.

Común o simple: es aquel que reuniendo los elementos mínimos permite el desarrollo de la mayor parte de las bacterias no exigentes.

Enriquecido: es un medio simple con el agregado de sustancias que aumentan su poder nutritivo (sangre, suero, extracto de levadura, vitaminas) en proporción del 1 al 10%. Este medio se usa para bacterias exigentes como estreptococos o micoplasmas. No debe confundirse con medio de enriquecimiento.

Selectivo: es el medio que permite seleccionar ciertos microorganismos frenando el desarrollo de otros. Esto se logra con el agregado de sustancias inhibidoras como antibióticos, ciertos colorantes, azida de sodio, sales biliares, etc. Ejemplos: medio hipersalado de Chapman para *Staphylococcus* (contiene una elevada concentración de cloruro de sodio soportada casi exclusivamente por estas bacterias); el agar sangre con polimixina B y neomicina usado para aislar estreptococos hemolíticos del grupo A contiene antibióticos que inhiben el desarrollo de los bacilos gramnegativos. También la temperatura de incubación hace selectivo a un medio de cultivo, por ejemplo, la incubación a 42 °C del agar cetrimide selecciona *Pseudomonas aeruginosa*.

Diferencial: es el medio que permite diferenciar bioquímicamente a las bacterias por su actividad metabólica. Posee un sustrato, sobre el que actúa o no la bacteria, y esa actividad se revela por variación del pH del medio o por alguna actividad enzimática que modifica el aspecto del medio de cultivo. Cuando los sustratos son azúcares o aminoácidos, el medio posee un indicador de pH. De acuerdo con la actividad metabólica de la bacteria sobre ese sustrato, vira o no el pH del medio y éste cambia de color o la colonia tiene una coloración particular que permite diferenciarla. Ejemplo: agar EMB que permite ver la actividad bacteriana sobre la lactosa. Otros ejemplos son el agar sangre que evalúa hemolisinas o el agar DNA que determina la producción de DNAsa, etc.

Especial: por las sustancias que lo integran, este medio cumple con las exigencias vitales de determinados microorganismos que únicamente en ellos pueden desarrollar en forma óptima.

Preparación de un medio de cultivo comercial

En la actualidad, los medios de cultivo son fórmulas comerciales en polvo adecuados para preparar con el agregado de agua destilada. También existen medios líquidos o sólidos listos para fraccionar o para usar inmediatamente.

Los medios que se expenden como polvo deshidratado deben guardarse a temperatura ambiente al abrigo de la luz y con la tapa bien cerrada. Debe registrarse la fecha de apertura inicial. Se debe leer atentamente el rótulo ya que hay medios que tienen agregados especiales, como el medio agar cetrimide al que se le agrega glicerina, y algunos no se esterilizan en autoclave, como el agar SS y el Hektoen.

El material de vidrio usado en la preparación se debe enjuagar con agua destilada y secado. Nunca se debe llenar más de los 2/3 del recipiente para evitar desbordes en el autoclavado. Las etapas en la preparación son las siguientes:

1) Pesar la cantidad indicada en el prospecto del medio elegido sobre papel, añadir agua destilada, dejar humectar y hervir durante 1 minuto a baño María, nunca a fuego directo.
2) Ajustar el pH si fuera necesario con OHNa o HCl, fraccionar y cerrar con tapa plástica o de algodón. El algodón puede cubrirse con una envoltura de papel, nunca con papel aluminio ya que éste impide la penetración del vapor en la esterilización por autoclave.
3) El último paso es la esterilización por autoclave. Debe recordase que hay medios que no se autoclavan, así como hay otros especiales que por sus componentes permiten únicamente la filtración.
4) Los medios de cultivo preparados deben guardarse en heladera a 4 °C. Antes de su uso se debe dejar que adquieran la temperatura ambiente.

Los siguientes son los medios de cultivo de uso más frecuente en el laboratorio de microbiología para inoculación primaria. En el Apéndice se describe la composición de los mismos.

* Agar tripteína soya o agar base sangre o agar infusión cerebro-corazón. Son la base para la preparación del agar sangre que es el medio enriquecido por excelencia. Este medio se funde a baño María y cuando alcanza 55 °C se le agrega sangre desfibrinada al 5-10%, agitando hasta lograr la homogeneización total. Se usa sangre de carnero que es la que da mejores resultados en la visualización de hemólisis. En casos especiales se usa sangre humana o de otras especies animales. Otra aplicación es en la preparación del agar chocolate. El agar sangre se coloca nuevamente a baño María a 80 °C y se agita hasta que el color del medio cambia de rojo a chocolate. No debe dejarse más tiempo ya que la sangre se "corta" y no queda una distribución homogénea.
* Agar CLDE (agar cisteína-lactosa deficiente en electrólitos) (Agar Brolactin de Merck®). Se lo usa principalmente para el cultivo de microorganismos presentes en orina (urocultivo). Permite el desarrollo de enterobacterias, algunos cocos y levaduras
* Agar EMB (eosin methilene blue). Es un medio diferencial y selectivo. Es un medio base con lactosa y sacarosa, y tiene como indicadores azul de metileno y eosina; es ideal para el aislamiento de enterobacterias y *Pseudomonas* de materiales diversos. No desarrollan *Streptococcus* y los *Staphylococcus* y *Enterococcus* lo hacen pobremente.
* Agar SS (*Salmonella-Shigella*). Útil para coprocultivos en la investigación de estos dos microorganismos. El medio inhibe gran parte de la microbiota contaminante presente en las heces. Posee lactosa, citrato férrico y citrato de sodio; como indicador posee rojo neutro y como inhibidores de los coliformes, verde brillante y sales biliares.
* Agar Lowenstein Jensen. Es un medio con base de huevo, selectivo por el verde de malaquita, usado para aislamiento de micobacterias.
* Caldo tioglicolato. Es un digesto pancreático de caseína con caldo de soja y glucosa. El tioglicolato reduce el E_h.

Crecen la mayoría de los microorganismos, incluidos los anaerobios.

* Agar Müller-Hinton. Destinado a la prueba de antibiograma por difusión.

Algunos de los medios más usados para la tipificación bioquímica de las bacterias son:

* Medio TSI o Klígler. Este medio se denomina triple azúcar hierro y en su composición hay sacarosa, glucosa y lactosa. Permite detectar tres características de los microorganismos: la producción de gas, por fermentación de azúcares, la fermentación de la lactosa o lactosa y sacarosa, y la producción de sulfuro de hidrógeno gaseoso. Es un medio diferencial que permite la tipificación bioquímica de los bacilos gramnegativos, y se usa fundamentalmente en la diferenciación de enterobacterias.
* Medio BAM (Buenos Aires modificado). Es un medio semisólido que permite ver si el microorganismo produce la enzima ureasa y si es o no móvil.
* Medio bilis esculina. Es un medio que permite diferenciar los estreptococos de los enterococos. En este medio el enterococo transforma la esculina en esculetina y el medio adquiere una pigmentación negruzca.

En el capítulo de identificación bioquímica de los microorganismos se describen otros medios.

AISLAMIENTO

Proceso o conjunto de métodos que deben aplicarse para conseguir bacterias en cultivo puro, separando las bacterias que se desea estudiar de los microorganismos contaminantes; se realiza en **medios sólidos**. El aislamiento y crecimiento inicial de microorganismos de un espécimen clínico se conoce como *aislamiento primario*.

Métodos generales de aislamiento bacteriano en un medio sólido

Diseminación en una placa

El medio de cultivo sólido elegido se debe fundir en baño María hirviente, dejar enfriar a ± 45 °C y volcar en placa de Petri, y dejar solidificar. Para evaporar el exceso de humedad del medio, se coloca la placa en estufa de cultivo a 37 °C boca abajo, 24 horas. No hay necesidad de abrir las placas. Esto permite también hacer un control de esterilidad del medio.

Para el aislamiento se puede colocar una ansada de la muestra en estudio (materia fecal, orina, sangre, esputo, etc.) en un punto periférico de la placa, y con el ansa, trazar una estría apretada de poca extensión; quemar y enfriar el ansa. Si la muestra es un hisopado, colocar el hisopo en un punto periférico e hisopar apretadamente, luego continuar con el ansa.

Para realizar la **primera siembra ciega**, la placa se gira en el sentido contrario de las agujas del reloj y se arrastra material de la estría primaria al medio sin sembrar, en forma perpendicular; quemar y enfriar nuevamente el ansa.

Seguido de una **segunda siembra ciega**, se gira nuevamente la placa arrastrando material de la segunda estría al medio nuevo en forma perpendicular.

Girando finalmente por tercera vez la placa, sin esterilizar el ansa, trazar una estría final de agotamiento en el medio sin sembrar e incubar.

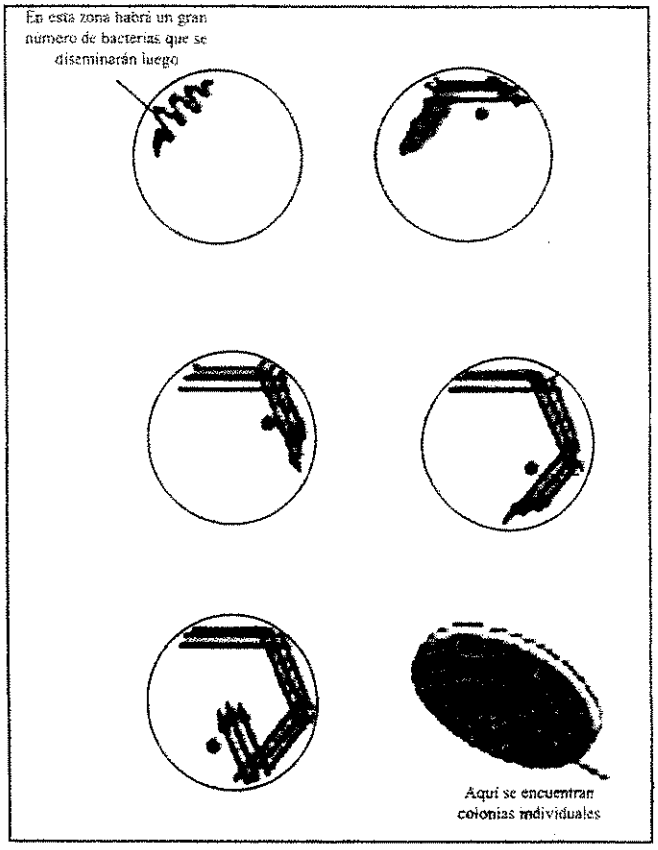


Figura 10-2. Método de diseminación en una placa.

Al quemar el ansa el número de colonias disminuirá de la primera a la última estría, permitiendo el aislamiento buscado.

Diseminación en varias placas

Se usan varias placas con medio sólido. Colocar en un extremo de la placa la muestra clínica y con espátula de Drigalsky previamente flameada y fría, diseminar la muestra en toda la superficie de la placa.

Tomar una segunda placa y repetir la diseminación con la espátula sin flamear.

Al repetir la operación con otras placas, la cantidad de bacterias irá disminuyendo progresivamente, obteniéndose al final colonias aisladas.

Dilución (método empleado para conteo viable o unidades formadoras de colonias)

Esta técnica se utiliza, fundamentalmente, en microbiología de agua y alimentos a fin de determinar su calidad higiénica; por ejemplo el recuento de bacterias mesófilas aerobias en la leche es la prueba "de oro" para evaluar la calidad bacteriológica de ésta. Una ubre sana aporta no más de 1000 bacterias mesófilas/ml de leche.

Se realizan diluciones de una muestra problema sobre la que se desea averiguar el número de bacterias viables. Se efectúa la siembra de una alícuota de cada dilución sobre medio sólido. Luego de incubar cada dilución, se cuenta el número de colonias aisladas y se multiplica por el factor de dilución, obteniéndose el número de bacterias por mililitro de muestra.

Tecnica

- Fundir tubos con agar placa en baño María hirviente, dejar enfriar a ± 45 °C y volcar en placas de Petri; dejar solidificar y evaporar el exceso de humedad colocándolas boca abajo en estufa de cultivo.

- Tomar una batería de tubos y en cada uno colocar 9 ml de solución fisiológica. Las diluciones son en base 10.
- En el primer tubo colocar 1 ml de muestra, mezclar rotando el tubo entre las manos y rotular (dilución 10^{-1} o 1/10).
- Tomar 1 ml de la dilución 10^{-1} y agregarlo al segundo tubo, mezclar y rotular (dilución 10^{-2} o 1/100); completar las diluciones hasta terminar (por ej., dilución 10^{-8}); sembrar dos placas por dilución de la siguiente forma:
  - ** si el inóculo es de 0,5 o 1 ml, debe colocarse en la placa vacía el volumen de siembra y debe agregarse sobre él el agar fundido y enfriado a ± 45 °C; homogeneizar con movimientos de rotación en ambos sentidos, dejar solidificar e incubar a 37 °C.
  - ** si el inóculo es de 0,05 o 0,1 ml primero se plaquea el agar y luego, con ayuda de una espátula, se extiende el total del volumen de siembra por toda la superficie de la placa, incubando posteriormente a 37 °C. Siempre se comienza sembrando a partir de la mayor dilución (menor concentración de bacterias).
- **Recuento:** se cuentan las placas con un desarrollo entre 30 y 300 colonias; luego de aplicar la siguiente fórmula se promedian los resultados de cada dilución.

Número de colonias x factor de dilución = bacterias viables/ml

Factor de dilución = inversa de la dilución x inversa del volumen de siembra

Ejemplo de cálculo: (para una sola placa)
Número de colonias contadas en la placa N° 3 = 50

Factor de dilución = 10^{-3} (1/1000): inversa de la dilución: 1000

Volumen de siembra = 0,1 ml (1/10): inversa del volumen de siembra: 10

50 x 1000 x 10= 500.000 bacterias/ml de muestra (5.10^5)*, que también se suele expresar como unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml).

Otra aplicación del número de bacterias viables es en el urocultivo. La orina de vejiga es estéril pero al pasar por la uretra puede sufrir una contaminación con bacterias uretrales. Para otorgarle crédito a la infección urinaria alta, se realiza un recuento de bacterias por ml de orina; si este recuento es menor de 10^5 bacterias/ml se consideran producto de una contaminación y el análisis se informa negativo.

TECNICA: la placa con medio de cultivo se siembra con un ansa calibrada de 10 µl; este volumen equivale a 0,01 ml. Se incuba 24 horas a 37 °C y posteriormente se cuenta el número de colonias, luego se multiplica por la inversa de la dilución y se obtiene el número de bacterias/ml.

Ejemplo: 30 bacterias x 100 = 3 x 10^3 bacterias/ml

Métodos especiales para obtener cultivos puros de bacterias a partir de muestras contaminadas

Calor

Cuando a partir de una muestra se quieren seleccionar bacterias esporuladas, se aplica shock de calor. Este consiste en someter al cultivo contaminado a una temperatura de 80 °C durante 15 a 30 minutos; así se eliminan las formas vegetativas y sólo quedan viables las esporas.

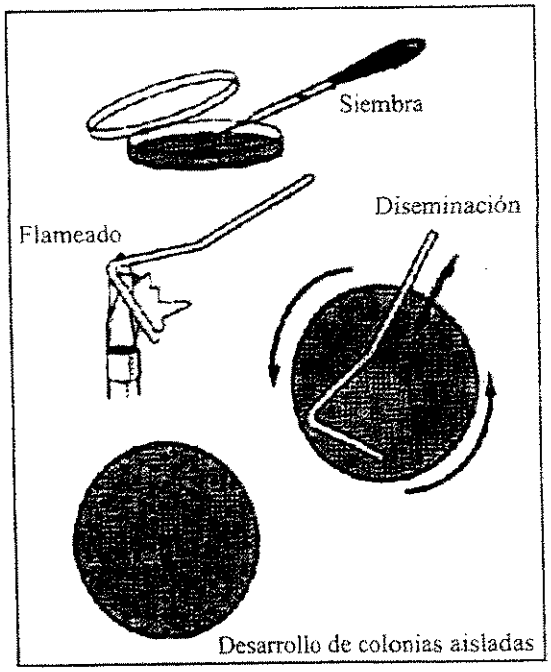


Figura 10-3. Método de diseminación con espátula de Drigalsky.

Temperaturas disgenésicas de cultivo: los medios sembrados se incuban a 44,5 °C (± 0,5 °C); a esta temperatura solamente desarrolla *Escherichia coli*, lo cual permite su aislamiento de los coliformes contaminantes.

Medios de cultivo disgenésicos

Se denominan así los medios que tienen poder selectivo sobre algunas bacterias gracias a ciertas sustancias que los integran (cloruro de sodio, bilis, alcohol feniletílico); por ellas pueden favorecer el desarrollo de determinados microorganismos y frenar o disminuir la proliferación de bacterias no deseadas.

Sustancias químicas

Para tratar muestras mixtas se utiliza el alcohol etílico de 50°C durante 1 hora; así se aíslan selectivamente los microorganismos que forman esporas.

Inoculación en animales de laboratorio

Se emplean animales altamente susceptibles a la bacteria que se desea aislar (por ej., ratón para el *Streptococcus pneumoniae*). Realizando la inoculación por la vía apropiada, los contaminantes quedan retenidos en el punto de inoculación y las bacterias patógenas invaden rápidamente el organismo, pudiendo ser aisladas en estado puro en sangre, hígado, bazo, etc. Siempre que sea posible, se deberá evitar el uso de animales de laboratorio. Esta técnica también se denomina **filtración biológica.**

TECNICAS DE CULTIVO

Trasplante

También llamado repique, resiembra o subcultivo, es el pasaje de las bacterias viables de un cultivo a un medio fresco.

De medio líquido a medio líquido: se realiza con ansa en anillo o pipeta Pasteur.

De medio líquido a medio sólido en tubo: el ansa en aguja cargada se lleva al fondo de un tubo con agar en pico de flau-

* también puede expresarse $5e10^5$

ta, se la apoya sobre el medio de cultivo y se desliza con un movimiento de zigzag a medida que se la extrae del tubo.

De medio sólido a medio líquido: con ansa o aguja, se lleva el inóculo y se lo deposita sobre las paredes del tubo, contactando con el caldo.

De medio sólido a medio sólido: con ansa o aguja, se repite la siembra en estría descrita anteriormente.

MORFOLOGIA Y ASPECTO DE LAS COLONIAS Y POBLACIONES MICROBIANAS

Desarrollo del cultivo en medio líquido

El cultivo de rutina en caldo se realiza en tubo de ensayo con 10 ml de medio o en tubos de hemólisis con 3 ml de caldo. Las características de las **poblaciones** son: formación de velo, anillo, enturbiamiento (característico), y depósito (característico).

Desarrollo superficial

1. **Formación de anillo**: puede ser de tamaño variado, adherido o no a la pared del tubo; consistencia variada (película tenue, grumosa o membranosa); aspecto diverso (seco, húmedo, etc.).
2. **Formación de película o velo**: puede ser de diferente consistencia, gruesa o fina, lisa o rugosa, húmeda o seca, ascendente por el tubo; al agitar puede mantenerse en la superficie o caer al fondo del tubo.
3. **Formación de precipitado floculoso**: al agitar el tubo el precipitado desciende formando largos flóculos hasta el fondo del tubo (la floculación es la dispersión de grumos sólidos en una solución coloidal).
4. **Formación de película membranosa**: formada por una membrana más gruesa que la forma pelicular o de velo.
5. **Desarrollo superficial ausente**: cuando se trata de bacterias microaerófilas o anaerobias absolutas no se observa ningún desarrollo superficial, sí se advierte turbidez del medio en la parte inferior.

Turbidez del medio líquido

Muchas bacterias desarrollan produciendo enturbiamiento del medio debido a la abundante suspensión celular. Esta turbidez tiene distintos grados y se la clasifica según su mayor o menor intensidad en leve, moderada y fuerte, y por su duración en transitoria o persistente.

Formación de sedimento

Muchos cultivos presentan sedimentos de diferente aspecto. Se clasifican en: *floculoso* cuando el aspecto es granuloso grueso, *granular*, cuando es granuloso fino, *escamoso* y *viscoso*. La cantidad de sedimento formado puede ser nula, escasa o abundante.

Desarrollo en cultivo sólido

La morfología colonial en medio sólido es característica de cada tipo bacteriano. Es útil su observación en un cultivo primario para definir si se trata de un cultivo puro o la muestra está contaminada. Las características más importantes son: pigmentación, forma, dimensiones, elevación, contorno y superficie.

El color depende de la presencia de pigmentos carotenoides. El *Staphylococcus aureus*, por ejemplo, presenta pigmento amarillo.

La superficie puede ser lisa, rugosa, mucosa, anular concéntrica o con surcos radiales. La superficie lisa se debe a la presencia de cápsula o a las cadenas laterales de los polisacáridos de la membrana externa de los gramnegativos y está muchas veces asociada a la virulencia del microorganismo. Las colonias rugosas tienen una superficie seca formada por células que carecen de cápsula o que crecen en forma filamentosa. En algunos microorganismos las cepas rugosas no poseen virulencia. Un caso inverso es el *Mycobacterium tuberculosis* cuyas cepas patógenas presentan colonias secas por el "factor cuerda" y las cepas mutantes de menor virulencia son de aspecto más liso. La superficie mucosa se observa en bacterias fuertemente capsuladas como *Klebsiella*.

Las formas varían desde puntiforme (< 1 mm de diámetro) hasta circular, filamentosa, rizoide o irregular.

El borde puede ser entero, ondulado, lobulado, mellado, filamentoso o festoneado.

La altura puede ser velada, plana, convexa o realzada.

Otros rasgos son el olor y los caracteres ópticos. El olor es a veces característico de algunas bacterias; por ejemplo, *Pseudomonas* tiene olor a flores. Los caracteres ópticos incluyen aspecto: opaco, traslúcido, opalescente o iridiscente.

CULTIVO DE MICROORGANISMOS ANAEROBIOS

Las bacterias anaerobias estrictas requieren tensión de oxígeno reducida para su crecimiento, por lo que no se desarrollan en la superficie de medios de cultivo en atmósferas de aire normal (aerobiosis) ni en ambientes con 10% de CO_2 (microaerofilia). Solamente se desarrollan en atmósferas anaerobias con 5-10% de H_2, 5-10% CO_2 y 80-90% de N_2.

Métodos para obtener anaerobiosis

Físicos

Producción de vacío: las bacterias se cultivan en un recipiente que se somete a vacío por extracción del aire con una bomba de vacío o con una trompa de agua.

Ebullición: el medio de cultivo se somete a ebullición por 10 minutos y luego se enfría bruscamente con agua helada o hielo. Después de sembrar el microorganismo se sella la superficie con vaselina líquida, lanolina o aceite.

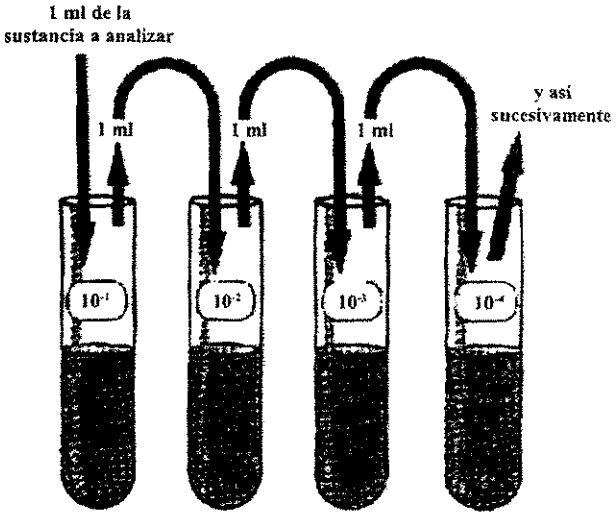


Figura 10-4. Método de dilución en tubos.

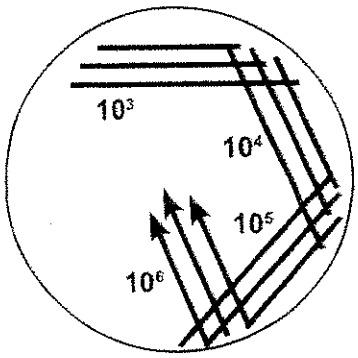


Figura 10-5. Utilización del método de difusión para muestras clínicas (por ej., urocultivo). Cantidad aproximada de bacterias en la muestra incial de acuerdo con el número de colonias en los distintos trazos.

Remplazo de gases: el medio de cultivo está en un recipiente en el que se remplaza el O_2 por otros gases como H_2, N_2, CO_2 o mezclas gaseosas. El método más tradicional es el de Novy que remplaza al O_2 por H_2 producido por la reacción del ácido sulfúrico (SO_4H_2) con granallas de cinc.

Químicos

Por el agregado al medio de cultivo de sustancias reductoras no tóxicas para los microorganismos.

La mayoría de las cepas de *Clostridium* patógenas crecen en un medio líquido al que se le agregan tejidos animales como carne, hígado, etc. Estos tejidos actúan como agentes reductores (caldo Tarozzi).

Glucosa: el agregado de glucosa al 1% a un agar nutritivo sembrado por punción en profundidad logra buenos resultados para obtener cultivos puros de anaerobios. Este método no es adecuado cuando la bacteria fermenta la glucosa por la abundante formación de gas y ruptura del medio.

Tioglicolato de sodio: es el medio reductor de uso más frecuente. Se lo emplea a una concentración de 0,05 a 0,1%, con 0,07% de agar para aumentar la viscosidad y reducir la extensión del O_2 por convección. Generalmente se le agrega un indicador de anaerobiosis como azul de metileno o resazurina. Si la acción reductora es adecuada, desaparece el color del indicador excepto en la superficie. Se incuba en condiciones aerobias.

La eficacia de los medios líquidos reductores aumenta si se agrega 0,1% de agar ya que éste disminuye las corrientes de convección que pueden llevar el O_2 hacia el fondo del tubo.

Hierro: las limaduras de hierro e incluso los clavos de hierro, actúan de manera eficaz como reductores agregados a los medios líquidos. El hierro debe conservarse estéril en frascos. Antes de agregar las limaduras, el medio debe hervirse durante 10 minutos y enfriarse rápidamente. Usar de inmediato.

Cisteína: se utiliza agregada al medio líquido en una concentración final de 0,3 a 0,5 mg/ml.

Acido ascórbico: en concentración del 0,1% en medio líquido es un eficaz agente reductor.

Formaldehido sulfoxilado de sodio: agregado a medios complejos en una concentración de 0,03-0,05% es un buen agente reductor.

Métodos combinados

jarra de anaerobiosis (Mc Intosh y Fildes)

Los cultivos se incuban dentro de un frasco de vidrio resistente o policarbonato en el que el oxígeno se combina con hidrógeno por acción catalítica del platino o negro de paladio caliente.

La jarra de policarbonato, con un diámetro interno de 12,5 cm, permite incubar varias placas de Petri o tubos en forma simultánea. La tapa de la jarra tiene una abrazadera que permite el cierre hermético. Para generar la anaerobiosis hay dos métodos. En el método original la tapa tiene dos grifos por donde se introduce el hidrógeno. La tapa también tiene dos terminales conectados por dos conductores a una bobina suspendida dentro del frasco. Esta tiene un amianto recubierto de paladio esponjoso. El amianto está recubierto con una resistencia que se conecta con los terminales de la tapa. El sistema funciona cuando se colocan los cultivos y se cierra la tapa. Se hace entrar hidrógeno a la jarra por un grifo durante 10 minutos mientras permanece abierto el otro grifo para que se retire el aire. Luego se cierran ambos grifos y se conecta la fuente de electricidad en los terminales. Cuando se calienta el paladio, comienza a formarse agua y se repite el proceso de hacer

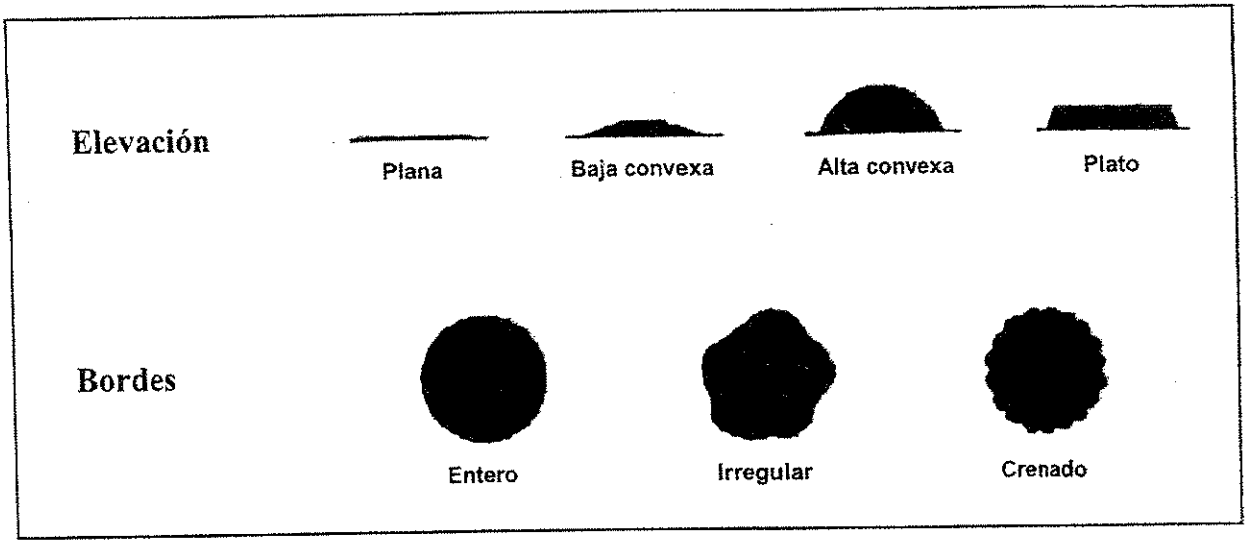


Figura 10-6. Formas, elevación y bordes de las colonias.

entrar hidrógeno y calentar el paladio hasta la eliminación del oxígeno. Se usa un testigo de caldo con azul de metileno que se hace incoloro cuando se alcanza la anaerobiosis total.

El método más sencillo (Gaspak) consiste en colocar en la jarra un sobre con una sustancia reductora. Los dos componentes básicos del sistema anaerobio son: un sobre generador del dióxido de hidrógeno y de carbono, y un catalizador de paladio. El sobre abierto y el catalizador se colocan dentro del tarro de GasPak. Se incluye un indicador de anaerobiosis. Se coloca agua con una pipeta y se tapa. A los 15 minutos se alcanza la anaerobiosis y se observa en el interior de la jarra una neblina por la condensación del agua. La jarra se incuba a 37 °C.

Indicadores de anaerobiosis

Hay indicadores químicos y físicos, y biológicos. Los primeros son colorantes que pierden su color en anaerobiosis por transformación a su leucobase. El azul de metileno al 0,5% agregado a una solución glucosada constituye el reactivo de Mc Intosh. También se utiliza la resazurina agregada a los medios líquidos.

Como método biológico se utilizan esporas de *Clostridium haemolyticum* o *Bacillus stearothermophilus* que se incluyen en la jarra anaeróbica y se incuban junto con el resto de las placas o tubos. Si este microorganismo desarrolla se infiere que la anaerobiosis es correcta.

Dentro de las bolsas plásticas sellables (Bio-Bag, Gas Pak Pouch, etc.) se colocan las placas, junto a un sistema generador de CO_2 e H_2 y un indicador que corresponde a la atmósfera que se desea obtener.

BIBLIOGRAFIA

Cátedra de Microbiología Especial, Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Guías de Trabajos Prácticos. Carrera de Bacteriología Clínica e Indust.

Finegold, Sydney M, Martin, William J: Bailey-Scott, Diagnóstico microbiológico, Ed. Panamericana. 1982.

Lennette, Balows, Hausler, Truant. Manual de Microbiología Clínica. 3ª edición. Ed Panamericana. 1982.

Mac Faddin JF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Panamericana. 1980.

Sterne M, Batty I. Clostridios patógenos. Ed. Acribia. 1978.

Capítulo 11

MARCHA BACTERIOLOGICA

Lucila Emilia Bautista,
Nestor Oscar Stanchi

Ante un problema de salud surge la necesidad de investigar las causas. Difícilmente pueden tratarse con éxito las infecciones si no se conoce cuál es el agente causal y cuál es su susceptibilidad a los fármacos antimicrobianos. La expresión marcha bacteriológica designa la serie ordenada de pasos que se deben seguir para identificar correctamente una bacteria responsable de infección. Cuando el veterinario clínico detecta la enfermedad en el paciente, comienza el proceso de diagnóstico microbiológico. A partir de aquí deben obtenerse una o varias muestras biológicas, como sangre, hisopados de mucosas, exudados, orina, etc., que permitan aislar al microorganismo causal o elementos específicos de ese agente. Estas muestras deben obtenerse en tiempo y forma adecuados.

El laboratorio de Microbiología realiza las etapas para la concreción de un resultado. El veterinario interrelaciona todos los datos obtenidos e inicia el tratamiento.

Los pasos habituales de la marcha bacteriológica son:

- Decisión de realizar el estudio bacteriológico
- Recolección de la muestra y transporte
- Observación microscópica
- Observación en fresco
- Coloración
- Cultivo
- Tipificación bioquímica
- Serotipificación
- Estudios complementarios
- Antibiograma
- Serodiagnóstico

DECISION

En esta primera etapa, es responsabilidad del médico veterinario definir la necesidad y el alcance de los estudios que va a remitir al laboratorio. Debe existir la presunción de que la enfermedad es de origen bacteriano. De acuerdo con la sintomatología clínica del animal objeto de estudio, el veterinario determinará qué tipo de muestra es la más adecuada para obtener un diagnóstico correcto. Debe conocer cómo tomar la muestra y cómo mantenerla en condiciones óptimas para que, una vez llegada al laboratorio, ésta sea representativa de la infección. También es importante evaluar el costo del estudio para indicar ante posibles resultados semejantes el estudio de menor valor.

RECOLECCION DE LA MUESTRA

Un espécimen obtenido en forma adecuada es el paso más importante en el diagnóstico de una infección, debido a que los resultados de las pruebas de diagnóstico de enfermedades infecciosas dependen de la selección, el tiempo y el método de obtención de las muestras. Las bacterias crecen, proliferan y mueren, son susceptibles a muchas sustancias químicas y pueden encontrarse en sitios anatómicos diferentes y en líquidos y tejidos corporales distintos durante la evolución de las enfermedades infecciosas. Debido a que el aislamiento de un agente infeccioso es muy importante en la formulación de un diagnóstico útil para un posterior tratamiento, la muestra debe obtenerse del sitio donde sea más probable que se presente el microorganismo en determinada etapa de la enfermedad y se manejará de tal forma que favorezca la supervivencia y proliferación de aquél. El profesional que realiza la toma de muestra pasa a tener importancia fundamental ya que de él depende que pueda aislarse el microorganismo responsable de la enfermedad.

La recuperación de bacterias es más significativa si el agente es aislado de un sitio normalmente desprovisto de microorganismos (un área, por lo común, estéril). Cualquier tipo de microorganismo cultivado de sangre, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, cavidad pleural y orina extraída por punción vesical es un hallazgo con valor diagnóstico. Por el contrario, muchas zonas del cuerpo tienen una microbiota normal (más correctamente llamados "microorganismos nativos"). Todas las aberturas del cuerpo, como el oído externo, las fosas nasales, la boca, el meato urinario y el ano están colonizadas. Hay bacterias en las mucosas en contacto con el exterior, en la piel, en el tracto gastrointestinal, en aparato respiratorio hasta los grandes bronquios, en aparato genital hasta vagina o uretra masculina y en aparato urinario hasta uretra en ambos sexos. Las bacterias nativas tienen diversas funciones: ocupan un lugar y espacialmente impiden que otros gérmenes colonicen. Producen bacteriocinas que son sustancias que impiden o retardan el desarrollo de otros géneros bacterianos; en algunos casos, como las bacterias del rumen o del intestino, actúan en un mutualismo conveniente para el hospedador ya que colaboran en la digestión de la celulosa, o fabrican vitaminas, etc.

Estas bacterias nativas son "potencialmente patógenas" ya que cuando abandonan su hábitat o nicho ecológico y colonizan otras regiones pueden causar infecciones de distinta severidad. Un ejemplo es cuando *Escherichia coli* invade el tracto urinario superior y causa cistitis. La obtención de microorganismos potencialmente patógenos de las vías respiratorias, gastrointestinal, genitourinaria, de heridas o de piel debe considerarse en el contexto de los microorganismos normales de cada sitio particular. Otra situación es la debilidad de las defensas del hospedador, los microorganismos nativos pueden causar enfermedad en pacientes inmunológicamente deficientes. El desafío del microbiólogo consiste en definir cuál de los microorganismos aislados de una muestra clínica participa de la enfermedad.

Es necesario el aislamiento del germen nativo en tres muestras consecutivas de un mismo lugar o en dos muestras de diferente sitio para atribuirle valor diagnóstico al hallazgo de un germen nativo y otorgarle categoría de agente causal de infección.

Los microorganismos transitorios son aquellos no patógenos o sólo potencialmente patógenos hospedados en la piel o las mucosas durante horas, días o semanas, que provienen del ambiente y no producen enfermedad.

Otros microorganismos son patógenos facultativos, por ejemplo: *Salmonella, Shigella, Mycobacterium bovis y avium, Campylobacter fetus*, etc. Estos no se consideran como microbiota normal y su presencia los implica como agentes etiológicos; pero hay que hacer una salvedad respecto de su papel "facultativo", puesto que para que una enfermedad se desarrolle, deben interactuar factores dependientes del germen (número de bacterias, factores de virulencia, etc.) y factores dependientes del hospedador.

Las **reglas generales** que se aplican a todas las muestras son:

- La cantidad de material recolectado debe ser adecuada.
- La muestra debe ser representativa del proceso infeccioso.
- Debe evitarse la contaminación del material con gérmenes nativos, utilizando sólo equipos estériles y precauciones de asepsia en la toma de muestra. Por ejemplo: descontaminar la piel durante 1 minuto antes de punzar durante la obtención de sangre.
- Debe enviarse el espécimen al laboratorio y examinarse con prontitud. Es fundamental el uso de medios de transporte cuando la muestra lo requiera.
- Si se han suministrado antimicrobianos antes de obtener las muestras para el estudio microbiológico, se requiere suspender el uso de ellos y repetir la toma de especímenes varios días después (depende de la farmacodinamia del antibiótico usado); a los fines prácticos, es conveniente no menos de 72 horas de suspensión de la administración del antimicrobiano. Si es inevitable el antimicrobiano por el estado del paciente (por ej., en casos de sepsis), se debe tomar la muestra inmediatamente antes de la próxima dosis.
- Deben respetarse las temperaturas de mantenimiento de las muestras antes de su procesamiento. Si se envía el material de lugares distantes, se debe procurar que sea en horario nocturno.
- Es fundamental el envío de un protocolo en el que se provean datos clínicos y de uso de antibióticos a fin de que el laboratorio seleccione las metodologías más apropiadas para alcanzar el diagnóstico bacteriológico adecuado.

TRANSPORTE

En otro capítulo hemos definido el medio de transporte como aquel que permite mantener la viabilidad de los gérmenes presentes en una muestra sin alterar su cantidad o calidad. Son en general de consistencia líquida o semisólida, no tienen elementos

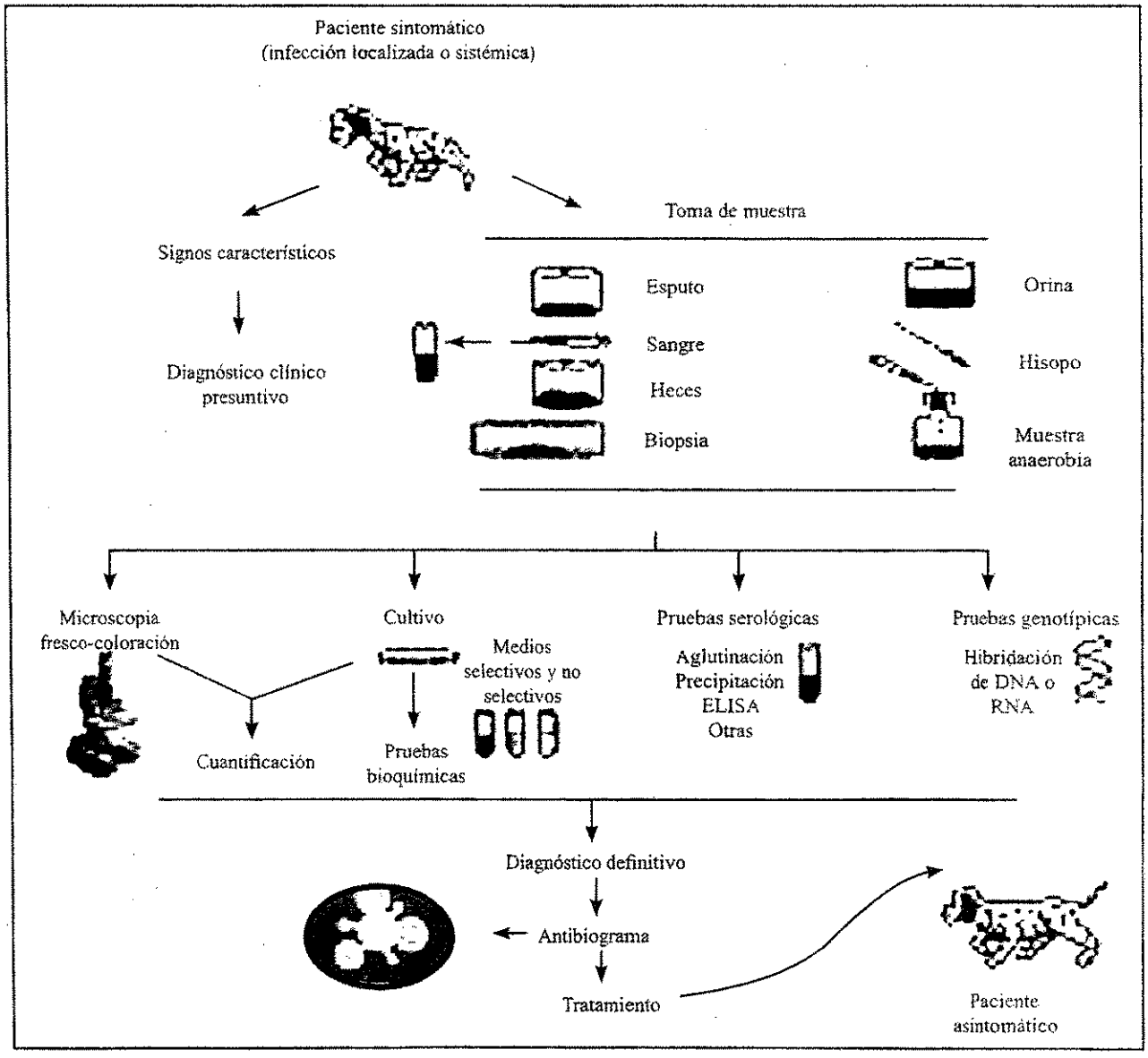


Figura 11-1. Esquema de la marcha bacteriológica.

nutritivos y poseen un agente reductor. Stuart y Cary y Blair son los más usados.

Muestras que requieren medio de transporte

Todas las muestras en hisopo: heridas, exudado vaginal o uretral, faríngeo, exudado ótico y conjuntival. Se conservan a temperatura ambiente 15-25 °C hasta 24 horas.

Muestras que no requieren medio de transporte

Semen, líquidos de punción, anaerobios. Se conservan a temperatura ambiente 15-25 °C hasta 12 horas.

Muestras que no requieren medio de transporte

Punta de catéter, orina, lavado bronquial, materia fecal, biopsias. Se conservan en heladera a 4 °C hasta 24 horas.

Sangre y líquido cefalorraquídeo. Se conservan en estufa de 37 °C.

OBSERVACION MICROSCOPICA

Observación en fresco en microscopio de campo claro

En esta técnica el microorganismo es visualizado sin colorear. Las bacterias permanecen vivas. Es un método sencillo, ya que se colocan las bacterias diluidas en solución fisiológica (o agua de canilla) sobre un portaobjetos, luego se coloca el cubreobjetos y se observa en el microscopio.

También las bacterias pueden ser observadas por la "gota pendiente" que consiste en utilizar un portaobjetos excavado donde se coloca una suspensión con las bacterias. Estas se desplazan libremente y la imagen obtenida no presenta distorsión.

En el caso de infección urinaria, para el examen bacteriológico de la orina se requiere centrifugar 10 ml de ésta, descartar el sobrenadante y observar el sedimento; en él se pueden ver las bacterias en aumento mediano 40X y apreciar la forma, agrupación y movilidad, además de la cantidad aproximada de leucocitos.

Fondo oscuro

En este caso, la muestra se coloca entre el porta y el cubre, pero el microscopio tiene un condensador especial (cardioide, alterno o paraboloide) que por medio de un diafragma central impide el paso de los rayos luminosos centrales, mientras que los rayos periféricos tienen una incidencia oblicua a nivel de la muestra (fenómeno Tyndall). Si los rayos luminosos encuentran partículas a nivel del objeto, sufrirán una desviación en su trayecto y penetrarán en el objetivo; de este modo, permitirán observar las bacterias iluminadas periféricamente como un cielo estrellado. Si, por el contrario, los rayos luminosos no encuentran ningún elemento que se forme a nivel del objeto, seguirán su marcha sin sufrir desviaciones, lo que permitirá observar un campo microscópico totalmente oscuro, sin partículas brillantes. Este método se aplica en la observación de bacterias que por su pequeño grosor (0,15-0,2 µm) no pueden ser coloreadas satisfactoriamente (por ej., espiroquetas).

Microscopio de contraste de fase

Este microscopio, que posee un sistema óptico especial, permite visualizar objetos transparentes como las bacterias con detalles que no pueden ser apreciados con el microscopio de luz clara; el fundamento es que la luz, al pasar a través de la bacteria, emerge en diferentes fases dependiendo de los diferentes componentes estructurales (pared, cápsula, esporas, etc.), el microscopio transforma estas fases en diferencias de intensidad y aparecen estructuras más oscuras que otras. Su uso está indicado principalmente para ciertas bacterias como *Campylobacter* y *Vibrio*.

COLORACION

Las bacterias vivas son transparentes y su índice de refracción es similar al de la mayoría de los medios acuosos, por eso el examen directo hace difícil el estudio de sus detalles morfológicos. Para poder observar la morfología, agrupación, afinidad tintorial y variedad de los microorganismos presentes en una muestra, se debe realizar un estudio tintorial previo a cualquier otra actividad. Las bacterias se tiñen con diversos colorantes anilínicos.

Colorante es toda sustancia capaz de transmitir color a otro elemento. En el colorante debemos considerar dos elementos o grupos:

a) grupo **cromóforo**: es el que da color.
b) grupo **auxócromo**: brinda la capacidad al colorante de poder colorear, de poder combinarse con la otra sustancia.

El grupo auxócromo da al producto la propiedad de disociarse electrolíticamente permitiendo la formación de sales y convirtiéndolo así en colorante. En general, los colorantes más usados en bacteriología son los básicos, que colorean la parte ácida de la bacteria, o sea, el DNA, el RNA, las proteínas, etc. (azul de metileno, violeta de metilo, fucsina básica, verde de malaquita). Los colorantes ácidos prácticamente no son usados en bacteriología (por ej., eosina, fucsina ácida, azul de anilina).

Mordientes y decolorantes

Los agentes químicos que fijan el colorante o le permiten penetrar más profundamente en el microorganismo se llaman **mordientes** (fenol, ioduro potásico). Prolongando el tiempo de coloración o calentándolos (mordiente físico), se aumenta la intensidad con que se tiñen las bacterias y las esporas. Una vez que el microorganismo ha sido teñido intensamente y el colorante se ha fijado por la acción del mordiente, no es fácil eliminarlo. Sin embargo, las bacterias y las células de los tejidos varían en su comportamiento al respecto, lo que hace posible las coloraciones diferenciales. El colorante se elimina mediante **decolorantes**, tales como los alcoholes diluidos, acetona, éter y ácidos orgánicos. Las células decoloradas se tiñen luego con un colorante de contraste.

Ventajas y desventajas de las preparaciones microscópicas coloreadas

Las desventajas consisten en que el colorante mata la bacteria y no se puede visualizar la movilidad. Las ventajas son que permite observar estructuras internas, detalles de agrupación y clasificar las bacterias de acuerdo con sus afinidades tintoriales.

Coloración simple: interviene un solo colorante, todo se tiñe del mismo color. Por ejemplo: la tinción con azul de metileno.

Coloración diferencial: son coloraciones especiales que tiñen una estructura en particular de la bacteria: esporas, flagelos, cápsula, gránulos metacromáticos, etc.

En la rutina de una marcha bacteriológica siempre se realiza la coloración diferencial de Gram, y cuando se investigan bacterias ácido alcohol resistentes como *Mycobacterium*, se realiza además la coloración de Ziehl Neelsen.

Coloración por el método de Gram

Consiste en teñir el extendido bacteriano con violeta de genciana o cristal violeta, someterlo a la acción de un mordiente, Lugol, lavar con alcohol o alcohol-acetona hasta eliminar el colorante y

teñir luego con un colorante de contraste, como la fucsina básica o la safranina. Las bacterias **grampositivas** se tiñen de violeta, ya que toman el color del colorante primario y **no se decoloran.** Las bacterias **gramnegativas** se tiñen de fucsia (colorante secundario) ya que el color del primario fue arrastrado por el decolorante.

Pasos metodológicos de la coloración de Gram

* **Extendido**: con ansa, extender una gota de líquido sobre el portaobjetos (si la muestra es sólida, tocar con el ansa y emulsionarla en una gota de solución fisiológica o agua colocada en el porta).
* **Secado:** al aire caliente, con leve movimiento de vaivén; en este paso se elimina el exceso de líquido, pero las bacterias continúan vivas.
* **Fijado:** el método de Koch consiste en pasar 3 veces el portaobjetos por la llama con un ángulo de 45°, evitando un calentamiento excesivo que carbonice la muestra. Puede también fijarse con metanol o acetona frías (-20 °C) y dejar actuar hasta la evaporación.
* **Coloración:** cubrir el preparado con violeta de genciana o cristal violeta (colorante primario) y dejar actuar 1 minuto.
* **Lavado:** con agua de canilla.
* **Mordiente:** Lugol (solución yodo-iodurada), cubrir el extendido y dejar actuar 1 minuto.

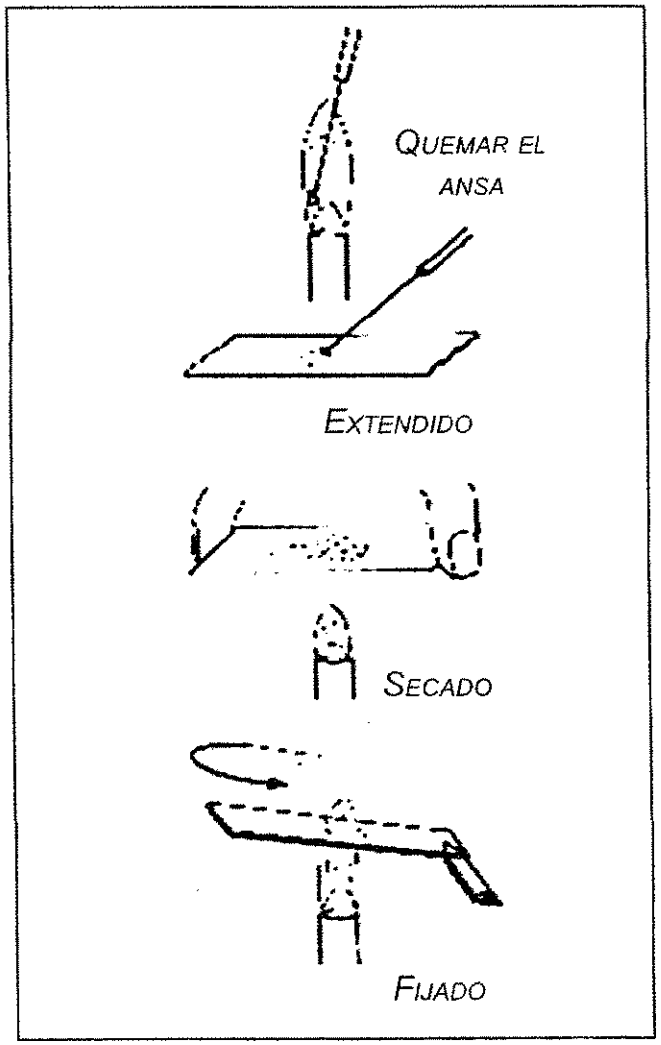


Figura 11-2. Extendido, secado y fijado (método de Koch) de un portaobjetos.

* **Decolorante**: alcohol o alcohol-acetona, lavar por arrastre con el portaobjetos inclinado hasta que no se elimine más colorante.
* **Lavado:** con agua de canilla.
* **Coloración de contraste**: fucsina diluida o safranina. Cubrir el extendido y dejar actuar no más de 45 segundos.
* **Lavado:** con agua de canilla.
* **Secado**: al aire.
* **Observación**: con lente de inmersión (mayor aumento o 100X). Se coloca previamente una gota de aceite de inmersión sobre el extendido coloreado. No se usa cubreobjetos.

Fundamento

La coloración de Gram permite clasificar a las bacterias en dos grupos por diferencias en la composición de la pared celular. Las grampositivas (violeta) poseen una gruesa pared de peptidoglucano de 200 a 800 Amstrong (Å); por el contrario, las gramnegativas (fucsia) poseen una triple envoltura laxa en la que el peptidoglucano tiene un espesor de 20 a 30 Å. La diferencia esencial entre esos dos tipos de células está en su resistencia a la decoloración. En el proceso de decoloración, el alcohol-acetona disuelve la membrana externa rica en lípidos de las gramnegativas, la fina capa de peptidoglucanos no puede retener el colorante inicial y la célula se decolora. Las bacterias grampositivas, al tener una gruesa capa de peptidoglucano, se hacen impermeables al decolorante por un proceso de deshidratación y retienen el colorante inicial (violeta de genciana).

Coloración de Ziehl Neelsen

Cuando la marcha se orienta a la búsqueda de bacterias ácido alcohol resistentes (BAAR), como *Mycobacterium* y *Nocardias*, se usa la coloración de Ziehl Neelsen. Las paredes celulares de estos microorganismos son ricas en lípidos, ceras y ácido micólico.

Fundamento

El colorante primario es la fucsina básica, el decolorante es alcohol-ácido clorhídrico y el contracolorante es azul de metileno.

En esta técnica, las bacterias ácido alcohol resistentes no se decoloran y conservan el colorante primario teñido de fucsia. Otros microorganismos toman el azul de metileno.

Técnica

* Preparar un extendido y fijar con calor suave.
* Bañar el preparado con la fucsina fenicada.
* Calentar el preparado pasando un hisopo encendido por debajo hasta que se desprendan vapores blancos; no debe hervir.
* Dejar enfriar 5 minutos y repetir el procedimiento.
* Decolorar con alcohol-ácido hasta que no se desprenda más colorante.
* Lavar con agua de canilla.
* Contracolorear con azul de metileno 30 segundos.
* Lavar con agua y secar. Examinar con aceite de inmersión.

El laboratorio puede hacer un informe preliminar sobre la aparición de bacterias en una muestra estéril (sangre, LCR, etc.).

Sobre las muestras con gérmenes nativos, el laboratorio informa presencia de leucocitos, piocitos, sangre, porcentaje de grampositivos y gramnegativos que pueden ser de utilidad antes de un informe definitivo.

CULTIVO

Se llama cultivo al proceso que consiste en propagar microorganismos brindándoles las condiciones ambientales adecuadas. Los microorganismos en crecimiento están haciendo réplica de sí mismos y requieren elementos que se encuentran en su composición química u otros necesarios para su elaboración. Los nutrientes deben brindarles estos elementos en una forma accesible desde el punto de vista metabólico. Además, estos microorganismos requieren energía metabólica con objeto de sintetizar macromoléculas y conservar los gradientes químicos esenciales a través de sus membranas. Los factores que se deben regular durante el crecimiento son nutrientes, pH, temperatura, aeración, concentración de sales y potencia iónica del medio.

Para la mayoría de las muestras biológicas se usan dos medios enriquecidos, agar sangre y agar chocolate, y un medio diferencial y selectivo para gérmenes gramnegativos como EMB o CLDE. Si se buscan anaerobios, en general se usa el caldo tioglicolato para el primoaislamiento.

ESTUDIOS BIOQUIMICOS O FISIOLOGICOS

Tienen como finalidad la identificación de las bacterias que, siendo morfológicamente parecidas, tienen actividad bioquímica distinta. Se usan medios de cultivo "diferenciales" que permiten evaluar las actividades metabólicas de los microorganismos sobre diferentes sustratos, a saber: azúcares, aminoácidos, entre otros. También se observa la presencia de enzimas como coagulasa o catalasa, etc.

Luego de evaluar la acción sobre los diferentes sustratos, el microbiólogo consulta tablas donde se definen el género y la especie bacteriana.

La importancia de estos estudios reside en realizar un tratamiento adecuado. Hay gérmenes que tienen sensibilidad conocida a las drogas y no es necesario el antibiograma (por ej., *Streptococcus pyogenes*); otros microorganismos requieren siempre la realización de aquél, pues tienen resistencia conocida a los antimicrobianos. Además, para el veterinario es importante saber si un segundo episodio de infección es una recidiva o una infección nueva.

SEROTIPIFICACION

Con fines netamente epidemiológicos o cuando se requiere conocer el serotipo de una bacteria que, en términos bioquímicos, es similar a otra (mismo género y especie; por ej., *Escherichia coli* H7 O157, productora del síndrome urémico hemolítico en el hombre), se utilizan pruebas de aglutinación, floculación, etc., enfrentando la bacteria aislada con sueros específicos contra componentes estructurales como los antígenos flagelares (H), somáticos (O) o capsulares (K).

ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS

Son estudios que se realizan para llegar a una identificación mucho más exacta de las bacterias. Por ejemplo: estudios de proteínas constitutivas por medio de la técnica de electroforesis, estudios sobre la constitución del DNA (reacción en cadena de la polimerasa [PCR], hibridación de DNA o RNA, utilización de sondas biotiniladas, etc.).

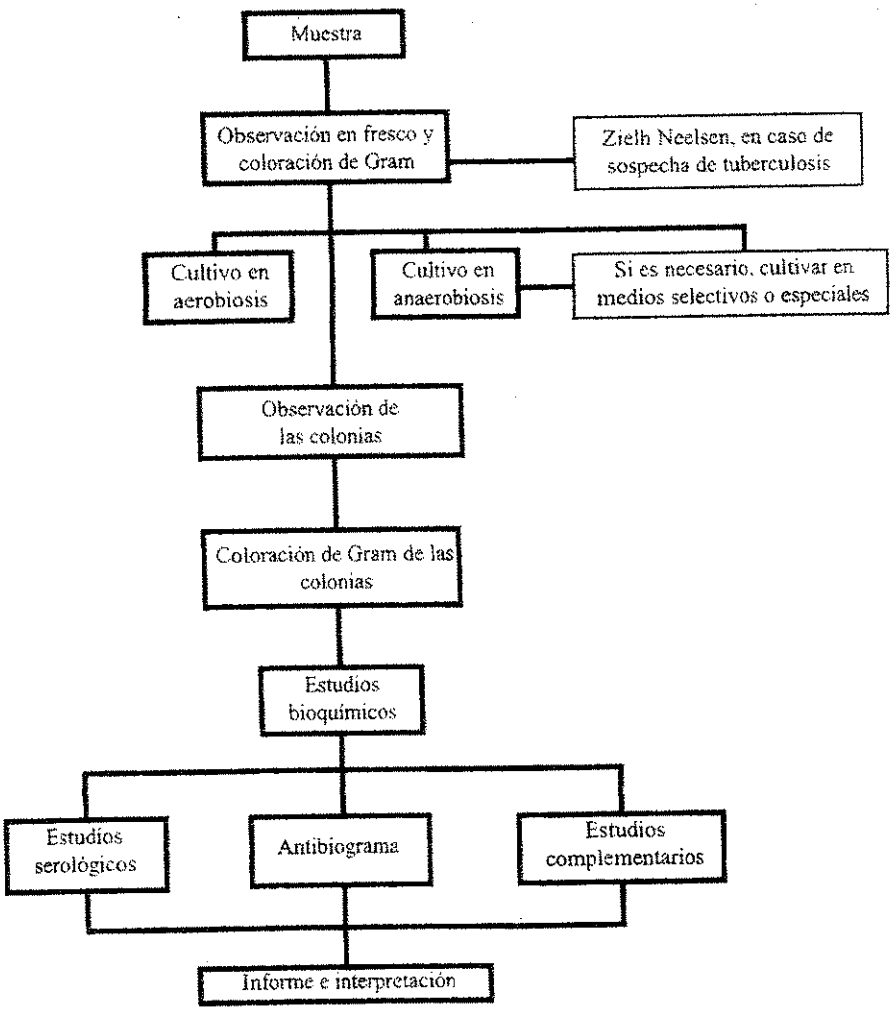


Figura 11-3. Marcha bacteriológica para muestras clínicas.

ANTIBIOGRAMA

Este es el estudio de sensibilidad de las bacterias a los antibióticos y quimioterápicos.

Se define como antibiótico a las sustancia producida por un microorganismo que mata o inhibe el crecimiento de otro germen. Un quimioterápico es la sustancia producida químicamente en el laboratorio con efecto bactericida o bacteriostático.

Este tema será desarrollado ampliamente en otro capítulo. Sólo cabe aclarar que luego de aislar una bacteria causal de infección se realizará o no el antibiograma dependiendo del conocimiento previo de su susceptibilidad a los antimicrobianos. Existen bacterias a las que, por tener una sensibilidad conocida o por existir discrepancia entre los resultados in vitro e in vivo, no se les realiza antibiograma. En otros casos es fundamental realizar este estudio.

PRUEBAS SEROLOGICAS

Cuando un microorganismo invade un hospedador vertebrado, se produce una respuesta inmunológica de tipo humoral y celular que puede ser evaluada in vitro. Las pruebas serológicas son determinaciones que se realizan en el laboratorio. Se utiliza el suero del animal objeto de estudio y por diferentes técnicas –precipitación, aglutinación, ELISA, PCR, etc.– se evalúa la respuesta humoral (mediada por anticuerpos). También existen pruebas in vivo e in vitro para determinar la respuesta celular, (por ej., la reacción a la tuberculina).

Las últimas etapas son el INFORME e INTERPRETACION de los análisis.

BIBLIOGRAFIA

Bailey- Scott. Diagnóstico Microbiológico. Ed. Panamericana. 6° edición. 1983.

Basualdo JA, Coto C, de Torres R. Microbiología Biomédica. Ed. Atlante. 1996.

Burrows, Williams. Tratado de Microbiología. Nueva Editorial Interamericana. 1975.

Dorland's Illustrated Medical Dictionary. Ed. El Ateneo. 1984.

Lennette Edwin, Microbiología Clínica. Ed. Panamericana. 1° edición. 1982.

Schlegel H. Microbiología General. Ed. Omega. Barcelona. 1988.

Sebald M, Tacquet A, Bricout F. Técnicas en Bacteriología. Serie Exámenes de laboratorio. Ed. Jims. 1977.

PROTOCOLO DE ENVIO DE MUESTRAS

AL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA VETERINARIO

Remitente: _____

Propietario: _____

Especie: _____ **Raza:** _____ **Sexo: M/H** **Castrado: Sí/No**

Lote: _____

Domicilio de envío de resultados: _____

Ciudad: _____ **Provincia:** _____ **Código postal:** _____

Teléfono: (**)** _____ **FAX: (** **)** _____ **E-mail:** _____

Estudio solicitado: _____

Tipo de muestra: _____

Fecha de toma de muestra: ___/___/___

Datos clínicos generales: _____

_____

_____

_____

_____

_____

Diagnóstico presuntivo:

_____

Otros datos que considere pertinentes:

_____

_____

_____

_____

Lugar y fecha **Firma y sello del profesional**

Capítulo 12

CONCEPTOS DE ESTERILIZACION

Nestor Oscar Stanchi,
Elida Gentilini,
Carlos Mario Gómez

INTRODUCCION

En la práctica de laboratorio es necesario conocer la metodología mediante la cual se puedan eliminar o al menos controlar y/o disminuir la carga bacteriana en un ambiente determinado. Para poder trabajar con microorganismos puros se requiere que éstos sean cultivados en medios estériles; la toma de muestra debe realizarse también con elementos estériles, de tal forma que otros microorganismos no puedan hacer variar los resultados de un estudio. De la misma manera, todo medicamento inyectable no deberá contener germen alguno, y las vacunas inactivadas, los elementos de cirugía, etc., deben cumplir con el mismo requisito: esterilidad.

La **esterilidad** indica la ausencia total de formas viables de microorganismos. No existen grados de esterilidad; ésta es, por lo tanto, un término absoluto. Un objeto nunca puede estar "parcialmente" estéril. El término **esterilización** se refiere a los procedimientos que conducen a la destrucción o separación de toda forma de vida, macro, micro o submicroscópica. Los procedimientos para lograr la esterilización son variados (tabla 12-1) pero todos apuntan a eliminar totalmente a los microorganismos. Otros términos relacionados que se utilizan son **asepsia** (sin sepsis[1]), que consiste en evitar la sepsis mediante procedimientos que intentan impedir la introducción de microorganismos y reducir el número de los que están presentes; o **antisepsia** (contra la sepsis) que es el proceso que se aplica al tejido vivo con el objeto de prevenir la multiplicación de las formas vegetativas de los gérmenes y provocar la sepsis. La **desinfección** consiste en la destrucción de los microorganismos patógenos en estado vegetativo que se encuentran sobre elementos inertes.

Controlar el crecimiento microbiano significa prevenir el crecimiento de microorganismos. Este control se efectúa de dos maneras básicas: matando microorganismos o inhibiendo su crecimiento. El control de crecimiento normalmente involucra el uso de agentes físicos o químicos que matan o previenen dicho crecimiento. Los agentes que matan las células se denominan con la terminación "cida" o "biocida", mientras que los agentes que inhiben el crecimiento de células (sin matarlas) son llamados agentes "estáticos". Así, el término bactericida se refiere a aquellos que matan a las bacterias, y el de bacteriostático, a los que inhiben el crecimiento de células bacterianas. Un bactericida mata bacterias, un fungicida mata hongos y así sucesivamente.

Tabla 12-1. Esterilización por agentes físicos

CALOR	SECO	DIRECTO	Mechero
		INDIRECTO	Horno (estufa)
	HUMEDO	CON PRESION	Autoclave
		SIN PRESION	Ebullición Vapor fluente Tindalización Pasteurización
FILTRACION	FILTROS DE PORO DEFORMABLE		Discos o placas tipo Seitz
	FILTROS DE PORO FIJO		Membranas (celulosa) Filamentos orgánicos Membranas nucleares
RADIACIONES	IONIZANTES		Rayos α, β y γ Rayos X
	NO IONIZANTES		Rayos ultravioletas Rayos infrarrojos

[1] Infección o degradación de los tejidos vivos por acción de los microorganismos.

AGENTES FISICOS:

CALOR

El calor es el método más confiable para la esterilización. La destrucción de una población bacteriana por medio del calor es un proceso gradual y la cinética de destrucción es exponencial. El tiempo requerido para la esterilización está universalmente relacionado con la temperatura de exposición. Tres parámetros pueden ser usados para indicar el grado de resistencia al calor que tienen los microorganismos.

El **punto térmico letal**, que es la temperatura más baja en la cual muere una población bacteriana en determinado tiempo (10 minutos).

El **tiempo térmico letal**, que es el menor tiempo necesario para matar el 100% de una población de microorganismos a determinada temperatura bajo condiciones específicas del medio.

La **reducción decimal de tiempo**, que es el tiempo en minutos necesario para matar el 90% de la población. Es una modificación del tiempo térmico letal.

Todos estos conceptos relacionan siempre tiempo y temperatura. Para determinar experimentalmente estos valores es requisito indispensable que las condiciones sean controladas. Esto es que la naturaleza del medio y el número de microorganismos permanezcan constantes. Debido a la elevada temperatura empleada en la esterilización por calor, un cambio mínimo de ésta altera significativamente el tiempo de muerte térmica (fig. 12-1).

Para el estudio de los métodos de producción del efecto letal en los microorganismos es necesario clasificarlos en dos grandes grupos: el **calor seco**, que corresponde al fuego directo y al aire caliente, y el **calor húmedo**, producido por la ebullición, el vapor de agua a presión (autoclave), la tindalización y la pasteurización.

Mecanismo de lesión térmica

Ya en 1881 se hablaba de la diferencia que había entre el uso del calor seco y húmedo como mecanismo de destrucción de microorganismos. Con calor seco hay más estabilidad proteica que con calor húmedo. Por ejemplo: la albúmina de huevo con 50% de agua coagula a 56 °C, mientras que si tiene 5% de agua, lo hace a 77 °C; con 6% de agua son necesarios 145 °C y sin agua se requieren 165 °C para coagular.

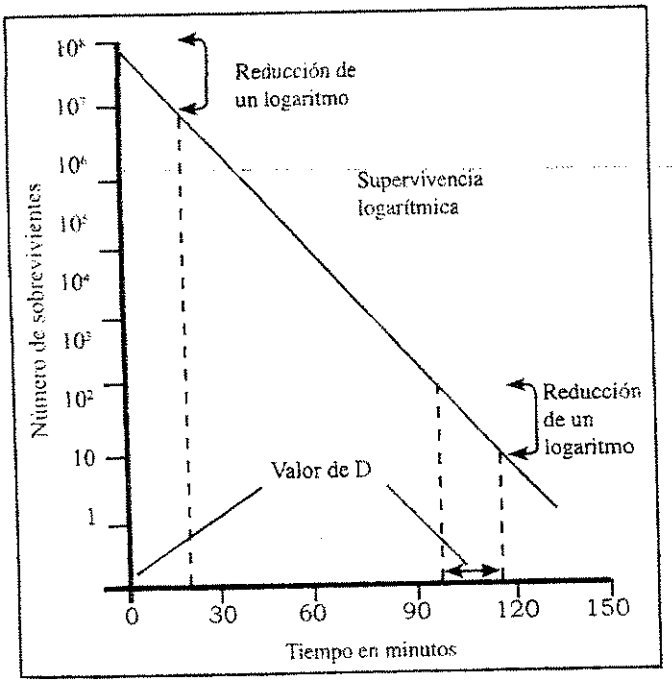


Figura 12-1. La reducción decimal del tiempo (valor D) es el tiempo en minutos para reducir el 90% de la población. Dicho de otra manera, es la cantidad de minutos necesarios para que el tiempo térmico letal pase a través de un ciclo logarítmico. El valor D es independiente del tiempo cuando la respuesta es logarítmica.

El efecto letal del calor húmedo por encima de determinada temperatura se atribuye a la desnaturalización y coagulación de las proteínas, pero lo que sucede en realidad es un proceso más complejo y es la coagulación la que enmascara otros fenómenos que ocurren en la célula. La producción de interrupciones en las cadenas únicas de DNA puede considerarse el primer fenómeno de efecto letal. Además, cuando se calienta una proteína con agua, hay ruptura de las uniones disulfuro, y se generan cadenas peptídicas móviles que se reactivan formando nuevas proteínas (desnaturalización). Por otro lado, el calor actúa alterando la integridad funcional de la membrana celular y permitiendo la salida de sustancias.

El efecto del calor seco se debe a la desnaturalización proteica, las lesiones de oxidación y los efectos tóxicos por niveles elevados de electrólitos. Al carecer de agua, el número de grupos polares de una cadena peptídica es menor y requiere más energía para abrir las moléculas, por lo cual resulta menos eficiente que el calor húmedo (tabla 12-2).

La tabla 12-3 muestra el tiempo necesario para la destrucción de esporas bacterianas por calor seco y húmedo.

Calor seco

Puede ser clasificado en *calor directo* (también denominado incineración), como la llama del mechero de Bunsen. Pasar los objetos por la llama es útil para esterilizar tijeras y pinzas que se sumergen previamente en alcohol y se dejan flamear fuera de la llama del mechero para evitar que se destemplen, pero aun así, éste no es el método de elección para esterilizar el material de cirugía. También se emplea en forma rutinaria para esterilizar el asa del mango de Kolle, antes y después de efectuar una siembra. En la figura 12-2 se detallan las temperaturas en las distintas porciones de la llama.

Este mismo método se emplea para destruir animales de laboratorio infectados, esqueletos y otros materiales de desecho en hornos crematorios.

El *calor seco* puede aplicarse en forma *indirecta* mediante el uso de hornos de esterilización por aire caliente. En éstos se requiere de 160 °C durante 2 horas o 170 °C durante 1 hora. Se recomienda para elementos de vidrio (placas de Petri, pipetas, erlenmeyer) o de metal. No se emplea para material de caucho, papel o telas porque se queman, ni tampoco para medios de cultivo. Hay que tener en cuenta que el vidrio en el proceso térmico puede variar su tamaño hasta en un 5%, por lo que no es recomendable este proceso cuando es necesario utilizar el material para mediciones volumétricas exactas. Tiene la ventaja de eliminar los pirógenos de las bacterias gramnegativas.

Dentro de un horno no ventilado se produce una estratificación del calor. La temperatura más alta se encuentra en la bandeja inferior vacía y la más baja en la bandeja superior llena, según se explica en la figura 12-3. Esta estratificación debe ser tenida en cuenta cuando se acopian grandes cantidades de materiales por las distintas temperaturas que existen en diferentes puntos del horno. Con un sistema de ventilación forzada se logra uniformar las temperaturas dentro del horno, solucionando así este problema.

Calor húmedo

a) Con presión: el autoclave

Para comprender las dificultades a vencer para obtener una perfecta operación de esterilización se debe conocer el funcionamiento del autoclave y el significado de los términos en uso.

Tabla 12-2. Tiempo de muerte térmica aproximado en minutos

Tiempo de muerte térmica en minutos				
			Agua en vapor bajo	
Grupo	**Organismo**	**Ebullición 100 °C**	**Presión 121 °C**	**Calor seco 180 °C**
Altamente sensibles	Bacterias no esporuladas, virus, hongos	2	1	< 1
Levemente sensibles	*Clostridium perfringens*	5	2	< 1
Moderadamente resistentes	*C. septicum*. *Bacillus anthracis* (esporo)	10	3	< 1
Altamente resistentes	*C. tetani* (esporo)	60	5	2
Extremadamente resistentes	*G. stearothermophilus*, *C. botulinum* (esporos)	300	12	5

Cuando a un líquido cualquiera se le aplica calor, se calienta hasta cambiar de estado y pasar a su forma gaseosa. La temperatura que alcanza un líquido para pasar al estado gaseoso se llama *punto de ebullición*. Este punto no se altera por mucho calor que se aplique. Mientras el líquido está recibiendo calor, aumenta su temperatura, pero llegado al punto de ebullición, se necesita calor extra, el cual es usado para vencer la presión que ejerce la atmósfera sobre la superficie del líquido y convertirse en vapor: esta cantidad extra de calor se llama **calor de vaporización** (539 calorías por gramo para el caso del agua).

El fenómeno descrito en los párrafos anteriores se produce exactamente en direcciones opuestas; si el vapor es enfriado, llega a convertirse en líquido, y en ese cambio de estado emite exactamente el mismo calor extra que recibió para convertirse en vapor. Este fenómeno se denomina **condensación**.

El agua con presión atmosférica, al pasar al estado de vapor, aumenta considerablemente su volumen. Este aumento es contenido, para el caso del autoclave, por sus paredes, las que, al no poder aumentar el volumen, incrementarán la presión interna. Este aumento de presión hace que el agua cese de bullir y que, por el momento, se establezca un equilibrio, el que no es más que un nuevo punto de ebullición del agua a esa presión. Se necesita otra vez cierta cantidad de calor (calor de vaporización a esa presión) para producir más vapor y, como consecuencia, aumentar la presión. Esta situación se repetiría hasta llegar un momento en que la presión destruiría las paredes del autoclave, lo cual se evita con una válvula de seguridad que a cierta presión deja escapar el vapor (tabla 12-4).

El calor sensible es la cantidad de calor necesario para llevar 1 litro de agua a ebullición (son necesarias 80 calorías). El calor latente es el necesario para llevar 1 litro de agua hirviendo a vapor,

Tabla 12-3. Tiempo de destrucción de esporas

Calor húmedo								
	Tiempo de destrucción en minutos a distintas temperaturas en °C							
Microorganismo	**100**	**105**	**110**	**115**	**120**	**125**	**130**	**134**
Bacillus anthracis	2-15	5-10						
B. subtilis	varias horas							
Anaerobios putrefactores	780	170	41	15	5-6			
Clostridium tetani	5-90	5-25						
C. welchii	5-45	5-27	10-15	4	1			
C. botulinum	300-530	40-120	32-90	10-40	4-20			
Bacterias del suelo	Muchas horas	420	120	15	6-30	4		1,5-10
Bacterias termófilas		400	100-300	40-110	11-35	3,9-8,0	3,5	1
C. sporogenes	150	45	12					

Calor seco							
Tiempo de destrucción en minutos a distintas temperaturas en °C							
Microorganismo	**120**	**130**	**140**	**150**	**160**	**170**	**180**
Bacillus anthracis			hasta 180	60-120	9-90		
C. botulinum	120	60	15-60	25	20-25	10-15	5-10
C. welchii	50	15-35	5				
C. tetani		20-40	5-15	30	12	5	1
Esporas del suelo				180	30-90	15-60	15

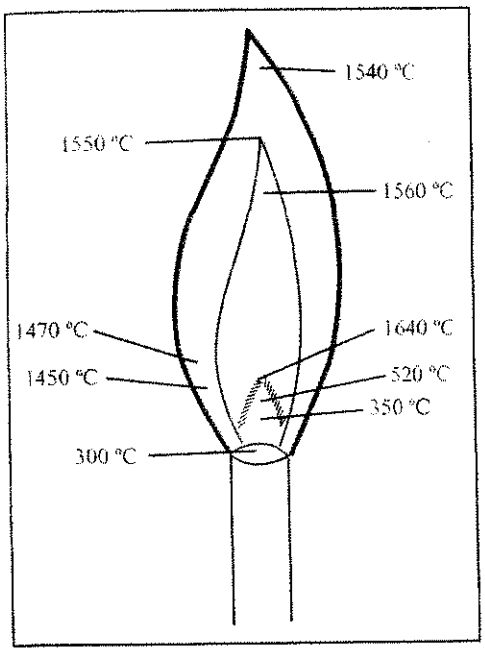


Figura 12-2. Esquema de las temperaturas en las distintas porciones de la llama.

siendo necesarias en este caso 539 calorías (casi 7 veces más). El vapor dentro del autoclave choca con elementos fríos (por ej., el material a esterilizar); de esta forma, el vapor se enfría y se condensa, y entrega en este caso 539 calorías/gramo; al condensarse se contrae y se retrae el volumen. El agua de condensación vuelve al sistema para ser nuevamente calentada y retornar al ciclo.

Si se le saca agua al sistema y se aumenta la temperatura, el vapor se sobrecalienta, se seca y actúa como calor de esterilización seco. Si el vapor sobrecalentado no encuentra ningún objeto frío, la esterilización no se realiza porque la cantidad de calor liberado por éste es menor que el latente liberado por la condensación del vapor saturado.

En el autoclave debe existir, por lo tanto, una relación constante entre presión y temperatura, en la cual el volumen no varía. Esta relación se produce sólo si el gas que se encuentra en su interior es vapor de agua saturado, si no hay condensaciones bruscas y hay buena circulación del vapor.

El autoclave: dentro de los autoclaves usados en el laboratorio se encuentran los de tipo Chamberland (fig. 12-4). Este es uno de los más sencillos y existen modelos verticales, horizontales y de diferentes tamaños, pero todos con el mismo principio. Están constituidos por la caldera de cobre batido y estañado interiormente, sostenido por una cámara metálica. En su parte inferior lleva una fuente calórica, gas o electricidad. En los grandes autoclaves industriales, el calor es suministrado por calderas. En la parte superior lleva una tapa que debe poseer los siguientes elementos: a) un termómetro indicador de temperatura que generalmente se extiende en el rango de 100 a 200°C; b) un manómetro indicador de presión expresada en libras/pulgada cuadrada, en kg/cm^2 o en atmósferas; a veces el termómetro y el manómetro se encuentran en un solo indicador, teniendo en cuenta la relación entre ambas (tabla 12-4), podría utilizarse mayor presión, y por lo tanto, mayor temperatura, pero no es habitual en el laboratorio; c) una espita que sirve para eliminar el aire durante el calentamiento, proceso denominado *purga*; y d) una válvula de seguridad que permite el escape del vapor a presión que hay en el interior, cuando excede la adecuada. En

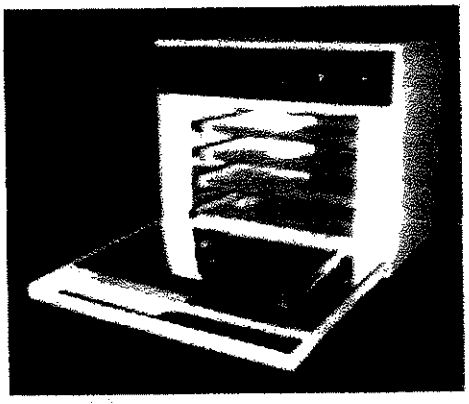


Figura 12-3. Estufa u horno de esterilización.

el interior del autoclave se encuentran un enrejado y una lámina cribada, sobre la cual se apoya el material a esterilizar. En los autoclaves modernos, se van remplazando estos elementos por sistemas automáticos que facilitan su manejo y garantizan la mayor eficacia de la esterilización (regulador automático de temperatura, presión, purgado y tiempo, etc.).

El purgado del autoclave es uno de los procesos más importantes a tener en cuenta para su manejo. En la figura 12-6 se puede observar el efecto del aire retenido sobre la temperatura del autoclave. Es necesario tener en cuenta además el volumen del elemento a esterilizar; a modo de ejemplo, en la figura 12-7 se puede apreciar el tiempo que tarda el calor en penetrar grandes volúmenes de líquido. De esto se desprende que en todo ciclo de esterilización por autoclave es necesario tener en cuenta que existen un tiempo de calentamiento (aproximadamente 20 minutos), un tiempo de penetración (que dependerá del volumen que deberá penetrar el calor hasta llegar al centro de aquél), de la pared del recipiente y del contenedor (lata o cesto de alambre), un tiempo de muerte más un tiempo de seguridad (15 minutos) y un tiempo de enfriamiento (fig. 12-8).

En forma práctica se puede calcular la temperatura en relación con la presión en libras, sumando 106 a dicha presión (por ej., 106 + 15 = 121 °C).

Ciclo de esterilización por autoclave

1. Tiempo de calentamiento (en autoclave) de aproximadamente 20 minutos desde 20 °C (temperatura ambiente) a 121 °C.
2. Tiempo de penetración: tiempo que tarda el calor en llegar a todo el objeto (121 °C).
3. Tiempo de alojamiento: es el tiempo que va a estar el objeto a la temperatura de 121 °C (contempla el tiempo de muerte más el de seguridad).
4. Tiempo de enfriamiento: desde 121 °C hasta 60 °C.

Controles de esterilización

Hay distintos métodos para controlar la operación de esterilización en autoclave. Uno de ellos, el **químico**, consiste en introducir papeles que contienen sustancias que, a determinada temperatura, cambian de color (generalmente a 120 °C, por ej.,

Tabla 12-4. Relación entre presión y temperatura

Presión en atmósferas	Presión en libras	Temperatura en °C
0	0	100
1	15	121

de gris a negro denso). Estos papeles se obtienen como cintas adhesivas e indican que se ha llegado a dicha temperatura, pero no el tiempo durante el cual se mantuvo.

El **método biológico**, el más seguro, consiste en introducir entre los elementos a esterilizar un tubo con un trozo de papel de filtro embebido en un cultivo de un microorganismo esporulado, resistente a altas temperaturas (por ej., *Geobacillus -Bacillus-stearothermophilus*), que además es apatógeno y fácil de cultivar. Luego de realizada la esterilización se lleva el papel a un medio de cultivo y se incuba durante 24 horas a 56 °C. La falta de desarrollo indicará que la esterilización ha sido correcta (se han eliminado las esporas bacterianas). Este mismo papel viene encerrado en ampollas que tienen un indicador púrpura de bromocresol, que vira al amarillo si el microorganismo es capaz de crecer. Este método presenta el inconveniente de tener que esperar 24 horas antes de poder usar los materiales procesados.

El **método físico**, de termocuplas, consiste en un electrodo ubicado en el interior del autoclave que va conectado por fuera a una aguja inscriptora que registra en un gráfico la temperatura en función del tiempo de esterilización. Cualquier variación de temperatura por debajo de la necesaria se debe agregar como tiempo extra de esterilización.

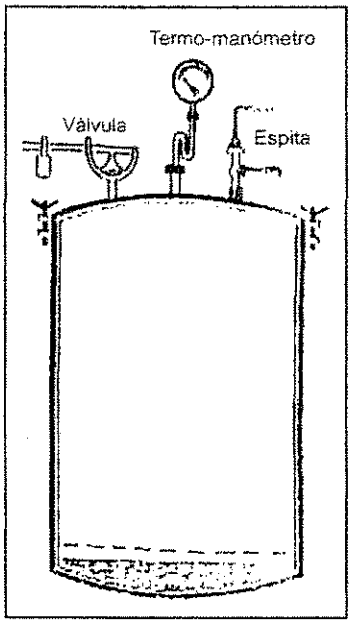


Figura 12-4. Partes del autoclave.

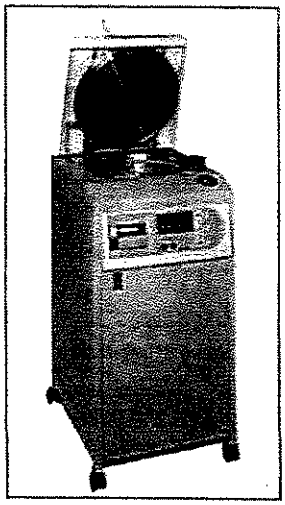


Figura 12-5. Autoclave moderno.

b) Sin presión

Ebullición: el agua en ebullición alcanza una temperatura de 100 °C a nivel del mar, la cual destruye en unos 10 minutos las formas vegetativas de la mayoría de las bacterias y muchos virus. Las esporas y ciertos virus, como el de la hepatitis humana o el de la anemia infecciosa equina, no son inactivados. Es un método útil para higienizar o disminuir la carga bacteriana en forma rápida y con un equipo sencillo ciertos elementos como jeringas, utensilios varios y aun instrumental de cirugía en casos extremos.

Tindalización: este proceso se conoce también como esterilización fraccionada. Consiste en 3 calentamientos de 60-80 °C durante 30 minutos, separados por dos incubaciones a 37 °C durante 24 horas. Con el primer calentamiento se destruyen las formas vegetativas del medio a esterilizar. Con la incubación, las esporas presentes pasan a formas vegetativas que se destruyen con el segundo calentamiento. Este se repite para asegurar la esterilización. Se emplea sobre elementos en los cuales la alta temperatura pueda alterar sus propiedades, como por ejemplo, hidratos de carbono o leche (principalmente esta última debido a la dificultad de filtración por sus materias grasas). Tiene el inconveniente del tiempo que demora, es necesario mantener el medio a temperaturas elevadas por largo tiempo (pueden envejecer algunos de los componentes del mismo) y puede resultar inseguro cuando la carga bacteriana es alta o el volumen del líquido es importante, por lo cual es poco usado en el laboratorio.

Pasteurización: es un método de higienización mediante el cual se reduce la carga bacteriana en ciertos productos. No es una técnica de esterilización, ya que se eliminan solamente las formas vegetativas de los microorganismos. Se aplica a sustancias que no toleran la temperatura de esterilización sin perder sus caracteres organolépticos. Pasteur la empleó por primera vez en la conservación de vinos y actualmente se la utiliza sobre todo en la industria de la alimentación (leche y derivados, vino, cerveza). Para establecer la temperatura y el tiempo adecuados, se tiene en cuenta la resistencia de los patógenos que con mayor frecuencia se encuentran en el producto (por ej., leche: *Mycobacterium tuberculosis* y *Coxiella burnetii*). Hay varios tipos de pasteurización: baja, que se realiza a 62 °C durante 30 minu-

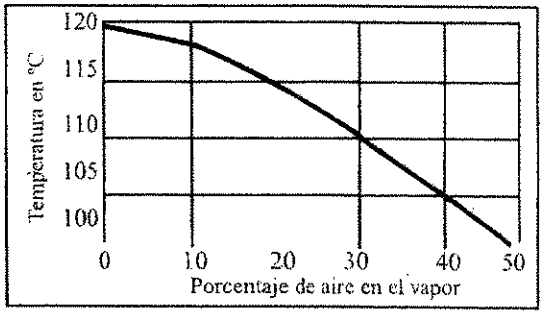


Figura 12-6. Efecto del aire retenido sobre la temperatura del autoclave.

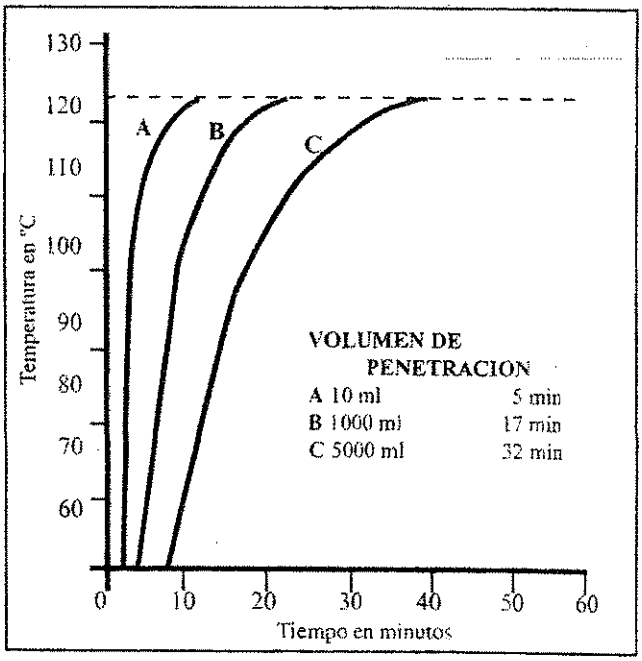


Figura 12-7. Influencia del volumen sobre el tiempo de penetración del calor.

tos: alta, a 72 °C durante 15 segundos; y ultraalta temperatura (UHT), a 100 °C durante 2 segundos. Como se mencionó, estas temperaturas sólo reducen la carga de microorganismos, por lo que no se deben descuidar las medidas de higiene que buscan evitar la contaminación previa o posterior al proceso.

Oxido de etileno: si bien el óxido de etileno es un agente químico, se lo incluye en este apartado ya que se emplea como esterilizante. El óxido de etileno es un gas muy soluble en agua y explosivo. Al igual que el formol, actúa como agente alquilante, sustituyendo los átomos de hidrógeno en radicales NH_2, OH, COOH y HS de las proteínas, combinándose en forma irreversible y desnaturalizándolas. Es muy eficaz tanto frente a formas vegetativas como a esporuladas. Al ser una molécula pequeña y no poseer cargas penetra con facilidad en las células sin necesitar del agua para actuar. Constituye un excelente método de esterilización gaseosa para superficies secas, pero su acción es más lenta que el vapor y más costosa. Por otro lado, resulta peligroso por ser explosivo y por su acción como tóxico residual. No está descartada una posible actividad mutagénica y carcinogénica, por lo que debe utilizarse con precaución. Se utiliza para esterilizar objetos sensibles al calor, como materiales plásticos, sondas, jeringas, cánulas, guantes, instrumental de cirugía (no es corrosivo sobre los metales) y equipos quirúrgicos. Su empleo puede hacerse mediante el autoclave de óxido de etileno (también denominado estufa de óxido de etileno) o sin él. Es de uso habitual en medicina humana, y en medicina veterinaria se aplica en la esterilización de materiales destinados a inseminación artificial y trasplante embrionario.

En el uso con autoclave se coloca el material a esterilizar dentro de bolsas de polietileno de no más de 100 µm de espesor, se hace vacío y luego se llena con el gas que viene en garrafas. En el uso sin autoclave, se preparan los materiales en bolsas de polietileno de espesor no mayor a 100 µm, y a su vez se los coloca dentro de una bolsa de espesor mayor de 100 µm, incluyendo en su interior una ampolla de Amphrolene (óxido de etileno); se cierra la bolsa y se rompe la ampolla. Luego de 24 horas está el material estéril, pero hay que esperar otras 24 horas antes de poder utilizar el contenido por los residuos tóxicos.

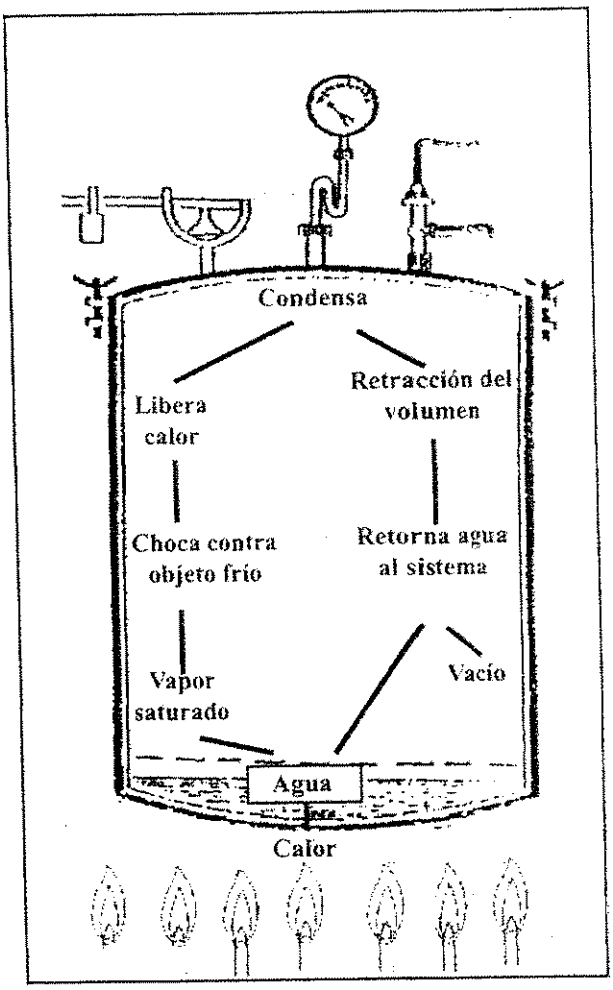


Figura 12-9. Diagrama de fases del autoclave.

FRIO

Las temperaturas inferiores a la óptima para el desarrollo disminuyen la actividad microbiana y, si son bastante bajas, ésta cesa, al igual que el metabolismo. Las bajas temperaturas son útiles para preservar cultivos, los cuales pueden almacenarse durante largos períodos a temperaturas de refrigeración (4 a 7 °C). Muchas bacterias, y sobre todo muchos virus, se mantienen con éxito congelados a temperaturas de -20 a -70 °C. En estos procedimientos, el enfriamiento inicial mata a cierta parte de la población, pero los sobrevivientes permanecen viables durante largo tiempo. A esto se debe que las bajas temperaturas, aún excesivas, no se puedan emplear como método de esterilización. Temperaturas tan bajas como -196 °C (nitrógeno líquido) son usadas para conservar cultivos de microorganismos. Los microorganismos mantenidos a bajas temperaturas se consideran en latencia, ya que no desarrollan actividad metabólica detectable. En esa condición se basa la aplicación de bajas temperaturas en la conservación de alimentos.

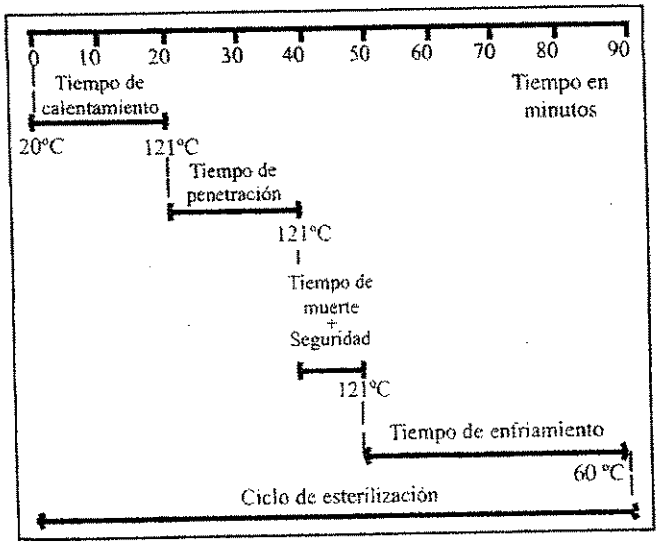


Figura 12-8. Ciclo de esterilización por autoclave.

Los procesos de congelamiento y descongelamiento repetidos producen un efecto más destructivo sobre los microorganismos. Este efecto parece depender de dos fenómenos: uno, menor, consiste en la formación de cristales de hielo que ocasionan lesiones sobre las membranas; otro, aparentemente más importante, es la formación de cristales de hielo extracelular, que causa la salida del agua desde el interior de la célula, y da como resultado el aumento de la concentración intracelular de electrólitos y la desnaturalización de las proteínas. Con la lesión de la membrana celular se produce la salida de compuestos intracelulares y por ende la muerte celular.

FILTRACION

Se entiende por filtración el pasaje de un fluido (líquido o gas) a través de una sustancia porosa que retiene los microorganismos

Tabla 12-5. Temperatura y efectividad de distintos tratamientos térmicos

Tratamiento térmico	Temperatura	Efectividad
Incineración (calor seco)	> 500 °C	Vaporiza el material orgánico de superficies no inflamables, pero puede destruir muchas sustancias en el proceso. Destruye los priones.
Ebullición	100 °C 30 min	La ebullición mata a los microorganismos patógenos y las formas vegetativas, pero puede no destruir las esporas.
Ebullición intermitente	100 °C 3 veces con intervalo de enfriamiento	Mata las esporas bacterianas.
Autoclave	121 °C 15 min a 1 atm de presión	Mata todas las formas de vida, incluyendo las esporas. No destruye los priones.
Aire caliente (en horno de esterilización)	160 °C 2 h	Para materiales que pueden resistir estas temperaturas y permanecer secos. Mata todas las formas de vida.
Aire caliente (en horno de esterilización)	170 °C 1 h	Para materiales que pueden resistir estas temperaturas y permanecer secos. Mata todas las formas de vida. El incremento de 10 °C disminuye el tiempo de esterilización en un 50%.
Pasteurización	63 °C 30 min	Mata la mayoría de las formas vegetativas, incluyendo los patógenos como *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Mycobacterium tuberculosis*.
Pasteurización	72 °C 15 seg	Idéntico al anterior. Es más útil para la industria por su rapidez, por sus menores efectos indeseables en cuanto a calidad y sabor. Mata a *Coxiella burnetii*.

contenidos en él. Este medio es un material fibroso o poroso que contiene perforaciones o poros interconectados entre sí de manera tal que permitan el paso del fluido.

Mecanismos que interactúan en la retención de partículas

Los sólidos suspendidos en un fluido son retenidos por medio de tres mecanismos básicos (fig. 12-10):

1. **Intercepción directa o tamiz:** en un medio filtrante se puede observar un conjunto de fibras que definen poros o ranuras a través de las cuales pasa el fluido. Si las partículas en el fluido son mayores que los poros o aberturas en el medio filtrante, ellas serán retenidas como resultado de la intercepción directa por dichos poros. La partícula circula por la vena fluida, y cuando el entramado de fibras es menor que el de la partícula, ésta queda retenida. En la práctica, la mayoría de las partículas en suspensión, aun muy pequeñas, son muy irregulares en su forma, y de aquí que puedan producir un efecto puente sobre la abertura del filtro.
2. **Mecanismo de inercia:** las partículas en un fluido en movimiento tienen masa y velocidad, y por lo tanto una cantidad de movimiento asociado a ella; a medida que el líquido y las partículas pasan a través del medio filtrante, la vena fluida sigue la trayectoria de menor resistencia al flujo y se desvía alrededor de la fibra. Una partícula impulsada por la vena fluida, debido a su masa y velocidad, no sigue el trayecto de ésta, e impacta con la fibra y queda retenida.
3. **Intercepción por difusión:** es un mecanismo inverso al de la inercia, para partículas extremadamente pequeñas. En este proceso típico de las partículas submicrónicas, éstas se encuentran en choque permanente con las moléculas del fluido. Estos choques frecuentes hacen que las partículas suspendidas se muevan con movimientos desordenados alrededor de las líneas de la vena fluida. Estos movimientos, que pueden ser observados con el microscopio, se llaman movimientos brownianos. La difusión browniana es la causa de que las partículas pequeñas se desvíen de la línea de flujo, con lo cual aumenta la probabilidad de que impacten la superficie de las fibras y sean allí retenidas.

Clasificación de los filtros

Hasta hace poco tiempo era muy común clasificar los filtros y los medios filtrantes como del tipo de profundidad y de superficie. Esta clasificación, que peca de esquemática, idealiza los medios filtrantes como de retención en la masa o seno de éstos, para el primer caso, o como si fueran capaces de retener la totalidad del filtrado por poros inferiores al tamaño de las partículas, en el segundo caso. Es decir que en filtros de profundidad actuarían los tres mecanismos de retención (tamiz, inercia y difusión), y las partículas quedarían retenidas en la superficie y en el espesor del filtro. En los filtros de profundidad existen varias capas, por

ejemplo, las placas filtrantes de amianto y celulosa. En los de superficie, el ejemplo estaría dado por las membranas filtrantes[2].

La clasificación actual es:

a) filtros de poros deformables.
b) filtros de poros fijos o indeformables.

Los de poros deformables dependen principalmente de los mecanismos de separación por inercia o difusión browniana; ejemplo de este tipo son los fieltros, las placas de amianto y las fibras de vidrio no ligadas por resinas. Dichos filtros están construidos con un medio filtrante no fijo, de espesor suficiente como para retener partículas de un determinado tamaño (en profundidad). Los filtros de poro variable están sujetos al fenómeno de migración al medio, esto significa que partes del mismo medio filtrante se desprenden y continúan su recorrido aguas abajo, contaminando el elemento filtrado (fig. 12-10).

Los filtros de poro fijo consisten en varias capas de un medio filtrante o una sola capa de mayor espesor de un mismo material. Se fabrican de manera tal que la estructura del medio no pueda distorsionarse. El tamaño del poro puede controlarse durante su fabricación, asegurando la retención cuantitativa de partículas mayores de un determinado tamaño, por mecanismo de intercepción directa o tamiz, aunque en algunas circunstancias pueden actuar mecanismos de impacto inercial o intercepción por difusión.

Un filtro de superficie o de malla es aquel en el cual todos los poros se encuentran en un plano único y, por lo tanto, dependen únicamente del mecanismo de intercepción directa para separar partículas de un fluido. Muy pocos filtros en el mercado pueden ser considerados verdaderos filtros de superficie (por ej., mallas de alambre tejido y telas metálicas).

Los filtros de amianto-celulosa son de poro deformable, con fibras de amianto entrecruzadas que ofrecen una gran superficie de filtración, la cual, al no tener un tamaño de poro determinado, no puede ser considerada absoluta para un determinado tamaño

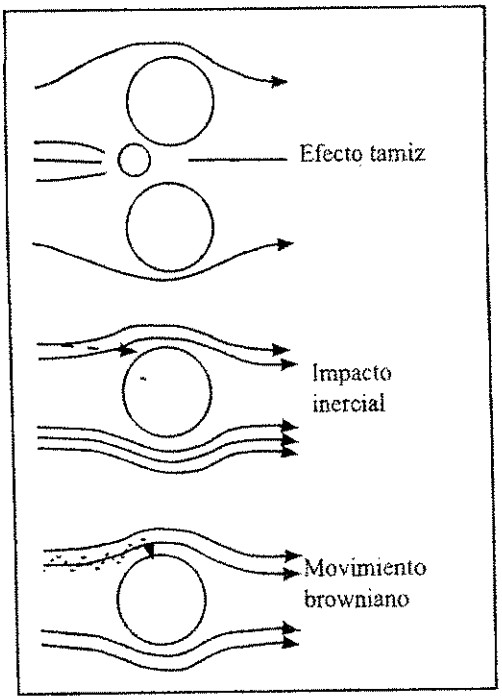


Figura 12-10. Mecanismos de filtración.

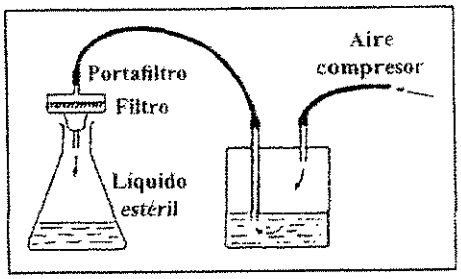


Figura 12-11. Filtración con presión positiva.

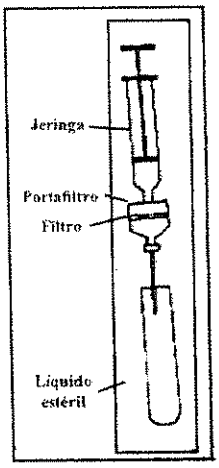


Figura 12-12. Filtro de jeringa.

de partícula. La función de tamiz depende de la estructura del filtro y de la forma de las partículas a filtrar.

Entre los filtros encontramos las bujías de porcelana o tierra de diatomeas (Pasteur, Chamberland, Berkefeld), los discos de vidrio y las placas de asbesto-celulosa (discos Seitz). Las bujías y los discos de vidrio eran utilizados antiguamente pero hoy han caído en desuso. Por otro lado, se encuentran las membranas filtrantes, que son fundamentalmente de tres tipos: las membranas de acetato o nitrato de celulosa, las membranas de filamentos orgánicos y las membranas nucleares de policarbonatos.

Los discos de membrana son los más modernos. Están compuestos por ésteres de celulosa (acetato o nitrato de celulosa) de 150 a 200 µm de espesor en 6 a 8 capas, y contienen millones de poros microscópicos de tamaño uniforme. La porosidad puede variar de 0,01 a 10 µm. Estos filtros retienen a las bacterias principalmente por el diámetro del poro y éste es indeformable; pasan aquellos microorganismos menores al diámetro utilizado para filtrar. Los virus atraviesan estos filtros con facilidad y son utilizados también para eliminar la carga bacteriana de muestras líquidas destinadas al estudio viral. También se han adaptado a procedimientos microbiológicos para identificar y enumerar mi-

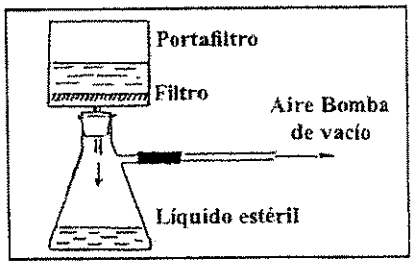


Figura 12-13. Filtración con presión negativa.

[2] Si bien existen distintas formas (por ej., "cartuchos filtrantes") útiles para filtrar grandes volúmenes de líquidos u otros fluidos como el aire, se describen los discos filtrantes ya que el fundamento del mecanismo de filtración es esencialmente idéntico.

croorganismos en muestras de agua y alimentos. Comercialmente se los solicita según el tamaño de poro que se desee.

Sistemas de filtración

Filtración con presión positiva

Se realiza introduciendo el líquido a filtrar en un continente de cierre hermético, que posee una válvula de entrada de aire a presión mediante un compresor (fig. 12-11). El conducto de salida del líquido a filtrar es inferior, y el líquido es transportado mediante gomas hasta el soporte del filtro. Este consta generalmente de dos partes, una superior y otra inferior, y el elemento filtrante se coloca entre ambas. El líquido atraviesa el filtro y de la parte inferior del soporte saldrá el líquido filtrado, que es conducido mediante gomas al elemento receptor final (por ej., Erlenmeyer). Todos estos elementos deben haber sido autoclavados antes de la filtración. Este sistema puede ser utilizado en filtros de jeringa; consiste en colocar el líquido a filtrar en una jeringa (fig. 12-12), el elemento filtrante en su extremo y hacer presión en el émbolo (presión positiva); de esta forma, el líquido atraviesa el filtro, y luego es recogido en algún recipiente estéril (por ej., tubo de ensayo). Es recomendable que la jeringa sea de vidrio y con pico a rosca para evitar que se produzcan desacoples al presionar, con posible contaminación al operador. La filtración con presión positiva es la más conveniente para los filtros de membrana.

Filtración con presión negativa

Es necesario contar con una bomba de alto vacío conectada a un frasco Kitasato (frasco semejante al Erlenmeyer con paredes gruesas para resistir el vacío y una tubuladura lateral y superior) mediante mangueras de goma rígida para evitar que se colapse. El soporte del filtro (semejante al anterior) es colocado sobre el Kitasato, y el líquido a filtrar, sobre un receptor superior. El vacío producido por la bomba hará que el líquido atraviese el filtro y sea recibido en el frasco Kitasato (fig. 12-13).

Aplicación

Los filtros sirven para tratar fluidos. Como este proceso no produce elevación de la temperatura, es útil para esterilizar líquidos como medios de cultivo que no resisten el tratamiento térmico, sueros u otras sustancias que contengan proteínas que se desnaturalizarían con el calor, azúcares (evitando el caramelizado), etc. Tienen como inconvenientes que el proceso de filtración en general suele ser algo tedioso, ya que es necesario proceder a filtrar sucesivas veces un mismo elemento para lograr su esterilización pasando desde filtros clarificantes, continuando con otros de diámetro de poro cada vez menor, hasta lograr utilizar filtros esterilizantes. La cantidad y el tipo de partículas que posea el elemento original determinará la cantidad de veces que será necesario realizar el proceso.

Otras aplicaciones son los filtros absolutos, también llamados HEPA (*High Efficiency Particulate Air*), destinados a la filtración de aire en el flujo laminar. El filtro HEPA, por definición, es un filtro con una eficiencia mínima del 99,97% en la partícula más difícil de filtrar, que es la de 0,3 µm de diámetro. Consta de una sola hoja de un papel de celulosa, amianto y vidrio de fibras de diámetro inferiores al micrómetro, este papel es doblado en muchísimos pliegues que se mantienen separados entre sí por medio de separadores metálicos o de cartulina corrugada.

El flujo laminar: las áreas estériles son ambientes cerrados y presurizados con una sobrepresión de aire donde éste entra al área a través de filtros de muy alta eficiencia (HEPA).

De esta forma se controla la contaminación producida por microorganismos. En la figura 12-14 pueden observarse dos tipos de flujo laminar: en el primer caso, destinado a preparación de medio y trabajo con sustancias no peligrosas (el flujo de aire estéril llega al operador; protección del producto); en el segundo, de uso con sustancias peligrosas, la corriente de aire circula dentro de la campana impidiendo la salida de aire al operador (protección del operador).

ULTRAPRESION

Tanto la alta como la baja presión no parecen producir la muerte de las bacterias; aun cuando cultivos de *E. coli* sean sometidos a presiones de más de 1000 atmósferas (atm) o cultivos de *B. subtilis* a 12.000 atm, no producen grandes pérdidas celulares. Por el contrario, una gran variedad de bacterias han sobrevivido en los satélites que giran en órbita terrestre, indicando su resistencia en baja presión extrema.

Sin embargo, los microorganismos parecen no sobrevivir a los cambios bruscos de presión; el fraccionador de Ribi produce la ruptura celular primero creando alta presión y después expulsándolas a través de un pequeño orificio que está sujeto a presión atmosférica normal. Este proceso depende de la formación de burbujas de gas intracelulares para su efecto.

ULTRASONIDO

El oído humano capta ondas sonoras con una frecuencia (en vibraciones por segundo) entre 12 y 32.000 Hertz (Hz). Mediante osciladores sónicos se pueden lograr vibraciones con una frecuencia

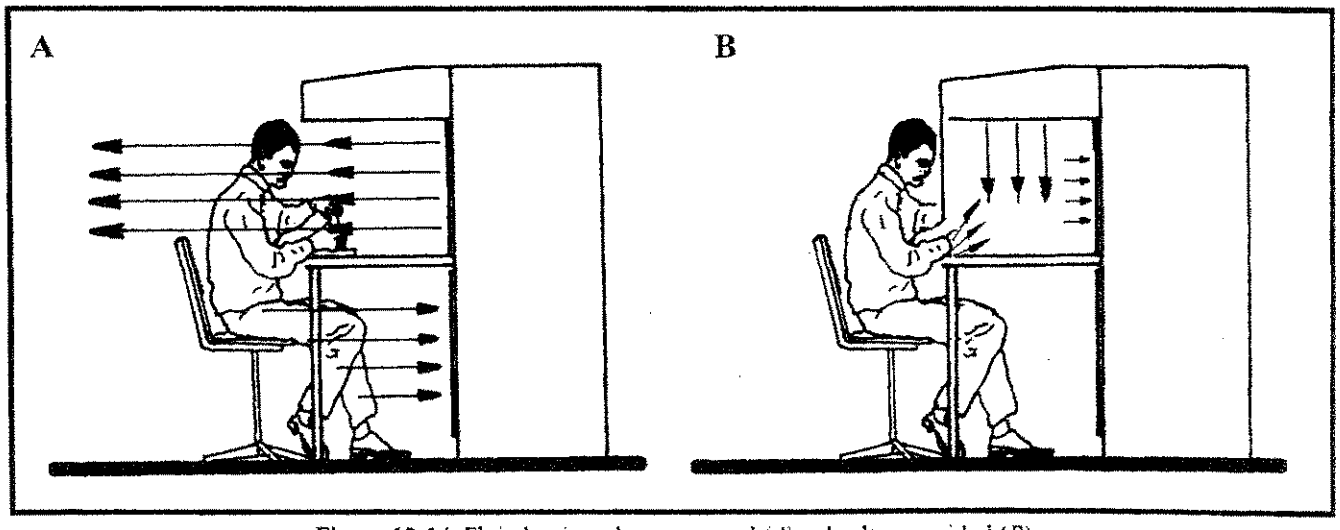


Figura 12-14. Flujo laminar de uso general (*A*) y de alta seguridad (*B*).

que puede llegar a 200.000 Hz. Esto proporciona una técnica útil para lisar células bacterianas y obtener sus fracciones (extracción de sus componentes), pero que no suele ser utilizada como método de esterilización ya que quedan muchas células vivas. El fundamento radica en que el sonido, al pasar a través de un líquido, provoca cambios de presión, los cuales, si el sonido es suficientemente intenso, generan cavidades en el líquido. Las cavidades, que tienen un diámetro de 10 mm, aumentan su tamaño hasta que colapsan violentamente, produciéndose altas velocidades y presiones locales del orden de las 1000 atm. Durante este violento estadio, la célula se desintegra.

RADIACIONES

La energía se transmite a través del espacio en una gran variedad de formas, una de las cuales son las radiaciones. Dentro de éstas se encuentran las electromagnéticas de alta energía o ionizantes, y otras de baja energía o no ionizantes.

Radiaciones ionizantes

Comprenden los rayos alfa, beta, gamma y Röntgen (rayos X), los cuales poseen suficiente energía para empujar los electrones fuera de las moléculas y ionizarlos, mediante una reacción en cadena. Cuando estas radiaciones pasan a través de las células se produce hidrógeno libre, radicales hidroxilo y algunos peróxidos que ocasionan diferentes tipos de daño intracelular. Como el daño recae en una gran variedad de constituyentes celulares, las radiaciones ionizantes son poco específicas en sus efectos, pero tienen alto poder de penetración.

Se aplican como método de esterilización en el laboratorio; este método se denomina esterilización fría, dado que se produce relativamente poco calor en el material que se irradia. Así es posible aplicarlas a sustancias sensibles al calor y emplearlas en las industrias farmacéutica y de la alimentación.

De este grupo, los **rayos X** son letales para los microorganismos y las formas superiores de vida, pero a pesar de tener considerable energía y capacidad de penetración, no son prácticos para esterilizar por su elevado costo de producción en cantidades suficientes y por ser difíciles de manejar debido a las radiaciones que salen en todas direcciones a partir del punto de origen. Se emplean en microbiología experimental para producir mutaciones.

Los **rayos gamma** tienen mucha energía y son los más usados; son emitidos por ciertos isótopos radiactivos, como el cobalto 60 (^{60}Co). Son similares a los anteriores, pero de longitud de onda más corta. Resultan cómodos para esterilizar objetos sensibles al calor, como jeringas de plástico o materiales de considerable espesor o volumen. Sin embargo, se debe contar con una fuente de radiaciones adecuada y controlada, que no afecte al operador ni elimine radiactividad al medio (Comisión Nacional de Energía Atómica [Argentina]).

Radiaciones no ionizantes

Comprenden a las **radiaciones ultravioletas** (UV) e **infrarrojas** (IR). La porción UV incluye radiaciones desde 150 a 3900 Å. Las de mayor eficacia como bactericida son las de 2650 Å. La luz solar está parcialmente compuesta por luz UV, pero la mayoría de las longitudes de onda corta son filtradas por la atmósfera terrestre (ozono, nubes, etc.), estando restringidas en la superficie terrestre a una amplitud de 2870 a 3900 Å, por lo que la luz solar tiene acción microbicida, pero en grado limitado.

La luz UV es absorbida por muchos materiales celulares, pero es en los ácidos nucleicos donde causa el mayor daño. Esta absorción se efectúa sobre todo en sus bases pirimídicas, donde puede formar un dímero entre 2 bases vecinas que, a menos que sea desdoblado por enzimas intracelulares específicas, inhibe la replicación del DNA.

Se pueden obtener lámparas que emiten luz UV en su región más efectiva (2600 a 2700 Å). Son de uso difundido en quirófanos, salas de envasado de vacunas y ambientes en general, así como también en la industria de la alimentación para envases y superficies contaminadas, aunque su efectividad real en estos casos es discutible, debido a que la luz UV tiene muy poca capacidad de penetrar la materia, de modo que una pequeña capa de vidrio resta gran capacidad de radiación.

Una radiación IR es inicua a las sustancias químicas y, por lo tanto, a los microorganismos. Únicamente causa alargamiento y desdoblamiento moleculares y algo de rotación, de manera que no les da la energía suficiente para reaccionar. En un horno al IR, de hecho se transmite suficiente energía para cocinar, pero tales dosis masivas de IR no se presentan en la naturaleza.

Se ha demostrado que la acción directa del sol se debe en gran parte a las radiaciones actínicas. También se sabe que haciendo actuar las distintas radiaciones del espectro sobre los medios de cultivo sembrados, la zona más activa sobre la vida bacteriana es la del violeta, siendo las otras poco o nada activas. Pero la acción de la luz solar sobre las bacterias es compleja y varía considerablemente según las circunstancias. Como se mencionó, actúa por sus rayos actínicos y también por los caloríncos, que ejercen una acción deshidratante.

AGENTES QUÍMICOS

Los agentes antimicrobianos son químicos que matan o inhiben el crecimiento de los microorganismos. Estos incluyen preservantes químicos y antisépticos, además de fármacos usados en el tratamiento de las enfermedades infecciosas de las plantas y los animales. Estos últimos, los antibióticos, son tratados en otro capítulo. Los agentes antimicrobianos pueden ser de origen natural o sintético, y pueden tener un efecto "biocida" o "bioestático".

Tipos de agentes antimicrobianos

Antisépticos: agentes microbicidas poco tóxicos que pueden ser aplicados sobre la piel o membranas mucosas; no deben ser ingeridos. Ejemplo: mercuriales, nitrato de plata, solución de yodo, alcoholes, detergentes.

Desinfectantes: agentes que matan a los microorganismos pero no necesariamente a sus esporas; no son seguros para su uso en tejidos vivos. Se utilizan sobre objetos inanimados como pisos, mesadas, utensilios. Ejemplo: cloro, hipocloritos, sulfato de cobre, compuestos de amonio cuaternario.

Los desinfectantes y los antisépticos se definen sobre la base de su seguridad de uso sobre las membranas mucosas; por ello, en algunos casos, un mismo compuesto, dependiendo de su concentración, puede ser un desinfectante o un antiséptico (por ej., hipoclorito de sodio).

Preservativos o conservantes: son agentes estáticos usados para inhibir el crecimiento de microorganismos, utilizados con frecuencia en alimentos. Obviamente, si son ingeridos, no deben ser tóxicos. Ejemplo: propionato de calcio, benzoato de sodio, nitrato, etc.

BIBLIOGRAFÍA

Bautista Navajas JM, Vicente Casero JL, Calbo Torrecillas F. Manual de Normas y Procedimientos de la Central de Esterilización. ASP. Johnson & Johnson MEDICAL, INC. Malaga, 1997.

Gimeno Benitez A, Martinez Bruque F. Esterilización por peróxido de hidrógeno. Todo Hospital, enero-febrero 2000; 163:43-47.

Capítulo 13

PRUEBAS INMUNOSEROLOGICAS DE DIAGNOSTICO EN MICROBIOLOGIA

Enrique Leo Portiansky

INTRODUCCION

Los anticuerpos (Ac) o inmunoglobulinas son glucoproteínas que se unen específicamente, tanto dentro del animal vivo (in vivo) como en diferentes materiales de laboratorio (in vitro), a determinados epitopes[1] presentes en los inmunógenos[2] que les dieron origen.

Los Ac se encuentran presentes en los líquidos y secreciones orgánicas tales como sangre, leche o mucus vaginal, en los que pueden establecerse su especificidad (determinación cualitativa) y/o su concentración (reacción cuantitativa), mediante la aplicación de pruebas inmunológicas. Estas pruebas expresan indirectamente la respuesta inmune mediada por los Ac, inducidos en el organismo por sustancias o partículas extrañas a él.

La reacción entre el Ac y el antígeno (Ag) es de naturaleza química y física. Esta reacción es específica, e involucra a moléculas enteras sin disgregación, aun después de haberse combinado. Esta unión Ag-Ac es firme pero con características de reversibilidad; es decir, el complejo puede disgregarse y sus elementos pueden retornar a su estado previo. Las fuerzas que los mantienen unidos, una vez que se ha efectuado el encuentro entre sus estructuras complementarias, son de tipo no covalente, como la atracción electrostática, los puentes de hidrógeno, las fuerzas de Van der Waals y la exclusión de agua. Las fuerzas que intervienen, consideradas en forma aislada, son débiles.

Las reacciones Ag-Ac se desarrollan, in vitro, en dos etapas. La primera comprende la unión específica entre el sitio activo del Ac y los epitopes correspondientes del Ag. La segunda etapa, que se produce a continuación de la primera, genera un fenómeno visible (por ej., precipitación o aglutinación). La primera etapa no se detecta visualmente, mientras que la segunda, por lo general, puede ser revelada con facilidad. En el caso particular de los haptenos[3], la segunda etapa puede no ser completa y, bajo ciertas condiciones (por ej., la hipotonicidad del medio), puede estar ausente. Es importante tener en cuenta la velocidad de las reacciones, ya que son diferentes en las distintas etapas; la primera es rápida, mientras que la segunda puede llegar a ser muy lenta en comparación con la anterior.

Siendo la unión Ag-Ac de naturaleza fisicoquímica, los distintos constituyentes del medio en que se producen pueden alterar la reacción, retrasándola o acelerándola. La primera etapa de una reacción va seguida, como se mencionó anteriormente, por una segunda, lo que hace difícil distinguir entre los efectos de las condiciones perturbadoras sobre ambas.

Dada la especificidad de la reacción Ag-Ac, ésta ha sido utilizada para la identificación de microorganismos (virus, bacterias, parásitos, hongos, etc.) o sus productos (endo y exotoxinas bacterianas, enzimas, etc.), y para la identificación y cuantificación de Ac séricos, principalmente con fines diagnósticos. No obstante ello, las pruebas serológicas han sido y siguen siendo de elevada utilidad en la investigación básica y aplicada de los fenómenos patogénicos de los microorganismos.

Toda prueba inmunoserológica requiere de un medio con un pH determinado. Generalmente, el neutro favorece la mayoría de las reacciones, aunque ciertos isotipos de IgG reaccionan mejor a pH ácido (por ej., en pruebas aplicadas al diagnóstico de brucelosis bovina con Ag acidificados, en las que la IgG1 se encuentra activa, mientras que la IgG2 y la IgM están inactivas). En general, el pH inferior a 6 o superior a 8,5 altera las reacciones inmunológicas, siendo óptimo un pH entre 7,3 y 7,5.

La presencia de electrólitos es necesaria para la aglutinación de las bacterias, aunque la combinación del Ac con el Ag puede efectuarse en su ausencia. En cierta medida, la reacción Ag-Ac es favorecida por el aumento de las concentraciones salinas; sin embargo, las elevadas tienden a interferir la reacción. Las sales actúan permitiendo una mayor solubilidad de las proteínas. La concentración fisiológica es óptima para las reacciones inmunológicas; las concentraciones superiores pueden resultar inhibitorias.

La velocidad de la unión Ag-Ac es directamente proporcional a la temperatura, en el rango de 0 a 37 °C. Por encima de esta temperatura, la velocidad de unión puede aumentar en una pequeña proporción, teniendo como límite los 46 °C, donde comienzan a alterarse los Ac. La temperatura tiene efecto sobre la agitación de las moléculas, aumentando las posibilidades de encuentro de los sitios complementarios del Ag y del Ac.

Para que la unión entre los reactantes (Ac y Ag) pueda manifestarse, debe existir equivalencia (proporción) entre ellos. Las reacciones pueden ser inhibidas por exceso de Ac o de Ag. Esta desproporción de los reactantes da lugar al **fenómeno de zona**, que se produce en las reacciones inmunológicas.

Cuando la inhibición de la reacción se produce por exceso de Ag, los dos sitios activos del Ac se saturan. Por lo tanto, la disposición en retículo del inmunocomplejo no se produce y el fenómeno no se visualiza. Por el contrario, cuando existe exceso de Ac, la cantidad de Ag disponible para la unión es insuficiente y tampoco se observa la reacción.

La unión que se produce entre los Ac y sus epitopes específicos es tan variada que puede ser evidenciada por distintas técnicas.

---

[1] Determinante antigénico, constituido en la mayoría de los casos por aproximadamente 10 a 15 aminoácidos, que es reconocido por un anticuerpo. El conjunto de epitopes constituye el idiotipo del antígeno (Ag). Si bien el idiotipo es un concepto que en principio fue descrito como las "características de la región variable de un anticuerpo (Ac)", hoy se hace extensivo a todos los Ag, y se lo caracteriza, entonces, como la variabilidad antigénica de una población de moléculas proteicas de una partícula antigénica.

[2] Inmunógenos son todas aquellas partículas desconocidas por el organismo que inducen la formación de Ac y que reaccionan específicamente con estos. Antígenos (Ag) son las partículas que sólo reaccionan con los Ac específicos.

[3] Moléculas no proteicas que se pueden combinar con sitios específicos de los Ac, pero no pueden iniciar la respuesta inmune por sí mismos. También se las conoce como Ag incompletos.

Por otra parte, difícilmente un mismo sistema Ag-Ac pueda ser revelado por todas las técnicas desarrolladas en la actualidad.

La especificidad inmunológica es un concepto sólidamente establecido. En el diagnóstico inmunoserológico deben tenerse en cuenta otros factores, como la frecuencia con que las comunidades antigénicas comparten sus epitopes. El inmunólogo debe seleccionar las técnicas de modo *tal que sólo pongan en evidencia un único sistema* Ag-Ac.

Las pruebas serológicas corrientes son de amplia difusión en los laboratorios de diagnóstico ya que brindan datos concretos del grado de respuesta orgánica y su costo no es tan elevado. En tal sentido, se ha incrementado la disponibilidad de equipos que permiten reacciones seriadas más exactas y con menor requerimiento de materiales de laboratorio.

Las técnicas inmunoserológicas pueden clasificarse en tres grandes categorías:

1. Pruebas primarias, que miden directamente la unión del Ag con el Ac.
2. Pruebas secundarias, que miden el resultado de la unión Ag-Ac in vitro, generalmente con menor sensibilidad pero de más fácil realización.
3. Pruebas terciarias, que miden el efecto protector de los Ac en el animal (in vivo).

PRUEBAS INMUNOSEROLOGICAS

Pruebas primarias

Técnicas inmunohistoquímicas

Los métodos inmunoserológicos convencionales (pruebas secundarias) no siempre son aptos para determinar la presencia de Ag en la superficie de células, bacterias y parásitos o para la detección de microorganismos en materiales infectados. Para resolver estos inconvenientes surgieron las técnicas inmunohistoquímicas (IHQ). Estas técnicas se basan en la aplicación de reacciones Ag-Ac únicas o secuenciales, altamente sensibles y específicas, que se ponen en evidencia con distintos métodos.

El *concepto de sensibilidad de una técnica IHQ puede establecerse por:*

1. La cantidad mínima de Ag que puede localizar. Cuanto menor Ag pueda ser detectado, mayor será la sensibilidad de la técnica.
2. La cantidad de diagnósticos confiables que se puedan conseguir con distintos métodos, en un número fijo de casos.
3. La dilución de los Ac localizadores. Cuanto mayor sea la dilución del antisuero necesario para marcar una cantidad fija de Ag, mayor sensibilidad tendrá la técnica.
4. Cuanto más purificados sean los antisueros (mayor especificidad del Ac), mayor sensibilidad se obtendrá con la prueba.

Para la determinación IHQ de Ag en cortes de tejido, es necesario que el material sea cortado por congelamiento (para técnicas de inmunofluorescencia) o incluidos en parafina. El congelamiento precoz y rápido de los tejidos evita fenómenos de autólisis postmortem. No obstante esto, la aplicación de la IHQ en cortes por congelamiento está limitada a la marcación de Ag poco conocidos o presentes en muy bajas concentraciones en los tejidos.

Las técnicas IHQ también pueden ser aplicadas a materiales de estudio citológico: improntas de tejido, líquidos de cavidades, extendidos cervicovaginales, cepillados prepuciales, lavados y aspirados.

Inmunofluorescencia

Los fenómenos de fotoluminiscencia son aquellos en los que se produce la emisión de luz por efecto de distintos tipos de radiaciones. En la fosforescencia, cuando cesa el estímulo, el cuerpo irradiado sigue emitiendo luz, mientras que en la fluorescencia, dicha emisión cesa con la excitación.

La radiación utilizada en la fluorescencia proviene de los rayos ultravioletas (originados en un microscopio de fluorescencia), y las sustancias que reaccionan son la fluoresceína (isotiocianato -FITC), la rodamina y la naranja de acridina, entre las más utilizadas.

El principio básico de la inmunofluorescencia es utilizar un Ac marcado con una sustancia fluorescente para detectar la presencia de un Ag en los tejidos.

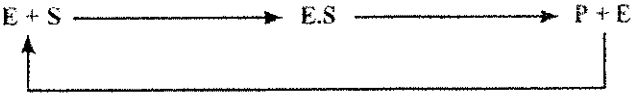
En las técnicas de inmunofluorescencia directa, los Ac marcados con la sustancia fluorescente reaccionan con el Ag presente en el tejido (fig. 13-1). En la reacción indirecta, el Ac primario no se conjuga con la sustancia fluorescente, ya que ésta se encuentra asociada a un segundo Ac, el cual se halla dirigido contras las inmunoglobulinas del animal del cual se obtuvo el Ac primario (fig. 13-2). De esta forma, al aumentar la cantidad de sitios activos de los antisueros marcados, se amplifica la reacción y, por ende, la sensibilidad del sistema.

Algunos ejemplos aplicados a la microbiología se observan en la tabla 13-1.

Técnicas de inmunoperoxidasa

Estas técnicas son un conjunto de métodos de inmunorreacción que tienen en común la enzima peroxidasa (la que puede ser remplazada por fosfatasa alcalina). Estas enzimas están acopladas a un Ac u otras sustancias, y su revelado, por medio de técnicas de histoquímica enzimática, permite localizar el Ag contra el cual se halla dirigido el Ac.

Como en la fluorescencia, aquí también existen métodos directos e indirectos. En el método directo, el Ac específico dirigido contra el Ag que se desea encontrar se halla conjugado con peroxidasa. La reacción consiste en incubar el Ac marcado, a concentraciones y tiempos preestablecidos, con el tejido que contiene el Ag buscado. Posteriormente, se procede al revelado de la enzima con soluciones de cualquier cianógeno (diaminobencidina -DAB; 9-etil, 3-aminocarbazol; 4,Cl-1-naftol, etc.; fig. 13-3), siguiendo el principio de la reacción enzima (E)-sustrato (S), y obteniendo un producto (P) de la reacción.



En el método indirecto, el Ac primario o específico no lleva conjugada la enzima marcadora. Esta se halla conjugada a un segundo Ac, que se encuentra dirigido contra las inmunoglobulinas del animal del cual se obtuvo el Ac primario. Este principio es similar al observado en la inmunofluorescencia.

Una variación de este método lo constituye la incorporación del complejo peroxidasa-antiperoxidasa (PAP). En este caso, se incuba el Ac primario; a éste se le agrega el secundario y por último se adiciona el complejo PAP, seguido del revelado de la enzima. A diferencia del método anterior, la enzima peroxidasa se halla ahora encerrada y estabilizada en el complejo, lo cual le brinda mayor sensibilidad al método (fig. 13-4).

Existen actualmente infinidad de variantes de estos principios, entre las que se puede mencionar la utilización de proteína A que, al unirse con gran afinidad a la porción Fc de las inmunoglobulinas, permite remplazar el Ac secundario; la introducción del complejo avidina-biotina (técnica ABC) que se une, por un lado, al Ac primario,

Tabla 13-1. Antígenos que pueden ser detectados mediante pruebas de fluorescencia directa o indirecta

Diagnóstico	Antígeno	Inmunofluorescencia
Enfermedades virales	Virus rábico	Directa
	Coronavirus canino	Indirecta
	Moquillo canino	Indirecta
	Peritonitis infecciosa felina (coronavirus)	Directa
	Síndrome respiratorio y reproductivo porcino	Indirecta
Enfermedades bacterianas	Enfermedades clostridiales	Directa
	Brucella canis	Indirecta
	Coxiella burnetii (fiebre Q)	Indirecta
	Rickettsia rickettsiae	Indirecta
Enfermedades parasitarias	*Babesia* sp	Indirecta
	Ehrlichia sp	Indirecta
	Toxoplasma gondii	Indirecta
	Cryptosporidia/Giardia	Directa
	Trypanosoma cruzi	Indirecta
	Neosporum caninum	Directa, indirecta
	Encephalitozoon cuniculi	Indirecta
Alteraciones inmunes	Lupus eritematoso sistémico	Indirecta

y por el otro, a la peroxidasa o complejo PAP; el uso de plata-inmuno-oro, en la que la solución argéntica se deposita sobre partículas de oro fijas a un Ac secundario, o la incorporación de lectinas que se acomplejan a los Ac y son reveladas con exceso de sacáridos para inhibir la unión de éstas con glucoproteínas tisulares.

La determinación cualitativa de las técnicas de inmunoperoxidasa o sus variaciones puede visualizarse mediante la utilización del microscopio óptico o el microscopio electrónico. La determinación cuantitativa o semicuantitativa de las técnicas de inmunoperoxidasa o sus variaciones puede realizarse mediante técnicas de análisis de imágenes.

Por lo general, esta técnica se utiliza para el diagnóstico de tumores, pero también se la aplica para el diagnóstico de algunas enfermedades infecciosas, remplazando a la inmunofluorescencia.

Enzimoinmunoensayos (EIA)

La inmunoenzimología es una nueva rama del inmunodiagnóstico que, en forma directa o indirecta, permite identificar Ag. Los fundamentos son similares a los de la inmunofluorescencia, de la que se diferencia en que emplea Ac (método directo) o antigammaglobulina (método indirecto), marcados con una enzima capaz de desarrollar una reacción coloreada. Por lo general, la enzima utilizada es la peroxidasa y su sustrato, la o-fenilendiamina, y el agua oxigenada.

Prueba de ELISA ("Enzyme Linked Immunosorbent Assay": Ensayo de inmunoabsorción con ligadura de enzima)

En la actualidad existen diversas aplicaciones de esta técnica. Sin embargo, el principio es similar en todas ellas. A diferencia de las pruebas inmunoquímicas previamente mencionadas, esta técnica también permite determinar en forma cuantitativa la concentración de Ac o Ag, mediante el uso de uno de ellos en fase sólida y el otro en solución. Por lo general, el material fijado a la fase sólida es aquel cuya presencia o concentración se quiere determinar (figs. 13-5 y 13-6). A éste se le fija un Ac específico marcado con una enzima (método directo) o un complejo Ac-anti-Ac marcado (método indirecto), el cual puede ser puesto en evidencia por la adición del sustrato.

El método de ELISA competitivo es una variación del método original que detecta Ac en las muestras. Se basa en el principio de la unión de Ac a los Ag presentes en los tejidos y la posterior inhibición de un Ac ligado a una enzima que reacciona con el Ag (competencia de unión; fig. 13-7). En el ELISA competitivo, la ausencia de color denota una reacción positiva. La cuantificación de la reacción se realiza por medio de un lector de densidad óptica con el filtro adecuado a la enzima y el sustrato utilizados. Algunos ejemplos de aplicación se observan en la tabla 13-2.

Inmunotransferencia (Immunobloting-Western blot)

Siguiendo los principios descritos para la prueba de ELISA, en esta técnica se remplaza el soporte sólido por papeles de nitrocelulosa limitando, de esta manera, en forma sustancial, el volumen de los reactivos que se utilizan. La positividad de las reacciones se determina, generalmente, a simple vista, aunque en algunos casos puede ser útil un reflectómetro para la cuantificación. En esta prueba, los Ag primero son separados de acuerdo con su peso molecular mediante una electroforesis en gel (véase Precipitación) y luego son absorbidos por un filtro. Los pasos siguientes son similares a los del ELISA. El *immunobloting* identifica uno o más Ag individuales, a los cuales se les unen los Ac. La muestra positiva revela un precipitado coloreado, producto de la reacción entre la enzima fija al Ac y su sustrato (fig. 13-8). Se utiliza en la detección del virus de la inmunodeficiencia felina.

Tabla 13-2. Enfermedades que pueden ser diagnosticadas mediante los métodos del ELISA

Enfermedad	Detecta
Leucemia felina	Ag
Inmunodeficiencia felina	Ac
Parvovirosis canina	Ag
Lengua azul	Ac
Brucelosis	Ac
Anemia infecciosa equina	Ac, competitiva
Peritonitis infecciosa felina	Ac
Paratuberculosis	Ac

Tabla 13-3. Agentes detectados mediante pruebas de precipitación

Agentes bacterianos	*Mycobacterium paratuberculosis*
Agentes virales	Virus de la lengua azul
	Virus de la leucemia bovina
	Virus de artritis-encefalitis caprina
	Virus de la anemia infecciosa equina
	Virus de la influenza aviar
	Virus de la neumonía progresiva bovina
Agentes micóticos	*Aspergillus*
	Coccidioides
	Histoplasma
	Blastomyces

Pruebas secundarias

Precipitación

La mayoría de los Ac tienen la capacidad de formar una malla que, al atrapar el Ag soluble, resulta muy pesada como para mantenerse en solución. Sin embargo, debe enfatizarse que no siempre se observará reacción cuando hay correspondencia entre Ac y Ag. Este efecto sólo se logra cuando hay "equivalencia" en la concentración de ambos reactantes. Tanto el exceso de Ag como de Ac inducen una escasa precipitación. Estos resultados pueden interpretarse por el hecho de que los Ac son divalentes, y pueden unirse sólo a dos epitopes por vez, mientras que las proteínas antigénicas son generalmente multivalentes, y presentan gran cantidad de epitopes. En una mezcla con exceso de Ac, cada molécula de Ag se cubre de un Ac, previniendo de esta forma la precipitación. Ante el exceso de Ag, cada Ac se une sólo a un par de Ag y, por lo tanto, no se forma la malla, los conjugados se mantienen solubles y no se observa precipitación.

Entre los métodos convencionales de precipitación se describen aquellos realizados en medios líquidos y en medios semisólidos. Para la precipitación en medios líquidos se deben mezclar volúmenes similares de Ag y de Ac, interpretando la prueba positiva como aquella en la que se observa turbidez. Esta misma prueba puede ser evidenciada con mayor claridad si se evita la mezcla de ambos volúmenes; de este modo es posible observar un anillo en la interfase de los líquidos, cuando hay correspondencia inmune. Esta última se utiliza para la determinación de infecciones producidas por el *Bacillus anthracis* (prueba de Ascoli-Valente). Estas técnicas pueden ser cualitativas si sólo se desea saber cuál es el Ag contra el que reaccionan los Ac, o cuantitativas, si se realizan diluciones seriadas del suero o del Ag.

Mediante este principio pueden valorarse sueros equinos que contengan Ac antitoxina tetánica o toxina diftérica, en los que el precipitado se deposita en forma de flóculos y se cuantifica por densidad óptica. Esta reacción particular, observada en equinos, podría deberse a la presencia de IgG(T) en su suero.

Para la precipitación en medios semisólidos se utilizan las pruebas de inmunodifusión e inmunoelectroforesis. La inmunodifusión en agar se basa en el hecho de que la mayoría de las proteínas se difunden a través de un gel. Si los Ac contactan con el Ag mientras migran, se forma una banda de precipitación en el punto en que ambas concentraciones alcanzan la equivalencia (fig. 13-9).

Esta prueba puede ser realizada tanto en tubo (Método de Oudin o difusión simple monodimensional) como en placa (Método de Outcherlony o doble difusión bidimensional). Ambos métodos pueden utilizarse para detectar tanto la presencia de Ac como de Ag en el suero. La prueba de Coggins es una inmunodifusión doble utilizada para determinar la presencia de Ac formados contra el virus de la Anemia Infecciosa Equina (fig. 13-10). La misma reacción permite identificar bovinos infectados con el virus de la Leucemia Bovina. Dependiendo de la cantidad de Ag o de Ac sembrados se pueden ver reacciones como las de la figura 13-11.

La inmunodifusión radial es una variante de la precipitación en placa que permite realizar determinaciones cuantitativas de Ag o de Ac. El suero sembrado en la fase semisólida, al igual que el Ag sembrado en el pocillo, difunden radialmente. En la reacción positiva se formará un halo de precipitación alrededor de un pocillo con una concentración conocida de Ag. El diámetro del halo, en la zona de equivalencia, estará relacionado con la concentración del Ac. Por lo tanto, es posible construir curvas de calibración utilizando concentraciones conocidas de un Ag dado, en las que el cuadrado del radio o la superficie del halo se representan en el eje de las ordenadas, mientras que en el eje de las abscisas se inscribe la concentración del Ag. Conociendo el diámetro del anillo de precipitación que se forma, es posible determinar la concentración de muestras desconocidas (fig. 13-12).

La tabla 13-3 muestra algunos ejemplos de agentes que pueden ser detectados por medio de las técnicas de precipitación.

El agar también puede ser empleado como soporte semisólido en la electroforesis.[4] Presenta gran cantidad de grupos con cargas negativas. Cuando se aplica una diferencia de potencial sobre el gel de agar, los iones cargados positivamente se mueven de forma libre en el campo eléctrico, mientras que los iones negativos se encuentran unidos al gel en forma covalente y, por lo tanto, inmóviles. El efecto general es la tendencia de los iones positivos a migrar al cátodo. En consecuencia, la concentración iónica en el cátodo se vuelve mayor que en el ánodo, y de esta forma se moviliza al agua hacia el cátodo para sobrellevar el desequilibrio de concentraciones. Mientras se produce este movimiento de cargas, las proteínas presentes en el agar experimentan un fenómeno osmótico debido a las cantidades variables de agua presentes en las diferentes partes del gel. Esta fuerza electrosmótica, junto con el movimiento del líquido, impulsa a las proteínas a migrar hacia el cátodo. Por consiguiente, durante la electroforesis en agar las proteínas experimentan dos fuerzas:

a. Fuerza electroforética debido a la diferencia de potencial aplicada. A pH 8, la mayoría de las proteínas están cargadas negativamente y, por lo tanto, migran al ánodo.

b. Fuerza electrosmótica que mueve las proteínas al cátodo. La mayoría de las inmunoglobulinas migran al cátodo.

La electroinmunodifusión es un método cuantitativo que permite que un Ag se difunda en el agar que contiene el antisuero,[5] tal como sucede en la inmunodifusión radial (fig. 13-13). En este caso, el Ag es dirigido dentro del gel por la electroforesis. Las líneas de precipitación que se forman entre el Ac y el Ag, siguiendo

[4] Electroforesis: método con el cual se consigue la separación de proteínas debido a diferencias en sus cargas eléctricas.

[5] Suero o líquido con Ac específicos.

Tabla 13-4. Determinaciones realizadas mediante las pruebas de aglutinación

Grupos sanguíneos
Anticuerpos antieritrocitos (Coombs)
Factor reumatoideo
Anticuerpos antibacterianos
Bordetella bronchiseptica
Brucella abortus
Brucella canis
Haemophilus somnus
Leptospira spp
Pasteurella
Campylobacter fetus

la dirección de la corrida, dan origen a la denominación de esta técnica ("rocket electrophoresis"- electroforesis de cohetes).

Esta técnica ya no es utilizada con frecuencia. Generalmente se la usa para detectar clases de inmunoglobulinas o proteínas del complemento en plasma. También se la emplea para la detección de inmunodeficiencias o excesos de inmunoglobulinas.

Aglutinación

A diferencia de la precipitación, la aglutinación se produce cuando un Ac reacciona con un Ag particulado (hematíes, bacterias, células). Los mismos Ac que presentan la capacidad de precipitar también pueden inducir la aglutinación, hecho que depende de manera exclusiva del estado del Ag (en solución o en suspensión, respectivamente).

Los principios que regulan esta reacción son los mismos que los mencionados para la precipitación (formación de mallas). En la aglutinación, la presencia de electrólitos de carga opuesta en la solución de reacción o en los líquidos corporales neutralizaría en parte las cargas superficiales de las partículas antigénicas, evitando el rechazo entre ellas y asegurando la aproximación indispensable para que una molécula bivalente de Ac pueda iniciar la formación de grumos, lo que llevaría a la aglutinación específica.

Los métodos cualitativos de la aglutinación permiten determinar la presencia de bacterias en el suero, si se dispone de sueros monoespecíficos.[6] Los métodos semicuantitativos consisten en establecer cuál es la máxima dilución del suero capaz de aglutinar el Ag específico. Las diluciones se hacen generalmente en base 2 y el título final se expresa como la inversa de la máxima dilución aglutinante. Por ejemplo, si la dilución 1/256 aglutina, pero la dilución 1/512 no lo hace, el título será 256 (figs. 13-14 y 13-15).

Tabla 13-5. Virus detectados mediante las pruebas de inhibición de la aglutinación

Virus de la encefalomielitis equina (Este, Oeste y Venezuela)
Virus de la influenza (varias especies)
Virus de la enfermedad de Newcastle
Paramixovirus aviar
Parvovirus (canino, porcino)
Virus parainfluenza-3

La variación del título de Ac puede ser muy útil para seguir la evolución de una infección. Se debe tener en cuenta, además, que la IgM que aparece en forma temprana en las infecciones bacterianas y virales es el Ac con mayor capacidad aglutinante, y le siguen en orden decreciente la IgG y la IgA.

La cuantificación de Ac por aglutinación puede realizarse mediante reacciones de lectura lenta o rápida. Esta última es muy utilizada en la serología diagnóstica de la brucelosis (reacción de Huddleson) o la salmonelosis (reacción de Widal). Estas técnicas se realizan sobre placas de vidrio, emplean Ag conocido y diluciones seriadas de suero. La lectura se realiza entre los 3 y 8 minutos.

En forma similar a la precipitación, el exceso de Ac induce la inhibición de la aglutinación, proceso conocido como prozona. Este fenómeno también se puede observar cuando Ac que se unen específicamente al Ag no pueden inducir la aglutinación (Ac asimétricos). Posiblemente, en este último caso, la presentación de epitopes en la porción profunda de la superficie de la partícula antigénica impida el entrecruzamiento Ag-Ac (inmunocomplejo). Para detectar estos Ac se recurre a la aglutinación indirecta, en las que el suero en análisis es incubado con partículas antigénicas, las cuales adsorben los Ac asimétricos. Luego de remover los Ac no ligados, las partículas restantes se miden con suero antigammaglobulina. Cuando ésta reacciona con los Ac adheridos, induce la aglutinación de las partículas.

La aglutinación es un método serológico más sensible que la precipitación. Por lo tanto, en ciertas ocasiones conviene convertir los Ag solubles en aglutinantes. Una forma de lograrlo es adsorbiendo los Ag a partículas tales como hematíes (fig. 13-16), si bien también se pueden utilizar bacterias o partículas de látex. Los Ac específicos inducen la aglutinación de este sistema. Dadas las características mencionadas, esta técnica se denomina hemoaglutinación pasiva. Un ejemplo de su aplicación lo constituye la transformación del lipopolisacárido de ciertas bacterias. La tabla 13-4 muestra ejemplos de utilización de la prueba de aglutinación.

Ciertos virus (parvovirus, mixovirus, arbovirus) tienen la particularidad de combinarse con receptores presentes en la superficie de glóbulos rojos y aglutinarlos. En este principio se basa la prueba diagnóstica de hemoaglutinación. La prueba de inhibición de la hemoaglutinación expresa la capacidad que presentan ciertos Ac antivirales específicos para impedir la combinación

Tabla 13-6. Agentes detectados mediante las pruebas de fijación del complemento

Agentes	**Ejemplo**
Bacterianos	*Brucella ovis*
	Haemophilus pleuropneumoniae (cerdo)
	Mycobacterium paratuberculosis
Virales	Virus de la fiebre aftosa
	Virus de la lengua azul
	Virus de la diarrea viral bovina (BVD)
	Herpesvirus bovino (rinotraqueítis infecciosa bovina)
Micóticos	*Aspergillus*
	Blastomyces
	Coccidioides
	Histoplasma
Protozoarios	*Anaplasma*

[6] Los sueros monoespecíficos son aquellos que luego de varias adsorciones con distintos Ag permiten reconocer un grupo limitado de epitopes presentes en la partícula antigénica.

Tabla 13-7. Agentes virales que pueden ser neutralizados en una reacción de neutralización

Virus de la diarrea viral bovina (BVD)
Adenovirus canino (hepatitis infecciosa canina)
Virus de la encefalomiocarditis
Virus de la rinoneumonitis equina
Virus de la arteritis viral equina
Herpesvirus (bovino, caprino, canino, felino)
Parvovirus (bovino)
Virus parainfluenza-3
Virus respiratorio sincitial
Virus de la gastroenteritis transmisible (cerdo)
Virus de la estomatitis vesicular

del virus con los hematíes (fig. 13-17). Las diluciones seriadas en uno u otro ensayo permiten cuantificar la reacción (obtención del título). La tabla 13-5 muestra algunos virus detectados mediante las pruebas de inhibición de la hemoaglutinación.

Fijación del complemento

El complemento, en su fase final de activación, puede inducir la lisis del Ag particulado (bacterias, glóbulos rojos, etc.) a través de su unión con el Ac específico (generalmente IgG). Este principio sirvió de base para la realización de la prueba de fijación del complemento, que permitió valorar tanto la presencia de Ag como de Ac, a través de un sistema indicador específico hematíe-hemolisina (sistema revelador) para fijar el complemento.

Esta prueba es muy utilizada para la tipificación de variantes del virus de la fiebre aftosa. Si existe correspondencia entre una cepa viral a identificar y un Ac específico conocido, el complemento agregado al sistema se unirá al inmunocomplejo. La posterior incorporación del sistema hemolítico inducirá la sedimentación de éste (reacción positiva). Si, por el contrario, no existe correspondencia inmune entre el Ag y el Ac, el complemento se fijará al sistema revelador produciendo la hemólisis de los glóbulos rojos (reacción negativa) (fig. 13-18).

En las determinaciones cuantitativas, tal como ocurría en la aglutinación, el título se expresa como la inversa de la máxima dilución que, puesta en contacto con el Ag, tiene capacidad de fijar el complemento (fig. 13-19). La tabla 13-6 muestra algunos agentes detectados mediante las pruebas de fijación del complemento.

Pruebas terciarias

Si un organismo o Ag posee actividad biológica, es posible experimentar con Ac para neutralizar dicha actividad. Estas reacciones incluyen la hemólisis de eritrocitos, la lisis de células nucleadas y la posibilidad de inducir la enfermedad y la muerte de animales. Lamentablemente, dada la variabilidad individual en los modelos biológicos, estas pruebas están sujetas a constantes modificaciones para su estandarización. Asimismo, los resultados pueden variar de acuerdo con la dosis de Ag inoculado. Por esta razón es necesario contar con un gran número de animales y un buen método estadístico de valoración de los resultados.

Reacción de neutralización

La prueba de neutralización estima, in vitro, la capacidad de un Ac, en contacto con un Ag, para neutralizar su actividad biológica. Estas pruebas son normalmente utilizadas para identificar toxinas bacterianas. Además, la capacidad infectiva de un virus sobre su célula hospedadora puede ser prevenida por incubación del agente infeccioso con su Ac específico.

Las pruebas de neutralización son altamente específicas y en extremo sensibles. Consisten en la incubación de un Ag y un Ac, y su posterior valoración biológica. Si se conoce la capacidad infectiva de un virus, se pueden realizar dos tipos de pruebas de neutralización. En la primera, la concentración viral se mantiene constante y se realizan diluciones seriadas del antisuero. De esta forma es posible determinar la capacidad neutralizante de un suero. Inversamente, se puede mantener constante la concentración sérica y diluir el Ag viral (fig. 13-20). La tabla 13-7 muestra agentes virales que pueden diagnosticarse por este método.

La valoración biológica de la efectividad del proceso de neutralización se puede realizar sobre cultivos celulares o animales vivos. En los primeros es posible determinar la capacidad de inhibir el efecto viral citopatógeno, la capacidad de inhibir la hemólisis o la incapacidad viral para dividirse, medida por la acidez del medio de cultivo. En los segundos, se mide la inhibición de los procesos mórbidos y hasta la muerte del individuo.

Protección

Las pruebas de protección son semejantes a la reacción de neutralización, sólo que se realizan por completo in vivo. La capacidad de protección que posee un suero puede ser valorada mediante su inoculación en diluciones seriadas en un grupo de animales de laboratorio, para luego desafiarlo con el Ag (microorganismo patógeno o toxina). El valor de protección de los sueros se expresa como Dosis Protectiva 50% (DP50%), que es aquella que protege al 50% de los animales inoculados. El cálculo se realiza mediante pruebas estadísticas como Reed y Muench, o Spearman Karber.

INTERPRETACION DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS

Las pruebas y las reacciones presentadas en los puntos anteriores pueden ser interpretadas como positivas o negativas. No obstante, en ciertas circunstancias, muestras que deberían arrojar un resultado positivo se manifiestan como negativas y viceversa. La tabla 13-8 muestra cuatro combinaciones posibles para muestras provenientes de animales infectados y no infectados.

Un resultado falso positivo se obtiene de una reacción serológica positiva con muestras obtenidas de animales no infectados. Un resultado falso negativo se obtiene de una reacción serológica negativa con muestras obtenidas de animales infectados. Estos resultados se obtienen con facilidad si las muestras son mal manejadas (manipulación, cadena de frío) o si la reacción se lleva a cabo de manera inapropiada. No obstante, también existen razones biológicas para la aparición de falsos positivos y negativos. La tabla 13-9 muestra las posibles causas de la aparición de estos resultados.

COMENTARIO FINAL

Las técnicas descritas son la base de los actuales métodos de detección de los principales microorganismos o sus productos

Tabla 13-8. Interpretación de los resultados de las pruebas inmunoserológicas

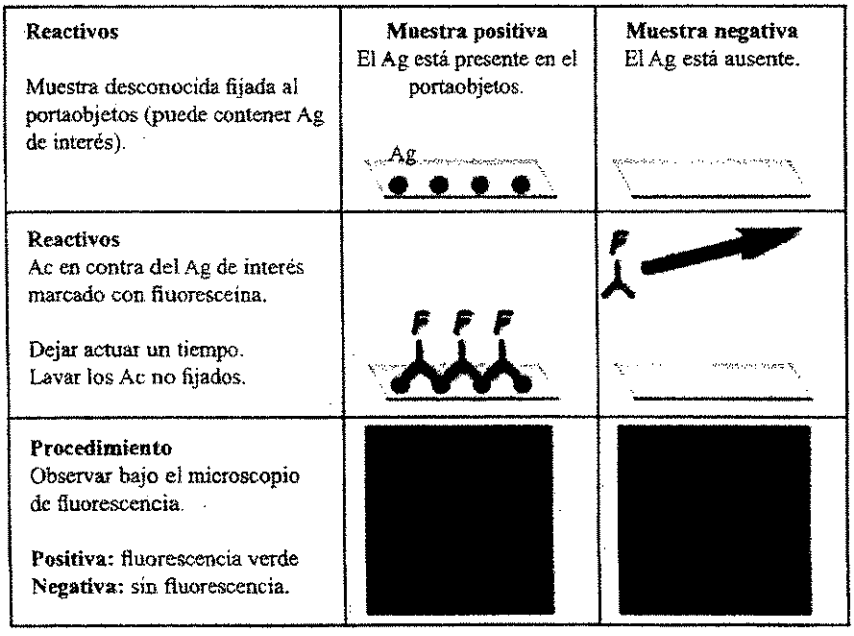
	Animales	
	Infectados	**No infectados**
Reacción positiva	Positivo	Falso positivo
Reacción negativa	Falso negativo	Negativo

Tabla 13-9. Fuente biológica de falsos resultados observados en las pruebas inmunoserológicas

En una prueba que detecta la presencia de Ac	**Fuentes biológicas de falsos positivos** El animal ha sido previamente expuesto al agente infeccioso, generó Ac, pero está libre de Ag en el momento de la toma de la muestra. El animal fue expuesto a un agente que indujo la producción de Ac que presentaron reacción cruzada con el Ag que está siendo analizado. La vacunación puede inducir la producción de Ac que se cruzan con las pruebas de diagnóstico, si los Ag utilizados en dichas pruebas son los mismos que los empleados en la vacunación. **Fuentes biológicas de falsos negativos** El animal ha sido recientemente expuesto al Ag y no ha tenido suficiente tiempo para la generación de Ac. El animal fue expuesto al Ag y se infectó, pero nunca generó una cantidad detectable de Ac.
En una prueba que detecta la presencia de Ag	**Fuentes biológicas de falsos positivos** El Ac utilizado en la prueba evidencia reacción cruzada con un microorganismo presente en el animal. El animal fue infectado y eliminó completamente el microorganismo, pero algunos Ag permanecen en los tejidos o el plasma. **Fuentes biológicas de falsos negativos** El animal se encuentra en la faz temprana de la infección y existen pequeñas o indetectables cantidades de Ag. Las muestras de tejido o de fluido contienen pequeñas o indetectables cantidades de Ag. El animal produjo una gran cantidad de Ac que saturan el Ag, previniendo la unión con los Ac de la prueba.

constituyentes o de secreción. En la actualidad existen *"kits"* comerciales con reactivos en botellas dosificadoras, que permiten realizar estas pruebas de manera más estandarizada que cuando fueron concebidas y con el ahorro de dinero. Tanto el espacio como el material de vidrio requeridos se ha visto reducido de manera significativa. Todas estas ventajas permiten realizar mayor cantidad de diagnósticos y con mayor exactitud que años atrás.

Entre los *"kits"* más conocidos se pueden mencionar aquellos que detectan adenovirus, rotavirus y parvovirus por medio de técnicas de ELISA; IgG, IgM e IgA en suero de pacientes que han tomado contacto con la *Bordetella pertussis*, por métodos de EIA; *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium tuberculosis*, por métodos de inmunofluorescencia directa; *Mycobacterium paratuberculosis* por el método de PAP; parvovirus por IFA ("Indirect Immunofluorescent Antibody"- inmunofluorescencia indirecta); tipificación de *Salmonella* sp con anticuerpos específicos mediante aglutinación; *Mycoplasma pneumoniae* por aglutinación con látex; *Cryptococcus neoformans* y clamidias, por EIA; anaerobios, toxoplasmosis, cisticercosis, triquinelosis, equinococosis, toxocariasis, tétanos y difteria, por ELISA.



● Antígeno

Anticuerpo marcado con fluoresceína

Figura 13-1. Prueba de fluorescencia directa.

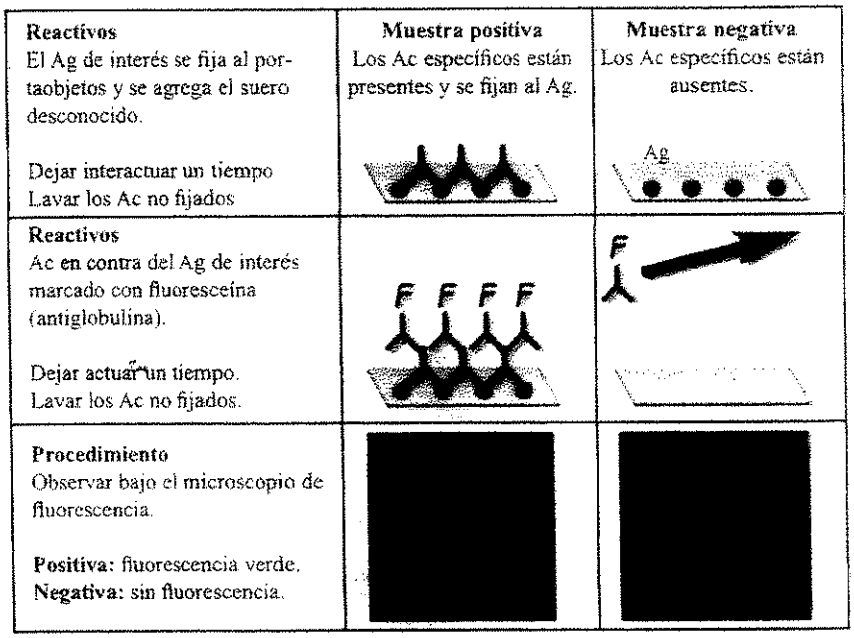


Figura 13-2. Prueba de fluorescencia indirecta.

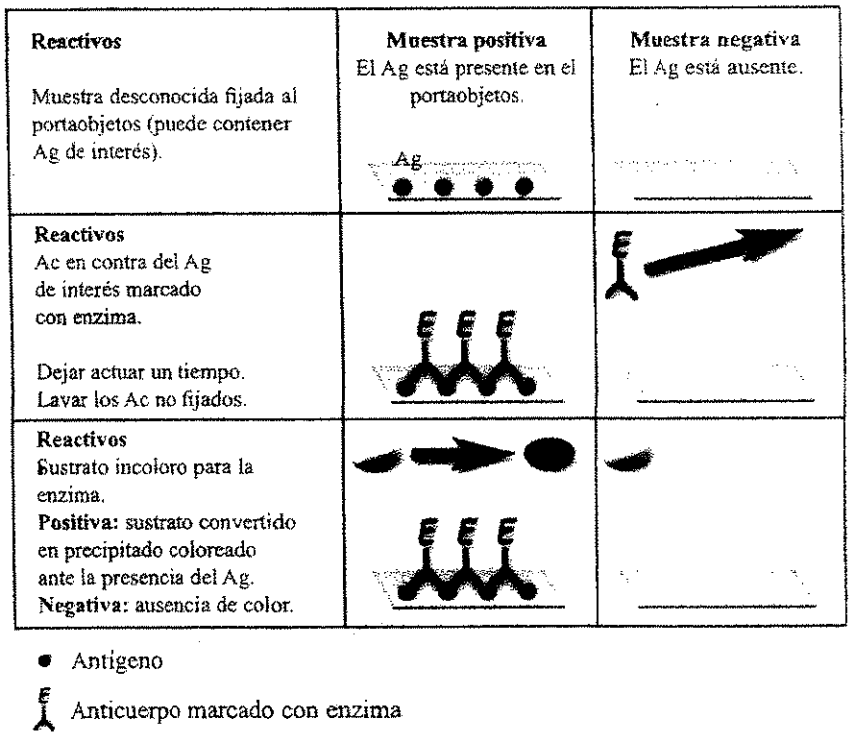


Figura 13-3. Reacción inmunohistoquímica.

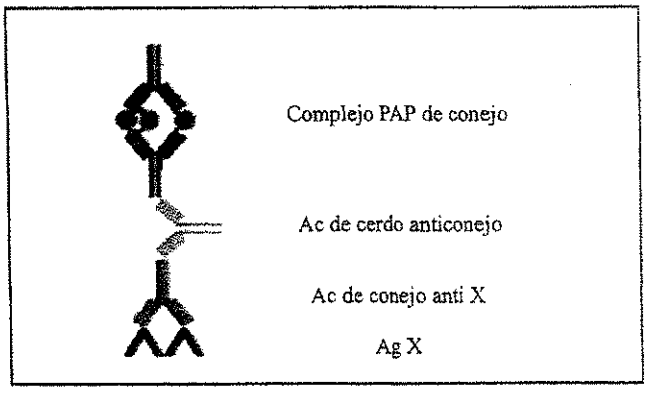


Figura 13-4. Complejo peroxidasa antiperoxidasa (PAP) en una reacción inmunohistoquímica indirecta.

Reactivos	**Muestra positiva**	**Muestra negativa**
Ag (fijado al pocillo) muestra desconocida. Dejar interactuar un tiempo. Lavar los Ac no fijados.	Los Ac específicos están presentes y se fijan al Ag.	Los Ac específicos están ausentes.
Reactivos Ac en contra del Ag de interés marcado con enzima (antiglobulina). Dejar actuar un tiempo. Lavar los Ac no fijados.		
Reactivos Sustrato incoloro para la enzima. **Positiva:** sustrato convertido en precipitado coloreado. **Negativa:** ausencia de color (sustrato no convertido).		

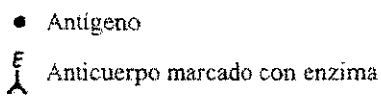


Figura 13-5. Determinación de Ac por medio de la técnica de ELISA.

Reactivos	**Muestra positiva**	**Muestra negativa**
Ac contra el Ag de interés (fijado al pocillo) muestra desconocida. Dejar interactuar un tiempo. Lavar los Ac no fijados.	Ag específicos están presentes y se fijan al Ac.	Los Ag están ausentes.
Reactivos Ac en contra del Ag de interés marcado con enzima. Dejar interactuar un tiempo. Lavar los Ac no fijados.		
Reactivos Sustrato incoloro para la enzima. **Positiva:** sustrato convertido en precipitado coloreado. **Negativa:** ausencia de color (sustrato no convertido).		

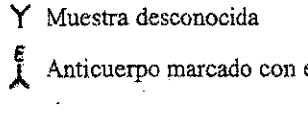


Figura 13-6. Determinación de Ag por medio de la técnica de ELISA.

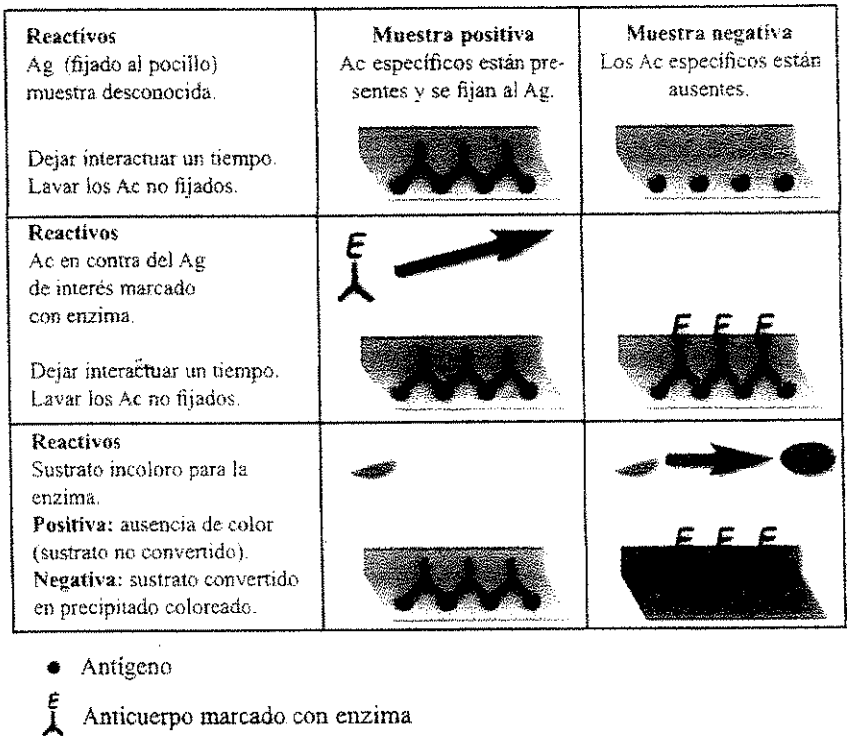


Figura 13-7. Determinación de Ac por medio de la técnica de ELISA competitiva.

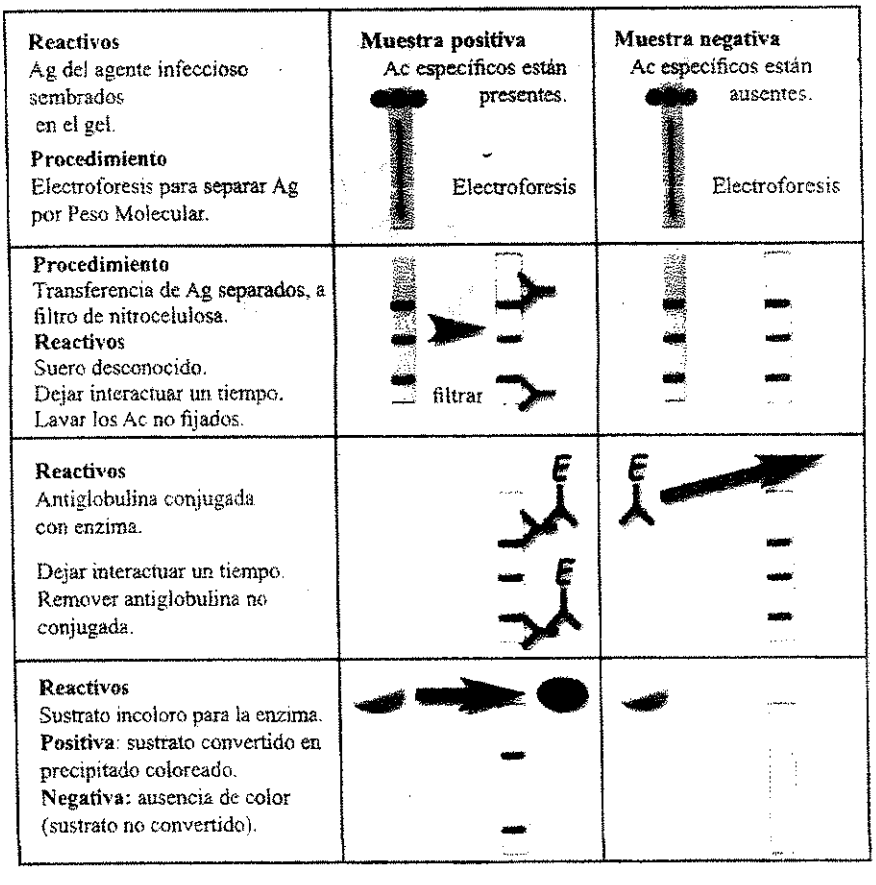


Figura 13-8. Determinación de Ag por medio de la inmunotransferencia.

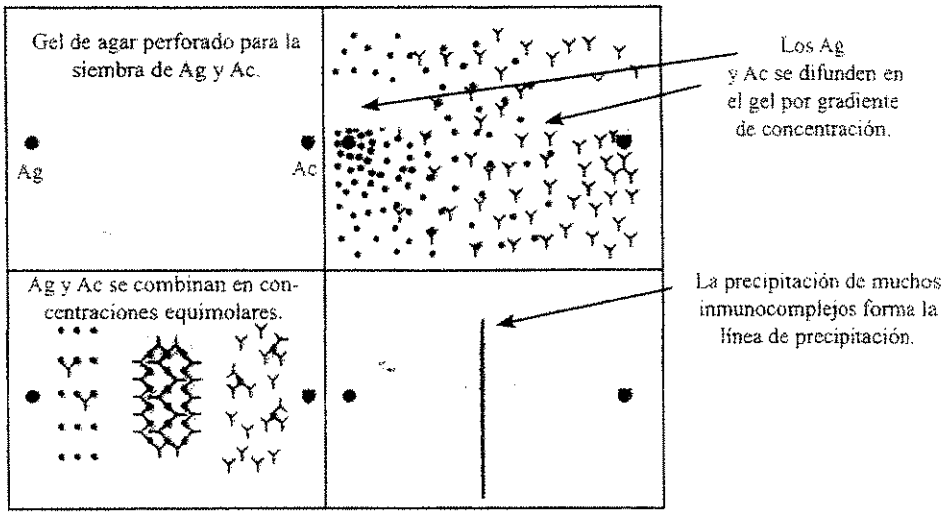


Figura 13-9. Secuencia de eventos en una reacción de precipitación.

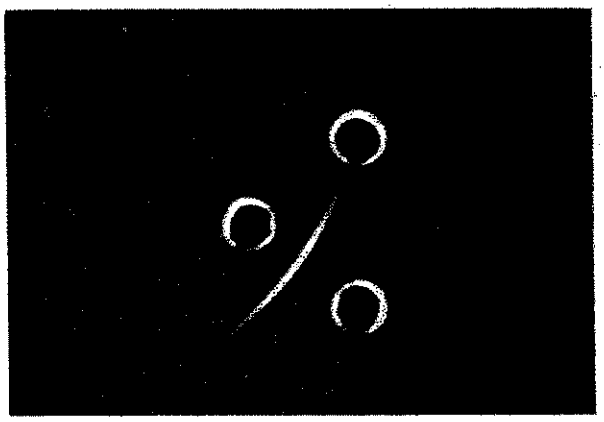


Figura 13-10. Reacción positiva con la prueba de Outcherlony para la determinación de la presencia de Ac antivirus de la anemia infecciosa equina.

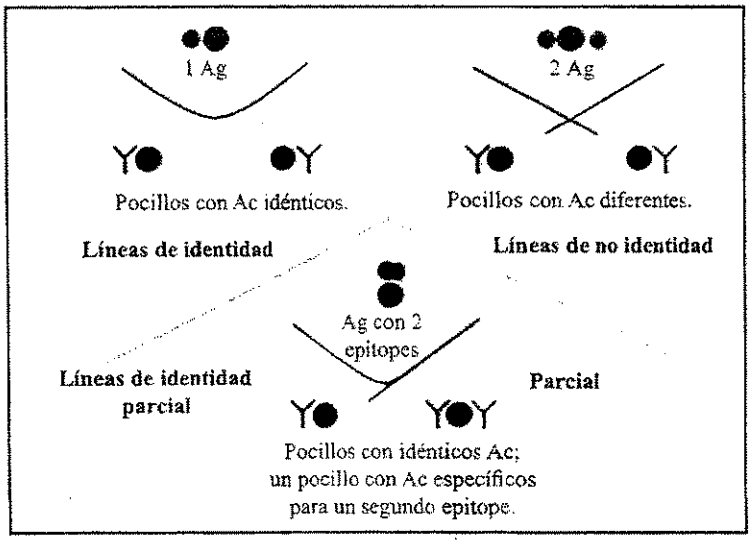


Figura 13-11. Líneas de identidad en las pruebas de precipitación.

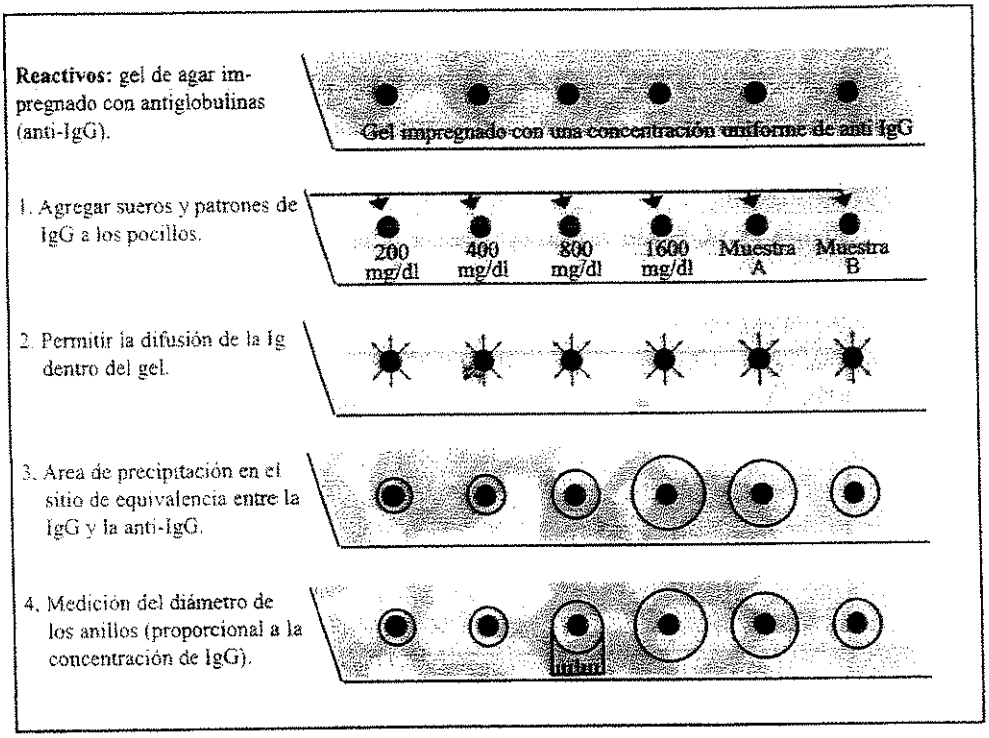


Figura 13-12. Determinación de la concentración de Ac mediante la prueba de inmunodifusión radial.

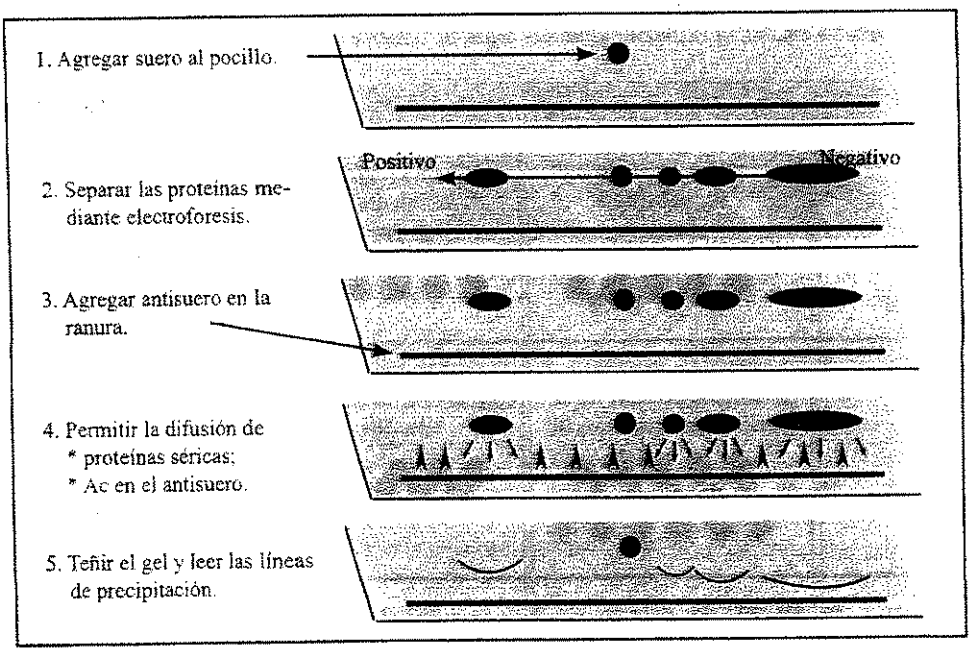


Figura 13-13. Representación de la prueba de electroinmunodifusión.



Figura 13-14. Prueba de hemoaglutinación. Aspectos de la reacción positiva, parcial y negativa.

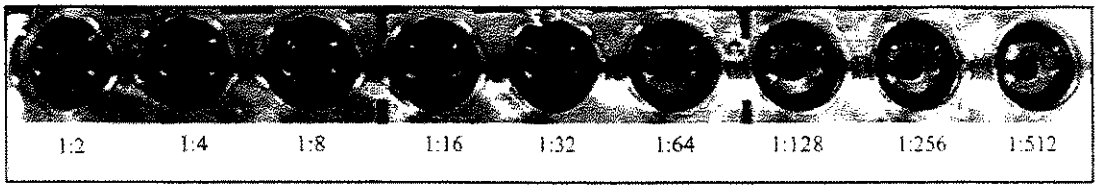


Figura 13-15. Prueba de hemoaglutinación. Título de la reacción: 32.

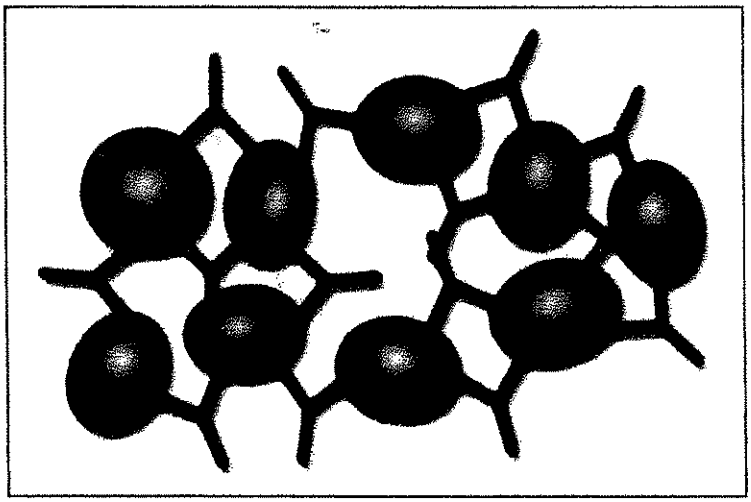


Figura 13-16. Ac aglutinando glóbulos rojos de carnero adsorbidos con el Ag problema.

Reactivos Suero problema (con o sin Ac). Virus. Dejar interactuar un tiempo.	**Muestra positiva** Ac antivirales presentes.	**Muestra negativa** Ac antivirales ausentes.
Reactivos Eritrocitos de la especie apropiada.	Inhibición de la unión de las glicoproteínas de superficie, del virus a los GR	Las glicoproteínas de superficie del virus se unen a los GR.
Positiva: los Ac inhiben la hemoaglutinación. **Negativa:** el virus induce la hemoaglutinación.		

GR Glóbulos rojos o eritrocitos

● Virus

Y Anticuerpo

• Eritrocito de la especie apropiada

Figura 13-17. Prueba de inhibición de la hemoaglutinación.

Reactivos	**Muestra positiva**	**Muestra negativa**
Ag Muestra desconocida. Fuente de C'. Dejar interactuar un tiempo.	Los Ac específicos están presentes, se unen a los Ag y fijan el C'.	Los Ac específicos están ausentes, no se fija el C'.
Reactivos Sistema revelador. Eritrocitos de oveja. Ac antieritrocitos de oveja. Dejar interactuar un tiempo.		
Positiva: complemento fijo en paso 1. Eritrocitos ovinos no lisados. **Negativa:** complemento no fijado en paso 1. Eritrocitos ovinos lisados.		

Figura 13-18. Prueba de fijación del complemento.

C' Complemento
● Antígeno
Fuente de complemento
Eritrocitos de oveja
Anticuerpos antieritrocitos de oveja



1:4 1:8 1:16 1:32 1:64

Figura 13-19. Aspecto macroscópico de la reacción de fijación del complemento con un título = 8.

Reactivos	**Muestra positiva**	**Muestra negativa**
Virus Muestra desconocida (con o sin Ac). Dejar interactuar un tiempo.	Ac antivirales presentes.	Ac antivirales ausentes.
Reactivos Agregar virus + Ac sobre cultivos celulares, donde el virus replique y cause daño visible. Permitir el crecimiento viral en células.		
Positiva: los Ac inhiben la adsorción y replicación viral; no hay daño celular. **Negativa:** el virus replica y causa daño celular.		

Figura 13-20. Diagrama de la prueba de neutralización viral.

● Virus
Y Muestra desconocida con o sin anticuerpo

BIBLIOGRAFIA

International Microbio. http://www.int-microbio.com/

Jonstone A, Thorpe R. Immunochemistry in practice. Blackwell Scientific Publications. Oxford. Second edition. 1990.

Margni R.A. Inmunología e Inmunoquímica. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Cuarta edición. 1989.

Portiansky EL. Procesamiento y análisis de imágenes: de los ojos al microchip. 1. Principios. En: Manual de actualización del 15° Curso Internacional de Posgrado en Técnicas de Inmunohistoquímica, Lectinhistoquímica y Microscopia Electrónica. Editado por el Instituto de Patología "Dr.B.Epstein" y Servicio Central de Microscopía Electrónica. FCV. UNLP. pp 47-54. 2003.

Portiansky EL. Procesamiento y análisis de imágenes: de los ojos al microchip. 2. Aplicación a las técnicas inmunocolorimétricas/colorimétricas. En: Manual de actualización del 15° Curso Internacional de Posgrado en Técnicas de Inmunohistoquímica, Lectinhistoquímica y Microscopia Electrónica. Editado por el Instituto de Patología "Dr.B.Epstein" y Servicio Central de Microscopía Electrónica. FCV. UNLP. pp 55-60. 2003.

Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology. Mosby. London. 1993.

Stanchi N, Portiansky EL. Diagnóstico inmunoserológico. En: Pennimpede E, Gómez C, Stanchi N. Introducción a la inmunología. Ed. EDULP. 2004. pp. 437-459.

Varios Autores. Manual de actualización del 15° Curso Internacional de Posgrado en Técnicas de Inmunohistoquímica, Lectinhistoquímica y Microscopia Electrónica. Editado por el Instituto de Patología "Dr. B. Epstein" y Servicio Central de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. 2003.

Veterinary Microbiology. VTPB 910. Texas A&M University. http://vtpb-www.cvm.tamu.edu/vtpb/vet_micro/serology/

Weir DM. Handbook of Experimental Immunology. Blackwell Scientific Publication. Oxford. Forth edition. Vols I y II, 1986.

GENETICA BACTERIANA

Elida Gentilini

Todos los seres vivos se asemejan a sus antepasados en la mayor parte de sus características. La constancia de los caracteres específicos a través de las generaciones se denomina **herencia.**

La **genética** estudia la transmisión de los caracteres (genes) y la regulación de la herencia.

Durante casi la primera mitad del siglo XX, algunos científicos dudaban que las leyes que gobernaban la herencia en los organismos que se reproducían sexualmente pudieran aplicarse a las bacterias. Sin embargo, algunos bacteriólogos trataron de explicar la variabilidad de las poblaciones bacterianas, aplicando los mismos principios genéticos de los organismos superiores. Fue con este concepto que se originó la genética bacteriana en la mitad de la década de 1940.

Los microorganismos ofrecen ventajas como objetos para el estudio de los problemas genéticos ya que, entre otras características, pueden obtenerse un gran número de células idénticas en un tiempo corto y en un espacio reducido, y proporcionan una molécula simple de DNA de fácil aislamiento y purificación. Es así como los mayores avances en el conocimiento de la naturaleza química y las funciones del material genético surgen a partir del estudio de la herencia bacteriana.

Para los estudios genéticos, son básicos los siguientes términos:

Gen: es la unidad de la herencia, un segmento de ácido desoxirribonucleico (DNA) que lleva la información en su secuencia de nucleótidos para una propiedad fisiológica o bioquímica específica.
Recordemos que esta información debe ser decodificada por medio de los procesos de transferencia unidireccional: la *replicación* de la doble hélice de DNA (para formar una copia semiconservadora), la *transcripción* a mRNA (como intermediario de esa información) y la traducción junto con el RNA ribosomal (rRNA) y el RNA de transferencia (tRNA) para formar las proteínas. A diferencia de los eucariotas, en los procariotas no existe una separación física entre la transcripción y la traducción.

Genotipo: es el capital genético de una célula.

Fenotipo: es el conjunto de características genéticas que pueden observarse o medirse.

Genoma: es la suma de genes que posee una bacteria en su cromosoma y, si los tuviera, en elementos extracromosómicos, como plásmidos y bacteriófagos.

Replicón o unidad de replicación: es la secuencia de nucleótidos fija y heredable donde comienza la replicación (origen de replicación). Esto es, los genes que codifican las proteínas que se unen al origen, para iniciar la replicación y el DNA que se replica bajo su control. El cromosoma bacteriano, los plásmidos y el genoma de los fagos son replicones únicos, pues contienen la información genética necesaria para su propia replicación.

Clona o cepa microbiana: es una población de células con genes idénticos.

Promotor y **operador:** son secuencias de nucleótidos que controlan la expresión de un gen, influyendo sobre las secuencias de bases que serán transcriptas al RNA mensajero.

Operón: son grupos de uno o más genes estructurales, cuya función, como unidad integrada, está controlada por un gen operador. Expresan una determinada característica, a partir de un promotor específico. Los operones que poseen muchos genes estructurales se denominan **policistrónicos.**

CROMOSOMA BACTERIANO

El material genético de las bacterias está constituido por una única molécula de DNA, doble cadena, generalmente circular, que almacena la información necesaria para llevar a cabo la biosíntesis de todos sus componentes. La molécula de DNA fue descubierta en 1951 por James Watson, Francis Crick y Maurice Wilkins.

Las bacterias suelen poseer genes auxiliares, presentes en los plásmidos. Estos elementos son también circulares y bicatenarios, pero de un tamaño menor que el del cromosoma bacteriano.

ESTRUCTURA DEL DNA

Estructura primaria

La mayor parte de las moléculas de DNA son de doble cadena con bases complementarias. La complementariedad de las bases le permite a una de las cadenas proporcionar la información para el copiado o expresión de la información en la otra cadena. Cada par de bases está compuesta por una purina y una pirimidina. Las purinas de una cadena forman puentes de hidrógeno con las pirimidinas de la otra cadena. El par A-T (adenina-timina), con dos uniones puente de hidrógeno; y el par G-C (guanina-citosina), con tres uniones.

Cada una de las cuatro bases está unida a una fosfo-2'-desoxirribosa para formar un **nucleótido**. Los 2'desoxirribonucleósidos están ligados por uniones fosfodiéster (un fosfato conecta a dos azúcares por una unión éster) entre un oxidrilo libre en la posición 3' de un azúcar y un fosfato en el extremo 5' del siguiente, determinando una *polaridad*. Así, una de las cadenas del DNA posee una terminación libre 3' en uno de sus extremos y una terminación 5' libre en el otro extremo. Cada cadena del DNA presenta una orientación *antiparalela* respecto a su polaridad (fig. 14-1).

Las uniones puente de hidrógeno entre los pares de bases determinan la secuencia de bases complementarias en las dos cadenas. No obstante, la estabilidad de las cadenas depende de interacciones hidrofóbicas entre los anillos aromáticos de las bases que tienden a apilarse unos sobre otros. Estas interacciones neutralizan la fuerza electrostática entre los grupos fosfatos con carga negativa.

Estructura secundaria

Estudios realizados por Watson y Crick (1953) establecen que la estructura clásica del DNA es una hélice formada por

dos cadenas. Desde entonces se ha demostrado que ésta es la estructura más frecuente del DNA, tanto en el interior como en el exterior de la célula.

Los esqueletos azúcar fosfato forman hélices dextrógiras, enrolladas una alrededor de la otra, y un giro helicoidal por cada 10,6 pares de bases. Esta estructura es la que adopta el DNA, con extremos que tienen la libertad de rotar (fig. 14-2).

El DNA en la doble hélice tiene dos surcos: el mayor y el menor. Estos surcos poseen proteínas que interactúan específicamente, con diferentes átomos del DNA.

El DNA circular cerrado y aislado de las bacterias está subenrollado, en comparación con la conformación anterior, y presenta un giro cada 200 pares de bases.

Estructura terciaria

El DNA bicatenario circular cerrado no posee extremos libres, por lo que el número de veces que las dos cadenas se enrollan una alrededor de la otra no se modifica.

La longitud de una molécula de DNA se expresa en miles de pares de bases o en kilobases (kb).

El cromosoma de una bacteria tipo (por ej., *Escherichia coli*), es una molécula circular única de DNA de doble cadena, que contiene alrededor de 4.500.000 pares de bases o 4500 kb, con una longitud aproximada de 1 mm. Como el tamaño de una bacteria suele ser mil veces más pequeño, se requiere un gran plegamiento y torsión del DNA para que el cromosoma bacteriano pueda acomodarse en el interior del citoplasma. Esto se logra por el superenrollamiento de la molécula de DNA, resultado del balance de la actividad enzimática de las topoisomerasas I y II.

Las topoisomerasas tipo I fracturan una de las cadenas del DNA, y las del tipo II, como la DNA girasa, rompen ambas cadenas de la hélice. Por la acción de estas enzimas, las moléculas de DNA pueden relajarse o enrollarse alternativamente.

El DNA puede enrollarse de manera positiva o negativa. La torsión superhelicoidal hacia la izquierda es la que generalmente se aísla de las bacterias. El enrollamiento negativo es cuando la torsión se produce hacia la izquierda (en dirección contraria a la doble hélice, que es hacia la derecha).

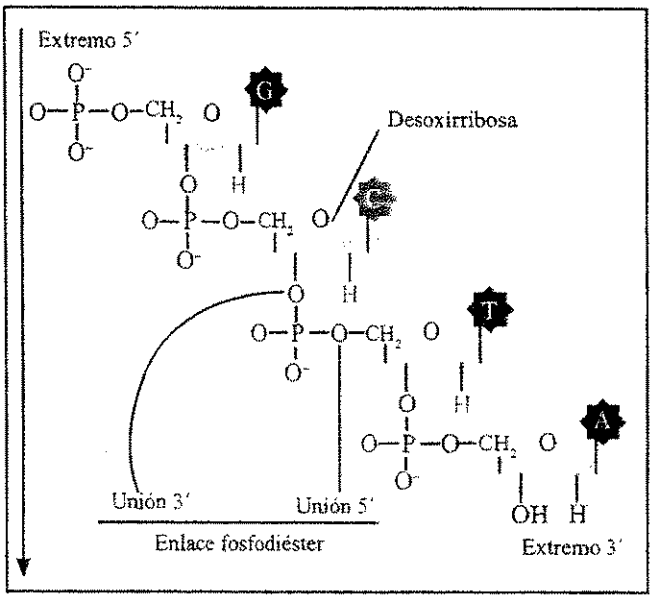


Figura 14-1. Estructura de una cadena de DNA. La polaridad de la cadena está determinada por la dirección en que se hallan los enlaces fosfodiéster. La dirección 5'→3' está indicada por una flecha.

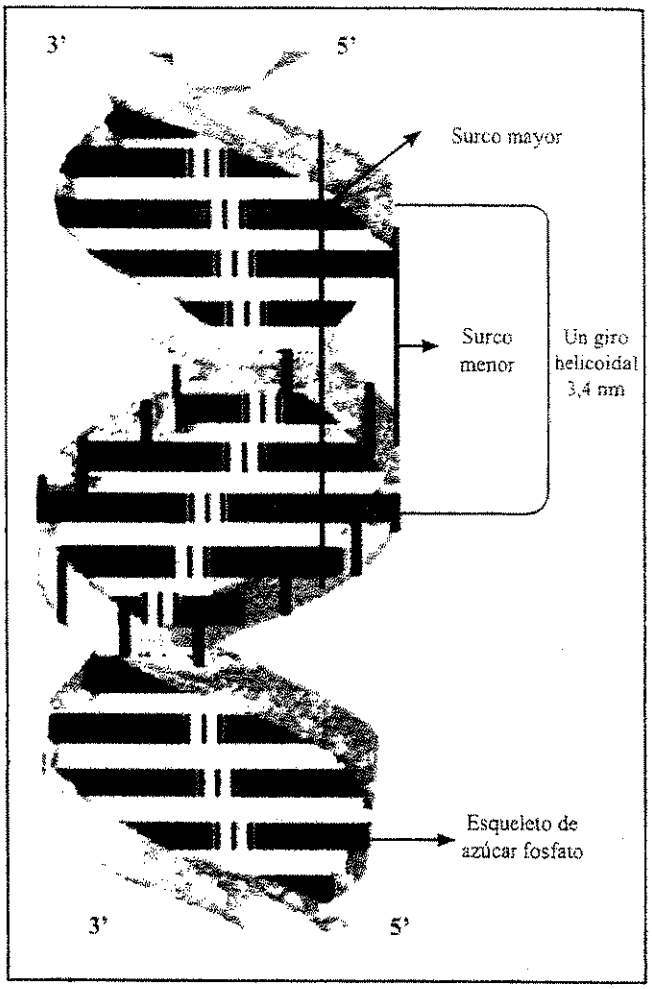


Figura 14-2. Modelo del DNA según Watson y Crick.

La torsión del DNA se mantiene si el cromosoma conserva la estructura circular.

El superenrollamiento representa un gran potencial energético, que podría perderse en el caso de que algunas de las cadenas del DNA se rompiera. Pero el cromosoma, a su vez, está organizado en una serie de rulos, cada uno de los cuales constituye un **dominio** (una bacteria puede poseer entre 20 y 70 dominios superhelicoidales); *E. coli* posee alrededor de 50 dominios). Cada dominio actúa como una región independiente. La ruptura de un dominio libera sólo un 2% del superenrollamiento, lo que evita una pérdida devastadora de energía en los procesos de replicación y transcripción del DNA.

Esta disposición facilita el plegamiento y la torsión de la larga molécula de DNA, permitiendo adaptarse a la bacteria.

REPLICACION DEL DNA

La replicación del cromosoma bacteriano está relacionada con la velocidad de crecimiento de la célula bacteriana. Se describen tres etapas: iniciación, elongación y terminación.

Iniciación

La iniciación de la replicación del DNA depende de la concentración de determinadas proteínas que forman un complejo multienzimático que se desplaza a lo largo del DNA.

La replicación del DNA se inicia en una secuencia específica del cromosoma denominada *ori*C, a partir del cual se desplaza hacia el punto terminal. La estructura donde las dos cadenas se separan y se lleva a cabo la síntesis nueva se denomina *horquilla de replicación*.

En *E. coli*, por ejemplo, para la síntesis del nuevo DNA, se establecen *dos horquillas de crecimiento* en el origen *ori*C, que avanzan en sentidos opuestos hasta reunirse en una secuencia terminal a 180° del punto de inicio (fin de la replicación), sobre el cromosoma circular.

El DNA nuevo se sintetiza de forma semiconservadora, utilizando como plantillas ambas cadenas del DNA parental, o sea que cada célula hija contiene una cadena del DNA materno y una cadena neosintetizada.

Para que las cadenas del DNA sean copiadas, la hélice debe estar desenrollada en la zona que se está duplicando. En la iniciación, las **topoisomerasas** alivian el superenrollamiento en el punto de origen en una cadena de DNA. Esto permite la entrada de una enzima **helicasa** capaz de desenrollar el DNA y exponerlo. Sin embargo, antes de iniciar la replicación del DNA, se requiere una enzima **primasa o RNA polimerasa**, capaz de sintetizar cebadores *(primers)* de RNA corto, para iniciar la síntesis del DNA en el origen, y las **polimerasas DNA dependientes I, II y III**, que copian el DNA en la dirección 5' → 3'.

Las proteínas desestabilizadoras de la hélice o *proteínas de unión a DNA de una sola cadena* (SSB) se unen a cadenas de DNA abiertas, quedando las bases expuestas como molde. Estas proteínas no son capaces de abrir las cadenas de DNA, pero junto con las helicasas estabilizan la conformación desenrollada de las cadenas simples.

DNA polimerasas: la función de la DNA polimerasa III, es la síntesis de nuevas cadenas de DNA. La polimerasa se desplaza a lo largo de la cadena de DNA e incorpora en cada posición el nucleótido complementario.

Las DNA polimerasas requieren de la existencia de un cebador que contenga el grupo 3' oxidrilo, para iniciar la incorporación de nucleótidos en el DNA (recordar que los nuevos nucleótidos se añaden siempre al oxidrilo 3' de la cadena que está en crecimiento). Esos cebadores son sintetizados por la primasa o por la RNA polimerasa.

La DNA polimerasa I remueve los cebadores y rellena los huecos en la síntesis de la cadena rezagada. La continuidad de la nueva cadena depende de la ligasa, y la especificidad de esta enzima asegura que no se reparen moléculas aberrantes.

Las DNA polimerasas también poseen funciones de lectura segura que permiten a la enzima confirmar que se ha insertado en el nucleótido correcto y que es factible corregir los posibles errores que pudieran acontecer.

La acción de la polimerasa II en la replicación del DNA, aún no está dilucidada.

Elongación

La reacción química central de la replicación del DNA puede ser catalizada por una enzima, la DNA polimerasa. Todas las polimerasas agregan nucleótidos en la dirección 5' → 3' para el crecimiento de la cadena y requieren un molde, un cebador y un desoxirribonucleósido trifosfato activado.

Sólo una cadena parental, *cadena conductora o líder*, es copiada de manera continua en la dirección 5' → 3'; la copia de la cadena antiparalela o cadena *rezagada* se realiza por fragmentos de DNA de corta longitud (fragmentos de Okazaki), por acción de los cebadores *primers* de RNA. A medida que dispone de su plantilla, el DNA de la cadena rezagada se extiende en la dirección 5' → 3'. La razón de la síntesis discontinua o por fragmentos es que el desenrollamiento de la hélice expone un molde que puede ser copiado sólo después de haber sintetizado un cebador. Esto ocurre porque no existen oxidrilos 3' libres a los que se les puedan unir nuevos nucleótidos.

La primasa debe sintetizar iniciadores de RNA que proporcionan oxidrilos libres en 3' a los que la DNA polimerasa III añade desoxinucleótidos. Luego actúa la DNA polimerasa I, que además de sintetizar DNA, hidroliza el iniciador de RNA o cebador del fragmento anterior (actividad exonucleasa). La ligasa remplaza a la DNA polimerasa I, luego de ser eliminado el cebador y sella los dos fragmentos, mediante enlaces fosfodiéster. La ligasa y DNA polimerasa I son enzimas implicadas en la reparación del DNA (fig. 14-3).

En resumen, la síntesis de la cadena conductora o líder es realizada por la **DNA polimerasa III.** La cadena rezagada requiere la acción de una **primasa** que se une al molde y sintetiza cebadores que son extendidos o elongados por la DNA polimerasa

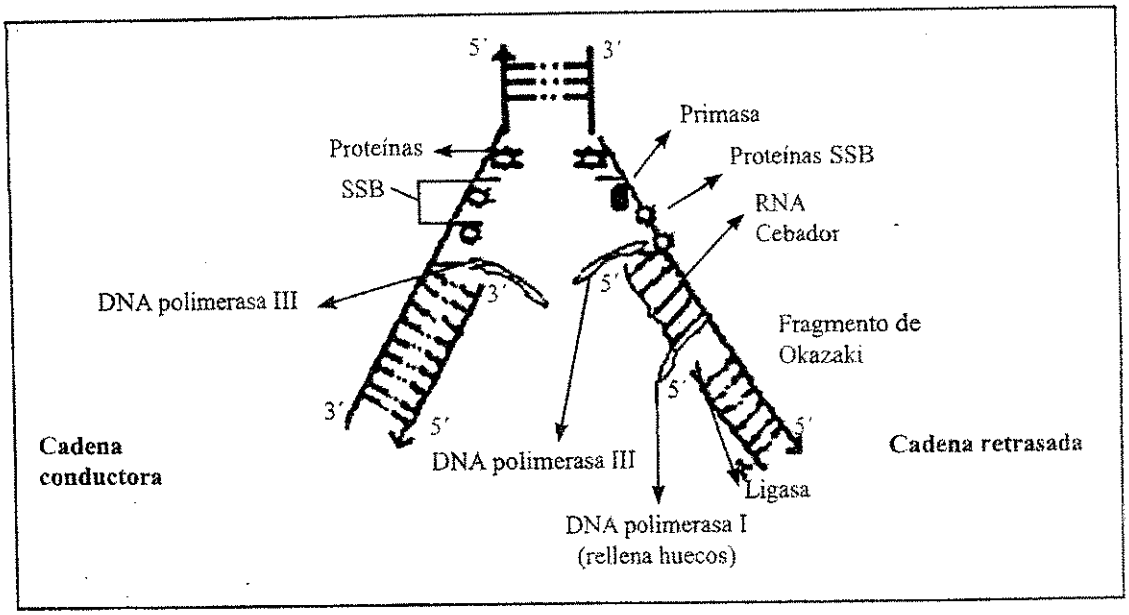


Figura 14-3. Horquilla de replicación del DNA. Esquema del crecimiento del DNA. La cadena retrasada crece en forma discontinua. Los espacios de la cadena discontinua son cerrados por la acción de una ligasa. La DNA polimerasa en la cadena retrasada sintetiza un fragmento de Okazaki.

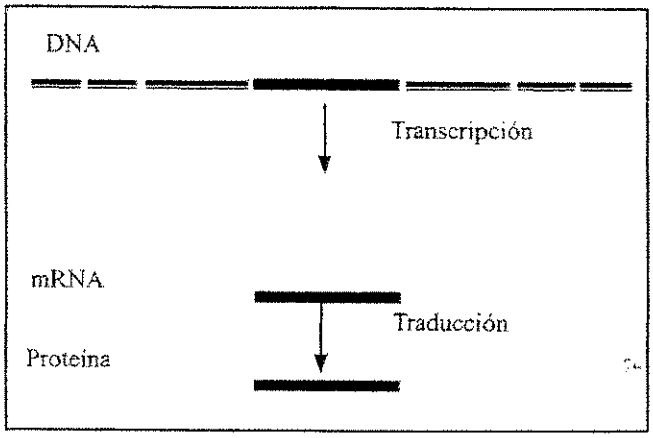


Figura 14-4. Transferencia de información desde el DNA hasta la proteína.

III. Los fragmentos de corta longitud son unidos por una **ligasa** y **DNA polimerasa I**.

Mediante este mecanismo ambas cadenas pueden replicarse sintetizando DNA en dirección 5' → 3'.

Terminación

Los dos cromosomas hijos se separan antes de la división celular, de manera que cada progenie adquiere un DNA hijo. Esto se logra por la acción de las topoisomerasas (permiten la correcta segregación de los cromosomas hijos) o mediante recombinación.

La replicación finaliza cuando las dos horquillas se encuentran a 180° desde el inicio.

Durante la fase logarítmica de crecimiento en un medio rico en nutrientes, las bacterias pueden tener varios inicios del proceso de replicación cromosómica (2 a 4 copias del cromosoma) antes de que ocurra la división celular. Una vez concluida la replicación suelen poseer un solo cromosoma por célula.

El proceso de replicación impone una gran fuerza de torsión sobre el DNA circular, y la topoisomerasa II (girasa) alivia la tensión creada delante de la horquilla de replicación al desenrollarse el DNA, de lo contrario, la tensión generada frenaría el avance de la horquilla. La topoisomerasa II o girasa es esencial para la vida de las bacterias y constituye el blanco de algunos antibióticos (ácido nalidíxico, quinolonas fluoradas y novobiocina), que inhiben la actividad de esta enzima con un efecto bactericida.

TRANSFERENCIA DE INFORMACION DESDE EL DNA HASTA LA PROTEINA

La información que contiene el DNA se expresa indirectamente a través de la síntesis de RNA específicos y de moléculas de proteínas que determinan las propiedades físicas y químicas de la célula (fig. 14-4).

TRANSCRIPCION DEL DNA

La transcripción del DNA es un proceso por el cual, mediante la acción de la RNA polimerasa, se sintetizan las moléculas de ácido ribonucleico (RNA). La transcripción genera tres tipos de RNA principales: RNA mensajero (mRNA), RNA de transferencia (tRNA) y RNA ribosomal (rRNA).

El RNA se diferencia químicamente del DNA al poseer ribosa en lugar de desoxirribosa, tener la base uracilo en lugar de timina y ser una molécula de tira simple, a excepción de algunos virus que tienen RNA de tira doble.

La RNA polimerasa requiere la presencia de DNA, que actúa como molde. La polimerasa se une fuertemente, cuando está en contacto con una secuencia específica de DNA, llamada **promotor**. Este contiene el *lugar de iniciación* para la síntesis del RNA. Luego de la unión al promotor, la RNA polimerasa abre una región de la doble hélice, exponiendo los nucleótidos de ambas cadenas de una zona pequeña de DNA. Una de las dos cadenas actúa como molde para el apareamiento de bases complementarias. La polimerasa se desplaza a lo largo del DNA, desenrollando la hélice y exponiendo una nueva región de la cadena molde para el apareamiento de bases. Esto implica, la unión de un sustrato ribonucleósido trifosfato, la formación de un enlace fosfodiéster con liberación de pirofosfato y la translocación de la polimerasa a una base sobre el molde. Se produce la elongación en dirección 5' → 3'. La elongación continúa hasta que la polimerasa encuentra una secuencia especial del DNA y se produce una **pausa** o la **terminación** de la transcripción. La enzima aquí se separa tanto de la cadena molde de DNA como de la molécula de mRNA nueva. Esta molécula funcional resultante es lineal y de tira simple. Así, el proceso de transcripción traslada el código genético del DNA (gen) al mRNA.

Se desconoce la causa por la que la enzima se detiene cuando el RNA que se sintetizó por detrás de ella forma una estructura de rulo pediculado por el apareamiento interno de sus bases. Varias proteínas pueden estar implicadas en el bloqueo de la terminación de la transcripción.

Algunos antibióticos, como actinomicina y rifampicina, interfieren en la síntesis de proteínas. La actinomicina se fija a la molécula de DNA, impidiendo la síntesis de mRNA, y la rifampicina se une específicamente a la RNA polimerasa, inhibiendo su actividad.

Código genético

El código genético contenido en el cromosoma (DNA) de la célula bacteriana se transcribe de la molécula de DNA al mRNA. Este mRNA es el molde para el ensamblaje de los aminoácidos.

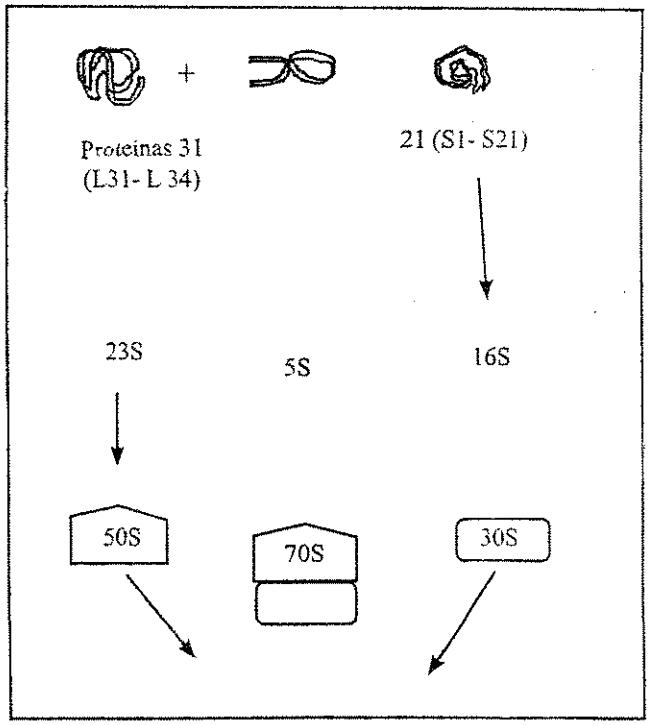


Figura 14-5. Esquema de la composición de un ribosoma bacteriano. (Redibujado de Jawetz y col. 17ª edición, 2001).

Todos los tipos de RNA contienen cuatro bases de nucleótidos diferentes: adenina (A), guanina (G), citosina (C) y uracilo (U).

Algunas moléculas del RNA tienen función enzimática, como la **ribozima**.

El triplete de bases mRNA (por ej., CUA), se denomina **codón** para un determinado aminoácido. Dado que en los nucleótidos puede haber cuatro bases, y en cada codón hay tres, son posibles 64 tripletes (codones) diferentes.

Como existen 20 aminoácidos para codificar, la cantidad de codones es mayor que la necesaria para trasladar la información genética del mRNA a la proteína.

El código genético está degenerado porque existen hasta seis codones diferentes que codifican para la síntesis de un aminoácido. De los 64 codones, a algunos, que no codifican para la síntesis de aminoácidos (por ej., UAA, UGA y UAG), se los denomina *codones sin sentido* o *codones de terminación*.

Estos codones sirven como señal para detener las síntesis de una proteína, cuando la molécula está totalmente formada. Algunos codones que representan puntos de inicio para la síntesis de nuevas proteínas se denominan *codones de iniciación*.

La **traducción** es el proceso por el cual el código del triplete de bases codificado en el mRNA se usa para dirigir la secuencia de aminoácidos en las moléculas proteicas. El ribosoma es el sitio donde las moléculas de tRNA leen el código nucleotídico, y una clase de enzimas, llamadas tRNA sintetasas, son responsables de montar las moléculas de tRNA con los aminoácidos correctos para la síntesis de proteínas.

Ribosomas

El ribosoma bacteriano está compuesto por tres moléculas de RNA y 53 proteínas diferentes que se designan según el coeficiente de sedimentación. Cada ribosoma posee dos subunidades, una de 50S (S = unidad Svedberg) y otra de 30S. Estas subunidades se unen para formar la partícula de 70S (fig. 14-5).

La subunidad 50S está implicada principalmente en la formación de la unión peptídica y contiene los rRNA 23S y 5S. En la actualidad se acepta que esta subunidad está compuesta por 32 proteínas, que se designan L1 a L34.

La subunidad 30S está implicada principalmente en la decodificación del mRNA. Esta subunidad contiene los sitios de enlace para las moléculas del tRNA activadas. Además, es importante en la iniciación de la traducción con el factor de iniciación IF3 (IF = factores de iniciación). Esta subunidad contiene el rRNA 16S y está constituida por 21 proteínas, denominadas S1 a S21.

En las bacterias, ambas subunidades se encuentran separadas, pero durante la síntesis proteica forman la unidad 70S, a la que se une el RNAm.

La traslación del código genético ocurre en el complejo ribosoma mRNA.

Un ribosoma posee tres lugares de unión para moléculas de RNA, uno para mRNA y dos para tRNA. Posee un sitio llamado sitio **P** (péptido dador), o el **lugar de unión peptidil-tRNA**, que transfiere la molécula de tRNA que está unida al extremo de la cadena polipeptídica en crecimiento, y otro sitio llamado A (aceptor), o el **lugar de unión aminoacil-tRNA**, hacia el cual se transfiere la molécula de tRNA cargada con un aminoácido.

tRNA y tRNA sintetasa

Los RNAt son responsables de la lectura de los tripletes de nucleótidos en el mRNA y de la traducción de este código en una secuencia de aminoácidos.

La estructura molecular de una molécula de tRNA se presenta como una hoja de trébol (fig. 14-6).

El agregado de aminoácidos al tRNA se realiza por enzimas aminoacil-RNAt sintetasas. La activación específica de un aminoácido determinado y la unión de ese aminoácido activado al tallo receptor del tRNA está catalizada por estas enzimas (una sintetasa para cada aminoácido). Para activar a un aminoácido, la sintetasa separa un pirofosfato de una molécula de ATP, y el AMP remanente queda unido al aminoácido por enlaces covalentes (aminoácido-AMP).

Las sintetasas, en última instancia, son las responsables de la fidelidad de la síntesis proteica. La enzima determina el aminoácido que se activará, para unirse a la molécula de tRNA, y el aminoácido que se insertará a la proteína en formación. Una vez que el aminoácido se activa y el complejo tRNA-aminoácido se separa de la enzima, este complejo emigra a un ribosoma que contiene una molécula de mRNA.

En las bacterias, el mRNA se une a la subunidad 30S del ribosoma 70S. El anticodón de un tRNA activado contiene tres bases complementarias al codón en el mRNA, reconoce y se une al codón de iniciación en la tira de mRNA y, además, se une a la subunidad 50S del ribosoma.

Los errores en la traslación del mensaje del mRNA, en general, son poco frecuentes. Algunos antibióticos que actúan sobre las subunidades 30S o 50S incrementan estos errores, haciendo que la proteína recién sintetizada sea anormal y alterando la capacidad funcional de la célula.

SINTESIS PROTEICA

Iniciación de la traducción

El proceso de iniciación está catalizado por proteínas denominadas factores de iniciación. La subunidad pequeña del ribosoma (30S) ayuda a la molécula de tRNA que lleva unida a encontrar un codón especial (el codón de iniciación) en la molécula de mRNA. El proceso es complejo, aunque está claro que, en las bacterias, la síntesis proteica se inicia en un aminoácido especial codificado por el codón AUG u ocasionalmente por GUG (iniciación) en la tira de mRNA. Estos tripletes codifican el aminoácido *N*-formilmetionina, constituyendo el primer aminoácido en la síntesis de cada proteína en formación. No obstante, más adelante, este aminoácido puede ser eliminado por acción enzimática, ya que no todas las proteínas tienen metionina como aminoácido terminal.

El factor de iniciación IF3 cumple una función directa en la unión del mRNA con la subunidad 30S del ribosoma y mantiene la subunidad 30S libre de la 50S hasta que la iniciación comienza a marchar.

El factor F2 promueve la unión del tRNA iniciador en el complejo de crecimiento (complejo 30S). La unión del IF2 lleva

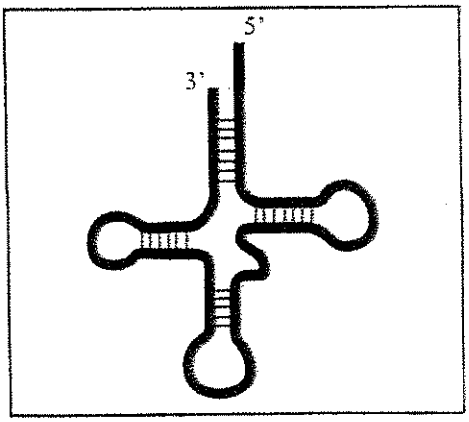


Figura 14-6. Configuración en hoja de trébol del RNA de transferencia.

a liberar el IF3. El paso final de la iniciación es la asociación del complejo de crecimiento con la subunidad 50S del ribosoma. Así, el complejo ensamblado contiene las subunidades 30S, 50S, mRNA y tRNA iniciador, y es competente para la siguiente etapa, que es la elongación.

Elongación

Una vez formado el complejo de iniciación, el crecimiento de la cadena polipeptídica se produce por la adición repetitiva de aminoácidos. La elongación involucra una serie de fenómenos repetidos, como reconocimiento, transferencia y translocación. Debe existir un suministro continuo de complejos activados aminoácido-tRNA en el mRNA (en el ribosoma).

El proceso de elongación de la cadena polipeptídica sobre el ribosoma puede considerarse como un ciclo de tres etapas.

En la primera etapa, una molécula de amino-acil tRNA se une al sitio A (véase Ribosomas) vacío del ribosoma.

En la segunda etapa, el extremo carboxilo de la cadena polipeptídica se desacopla del sitio P y se une por enlace peptídico al aminoácido unido a la molécula de tRNA que está en el sitio A. Esta reacción está catalizada por la enzima peptidiltransferasa.

En la tercera etapa, el nuevo peptidil-tRNA del sitio A se transloca al sitio P, cuando el ribosoma se desplaza a lo largo de la molécula de mRNA. Esta etapa requiere energía.

Como parte del proceso de translocación, la molécula libre de tRNA que se generó en el sitio P, durante la segunda etapa, se libera del ribosoma. Así, al completarse la etapa tres, el sitio A, que se encuentra vacío, puede aceptar una nueva molécula de tRNA unida al siguiente aminoácido, y ésta vuelve a iniciar el ciclo.

En resumen, conforme cada tRNA encuentra su triplete complementario de nucleótidos sobre el mRNA, el aminoácido que porta, se une por enlace peptídico con el aminoácido de la molécula de tRNA que le precede. La enzima peptidiltransferasa (la 23S RNA o ribozima) cataliza la formación del enlace peptídico.

Terminación

La terminación de la síntesis de una cadena peptídica se produce cuando se alcanza uno de los codones de terminación, el cual no codifica la unión con cualquier complejo aminoácido tRNA en el mRNA. No existe tRNA para los codones sin sentido.

Se conocen tres codones que detienen la síntesis de proteínas: UGA, UAG y UAA.

En el citoplasma existen proteínas denominadas *factores de liberación*, que se unen a cualquier codón de terminación que llegue al sitio A del ribosoma. Esta unión modifica la actividad de la enzima peptidiltransferasa, que se convierte en una hidrolasa y cataliza la adición a una molécula de agua, al peptidil tRNA, en lugar de un grupo amino libre de un aminoácido. Como consecuencia de esto, el extremo libre carboxilo de la cadena polipeptídica en crecimiento queda libre de su unión a una molécula de tRNA. Como normalmente la cadena polipeptídica en crecimiento se encuentra unida al ribosoma a través de esta unión, queda libre en el citoplasma. Así, el ribosoma libera el mRNA y se disocia en sus dos subunidades, las cuales podrán ensamblarse nuevamente y comenzar otro proceso de síntesis.

Los procesos de iniciación, elongación y terminación requieren moléculas con enlaces fosfato de alta energía (trifosfato de adenosina o ATP, y trifosfato de guanosina o GTP). En la iniciación se utiliza energía resultante de la hidrólisis del GTP.

REGULACION DE LA EXPRESION GENETICA

Los estudios sobre la inducción de síntesis enzimática que las bacterias realizan cuando el sustrato está presente en el medio, permitieron alcanzar los conceptos actuales sobre regulación genética. Los mecanismos que se conocen son la inducción-represión, la represión por catabolitos y la atenuación.

Inducción-represión

Jacob, Monod y col., al estudiar el sistema que controla en *E. coli* la utilización de la lactosa, aportaron la mayor parte de los conocimientos sobre cómo operan genéticamente la inducción y la represión de las enzimas.

En esta bacteria existen tres enzimas que intervienen en la fermentación de la lactosa: una β-galactosidasa, una permeasa (necesaria para la captación de la lactosa) y una acetilasa (interviene en la inducción coordinada con la β-galactosidasa y permeasa). Normalmente, *E. coli* utiliza glucosa y no lactosa, por lo que la síntesis de estas enzimas es inducible, es decir, se produce sólo en presencia de un β-galactósido en el medio de cultivo. No obstante, aparecen cepas de *E. coli* mutantes en las cuales la síntesis de estas enzimas es constitutiva, es decir, ocurren tanto en presencia como en ausencia del inductor de β-galactósido. También existen cepas *E. coli* en las cuales no se sintetizan algunas de estas enzimas por lo tanto, no pueden ser inducidas.

Un conjunto de genes adyacentes forman una unidad genética funcional llamada **operón**. El operón se localiza contiguo a otras partes del DNA que regulan la expresión de los genes estructurales. Estas partes del DNA se designan **genes promotores, operadores y reguladores**.

El operón más estudiado es el de la lactosa (operón *lac*) en *E. coli*. Este operón *lac* incluye todos los genes necesarios para el metabolismo de la lactosa, los mecanismos de control para su inactividad (en presencia de glucosa) o actividad (en presencia de galactosa o de un inductor).

El operón *lac* presenta una secuencia promotora y **genes estructurales**, como el gen Z, que codifica para la producción de la enzima β-galactosidasa (hidroliza la lactosa en galactosa y glucosa); el gen Y, que codifica para la producción de una permeasa (transporta la lactosa al interior de la célula); y el gen A, que codifica para la producción de una acetilasa, cuya función fisiológica aún no ha sido dilucidada.

Los genes estructurales del operón de la lactosa están dispuestos en orden lineal, en relación con el gen operador y el regulador.

El gen regulador se denomina *lacI*, y determina la producción de una proteína citoplasmática o represor. La acción de este represor es fijarse a un sitio específico del DNA, llamado operador (*lacO*), que controla la expresión de los genes estructurales (fig. 14-7).

La represión del operón *lac* ocurre de la siguiente manera: la transcripción comienza cuando la RNA polimerasa se une a la región promotora. El gen regulador es la primera parte transcripta de la tira con sentido de DNA. La función del gen regulador es codificar la producción continua de proteínas represoras. En ausencia de alolactosa en el medio, las proteínas represoras son libres de unirse al operador, impidiendo que la RNA polimerasa se una al operador. En síntesis, el represor *lac* ejerce un control negativo sobre la transcripción del operón *lac* al unirse al operador *lac*.

La lactosa en sí no tiene influencia en la regulación de la transcripción. La β-galactosidasa produce alolactosa, que es un isómero estructural de la lactosa. La alolactosa posee esta función y constituye el **inductor** del operón *lac*.

La ausencia de glucosa y la presencia de lactosa invierten esta represión.

En presencia del inductor, el represor se libera y se realiza la transcripción.

La capacidad del represor de fijarse al operador es lo que determina la síntesis enzimática inducible.

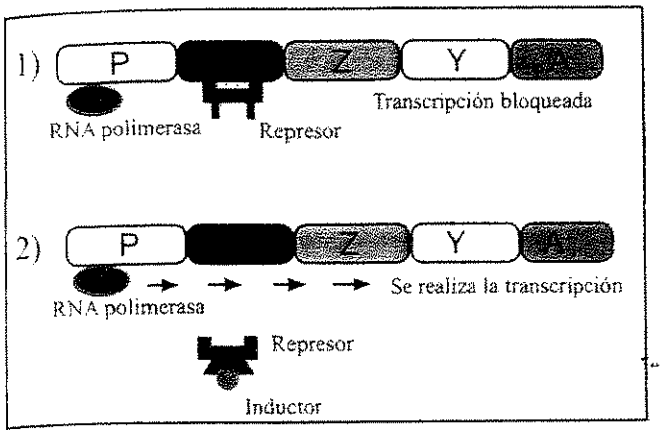


Figura 14-7. Esquema de inducción enzimática. 1) La proteína represora se une al operador (O), e impide la acción de la RNA polimerasa. 2) La unión de un inductor a la proteína represora permite la transcripción. El operón de la lactosa se transcribe en forma de mRNA, a partir del promotor (P), y se traduce a tres proteínas: β-galactosidasa (gen Z), permeasa (gen Y) y acetilasa (gen A).

El inicio de la transcripción puede tener un control tanto positivo como negativo. Los genes que están bajo control negativo se expresan en forma continua, salvo que sean desconectados por una proteína represora. Esta proteína represora se une a una secuencia específica del DNA u operador, por lo que la RNA polimerasa no puede iniciar la transcripción en el promotor.

Los genes que están bajo control positivo no son transcriptos, a menos que exista una proteína reguladora activa, denominada **apoinductor**. El apoinductor se fija a una secuencia específica del DNA y ayuda a la RNA polimerasa a iniciar la transcripción.

Todos los genes de un operón se transcriben juntos, en forma coordinada, en un solo mRNA policistrónico (con información de varios genes).

Represión por catabolitos

E. coli puede catabolizar glucosa o lactosa para obtener energía para su desarrollo. Si ambos azúcares están en el medio de cultivo, las bacterias utilizarán primero la glucosa hasta agotarla y luego la lactosa. Como se describe más arriba, las síntesis de enzimas que fermentan la lactosa son inducibles, pero también existe una regulación por represión de catabolitos.

Cuando la glucosa se está usando en presencia de lactosa, la glucosa es el catabolito que actúa como un represor sobre el operón *lac*. Cuando la glucosa del medio se agota, no hay catabolito que actúe como represor, el gen se activa y la lactosa puede inducir al operón *lac*.

La expresión completa del operón *lac* necesita de la presencia de un control positivo y mediado por proteínas. La **proteína fijadora del AMP cíclico** (PAC) se une a una secuencia del DNA, cercana al promotor del operón regulado. Esta proteína ejerce un control positivo al estimular la actividad de la RNA polimerasa, para que ésta se una al promotor y la transcripción comience.

En presencia de glucosa, la concentración intracelular de **AMP cíclico** (cAMP) es baja. La falta de cAMP impide la fijación de PAC al promotor, la RNA polimerasa tampoco se une y la transcripción no se realiza. En consecuencia, la represión por catabolitos responde a una deficiencia intracelular de cAMP.

Otro mecanismo de regulación génica ocurre en operones que controlan la síntesis de aminoácidos. El mejor estudiado es el operón del triptofano (*trp*).

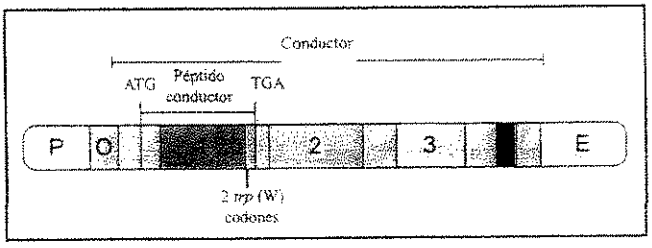


Figura 14-8. Regulación del operón del triptofano (*trp*).

El triptofano es un aminoácido esencial para la síntesis proteica, pero un exceso puede ser tóxico para la bacteria, por lo que su síntesis debe estar regulada.

El operón del triptofano (**operón *trp***) en *E. coli* contiene los genes estructurales necesarios para la biosíntesis del aminoácido. Este operón se encuentra bajo una doble regulación.

En el DNA, el aumento de triptofano intracelular activa una proteína **represora**. La unión de la proteína represora al operador impide la transcripción de los genes *trp*.

El operón se encuentra también regulado por un mecanismo de atenuación-antiterminación. La secuencia reguladora adyacente incluye tres regiones: el promotor, el operador y una región llamada secuencia líder, que es característica de las secuencias reguladoras para ***atenuación***. Dentro de la secuencia líder, en la célula, existe una región que codifica para la síntesis de un péptido rico en triptofano, llamado *péptido guía*.

El mRNA conductor posee cuatro repeticiones (1, 2, 3 y 4) que se pueden aparear de distintas formas según la disponibilidad de *trp*, lo que ocasiona una terminación precoz de la transcripción del operón *trp*, o su transcripción completa (fig. 14-8).

En presencia de una elevada concentración de triptofano en la célula y en el medio, la traducción del péptido guía, al comienzo del mRNA, favorece la formación de un asa de doble cadena en el RNA, por apareamiento de las regiones 3 y 4, con una finalización prematura de la síntesis de mRNA (fig. 14-9).

Cuando el triptofano intracelular es bajo o nulo, por atascamiento de los ribosomas en la región *1*, no puede sintetizarse el péptido guía. Pueden aparearse las regiones 2 y 3, formando una horquilla antiterminación y ocasionando la transcripción de los genes *trp*.

Lo crítico de este mecanismo es que la síntesis del péptido guía hace que la transcripción de los genes estructurales del operón *trp* se suspenda. Pero si una deficiencia de triptofano detiene la síntesis del péptido guía, el mRNA adopta una estructura que enmascara la señal de terminación, permite que la transcripción continúe en los genes estructurales y se sintetiza triptofano dentro de la célula (fig. 14-10).

También pueden aparearse las regiones 1:2 y 3:4 del mRNA conductor libre, lo cual produce una interrupción de la transcripción antes de la aparición del primer gen estructural *trpE* (fig. 14-11).

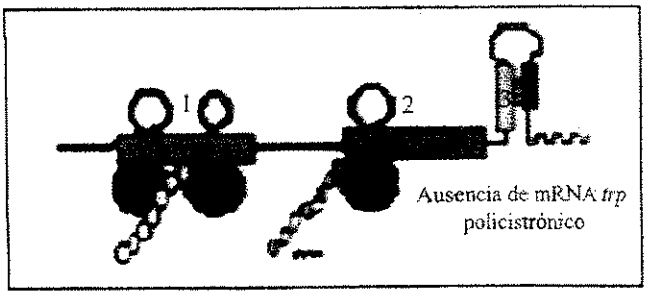


Figura 14-9. Alta concentración de *trp*.

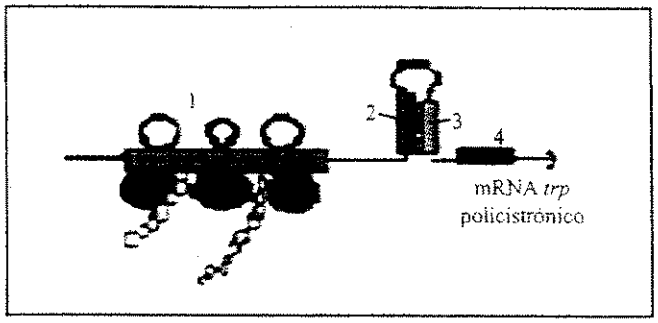


Figura 14-10. Baja concentración de *trp*.

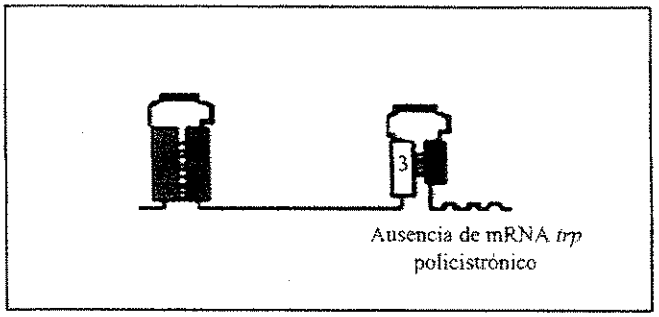


Figura 14-11. Ausencia de síntesis de proteínas.

INTERCAMBIO GENETICO ENTRE LAS BACTERIAS

El intercambio genético entre las bacterias permite la aparición de cepas bacterianas nuevas. El DNA transferido puede integrarse en el cromosoma de la célula receptora o permanecer como elemento extracromosómico (plásmido), o como un virus (bacteriófago), y transmitirse a las células hijas.

PLASMIDOS

Los **plásmidos** son moléculas circulares de DNA de doble cadena con un número variable de pares de bases (de 1500 a 400.000). Pocas eubacterias pueden poseer plásmidos lineales; por ejemplo, *Borrelia burgdorferi* es responsable en el hombre de la enfermedad de Lyme.

En los plásmidos se suelen encontrar genes que regulan funciones especializadas, sobre todo las de relación con el medio que rodea al microorganismo. Codifican diferentes factores de virulencia, como toxinas, bacteriocinas, adhesinas, y resistencia a metales pesados, entre otros. Muchos plásmidos codifican resistencia a antibióticos, pero generalmente esta información se encuentra en elementos transponibles o **transposones.**

Los plásmidos se replican en forma autónoma (razón por la cual se denominan **replicones**), independientemente del cromosoma y sin integrarse a éste. El número de copias de plásmidos producido por una bacteria es específico de cada uno de ellos. Este número de copias puede ser alto (hasta 50 copias) en plásmidos pequeños, o bajo (1 copia) en el caso de plásmidos grandes.

Algunos plásmidos grandes, como por ejemplo **el factor F de fertilidad** en *E. coli* (20-120 kb), son **episomas**, lo que indica que pueden integrarse en el cromosoma de la bacteria. Este es un ejemplo de plásmido *conjugativo,* dado que poseen los genes *tra* relacionados con la transferencia. Es así como el factor F puede mediar su propia transferencia de una célula a otra por conjugación, confiere fertilidad y posee genes que codifican para la síntesis de los *pili* sexuales (véase más adelante Conjugación). El factor F, o plásmido F, puede duplicarse en forma autónoma e integrarse al cromosoma bacteriano por recombinación de secuencias homólogas. Al integrarse al cromosoma bacteriano, se duplica junto con el resto de los genes del cromosoma en cada división celular.

Otro ejemplo de plásmido grande es el plásmido R (80 kb), compuesto por el factor de transferencia de resistencia (FTR) y uno o varios determinantes R (que codifican la información necesaria para la resistencia a distintos antimicrobianos). El componente FTR contiene la información para la transferencia de los plásmidos entre bacterias, siendo similar en diferentes especies bacterianas, mientras que existe una gran variedad de determinantes R (cada uno es específico para la resistencia a un antimicrobiano).

Existen *plásmidos no conjugativos*, como por ejemplo, el plásmido que codifica para la síntesis de colicinas en *E. coli*. A diferencia de los plásmidos F y R, estos plásmidos no son transmisibles a otras células, salvo que se integren a algún plásmido conjugativo (F y R), que son los que les confieren a las bacterias la capacidad para establecer la conjugación.

Otros plásmidos pueden transferirse por transformación o por transducción. Existen plásmidos que no se transmiten jamás.

Los *plásmidos crípticos* son aquellos a los que no se les ha podido adjudicar una función.

Los *cósmidos* **son plásmidos que pueden** aceptar grandes segmentos de DNA de hasta 45 kb. Son utilizados como vectores de clonación, al actuar como vehículos del DNA pasajero.

Los cósmidos son híbridos, pues combinan propiedades de los plásmidos y del bacteriófago λ.

La mayoría de los plásmidos de las bacterias gramnegativas se replican de manera similar a la del cromosoma bacteriano. La replicación se inicia en un origen, continúa la replicación bidireccional y completa el círculo.

Algunos plásmidos pueden tener una replicación unidireccional.

Los plásmidos de las bacterias grampositivas tienen un sistema denominado plásmido rodante. Se forma un intermediario, un DNA monocatenario, y por el pequeño tamaño del DNA plasmídico, la replicación se produce muy rápidamente (en menos de la décima parte del ciclo de la división celular).

BACTERIOFAGOS

Los **bacteriófagos** son virus bacterianos. Pueden poseer DNA, simple o doble, o RNA simple, rodeados por una capa proteica. El genoma de los bacteriófagos es un replicón único, pues contiene la información genética necesaria para su propia replicación.

Los bacteriófagos infectan células y se replican hasta un número elevado que ocasiona la lisis de la bacteria (**infección lítica**) o se integran en el genoma del hospedador (profagos) sin producir la muerte bacteriana (**bacteria lisogénica**). Algunos fagos lisogénicos son portadores de genes que codifican para la producción de toxinas; por ejemplo, el corinéfago b es portador de la toxina diftérica, la toxina eritrogénica, producida por *Streptococcus pyogenes*, y la toxina botulínica, producida por cepas lisogénicas de *Clostridium botulinum*, son codificadas por profagos.

Los profagos contienen los genes para el ciclo lítico y la expresión de ellos se encuentra reprimida mientras conservan ese estado. Existen diversos factores que estimulan la desrepresión. Algunos son externos, como la luz ultravioleta, y otros son internos, como el aumento de la tasa de reproducción de la célula hospedadora.

TRANSPOSONES

Los **transposones** (Tn) son elementos genéticos móviles que pueden transferir el DNA de una posición a otra dentro de un mismo genoma o entre distintas moléculas de DNA (pueden "saltar" de un plásmido a otro, de un plásmido al cromosoma bacteriano y viceversa). Al conducirse de esta manera, los transposones crean mutaciones por inserción.

La importancia de los Tn reside en que algunos codifican factores de virulencia y resistencia a antimicrobianos.

Los transposones más simples son los elementos de **secuencias de inserción** (IS). La mayoría de los elementos IS contienen entre 700 y 1500 pares de bases de DNA bicatenario. Los genomas de las bacterias pueden poseer varios elementos de IS. Estos elementos se caracterizan por portar un solo gen, que codifica para la expresión de la enzima *transposasa*, la cual promueve su propia transposición

Las IS presentan secuencias de nucleótidos (repeticiones de 15-40 pares de bases complementarios) invertidas en sus extremos. En realidad son dos copias de un elemento de IS que rodean algún gen o genes auxiliares.

Las secuencias de inserción, o elementos de IS, se descubrieron como segmentos de DNA que tenían la propiedad de inactivar el operón *gal* de *E. coli*.

Los **Tn complejos** llevan un carácter asociado para funciones especializadas, como resistencia a antibióticos, y están flanqueados por secuencias de inserción. Tienen un tamaño que varía entre 2000 y 40.000 pb. El Tn*10* es un elemento con 9300 pb, compuesto por dos copias de IS*10* que encierran un gen para la resistencia a la tetraciclina.

La mayor parte de estos Tn están contenidos en plásmidos que pueden ser pasados entre especies de bacterias, por lo que se permite una rápida diseminación de la resistencia.

Los **transposones tipo A** no poseen elementos de IS repetidos en los extremos y tienen secuencias terminales, cortas, invertidas y repetidas. Estos Tn, además de portar genes auxiliares, codifican dos enzimas implicadas en la transposición, una *transposasa* y una *resolvasa*, que cataliza la resolución de replicones fusionados. Esta clase está presente en el Tn*3*, un Tn de 4700 pb, que transporta un gen betalactamasa.

Los Tn tienen importancia en la mutagénesis, pues al insertarse dentro de un gen, lo inactivan (interrumpen la continuidad del código genético).

Los Tn, a diferencia de los plásmidos y bacteriófagos, no poseen la información genética necesaria para su propia replicación.

INTEGRONES

Los integrones son un grupo de elementos genéticos móviles, capaces de integrar y expresar preferentemente genes de resistencia a antibióticos. Es un sistema de recombinación sitio-específica, que contiene una enzima integrasa y un sitio específico de captura o de acumulación de uno o varios genes de resistencia. Los genes capturados se presentan como *casetes genéticos* móviles.

Los integrones se asocian al cromosoma o a plásmidos y transposones que sirven como vehículos, para su transmisión intra o interespecie. No pueden realizar autotransposición. Los que forman parte de un transposón pueden transponerse desde el cromosoma hacia los plásmidos y viceversa, mientras que los plásmidos conjugativos pueden transferirse de una bacteria a otra de la misma o de diferente especie.

Estructura básica de un integrón

La mayoría de los integrones de clase 1 (los más estudiados) básicamente poseen tres regiones: un extremo altamente conservado 5' (5'CS), que contiene el gen *intI* que codifica para una integrasa; un extremo altamente conservado 3' (3'CS), en el que se encuentran genes de resistencia a compuestos de amonio cuaternarios, sulfonamidas, y entre los extremos 5'CS y 3'CS se encuentra la región variable, con presencia o ausencia de casetes genéticos de resistencia a antibióticos (fig. 14-12).

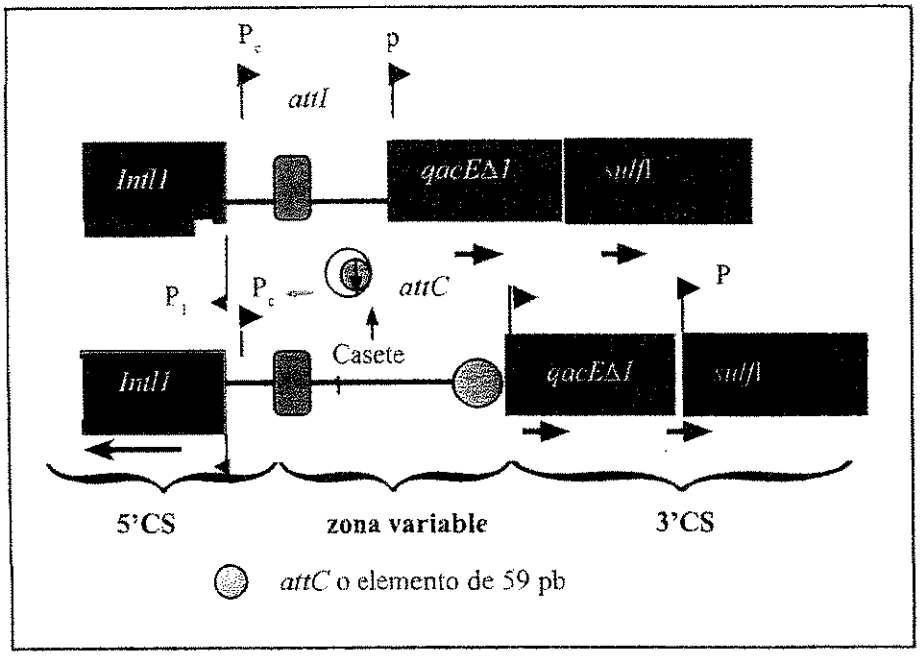


Figura 14-12. Esquema de la estructura de un integrón "clásico". La caja roja corresponde al extremo altamente conservado 5'CS, *IntI1*: gen que codifica la integrasa. Las cajas verdes corresponden al extremo altamente conservado 3'CS: la verde clara con los determinantes de resistencia a sulfamidas *sulI*; y la verde oscura con los determinantes de resistencia, a los compuestos de amonio cuaternario, designado como *qacEΔ1*. La caja lila, *attI*, corresponde al sitio de recombinación del integrón en el cual los casetes son integrados (pueden ser integrados de uno a cuatro casetes de resistencia). P_1: promotor que transcribe la integrasa. P_c: promotor que dirige la transcripción de los casetes integrados. Círculo naranja: *attC*: sitio de recombinación del casete genético.

La integrasa

La integrasa forma parte de una familia de enzimas cuyo prototipo es la integrasa del bacteriófago λ, que actualmente se denominan tirosina-recombinasas.

Existen varias familias de integrones de clase 1, 2, 3 y 4, definidas según la secuencia de nucleótidos del gen *intI* que codifica para la enzima integrasa. Al menos tres clases están relacionadas con la expresión de genes de resistencia. Los integrones de clase 1 y 2 se encuentran en plásmidos y transposones; los de clase 3, sólo en plásmidos, y los de clase 4 son los "superintegrones", hallados en *Vibrio cholerae*.

Estructura genética

La actividad de un integrón requiere:

Gen *intI*: codifica una proteína con actividad recombinasa específica de sitio (Int1), la integrasa.

Sitio *attI*: adyacente al *intI*, es el sitio de recombinación específica de sitio, en el que se integra el *casete genético* de resistencia.

La enzima integrasa media la recombinación entre un sitio de recombinación primaria (*attI*) y una secuencia blanco denominada sitio *attC* (o elemento 59 pb).

Entre *intI* y *attI* se encuentran dos promotores divergentes: P_1, promotor para la expresión *intII* (transcribe la integrasa), y P_c (común), promotor para la expresión de los casetes genéticos (dirige la transcripción de los casetes integrados). Hasta el momento no se han encontrado casetes con promotores propios.

Casetes genéticos: son círculos covalentemente cerrados, independientes, no replicativos, que contienen sólo un marco de lectura abierta completo *orf* o gen de resistencia. A continuación del *orf*, se encuentra un sitio de recombinación específica, el elemento 59 pb, localizado en el extremo 3'del gen. Los casetes genéticos no codifican enzimas u otros productos involucrados en su propia movilización.

La transcripción de los casetes integrados, *attC* o 59 pb, se lleva a cabo desde un promotor localizado en 5'CS. Pequeñas variaciones nucleotídicas en éste afectan la fuerza de transcripción del promotor, llegando a niveles tan bajos de expresión que la bacteria aparece fenotípicamente sensible, aunque es, en potencia, resistente por la presencia del gen que codifica resistencia.

Los integrones han sido detectados en bacilos gramnegativos fermentadores, como las enterobacterias y los vibrios, y algunos no fermentadores, como las pseudomonas y acinetobacterias. También se han descrito en grampositivos e incluso en *Mycobacterium fortuitum*.

El nivel de resistencia a un determinado antibiótico, codificado por un casete de resistencia, depende de la posición en el integrón. Cuanto más cerca está del P_c, las bacterias presentan niveles más elevados de resistencia, y disminuyen a medida que los genes se encuentren en casetes posteriores, río abajo del promotor.

MECANISMOS DE TRANSFERENCIA GENETICA

Los mecanismos principales de intercambio genético en las procariotas se diferencian por las formas en que se dona el DNA; ellos son: a) **conjugación**, que consiste en la transferencia unidireccional de material genético entre dos bacterias (una donante o célula macho y otra receptora o célula hembra) a través del *pili* sexual, b) **transformación**, cuando la bacteria incorpora fragmentos de DNA desnudo a partir del medio que la rodea, y c) **transducción**, cuando la incorporación de material genético ocurre por medio de un bacteriófago.

Conjugación

La conjugación bacteriana es un proceso de transferencia de genes que implica:

- Apareamiento celular (contacto mediado por el *pili* sexual);
- Transferencia unidireccional del DNA;
- Recombinación entre el fragmento donador y el DNA receptor;
- Expresión de un nuevo fenotipo en la célula receptora.

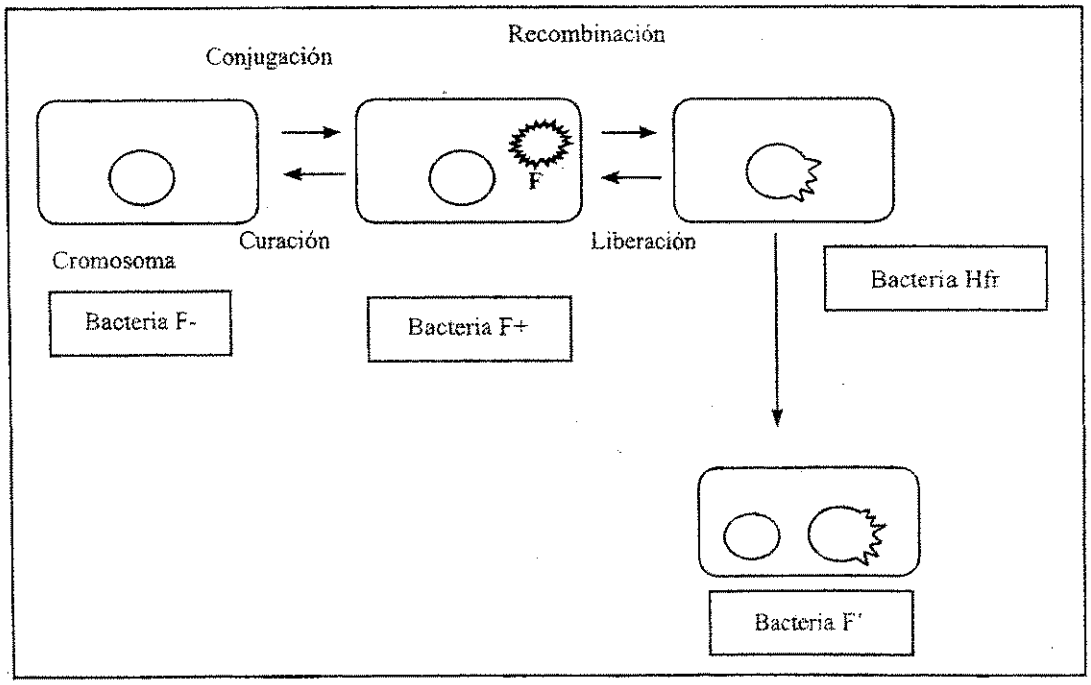


Figura 14-13. Esquema del intercambio genético entre bacterias F-, F+, Hfr y F'.

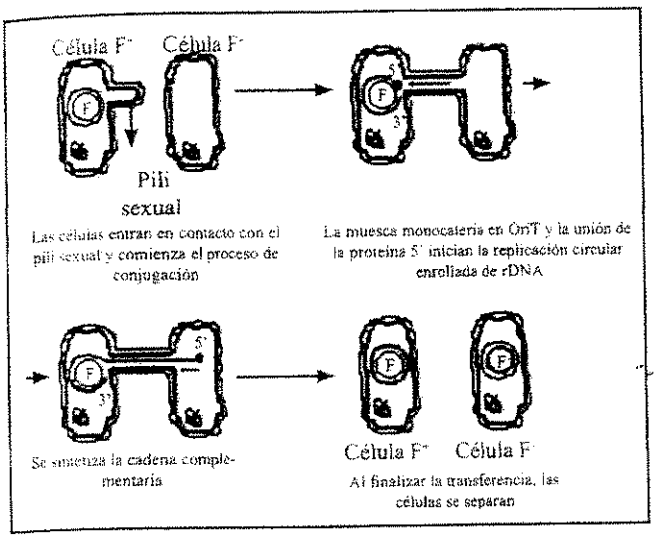


Figura 14-14. Esquema de transferencia del plásmido F por conjugación.

La capacidad de las células para actuar como donantes se debe a la presencia del **factor F** o factor de fertilidad (células macho). Las células que carecen del factor F (F- o células hembras) son receptoras.

El estudio genético ha experimentado un gran avance debido a la investigación de los **factores de fertilidad o factor F** de *E. coli*.

El factor F es una molécula de DNA de doble cadena, que posee todos los genes involucrados para: a) su propia transferencia, b) la síntesis de *pili* sexual, y c) el inicio de la síntesis de DNA en el "origen de la duplicación de transferencia" (*ori*T).

El factor F puede presentarse como un plásmido de replicación autónoma, como parte integral del cromosoma, o como un plásmido con fragmentos pequeños del DNA cromosómico.

La terminología utilizada en las células que poseen el factor F en cada una de estas presentaciones es: F+, Hfr y F', respectivamente.

En síntesis, el factor F se transfiere a sí mismo, convirtiendo a la célula receptora en F+; se integra en diferentes lugares del cromosoma bacteriano y genera una célula Hfr (alta frecuencia de recombinación), y transporta el fragmento del DNA cromosómico, convirtiendo a la célula receptora en F' macho (fig. 14-13).

En la transferencia del material genético, la función del *pili* sexual F sería la de unir células masculinas (F+, Hfr y F') y femeninas (F-), formando parejas. Al producirse el apareamiento, el *pili* se retrae rápidamente y promueve la formación de contactos pared a pared, a través de los cuales se realiza la transferencia del DNA.

Cuando se desencadena el mecanismo de transferencia, comienza la replicación del factor F. La movilización comienza con la formación de una muesca por la acción de una proteína (endonucleasa) en una de las cadenas del DNA del factor F, en el *ori*T. La cadena de DNA 5' terminal desplazada se dirige hacia la célula receptora. La transferencia del DNA se realiza como una molécula con una sola cadena. En la célula receptora, se sintetiza la cadena complementaria de la cadena única de DNA, y al completarse la transferencia y la duplicación del factor F, se produce la circularización.

En la célula donadora, se produce la replicación circular continuada del DNA y se recupera su forma (círculo rodante). Esto explica por qué la célula masculina sigue siendo F+ después de la transferencia (fig. 14-14).

Una característica importante del plásmido F o factor F es su capacidad para integrarse en diferentes lugares del cromosoma bacteriano. La integración del plásmido F en el cromosoma, por un proceso de recombinación, implica la ruptura y la nueva unión del DNA. Una vez integrado, forma una unidad de réplica en la célula vegetativa, generando en una división celular normal, una célula Hfr. Estas células expresan los genes implicados en la movilización y la transferencia.

La transferencia mediada por el factor F del cromosoma Hfr se inicia por un corte en el *ori*T. Recordando la capacidad del factor F para integrarse en el cromosoma, la transferencia de la secuencia F inicial es seguida por secuencias cromosómicas contiguas. Durante la transferencia, el cromosoma de la célula donante suele romperse espontáneamente y al azar. Por lo tanto, la frecuencia con que un gen es heredado por los recombinantes, disminuye exponencialmente cuando aumenta su distancia (la del gen) con respecto al origen de transferencia.

Los recombinantes que se producen por el apareamiento entre Hfr y F- suelen permanecer F- (pues sólo se transfiere una parte del factor F). Cuando se transfiere todo el cromosoma Hfr, con la secuencia F distal que presenta los genes relacionados con la transferencia, se convierten en F+.

La interrupción experimental del acoplamiento entre una célula Hfr y una célula F- ha resultado útil para elaborar un mapa del DNA cromosómico de *E. coli*.

La velocidad de transferencia de genes de las células Hfr es constante. Esta característica permite medir la distancia entre los diferentes *loci*, por el tiempo que requiera la célula para transmitirlos por conjugación. Se toma como "tiempo cero" el momento en que se detecta la transferencia del primer gen en la cepa estudiada.

La conjugación F' se produce cuando el plásmido F se separa del cromosoma Hfr en el que está insertado. Durante la escisión, el plásmido F arrastra secuencias del material cromosómico, y se convierte en un plásmido F' (se regenera un factor sexual que contiene en su estructura circular un segmento del cromosoma bacteriano). La célula en la cual se produce este tipo de separación de F se denomina F', y el factor sexual compuesto, F' o *merocigote*.

La conjugación entre las células primarias F' x F- es similar al cruzamiento entre F+ x F-, con la diferencia de que los genes que lleva el plásmido F' son transferidos y pueden expresarse sin la necesidad de incorporarse al cromosoma del receptor. En este caso, el cruzamiento genera células *F' secundarias* y constituye un *merocigote diploide parcial*, con respecto a los genes presentes en el plásmido F' y en el cromosoma de la célula receptora.

En las células F' primarias se conserva la constitución genética haploide; en cambio, en las células F' secundarias, los genes cromosómicos del plásmido F' son duplicados también desde los alelos que existen en el cromosoma bacteriano.

La transferencia mediada por células F' se denomina también *sexducción*.

Conjugación en bacterias grampositivas

Se han demostrado plásmidos conjugados en bacterias grampositivas, como *Streptococcus* spp, *Streptomyces* spp y *Clostridium* spp. La transferencia se produce por la presencia de una molécula de adhesina en la superficie de la célula donante.

Transformación

Consiste en la incorporación directa de fragmentos de DNA exógenos.

Posterior a la incorporación, se produce la recombinación del fragmento de DNA con la región homóloga del cromosoma bacteriano.

Cuando una célula es capaz de tomar una molécula o un fragmento de DNA y transformarse, se denomina **célula competente**.

Sólo algunas cepas poseen esta característica y parece ser una propiedad hereditaria del microorganismo.

Como proceso natural es poco común, pero es posible inducir a ciertas bacterias hacia un estado competente, por ejemplo, sometiéndolas a un campo eléctrico pulsante (*electroporación*), por tratamiento con concentraciones elevadas de iones calcio o por temperaturas de choque (congelamiento a -70 °C y descongelamiento a 37 °C).

El DNA transformante puede ser de origen bacteriano, viral o plasmídico.

Este DNA penetra en la célula competente a través de receptores proteicos presentes en la superficie celular. La longitud de los fragmentos que puede penetrar varía entre 7 y 20 kb.

En las bacterias grampositivas, la recombinación se realiza con una sola de las cadenas del DNA que es transformante homóloga. La otra cadena, en la superficie celular, es digerida por endonucleasas. La cadena que penetra en el citoplasma se alinea con la secuencia complementaria de bases de una de las cadenas del DNA de la célula receptora, sustituyendo a la región homóloga del cromosoma. Una vez integrado se forma un heterodúplex (las dos cadenas son distintas). Luego de la replicación de este DNA híbrido, uno de los cromosomas adquiere la configuración original y el otro, los genes transformados. Este último, luego de la división celular da lugar a una célula transformada.

En bacterias gramnegativas, penetran ambas cadenas, de las cuales una sola se integra al cromosoma bacteriano, formando también un heterodúplex.

El tamaño del DNA transformante integrado varía entre 2 y 5 kb.

El DNA transformante antes de recombinarse puede ser digerido por *enzimas de restricción*.

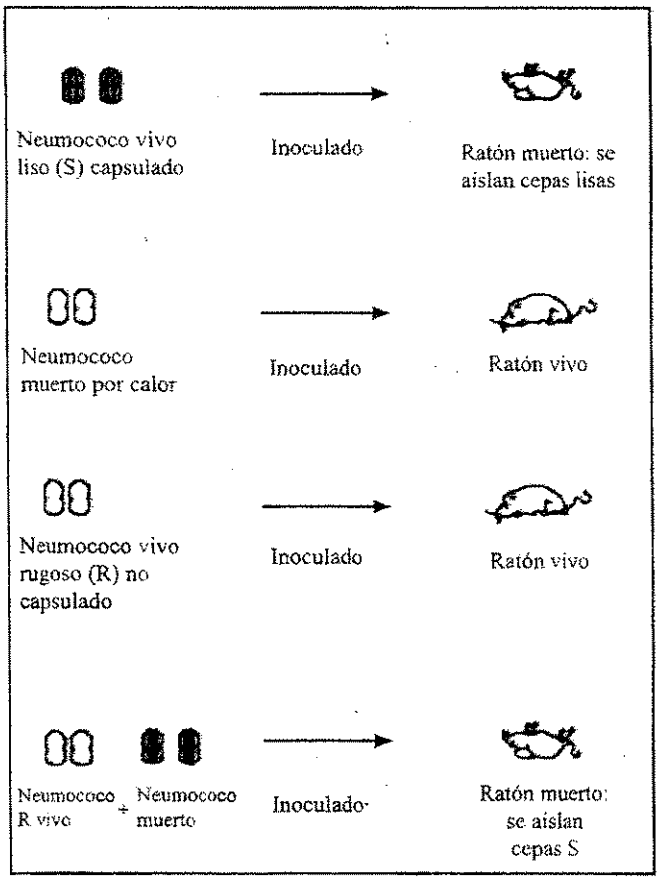


Figura 14-15. Experimento de Griffith.

Cuando el DNA transformante es de origen plasmídico, debe presentar la forma circular covalentemente cerrada. Una vez en el interior de la célula, el DNA plasmídico puede replicarse en forma autónoma, integrarse en el cromosoma de la bacteria o recombinarse con el DNA de otro plásmido.

Cuando el DNA transformante es de origen viral, el proceso se denomina ***transfección***. Cuando el DNA viral penetra en la célula receptora, puede quedar incorporado en el genoma bacteriano en estado de profago, producir el ciclo lítico o ser degradado por enzimas de restricción.

Las células competentes poseen altas concentraciones de *autolisinas* que dejan al descubierto receptores de DNA transformante.

La transformación puede ser inhibida por la DNAsa. Esta sensibilidad del DNA permite diferenciar la transformación de otros mecanismos de transferencia de genes.

Transformación en la naturaleza

Frederick Griffith, en 1928 (Inglaterra), analizando factores implicados con la patogenicidad de los neumococos en ratones, descubrió este fenómeno.

La virulencia de los neumococos está relacionada con la capacidad de producir cápsula. Si se inoculan cepas capsuladas a un ratón, se produce la muerte en pocos días. Pueden aislarse mutantes no capsuladas, estas cepas no son patógenas, por lo que, al inocularlas a un ratón, no producen enfermedad.

Griffith observó que:

- Al inocular neumococos capsulados vivos, los ratones morían,
- Al inocular mutantes no capsulados vivos, los ratones no morían.

Posteriormente, al inocular células vivas de neumococos no capsulados mezclados con neumococos capsulados, pero muertos por calor, muchos ratones morían. De estos ratones muertos, recuperaba neumococos capsulados (fig. 14-15).

Griffith no llegó a comprender cuál era el elemento que transformaba a las bacterias. Avery, McLeod y McCarty, quince años después de los estudios de Griffith, identificaron el DNA como el elemento clave del mecanismo de transformación.

La transformación en ratones también se ha demostrado con la resistencia a antibióticos. Si se inoculan dos cepas, una resistente a penicilina y otra resistente a estreptomicina, pueden aislarse de los ratones cepas resistentes frente a ambos antibióticos.

Transducción

Es la recombinación genética mediada por fagos. Cuando un fago infecta una bacteria, capta fragmentos del genoma de la célula hospedadora y los almacena en el interior de las partículas víricas. Al lisar e infectar otra célula hospedadora, el fago transductor puede transferir no sólo sus propios genes sino también genes de la célula hospedadora de la cual procede.

Los *fagos virulentos* siempre inician un ciclo lítico, con producción de nuevas partículas virales que se liberan por lisis celular.

Los *fagos atenuados* pueden expresar o no el DNA en la célula hospedadora. Si lo expresan, existe una respuesta lítica. Si no lo expresan, por un fago represor específico, aquél queda en estado de profago, esté o no integrado en el genoma bacteriano. La célula bacteriana es lisogénica y adquiere inmunidad contra fagos homólogos por la presencia del represor. El represor o proteína de inmunidad impide la transcripción de los genes responsables de la infección lítica.

Es importante destacar que en un cultivo bacteriano lisogénico, una pequeña cantidad de células (0,1% a 0,0001%) producen virus y se lisan.

El mecanismo de transducción fue descubierto por Zinder y Lederberg (1952). Estudiando la recombinación genética entre diferentes cepas de *Salmonella typhimurium*, observaron que al separar dos poblaciones bacterianas diferentes, mediante filtros con un tamaño de poros que permitían el paso de agentes filtrantes, pero que impedían que el intercambio se produjera por contacto directo de las bacterias (*conjugación*), *se producía la recombinación*. Este proceso no era inhibido por la acción de DNAsa.

De los resultados de las observaciones realizadas en tubos en U (fig. 14-16), demostraron que algunas de las cepas de *Salmonella* **LA-22**, presente en una de las ramas del tubo, contenían un profago **P22**. Este fago, luego de ser liberado por lisis espontánea de una célula *Salmonella* LA-22, durante el crecimiento en un medio de cultivo determinado, atravesaba el filtro, infectaba y lisaban cepas sensibles de *Salmonella* **LA-2**, presentes en la otra rama del tubo en U y en el mismo medio de cultivo. En el proceso de lisis de esta nueva cepa LA-2, algunos fagos almacenaban fragmentos de DNA bacteriano en el interior de su cápside. Muchos de estos fagos (portadores de genes bacterianos obtenidos de las cepas LA-2 lisadas), al pasar en sentido retrógrado a través del filtro, eran adsorbidos por cepas LA-22, y de ese modo se transfería la información genética.

Existen fagos transductores en distintas bacterias, como, entre otras, *Bacillus, Staphylococcus, Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli*.

Está demostrado que la transducción es un mecanismo de recombinación de DNA producido por virus y no un mecanismo de conjugación o transformación porque:

1) La transducción no requiere contacto célula a célula (célula donante–célula receptora) como en la conjugación;
2) La capacidad transductora de los lisados celulares no es inhibida por DNAsa, por lo que se descarta que la recombinación sea por transformación;
3) La transducción se produce siempre que las células poseen receptores específicos para el virus en cuestión;
4) El agente transductor puede purificarse mediante métodos utilizados para purificar partículas virales;
5) La neutralización viral con antisueros específicos impide la transducción.

La transducción puede ser:

- *Generalizada*, si la selección de secuencias del genoma de la bacteria es aleatoria. Esta selección al azar ocurre por un almacenamiento accidental de DNA de la célula hospedadora en el interior de la cápside del fago;
- *Especializada*, si los fagos transfieren genes específicos (generalmente los adyacentes a sus lugares de integración en el genoma bacteriano).

En la transducción generalizada, al ocurrir la infección lítica del fago, el DNA bacteriano se rompe en pequeños fragmentos, quedando algunos de ellos incorporados dentro de las partículas víricas. Luego de la lisis celular, estas partículas son liberadas en el medio, junto con partículas víricas normales, y se puede iniciar la infección de otras células. Las partículas víricas transductoras inoculan a la bacteria de DNA bacteriano y poco o nada de DNA vírico. El DNA transducido puede permanecer en el citoplasma en estado libre o recombinarse con la región homóloga del cromosoma bacteriano.

Cuando el DNA no se inserta en el DNA de la célula receptora, se produce una *transducción abortiva*. En la división celular, sólo una de las células hijas conserva el fragmento libre.

Si el DNA se recombina en la región homóloga del cromosoma de la célula receptora, los genes transducidos se replican con el cromosoma y pasan a todas las células hijas, constituyendo una *transducción completa*.

En la transducción *especializada*, el genoma del fago queda integrado en el DNA del hospedador en un lugar específico. Un ejemplo es lo que ocurre en *E. coli* con el fago *lambda* (λ). Los genes que el fago transduce son los de la galactosa (*gal*) y la biotina (*bio*). La integración del fago λ en el cromosoma de *E. coli* se produce siempre en el mismo sitio (una región de 15 nucleótidos presentes en el fago λ, con una región homóloga franqueada por los genes *gal* y *bio*, presentes en el cromosoma de *E. coli*). Al separarse el DNA viral del cromosoma bacteriano, habitualmente puede llevarse uno o los dos genes que tiene a su lado (*fagos defectivos*). Al ocurrir la lisis bacteriana (los fagos portan parte de la información genética de la célula hospedadora), inician la infección de otras células y transmiten la información a otras bacterias. En la nueva bacteria, el cromosoma vírico defectuoso se integra en el cromosoma bacteriano y se replica con él. Si la bacteria receptora es *gal– bio* –, o ambos, por lo que es incapaz de utilizar la galactosa o de sintetizar biotina, puede transformarse en *gal* + *bio* +, o en ambos. Estas recombinaciones se expresan por cambios en el fenotipo; por ejemplo: si una bacteria era galactosa negativa, se hace galactosa positiva y lleva en su DNA el fago λ defectivo.

El fago temperado λ de *E. coli* es el mejor caracterizado. Se han identificado los genes que gobiernan la respuesta lítica o lisogénica a la infección. También se han investigado en detalle las complejas interacciones del fago λ.

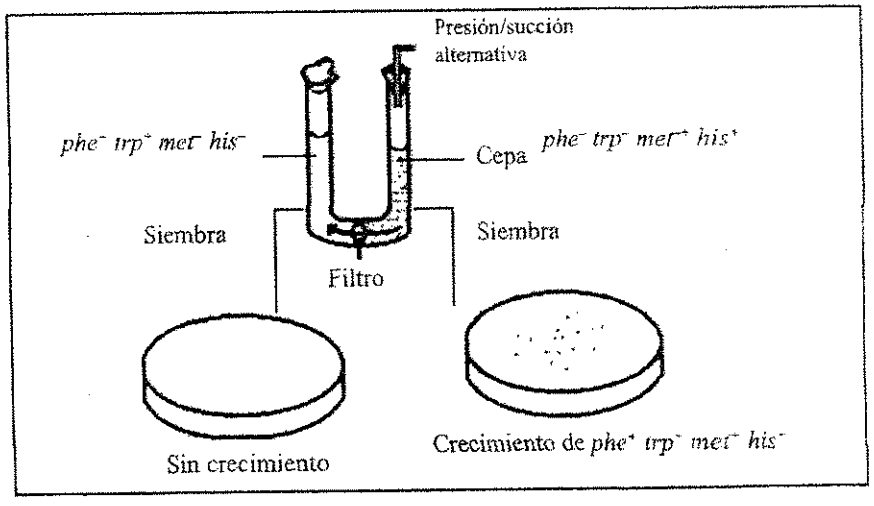


Figura 14-16. Experimento de Lederberg-Zinder con dos cepas de *Salmonella*.

Conversión fágica

La conversión fágica es un cambio genético aportado por medio de la lisogenización por un fago atenuado. Es un mecanismo similar a la transducción especializada. Ocurre cuando un fago atenuado normal (no defectivo) lisogeniza una bacteria y su DNA queda en estado de profago. Un ejemplo es el caso de la conversión de cepas de *Corynebacterium diphtheriae* no productoras de toxina diftérica en cepas productoras de toxina, y por lo tanto, patógenas, mediante la lisogenización por el fago β.

MUTACION

Las mutaciones son cambios heredables de la secuencia de bases del DNA; pueden ser sustituciones, supresiones, inserciones y reordenamiento de bases; pueden ser espontáneas o inducidas.

Tipos de mutación

La clasificación molecular permite la comprensión del mecanismo de la mutación.

Las mutaciones por **deleción** e **inserción** pueden alterar la secuencia de bases en cualquier número de pares de bases e introducir alteraciones importantes en el genoma. Estas supresiones e inserciones, en general, son causadas por mecanismos de transposición. Las mutaciones que cambian una base por otra se subdividen en **transiciones y transversiones**. Si se considera una de las cadenas de la hélice, una mutación por transición cambia una purina por la otra (adenina ◄► guanina) o una pirimidina por la otra (timina ◄► citosina). Por el contrario, una transversión interconvierte una purina por una pirimidina.

Consecuencias funcionales de la mutación

Mutación por cambio de sentido: es cuando cambia un codón para un aminoácido, por otro. Estas mutaciones son transiciones o transversiones en la secuencia del DNA.

La mayoría de las mutaciones son **puntuales,** pues se producen por el cambio en una sola base.

Las *mutaciones silenciosas* son mutaciones puntuales, que no provocan un cambio en el fenotipo de las bacterias. No se produce cambio en los aminoácidos transportados para la síntesis proteica. Estas mutaciones sólo pueden detectarse secuenciando el gen. Esto ocurre porque un aminoácido puede ser codificado por más de un codón.

La *mutación de sentido equivocado* es la que ocurre por la inserción en la proteína de un aminoácido diferente. Si el nuevo aminoácido posee propiedades similares (por ej., valina que sustituye a una alanina), puede tratarse de una **mutación conservadora**.

Esta mutación se expresa en la estructura de la proteína, y puede o no afectar su función; depende del tipo y del lugar en el que se encuentre el aminoácido sustituido.

La *mutación sin sentido* es cuando un codón que codifica para un aminoácido es sustituido por un codón de interrupción (por ej., TAG o timidina-adenina-guanina), lo cual hace que el ribosoma pierda el mRNA, con la interrupción prematura de la síntesis proteica. Se origina un péptido más corto, que en la mayoría de los casos no es viable.

Las mutaciones por supresión o deleción pueden alterar drásticamente la secuencia de aminoácidos de los productos génicos. La expresión exacta de las secuencias del DNA depende de la transducción ordenada de los tripletes de nucleótidos en los codones. Por lo tanto, una pequeña deleción o inserción que no ocurra en múltiplo de tres conduce a una **mutación por cambio de estructura**; se produce un desplazamiento del marco de lectura y las tres bases siguientes se leen como un codón sin sentido. Como consecuencia de esta mutación, el péptido codificado es más corto y carece de sentido.

Las **mutaciones nulas** ocurren por la inserción o deleción de segmentos más largos de DNA. Se destruye por completo la función del gen.

Mutaciones espontáneas

Las mutaciones espontáneas ocurren naturalmente, sin la influencia de una condición selectiva. La probabilidad de este tipo de mutaciones es muy baja, varía entre 10^{-7} y 10^{-12} por bacteria. Se pueden producir por errores de replicación o sustitución, o como consecuencia del apareamiento erróneo entre bases complementarias durante la replicación. En *E. coli*, esto sucede 1 por cada 10^{10} veces que se incorpora un nucleótido a una base. Para evitar estas mutaciones, existen enzimas de **reparación** del apareamiento equivocado, un mecanismo que lee y corrige una cadena recién sintetizada, para asegurar que se complementa con su plantilla. Es la actividad de las polimerasas bacterianas, que poseen función de síntesis y de exonucleasa. Pero, a veces, los errores al azar del sistema de la DNA polimerasa durante la replicación del DNA no llegan a ser reparados por la actividad exonucleasa, dando lugar a la aparición de mutaciones permanentes.

Un desplazamiento en el marco de lectura también puede generar una mutación espontánea. En este caso se produce una deleción en un segmento del DNA, que da lugar a la formación de nuevos codones.

Mutaciones inducidas

Si bien en la naturaleza ocurren mutaciones en forma espontánea, muchas mutaciones pueden ser inducidas por la acción de agentes físicos o químicos.

Agentes físicos: luz ultravioleta (UV): la acción sobre el DNA produce, al enlazar bases de timina vecinas, dímeros de pirimidinas, causando errores manifiestos en el DNA.

Los daños causados sobre el DNA por irradiación con UV pueden ser parcialmente reparables por un proceso de *fotorreactivación*. Si se irradia una suspensión de bacterias con una dosis alta de UV, un alto porcentaje de células sufre daño letal (*mutaciones letales*); si inmediatamente se incuban en la oscuridad, sólo un ínfimo porcentaje de las bacterias forma colonias. Si luego del tratamiento con UV, se irradian las células brevemente con luz azul del espectro visible, se restaura el daño (véase Mecanismos de reparación del DNA).

Existe otro mecanismo de reparación de los daños producidos en las células por la UV, que es por escisión (véase Mecanismos de reparación del DNA).

Las radiaciones ionizantes (por ej., rayos X) poseen mayor penetración que la radiación UV, y producen radicales libres de hidroxilo hiperreactivos, responsables de la abertura de un anillo de una base, o fracturas monocatenarias o bicatenarias en el DNA. Esto puede ocasionar mutaciones por deleción y reordenamiento.

El calor produce desaminación de los nucleótidos.

Agentes químicos: estos agentes mutagénicos pueden agruparse en tres clases:

1) *Los análogos de las bases de nucleótidos*. Son moléculas que se incorporan en la replicación del DNA, ocasionando apareamientos erróneos o alteraciones en la replicación

del DNA. El 5-bromouracilo es un análogo de la timina y forma par con la adenina, incorporándose en el DNA. Posteriormente, una recolocación de la molécula hace que el 5-bromouracilo se fije a la guanina en lugar de la adenina, y así un par de bases T-A se convierte en G-C.

2) *Los que actúan por intercalación entre los pares de bases del DNA.* Los colorantes de acridina (naranja de acridina, bromuro de etidio, proflavina) producen mutaciones por corrimiento del marco de lectura, donde hay introducción o remoción de un solo par de bases del DNA, producidas por un deslizamiento pequeño de las cadenas del DNA. Los colorantes, al intercalarse entre las bases, aumentan el espacio existente entre los sucesivos pares de bases, destruyendo el esqueleto normal de tipo azúcar-fosfato y disminuyendo el grado de inclinación de la hélice. Estos cambios generan errores en la replicación del DNA.

3) *Los que causan modificaciones covalentes en el DNA.* Los agentes alquilantes como sulfonato de etilmetano y nitrosoguanidina se conocen como los agentes mutágenos más activos. Los nitrógenos y el oxígeno se pueden alquilar. La mutagénesis se relaciona con una modificación de la guanina, que se puede aparear por error con la timina.

El ácido nitroso y la hidroxilamina producen desaminación del DNA. Generalmente desaminan citosina a uracilo, lo que puede dar lugar a una transición CG a TA.

MECANISMOS DE REPARACION DEL DNA

Las bacterias han desarrollado diferentes mecanismos de reparación para minimizar los errores de replicación. Estos mecanismos son:

- La reparación directa del DNA por acción de enzimas que eliminan las lesiones. Por ejemplo, el daño producido por la UV sobre el cromosoma bacteriano puede ser reparado por exposición de la bacteria a la luz azul del espectro visible. El proceso se realiza por acción de una enzima fotorreactivadora, que actúa cortando los dímeros de timina. El fenómeno se denomina reparación por fotorreactivación.
- La reparación por escisión, que consiste en la separación del segmento de DNA lesionado, seguida de la síntesis de una nueva cadena de DNA. Una enzima nucleasa (DNAsa) reconoce el lugar dañado como consecuencia de la luz UV y corta los enlaces fosfodiéster para eliminar el fragmento de DNA que ha sufrido la alteración; la acción de la enzima genera un hueco en el DNA y, posteriormente, la DNA polimerasa I rellena ese hueco, insertando los nucleótidos complementarios a los de la cadena intacta. La enzima ligasa sella el corte en la última base insertada, cerrando el hueco.
- En la correción de pruebas, actúa la DNA polimerasa III, al insertarse un nucleótido incorrecto durante la polimerización. La enzima detecta la base equivocada y la sustituye por la base adecuada. Este sistema de reparación incrementa unas 100 veces la seguridad de la síntesis de DNA bacteriano.
- La reparación por emparejamientos erróneos es un mecanismo similar a la reparación por escisión, y es el que actúa frente a los errores que quedan luego de la intervención del sistema de corrección de pruebas. En *E. coli* se determinó, ante un emparejamiento de bases incorrecto, a qué cadena pertenecía el nucleótido erróneo. Se descubrió que la enzima adenina metilasa reconocía la secuencia del DNA y metilaba las adeninas. Cuando la enzima reconoce el nucleótido incorrecto, elimina el que se encuentra en la cadena no metilada y, en su lugar, se inserta el adecuado.
- La reparación por recombinación o respuesta SOS. Este sistema repara los daños no corregidos por los sistemas anteriores. Cuando existe un daño en el DNA que se está replicando, se para la DNA polimerasa y, posteriormente, salta la alteración o daño para seguir sintetizando DNA. Esta acción genera un hueco en la cadena nueva. Mediante la proteína *rec A* que cataliza el intercambio de cadenas homólogas, por recombinación, se rellena el hueco, por inserción de un segmento de la cadena homóloga intacta. El nuevo hueco que se genera en la cadena donadora, al continuar la replicación, se rellena a través de una síntesis reparadora.

RECOMBINACION DEL DNA

La recombinación es la incorporación de genes de una bacteria donadora en el cromosoma de una bacteria receptora. Esta bacteria receptora los expresa como el resto de la información genética.

La recombinación puede ser homóloga o heteróloga.

La recombinación homóloga se produce entre secuencias de DNA estrechamente relacionadas y, por lo general, sustituye una secuencia por otra. Puede producirse por una inversión específica de sitios, o por conversión genética.

La recombinación por inversión específica de sitios se produce cuando el fragmento de DNA donador contiene secuencias repetidas, invertidas y cortas, semejantes a la que se hallan en los transposones. Esta recombinación está catalizada por una proteína denominada factor para proteína de estimulación de inversión o proteína Fis. Este tipo de recombinación genera alteraciones de los antígenos flagelares (antígenos H), en las diferentes serovariedades del género *Salmonella*.

La recombinación por conversión genética es un intercambio genético no recíproco, que se produce entre dos genes ligados muy cercanos.

La recombinación heteróloga puede ser generalizada, específica o por transposición.

La recombinación generalizada se produce cuando un fragmento de DNA donador contiene una secuencia nucleotídica homóloga al fragmento de DNA del cromosoma receptor o plásmido. El intercambio está catalizado por la proteína *recA*.

La recombinación específica es la que el fragmento de DNA sólo se puede insertar en un lugar específico del replicón receptor. Por ejemplo, el bacteriófago *lambda* siempre se inserta entre los genes *gal* y *bio* de *E. coli*. En este mecanismo no interviene la proteína *recA*.

La recombinación por transposición se realiza mediante transposones.

Estas dos últimas formas de recombinación dependen de enzimas codificadas por el DNA integrado en bacteriófagos o en transposones.

INTRODUCCION A LAS TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

La comprensión de las técnicas utilizadas en biología molecular se sustenta en el conocimiento de la estructura de los ácidos nucleicos, sobre todo el DNA, y las enzimas que intervienen en

su replicación, y en la posibilidad de modificarlo y construir moléculas nuevas.

Las **enzimas endonucleasas de restricción** pueden cortar el DNA en determinadas secuencias, dejando extremos cohesivos o romos. Es posible unir estos fragmentos en presencia de energía y enzimas como la **DNA ligasa**, que sella en forma covalente ambos extremos. La eficiencia de ligado es menor con los extremos romos que con los cohesivos.

El nombre de estas enzimas se debe a su función, que es proteger a las bacterias de la infección por bacteriófagos, al degradar el DNA invasor.

Cada enzima reconoce una secuencia específica del DNA de entre cuatro y ocho nucleótidos.

Actualmente se han aislado alrededor de 200 enzimas de restricción, las cuales reconocen diferentes secuencias de nucleótidos y se denominan según el microorganismo en el que se descubrieron; por ejemplo, *Eco*RI, obtenida de *Escherichia coli* RY13, genera un corte que libera extremos cohesivos (fig. 14-17).

Otros ejemplos son: *Hind*III, obtenida de *Haemophilus influenzae* Rd; *Bam*HI, obtenida de *Bacillus amyloliquefaciens* H; y *Pst*I, de *Providencia stuartii*.

Otras enzimas de restricción como *Hpa*I generan cortes que liberan extremos romos (fig. 14-18).

El extremo cohesivo es complementario en secuencia al que genera la misma enzima de restricción en cualquier otro fragmento. Los extremos cohesivos permiten unir fácilmente fragmentos de DNA obtenidos con la misma endonucleasa de restricción, o con otra que genere los mismos extremos cohesivos.

El empleo de varias endonucleasas de restricción permite obtener un perfil de restricción del DNA a estudiar. Con el análisis de este perfil se pueden diferenciar especies y también variantes genotípicas, o caracterizar cepas de microorganismos. Al intentar relacionar estos perfiles, provenientes de gérmenes aislados de casos clínicos, se puede llegar a establecer el origen de un brote infeccioso o la correlación entre dichos casos clínicos.

Las DNA polimerasas adicionan desoxirribonucleótidos monofosfato al extremo 3′ (OH) de una cadena de DNA. Esto se denomina actividad de **polimerasa** 5′ 3′. Algunas polimerasas tienen también actividad de **exonucleasa**, es decir, cortan segmentos de DNA. Esto es fundamental en los procesos de reparación del ácido nucleico, ya que permite eliminar pequeños oligonucleótidos, cortando la cadena y reparando errores de copiado.

La Tac **polimerasa** es una polimerasa obtenida de la bacteria *Thermus aquaticus*, cuya temperatura óptima de acción está entre los 75 y 80 °C. Una de sus aplicaciones tiene lugar en la reacción en cadena de la polimerasa (véase más adelante PCR). Existen otras DNA polimerasas termoestables que provienen de otras bacterias, como *Thermococcus litoralis* (Vent pol) o *Pyrococcus furiosus* (Pfu).

Las **transcriptasas reversas** son enzimas que pueden utilizar RNA como molde para sintetizar DNA. No poseen acción correctora. La cadena de DNA obtenida se denomina DNA complementaria.

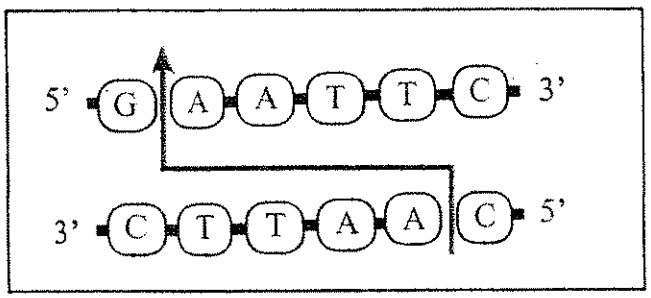


Figura 14-17. *Eco*I: el corte es escalonado y crea extremos cohesivos.

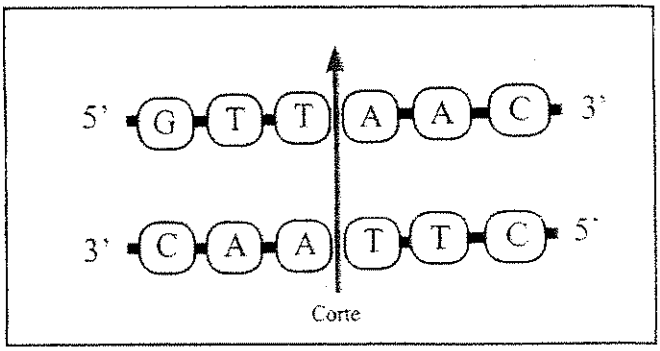


Figura 14-18. *Hpa*I: genera extremos romos.

Las **ligasas** catalizan la unión entre el OH 3′ de una cadena nucleotídica y el fosfato 5′ de otra, mediante un enlace fosfodiéster.

Polimorfismo del DNA

El polimorfismo son las variaciones entre las secuencias de los nucleótidos del DNA en individuos de una misma especie.

Para detectarlo se realiza el corte del DNA con enzimas de restricción y los fragmentos obtenidos se analizan por electroforesis, en un gel de agarosa. Los fragmentos se van separando según su tamaño, quedando los más grandes, de mayor peso molecular, más cerca del origen del gel. Comparándolo con otro DNA de la misma especie se puede detectar el polimorfismo, por la ausencia de uno o varios sitios de corte con la correspondiente ausencia de algún fragmento en el gel.

El polimorfismo se puede originar por inserción, transición o transversión.

Manipulación de genes

La ingeniería genética, conocida también como tecnología del DNA recombinante, utiliza técnicas y métodos desarrollados por especialistas en genética bacteriana, con el objeto de expresar secuencias de DNA específicas.

La ingeniería genética y la clonación han revolucionado tanto la biología como la medicina.

La manipulación de genes bacterianos por ingeniería genética tiene como objetivo incrementar la cantidad de los productos bacterianos (aumentando el número de copias de un gen y, por lo tanto, la producción de metabolitos microbianos deseables), y expresar genes de origen animal o vegetal para que la bacteria sintetice una proteína que sólo se produce normalmente en células animales o vegetales (los genes animales o vegetales son removidos del cromosoma, se insertan en un plásmido bacteriano y este plásmido alterado es devuelto a la misma célula bacteriana, de modo que esta bacteria producirá una proteína cuya síntesis será dirigida por genes animales o vegetales). Las moléculas que poseen fragmentos no relacionados de DNA, como ese plásmido manipulado, se conocen en general como DNA de recombinación o DNA recombinante.

Las herramientas básicas con que cuenta la ingeniería genética son:

- Los **vectores de clonación**, que suministran las secuencias de DNA en la célula receptora, permitiendo amplificar la secuencia deseada;
- Las enzimas de restricción, que pueden cortar el DNA en determinadas secuencias, dejando extremos cohesivos o romos;

– La DNA-ligasa, que une los fragmentos de DNA al vector de clonación.

Vectores de clonación

Deben poseer: capacidad de replicación, permitir que el DNA extraño se inserte en él y tener algún elemento marcador de selección (genes de resistencia a antibióticos y/o genes que codifiquen la síntesis de enzimas no presentes en la célula hospedadora) para diferenciar la célula hospedadora portadora del vector de aquella que no lo tiene. Se emplean plásmidos (fig. 14-19) para fragmentos de hasta 20 kb; bacteriófagos para fragmentos mayores de hasta 25 kb, y **cósmidos** (han combinado algunas ventajas de los plásmidos y de los bacteriófagos) para fragmentos de DNA de hasta 45 kb. Los cósmidos son vectores de clonación híbridos porque poseen parte del cromosoma del fago lambda y parte del DNA plasmídico.

La mayoría de los vectores de clonación, por técnicas de ingeniería genética, han sido preparados para distintas funciones: disponibilidad de un sitio de inserción para el DNA extraño; un medio de selección, como por ejemplo, resistencia a antibióticos para las bacterias que han incorporado el vector, y un medio para diferenciar a las bacterias que han incorporado plásmidos con DNA insertado.

Para clonar un segmento de DNA extraño, tanto el vector como el DNA deben ser escindidos por enzimas de restricción. Estas enzimas reconocen una secuencia palindrómica específica y realizan un corte que da lugar a la aparición de extremos adherentes, o un corte romo, que da lugar a terminaciones romas.

La unión del vector con los fragmentos de DNA genera una molécula capaz de replicar la secuencia insertada que se denomina **DNA recombinante**.

El número total de vectores recombinantes, obtenidos durante la clonación del DNA, se conoce como **biblioteca genómica**, pues debe contener al menos un representante de cada gen.

Otro método de clonación de una proteína consiste en convertir en DNA el mRNA destinado a dicha proteína. Esto se realiza por la transcriptasa reversa (DNA polimerasa dependiente del RNA) y en el proceso se produce un DNA complementario. Una biblioteca de DNA complementario representa todos los genes expresados en una célula.

En la actualidad, las células bacterianas manipuladas y alteradas por tecnología genética están produciendo hormona de crecimiento humana, porcina y bovina, insulina humana, interferón humano, albúmina sérica humana, proteínas virales e interleuquina.

Una de las aplicaciones en veterinaria de las bacterias manipuladas genéticamente, es el desarrollo de vacunas virales y bacterianas.

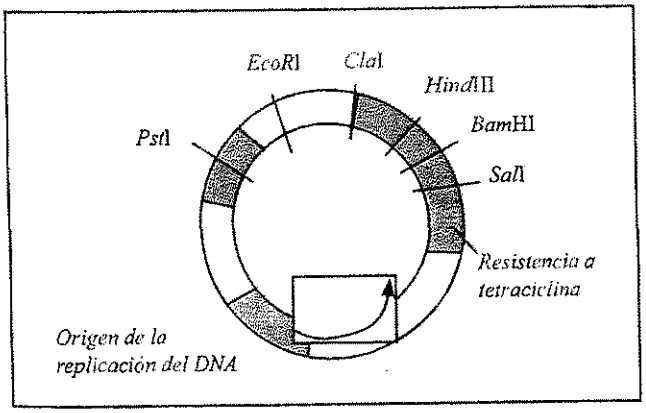


Figura 14-19. Esquema de un vector de clonación clásico. Plásmido pBR322 (la flecha indica la replicación del DNA a partir del origen de replicación de éste).

TECNOLOGIA DEL DNA RECOMBINANTE

Los pasos para la obtención del DNA recombinante son:

1) Uso de enzimas endonucleasas de restricción (cortan las moléculas de DNA por secuencias específicas de nucleótidos).
2) Los fragmentos de DNA originados por la acción de las enzimas se unen a otras moléculas de DNA que sirven de vectores. De esta manera se facilita la manipulación de la molécula de DNA recombinante sintetizada. Los vectores (plásmidos, bacteriófagos, cósmidos) se replican autónomamente en la célula hospedadora.
3) La molécula de DNA unida al vector se transfiere a una célula hospedadora. En esta célula, el DNA recombinante se replica dando origen a miles de copias idénticas, conocidas como clones.
4) Al replicarse la célula hospedadora, las células hijas heredan el DNA recombinante, y la población de células idénticas que se origina lleva la secuencia clonada.
5) Los segmentos de DNA clonados pueden recuperarse de las células hospedadoras, purificarse y analizarse.

LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

En 1986 se desarrolló esta técnica, muy utilizada en biología molecular, por constituir una herramienta eficaz en las investigaciones del DNA recombinante en genética, microbiología, inmunología y medicina forense.

La PCR permite la amplificación directa de fragmentos de DNA específicos, sin necesidad de clonación, y hace posible obtener gran número de copias de fragmentos, aun a partir de una pequeña cantidad de muestra. El desarrollo de la PCR significó, para Kary Mullis, la obtención del premio Nobel de Química en 1993.

Esta técnica utiliza la enzima DNA polimerasa, iniciadores o *primers*, y oligonucleótidos que hibridan con la cadena complementaria a la secuencia que se quiere amplificar.

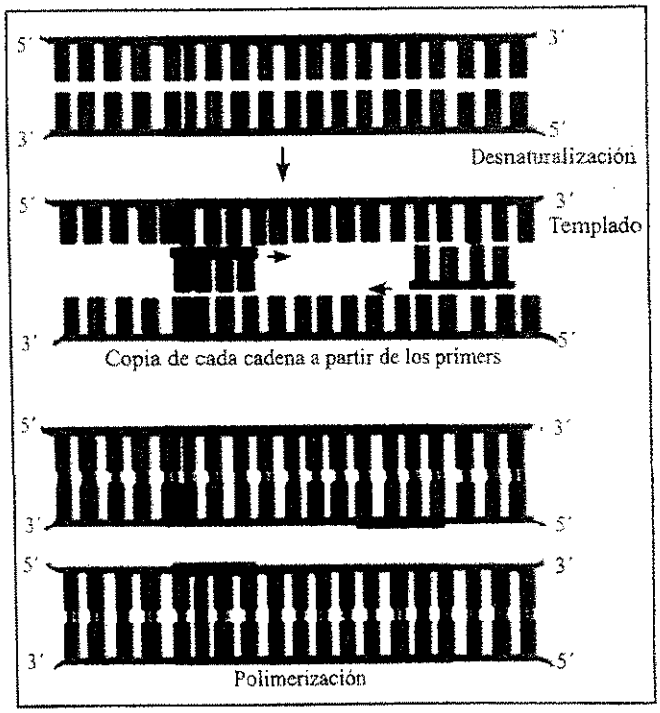


Figura 14-20. Esquema de un ciclo en la PCR.

La PCR consta de tres pasos. El primero es la desnaturalización: el DNA que se quiere amplificar se desnaturaliza en cadenas sencillas. Para desnaturalizar el DNA y separarlo en cadenas sencillas, se utilizan temperaturas de 90 °C durante 5 minutos.

No es necesario que el DNA esté clonado ni purificado, y puede provenir de bacterias, virus, hongos, semen, pelos, sangre, etc.

El segundo paso es el templado: la temperatura de la mezcla se baja para que los cebadores, *primers* o fragmentos iniciadores del DNA se enlacen con las cadenas separadas de esta molécula. Los *primers* se unen al DNA de cadena sencilla. Son oligonucleótidos sintéticos que hibridan con las secuencias del fragmento que se quiere amplificar. Normalmente se utilizan dos *primers* diferentes, cada uno de los cuales tiene una secuencia complementaria a una de las dos cadenas del DNA. Los *primers* se alinean por sus extremos 3' ya que hibridan sus cadenas opuestas.

En el tercer paso, o polimerización, se eleva la temperatura y se agrega una enzima DNA polimerasa resistente al calor, la *Taq* polimerasa, para que copie rápidamente el DNA. La polimerasa extiende los cebadores o *primers* en dirección 5' → 3', utilizando como molde el DNA de cadena sencilla al que se ha unido el cebador. El producto resultante es una molécula de DNA de doble cadena con los cebadores incorporados en el producto final (fig. 14-20).

El producto de la amplificación puede leerse en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio e iluminado con luz ultravioleta.

En resumen, los pasos o ciclos son desnaturalización del DNA, hibridación de los *primers* y extensión por la polimerasa. Si se comienza con una molécula de DNA, en el primer ciclo se producirán dos moléculas de DNA; en el segundo, cuatro; en el tercero, ocho; en el cuarto, dieciséis, y así sucesivamente. Este proceso está automatizado, y se utiliza un termociclador, que puede programarse para realizar un determinado número de ciclos. De esta manera, en pocas horas, se pueden obtener grandes cantidades de DNA. En microbiología tiene múltiples aplicaciones, como por ejemplo, en la clínica, para identificar el agente etiológico de muchas enfermedades.

BIBLIOGRAFIA

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K y Watson J. Biología Molecular de La Célula. Ediciones Omega 3ra. Edición. 1996.

Jawetz, Melnick y Adelberg. Genética microbiana. Microbiología Médica. Cap.7. 105-129. 17ª. Edición. Manual Moderno. 2002.

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Genética bacteriana. Microbiología Médica. Cap. 5. 34-46. 4ta. Edición. Elsevier. 2003.

Vadillo S, Píriz S y Mateos E. Genética bacteriana. Manual de Microbiología Veterinaria. Cap. 7. 93-118. McGraw-Hill-Interamericana. 2002.

Zinsser. Bases moleculares de la genética y regulación metabólica. En: Microbiología. Cap. 7. 136- 175. 20ª. Edición. Editorial Panamericana. 1997.

Capítulo 15

ANIMALES DE LABORATORIO

Cecilia Carbone,
María del Pilar Cagliada, Miguel Angel Ayala

INTRODUCCION Y CONCEPTOS GENERALES

La ciencia de los animales de laboratorio se puede definir como una rama multidisciplinaria que contribuye con la investigación biomédica permitiendo la obtención de datos reproducibles, confiables e informativos.

Incluye el estudio de la biología de los animales de laboratorio, su manejo y requerimientos ambientales, los procedimientos de estandarización microbiológica y genética, la prevención y el tratamiento de enfermedades, la optimización de técnicas experimentales y anestesia, la analgesia y la eutanasia. Esta ciencia también incluye el estudio de los aspectos éticos de la experimentación animal junto con la búsqueda de procedimientos alternativos y complementarios.

El término "experimento con animales" puede aplicarse a cualquier procedimiento científico en el que se utilicen animales, con independencia de que sean vertebrados o invertebrados.

El objetivo principal de la ciencia de animales de laboratorio es lograr el equilibrio entre la calidad de la experimentación y el bienestar de los animales.

DEFINICION DE ANIMAL DE LABORATORIO

Se define como animal de laboratorio a cualquier tipo de ser vivo, con independencia de su categoría filogenética o taxonómica, tanto vertebrado como invertebrado, que se utilice como instrumento de medida con fines científicos.

La ciencia en la que se lo emplea fundamentalmente es la biología (biomedicina), dentro de las siguientes áreas:

a. Estudios biológicos.
b. Desarrollo y control de calidad de productos, y aplicaciones para medicina humana y veterinaria, fabricación de productos farmacéuticos o alimenticios, y pruebas de eficacia y/o seguridad.
c. Diagnóstico y prevención de enfermedades o alteraciones de la salud, prevención de anomalías o sus efectos, diagnóstico y tratamiento de aquéllas.
d. Valoración, detección, normalización o modificación de las condiciones fisiológicas en el hombre, los animales vertebrados e invertebrados, o las plantas.
e. Protección del hombre, los animales y el ambiente.
f. Educación y formación.
g. Otros.

El animal de laboratorio se considera como un "reactivo biológico", y se lo define como aquel animal en experiencia, en función del tema en estudio, capaz de dar una respuesta confiable y reproducible. Su pureza debe ser vigilada, controlada y evaluada lo mismo que otro reactivo (químico o físico), sin olvidar su posible contaminación biótica o abiótica, que puede producir alteraciones en los resultados esperados u observados en el proceso experimental. Por otra parte, la posibilidad de reproducir las experiencias está limitada por su propia variabilidad; es decir que sobre esta base, el empleo de animales homogéneos asegura la confiabilidad de la respuesta esperada. Nace así el concepto de **"estandarización del reactivo biológico"**.

El objetivo final es la obtención de animales biológicamente uniformes, desde el punto de vista genético y microbiológico. Además se deben estandarizar las variables macro y microambientales del espacio en el cual se encuentran los animales (ventilación, temperatura, humedad, luz), así como también las de índole etológico o de comportamiento (territorialidad, agresividad y hacinamiento).

Las unidades en donde se producen o mantienen bajo experiencia los animales de laboratorio se denominan **bioterios**. Tienen como función producir animales para ser utilizados como reactivos biológicos de alta calidad y/o mantener especies o cepas bajo experiencia aplicando metodologías que estén de acuerdo con las recomendaciones internacionales.

Es importante saber que cualquier especie animal, incluso las silvestres, que se mantenga bajo determinadas condiciones y se use para investigación o para realizar pruebas de diagnóstico o control de calidad se considera un animal de laboratorio.

Los animales más utilizados en experimentación son los roedores, dentro de ellos, y en primer lugar, los ratones y las ratas. Esto se debe a que existen una gran cantidad de datos biológicos relativos a ellos, por lo que representan, desde el punto de vista de su anatomía, fisiología, genética, patología y comportamiento, individuos definidos y estandarizados.

A estas dos especies les siguen en importancia los cobayos, conejos, hámsters y gérbils.

En este capítulo nos referiremos a estas especies, aunque también los perros, gatos, cerdos y primates se utilizan en gran escala como animales de laboratorio en todo el mundo.

Las áreas principales en las que se utilizan son investigación de fármacos, pruebas de vacunas, pruebas de toxicidad, investigación sobre cáncer y otros fines científicos, como investigación básica, estudios genéticos, de diagnóstico, cirugía experimental, enseñanza, etc.

El número de animales que se utiliza varía en cada país, dependiendo del grado de desarrollo de la investigación biomédica.

Bienestar animal

RUSSELL Y BURCH: LAS 3 R

La teoría de Russell y Burch, tal como se elaboró a finales de los años cincuenta, se ha convertido en un tema central de la ciencia de animales de laboratorio.

Se trata de cómo instrumentar medidas para disminuir o eliminar los aspectos no humanitarios de la experimentación animal,

para ese fin se introdujo el "**Concepto de las 3 R**" (refinamiento, reducción y remplazo) como base fundamental para el empleo responsable de los animales en los experimentos.

Refinamiento: se refiere a las condiciones y calidad de vida que se le otorgan al animal en cautiverio. Incluye desde la caja o jaula, condiciones ambientales, de manejo, anestesia, analgesia, toma de muestras, inoculación de sustancias e incorporación en su ambiente de elementos que contribuyan favorablemente a su bienestar.

Reducción: se refiere a una disminución del número de animales que se necesitan para un experimento determinado. Esto se puede lograr eligiendo procedimientos experimentales apropiados, controlando los factores ambientales y estandarizando a la población animal; temas en los que se ha avanzado mucho en los últimos años.

Remplazo: se refiere a la sustitución del empleo de animales vivos por técnicas in vitro, modelos normatizados, vídeos, etc. El experimento puede ser sustituido por un procedimiento alternativo que produce el mismo resultado sin la utilización de animales vivos.

ENTRENAMIENTO DEL PERSONAL RELACIONADO CON EL ANIMAL DE LABORATORIO

El personal debe recibir un entrenamiento y una formación adecuados, condición fundamental para obtener calidad en la investigación y para utilizar en forma responsable a los animales. Como ejemplo entre los países que han desarrollado reglamentaciones en este tema se encuentran la Unión Europea, que establece que ***"las personas que lleven a cabo experimentos o tomen parte en ellos y aquellas que estén al cuidado de animales utilizados en experimentos, incluyendo las tareas de supervisión, deberán tener la preparación y formación apropiadas"***. Además, según la ley sobre el bienestar de los animales de los Estados Unidos, ***"las personas implicadas en el empleo y cuidado de los animales utilizados en investigación deben estar formadas adecuadamente"***.

Dado el avance de esta ciencia y la influencia de la capacitación del personal sobre la calidad de la experiencia y el bienestar animal, en muchos países se ha establecido la obligatoriedad de que los científicos "nuevos" se preparen en este campo.

Sin embargo, la preparación y formación, aunque son imprescindibles, no otorgan la libertad para experimentar con animales y sólo se justifica la realización de una experiencia si ésta es necesaria y no hay alternativas disponibles; si el beneficio es superior al sufrimiento del animal (según el juicio de un comité ético) y si el experimento es diseñado cuidadosamente prestando la máxima atención a su bienestar.

CALIDAD MICROBIOLOGICA DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO

Categorización

Junto con el desarrollo y la evolución de la ciencia de los animales de laboratorio se pudo comprobar que la presencia de parásitos y microorganismos patógenos en estos individuos puede provocar interferencias en los resultados de las pruebas de diagnóstico, investigación y control de calidad. Por esta razón, los especialistas desarrollaron técnicas que se aplican para producir y mantener animales de los que selectivamente se han eliminado ciertos microorganismos. Esto permite obtener animales microbiológicamente definidos de acuerdo con la siguiente clasificación:

a. **Convencionales:** criados y mantenidos en condiciones ambientales no definidas; eventualmente pueden ser portadores de infecciones, latentes o no, pero de ninguna manera zoonosis.
b. **Libres de patógenos específicos (SPF, *Specific Pathogen Free*):** se obtienen por histerectomía aséptica y se crían y mantienen bajo barreras sanitarias. La técnica de histerectomía se fundamenta en la capacidad que tiene la placenta para filtrar la mayoría de los microorganismos, lo cual evita la transmisión vertical. Su microbiota intestinal es normal y se controlan periódicamente.
c. **Libres de gérmenes o axénicos (GFA, *Germ Free Animals*):** son animales en los cuales no se puede detectar ningún microorganismo, incluyendo los de la microbiota normal, por los métodos hasta ahora conocidos. Son criados y mantenidos en ambientes totalmente estériles, como por ejemplo: aisladores. También se obtienen por métodos de histerectomía.
d. **Gnotobiotes (*Gnotos: conocido, biote: vida*):** son animales axénicos o libres de gérmenes que se han puesto en contacto con uno o más cultivos puros de microorganismos. Es decir que en estos animales se conoce totalmente la carga microbiana presente.

Para establecer la categoría microbiológica a la cual pertenecen los animales se controla periódicamente el estado sanitario de las colonias aplicando métodos y recomendaciones establecidos internacionalmente.

BIOLOGIA Y MANEJO DE LAS ESPECIES MAS COMUNES DE LABORATORIO

Uno de los requisitos previos para el empleo responsable de los animales en la investigación biomédica es el conocimiento exhaustivo de las características biológicas de la especie que se va a utilizar, así como de las condiciones necesarias para su manejo. La elección de la especie animal y de la cepa depende de sus características anatómicas, fisiológicas y de conducta, de acuerdo con las demandas de la investigación. El alojamiento, la alimentación y el cuidado de la especie animal seleccionada deben ser los apropiados para satisfacer sus necesidades.

RATON

El ratón es el animal más utilizado en las pruebas de diagnóstico e investigación. Su pequeño tamaño, su vida relativamente corta, su alta eficiencia reproductiva, su adaptación a la explotación en grandes colonias, el conocimiento completo de su genoma, su amplia variabilidad genética y susceptibilidad a agentes químicos y microbianos hacen de este animal un modelo apropiado para investigación en diversas disciplinas, tales como embriología, etología, genética, gerontología, microbiología, oncología, etc.

ORIGEN

El ratón doméstico *(Mus musculus)* tiene una amplia distribución mundial y, como su nombre lo indica, se encuentra asociado al hábitat humano.

Todas las cepas de ratones de laboratorio existentes derivan de una cría selectiva del *Mus musculus* tipo salvaje.

TAXONOMIA

Clase: mamífero.
Orden: Rodentia.
Familia: Muridae.
Género: *Mus*.
Especie: *musculus*.

BIOLOGIA GENERAL

El ratón doméstico es una especie cosmopolita, comensal del hombre. Se adapta ampliamente a una gran variedad de condiciones ambientales, desde zonas muy frías hasta regiones tropicales. En general, las especies prefieren lugares más secos que húmedos.

Es de hábitos nocturnos. Posee un agudo sentido de la audición y responde a un amplio rango de secuencias ultrasónicas; por ejemplo, cuando la hembra sale del nido, sus crías emiten sonidos ultrasónicos que inmediatamente son percibidos por la madre. En el laboratorio, los ratones se alteran por sonidos de muy baja frecuencia, por lo que hay que tener cuidado con los equipos que se utilizan.

El sentido del olfato está muy desarrollado, no sólo para detectar alimentos y depredadores, sino también para establecer un orden social.

La visión es muy pobre, la retina tiene muy pocos conos y, por lo tanto, no pueden percibir los colores.

El sistema social depende de la densidad de población; viven en grandes colonias y el rango está bien establecido.

Por su pequeño tamaño corporal son muy susceptibles a cambios ambientales, aun a pequeños cambios de temperatura (2 a 3 °C) que pueden afectar su temperatura corporal y modificar su fisiología.

El tamaño del ratón adulto varía entre 12 y 15 cm desde la punta de la nariz a la punta de la cola. El recién nacido pesa entre 1 hasta 2 g, y gana rápidamente peso durante la lactación.

En general, los ratones híbridos, producto del cruzamiento entre dos cepas puras, viven más que los parentales. Las cepas de ratones de corta vida mueren entre el quinto y decimosexto mes, mientras que las cepas longevas llegan hasta los 24 y 36 meses.

El ratón de laboratorio es un animal sociable y se mantiene, habitualmente, en grupos sin ningún inconveniente; éstos deben formarse de inmediato luego del destete; sin embargo, los machos de ciertas cepas como, por ejemplo, HRS/J, BALB/cJ, SJL/J, comienzan a demostrar su agresividad entre la séptima y décima semana de edad, aun cuando estos grupos se hayan establecido en el momento del destete. Las hembras generalmente no son agresivas, incluso cuando se hayan agrupado siendo adultas. El ratón normalmente divide su caja en áreas específicas para dormir, comer, orinar y defecar. Las hembras parturientas construyen un nido y permanecen mucho tiempo cerca de él o sobre las crías. Tanto la hembra como el macho limpian a los neonatos y evitan que otras crías se acerquen.

PRODUCCION

Microambiente

Los ratones que se utilizan con propósitos experimentales se alojan tanto en cajas metálicas como de material plástico provistas de tapas de alambre galvanizado o de acero inoxidable.

En el caso de los ratones adultos (con un peso aproximado de 30 g) se requiere una superficie mínima de 97 cm^2 por animal, la cual debe aumentarse hasta 390 cm^2 en el caso de las hembras con la camada. En todos los casos, la altura de las paredes de la caja no debe ser inferior a 15 cm.

El lecho debe estar libre de polvillo, ser absorbente, atóxico, no producir alergias y ser esterilizable. En este sentido, cabe señalar como el más adecuado la viruta de madera de álamo. La limpieza y desinfección de las cajas debe realizarse como mínimo una vez por semana, dependiendo de la cepa, de la densidad animal y de la ventilación del ambiente.

El agua se les administra en mamaderas o en bebederos automáticos. Se puede esterilizar por medio de autoclave o por filtración.

El alimento se brinda *ad libitum* y generalmente se utilizan preparados comerciales. Para los animales SPF, axénicos y gnotobióticos, éste debe ser estéril. La esterilización se puede realizar por medio de radiación o autoclavado; en este último caso, el alimento debe ser reforzado ya que el calor destruye gran parte de los nutrientes.

Macroambiente

La temperatura de las habitaciones debe mantenerse entre los 18 y los 25 °C, siendo la más adecuada entre los 24 °C +/- 1 y la humedad relativa entre 40 y 70%.

La ventilación es importante para controlar la humedad, el calor y los gases tóxicos. Se deben realizar entre 10 y 14 recambios de aire/hora, dependiendo de la carga animal.

La iluminación es importante para la regulación del ciclo estral y reproductivo. Se recomienda un ciclo de 12 horas luz/12 horas oscuridad.

Los ratones son muy sensibles a los ruidos, por lo que éstos deben evitarse cuando se trabaja con ellos.

MANEJO REPRODUCTIVO

El manejo reproductivo de una colonia está determinado por el método que se emplee para remplazar a los animales viejos por los jóvenes.

PROGRAMA REPRODUCTIVO

El programa reproductivo debe establecerse teniendo en cuenta una serie de premisas, básicamente: espacio disponible, fecundidad de la cepa a emplear y esquema de consanguinidad.

La ratona es poliéstrica continua. Entre las 12-24 horas posteriores al parto se produce un estro fértil, de manera que si las necesidades productivas lo exigen, pueden utilizarse para que la cubra el macho. Hay que tener en cuenta que la lactación y gestación simultáneas pueden retrasar entre 3 y 5 días la implantación del embrión.

Al nacer, el ratón de laboratorio pesa 1 gramo; nacen con los ojos y oídos cerrados, sin pelos, y muy activos. Al tercer día comienza a notársele el pelo, para estar completamente cubiertos a los 10. A los 12 días comienzan a abrir los ojos y el conducto auditivo externo, entre el decimotercero y decimocuarto empiezan a ingerir alimento sólido y agua del bebedero.

Generalmente se los desteta a los 21 días de edad con un peso de 10 a 12 gramos.

Cuando no se ha utilizado el estro posparto, las hembras comienzan a ciclar 5 días después de haber destetado a sus crías.

Sistemas reproductivos

Los sistemas reproductivos más empleados en las colonias de fundación y producción son: 1) sistema reproductivo monogámico y 2) sistema reproductivo poligámico.

1) El **sistema reproductivo monogámico** se realiza colocando un macho y una hembra que siempre permanecerán juntos en una misma caja. Este sistema se utiliza en los stock de fundación para el mantenimiento permanente de éste. Las

crías que se obtienen se destetan a los 21 días, antes de que se produzca el nuevo nacimiento. Con este sistema, en el que se aprovecha el estro posparto, se logra obtener un mayor número de camadas, a la vez que permite un correcto control y evaluación de la producción de cada hembra. Como desventaja hay que señalar el elevado número de machos necesarios, el desgaste prematuro de la hembra, la mayor cantidad de espacio requerida y el incremento de trabajo para el personal.

2) El **sistema reproductivo poligámico** se realiza apareando un macho con 2 a 6 hembras. Antes del parto, las hembras se llevan a cajas individuales, lo que naturalmente impide aprovechar el estro posparto. Como consecuencia la hembra se desgasta menos, lo que se traduce en mayor viabilidad y mayor tamaño de las crías destetadas. Como desventaja hay que señalar que se obtiene un menor número de camadas por hembra, un mayor trabajo a desarrollar con cada caja y, finalmente, el agotamiento de los machos.

Ciclo estral

El ciclo estral tiene una duración de 4 a 5 días, el estro dura aproximadamente 12 horas. Durante la lactación se interrumpe la periodicidad ovárica.

Cuando se colocan las hembras en grupos homosexuales, puede darse en todas ellas un período de anestro continuo, que se interrumpe, es decir que comienzan a ciclar nuevamente cuando se introduce un macho en el lote o, simplemente, mediante su olor, utilizando las camas extraídas de las cajas de los machos. A las 72 horas se produce una sincronización del estro; este fenómeno se conoce como **efecto Whitten**.

Las hembras tienen un período de gestación que oscila entre 19 y 21 días, en las lactantes aumenta entre 3 a 10 días en función del tamaño de la camada. Las hembras cubiertas por un macho determinado no deben tomar contacto físico o exponerse al olor de otro, al menos en las primeras 48 horas posteriores a la fecundación; si esto ocurre, se puede producir la reabsorción embrionaria, proceso que se denomina **efecto Bruce**.

El diagnóstico de gestación se realiza por la presencia de espermatozoides en los frotis vaginales, así como también por la presencia de un tapón vaginal formado por el semen gelificado; éstos son indicadores ciertos de que se ha producido la cópula en las 24 horas precedentes.

El tamaño de la camada varía dependiendo de la cepa, la edad de la madre, etc., pero siempre la primera es más reducida, y son más numerosas entre el segundo y octavo parto; por ejemplo, una hembra de la cepa BALB/c en su primera camada tiene entre 3 y 4 crías, y su número aumenta a 5 o 7 en los partos siguientes.

MANEJO

Los ratones jóvenes y adultos se sujetan y levantan tomándolos por la base de la cola o por el cuerpo, con los dedos o con pinzas pequeñas, teniendo especial cuidado con los agresivos ya que pueden darse vuelta y morder. Una vez que se lo sujeta por la cola, se lo examina. Luego se lo toma por la piel laxa del cuello y las orejas con los dedos índice y anular, y se lo da vuelta sujetando la cola entre el meñique y la palma de la mano. En ningún caso se lo debe sujetar por la punta de la cola ya que podría desprenderse la piel de dicho apéndice. Las pinzas son excelentes para manipular ratones salvajes y agresivos, y también para tomar a los recién nacidos.

Identificación

Existe una gran variedad de métodos para identificación: permanentes y temporarios. Los métodos de identificación permanente incluyen caravanas de metal en las orejas, muescas, recorte de cola, tatuajes y marcas. La identificación temporaria se puede lograr tiñiendo el pelo de los ratones albinos, cortando el pelo o haciendo marcas en la cola con tinta indeleble. Los dos primeros métodos permiten la identificación por 1 o 2 semanas y las marcas de tinta desaparecen en 1 o 2 días.

Sexado

Los machos pueden reconocerse al momento del nacimiento por la mayor distancia anogenital (1,5-2 veces mayor que en la hembra), los testículos de color pálido, visibles a través de la pared abdominal, y el mayor tamaño de la papila genital. La hembra, a los 9 días de edad, tiene las mamas ostensibles.

ADMINISTRACION DE FARMACOS Y OTROS COMPUESTOS

Tópica

La aplicación tópica de los compuestos se realiza sobre la piel depilada de la cola, las orejas o el cuerpo en ratones normales o desnudos. Este es un procedimiento fácil, se debe evitar el lamido para que el animal no ingiera los compuestos aplicados. Se han desarrollado diversos dispositivos para este propósito, como por ejemplo, el collar isabelino, bandas y tubos de vidrio o acrílico para la cola.

Oral

La forma más fácil de administrar un compuesto por vía oral es mezclándolo con el alimento o con el agua de bebida, pero si le dan un sabor desagradable, se reduce considerablemente su consumo. Para asegurar la administración oral de un compuesto se requiere de una técnica de infusión intragástrica continua. Se debe tener un amplio conocimiento de la anatomía de la zona orofaríngea, ya que el orificio esofágico es difícil de localizar en los ratones vivos. Una vez inmovilizado el ratón, se introduce la sonda lenta y suavemente a lo largo de la rama mandibular izquierda. En este punto, el ratón comienza a tragar y la sonda se inserta dentro del esófago.

Subcutánea

La inyección subcutánea (en un volumen de 1 a 2 ml en el ratón adulto) se realiza en la piel laxa del cuello o el flanco usando agujas 26 1/2 gauges. La aguja se inserta en la piel paralela a la columna vertebral.

Intradérmica

La inyección intradérmica se usa para evaluar reacciones inmunológicas o para medir respuestas inmunes. Se pueden inyectar 0,05 ml en el pulpejo palmar o plantar. La aguja utilizada para esta maniobra es de 27 gauges.

Intracraneal

Esta vía se utiliza para el ensayo de virus neurotrópicos, como por ejemplo, el virus rábico. Se utilizan animales lactantes. La aguja debe ser de 27 gauges para neonatos y de 24 gauges para lactantes; ésta se introduce bajo la piel en la región central del hueso parietal lateralmente a la sutura central, lo que evita alcanzar el seno venoso transverso; luego se la rota lentamente hasta atravesar el hueso y se avanza hasta una profundidad de 1 a 4 mm, dependiendo del tamaño del ratón. Se pueden inyectar 0,015 y 0,03 ml en neonatos y lactantes, respectivamente.

Las soluciones deben tener una temperatura aproximada a la del cuerpo, y luego de la inyección, los animales deben mantenerse en lugares templados para reducir la posibilidad de un shock térmico.

Intramuscular

Esta vía es muy poco usada, debido a la pequeña masa muscular del ratón. La soluciones acuosas tienen la misma absorción por la vía subcutánea, pero se la utiliza para las sustancias oleo-

sas, siendo el volumen del inóculo de 0,05 ml. Se realiza en la región anterolateral del muslo (grupo de músculos cuádriceps femorales), con agujas 22 a 26 gauges.

Intraperitoneal

Para evitar lesionar el hígado, el estómago y el bazo, la inoculación intraperitoneal debe realizarse en el cuadrante derecho inferior del abdomen. El ratón se coloca en decúbito dorsal y levemente inclinado hacia craneal, para que se produzca el desplazamiento visceral; luego se inserta en la piel una aguja de entre 23 y 26 gauges, se la lleva hacia craneal 1 o 2 mm y se la introduce perpendicularmente en la cavidad abdominal; esto se hace para evitar que los orificios de inoculación coincidan y salga el inóculo por ellos. Se puede inocular por esta vía hasta 1 ml.

Intravenosa

Esta inoculación se realiza en las venas laterales y dorsales de la cola. Es relativamente fácil, inmoviliza previamente al ratón y se dilatan las venas con alcohol o calor. En los ratones albinos, las venas se visualizan fácilmente, siendo más difícil en los animales con manto de color. Las agujas a utilizar dependen del tamaño del ratón; las medidas habituales, varían entre 26 y 30 gauges.

Otros sitios para la inoculación intravenosa son la vena yugular externa, la vena metatarsiana dorsal, la vena sublingual y el plexo oftálmico. El volumen a inocular es de 0,01 a 0,2 ml.

EXTRACCION DE SANGRE

Se han desarrollado varias técnicas para la recolección de sangre en ratón.

Seno orbital

La sangre venosa se obtiene fácilmente del seno orbital; se sujeta al ratón y se tira suavemente la piel hacia caudal hasta la protrusión del ojo.

Con una pipeta Pasteur o un tubo capilar se inserta en el ángulo medial de la órbita, rotando con suavidad hasta penetrar en el seno orbital; normalmente el ojo no se lesiona, pues el seno orbital se encuentra por debajo de él. El tubo o la pipeta se llena por capilaridad rápidamente. Pueden obtenerse pequeñas cantidades de sangre entre 30 y 80 µl en ratones jóvenes de 14-16 días de edad. De ratones adultos se obtiene mayor cantidad de sangre, hasta 0,5 ml, utilizando el tubo o la pipeta con anticoagulante.

Venas y arterias caudales

Se obtiene sangre en pequeños volúmenes sencillamente por amputación de la punta de la cola, y se la recolecta en tubos capilares heparinizados.

Intracardíaca

Se pueden obtener mayores volúmenes de sangre directamente por punción cardíaca, utilizando diferentes técnicas.

Siempre el animal debe estar anestesiado.

Para realizar la técnica de punción cardíaca se coloca al ratón en decúbito dorsal, se ubica la apófisis xifoides y se inserta la aguja perpendicularmente a la columna vertebral; si se punza el corazón, se percibe el choque cardíaco; se aspira con el émbolo y comienza a fluir la sangre (las medidas de las agujas deben ser de 20 a 25 gauges). El volumen de sangre dependerá del peso corporal del ratón, se puede sangrar el 1% del peso corporal cada 2 semanas, el 3% del peso corporal 1 vez al mes y el 6% es sangrado a blanco. Por ejemplo, si se quiere obtener un volumen del 1% del peso de un ratón de 20 g, se sangran hasta 0,2 ml, del 3% se sangran 0,6 ml y del 6% se obtienen hasta 1,2 ml.

EUTANASIA

Se conoce con este nombre el sacrificio deliberado de un animal, siguiendo una técnica indolora, rápida, que permita un tránsito tranquilo desde la plena conciencia hasta la muerte.

Entre los métodos más empleados se encuentra la administración intraperitoneal, endovenosa e intracardíaca de una sobredosis de un anestésico inyectable. Se calcula una dosis 3-4 veces mayor que la normal.

Otro método de eutanasia se realiza mediante la dislocación cervical, sólo para un pequeño número de animales.

Uno de los métodos más recomendados es el CO_2. Para esto se debe contar con una cámara lo suficientemente grande como para permitir el ingreso de los animales dentro de sus propias cajas, lo que disminuye el estrés. Los animales deben estar expuestos a este gas a los 3-5 minutos del cese de la respiración. Los neonatos son resistentes; por lo tanto, se requiere de un método alternativo o exponerlos por más de 15 minutos.

RATA

ORIGEN

La rata de laboratorio es la variedad doméstica de la rata noruega marrón, la cual se encuentra en climas fríos, templados y subtropicales de Europa y Norteamérica. En la actualidad es una especie cosmopolita.

TAXONOMIA

Clase: mamífero.
Orden: Rodentia.
Familia: Muridae.
Género: *Rattus.*
Especie: *norvegicus.*

BIOLOGIA GENERAL

La rata es un animal con una alta adaptabilidad; al igual que el ratón, es capaz de sobrevivir a una amplia variedad de condiciones climáticas y de hábitats. Puede ser solitaria o vivir en grandes grupos. En la naturaleza compite con el hombre por el alimento. El hacinamiento combinado con la escasez de alimento puede llevarlas a competir entre ellas, sucumbiendo las más débiles. En el laboratorio, el canibalismo se evita alimentándolas *ad libitum*.

Los sentidos del olfato y la audición están muy desarrollados, pueden oír altas frecuencias, más de 80 kHz en el rango ultrasónico. La máxima sensibilidad de audición se sitúa en un rango de 15 a 25 kHz. La visión de la rata es pobre; su retina está compuesta casi enteramente de rodocitos y no muestra células de Purkinje. La rata es ciega a la luz de longitud de onda del rojo; la visión en colores no existe, pero es eficiente ante la luz de baja longitud de onda. Los receptores táctiles están particularmente bien desarrollados sobre la cabeza, alrededor del hocico, en los pulpejos palmares y plantares, y sobre la cola. Esta es usada por el animal para orientarse sobre el terreno y para el equilibrio durante el salto; además sirve como principal órgano de regulación de la temperatura. La rata tiene gran instinto exploratorio, pero es cautelosa y evita el peligro. Acostumbra a repetir estímulos por lo que puede ser entrenada para tolerar procedimientos no placenteros, tales como inyecciones.

Es capaz de controlar su consumo de alimento dejándolo o almacenándolo en la caja, pero puede volverse obesa si la caja no es suficientemente grande como para hacer ejercicios. En la naturaleza, en condiciones de alimentación o espacio restringidos, la rata roe todo, aun metales como el hierro lo cual hace que sus dientes incisivos se afilen. Habitualmente va en busca de alimento y vuelve a su hábitat luego de una excursión nocturna.

Normalmente estos animales viven más de 3 años si están en buen estado de salud, pero la mayoría de ellos, en particular cuando son convencionales, presentan enfermedades generalmente respiratorias progresivas, por lo que su vida se reduce a 1 año o año y medio. En el caso de los animales SPF, el promedio de edad supera los 3 años. La vida reproductiva dura hasta los 14 meses, en dicho período pueden producir entre 6 y 10 camadas, dependiendo de la cepa.

Los machos son más agresivos que las hembras pero, si se manejan adecuadamente, la agresión es rara, de forma que, al contrario de lo que ocurre con los ratones, pueden permanecer alojados en grupo; pero si hay peleas, el perdedor generalmente resulta herido o muerto. Si se observan signos de agresividad, por ejemplo lesiones en el dorso o en la cola, hay que sacar de la caja tanto al agresor como al agredido.

Los machos y las hembras pueden mantenerse en la misma caja, pero es aconsejable sacar al macho antes del parto y durante la lactación. Previo al parto, la hembra prepara el nido. El neonato permanece allí cubierto con el material de la cama para mantener la temperatura corporal.

Es muy raro que se produzcan fenómenos de canibalismo; éste puede ser indicador de mal manejo de la colonia o cuidados insuficientes. Si a estos animales se los maneja mal o hay alguna deficiencia nutricional, por ejemplo, avitaminosis, pierden su docilidad y atacan a las personas que los manejan.

Son de hábitos nocturnos, por lo que se toman muy activos durante la noche.

PRODUCCION

Microambiente

Las cajas o jaulas pueden ser de plástico o metálicas, con tapas soldadas de acero inoxidable o alambre galvanizado. En caso de emplear alambre, la malla no debe tener una sección superior a los 0,85 cm^2. Los animales adultos con un peso corporal aproximado de 300 g tienen una exigencia de espacio de alrededor de 250 cm^2. Las hembras con sus crías necesitan un espacio de 1000 cm^2.

A medida que van creciendo y luego del destete, si se alojan en grupos numerosos, pierden peso debido a la densidad animal. Las ratas no poseen glándulas sudoríparas, sólo hay unas pocas en las almohadillas plantares. Al igual que en el ratón, la cola es la principal fuente de pérdida de calor y por mecanismo de vasodilatación de las venas caudales se produce la disipación del calor hacia el medio ambiente. Si las ratas están hacinadas y la temperatura ambiental es elevada, falla el sistema termorregulador, pero tienen un último mecanismo de defensa, representado por una hipersalivación determinada por el gran desarrollo de las glándulas salivales, que les permite cubrir todo su cuerpo con saliva; finalmente, si la temperatura sigue aumentando, la rata muere rápidamente de hipertermia.

El lecho debe tener las mismas características que para el ratón. La higiene de las cajas o jaulas se realiza con la frecuencia que se estime necesaria, con el objeto de mantener siempre a los animales limpios y secos. En general, de 1 a 3 cambios por semana es suficiente, dependiendo de la densidad de animales por jaula y de la ventilación.

La alimentación es *ad libitum*, igual que en el ratón.

En cuanto al agua, ésta se suministra en bebederos automáticos o en mamaderas.

Macroambiente

La temperatura en las habitaciones debe mantenerse entre los 18 y 25 °C, aunque la ideal se sitúa en 24 +/- 1 °C.

La humedad relativa debe ser entre el 50 y 60%; por debajo de ésta y sumado a una temperatura elevada se produce el fenómeno de la "cola anillada" o "*ring tail*" (constricciones localizadas de la cola), sobre todo en animales jóvenes.

La ventilación es muy importante; deben establecerse entre 10 y 15 cambios de aire por hora, ya que la concentración de amoníaco irrita el tracto respiratorio de las ratas.

Este animal es muy sensible a los polvos ambientales (aserrín, polvillo de los alimentos y medio ambiente) y gases (amoníaco y sulfurados). Una de las primeras respuestas hacia estas irritaciones es el aumento de la actividad de las células caliciformes del epitelio traqueal y bronquial.

Tanto la irritación interna como la crónica producen una firme acumulación de tejido linfático a nivel pulmonar, de la bifurcación bronquial, de los bronquiolos, y alrededor de los vasos sanguíneos. En esta situación, una infección como, por ejemplo, *Micoplasma* spp, *Pasteurella* spp, Virus Sendai, etc., puede llevar a una enfermedad pulmonar progresiva de la cual el animal nunca se recupera completamente. El filtro de aire ofrece la posibilidad de prevenir estos inconvenientes.

Los ruidos afectan más a las ratas que a los ratones, y cuando son muy intensos provocan fenómenos de canibalismo.

La iluminación es tan importante en la rata como en el ratón, especialmente en la regulación del ciclo estral y reproductivo. Se recomiendan 12 horas de luz y 12 de oscuridad.

PROGRAMA REPRODUCTIVO

Las ratas son poliéstricas continuas, con ligeras variaciones estacionales en cuanto a la fertilidad. Tras el parto se produce, a las 48 horas, un estro fértil. Si éste se utiliza hay que tener en cuenta que se produce un retraso en la implantación de los embriones, de 3 a 7 días, lo que impide precisar, exactamente, las fechas de los partos, dificultando el manejo y programación de la colonia.

Al nacer, la rata pesa aproximadamente 5 g, no presenta pelo, el conducto auditivo está cerrado, al igual que los ojos. Es de color escarlata y luego de 2 días adquieren un color rosado. Estos animales son muy activos, y a la hora de nacidos ya son capaces de mamar. El pelo comienza a aparecer al cuarto día, y al décimo ya están cubiertos completamente. Hacia el día decimotercero comienzan a abrir los ojos y el oído externo, hacia el decimosexto pueden ingerir alimento sólido y tomar agua.

El destete se realiza a los 21 días, con un peso de 40-50 g. De no haber sido fecundado en el estro posparto, el ciclo se reinicia a los 2-4 días posdestete.

Sistemas de crías

Son iguales a los del ratón.

Ciclo estral

La duración del ciclo estral es de 4-5 días, el estro dura 12 horas aproximadamente y, al igual que en el ratón, se produce casi siempre durante la noche.

El efecto Witthen también se da en estos animales, aunque con menor intensidad que en las ratonas. En ocasiones se han descrito ovulaciones inducidas.

La gestación en la rata tiene una duración de 20-22 días. Como se mencionó anteriormente, la lactación simultánea puede alterar la implantación de los embriones en 5-7 días. Al contrario de la ratona, en esta especie no se produce el efecto Bruce.

A las 12-14 horas de la cópula, se detecta en la vagina un tapón que a veces se desprende. Asimismo se puede constatar la presencia de espermatozoides en los frotis vaginales.

El tamaño de la camada oscila entre 6 y 12 crías, dependiendo de la cepa, y va reduciéndose, así como la fertilidad, tras el octavo y décimo parto.

La infertilidad se da tanto en el macho como en la hembra. Una de las causas puede ser la falta de vitamina E, la cual puede causar esterilidad permanente en el macho, mientras que en la hembra es reversible. La temperatura ambiente muy elevada también puede causar infertilidad en el macho.

MANEJO

La rata posee un temperamento tranquilo, aun cuando se la someta a tratamientos continuos o no se la maneje por largos períodos. Estos animales son pacíficos si se los manipula correctamente.

El adulto no debe levantarse por la cola, ya que esto le puede causar estrés. El pánico que sufre hace que el animal gire y se desprenda la piel de este apéndice.

Debe sujetarse firmemente por el cuello y el dorso con los dedos pulgar, índice y medio, y con el anular y meñique debajo del abdomen. En esta posición, las ratas están más relajadas. Si el animal es grande, por ejemplo, más de 250 g, se usa la otra mano.

El éxito de este método dependerá de la presión aplicada inicialmente al tomar la rata: mucha presión dificulta la respiración y si no es suficiente el animal intentará huir.

Hay que tener mucho cuidado cuando la hembra está en avanzado estado de preñez, dándole sostén en los cuartos posteriores. Cuando se manejan ratas con camada siempre hay que esperar que la madre salga del nido para tomarla. Para manejar a las crías se debe sacar a la madre previamente.

Sexado

Los testículos son evidentes a edades muy tempranas, especialmente si el animal se sostiene en forma vertical, lo que produce el paso de dichos órganos al escroto. Los machos poseen, asimismo, una amplia papila genital y una distancia urogenital mayor que la de las hembras (5 mm en los machos y 2,5 mm en las hembras a los 7 días de edad). Entre los días octavo y decimoquinto es posible distinguir las mamas en las hembras.

ADMINISTRACION DE FARMACOS Y OTROS COMPUESTOS

Tópica

Igual que en el ratón.

Oral

Aquellas sustancias altamente palatables pueden administrarse mezclándolas con el agua de bebida o el alimento; las no palatables deben administrarse por medio de sondas gástricas.

Una sonda adecuada debe tener un diámetro de 15 a 16 gauges y de 10 a 12 cm de largo. Para introducir la sonda, la rata debe asirse firmemente por la piel del dorso y el cuello; esto asegura que la cabeza y el cuello queden extendidos formando una sola línea. Luego la sonda se introduce en la boca a través del espacio interdental y avanza lentamente, rotando con suavidad para que sea fácil el pasaje dentro del esófago y el estómago. Hay que tener mucho cuidado de que la sonda no penetre por la tráquea.

Subcutánea

La técnica es igual a la del ratón. La cantidad del inóculo varía entre 1 y 2 ml.

Intradérmica

El sitio de inyección se ubica generalmente en la piel laxa del dorso, previa depilación de la zona. Se utiliza una aguja con un diámetro de 26 gauges y se la inocula paralela a la superficie de la piel. La aguja debe avanzar unos pocos milímetros, teniendo cuidado de no administrar el inóculo por vía subcutánea. La cantidad a inocular es de alrededor de 100 µl.

Intraperitoneal

La técnica utilizada ya fue descrita en el ratón. El volumen a inocular es de 2 a 3 ml.

Intramuscular

El sitio de elección para esta vía son los cuádriceps femoral o los tríceps. La inyección en los miembros posteriores puede causar molestias al animal. Hay que tener cuidado de no dañar el nervio ciático. La inoculación debe realizarse en pequeños volúmenes para no causar irritación ni dolor; se inocula entre 0,1 y 0,2 ml.

Intravenosa

Los vasos más utilizados son las venas laterales de la cola, que son fáciles de ver en los animales jóvenes. En las ratas adultas es más dificultoso identificarlos. Hay que entibiar la cola con una lámpara o sumergirla en agua tibia, para dilatar los vasos y así visualizarlos. La cantidad de inoculación es de 1 ml y debe administrarse lentamente con una aguja de hasta 23 gauges.

Intracardíaca

Igual que en el ratón.

COBAYO

ORIGEN

El cobayo es originario de Sudamérica y fue introducido en Europa por los españoles en la mitad del siglo XVII, como mascota. No se sabe con exactitud la fecha cierta en que se lo usó por primera vez como animal de experimentación, pero se estima que fue a comienzos del siglo XIX.

No se conoce el origen exacto del cobayo (*Cavia porcellus*), pero se sabe que fue domesticado por las culturas preincaicas.

TAXONOMIA

Clase: mamífero.
Orden: Rodentia.
Familia: Cavideae.
Género: *Cavia.*
Especie: *porcellus.*

BIOLOGIA GENERAL

Son animales rápidos, que no hacen cuevas, pero en la naturaleza viven en pequeños grupos de 5 a 10 individuos en cuevas o en refugios abandonados por otros animales. Se adaptan rápidamente a la vida en cautiverio y son sociables. Cuando se sujetan o transportan hay que tener en cuenta que, a pesar de no morder y parecer muy dóciles, son muy sensibles a los movimientos y pueden quedar estáticos durante 30 minutos o más si sienten miedo o temor.

El largo del cuerpo, incluida la cabeza, es aproximadamente de 140 mm al nacer y de 310 mm en los animales adultos. Estos últimos pesan entre 700 y 1300 g. No tienen cola y poseen 3 dedos en las patas traseras y 4 en las delanteras.

La longevidad es de entre 4 y 5 años, pero se puede acortar 2 años en las hembras reproductoras.

En los tipos salvajes, el pelaje es rústico, y el pelo, largo y grisáceo, o amarronado. Sin embargo, los cobayos domésticos tienen el pelo largo y fino, y éste puede presentar remolinos con una gran variedad de colores.

Son muy tímidos y generalmente dejan sus moradas a la noche para buscar alimento. Comen una amplia variedad de vegetales; les gusta especialmente la alfalfa.

Los machos son más agresivos que las hembras, pelean vigorosamente, en particular en presencia de hembras en estro o cuando se tiene que establecer la dominancia en una tribu. Esta está influenciada por la receptividad de una hembra con la cual el macho está asociado.

La vocalización parece jugar un papel importante en el comportamiento social de los cobayos y llama la atención de los cuidadores. Se han registrado al menos 11 vocalizaciones diferentes, algunas de las cuales no son audibles para el humano.

Es frecuente que los animales de más edad agredan y muerdan por lo común en las orejas a los animales más jóvenes y/o subordinados.

PRODUCCION

Microambiente

Para el alojamiento de esta especie hay una gran variedad de habitáculos, incluyendo jaulas en estantes fijos o *racks* móviles.

Las jaulas se presentan en una amplia diversidad de cajas y materiales: jaulas de metal y plásticas, con piso sólido o de alambre, o con piso sólido y lecho, lo que permite a los animales vivir en un ambiente cálido. La limpieza es trabajosa por el tamaño de los cobayos, ya que para realizarla éstos deben trasladarse a otras jaulas, lo cual es más problemático cuando la hembra está preñada o con crías pequeñas.

Lo que se utiliza actualmente son jaulas con piso de alambre y bandeja inferior recolectora de acero inoxidable. No se pierde tanto tiempo en la limpieza y tampoco se cambia la cama tan frecuentemente.

Los animales adultos deben disponer de una superficie de 652 cm^2/animal.

El lecho puede ser de viruta de madera, tiras de papel absorbente o diversos productos vegetales, pero no debe ser palatable y debe ser abundante.

Los bebederos pueden ser los que se utilizan para la rata y el ratón, pero el cobayo tiende a tomar agua con el alimento en la boca, lo que ocasiona que éste se introduzca dentro del bebedero y lo obture, por lo cual, en el caso de utilizar bebederos automáticos, es importante controlarlos diariamente.

El alimento se le administra *ad libitum* en comederos tipo tolva, delante de la jaula, donde sólo pueda introducir la cabeza, para evitar que defeque sobre el alimento. El cobayo es incapaz de sintetizar vitamina C, por lo que requiere una dosis alimentaria diaria exógena de 10 mg por kg de peso vivo de ácido ascórbico. Si los alimentos no lo contienen, deberán añadirse 200 mg/litro de vitamina C en el agua de bebida, teniendo en cuenta que la actividad de dicha vitamina en los bebederos disminuye en un 50% en el plazo de 24 horas debido a que se oxida en contacto con el aire.

Macroambiente

La temperatura adecuada se encuentra en los 24 +/-1 °C. La ventilación es de 8 a 20 recambios de aire por hora. Las altas temperaturas ambientales, sin la correspondiente renovación de aire, predisponen a los animales a contraer enfermedades respiratorias. La humedad relativa debe oscilar en función de la temperatura entre 30 y 70%. Los cobayos son muy sensibles a los ruidos, al igual que las otras especies.

El período luz/oscuridad debe ser de 12 a 16 horas luz/12 a 8 horas oscuridad.

REPRODUCCION

La cobaya es poliéstrica continua, presenta un ciclo estral de 16 a 17 días. Es sexualmente madura a partir de las 4 o 5 semanas de edad, aunque la edad óptima del apareamiento es los 3 meses. Se puede reconocer el estro al observar la membrana vaginal abierta y cambios de conducta, como intentar montar a otra hembra.

La duración de la gestación es de aproximadamente 68 días. Las hembras preñadas producen leche antes del parto y pueden amamantar a otras crías antes de éste.

Las crías nacen bien desarrolladas, con pelo, ojos y oídos abiertos, los dientes bien formados, y caminan en forma inmediata. A las pocas horas pueden ingerir alimento sólido. Generalmente las hembras gestantes paren de 1 a 4 crías dependiendo de la edad de la madre y de un peso aproximado de 40 g. El destete se realiza entre los 14 y 21 días.

Se utilizan los sistemas tanto monogámico como poligámicos. En el primer caso, las hembras están juntas durante el período reproductivo, son comunes los apareamientos posparto lo que permite que cada hembra tenga aproximadamente 5 camadas al año; mientras que en los grupos poligámicos se coloca a un macho con 8 a 10 hembras que permanecen juntas durante su edad reproductiva.

MANEJO

Los cobayos son animales muy tímidos y nerviosos. Cuando el operador se aproxima, se asustan y corren a su caja o jaula, lo cual dificulta su sujeción.

El animal debe sujetarse con ambas manos; una rodea las escápulas y la otra soporta el peso del tren posterior. Se deben tomar con firmeza. Hay que tener cuidado porque este animal, a pesar de que rara vez muerde, posee dientes muy largos y filosos. Cuando se sujeta a las hembras preñadas, debe hacérselo delicadamente, sosteniendo siempre el peso del tren posterior del animal con la mano abierta.

Identificación

No hay un método ideal de identificación. Se utilizan tatuajes en las orejas con letras de 0,5 por 0,25 cm, tintas negras para

animales albinos y verdes para animales de manto de color, pero son difíciles de leer. También se utilizan caravanas, pero tienen el inconveniente de que se las suelen arrancar durante las peleas.

Los animales de más de un color se identifican por la disposición de manchas y patrones de color. Para identificaciones temporarias se utilizan colorantes como el ácido pícrico, la fucsina, el violeta de metilo, el azul tripano, etc.

Sexado

El macho se sexa ejerciendo una leve presión en la zona genital, con esta maniobra se exterioriza el pene y los testículos descienden a las bolsas escrotales.

La hembra posee una abertura vaginal con una membrana que se debe poner de manifiesto presionando levemente con el índice y el pulgar.

ADMINISTRACION DE FARMACOS Y OTROS COMPUESTOS

Oral

La técnica es igual que en las ratas.

Subcutánea

La técnica es igual que en las ratas.

Intramuscular

La técnica es igual que en las ratas.

Intradérmica

La técnica es igual que en las ratas.

Intravenosa

Los cobayos tienen pocas venas superficiales; éstas son las metatarsianas y la vena dorsal del pene. Son pequeñas y frágiles, y por lo tanto, la inyección intravenosa es difícil en esta especie.

El animal debe sostenerse con la ayuda de un asistente sobre una superficie firme. Las venas metatarsianas pueden dilatarse comprimiéndolas por medio de una banda elástica. Es posible introducir un catéter con una aguja muy fina dentro de la vena para realizar inyecciones repetidas.

La inyección en las venas peneanas se realiza con el animal anestesiado, ya que causa considerables molestias.

Se exterioriza el pene y se lo sostiene entre el dedo pulgar y el índice para observarlas; al introducir la aguja hay que evitar dañar las venas ya que son muy frágiles.

Intracardíaca

La técnica es igual que en las ratas.

CONEJO

ORIGEN

El conejo (*Oryctolagus cuniculus*) existe como tipo silvestre y doméstico. Se utiliza como productor de carne, piel, animal de laboratorio y como mascota.

Es originario de la península ibérica, y de allí se extendió a distintas regiones del Mediterráneo y posteriormente hacia el oeste de Europa.

TAXONOMIA

Clase: mamífero.
Orden: Lagomorpha.
Familia: Leporidae.
Género: *Oryctolagus*.
Especie: *cuniculus*.

BIOLOGIA GENERAL

Pertenece al orden Lagomorpha, se diferencia de los roedores por el segundo par de incisivos superiores y es duplicidentado.

Sus ojos son prominentes y con campos visuales independientes y panorámicos, junto con un pequeño campo binocular, lo que le permite un amplio rango de visión. El sentido de la audición y el olfato también están bien desarrollados.

Es un animal herbívoro y su aparato digestivo presenta ciertas características de adaptación, como por ejemplo, la naturaleza de los dientes, la abundante producción de bilis, el intestino voluminoso y el ciego que termina en un apéndice vermiforme bien manifiesto. La característica que distingue a este animal es el hábito de la cecotrofia. Consiste en la ingestión de *pellets* de materia fecal blanda que es tomada directamente del ano. Estos pellets contienen el doble de proteína y la mitad de fibra que los de materia fecal dura. Esto se debe a que el conejo presenta en el ciego bacterias productoras de vitamina B. La cecotrofia comienza entre la tercera y cuarta semana de vida; aquellos que no pueden realizarla mueren dentro de las 3 semanas posteriores al nacimiento.

En la naturaleza, el conejo se adapta a una amplia variedad de condiciones ambientales, desde el desierto semiárido, con un promedio de lluvia anual menor a 180 mm, a climas subtropicales con hasta 1870 mm de agua caída por año. Sin embargo, el clima de pradera es el ideal para esta especie.

Los hábitos varían de acuerdo con el ambiente; así, en regiones desérticas viven en cuevas, mientras que en regiones más húmedas cavan galerías.

Las hembras silvestres alcanzan la madurez sexual entre los 4 y 6 meses de edad y los machos un poco más tarde. Si bien los nacimientos ocurren durante todo el año, alcanzan un pico máximo en primavera. El tamaño de la camada en la naturaleza es de aproximadamente 5 gazapos.

PRODUCCION

Microambiente

Lo mismo que cualquier otro animal de laboratorio, el conejo debe disponer de un área de alojamiento apropiada a su tamaño y peso, de modo que para un peso vivo inferior a 2 kg es aconsejable una superficie de 0,14 m^2; para animales de hasta 5 kg, un área de 0,28 m^2, y para pesos superiores, de 0,37 m^2. Las hembras en lactación exigen una superficie adicional de 0,19 m^2.

Actualmente se usan jaulas metálicas, que son de fácil mantenimiento; las medidas óptimas son de 48 cm de ancho por 61 cm de largo y 46 cm de altura. Presentan una abertura en la parte posterior para colocar otro compartimiento que los reproductores usan para criar a sus gazapos. Su pared anterior debe estar provista de comederos tipo tolva y bebederos automáticos o mamadera. El tamaño de la malla de alambre del piso de las jaulas es muy importante. La separación debe ser de 26 mm, de este modo se evitan problemas en los tarsos.

Luego del destete, los jóvenes se trasladan a jaulas o cajas de 1,2 m de ancho por 1,5 m de largo y 0,7 m de altura. Cada jaula puede albergar a 20-25 animales recién destetados. En ocasiones, los conejos que han alcanzado la pubertad resultan sumamente

agresivos hacia sus congéneres, de tal forma que, de alojarse juntos, los machos pueden castrarse los unos a los otros. En cuanto a las hembras y, al margen de las lesiones que pudieran infligirse, el agrupamiento homosexual puede producir seudogestación. En consecuencia y a partir de los 3 meses de edad, es aconsejable alojar a los animales en jaulas individuales.

Cuando se acerca el momento del parto deben colocarse nidos. Para crías de tamaño mediano se utilizan nidos de 30 cm de ancho por 38-40 cm de largo, por 25 cm de alto que pueden dejarse instalados dentro de la jaula hasta que los gazapos tengan un tamaño equivalente a la tercera parte del peso del adulto.

Los conejos deben alimentarse siempre con un preparado comercial de alta calidad, en forma de *pellet*, y administrado *ad libitum*. Un conejo consume diariamente alrededor de 5 g de alimento por cada 100 g de peso vivo. Existe una gran variedad de utensilios para el suministro del agua y el alimento. Los recipientes abiertos son menos higiénicos que las botellas y tolvas, ya que los conejos desarrollan el hábito de orinar y defecar dentro del recipiente del agua y la comida. Lo ideal es usar sistemas automáticos de suministro de agua y tolvas automáticas para el alimento.

Macroambiente

Luz: aunque es común el uso de luz natural, se recomienda aumentar las horas luz cuando la duración del día sea menor a 12-14 horas.

Temperatura: aunque toleran grandes fluctuaciones térmicas (entre –7 y 28 °C), se recomienda un rango de 15 a 20 °C.

Ventilación: es muy importante una buena ventilación. Se recomienda entre 15/20 cambios de aire por hora. Cuando hay una buena rutina de limpieza y la densidad animal es baja, se puede reducir el número de recambios de aire.

Humedad: debe regularse entre 50 y 55% de humedad relativa.

Ruidos: se deben evitar, ya que interfieren en actividades tales como la reproducción y en el cuidado de las crías.

PROGRAMA REPRODUCTIVO

Su longevidad es de 6-7 años, aunque no es excepcional el que algunos ejemplares alcancen los 15 años.

La edad reproductiva útil del conejo se extiende desde los 6 meses hasta los 3 años, siendo suficiente un macho por cada 10 hembras. En las explotaciones intensivas, las hembras se cubren a las 2 semanas de producido el parto, destetándose los gazapos a las 4 semanas, a pesar de que un destete posterior (6-8 semanas) garantizaría una mejor salud y crecimiento de los gazapos. En estas explotaciones, y con un buen manejo, cada coneja puede proporcionar hasta 8 camadas por año.

La embriología del conejo se ha estudiado exhaustivamente. El óvulo fecundado, cuya medida es de 160 µm de diámetro, es el más grande entre los mamíferos y también es de rápido desarrollo. El blastocisto es especialmente grande, 5 mm o más antes de su implantación. Estas características son útiles en el momento de controlar sustancias embriotóxicas.

El tiempo de gestación varía entre 31 y 32 días; cuando las camadas son pequeñas, se alarga un poco. El tamaño de la camada es de alrededor de 6 animales. El peso al nacer varía desde menos de 30 g en las razas pequeñas a más de 70 g en las grandes, y es inversamente proporcional al peso; por ejemplo, en una cepa pequeña, el peso promedio en el momento del nacimiento es de aproximadamente 35 g con un tamaño de camada de 10 animales y de 70 g cuando nacen 2 gazapos.

Detección del celo, receptividad sexual y diagnóstico de preñez

La técnica del frotis vaginal no es adecuada para la detección del estro ya que la coneja es un animal de ovulación inducida y, en consecuencia, no se puede hablar de un ciclo ovárico. Se puede diagnosticar por la apariencia de la vulva, la cual se ve más alargada y de un color rojo-violáceo por la influencia de los estrógenos. Sin embargo, no es un método seguro, ya que hay hembras que a pesar de presentar estas características no se preñan y otras sin estos signos sí lo hacen.

En los últimos 3 días de gestación, la coneja construye su nido con pelo de su abdomen junto con la paja o viruta que se le proveyó para tal fin.

Tras un servicio infértil es frecuente la presentación de seudopreñez, estado que también se produce ante la presencia del macho o al ser montada por otra hembra. Cualquiera de estos estímulos desencadena la ovulación y el cuerpo lúteo subsecuente tiene una persistencia de 15-17 días con secreción de progesterona, que promueve el desarrollo mamario y hace que la hembra inicie la construcción del nido.

Parto y canibalismo

Normalmente la gestación dura entre 31 y 32 días, con una camada pequeña puede durar 1-2 días más. Por lo general, el parto se produce en horas tempranas de la mañana y pasa inadvertido. Algunas veces se produce en dos tiempos, por eso es recomendable la palpación posparto para cerciorarse de que han parido todas las crías. El canibalismo es común en esta especie, generalmente se produce el día del parto.

El conejo nace inmaduro y depende totalmente de la madre; presenta el pelo muy corto y enseguida pierde calor, lo que puede ser fatal para los gazapos si se caen del nido.

Es sorprendente el desarrollo que se produce en la primera semana. El décimo día abre los ojos. A la tercera semana puede salir del nido y comer alimento sólido.

MANEJO

Sujeción y sexado

La sujeción debe ser suave, pero firme; los conejos perciben la inseguridad y forcejean, y pueden producirse fracturas en el animal o heridas en el manipulador. El conejo se sujeta por la piel laxa del dorso y para inmovilizarlo se pasa el antebrazo libre entre los miembros anteriores y posteriores recorriendo el abdomen; si con el otro antebrazo que lo sujeta por el dorso se comprime gradualmente a lo largo de la columna vertebral, se logra inmovilizar al animal, que a su vez queda en una situación cómoda. En cualquier caso conviene recordar que las orejas del conejo son sumamente frágiles y sensibles, por lo que no se deben emplear para sujetarlos o levantarlos.

En cuanto al sexado, los machos jóvenes presentan una abertura genital protuberante, sumamente marcada; en cambio, las hembras tienen una abertura poco manifiesta. En los machos adultos, el escroto es perfectamente visible, de localización inguinal y carente de pelo.

Identificación

Se utilizan métodos permanentes, como el uso de anillos, tatuajes, muescas, clips o botones de colores con un número de

código en las orejas. Estos últimos no se recomiendan porque suelen desengancharse y lastimarlas. Para animales recién nacidos se recomienda la marcación por medio de muescas o con colorantes como el violeta de genciana. Existe una gran variedad de anillos para los miembros posteriores que se colocan en la articulación del tarso antes de las 8-12 semanas.

ADMINISTRACION DE FARMACOS Y OTROS COMPUESTOS

Subcutánea

Se inocula en la piel del flanco.

Intravenosa

En la vena marginal de la oreja, previamente se debe pasar alcohol para producir vasodilatación.

Intramuscular

Igual que en las demás especies.

Intraperitoneal e intracardíaca

Igual que en las demás especies.

OBTENCION DE SANGRE

Se utiliza la vena marginal de la oreja o la punción cardíaca.

EUTANASIA

Se los puede sacrificar por dislocación cervical o por sobreanestesia con pentobarbital sódico en 200 mg/kg de peso o con dióxido de carbono.

HAMSTER

ORIGEN

El hámster dorado (*Mesocricetus auratus)* o sirio es originario del Oriente Medio y es el más usado como animal de laboratorio.

TAXONOMIA

Clase: mamífero.
Orden: Rodentia.
Familia: Cricetidae.
Género: *Mesocricetus.*
Especie: *auratus.*

BIOLOGIA GENERAL

El hámster adulto pesa alrededor de 100 g. La longevidad oscila entre 18 meses y 2 años, aunque existe constancia de ejemplares que la han superado ampliamente.

Bajo ciertas condiciones de temperatura, por debajo de 4 °C, o ante la disminución de alimento o alteración del fotoperíodo, los hámsters pueden entrar en un período de hibernación, que en cualquier caso es muy reducido.

Como característica particular, estos animales presentan unas formaciones anatómicas ubicadas en la zona de la articulación mandibular, en forma de bolsas, de tejido epitelial altamente vascularizado, denominados abazones, que sirven para el transporte de sustancias alimenticias o de sus crías, cuando la hembra construye un nuevo nido. Los abazones poseen características ideales para el estudio de problemas relacionados con la microcirculación.

El hámster presenta condiciones inmunológicas particulares, razón por la cual se lo utiliza en estudios de trasplantes tumorales.

También en estos animales se pueden producir experimentalmente caries dentales con cierta facilidad, por lo que son un buen modelo en odontología.

Se han realizado numerosos estudios sobre el comportamiento de este animal, en especial en conducta maternal y en psicología.

Cuando se usan métodos apropiados de manejo, los hamsters no son naturalmente agresivos hacia el operador. El alojamiento es muy similar al de las ratas y los ratones; se pueden colocar varios animales en una misma caja siempre y cuando se hayan agrupados luego del destete porque es frecuente la agresión entre adultos.

PRODUCCION

Microambiente

El hámster se aloja en cajas plásticas, de suelo continuo, dotadas con tapa de acero inoxidable, cuya altura mínima debe ser de 15 cm. Pueden presentar un ángulo para colocar el alimento y apoyar el bebedero o la mamadera. En general, las cajas y los equipos diseñados para ratas se adecuan perfectamente para alojar a esta especie. Cabe señalar que el hámster roe el plástico, la madera e incluso los metales blandos, de forma que, hasta cierto punto, es relativamente fácil que escapen de las jaulas mal construidas o mal aseguradas.

La superficie requerida para los animales de destete es de 65 cm^2; para los de entre 5 semanas y 3 meses, de 81 cm^2, y para animales de más de 3 meses, de 97 cm^2; la hembra con cría requiere 970 cm^2.

La elección de las cajas dependerá del sistema de cría que se utilice. Existen cajas de acero inoxidable con una arista lateral que le permite al animal mirar hacia el exterior. De esta manera, pueden visualizar los movimientos del personal y se hacen más dóciles.

Este animal necesita construir sus nidos; por lo tanto, hay que colocar material suficiente para tal fin. Normalmente se emplea viruta como cama u otros productos vegetales (cáscara de arroz, girasol, etc.).

Se alimentan con un concentrado comercial que debe cumplir con los requerimientos nutricionales de esta especie y que se suministra *ad libitum*, al igual que el agua de bebida, con el mismo tratamiento que se utiliza para la rata y el ratón.

Hay que tener en cuenta que las crías empiezan a beber a los 10 días de edad, de manera que los bebederos deben situarse a una altura adecuada para que puedan alcanzarlos.

Macroambiente

En general, las recomendaciones sobre las condiciones ambientales para el mantenimiento de ratas y ratones son también adecuadas para estos animales, aunque existen variaciones estacionales en cuanto al ciclo reproductivo. Esta variación se puede reducir si se le proporciona una temperatura constante durante todo el año. La temperatura más adecuada se sitúa entre los 18 y 22 °C, siendo la más recomendable 22 +/- 1°C. Otra de las variables ambientales más importantes es la iluminación. En efecto, por debajo de las 12 horas diarias de luz para las hembras y 14 horas para los machos, se produce un bloqueo de la secreción

de gonadotrofinas hipofisarias, lo que se traduce en prolongados períodos de anestros y atrofia testicular, respectivamente.

Con condiciones adecuadas de iluminación y temperatura se evita la hibernación. La humedad relativa debe oscilar entre 30 y 70% en función de la temperatura corporal. En cuanto a la ventilación deben hacerse entre 10 y 15 recambios de aire por hora. Los ruidos deben evitarse ya que irritan fácilmente a estos animales.

PROGRAMA REPRODUCTIVO

Existen tres métodos reproductivos: reproducción monogámica, reproducción dirigida y reproducción poligámica.

1. Reproducción monogámica: es el método más adecuado para los hámsters; se aparean un macho y una hembra luego del destete y se obtienen muy buenos resultados. Las ventajas de este sistema incluyen una gran reducción de trabajo y un registro minucioso de la actuación reproductiva de los animales y del pedigree, el cual es esencial cuando se mantienen cepas endocriadas. La mayor desventaja de este sistema es el canibalismo.
2. Reproducción dirigida: ha sido tradicionalmente el método más exitoso de reproducción, aunque requiere de un trabajo más intensivo.
   Los hámsters se aparean durante la noche, ya que son de hábitos nocturnos. El procedimiento más común es colocar a la hembra en la caja del macho y observar si ocurre la cópula. Si la hembra es receptiva, se observa lordosis, y el apareamiento se produce de inmediato. Si el macho y la hembra comienzan a pelear, deben separarse lo más pronto posible, ya que la hembra puede llegar a lesionar al macho seriamente.
3. Reproducción poligámica: este método, si bien se ha utilizado con éxito, tiene la desventaja de ser muy trabajoso y estresante para los animales. Por lo general se agrupan de 1 a 4 machos con hasta 10 hembras, las que deben separarse antes del parto.

Ciclo estral y ciclo de vida

A medida que se aproxima el estro, en la hembra sexualmente madura, se produce una secreción vaginal mucosa, translúcida, ligera, filante, que pasa a ser opaca y densa.

La hembra tiene un ciclo estral de 4 días de duración. Inmediatamente luego del parto se produce un estro anovulatorio. El primer estro fértil de la hembra se produce varios días luego de haber destetado a sus crías.

La gestación tiene una duración de 15-18 días, con un promedio de 16 días. El tamaño de la camada oscila entre 4 y 16 crías, con un promedio de 11. Generalmente, en las hembras primíparas, el número es más reducido.

Cuando la hembra está construyendo el nido se recomienda colocar suficiente alimento como para no molestarla durante los 10 días subsiguientes; esto hace que el porcentaje de canibalismo baje de modo considerable. El destete se realiza a los 21 días.

Al nacer, las crías tienen el conducto auditivo y los ojos cerrados, están desprovistas de pelo y ya presentan dientes. El conducto auditivo externo se abre entre los 4 y 5 días, empiezan a ingerir alimento sólido entre los 7 y 10 días, y abren los ojos entre los 14 y 16 días. Es importante que las crías dispongan de suficiente agua ya que comienzan a comer alimento sólido precozmente.

Alcanzan la pubertad entre las 8-10 semanas, aunque existen animales precoces que a las 4 semanas están sexualmente maduros. Esto es muy importante para el manejo ya que cuando se dejan juntos a los animales luego del destete pueden ocurrir apareamientos que pasan inadvertidos para el operador. En general, la edad ideal es entre las 8-10 semanas en la hembra y 10-12 semanas en el macho. El período de vida reproductiva es de 10 meses, y durante este tiempo, la hembra produce entre 4 y 6 camadas.

MANEJO

Sujeción y sexado

Si se los maneja en forma suave y no se los somete a situaciones de estrés, los animales son dóciles. Para sujetarlos o levantarlos, es suficiente con introducirlos en un recipiente de pequeño tamaño, o tomarlos por la piel laxa del cuello, o con ambas manos, colocando los dedos alrededor del tórax, el dorso y la cola. Si los animales no están acostumbrados a que se los maneje es conveniente utilizar guantes.

En cuanto al sexado, en el macho se observa el margen perineal redondeado por la presencia del saco escrotal, mientras que la hembra presenta una forma puntiaguda. Otro rasgo distintivo es la mayor distancia anogenital y la existencia de una papila más protuberante en el macho.

Identificación

Se los puede identificar marcándolos en las orejas, al igual que en ratas, o con tatuajes, excepto en aquellos animales de piel oscura.

ADMINISTRACION DE FARMACOS Y OTROS COMPUESTOS

Las vías de inoculación, obtención de sangre, anestesia y eutanasia son las mismas que en las ratas y los ratones.

MERION

ORIGEN

El gérbil de Mongolia es originario de China, Mongolia y del este de Rusia.

TAXONOMIA

Clase: mamífero.
Orden: Rodentia.
Familia: Cricetidae.
Género: *Merion.*
Especie: *unguiculatus.*

BIOLOGIA GENERAL

El gérbil de Mongolia, especie de hábitos crepusculares, en su medio natural vive en grandes grupos familiares en sistemas complejos de galerías y túneles, excavados en el suelo arenoso y seco, donde construye sus nidos y cámaras de almacenado circulares, y deposita las semillas de gramíneas de las cuales se alimenta. Suele frecuentar las plantaciones de trigo y mijo, causando daños de consideración a los agricultores. Esta especie tiene gran capacidad termorreguladora, por lo que soporta altas temperaturas, incluso las radiaciones solares directas en las horas más calurosas del día.

Como se señaló, el gérbil de Mongolia vive en grandes comunidades, debido a que, por lo común, las camadas destetadas no abandonan el grupo familiar. Lo mismo puede ocurrir en cautiverio si se decide mantener con los padres a las camadas sucesivas; de este modo se logra una perfecta armonía en el grupo parental.

La especie no vocaliza, al menos en el rango audible humano; el tamborileo con las patas puede constituir un mecanismo significativo de comunicación o alerta. La socialización y el marcado del territorio parecen depender básicamente del olfato. Para ello, ambos sexos poseen glándulas sebáceas muy desarrolladas en la zona ventral, cercanas al ombligo.

Cuando el gérbil se somete a algún tipo de estrés en el laboratorio, aun por causas simples, como manipulación o cambio de caja, se pueden desarrollar convulsiones epileptiformes con consecuencias nocivas para el animal.

El mal manejo de los animales puede inducir a conductas agresivas hacia el operador. Casi instintivamente, los adultos que se mantienen en cajas separadas pelean cuando se unen, y esto se hace extensivo entre machos y hembras al momento del primer apareamiento, donde, por lo general, el macho suele salir derrotado y muchas veces muerto. Esto puede evitarse alojando juntos animales prepúberes.

Con respecto a la conducta sexual, los machos persiguen activamente a las hembras y muestran un patrón con repeticiones durante la cópula. La hembra durante el estro muestra una sutil lordosis.

El macho juega un papel bastante activo en el cuidado parental. Ambos sexos pasan mucho tiempo construyendo el nido.

PRODUCCION

Microambiente

Las cajas o jaulas, que se emplean habitualmente para ratas, son los alojamientos más utilizados para estos animales. El espacio vital por animal es de 125 cm^2. El lecho debe ser de viruta de madera, lo más fina y suave posible. Este puede esterilizarse a 120 °C durante 20 minutos por medio de autoclave. Los cambios y la limpieza de cajas, tapas, mamaderas, picos y tapones, deben efectuarse como mínimo 1 vez por semana. El alimento debe suministrarse *ad libitum*. Con respecto al consumo de agua en su hábitat natural es muy bajo, pero, en confinamiento, se la debe proporcionar fresca y en abundancia; consume de 7 a 10 g de alimento concentrado y 4 ml de agua por día.

Macroambiente

El rango óptimo de temperatura oscila entre los 20 y 25 °C y la humedad relativa entre el 50 y el 60%.

El merión o gérbil es una especie muy sensible, por lo que se deben evitar todos los factores que originan estrés en la colonia, como por ejemplo, los ruidos.

Al ser individuos que producen poca orina, los recambios de aire están comprendidos entre 7 y 8 por hora.

En cuanto al ciclo de luz, no se diferencia del de las otras especies, es de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

PROGRAMA REPRODUCTIVO

Debe establecerse antes de que alcancen la madurez sexual, pueden programarse grupos poligámicos, pero no es lo indicado. Las parejas monogámicas deben alojarse juntas antes de las 8 semanas de edad, o incluso antes, para que no se produzcan agresiones o rechazo sexual. La reproducción puede iniciarse a las 10-12 semanas de edad cuando los animales alcanzan un peso de 70 a 80 g.

Ciclo estral

Las hembras son poliéstricas continuas, presentan un ciclo estral cada 4-6 días. Al segundo o tercer día después del parto se observa un estro que es en un 60-80% fértil. El estro dura entre 12 y 15 horas, y se presenta generalmente en horas crepusculares.

El período de gestación oscila entre los 24 y 26 días. En el caso de que el macho cubra a la hembra en el estro posparto, la implantación de los embriones se retarda 3 o 4 días, por lo que el período de gestación se alarga hasta los 30 días.

Los partos se producen generalmente de noche, las madres comen las placentas y rara vez hay canibalismo.

El número de crías es de 2 a 4, y el destete se realiza a los 21 días.

La seudogestación es rara en esta especie y cuando se produce puede durar de 10 a 15 días.

Los meriones nacen con un peso de 2,5 a 3,5 g, con los ojos y oídos cerrados, y sin pelo; éste comienza a notarse entre el quinto y séptimo día. La erupción de los incisivos se produce a los 12 días, los ojos y oídos se abren a los 16 días y es entonces cuando comienzan a ingerir alimento sólido y beber. A los 21 días se destetan con un peso de entre 11 y 18 g (dependiendo del número de animales en la camada). El descenso de los testículos ocurre entre los 30 y 40 días, y la vagina se abre entre los 40 y 60 días. La madurez sexual se presenta entre los 63 y 84 días.

MANEJO

Una forma corriente de sujetar al merión es por la base de la cola; sin embargo, es mucho más seguro sujetarlo extendiendo la mano sobre su dorso porque al realizarlo de la primera manera se corre el peligro de desprender la piel de este apéndice.

Sexado

Los machos jóvenes tienen el escroto de color oscuro y una distancia anogenital mayor que las hembras. Ambos sexos presentan papilas genitales.

ADMINISTRACION DE FARMACOS Y OTROS COMPUESTOS

Las vías de inoculación son las mismas que para la rata y el ratón.

EUTANASIA

Se realiza de la misma manera que para la rata y el ratón.

ANESTESIA EN PEQUEÑOS ROEDORES DE LABORATORIO

Los pequeños roedores de laboratorio se anestesian tanto para realizar procedimientos experimentales como para proporcionar una sujeción humanitaria no traumática y eliminar la percepción del dolor durante procedimientos quirúrgicos.

Los fármacos utilizados deben asegurar una analgesia efectiva y una recuperación sin accidentes, libres de efectos secundarios desagradables. El investigador debe estar familiarizado con la

administración y con las condiciones farmacológicas del anestésico, para que tenga una influencia mínima sobre el trabajo experimental que se está llevando a cabo y no altere el bienestar animal durante la maniobra de anestesia.

Los problemas que surgen cuando se anestesia a los roedores de laboratorio están relacionados con el pequeño peso corporal de estas especies, con su pequeño tamaño, por lo que son susceptibles a la hipotermia, y por la limitación que existe para la administración intravenosa de fármacos debido al tamaño de las venas superficiales.

En las colonias de ratas y ratones convencionales, la aparición de una enfermedad pulmonar subclínica puede causar un fallo respiratorio durante el período de anestesia o dar lugar al desarrollo de enfermedades respiratorias graves en el período posoperatorio, por eso es tan importante mantener a los animales libres de sus microorganismos patógenos específicos.

RATA

Procedimiento

a. **Agentes inyectables**: los fármacos se administran normalmente por vía intraperitoneal (IP) o intramuscular (IM), y la dosis debe ser única y bien calculada.
Los medicamentos de elección son una combinación de: xilacina 10 mg/kg IP y ketamina 75 mg/kg IP. Se mezclan los dos compuestos en la misma jeringa y proporcionan buena anestesia quirúrgica con una duración de 30 minutos.
El pentobarbital debe diluirse para proporcionar una solución madre de 30 mg/ml y luego a partir de ésta hasta 40-50 mg/kg para ser administrada IP. Se debe tener en cuenta que el inicio de la anestesia quirúrgica se acompaña de una depresión respiratoria importante, lo cual redunda en un alto índice de mortalidad.

b. **Manejo anestésico:** es importante evitar la hipotermia de la rata anestesiada. Lo ideal es colocar al animal sobre una manta térmica, o algodón o envoltorios durante el período de recuperación posoperatorio en un ambiente a 25 +/- 1 °C.

RATON

Procedimiento

a. **Agentes inyectables**: al igual que en la rata, los fármacos se administran por vía intraperitoneal. La combinación de ketamina 80-100 mg/kg IP y xilacina 10 mg/kg IP, mezcladas en un jeringa, en dosis única, proporciona 20 a 30 minutos de cuadro quirúrgico.
El pentobarbital debe diluirse hasta alcanzar una solución madre de 6 mg/ml y administrarse en una dosis única en una dilución de 40-50 mg/kg IP de la solución madre. La variación del efecto en las distintas cepas de ratones es considerable, con tiempos que oscilan entre 50 y 250 minutos con idéntica dosis de anestésico, por lo que puede producir una sobredosis o dosificaciones por debajo de lo normal en las diferentes cepas.

b. **Manejo anestésico:** los ratones son más propensos que las ratas a desarrollar hipotermia y es esencial tomar medidas para mantener la temperatura corporal.

HAMSTER

Procedimiento

a. **Agentes inyectables:** al igual que en la rata y el ratón los fármacos se administran por vía intraperitoneal. La ketamina se administra en una dosis única de 200 mg/kg IP y la xilacina 10 mg/kg IP mezcladas en la misma jeringa. El uso del pentobarbital (50-90 mg/kg IP) en hámsters es particularmente arriesgado y a menudo produce la muerte.

b. **Manejo anestésico:** como en los otros pequeños roedores de laboratorio, la prevención de la hipotermia es de una importancia crítica.

GERBIL

Procedimiento

a. **Agentes inyectables:** la administración de fármacos anestésicos se realiza igual que en el hámster.

b. **Manejo anestésico:** igual que en el resto de las especies.

COBAYO

Los cobayos se encuentran entre los roedores más difíciles para conseguir una anestesia segura y eficaz. La respuestas a muchos anestésicos inyectables es muy variable y se observan frecuentemente complicaciones posanestésicas, como infecciones respiratorias, alteraciones digestivas y depresión generalizada e inapetencia. Estos problemas se pueden evitar mediante la selección cuidadosa de los agentes anestésicos y un alto estándar de cuidados intra y posoperatorios.

Procedimiento

a. **Agentes inyectables:** la administración de los fármacos anestésicos se puede realizar por vía intraperitoneal, subcutánea (SC) o intramuscular. La ketamina se administra en dosis de 40 mg/kg IP y la xilacina 5 mg/kg SC. Esta combinación proporciona aproximadamente 30 minutos de anestesia quirúrgica, aunque el grado de analgesia puede ser insuficiente. Si se va a utilizar pentobarbital, es mejor administrarlo a una dosis de 25 mg/kg IP y posteriormente profundizarlo con un anestésico volátil como el metoxiflurano. Las dosis más altas de pentobarbital producen una alta mortalidad en esta especie.

b. **Manejo anestésico:** igual que en el resto de las especies.

CONEJOS

Los conejos se estresan fácilmente por el manejo preoperatorio inexperto y durante la inducción con agentes anestésicos volátiles. Los efectos combinados del estrés y de la anestesia pueden provocar un fallo cardíaco y respiratorio. Con frecuencia, las lesiones preexistentes causadas por infecciones con *Pasteurella multocida* pueden causar un fallo respiratorio durante la anestesia.

Con un buen manejo preanestésico y una buena selección del método, los riesgos son mínimos.

Procedimiento

a. **Agentes inyectables:** la inyección intravenosa (IV) puede realizarse de un modo relativamente fácil usando la vena marginal de la oreja o la vía intramuscular. La administración de ketamina 35 mg/kg IM y xilacina 5 mg/kg IM produce alrededor de 30 minutos de anestesia quirúrgica. La duración de la anestesia puede prolongarse mediante el agregado de butorfanol (0,1 mg/kg) al protocolo de la ketamina/xilacina, aumentando aproximadamente a 80 minutos la anestesia quirúrgica.

Si es necesario utilizar pentobarbital (30-45 mg/kg IV), éste debe diluirse hasta una solución madre de 30 mg/ml y administrarse lentamente por vía IV.

b. **Manejo anestésico:** igual que en el resto de las especies.

RECOMENDACIONES PARA ESPECIFICACIONES SOBRE ANIMALES EN LA REDACCION DE TRABAJOS CIENTIFICOS

Todo informe de los resultados de estudios en los que se utilizan animales debe incluir suficiente información sobre éstos y sobre las condiciones en que fueron mantenidos durante la experiencia, de manera que el lector esté en condiciones de interpretar, comparar o extrapolar los resultados conociendo la manera en que la investigación se llevó a cabo.

La investigación en ciencias biomédicas está basada en la acumulación gradual de conocimientos obtenidos, ingresando y comparando datos experimentales provenientes de distintos lugares o laboratorios. Las experiencias podrán incorporarse al intelecto sólo si se conocen las condiciones bajo las cuales se han realizado y las características de los modelos utilizados.

Cuando la base de un experimento biológico es el animal de laboratorio, éste tiene sus propios patrones y particularidades específicas siendo indiferente el hecho de que se lleve a cabo en el animal propiamente dicho o en órganos y tejidos del mismo.

Se ha confirmado la influencia que ejercen los factores biológicos, físicos y químicos en las experiencias con los animales, por lo cual se concluye que aquellos son capaces de modificar los resultados alcanzados en las investigaciones.

Las conclusiones que se obtienen con un animal en particular son sólo válidas para las condiciones bajo las cuales se hayan obtenido. Estos resultados pueden utilizarse para hacer comparaciones, pero no pueden considerarse como datos definitivos, fijos o normativos, ni aun tratándose de animales genéticamente definidos y mantenidos bajo condiciones experimentales estandarizadas. Además, los resultados son válidos para hacer comparaciones si se conocen todos los datos concernientes a las condiciones experimentales. Repetir una prueba sólo por el hecho de haber sido mal registrada significa una pérdida de tiempo y dinero; más aún, significa también que los animales deberán sacrificarse inmediatamente y esto es injustificable por razones éticas.

La información que debe proporcionarse sobre los animales en los trabajos científicos debe incluir la designación de la cepa o raza, utilizando la nomenclatura internacional, el origen, la categoría genética, el sexo, la edad y el peso al comenzar la experiencia; la categoría microbiológica, incluyendo la especificación de los microorganismos presentes o ausentes en el animal; el método de transporte, y el período de cuarentena, de adaptación o de aclimatación. Se deben definir las medidas que se instrumentarán para mantener el estatus microbiológico y el equipamiento destinado al alojamiento, incluyendo el tipo y modelo de caja o jaula, el material, las dimensiones, el lecho y, si fuera posible, el número de animales por unidad.

También se deben especificar las condiciones ambientales, como la temperatura, la humedad, la iluminación y también la alimentación.

En cuanto a los procedimientos experimentales, su descripción dependerá del propósito de la prueba; sin embargo, por razones éticas deberá incluir el número de animales utilizados, la duración total, el intervalo de tiempo entre el muestreo y el procesamiento de las muestras, y los pretratamientos a que fueron sometidos los animales.

Los trabajos de investigación en los que se utilizan animales de laboratorio deben indicar la normativa, junto con el organismo que la acredita, sobre la que se fundamentó la experiencia desde el punto de vista del bienestar animal.

BIBLIOGRAFIA

Benavides F, Guénet J. Manual de Genética de Roedores de Laboratorio. Principios Básicos y Aplicables Ed. SECAL. 2003; p. 59-73.

Comité para la Caracterización Biológica de los Animales de Laboratorio. Laboratory Animals. 1985; 19: 106-108.

Harkness J, Wagner J. The Biology and Medicine of Rabbits and Rodents. Ed. Lea & Febiger. 1989; p. 9-85.

Hume C, The Ufaw Handbook on The Care and Management of Laboratory Animals. Ed. Churchill-Livingstone. 1976.

Klecknell P. Anestesia de Animales de Laboratorio. Ed. Acribia 1998. 159-190.

National Research Council, Guidelines for The Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research. 2003; p. 10-12.

Oflert E, Cross B y Willian A. Manual Sobre el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación. Vol. 1, Ed Consejo Canadiense de Protección de los Animales. 1998; p. 119-124.

Tuffery A. Laboratory Animals. Ed. Wiley. 1995, 87-106.

Van Zutphen L, Ball M. Animal Alternative Welfare and Ethics. Ed. Elsevier. 1996; p. 27-42.

Van Zutphen L, Barrienes V, Beynen A. Principio de la Ciencia del Animal de Laboratorio. Ed. Elsevier 1999; p. 1-82.

Zuñiga J., Tur Marí J., Milocco S., Piñeiro R. Ciencia y Tecnología en Protección y Experimentación Animal. Ed. Graw-Hill – Interamericana 2001; p. 3-23.

Capítulo 16

CONCEPTOS GENERALES DE VIROLOGIA

Nestor Oscar Stanchi,
Elida Gentilini, María Gabriela Echeverría

INTRODUCCION

Nada más acertado que la afirmación: "...Debe ser un virus..." que G. Carballal y J. Oubiña expresan en el prefacio del libro *Virología Médica*, como un fiel reflejo de la práctica diaria en clínica, tanto médica como veterinaria. A todo aquello que no se le encuentra etiología se le asigna una causa viral. Si bien los virus son responsables de muchas patologías, también es cierto que muchos de ellos pasan por el organismo prácticamente sin causar daño. En muchos otros casos, por el contrario, a pesar de causar enfermedad en los animales, no son estudiados por la "dificultad de su diagnóstico". Siendo mucho más pequeños que las bacterias, los virus se encuentran en el borde mismo de la vida, entre la vida y la materia inorgánica, dependiendo sólo del momento en que se los estudie.

Los virus[1] son un grupo de estructuras difíciles de definir, ya que como se mencionó, depende del momento en que se los estudie, la correspondencia entre el término empleado y su verdadero rol.

Son, en definitiva, agentes infecciosos de amplia distribución en la naturaleza, que tienen como característica ser parásitos intracelulares obligados (esto implica que sólo pueden multiplicarse dentro de una célula, sean éstas animales[2], vegetales o bacterianas), y para ser considerados virus en su constitución deben tener solamente un tipo de ácido nucleico (DNA o RNA, nunca los dos[3]).

Su evolución es incierta. Hay quienes postulan que se iniciaron como una regresión de parásitos celulares obligados que perdieron propiedades de tipo celular, dependiendo en mayor grado de la célula hospedadora. Otros suponen un origen subcelular, es decir, que se trataría de ácidos nucleicos celulares, que adquirieron capacidad de reproducción autónoma. Mutaciones y selecciones posteriores culminaron en los virus actuales.

TAMAÑO

Como se mencionó anteriormente, los virus son, en líneas generales, mucho más pequeños que las bacterias. De allí el nombre de virus "filtrables" como se los denominaba antiguamente, ya que atraviesan los filtros que se suelen utilizar para esterilización.

El tamaño varía desde 18 nm en el caso de los *Parvovirus* o 27 nm en Picornaviridae (pico = pequeño) (por ej., aftosa) hasta 250 nm como los Poxviridae (por ej., viruela).

ESTRUCTURA

Una partícula viral puede tener un solo **ácido nucleico**, DNA o RNA, recubierto por una **cápside** de naturaleza proteica. Algunos virus pueden además poseer exteriormente otra estructura de naturaleza lipoproteica denominada **envoltura, envelope o peplos** (del griego "túnica") (fig. 16-1); estos virus se denominan **envueltos o vestidos**, mientras que aquellos que no la poseen se llaman **desnudos**.

Los términos virus y **virión** son semejantes, sólo que virión es empleado cuando el virus es completo e **infectante**.

El ácido nucleico viral, al ser tan pequeño, puede contener relativamente poca información genética. La única explicación razonable para la codificación de una cápside radica en que en su constitución intervienen sólo uno o dos tipos proteicos (**protómeros**) estructuralmente idénticos repetidos n veces que, al unirse con estas subunidades proteicas, se las denominan **capsómeros** o **unidades morfológicas**.

El ácido nucleico se encuentra entonces dentro de la cápside y en su conjunto (ácido nucleico + cápside) se denomina **nucleocápside**, mientras que el conjunto de ácido nucleico y de proteínas íntimamente relacionadas (por ej., transcriptasas) se denomina **core**.

La envoltura, como se verá más adelante en su proceso de generación celular, es de naturaleza lipoproteica, a semejanza de las típicas membranas biológicas.

Principalmente en el caso de algunos virus envueltos, existen proteínas de envoltura (hemaglutininas) que pueden tener importantes funciones biológicas, como aglutinar glóbulos rojos de ciertas especies o también enzimas que permiten clivar la unión producida por la hemaglutinina, denominadas neuraminidasas.

Algunos virus desnudos (por ej., adenovirus) poseen fibras en su superficie con propiedades hemaglutinantes.

Los estudios realizados con microscopia electrónica han permitido observar distintas morfologías virales; por ejemplo de cristales pequeños en los cuales la morfología está determinada por la cápside (por ej., Picornavirus, Adenovirus, Papovavirus); forma de varillas largas, en donde la cápside es cilíndrica y en su exterior se observa una fina estructura helicoidal (por ej., virus del mosaico del tabaco). La forma compleja está caracterizada por viriones icosaédricos y viriones helicoidales rodeados por una envoltura (peplos) presentando polimorfismo pues la estructura externa no es rígida (por ej., Herpesvirus, Mixovirus, Poxvirus, Bacteriófagos).

ACIDOS NUCLEICOS

Como se mencionó, un virus presenta un solo tipo de ácido nucleico: DNA o RNA. Estos pueden presentarse como:

DNA o RNA de cadena simple (monocatenario).
DNA o RNA de cadena doble (bicatenario).

[1] Virus: del latín "veneno líquido".

[2] Los virus que parasitan células animales (tanto de vertebrados como de invertebrados) se llaman virus animales o zoófagos, los que lo hacen sobre vegetales se llaman virus vegetales o fitófagos, mientras que los que afectan a las bacterias se denominan bacteriófagos o simplemente fagos.

[3] Existen algunos virus en los que pueden hallarse fracciones de otro ácido nucleico, pero uno de ellos nunca es funcional.

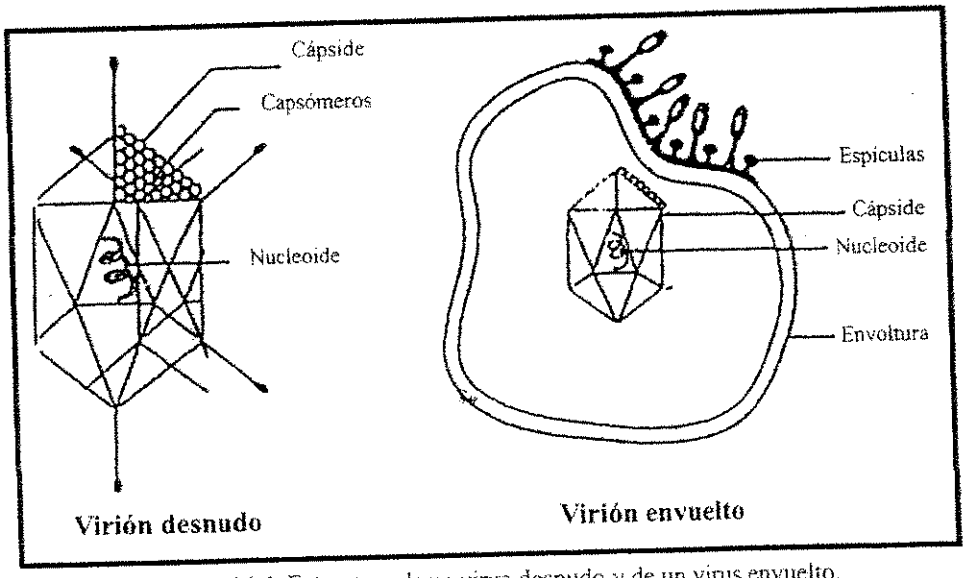


Figura 16-1. Estructura de un virus desnudo y de un virus envuelto.

Los virus DNA pueden tener una conformación lineal (monocatenario o bicatenario), como también pueden presentar conformación circular (generalmente bicatenario y en algunos casos monocatenario). El ácido nucleico, en los virus RNA, puede estar fragmentado. Su disposición puede ser lineal o circular.

SIMETRIA DE LA CAPSIDE

La cápside viral, proteína que rodea al genoma de ácido nucleico, puede tener distinta disposición espacial o simetría: una simetría **icosaédrica** (20 lados), también llamada **cúbica** o **isométrica**; una simetría **tubular** o **helicoidal**, y otra simetría **compleja** por combinación de ambas. En todos los casos, la cápside está formada por subunidades **(capsómeros)**.

En las **cápsides icosaédricas**, cuando se reúnen 5 de estos protómeros, el capsómero (denominado por ello pentámero) que se forma se ubicará en los vértices del icosaedro, si se reúnen en 6 protómeros, el capsómero (hexámero) que se forma se ubicará en las aristas y en las caras. Todas las cápsides presentan 12 ángulos, cada uno de ellos ocupado por pentámeros y 20 caras triangulares que contienen el mismo número de capsómeros o hexámeros. La suma de los capsómeros constituye la cápside de los virus de simetría cúbica. El número de capsómeros está determinado para un virus dado. Un icosaedro está formado por 20 caras que tienen la forma de un triángulo equilátero, 12 vértices y 30 aristas (fig. 16-2).

Las **cápsides helicoidales** son más simples que las cápsides de simetría icosaédrica. La estructura es siempre cilíndrica, los protómeros no se agrupan en capsómeros, sino que están unidos formando una estructura similar a la de una cinta enrollada. El ácido nucleico se dispone formando un helicoide y los protómeros se van disponiendo uno al lado del otro recubriendo el ácido nucleico. Tienen forma de bala, bastón o de escalera de caracol (por ej., Rhabdovirus).

En las **cápsides de simetría compleja** pueden tener forma de ladrillo. El DNA está unido a una proteína con aspecto de disco bicóncavo rodeado de varias capas de lipoproteínas (Poxvirus).

Los **bacteriófagos** (tipo T de *E. coli*) son aún más complejos, con ambos tipos de simetría, helicoidal en la cola e icosaédrica en la cabeza. La cola está constituida por tres partes: a) un tubo hueco central, a través del cual pasa el ácido nucleico desde el fago a la bacteria infectada; b) una vaina que rodea al tubo central, contráctil, que se extiende desde el cuello del fago hasta la placa basal; y c) la placa basal, de forma hexagonal, con una punta en cada uno de sus extremos, conectada a seis fibras terminales delgadas, que son los órganos de unión del bacteriófago a la pared de la bacteria hospedadora (véase fig. 16-7).

ENVOLTURA

Es una membrana que rodea al virus (virus envuelto: por ej., Herpesvirus, Paramixovirus, Togavirus), de naturaleza proteica y lipídica. Las proteínas a menudo se hallan unidas a hidratos de carbono (glicoproteínas). En la mayoría de los casos, deriva de la membrana citoplasmática; en el caso de los Herpesvirus, se adquiere en el proceso de brote, procedente de la membrana nuclear. La envoltura es inmunógena y necesaria para la infectividad.

CLASIFICACION DE LOS VIRUS

Distintos criterios y, por lo tanto, distintas clasificaciones pueden aplicarse a los virus. Como se mencionó al principio, por la afinidad del hospedador pueden clasificarse en virus animales, vegetales y bacteriófagos. Los que son de interés en medicina veterinaria son los virus animales. Estos pueden, de acuerdo con el tropismo de células que atacan, dividirse en epiteliotropos (parasitan a células de origen epitelial), por ejemplo: Herpesvirus; neurotropos (lo hacen en células del tejido nervioso), por ejemplo: virus rábico, etc. Según los órganos que afectan pueden clasificarse en virus entéricos (Parvovirus), virus respiratorios (Mixovirus), o por su forma de diseminación pueden clasificarse en virus aerógenos (diseminados por el aire), como el virus de la influenza, o transmitirse por vectores (picadura de insectos) como el caso de los Togaviridae, etc.

Sin embargo, actualmente se intentan dos tipos de clasificaciones: una numérica/alfanumérica (criptograma), de uso poco habitual y otra que intenta ordenar a los virus de manera taxonómica en Familias y Géneros, siendo difícil la división en especies (considerada como una colección de virus con propiedades similares).

Se tiene en cuenta para esta clasificación el tipo de ácido nucleico (DNA o RNA) y sus características (cadena simple o doble, lineal o fragmentado, cadena positiva o negativa), la simetría de la cápside (icosaédrico, helicoidal o complejo), la presencia o ausencia de envoltura, el lugar en que el virus produce su ensamblado final (núcleo o citoplasma; véase Proceso de replica-

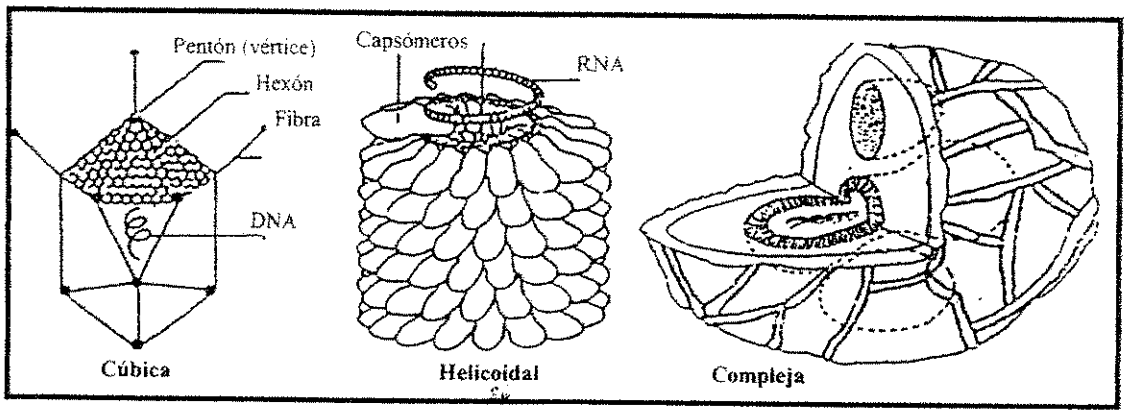


Figura 16-2. Simetría viral cúbica, helicoidal y compleja.

ción), el tipo de liberación celular (véase Proceso de replicación) y el número de capsómeros o el diámetro de la hélice.

La figura 16-3 muestra a las familias virales más importantes de acuerdo al tipo de ácido nucleico. Las tablas 16-1 y 16-2 muestran la clasificación de los virus según Familias y Géneros.

PROPIEDADES DE LOS VIRUS

Los virus son, con excepciones, sensibles al calor. Aquellos que poseen envoltura suelen ser termolábiles en comparación con los virus desnudos. Una temperatura de 60 °C durante 30 minutos es suficiente para inactivar a la mayoría de los virus, aunque esto no es efectivo, por ejemplo, para el virus de la hepatitis B del humano.

La estabilidad de los virus aumenta cuando decrece la temperatura; es así que para conservarlos o cuando se envían muestras para aislamiento al laboratorio, cuanto más baja es la temperatura de conservación mayores posibilidades habrá de recuperarlos. A temperatura ambiente se inactivan rápidamente, a 4 °C sobreviven 1 o 2 días, a -20 °C lo hacen por 1 semana, mientras que a -70 °C sobreviven por varios meses.

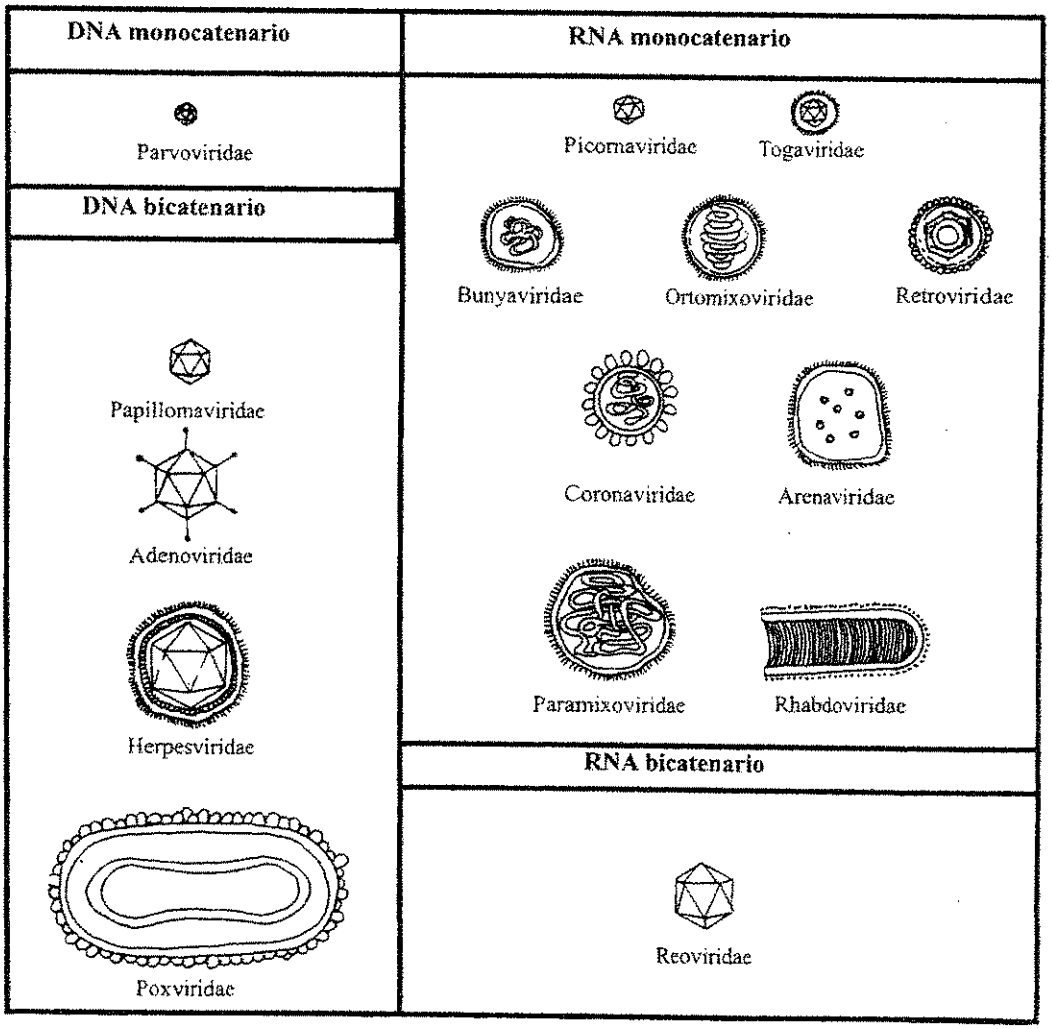


Figura 16-3. Forma y tamaño relativo de los principales virus.

Tabla 16-1. Familias y géneros de virus RNA más importantes en veterinaria

Virus RNA		
Familia	**Género**	**Representante/s más importante/s**
Picornaviridae	Enterovirus	Enterovirus bovino y porcino
	Rhinovirus	Rinovirus bovino
	Aphtovirus	Virus de la fiebre aftosa
Caliciviridae	Vesivirus	Exantema vesicular porcino
		Calicivirus felino
Togaviridae	Alphavirus	Encefalomielitis equina
Reoviridae	Orbivirus	Virus de la lengua azul
	Rotavirus	Gastroenteritis en distintas especies
Arteriviridae	Arterivirus	Arteritis viral equina
		Síndrome respiratorio y reproductivo porcino
Coronaviridae	Coronavirus	Bronquitis infecciosa aviaria
		Diarrea neonatal del ternero
		Gastroenteritis transmisible del cerdo
Ortomixoviridae	Influenzavirus	Influenza equina, porcina, aviaria
Paramyxoviridae	Avulavirus	Enfermedad de Newcastle
	Morbillivirus	Moquillo canino
	Pneumovirus	Virus sincitial respiratorio bovino
Rhabdoviridae	Vesiculovirus	Virus de la estomatitis vesicular
	Lyssavirus	Virus de la rabia
Retroviridae	Alpharetrovirus	Sarcoma y leucosis aviar
	Gammaretrovirus	Leucemia felina
	Deltaretrovirus	Leucosis bovina
	Lentivirus	Anemia infecciosa equina
		Inmunodeficiencia bovina y felina
Flaviviridae	Pestivirus	Peste porcina clásica
		Virus de la diarrea bovina

Cuando deben mantenerse cepas virales en el laboratorio por años es necesario congelar el stock viral en nitrógeno líquido (-196 °C). Algunos virus, como es el caso de Citomegalovirus, no resisten el congelamiento y descongelamiento, principalmente cuando se los realiza a -20 °C, por lo que se desaconseja su realización.

Los virus que poseen envoltura, al ser ésta de característica lipoproteica, son sensibles a los solventes orgánicos como el éter o el cloroformo, los cuales les hacen perder su infectividad. Esta característica es tenida en cuenta para su clasificación inicial. La mayoría de los virus se conservan mejor en condiciones donde el pH y la concentración iónica sean las fisiológicas.

CICLO DE INFECCION DE UN VIRUS

Se tratará en primer instancia a los virus animales (fig. 16-4), señalando luego la diferencia con los bacteriófagos.

Todos los virus necesitan parasitar a una célula para lograr su multiplicación. En este proceso se produce la replicación del ácido nucleico y la expresión de la información contenida en él.

La replicación de los virus animales varía según se trate de virus DNA o RNA, de cadena simple o doble, así como también si son cadenas circulares o lineales, o si presentan polaridad positiva (+) o negativa (-) (véase tabla 16-3). Por convención se ha establecido que: a) en virus con ácido nucleico bicatenario, las cadenas de esos ácidos nucleicos deben ser de polaridad opuesta: una será (+) y la otra (-); b) un virus con ácido nucleico monocatenario tiene polaridad +, cuando su genoma tiene capacidad de actuar directamente como ácido nucleico mensajero en la célula hospedadora; c) un virus con ácido nucleico monocatenario tiene polaridad -, cuando su genoma es incapaz de actuar como mensajero, y necesita de la síntesis de un mRNA viral, sintetizado como intermediario en la célula infectada, y forma un híbrido -+ con el genoma que lo originó. Si bien el mecanismo de replicación difiere, según se trate de un virus DNA o RNA, los pasos de tal replicación para ambos grupos son similares. Básicamente puede suceder que, como resultado de la infección, la célula muera (lisis), o que el genoma viral se integre con el genoma celular induciendo la transformación celular.

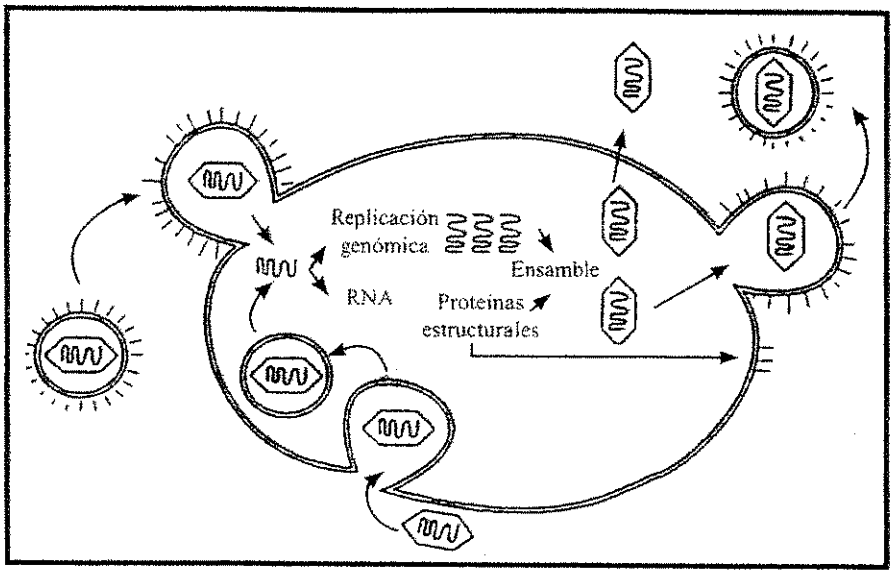


Figura 16-4. Esquema de multiplicación de un virus.

Adsorción o fijación

Una vez que el virus ha ingresado al organismo, por distintos mecanismos toma contacto con una célula blanco, de acuerdo con su tropismo, y comienza la etapa denominada de **adsorción** o **fijación**. En ésta, el virión, por medio de una proteína o glicoproteína denominada antirreceptor (por ej., hemaglutinina), se adsorbe a la membrana de la célula blanco en un sitio denominado receptor; por lo general esto depende de las fuerzas iónicas, el pH, la naturaleza del medio y la temperatura. La ausencia de receptores celulares para el virus impide la adsorción y, por lo tanto, hay resistencia a la infección. El mantenimiento de la adsorción se debe a distintos tipos de uniones químicas, como puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals y fuerzas electrostáticas. Estas fuerzas de unión son necesarias, pues los virus y las células tienen cargas negativas y, por lo tanto, se repelen. Existen factores que favorecen la adsorción, como la presencia de iones Ca^{++} o Mg^{++}, dextrán u otros agentes que se usan en el laboratorio para facilitar la infección celular.

Penetración

Luego que la adsorción se ha producido, continúa la etapa de **penetración**, la cual puede producirse por uno de los siguientes mecanismos: la endocitosis o viropexis, la fusión de membranas

Tabla 16-2. Familias y géneros de virus DNA más importantes en veterinaria

Virus DNA		
Familia	**Género**	**Representante/s *más importante/s***
Parvoviridae	Parvovirus	Parvovirus canino y aviar Panleucopenia felina
Adenoviridae	Mastadenovirus	Adenovirus bovino, equino y ovino Hepatitis infecciosa canina
	Aviadenovirus	Enteritis hemorrágica del pavo
Herpesviridae	Aricellovirus	Rinotraqueítis infecciosa bovina Rinoneumonitis equina Seudorrabia porcina
	Marekvirus	Virus de la enfermedad de Marek
Poxviridae	Orthopoxvirus	Poxvirus de la vaca (vacuna)
	Avipoxvirus	Poxvirus de aves de corral
	Leporipoxvirus	Virus del mixoma del conejo
	Parapoxvirus	Virus del ectima contagioso ovino
Asfaviridae	Asfavirus	Peste porcina africana
Circoviridae	Gyrovirus	Anemia infecciosa de los pollos
Papillomaviridae	Papillomavirus	Papiloma de distintas especies

Tabla 16-3. Replicacion del ácido nucleico viral

El proceso es variable de acuerdo con el tipo de ácido nucleico del virus involucrado (ácido nucleico y polaridad de las cadenas) y puede seguir seis estrategias distintas.

Estrategia I

Los virus DNA de doble cadena, con polaridad (+ -), no requieren ningún intermediario para su replicación. El DNA de estos virus tiene la propiedad de servir como molde para su transcripción asimétrica, originando un mRNA, y como molde para la replicación semiconservadora de nuevas moléculas de DNA viral.

El DNA bicatenario puede presentarse como DNA circular o como DNA de cadena lineal. Cuando es bicatenario, la RNA polimerasa (RNApol) celular, comienza la transcripción del mRNA, luego ocurre la replicación semiconservadora del DNA viral, que utiliza la DNA polimerasa (DNApol) de la célula hospedadora; se forman así nuevas cadenas, una se sintetiza en forma continua y la otra, fragmentada. Estos fragmentos son posteriormente empalmados y así se originan el DNA bicatenario circular (por ej., virus del papiloma, SV_{40}, poliorna, adenovirus, herpesvirus y poxvirus).

Estrategia II

Los virus formados por DNA de una sola cadena de polaridad (+) (DNA+) requieren para su replicación que se forme primero un intermediario de DNA de cadena doble (+ -) (DNA+ -) y a partir de este DNA+- se transcribe un mRNA. La transcripción la hace la cadena complementaria y a diferencia de los virus DNA de doble cadena, durante todo el ciclo tipo II de replicación se sintetizan las mismas moléculas de mRNA (por ej., parvovirus).

Estrategia III

Son virus cuyo genoma es un RNA de cadena doble (+ -) que no necesitan intermediarios para su replicación. El genoma de los reovirus se presenta fragmentado en 10 segmentos, cada uno de éstos poseen una RNApol que va a transcribir un solo RNA; algunos de estos RNA actuarán como mRNA, otros servirán de molde para la replicación de RNA complementarios, los que originarán nuevas moléculas de RNA bicatenario.

Estrategia IV

En los virus con RNA monocatenario de polaridad +, el ácido nucleico se comporta como mRNA, uniéndose a los ribosomas, traduciéndose en proteínas específicas para el virus y originando una RNApol que catalizará la síntesis de una cadena RNA. Utiliza para ello el molde de la cadena paterna RNA (+) (por ej., poliovirus). En el caso de picornavirus, calicivirus y togavirus, el genoma se expresa a través de dos moléculas de mRNA, una de igual tamaño que el genoma viral y otra menor, que codificarán la síntesis de proteínas estructurales virales.

Estrategia V

Los virus RNA monocatenarios de polaridad (-) presentan una transcriptasa capaz de transcribir el RNA del genoma viral en un RNA+ que se comporta como mRNA. Los paramixovirus, rhabdovirus y orthomixovirus pertenecen a este grupo. Los paramixovirus y rhabdovirus poseen genomas complejos y replican sobre citoplasma celular. Una vez perdida la envoltura, se activa la transcriptasa, iniciándose la síntesis de mRNA viral. El genoma de los orthomixovirus está segmentado en ocho componentes y a partir de cada uno de los segmentos se producirá un RNA complementario con función mensajera.

Estrategia VI

Existen ciertos virus, como los retrovirus, que poseen RNA monocatenario de polaridad +, pero con capacidad de poder transcribir el RNA+ del virus en DNA por medio de una transcriptasa reversa o inversa, lo cual forma un híbrido RNA-DNA, que será utilizado como molde para la síntesis de un DNA bicatenario o genoma de un provirus que se integrará al genoma celular por acción de una enzima-virus-específica. Luego, utilizando este DNA, el virus puede transcribir mRNA y RNA viral por medio de RNA-DNA polimerasa dependiente de la célula hospedadora. Parte del ciclo replicativo ocurre en el citoplasma y parte en el núcleo.

y la penetración directa. En el primero de los casos, los viriones son englobados como vacuolas fagocíticas (el modo más común). En el segundo caso se produce la fusión de las membranas de la célula y la del virión (por ej., herpes). Por último, el mecanismo de penetración directa es menos frecuente en los virus animales: sólo se produce en algunos picornavirus, adenovirus y reovirus.

Escape o decapsidación

Una vez que la partícula viral se encuentra ya dentro de la célula hospedadora, comienza la etapa de liberación del ácido nucleico infeccioso a efectos de lograr su expresión. Este proceso se llama **escape**, **salida**, **desnudamiento** o **decapsidación**. Es distinto según el tipo de virus; las proteínas virales no suelen ser digeridas por las enzimas celulares (excepto en reovirus), el ácido nucleico puede o no liberarse totalmente y este proceso puede tener lugar en la membrana celular misma (por ej., virus de la influenza que se funde con la membrana citoplásmica, liberando el ácido nucleico en el citoplasma), en el citoplasma (por ej., picornavirus) o en los poros de la membrana nuclear (por ej., adenovirus que pierden parte de su cápside en el citoplasma y parte en el núcleo), y en los lisosomas (por ej., reovirus, en donde el RNA reoviral es liberado por las enzimas de la vacuola fagocítica).

Eclipse

Luego que el virus ha liberado total o parcialmente su ácido nucleico, pierde su infectividad para otras células, por esto a este período se lo denomina **eclipse** y dura hasta que sea posible hallar nuevas partículas virales dentro de la célula. En la fase de eclipse se pueden describir distintos momentos como los de **transcripción**, **traducción**, **replicación**, **ensamble** y **maduración** viral. En el ciclo de replicación de la mayoría de los virus se distinguen dos períodos: 1) temprano, en el cual a partir de ácido nucleico viral se transcriben unos pocos genes que llevan la información necesaria para la producción de un mRNA precoz. Estos llevan a los ribosomas de la célula hospedadora la información necesaria para la síntesis de proteínas tempranas virales, inhibiendo la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos de la célula parasitada, y permiten así la expresión de la información del genoma viral.

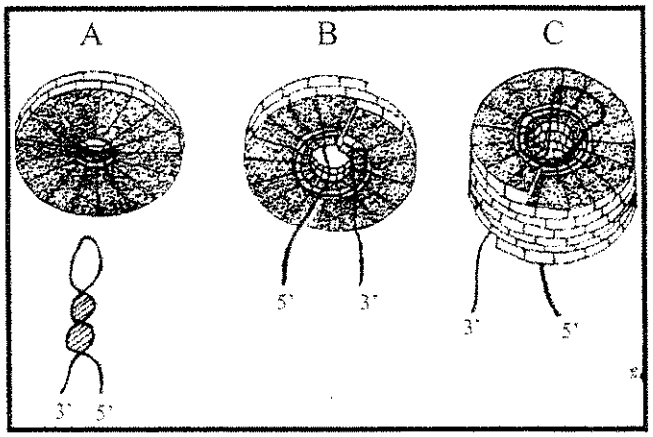


Figura 16-5. Ensamble de un virus helicoidal.

El paso siguiente (explicado más adelante) es la replicación del ácido nucleico ubicado entre el período temprano y el tardío. 2) Tardío, durante el cual finaliza la síntesis de ácido nucleico viral y comienza la del resto de los componentes virales: los polipéptidos de las cápsides y las enzimas, que están codificados por el mRNA de los nuevos genomas producidos.

La **traducción** de mRNA tanto en virus RNA y DNA es realizada en el citoplasma por los ribosomas celulares. Es así que las proteínas formadas corresponden a proteínas y glicoproteínas estructurales (aquellas que van a formar parte de la cápside viral), proteínas generalmente con actividad enzimática, como el caso de las polimerasas y proteasas, y aquellas proteínas que frenan el metabolismo celular permitiendo que el virus "comande" la célula. Principalmente en el caso de los virus envueltos, ciertas glicoproteínas ocupan sitios en la membrana celular cambiando también así la antigenicidad de la célula hospedadora.

La **replicación** se lleva a cabo en el citoplasma celular utilizando al RNA viral como plantilla para la copia (cRNA), luego éste servirá como nueva plantilla para la copia del RNA viral. Este proceso se lleva a cabo mediante la enzima replicasa.

Ensamble

El **ensamble, autoensamble** o **maduración** viral constituye la etapa en la que el ácido nucleico viral entrará en contacto con su cápside. En el caso de los virus de simetría isométrica, el ácido nucleico debe formar un ovillo y, "ayudado" por proteínas en presencia de algunas subunidades capsídicas ya ensambladas, se va completando el armado de la cápside por el agregado de nuevas subunidades.

En aquellos virus de simetría helicoidal (fig. 16-5), el proceso parece comenzar con la formación de un lazo en el ácido nucleico viral, donde las proteínas de la cápside se van agregando para formar la estructura definitiva.

Egreso o liberación

Por último, el **egreso** o **liberación** viral se produce por lisis celular, como es el caso del virus de la poliomielitis del humano o los reovirus. Otros, como los coronavirus o los togavirus, maduran por gemación a través del retículo endoplásmico. Finalmente algunos brotan a través de la membrana celular (como los paramixovirus y arenavirus) (fig. 16-6) o de la membrana nuclear (como los herpesvirus). Básicamente, en los virus DNA sin envoltura, la liberación se produce por citólisis. Los virus RNA (por ej., picornavirus-calicivirus) se liberan primariamente por extrusión, se reúnen en el interior de estructuras citoplásmicas conectadas a la superficie celular por túbulos, a través de los cuales son liberados los viriones continuamente. Los reovirus se liberan casi siempre por citólisis, mientras que los RNA con envoltura lo hacen por gemación.

CICLO DE INFECCION DE LOS VIRUS BACTERIANOS

Según el virus, el ácido nucleico será DNA o RNA, pudiendo ser a su vez el DNA de cadena simple o cadena doble. Sólo se ha encontrado hasta la fecha RNA de cadena simple. Los estudios de bacteriófagos se han orientado hacia los virus que infectan a *E. coli* y que poseen DNA de doble cadena.

Morfológicamente existen distintos virus bacterianos, sin embargo, a efectos de simplificar se describe la estructura del fago T-par de *E. coli* (fig. 16-7). Básicamente las etapas de infección son semejantes a las producidas en los virus animales. La etapa de **adsorción** involucra primero el acoplamiento y luego la penetración del ácido nucleico a través de la pared celular bacteriana, quedando los principales componentes proteicos fuera de la célula. Este sistema es muy poco común y sucede prácticamente sólo en fagos.

La fase de **eclipse** dura aproximadamente 25 minutos. En ésta, el fago rápidamente influye en la función celular, frenando todo el metabolismo celular (DNA, mRNA, rRNA y tRNA). De inmediato comienza la producción y replicación del DNA viral, su traducción lleva aparejada la presencia de distintos tipos de proteínas denominadas tempranas (las primeras en aparecer) y tardías (las últimas). Las primeras tienen, entre otras, la misión de asegurar que las tardías aparezcan en el momento justo, ya que como se mencionó en el caso de los virus animales, se produce un autoensamble, y si no hay correspondencia con la producción de ácido nucleico viral, habría cápsides ensambladas, sin presencia de ácidos nucleicos.

La fase de **maduración** se inicia con el armado de la progenie viral, en la cual las proteínas de la cabeza se montan antes de que se

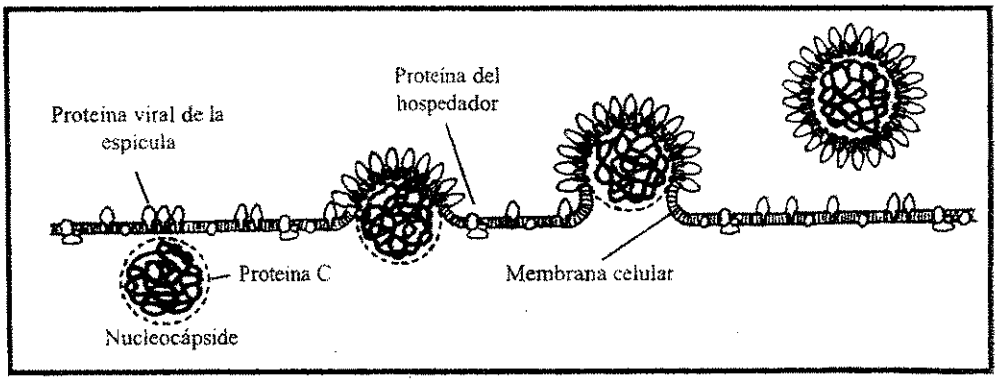


Figura 16-6. Ejemplo de salida de un virus envuelto por la membrana celular.

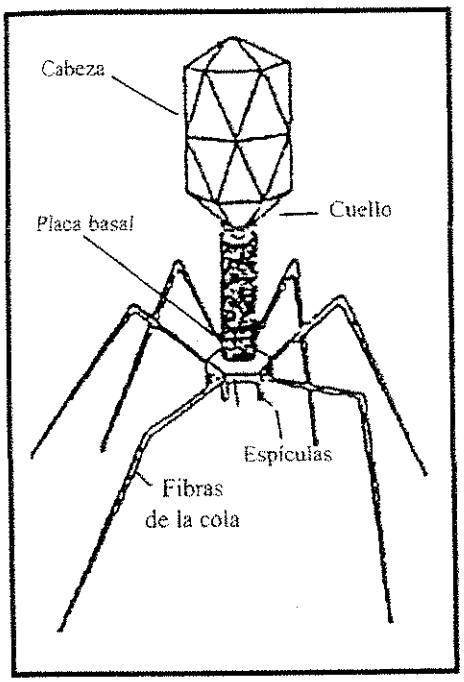


Figura 16-7. Esquema de los componentes de un fago.

introduzca el DNA viral; aún quedan algunos aspectos desconocidos sobre el mecanismo final de encapsidación del ácido nucleico.

Finalmente la **salida** del virión de la célula implica la lisis de ésta (aparentemente por la enzima lisozima codificada por algún gen viral).

LISOGENESIS

La lisogénesis es un proceso que se produce en ciertos fagos denominados lisogénicos o atemperados, en los cuales el DNA viral, en lugar de producir los pasos vistos anteriormente, se integra en el genoma celular (estado de profago). La bacteria hospedadora no es afectada por este fago pero se hace resistente a la infección adicional por un fago afín. Por algún mecanismo (por ej., luz ultravioleta), el fago es reactivado, en un proceso denominado inducción, y el estado lisogénico es transformado a lítico. El fenómeno se llama virogenia cuando se hace referencia a los virus animales.

OTROS AGENTES

Viroides

Son agentes infecciosos que al igual que los virus poseen un solo tipo de ácido nucleico, pero en este caso carecen de estructuras de recubrimiento como cápside o envoltura. Por lo tanto, en su genoma no poseen codificación para proteínas estructurales.

Provirus

A semejanza de lo que ocurre en ciertos virus bacterianos en los que el genoma viral se integra al DNA bacteriano, en los virus animales sucede un fenómeno semejante y por tal motivo a los virus que integran su genoma al DNA celular, replicándose con éste, se los denomina provirus. En estos casos, los provirus pueden llegar a modificar las características de las células, en un proceso denominado **transformación** (por ej., retrovirus). Estos provirus pueden activarse por algún mecanismo en algunos casos desconocidos y llegan a multiplicarse en las células.

Seudovirus

En el proceso de ensamble de un virus en la célula pueden aparecer errores; por ejemplo, que se introduzca en la cápside viral genoma celular (no viral). En este caso, el elemento resultante se denomina *seudovirus*.

Virus híbridos

En ciertas ocasiones, dos virus distintos pueden infectar una misma célula, produciéndose en el ensamble viral un tipo de virus denominado híbrido. Si bien es un fenómeno poco común, se conoce en el caso del virus SV_{40} (Simian virus 40) y adenovirus.

Prión (virus no convencionales)

En el caso de la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (humanos), el scrapie de las ovejas o la encefalopatía transmisible del visón, o la

Tabla 16-4. Características distintivas de algunos agentes microbianos

	Virus	Viroides	Rickettsias	Chlamydias	Mycoplasma	Bacterias
Acido nucleico	DNA o RNA	DNA	Ambos	Ambos	Ambos	Ambos
División binaria	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí
Multiplicación en medio artificial	No	No	No*	No	Sí	Sí
Ribosomas	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí
Variación de tamaño	No	¿No?	Sí	Sí	Sí	Sí
Producción de energía enzimática	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí

* Algunas rickettsias pueden cultivarse in vitro

encefalitis espongiforme bovina (BSE) no se ha podido aislar ningún agente infeccioso que contenga las típicas características de un virus (ácido nucleico y cápside). Se sabe que el agente involucrado en el desarrollo de estas enfermedades infecciosas es muy resistente a altas temperaturas (autoclave a 120 °C 15 minutos) y produce enfermedades "lentas" con período de incubación de años. Estos agentes parecen ser de naturaleza proteica, y si bien se postula una desrepresión de un gen celular, se desconoce el mecanismo real por el cual producen la enfermedad (véase el cap. 81).

RICKETTSIAS Y CLAMIDIAS

Existen microorganismos como las clamidias y las rickettsias que no pueden considerarse organismos virales pero que habitualmente son estudiados por los virólogos, debido a que sólo pueden cultivarse en células vivas (parásitos intracelulares obligados). Tanto las Chlamydias como las Rickettsias son procariotes que tienen DNA y RNA y ribosomas, siendo el tamaño celular variable.

Rickettsias

Las formas parasitarias están asociadas con el sistema reticuloendotelial, las células del endotelio vascular o eritrocitos de vertebrados. Sólo pueden sobrevivir durante breves periodos fuera de la célula animal; el agente causal de la fiebre Q (*Coxiella burnetii*) resulta extraordinariamente resistente al calor, lo que facilita su traslado de un hospedador a otro.

Las **rickettsias** están asociadas generalmente con artrópodos que las transmiten. Muchos insectos (pulgas, piojos) y arácnidos (garrapatas, ácaros) sirven como reservorios y/o vectores del microorganismo.

Los microorganismos se parecen en su composición a las bacterias gramnegativas con ácido murámico en su pared celular. Las rickettsias poseen muchas funciones metabólicas bacterianas, pero necesitan de factores accesorios (por ej., glutamato) para poder ejercer estas funciones. Se postula que para que esto sea posible necesita una excelente permeabilidad de la membrana plasmática que permita el paso de los cofactores externos.

Chlamydia y *Chlamydophila*

Las *Chlamydias* y el nuevo género *Chlamydophila* poseen DNA y RNA, se dividen por fisión binaria, con pared celular idéntica a las bacterias gramnegativas, con ribosomas semejantes a los bacterianos y son sensibles a los antibióticos. Forman inclusiones en las células que parasitan. Se reproducen por medio de **corpúsculos elementales** que, al introducirse en una célula, pasan a formar el denominado **cuerpo reticular** (cuerpo de inclusión). Causan enfermedades como el tracoma, o infertilidad en el hombre, o la psitacosis en las aves y enfermedad ocular en los gatos.

Estos microorganismos sobreviven a la fagocitosis, inhiben la actividad enzimática de los lisosomas y la síntesis de DNA del hospedador, y son parásitos energéticos, ya que utilizan la vía metabólica por medio del ATP celular; aparentemente el déficit de las chlamydias estaría dado en las enzimas capaces de producir energía.

BIBLIOGRAFIA

Carballal G. Oubiña J. Virología Médica. El Ateneo. 1996.

Coto C, De Torres R. Naturaleza y estructura de los virus animales. EDIGEM, 1993.

Davis B, Dulbecco R. Tratado de Microbiología. Salvat 1983.

Horne R. Estructura y función de los virus. Ed.Omega. 1979.

ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) 2000. www.*ictvdb.iacr.ac.uk*.

Jawetz E. Manual de Microbiología Médica. 17.ed., El Manual moderno. 2002.

Lennette E. Jchmidt N. Diagnostic Procedures for viral, Rickettsial and Chlamydial Infections. 5th edition. Am. Pub. Heal Assoc. 1979.

Mohanty S., Dutta S. Virología Veterinaria. Interamericana, 1983.

Rhodes A, Van Rooyen C. Tratado de virología. Toray, 1973.

Capítulo 17

TECNICAS DE ESTUDIO Y DIAGNOSTICO VIROLOGICO

Nestor Oscar Stanchi, María Gabriela Echeverría

INTRODUCCION

El diagnóstico virológico se realiza por una variedad de razones, desde aquellas destinadas al diagnóstico etiológico de una enfermedad hasta los de estudios retrospectivos serológicos. La virología ha sido hasta hace poco tiempo considerada una rama de la microbiología "difícil de estudiar"; los virus, al ser parásitos intracelulares obligados, imponen la necesidad del cultivo previo de células o la inoculación de animales de laboratorio, lo que conducía a tediosas técnicas y costoso instrumental que desalentaban a muchos laboratoristas.

Para el estudio de los virus pueden aplicarse distintos métodos diagnósticos que incluyen: a) el aislamiento viral que indica la presencia de virus como agente infeccioso, b) la detección directa de los antígenos virales o su genoma, c) la detección de anticuerpos que ellos producen, o bien d) la observación directa de partículas con el microscopio electrónico. Para el aislamiento viral es necesario contar con cultivos celulares o animales de laboratorio, lo cual implica una gran disponibilidad de recursos y personal entrenado; las pruebas de detección directa de antígenos virales o su genoma en tejidos u otras muestras por distintos procedimientos (por ej., inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa, prueba de ELISA, hibridación, reacción en cadena de la polimerasa, etc.) se han desarrollado como métodos alternativos de similar sensibilidad al uso de cultivos celulares al igual que los estudios serológicos, como métodos diagnósticos indirectos para detectar la presencia o desarrollo (aumento en el título) de anticuerpos, prácticamente los más difundidos en los laboratorios de virología.

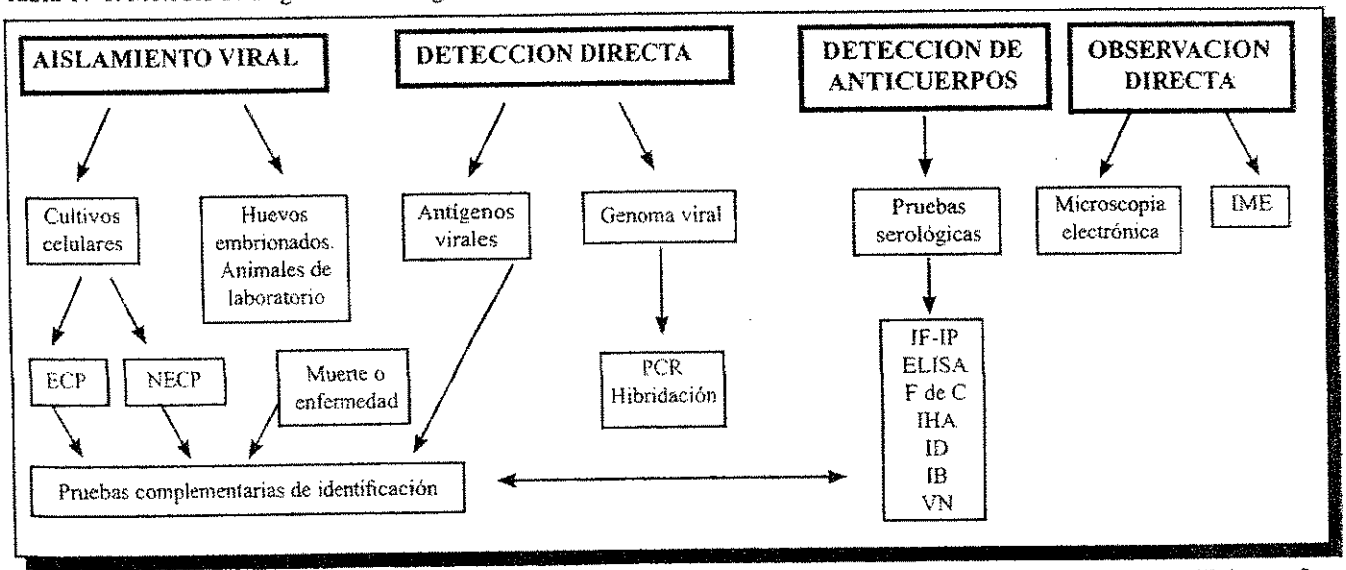
Por diagnóstico virológico rápido (DVR) se entiende una serie de técnicas que son compartidas también con los métodos de identificación viral en el cultivo celular. Estas comprenden la detección directa, los estudios serológicos para detectar la presencia o desarrollo (aumento en el título) de anticuerpos y pruebas de detección de virus o antígenos virales en tejidos u otras muestras (independiente del cultivo de virus) por distintos procedimientos (por ej., inmunofluorescencia, ELISA, hemaglutinación, inhibición de la hemaglutinación, etc.). Muchas de estas pruebas se realizan mediante kits comerciales que facilitan una pronta respuesta diagnóstica.

Es esencial, en el laboratorio virológico, el mantenimiento de un estrecho contacto entre el laboratorista y el profesional que envía la muestra, ya que de otra manera es imposible encaminar el proceso de estudio del material virológico. A diferencia del diagnóstico bacteriológico, no existe una "marcha virológica" básica, que pueda tomarse como guía para el estudio de un virus; esta marcha va a depender del virus que se sospeche y de las posibilidades del laboratorio de diagnóstico. Los métodos de diagnóstico virológico se resumen en la tabla 17-1.

EL CULTIVO VIRAL

El cultivo viral es una técnica que va perdiendo adeptos, debido a la facilidad que presentan otros métodos diagnósticos como alternativa para la rápida respuesta requerida. Sin embargo, posee varias ventajas: representa la confirmación de un diagnóstico tentativo basado en alguna otra técnica, cuando la enfermedad no ha sido descrita

Tabla 17-1. Métodos de diagnóstico virológico



IME: inmunomicroscopia electrónica; ECP: efecto citopático; NECP: sin efecto citopático; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; IF: inmunofluorescencia; IP: inmunoperoxidasa; F de C: fijación de complemento; IHA: inhibición de la hemaglutinación; ID: inmunodifusión; IB: inmunoblot; VN: virus neutralización.

aún en una zona determinada, cuando el diagnóstico serológico no revela una verdadera relación etiológica con el agente sospechoso o cuando la sintomatología puede coincidir con varios agentes virales semejantes y la realización de serología puede ser impracticable para todos ellos. Finalmente, si es de importancia para la vigilancia epidemiológica que debe realizar el Estado para el control sanitario de la población tanto animal como humana. El aislamiento viral es el método clásico convencional de diagnóstico, cuyo éxito depende de la viabilidad del virus en la muestra problema.

Elección y toma de muestra

Para el éxito del aislamiento, es de fundamental importancia la elección de la muestra a procesar. Esto va a depender de la sintomatología que presente el animal (por ej., hisopado faríngeo en enfermedad respiratoria, materia fecal en diarreas, etc.), pero la regla fundamental es la toma de muestra temprana; esto es, teniendo en cuenta que la mayor parte de los virus son mucho más fáciles de aislar y cultivar en la etapa aguda de la enfermedad (se encuentran y eliminan generalmente en mayor concentración), es necesario que se envíe al laboratorio la muestra de inmediato ante la sospecha de una etiología viral y preservarla para su traslado.

Las muestras deben extraerse en forma estéril y enviarse en medios especiales para cultivo de virus. No son adecuados los conservadores utilizados para muestras bacterianas, y se emplean por lo general medios como el 2-SP que contienen soluciones tamponadas con el agregado de antibióticos como penicilina-estreptomicina, y un antifúngico como la nistatina. Como alternativa puede emplearse solución fisiológica estéril. La solución de transporte elegida debe mantenerse congelada (-20 °C) hasta el momento de uso y enviarse al laboratorio en condiciones refrigeradas (4 °C). También puede remitirse material en medios protectores como el caldo triptosa, gelatina (0,5%) o glicerina (50%).

La mayor parte de las muestras corresponden a excreciones y exudados, tales como heces, orina, saliva, líquidos vesiculares, aspirados nasofaríngeos, líquido cefalorraquídeo, etc.; tejidos de necropsia o biopsia, o hisopados (rectal, faríngeo, ocular o vesicular) y sangre. Es muy importante acompañar la muestra con un breve resumen de la historia clínica, destacando fecha de inicio de los síntomas.

Animales de laboratorio

Los animales de laboratorio más utilizados en virología son: ratones, hámsters, cobayos y conejos. Tienen el inconveniente de que, además de la complejidad de las instalaciones necesarias para su mantenimiento, muchos de ellos poseen ya sus propios virus[1] que pueden activarse en la manipulación de laboratorio. Cuentan con la ventaja de brindar (especialmente cuando es desconocido el agente causal) todos los órganos para todos los tropismos posibles. La inoculación del material sospechoso se realiza en varios animales (manteniendo algunos sin inocular como controles testigos), por distintas vías, según el tropismo viral, y se observan por 1 o 2 semanas. Algunos animales pueden morir o presentar signos clínicos, y se sacrifican a intervalos regulares para evidenciar cambios patológicos, para subcultivarlos o para realizar técnicas complementarias. Aquellos que mueren dentro de las primeras 48 horas de su inoculación son descartados porque sus muertes se consideran inespecíficas. Los ratones lactantes se utilizan para virus rábico; los cobayos, para enfermedades vesiculares y neurotrópicas; los conejos, para herpesvirus, y los hámsters, para enfermedades neurotrópicas. El uso de animales de laboratorio está siendo sustituido por cultivos celulares por razones humanitarias.

Huevos embrionados

Los huevos fértiles de gallina (embrión de pollo) se pueden utilizar en lugar de los animales de laboratorio, debido a que suelen ser más económicos. Son empleados para el aislamiento de virus influenza y son también muy importantes como suministro de tejidos para la realización de cultivos celulares. Suelen ser también útiles para el estudio de Rickettsias.

Para ser inoculados deben reunir ciertas condiciones, como edad (tiempo de incubación) para que el embrión, las cavidades extraembrionarias y membranas adquieran el tamaño necesario de acuerdo con la vía de inoculación elegida, y provenir de animales en buenas condiciones sanitarias. Actualmente el cultivo viral en embrión de pollo se realiza para la preparación de ciertas vacunas. Las técnicas o vías de inoculación están someramente esquematizadas en la figura 17-1. En la cavidad alantoidea se inoculan virus de las familias Paramixoviridae y Orthomixoviridae, Poxviridae y Herpesviridae en la membrana corioalantoidea, y Togavirus y Rhabdovirus en el saco vitelino. El éxito de la infección puede manifestarse como muerte del embrión, alteraciones macro y microscópicas, cuerpos de inclusión, hemorragias, retraso del crecimiento, etc.

Cultivo de células

El cultivo de células constituye el método de elección para la replicación de la mayoría de los virus. Los cultivos se mantienen en botellas, tubos o placas, de vidrio o plástico, en condiciones de esterilidad y con medios nutritivos. Existe una suerte de confusión en cuanto a la terminología que emplean distintas fuentes bibliográficas. Términos como cultivo primario, secundario, explantes, líneas celulares, etc., parecen mezclarse, no dejando claro el concepto de cada término. Antes de acercar la definición de cada uno de los términos, se describirá el procedimiento básico para el cultivo celular primario, para luego señalar las diferencias entre ellos.

Cultivo primario

Consiste en obtener material de un donante, generalmente a partir de la necropsia de un animal, eligiéndose un órgano de acuerdo con los requerimientos celulares (por ej., riñón). Este órgano debe provenir de un animal clínicamente sano. La extracción del material se realiza previa higiene minuciosa y desinfección de la piel (técnicas asépticas), trabajando siempre con materiales estériles y en flujo laminar. Una vez obtenido el órgano, los pasos a seguir se resumen a continuación:

a) Se coloca el órgano en un recipiente estéril, se lava varias veces con una solución salina isotónica, se descapsula si correspondiera y se procede a su trituración con tijeras hasta reducirlo a pequeños trozos de 3 o 4 mm.

b) Por medio de enzimas (tripsina) se realiza la desintegración del tejido disolviendo el cemento intercelular y separando las células unas de otras.

c) Se filtra por gasa, se centrifuga y se tira el sobrenadante (que contiene tripsina).

d) Se realiza un conteo de células vivas en una cámara cuenta glóbulos (a efectos de estandarizar el número de células),

[1] Existen animales SPF (libres de patógenos específicos) o GFA (libres de gérmenes) que, si bien serían de utilidad, su costo es mucho mayor y el mantenimiento más caro.

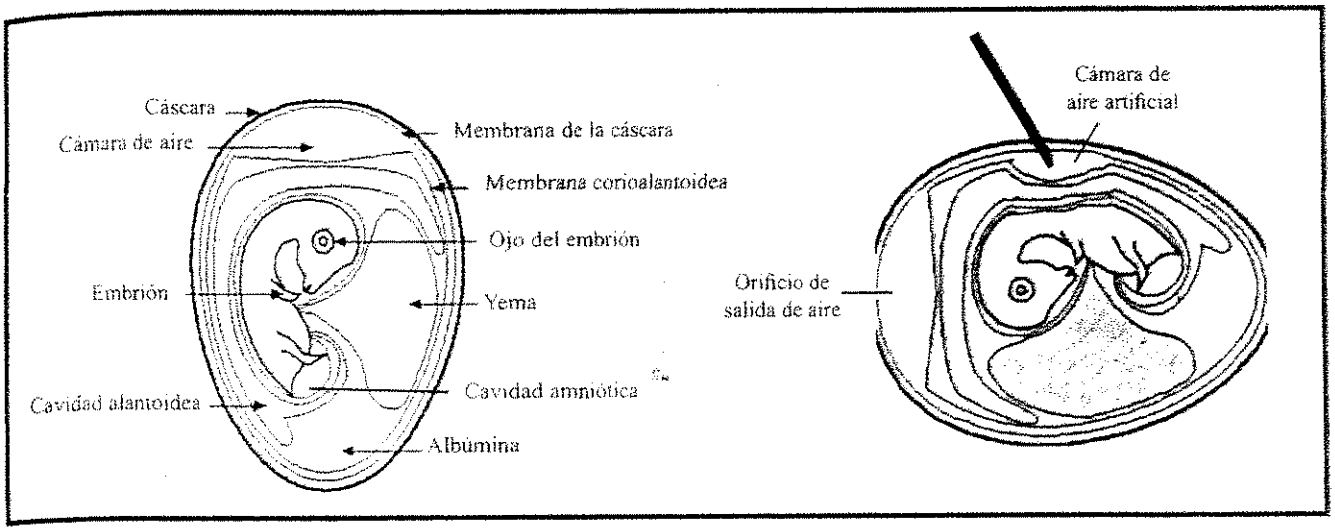


Figura 17-1. Anatomía de un huevo embrionado (izquierda) e inoculación de la membrana corioalantoidea después de formar una cámara de aire artificial (derecha).

con azul de tripán que colorea las células muertas, o con un colorante vital como el rojo neutro que colorea sólo las células vivas.

e) El medio de cultivo (medio esencial mínimo, MEM) para el crecimiento de células es altamente complejo, y está suplementado con nutrientes esenciales que incluyen los elementos necesarios para la biosíntesis de nuevas células y los sustratos para el metabolismo energético. Posee sales minerales (iones inorgánicos para funciones catalíticas y fisiológicas como el balance osmótico y el mantenimiento del potencial de membrana), trazas de elementos como hierro y cobre[2], vitaminas (principalmente del grupo B), indicador de pH, azúcares como glucosa o galactosa para el metabolismo energético, bicarbonato de sodio, aminoácidos esenciales y no esenciales para la biosíntesis de diversos constituyentes celulares, y suero fetal bovino (SFB) al 10% para el crecimiento celular[3]. El uso de este tipo de suero se debe a que no posee anticuerpos y contiene ciertos factores necesarios para el crecimiento que no poseen los sueros de animales adultos. Este medio debe estar libre de cualquier efecto tóxico o inhibitorio. Todos los nutrientes deben estar cuantitativamente ajustados para producir una relación balanceada entre los componentes del medio. En general se utilizan medios deshidratados de origen comercial. En la tabla 17-2 pueden apreciarse los componentes elementales del medio MEM.

f) Las células con su medio de cultivo se colocan en botellas de vidrio o plástico (fig. 17-2) donde decantarán y se multiplicarán adhiriéndose a la superficie del vidrio, formando una sola capa de células (cultivo "en monocapa"), la que podrá visualizarse con la ayuda de un microscopio con bajo aumento. Otro sistema utilizado es la suspensión, en la cual las células están mantenidas en agitación permanente.

g) Una vez multiplicadas, se retira el medio de crecimiento y se lo remplaza por el de mantenimiento, que es MEM, pero con el agregado de suero fetal bovino al 2% (dependiendo del tipo celular).

En este caso, el cultivo celular se ha desarrollado a partir de un órgano, pero este cultivo no mantiene la arquitectura del órgano que le dio origen. Las células en monocapa pueden tener aspecto de células poliédricas o elongadas.

Cultivo secundario

Cuando se hace actuar una enzima (tripsina) sobre una monocapa de un cultivo primario, las células que estaban adheridas al vidrio se desprenden y pueden ser subcultivadas, se generan de esta manera nuevas botellas y aumenta el número de células. A partir de este momento, a estas células se las denomina secundarias, y a este proceso, subcultivo, pasaje o repique. Normalmente este proceso puede repetirse un número limitado de veces ya que por factores desconocidos, luego de sucesivos pasajes, las células tienden a no multiplicarse y morir.

Tabla 17-2. Composición del medio MEM

Sales inorgánicas	
$CaCl_2$(anhidro)	L-isoleucina
$Fe(NO_3)_3.9H_2O$	L-leucina
KCl	L-lisina
KNO_3	L-metionina
$MgSO_4$	L-fenilalanina
NaCl	L-serina
$NaHCO_3$	L-treonina
NaH_2PO_4	L-triptofano
Otros componentes	L-tirosina
D-Glucosa	L-valina
Rojo fenol	**Vitaminas**
HEPES-Buffer	D-Ca pantotenato
Piruvato sodio	Colina
Aminoácidos	Acido fólico
L-arginina HCl	i-inositol
L-cistina	Nicotinamida
L-glutamina	Piridoxal
Glicina	Riboflavina
L-histidina HCl	Tiamina-HCl

[2] Estos elementos estaban históricamente presentes en los medios como "contaminantes" de los componentes que se usaban en la preparación de aquéllos. Actualmente son agregados a los medios de manera intencional en concentraciones definidas (otros ejemplos: vanadio, molibdeno, cinc y selenio).

[3] En la actualidad existen medios sintéticos sin necesidad del agregado de SFB.

Línea celular

Cuando puede replicar indefinidamente un cultivo celular, se puede decir que se ha establecido una línea celular. El número de veces que es necesario subcultivar las células para considerar a un cultivo como línea celular varía, según los autores, entre 30 y 70 pasajes. Actualmente existen numerosas líneas celulares establecidas que se comercializan por distintos laboratorios o por instituciones. Ejemplos de ellas son las HeLa, Hep-2, BHK, Vero, RK13, MDBK y MDCK, entre otras[4].

Se llama *línea celular diploide* cuando la mayor parte de las células que integran la línea poseen el número normal de cromosomas de la especie de la cual provienen; mientras que se denomina *heteroploide* cuando la mayor parte de ellas poseen un número distinto de cromosomas.

Explante

También llamado cultivo en sobrevida, designa a un fragmento de órgano o tejido, que será mantenido con su arquitectura en condiciones que posibiliten su estudio o infección viral. Es de uso poco frecuente en la práctica virológica.

SIEMBRA DEL MATERIAL PARA ESTUDIO VIROLOGICO: INOCULACION

En general, el aislamiento de un virus es el método de diagnóstico más preciso y es aún considerado como "prueba de oro" en la mayoría de los casos.

Las muestras se procesan convenientemente e inoculan en células elegidas por su susceptibilidad, siempre intentando abarcar la mayor cantidad posible de tropismos virales. Normalmente se inoculan de 3 a 4 tipos celulares que son observados diariamente durante 1 o 2 semanas incubados a 37 °C en búsqueda de efecto viral sobre el cultivo celular. Esta acción, llamada efecto citopático (ECP), puede producirse sobre grupos celulares o sobre la totalidad de la monocapa, dependiendo siempre del tipo y la cantidad de virus, y de la célula afectada. La replicación viral en cultivo suele presentar problemas de adaptación, lo que se soluciona efectuando una serie de pasajes sucesivos denominados "pasajes ciegos", hasta que aparezca el ECP característico.

Los tipos de ECP se pueden sintetizar en los siguientes (siempre comparándolos con una monocapa de células control sin inocular): a) cambios celulares que pueden ser progresivos, de redondeamiento celular o, por el contrario, elongación, b) picnosis, c) pérdida de unión entre células, d) levantamiento de la monocapa (efecto lítico), e) cambio de refringencia de las células, f) fragmentación de la monocapa, g) vacuolización celular, h) formación de sincicios (células multinucleadas), e i) agregación celular.

También pueden observarse cambios en el medio de cultivo que consisten generalmente en variación de pH; de neutro (color rosado si el indicador de pH es rojo de fenol) puede pasar a alcalino (rosa fuerte) o acidificarse (amarillo); sin embargo, el metabolismo normal de las células conduce a la acidificación del medio de cultivo. Si se encuentra el pH del medio neutro luego de la incubación, puede significar la presencia de virus, ya que éste puede actuar frenando el metabolismo celular y, por ende, la acidificación normal.

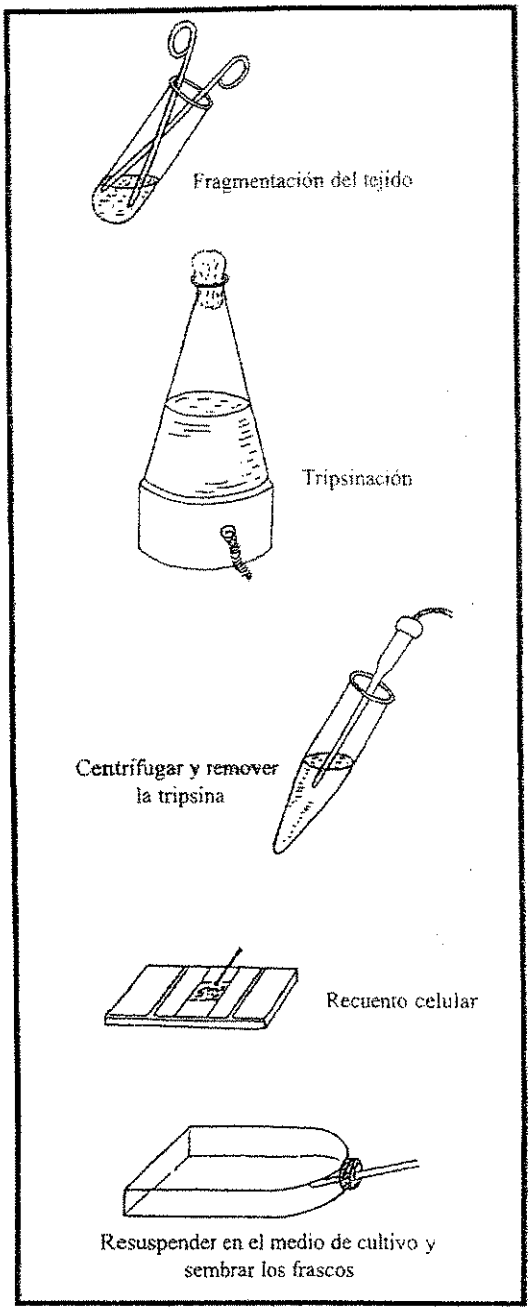


Figura 17-2. Procedimiento para el cultivo celular primario.

Los cambios mencionados pueden observarse con facilidad; hay otros que necesitan la ayuda de técnicas especiales de coloración, como aquellas que ponen en evidencia a los cuerpos de inclusión[5]. Para ésto se realizan técnicas especiales de tinción, que necesitan previamente "levantar"[6] las células que han sido cultivadas en los tubos.

[4] Actualmente existe la tendencia a unificar los términos llamando, tanto a la célula como al cultivo secundario, línea celular.

[5] Los cuerpos de inclusión son producidos por ciertos virus, y pueden consistir en cúmulos de virus (menos frecuente) o productos del metabolismo celular alterado (más frecuente). Estos cuerpos de inclusión pueden localizarse en el núcleo (IN) o en el citoplasma celular (Icit). IN = Herpesvirus, Adenoviridae, Parvoviridae. Icit = Reoviridae, Rabdoviridae.

[6] A menos que se emplee la técnica de cultivo en "viales", que consiste en el cultivo sobre un cubreobjetos que se deposita en el fondo de un tubo, sobre el cual crecerán las células. Luego que el virus ha producido el efecto citopático, puede observarse directamente el cubreobjetos sin necesidad de levantar las células.

El desarrollo de ECP en un cultivo celular permite reconocer que se ha aislado un virus, y de acuerdo con el material del cual proviene la muestra, el tipo de células en el que se desarrolla, el tipo de efecto que causa sobre el cultivo celular y el tiempo de desarrollo, puede realizarse una identificación presuntiva. Sin embargo, *es casi imposible poder afirmar de qué* virus se trata, ya que muchos virus pueden desarrollar el mismo ECP. Además, algunos virus no producen ECP visible con el microscopio óptico luego de la replicación en cultivos celulares, por lo que la identificación debe efectuarse por pruebas complementarias. La identificación definitiva se realiza utilizando un anticuerpo específico que detecta antígenos virales o para inhibir el ECP inducido por el virus en las células. De acuerdo con la sospecha viral, podrán incluirse distintos tipos de pruebas complementarias[7]; algunas de estas pruebas están estrechamente relacionadas con los métodos de diagnóstico, y por lo tanto, se tratarán en conjunto.

Pruebas complementarias para la identificación viral

Entre las pruebas complementarias pueden mencionarse la hemadsorción, la inhibición de la hemadsorción, la hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación, la virusneutralización, la interferencia viral, la inmunofluorescencia y la inmunoperoxidasa. El diagnóstico presuntivo puede realizarse sobre la base de los resultados obtenidos en las pruebas de hemadsorción, hemaglutinación o interferencia viral, mientras que el diagnóstico definitivo debe realizarse por identificación del virus mediante las pruebas de virus neutralización, inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa, fijación del complemento, ELISA o inhibición de la hemaglutinación, entre otras.

Hemadsorción

Algunos virus, como los Orthomixoviridae y Paramixoviridae, confieren al cultivo celular infectado antígenos de membrana (hemaglutininas), que adsorben glóbulos rojos de ciertas especies bajo condiciones específicas, causando agregación. Muchos de los virus que integran estas familias producen escaso ECP. La prueba consiste en agregar al tubo o frasco infectado y al control una suspensión de hematíes de pollo o cobayo convenientemente lavados en solución fisiológica. Se dejan horizontalmente por algunos minutos a 4 °C o a 37 °C, la monocapa se lava y se examina con el microscopio en búsqueda de glóbulos rojos adsorbidos a las membranas celulares; en las células control no debe haber hemadsorción. Debido a que muchos virus poseen hemaglutininas, esta técnica sólo permite realizar un diagnóstico presuntivo.

Inhibición de la hemadsorción

Una vez realizada la prueba anterior y confirmada la presencia de un virus hemadsorbente, es posible identificarlo mediante la prueba de inhibición de la hemadsorción, que consiste en hacer sobre un cultivo celular infectado, un suero con anticuerpos específicos (antivirus determinado) que se deja actuar sobre la superficie celular por 15 minutos. Luego se agregan los glóbulos rojos de acuerdo con la técnica anterior. Los anticuerpos bloquearán los antígenos de superficie que posee la membrana celular y no permitirán, por tanto, la adsorción de los glóbulos rojos. De esta manera, conociendo el anticuerpo (suero anti) empleado, y al inhibirse la hemadsorción, se puede identificar el virus actuante.

La interferencia viral

Como ya ha sido mencionado, en algunos virus la replicación ocurre sin producción de ECP, pero sin embargo, esta replicación es capaz de inhibir la replicación de un virus secundario inoculado en el mismo cultivo celular. El mecanismo de la interferencia no es completamente conocido; se postulan alteraciones en la superficie celular, enzimas iniciales producidas por el virus o la producción de interferón[8]. Esta técnica se usa principalmente en el virus de rubéola humana que interfiere con el desarrollo de otros virus que producen efecto citopático. Si un cultivo celular está infectado con el virus de la rubéola, ante la inoculación de un virus productor de efecto citopático en el mismo cultivo, este último no se desarrolla y, por lo tanto, no se observará efecto alguno. El uso de esta técnica sólo permite un diagnóstico presuntivo.

Virus neutralización

La prueba de virus neutralización consiste, como su nombre lo indica, en neutralizar la acción de un virus por medio de Ac específicos dirigidos contra Ag superficiales. Luego que un virus ha sido aislado, se lo cosecha obteniendo el material sobrenadante del cultivo celular, se divide en alícuotas y una de ellas se pone en contacto con suero antivirus específico. Luego de un período de incubación, se infecta un nuevo cultivo celular. Por otro lado, y a efectos de tener un testigo, se infecta otro cultivo celular con una alícuota viral sin neutralizar. Si el suero era específico contra ese virus, lo neutralizará y no producirá ECP. Es una de las técnicas más confiables para la tipificación viral, sin embargo, cuenta con el inconveniente de ser de lenta y costosa realización.

Hemaglutinación

El principio de la reacción es el mismo que el de la hemadsorción. La diferencia consiste en que en ésta se demuestra la presencia de hemaglutininas en las membranas celulares, mientras que en la hemaglutinación, el fenómeno ocurre en el líquido de cultivo sobrenadante (fig. 17-3). Consiste en extraer luego que el virus se ha multiplicado en la monocapa o en embrión de pollo, el líquido sobrenadante del cultivo (rico en virus), enfrentándolo en un tubo o policubeta con una suspensión de glóbulos rojos preparadas como para la hemadsorción. Si la reacción es positiva, los glóbulos rojos forman una malla fina, que se deposita lentamente en el fondo del tubo y se visualiza como un halo grande. Por el contrario, si es negativa, se decantan al fondo del tubo formando un botón. Al igual que la hemadsorción, el uso de esta técnica sólo permite arribar a un diagnóstico presuntivo.

Inhibición de la hemaglutinación

Semejante al concepto de inhibición de la hemadsorción, si se hace reaccionar un virus con capacidad hemaglutinante con su anticuerpo específico, éste anulará su capacidad de hemaglutinación por bloqueo de las hemaglutininas. El antisuero neutralizará esta actividad viral y luego, al agregarse los glóbulos rojos, éstos no serán aglutinados.

Si se desea investigar la presencia de Ac en animales sospechosos de padecer una enfermedad causada por un virus hemaglutinante, éstos pueden ponerse en evidencia enfrentando

[7] Algunas de las denominadas "pruebas complementarias" pueden incluirse dentro de las llamadas pruebas inmunológicas que serán descritas más adelante (por ej., Inmunodifusión).

[8] El interferón (IFN) es una sustancia antiviral (generalmente glucoproteína de bajo peso molecular) no específica, muy importante, producida por células en respuesta a la infección de un virus (u otras sustancias inductoras). Se produce un mismo tipo de interferón para distintos tipos de virus, pero es específico de la especie (el interferón bovino no tiene actividad en el humano).

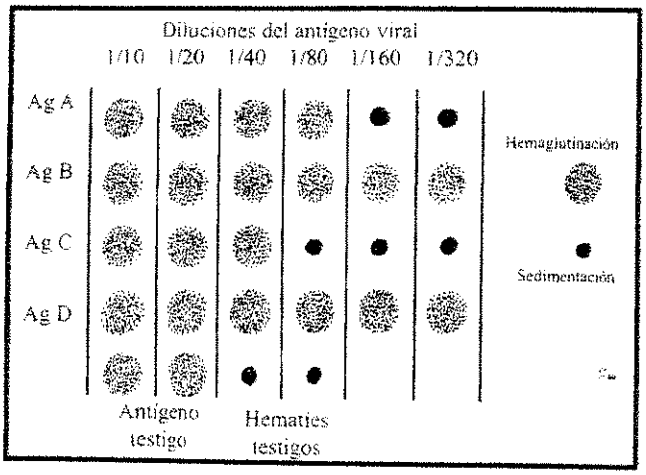


Figura 17-3. Técnica de hemaglutinación.

el suero del animal afectado con una suspensión vírica convenientemente estandarizada. Asimismo, por esta técnica pueden titularse los Ac presentes. Es una técnica sensible y específica que requiere equipamiento mínimo y es de lectura visual.

Inmunofluorescencia

La técnica de inmunofluorescencia (IF) (fig. 17-4) es ampliamente usada en el diagnóstico virológico debido a su alta especificidad y muy buena sensibilidad. Su mayor inconveniente es la necesidad de poseer en el laboratorio un buen microscopio de fluorescencia, por su precio elevado. Es útil no sólo para el diagnóstico e identificación de un virus que ha sido aislado en el laboratorio, en muestras clínicas tales como hisopados faríngeos, líquido o hisopados de úlceras, vesículas, o incluso cortes o improntas de tejidos, sino también como técnica de diagnóstico.

La técnica de IF requiere de Ac purificados antivirus determinados (suero anti), "marcados" o conjugados[9] con fluoresceína (fluorocromo que tiene la propiedad de excitarse con los rayos UV y emitir luz verde brillante) generalmente comerciales.

En un portaobjetos se colocan las células infectadas con el virus, se fijan con alcohol metílico o acetona, se dejan secar y se hace actuar el suero anticonjugado. Luego de un lavado con solución fisiológica, y si hubo unión Ag-Ac, el Ac queda unido y no será arrastrado. Se deja secar y se observa, en microscopio de fluorescencia, un color verde brillante en aquellas células infectadas por el virus.

Para evaluar la presencia de Ac en sueros de animales sospechosos, es necesario tener un Ag conocido (generalmente células infectadas por el virus a estudiar, adheridas a un portaobjetos); en una primera etapa se colocan diluciones del suero que reaccionan sobre el Ag uniéndose a él. Para poner en evidencia esta reacción, se agrega finalmente un suero antiespecie[10] conjugado con fluoresceína. La reacción se visualiza de igual modo bajo microscopia fluorescente.

Inmunoperoxidasa

Es similar a la anterior, sólo que el anticuerpo está conjugado a la enzima peroxidasa. Como ventajas respecto de la IF se puede destacar que la lectura se realiza en un microscopio común y que la reacción desarrollada como gránulos de color es permanente.

ELISA

Con el nombre de ELISA (del inglés "*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*") o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas, se designan una serie de pruebas de altísima sensibilidad (detectan cantidades iguales a nanogramo [ng]) y aceptable especificidad, caracterizadas por la acción de un Ac conjugado con una enzima (peroxidasa o fosfatasa alcalina como las más comunes).

Existen numerosas variantes o combinaciones de pruebas, una de las más usuales consiste en fijar, en policubetas de plástico, un Ac específico antivirus (la fijación se realiza por cargas eléctricas). La búsqueda del Ag se realizará a partir de los cultivos celulares que tengan o no efecto citopático (de acuerdo con el tipo de virus sospechado). Si el virus se encuentra presente en el líquido sobrenadante del cultivo celular y existe correspondencia Ag-Ac, se unirá al Ac fijado a la policubeta y no se eliminará ante un lavado (todo otro Ac no fijado se irá con él).

Luego se agrega nuevamente el mismo Ac antivirus que fue usado en primera instancia pero conjugado con una enzima (por ej., peroxidasa) (Ac*). Si el Ag quedó unido al Ac en el primer paso de la reacción, este Ac* quedará unido al Ag y no será arrastrado en un lavado posterior (queda a manera de sándwich Ac-Ag-Ac*).

Para revelar la presencia de este Ac*, es necesario brindar un sustrato que, para la peroxidasa, es el agua oxigenada. Al encontrarse esta enzima con su sustrato, liberará oxígeno que producirá un cambio de color (por oxidación-reducción) de un reactivo (por ej., OPD[11]). De esta manera, una reacción positiva (presencia de virus) se verá como cambio de color en los pocillos de la policubeta, mientras que su ausencia dejará los pocillos incoloros.

En el caso de ser necesario detectar la presencia de Ac, la prueba varía en que en lugar de pegar un Ac a la policubeta, se pega un Ag conocido. Se hace reaccionar el suero problema (que si tiene Ac específicos quedarán unidos al Ag) y finalmente se hace reaccionar un suero antiespecie conjugado con una enzima (Ac*). El revelado de la reacción se realiza del mismo modo que para el caso de la investigación de Ag.[12]

Fijación del complemento

En esta prueba se detectan Ac dirigidos contra Ag internos del virus. Fue una de las primeras técnicas empleadas en el diagnóstico de infecciones virales, pero en la actualidad ha sido remplazada por técnicas más sensibles.

Inmunoblot

Esta técnica combina la resolución en el fraccionamiento de proteínas que posee la electroforesis en geles de poliacrilamida con la especificidad de la detección inmunoquímica. Como primer paso se efectúa la separación electroforética de

---

[9] El procedimiento consiste en pegar la fluoresceína a los anticuerpos, que seguirá con sus sitios de reconocimiento antigénico activo. De esta manera, al producirse la unión Ag-Ac, la fluoresceína quedará también unida al Ag. La fluoresceína puede ser remplazada por otros compuestos, que serán útiles en otras reacciones de identificación de antígeno, tales como enzimas (peroxidasa, fosfatasa alcalina, ureasa, etc.), para las técnicas inmunoenzimática (ELISA) o inmunohistoquímica.

[10] Ante la inoculación de un suero o Ac de una especie animal en otra (por ej., suero de bovino inoculado a un conejo), esta última (la receptora), al no reconocer estas proteínas como propias, elabora inmunoglobulinas que reaccionarán con los Ac inoculados. El suero obtenido se denomina antiespecie o antiglobulina.

[11] OPD = Orthodifenilendiamina.

[12] Siempre es necesario entre un paso y otro de la prueba el lavado para eliminar todo elemento no reaccionante.

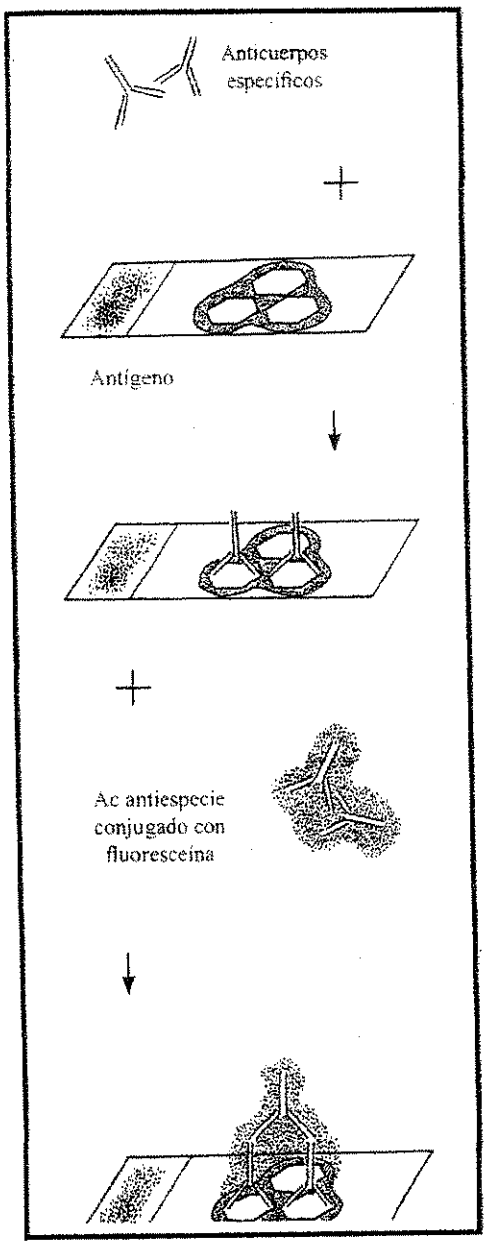


Figura 17-4. Técnica de inmunofluorescencia.

las proteínas virales en geles de poliacrilamida. Luego se realiza la transferencia de esas bandas a papeles de nitrocelulosa mediante corriente eléctrica. Se incuban esas tiras de papel con sueros problema y controles positivos, y posteriormente, se incuban con antisuero antiespecie conjugado con enzimas y se revelan con su sistema detector. La positividad de una muestra se evidencia por bandas coloreadas.

DETECCION DIRECTA

Detección de antígenos virales

Puede llevarse a cabo en tejidos u otras muestras por distintos procedimientos ya mencionados (por ej., inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa, prueba de ELISA, hemaglutinación, inhibición de la hemaglutinación, etc.).

Para el examen microscópico de tejidos, debería enviarse un trozo de órgano afectado, de no más de 5 mm de espesor, embebido en formol al 5% (pH 7,0). Para la detección de Ag virales, pueden enviarse improntas realizadas con tejidos sobre un portaobjetos, secadas al aire y fijadas con metanol o acetona por 5-10 minutos. En todos los casos deben remitirse refrigeradas y deben arribar al laboratorio dentro de las 24 horas.

Detección de genoma viral

PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

La amplificación enzimática selectiva de secuencias de DNA o RNA, flanqueada por dos oligos cebadores o "primers" que hibridan con las cadenas opuestas de la secuencia de interés, provee información adicional que no puede ser obtenida por procedimientos de rutina. El ácido nucleico presente en una muestra se desnaturaliza a altas temperaturas; posteriormente, los cebadores se hibridan a las cadenas en forma complementaria y luego se produce la síntesis de nuevas cadenas complementarias al DNA por la acción de la enzima polimerasa. La prueba requiere tres etapas de incubación (desnaturalización, hibridación y extensión) a distintas temperaturas (un ciclo). Cada ciclo sucesivo duplica la cantidad de DNA sintetizado en el ciclo previo. Durante varios ciclos programados, cada cadena de DNA sirve de molde para el ciclo siguiente, de manera de obtener grandes cantidades de DNA que se visualizan en geles. Si el virus es RNA, debe realizarse una etapa de transcripción reversa previa a la amplificación por la polimerasa.

Hibridación

El empleo de sondas de DNA o RNA para detección de secuencias de genomas se fundamenta en la tendencia de dos cadenas de ácido nucleico a aparearse por sus secuencias complementarias (hibridación). Luego del aislamiento viral, el ácido nucleico a investigar se fija en membranas de nitrocelulosa o nailon, se desnaturaliza (separación de la doble cadena) y se incuba con una sonda marcada (secuencia conocida y conjugada con enzimas o isótopos radiactivos). Si hubo hibridación, los híbridos se evidencian por precipitados coloreados (enzimas) o mediante autorradiografía (isótopos).

DETECCION DE ANTICUERPOS

La toma y la remisión de muestra

Para el caso del estudio serológico, es necesario remitir al laboratorio suero[13] del animal enfermo o, en su defecto, de animales que hayan estado en contacto con él. En la mayoría de las enfermedades infecciosas, es de importancia la seroconversión, es decir, es imperioso tener dos muestras de suero obtenidas del mismo animal con intervalo no inferior a 10 días, a efectos de detectar variación en el título[14]. La conversión serológica se define como la aparición o el aumento de 4 o más veces del título de Ac entre dos muestras pareadas de suero, la primera obtenida en el período agudo, y la segunda, 14-21 días después del comienzo de los síntomas. La detección de la conversión serológica permite realizar el diagnóstico de infección reciente. Cuando no se encuentra un aumento importante o el título es bajo, significa que hubo una infección previa. Si no hay Ac, no hubo contacto con el virus. Si la técnica de detección de anticuerpos es la virus

[13] El suero se obtiene por extracción de sangre al animal, dejándolo coagular espontáneamente y centrifugando. Se envía sólo el suero sin el coágulo y un protocolo completo.

[14] Variación en la cantidad detectable de Ac (en más o en menos) mayor de 2-4 diluciones y según la técnica empleada.

neutralización, las muestras de suero a remitir deben conservarse en forma estéril.

Los anticuerpos en el diagnóstico de la infección viral

La valoración de anticuerpos puede ser un método ideal para la evaluación de la infección viral cuando el cultivo no pueda ser practicado en el laboratorio. Es útil además para determinar el estado inmune del animal o de la población. Sin embargo, la sola presencia de Ac en un animal no significa protección o enfermedad, sino contacto previo con el virus estudiado.

Existen numerosas pruebas complementarias, aparte de las mencionadas, que se utilizan en el diagnóstico de las infecciones virales. Muchas de ellas son usadas también para el diagnóstico de enfermedades producidas por otros microorganismos (bacterias, hongos) e incluso son útiles para el diagnóstico de enfermedades autoinmunes, determinación de preñez, investigación de hormonas, etc. El tema se encuentra ampliado en el capítulo referido a pruebas serológicas, que abarca un número mayor de técnicas diagnósticas.

OBSERVACION DIRECTA DE PARTICULAS

Microscopia electrónica

Para esta técnica es necesario una alta concentración de partículas en la muestra, la cual puede observarse en forma directa (morfología de las partículas virales) o mediante el empleo de Ac antivirus que permite conglutinar las partículas (inmunomicroscopia).

BIBLIOGRAFIA

Carballal G, Oubiña J. Virología Médica. El Ateneo. 1991.

Coto C, De Torres R. Naturaleza y estructura de los virus animales. EDIGEM, 1993.

Davis B, Dulbecco R. Tratado de Microbiología. Salvat 1983.

Horne R. Estructura y función de los virus. Ed. Omega, 1979.

Jawetz E. Manual de Microbiología Médica. 8va.ed., El Manual Moderno. 1979.

Lennette E. Laboratory Diagnosis of Viral Infections. Marcel Dekker, INC. 1985.

Lennette E, Jchmidt N. Diagnostic Procedures fot viral, Rickettsial and Chlamydial Infections. 5th edition. Am.Pub. Heal Assoc. 1979.

Lustig SE de, Nebel A, Cultivo de tejidos. Un manual práctico. Inst. Nac. Oncología. "Angel Roffo". 1981.

Mohanty S, Dutta S. Virología Veterinaria. Interamericana, 1983.

Rhodes A, Van Rooyen C. Tratado de virología. Toray, 1973.

Webster RG, Granoff A. Encyclopedia of Virology, Ed. Robert G. Webster and Allan Granoff. Academic Press, 1994.

Capítulo 18

TECNICAS DE ANALISIS MOLECULAR

Guillermo Giovambattista, María Verónica Ripoli, Silvina Díaz, Egle Etel Villegas Castagnasso, Verónica It Carollo, Juan Pedro Lirón, Mariana Eva Kienast, Pilar Peral García

En la últimas tres décadas ha ocurrido un desarrollo exponencial de las técnicas moleculares, lo que ha permitido estudiar y manipular las moléculas de DNA y RNA. El diseño de estas metodologías se ha basado fundamentalmente en los conocimientos sobre la estructura y las propiedades fisicoquímicas de los ácidos nucleicos. En el presente capítulo se describen brevemente las técnicas básicas de análisis molecular más utilizadas, finalizando con una reseña acerca de las perspectivas futuras.

ELECTROFORESIS

En biología molecular se emplean distintas técnicas para el estudio de las macromoléculas o fragmentos de ellas. La mayoría de las macromoléculas se encuentran cargadas eléctricamente y por lo tanto tienen la capacidad de migrar en un campo eléctrico. Este tipo de movilidad puede llevarse a cabo en soportes sólidos compuestos por agarosa o poliacrilamida.

La migración de las distintas moléculas a través de un gel dependerá de las características de éste. La velocidad de migración electroforética de las moléculas está relacionada en gran medida con cuatro parámetros principales:

1. Tamaño molecular.
2. Conformación.
3. Corriente aplicada.
4. Tamaño del poro.

1) *Tamaño molecular:* el tamaño de la molécula interviene directamente en su velocidad de migración desde el cátodo al ánodo, o a la inversa, dependiendo de su carga. Las moléculas de menor tamaño son las que se desplazan más rápido, así vemos que la velocidad de migración es inversamente proporcional al Log_{10} de sus pesos moleculares.

2) *Conformación:* la velocidad de migración en los geles depende de la conformación de la molécula. Por ejemplo, el DNA puede presentar tres formas distintas: circular cerrado, circular mellado o lineal. Las movilidades relativas de las tres formas dependen también de otros factores, tales como la fuerza iónica del tampón de corrida o la concentración de agentes intercalantes de bases como el bromuro de etidio (BrEt), que al conjugarse con ellas hace que se desplacen con mayor o menor velocidad. Por ello es que en algunas condiciones, el DNA circular cerrado migra más rápido que el lineal y en otras condiciones, el orden es inverso. Si deseamos conocer las diferentes formas del DNA, un método muy útil puede ser la electroforesis en presencia de cantidades crecientes de BrEt. Cuando la concentración del BrEt se incrementa, la mayor parte del colorante se une al DNA y las moléculas de la superhélice negativa en conformación circular cerrada son desplazadas progresivamente (en sentido inverso), lo que da como resultado que su velocidad de migración sea lenta. De este modo, al llegar a la concentración crítica de colorante libre, la velocidad de migración de la molécula circular cerrada alcanza su mínimo valor. Por otra parte, si se añade más BrEt, se generan rotaciones de la superhélice positiva y la movilidad de la forma circular cerrada se incrementa rápidamente. Al mismo tiempo, las movilidades de la forma circular mellada y lineal del DNA decrecen de manera diferente como resultado de una carga neutralizante y de la rigidez impartida al DNA por el BrEt. Para diferenciar la forma circular mellada de la lineal, se debe recordar que los fragmentos del DNA lineal migran a velocidades que son inversamente proporcionales al Log_{10} de su peso molecular.

3) *Corriente aplicada:* a bajo voltaje, la velocidad de migración de los fragmentos lineales de las macromoléculas es proporcional al voltaje aplicado. Sin embargo, cuando la fuerza del campo eléctrico aumenta, la velocidad de los fragmentos de alto peso molecular se incrementa; en otras palabras, a mayor voltaje, menor resolución. Por ejemplo, para obtener el máximo de resolución de los fragmentos de DNA en geles de agarosa, éstos deberán ser corridos en un rango de aproximadamente 1 voltio por cada 5 cm^2.

4) *Tamaño del poro:* un fragmento de DNA o una macromolécula de un determinado tamaño molecular migra a distintas velocidades a través de geles que contienen diferentes tamaños de poro. Existe una relación lineal entre el logaritmo de la movilidad electroforética y la concentración del gel, o sea que con un poro de mayor tamaño (menor concentración del gel), la separación de las bandas será menor. Es por ello que cuando se desea obtener una buena nitidez entre diferentes bandas de alto peso molecular, se elaboran geles de concentraciones bajas, mientras que cuando se desean separar fragmentos de bajo peso molecular, las concentraciones deben ser mayores.

En la elaboración de geles se emplean dos matrices diferentes, ya que sus características particulares permiten la separación de moléculas de distinto peso molecular. La primera de ellas es la agarosa y la otra es la poliacrilamida.

Electroforesis en gel de agarosa

El método estándar utilizado para separar, identificar y purificar fragmentos de DNA es la electroforesis en gel de agarosa. La técnica es simple y rápida en su ejecución, y resolutiva en cuanto a la separación de los fragmentos de DNA de una mezcla que no puedan ser separados adecuadamente por otros procedimientos, como por ejemplo, centrifugación en gradiente de densidad. Otra ventaja de esta técnica es que permite conocer en todo momento el sitio que va ocupando el DNA o los fragmentos de él, cuando ellos migran dentro del gel del cátodo (-) al ánodo (+), ya que las bandas de DNA son teñidas con el colorante. La concentración más baja a la que puede ser visualizado el DNA en el gel es de 50 hg cuando es examinado directamente sobre un transiluminador de luz ultravioleta (UV).

El nivel de concentración del gel depende del material a correr y del análisis que se desee hacer. La concentración puede estar

entre 0.5 y 2% de agarosa para electroforesis DNA/RNA. Como se planteó anteriormente, si el material de corrida posee varios fragmentos de diferentes tamaños, se utiliza un gel de 0,8%, así el gel no ofrece mucha resistencia en la corrida y las bandas pueden separarse con mayor resolución. Para observar el producto amplificado de una reacción en cadena de la polimerasa, el gel recomendado es de 1,5%, si se desea concentrar más la banda se aumenta la concentración de agarosa.

El comportamiento electroforético del DNA en los geles de agarosa no es afectado de manera significativa ni por la composición de bases en el DNA, ni por la temperatura a la cual el gel se encuentra durante la corrida. De este modo, en los geles de agarosa, la movilidad electroforética relativa de los fragmentos de DNA de tamaños diferentes no cambia entre los 4 °C y 30 °C. En general, los geles de agarosa son corridos a temperatura ambiente. Sin embargo, los geles que contienen menos de 0,5% de agarosa son más frágiles, por lo que su corrida se realiza a 4 °C para que adquieran rigidez.

Electroforesis en campo pulsante

La electroforesis de campo pulsante en gel de agarosa permite separar moléculas de DNA de alto peso molecular (hasta 2000 kilobases [kb]). El fundamento de este método se basa en la propiedad que tienen las moléculas grandes de DNA de fraccionarse en los geles de agarosa, al ser sometidas alternativamente a dos campos eléctricos no homogéneos (en pulsaciones) y de orientación perpendicular. A diferencia de otras electroforesis, la muestra es procesada dentro de un gel de bajo punto de fusión. La corrida electroforética se realiza en un gel de agarosa de 1,5% que es sometido a la acción de los dos campos eléctricos que se alternan cada cierta cantidad de tiempo con la finalidad de lograr una migración diferencial en función del tamaño de las moléculas de DNA.

En esta técnica es fundamental controlar la homogeneidad de la temperatura y la conductibilidad en el gel. Luego de obtener la separación de las bandas, los resultados se pueden analizar por transferencia a una membrana para realizar la hibridación del material o por medio de un análisis con enzimas de restricción (RFLP).

Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

Los geles de poliacrilamida son muy usados en estudios de proteínas, por el alto poder de resolución que ofrecen para la separación de fragmentos de DNA de hasta 1 kb de longitud. Estos geles pueden separar y acomodar más fracciones que los de agarosa y el DNA recuperado es extremadamente puro. Los geles de poliacrilamida pueden ser de dos tipos: no desnaturalizantes y desnaturalizantes.

Los geles no desnaturalizantes se utilizan en la separación y purificación de fragmentos de DNA de doble cadena. Se corren a bajo voltaje (1-8 V/cm) para prevenir la desnaturalización de pequeños fragmentos de DNA debido al calor generado por el paso de la corriente eléctrica. En la mayoría de las especies, el DNA de doble cadena migra a una velocidad inversamente proporcional al Log_{10} de su tamaño o muy cercano a ella.

Los geles desnaturalizantes se emplean para correr fragmentos de cadena simple, por ejemplo, para el aislamiento de sondas marcadas. En la separación de fragmentos, las cadenas complementarias no migran a igual velocidad: las dos cadenas adquieren estructuras secundarias diferentes, como consecuencia de un apareamiento de bases intracatenario.

La concentración de los geles puede variar entre 3,5 y 20%, dependiendo del tamaño de los fragmentos de interés. La longitud de éstos puede variar entre 10 y 100 cm, según la separación que se requiera entre las bandas. La electroforesis se realiza invariablemente en posición vertical.

Si la electroforesis se realiza para estudios de proteínas, es usual el empleo de geles mixtos conformados por un gel concentrador y un gel separador, los que se diferencian entre sí por el tamaño del poro (concentraciones diferentes de acrilamida/bisacrilamida). La relación entre estas dos últimas y entre ellas y el resto de los componentes del gel determina el tamaño del poro. De este modo, mientras mayor sea la diferencia entre acrilamida y bisacrilamida, mayor será el tamaño del poro. Así como también si el porcentaje de acrilamida/bisacrilamida es mayor en relación con los demás componentes del gel, el tamaño del poro será menor.

TECNICAS DE HIBRIDACION EN FILTROS POR TRANSFERENCIA *SOUTHERN BLOT*

Para comprender la utilidad de la técnica de transferencia, se hace necesario formular la siguiente pregunta: ¿Por qué, si la separación de fragmentos de DNA de diferente peso molecular puede hacerse eficientemente mediante electroforesis en geles de agarosa, es inevitable transferir el DNA desde el gel hacia una membrana? Porque los geles de agarosa se dañan fácilmente durante los procesos de hibridación, lavado y detección. Además, las bandas de ADN se difunden rápido dentro del gel. Estas dificultades metodológicas fueron resueltas por primera vez por E. Southern (1975) mediante el desarrollo de la metodología de transferencia que lleva su nombre.

Sonda: se define como una secuencia de ADN marcada que es complementaria a la secuencia que se desea detectar. Tras la hibridación, si está marcada radiactivamente, será detectada por autorradiografía; mientras que, si la marca es no-isotópica, podría ser revelada mediante un sustrato cromogénico, fluorescencia o quimioluminiscencia.

Hibridación: apareamiento de dos cadenas simples de DNA, cuyas secuencias de bases son complementarias.

La técnica de Southern[1] consiste en transferir los fragmentos de DNA separados mediante electroforesis desde la matriz del gel de agarosa a una membrana de nailon o nitrocelulosa (el Northern es un método equivalente al Southern pero referido al RNA). Como se detalla en la figura 18-1, dicha metodología incluye varias etapas durante su desarrollo. El primer paso es extraer y purificar el DNA genómico, el que posteriormente se digiere con una o varias enzimas de restricción. Los productos obtenidos en la digestión, que consisten en numerosos fragmentos de restricción de un amplio rango de peso molecular, se separan mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa. El paso siguiente consiste en desnaturalizar el DNA mediante un álcali y transferirlo desde el gel hasta la membrana de nitrocelulosa o nailon. Como se observa en la figura 18-1, la transferencia puede realizarse por simple capilaridad, haciendo pasar una solución tampón de alta fuerza iónica, o empleando una bomba de vacío. Como el movimiento de los fragmentos de DNA sigue una trayectoria vertical, esto permite que se conserve en la

[1] Denominada así por su inventor.

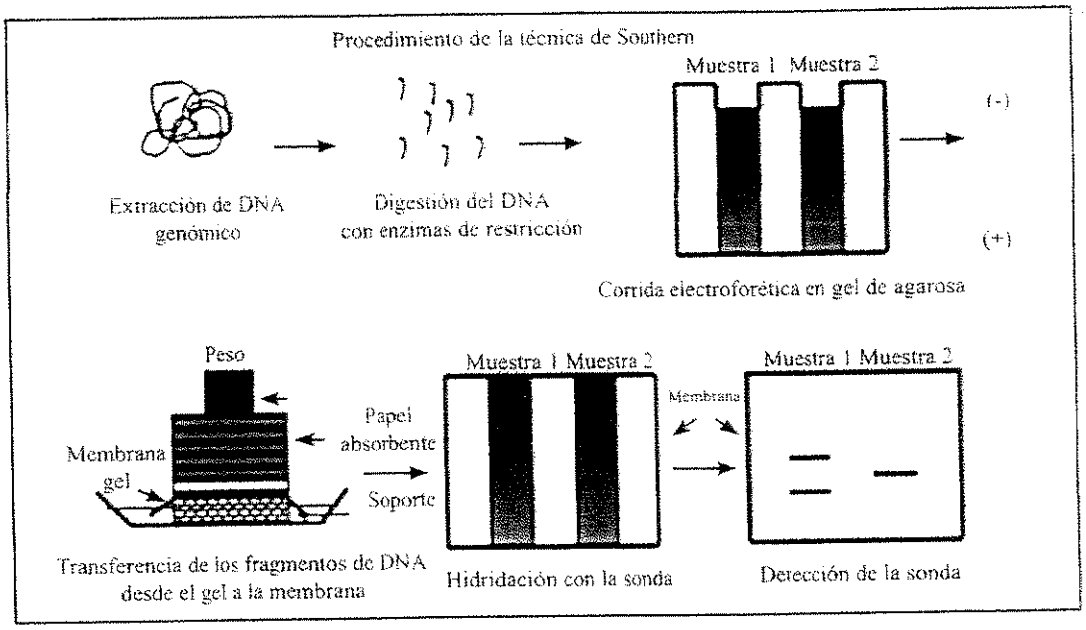


Figura 18-1. Procedimientos empleados en la técnica de Southern blot.

membrana la posición relativa de los fragmentos en el gel. Una vez finalizada la transferencia, el DNA de cadena simple se fija al nuevo soporte por tratamiento a 80 °C o por luz ultravioleta antes de comenzar con la hibridación. En la etapa siguiente, la membrana que contiene el DNA se pone en contacto con la sonda, permitiendo la hibridación de las secuencias homólogas. Finalmente, se procede a revelar la señal que contiene la sonda y, de esta manera, detectar las bandas de interés.

Según el tipo de sonda utilizado se pueden obtener patrones sencillos (sondas de locus simple) o complejos (sondas multilocus). Las técnicas de hibridación en filtros incluyen, además del Southern, las metodologías de punteado (*dot blot* y *slot blot*) e hibridación in situ de fagos, plásmidos, DNA bacteriano y de genotecas. En estos casos, el DNA correspondiente a las diferentes muestras (por ej., clones de un cultivo bacteriano o de una genoteca) se coloca en la membrana en forma de punto (*dot blot*) o de línea (*slot blot*), y éste se trata con un álcali para desnaturalizar el DNA. En el caso del Southern, tras la hibridación con la sonda marcada, aparecerán señales en los puntos que contengan ADN homólogo al de la sonda utilizada.

Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (*Restriction fragment lenght polymorphism*: RFLP)

Las enzimas que hidrolizan las uniones fosfodiéster de los ácidos nucleicos se denominan nucleasas. Estas enzimas pueden actuar tanto en los extremos de la cadena (exonucleasas) como en el interior de ésta (endonucleasas). Dentro de este último grupo encontramos a las enzimas de restricción, que son proteínas bacterianas que digieren al DNA de doble cadena al reconocer un determinado motivo o diana de restricción. Estas secuencias específicas se caracterizan por ser palindrómicas, es decir que tienen un eje de simetría, y por tener una longitud de 4 a 10 pares de bases (fig. 18-2).

Las bacterias utilizan estas enzimas para protegerse de la infección causada por bacteriófagos, ya que las mismas hidrolizan el DNA foráneo. Para preservarse de la hidrólisis de su propio material genético, las bacterias poseen enzimas de modificación que metilan su propio DNA en las regiones específicas reconocidas por las endonucleasas.

Las enzimas de restricción se nombran de acuerdo con la bacteria de la cual se han aislado; así, por ejemplo, *Hae*III fue aislada de *Haemophilus aegyptius* y *Eco*RI se obtuvo a partir de la cepa RY13 de *Escherichia coli*. Este tipo de endonucleasas pueden efectuar dos tipos de cortes en la cadena de DNA, cuando el corte se realiza por la mitad de la secuencia de reconocimiento genera extremos "romos", y cuando es desigual con respecto al eje de simetría se obtienen extremos "pegajosos" (fig. 18-2).

La biología molecular se revolucionó a partir del descubrimiento de las enzimas de restricción, ya que representaron una nueva herramienta para el estudio de los polimorfismos a nivel del DNA. El análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción obtenidos a través del uso de endonucleasas se denomina RFLP. Por otra parte, estas enzimas permitieron la realización de los mapas de restricción que indican la ubicación de los fragmentos de DNA en estudio a lo largo del cromosoma.

La técnica PCR-RFLP se basa en la detección de polimorfismos a nivel del DNA mediante el estudio de los fragmentos de restricción en el producto de amplificación. Las variaciones observadas mediante el uso de esta técnica pueden deberse a cambios moleculares tales como deleciones, inversiones, cambios de bases, o reordenamientos. Cualquiera de estos eventos puede crear, eliminar o translocar los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción. Estos cambios pueden suceder tanto en zonas que se transcriben como en zonas que no se transcriben, por lo que aportan un mayor grado de información y amplían los límites de los estudios.

En la figura 18-3 se observa cómo mediante el uso de la enzima *Hind*III se pueden identificar los alelos A y B del gen de la k-caseína bovina a partir del producto de amplificación del cuarto exón.

CLONACION DE SECUENCIAS DE DNA

El proceso de clonación o clonado de DNA consiste en la inserción de un fragmento de DNA de interés (inserto) en un vector (plásmido, bacteriófago, etc.) con el fin de producir múltiples copias de aquél en cantidad y pureza adecuadas para estudios moleculares posteriores. El inserto puede consistir en uno o más

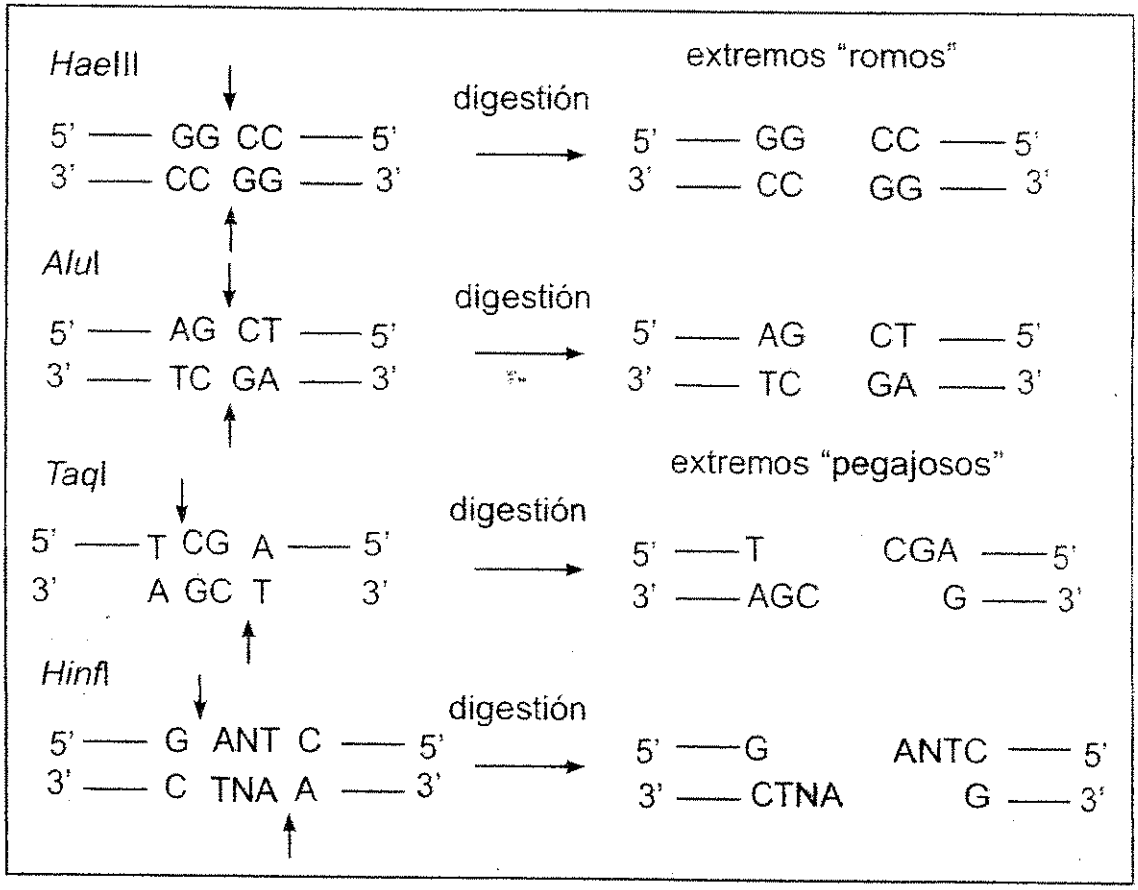


Figura 18-2. Representación esquemática de sitios de digestión correspondientes a cuatro enzimas, dos que producen extremos romos (*Hae*III y *Alu*I) y dos con extremos pegajosos (*Taq*I y *Hinf*I).

genes, porciones de un gen, o fragmentos generados por PCR de una determinada región del genoma.

El ligado del vector con el segmento de DNA da lugar a una molécula que conserva la capacidad de autorreplicación del plásmido original, de modo que la secuencia insertada se replica con el vector, y se conoce como molécula de DNA recombinante (fig. 18-4).

Vectores de clonado

En la práctica experimental, la selección del vector apropiado dependerá del tamaño del fragmento que se desea clonar, del sistema de selección de los clones transformados, de las enzimas de restricción que sean compatibles entre el vector y el fragmento, y de si el vector va a usarse para expresar secuencias clonadas en *E. coli* o en células de mamíferos. Los vectores de clonado poseen diferente capacidad media de soportar distintos tamaños de insertos, que depende del tipo de vector elegido, de su longitud en pares de bases (pb), de su huésped natural y de la forma de integración o expresión en ese hospedador.

Plásmidos

Los plásmidos son moléculas circulares de DNA extracromosómico de doble cadena, que contienen grupos de genes con capacidad de replicar. Se encuentran naturalmente en la mayoría de las bacterias. Estos elementos episomales se identifican comúnmente con genes de resistencia a fármacos (plásmidos R), autotransmisibilidad (plásmido F) y antibióticos conocidos como bacteriocinas (sustancias colicinogénicas).

Además de los plásmidos de ocurrencia natural, se han construidos plásmidos in vitro que contienen un origen funcional, tales como los plásmidos oriC con el origen de cromosomas bacterianos, los plásmidos ldv con el origen del fago l, y aun con elementos ARS de levaduras. Los plásmidos más estudiados de las bacterias gramnegativas (tabla 18-1) dependen de las proteínas del hospedador para la síntesis de DNA, pero contribuyen con factores propios para el proceso de iniciación.

Los plásmidos se mantienen en un número fijo de copias por célula mediante controles que regulan la frecuencia de la iniciación. Además, proveen vectores de intercambio genético entre bacterias durante el proceso de conjugación, y algunos codifican funciones que les permiten invadir nuevas células, es decir, son autotransmisibles. Este rasgo es de enorme importancia médica dado que es responsable de la rápida propagación de la resistencia a fármacos en las poblaciones bacterianas.

La resistencia a antibióticos es una característica muy útil para la selección de las moléculas recombinantes. Así, los plásmidos que han sido introducidos y propagados/replicados en la célula bacteriana otorgan a esta última la capacidad de degradar las moléculas de antibióticos que de otra manera hubieran sido letales para ellas (por ej., resistencia a ampicilina o a gentamicina). La existencia de marcadores seleccionables permite discriminar a los plásmidos que han incorporado el inserto de interés; el mecanismo de detección más utilizado consiste en la α-complementación (ver ejemplo). Los plásmidos se usan frecuentemente para clonar fragmentos de DNA pequeños, subclonar fragmentos de DNA grandes o generar bibliotecas genómicas pequeñas.

Como ejemplo del procedimiento general se describirá el clonado de productos de PCR. Para esto se utilizan plásmidos *dT-tailed* de la serie pGEM. Estos plásmidos son derivados

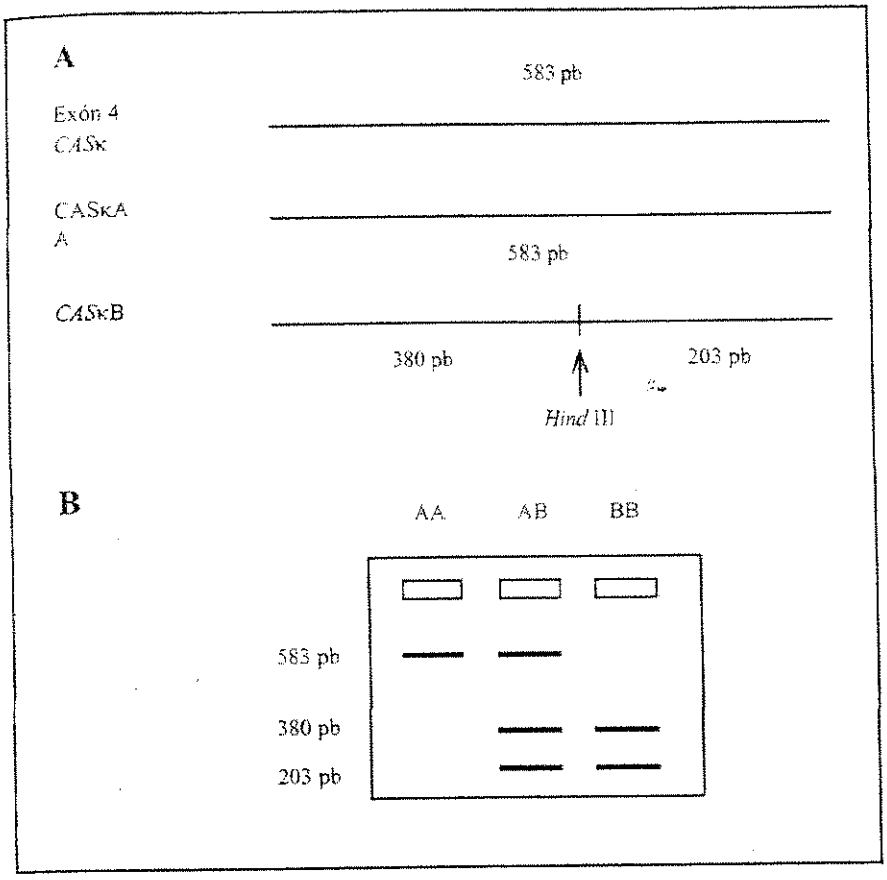


Figura 18-3. *A*, Representación esquemática de los patrones de restricción correspondientes al cuarto exón del gen *k*-caseína (*CASk*) digerido con la enzima *Hind*III y *B*, su posterior visualización en un gel de poliacrilamida.

artificiales de la linealización del pGEM-5Zf (+), un plásmido multicopia (20-80 copias por célula) que posee un sitio autónomo de inicio de la replicación y puede modificar el fenotipo de la bacteria hospedadora, dado que en su genoma está presente el gen que codifica para resistencia al antibiótico ampicilina. Como todos los vectores plasmídicos, tienen una región conocida como sitio múltiple de clonado MCS -*Multiple Cloning Site*- con una sucesión de sitios de reconocimiento para enzimas de restricción, y en este vector en particular los extremos 3´ terminales poseen una timidina que facilita la ligación de productos de PCR.

Por medio de la reacción de ligación, el producto de amplificación seleccionado se une a la timidina en posición 3´ terminal del plásmido. Como en su DNA está codificada la porción NH_2 terminal del gen de la β-galactosidasa o lacZ (promotor y primeros 146 aminoácidos), la inserción interrumpe la porción α del gen lacZ codificada en el vector, de modo que los plásmidos recombinantes no pueden expresar el gen en presencia, en el medio de cultivo, del inductor gratuito, isopropiltio-β-D-galactósido (IPTG). Los plásmidos que no poseen el inserto sí expresan la porción a del gen lacZ, y al complementar con la porción β codificada en la bacteria hospedadora, en presencia del sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido (X-Gal), las colonias son de color azul. Este fenómeno se conoce como α-complementación, y es de gran utilidad en la selección de clones recombinantes en conjunción con el uso de antibióticos.

Las cepas bacterianas que se usan como hospedadoras para el vector recombinante generalmente son cepas bacterianas de *Escherichia coli*. Algunas son deficientes en recombinación para impedir la multimerización del inserto y los reareglos en el DNA, y carecen de

Tabla 18-1. Plásmidos de ocurrencia natural en bacterias gramnegativas (kb = kilobases de DNA)

Plásmido	Longitud (kb)	Autotransmisibilidad	Nº de copias	Características
ColE1	6	-	10-20	Confiere inmunidad a colicina E1
R300B	9	-	10-20	
pSC101	9	-	4-6	Resistencia a tetraciclina (Tc^R)
F	~90	+	1-2	Pili F
ColV	~90	+		
RK2	56	+	5-8	Amplio rango de huésped
Plásmidos de *Agrobacterium*	140-500	+		Inducción de tumores en plantas
Plásmidos de *Rhizobium*	40-50	+		Inducción de tumores en plantas

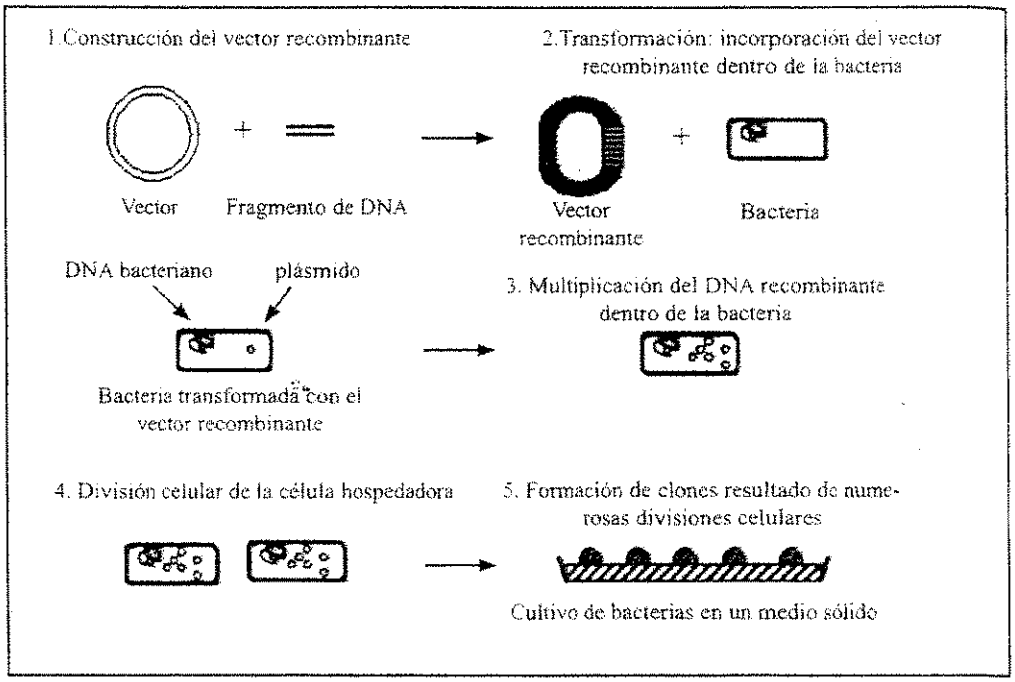


Figura 18-4. Etapas del proceso de clonación de una secuencia DNA.

sistemas de metilación-restricción. Además, estas cepas codifican en su DNA el fragmento COOH terminal (fragmento β) del gen lacZ.

El tratamiento con CaCl induce un estado de "competencia" o desestabilización en la pared de la bacteria receptora, durante el cual las células son capaces de recibir DNA de distinta procedencia. El plásmido con el inserto de DNA introducido en la célula bacteriana se replica aprovechando la maquinaria enzimática de la hospedadora. El estado de "competencia" se induce en las paredes bacterianas mediante un procedimiento químico que involucra un tratamiento con sales de calcio o de magnesio. También puede realizarse mediante electroporación, procedimiento más rápido y que rinde mayores eficiencias de transformación, que oscilan alrededor de 1×10^5 a 1×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC)/mg de DNA.

La transformación por choque térmico se realiza mezclando parte de la reacción de ligación con células competentes. Este *shock* determina la entrada del DNA foráneo (plásmido + inserto) a través de la pared en estado "competente" de la bacteria. Luego del tratamiento, las células se incuban por un ciclo de generación en medio suplementado con glucosa, que induce la expresión de los genes lacZ, cuyo producto servirá para seleccionar por color las colonias recombinantes en el medio de selección (colonias blancas).

La presencia del inserto se verifica mediante PCR con los mismos cebadores utilizados para obtener los productos iniciales y los clones "positivos" se almacenan en la forma de cultivo saturado a -70 °C con crioconservantes.

PURIFICACION DE DNA PLASMIDICO

El DNA de los plásmidos recombinantes puede aislarse y purificarse, de manera tal que el fragmento clonado puede posteriormente separarse del DNA cromosómico y de los componentes macromoleculares de la bacteria. Uno de los métodos de purificación utilizados tradicionalmente se denomina "lisis alcalina". En este último, las suspensiones de cultivos bacterianos saturados (con plásmidos recombinantes) se lavan en medio de cultivo y se someten sucesivamente a tratamientos a pH elevado (12-12,6), que producen la lisis celular y la desnaturalización del DNA bacteriano, sin afectar al plásmido circular y cerrado covalentemente. La neutralización del extracto con solución rica en sales provoca la precipitación del cromosoma bacteriano y del RNA, y la presencia de detergentes aniónicos (SDS) produce la precipitación de las proteínas. El sobrenadante límpido resultante contiene en suspensión el DNA plasmídico, quedando los demás componentes celulares, incluido el DNA bacteriano, en el fondo del tubo. La purificación posterior se realiza con solventes orgánicos (fenol:cloroformo) y precipitación con etanol o isopropanol. El DNA plasmídico resuspendido en *buffer* o agua destilada estéril se cuantifica en gel de agarosa con estándares de DNA de concentración conocida.

El rendimiento de DNA puro de minipreps es de aproximadamente 100 ng/ml a partir de 1-3 ml de cultivo saturado inicial, en tanto que las preparaciones a gran escala (midipreps y maxipreps) rinden hasta 3000 mg por cada 500 ml de medio de cultivo inicial. Estas últimas preparaciones explotan las diferencias de densidad entre el plásmido superenrollado, otros ácidos nucleicos y las proteínas en suspensión para la purificación. Alternativamente, pueden utilizarse *kits* comerciales de extracción que, en aproximadamente 1 hora, permiten obtener DNA puro en altas concentraciones a partir de 1,5 ml de cultivo.

Cósmidos

Las bibliotecas genómicas de organismos eucariotas se preparan generalmente con el bacteriófago λ (lambda) como vector. El fago lambda puede funcionar de forma lítica o lisogénica (integrado en el DNA de *E. coli*) y posee una región de su DNA que contiene los genes para las funciones lisogénicas, de modo que es prescindible a la hora de insertar un fragmento de DNA en esa zona. Para que sea útil en clonación molecular, sólo se requieren sus funciones líticas, que aseguran un alto número de copias por célula. La digestión con enzimas apropiadas permite la separación del fragmento que codifica para las funciones lisogénicas y la inserción en esa localización del inserto de DNA (vectores de

inserción), que si es de alrededor de 32-47 kpb, permite la regeneración in vivo de partículas fágicas con un empaquetamiento correcto. La inclusión de un pequeño fragmento del genoma del fago l en un plásmido permite utilizar el sistema de empaquetamiento in vitro con alta eficiencia de transformación, y son los vectores conocidos como cósmidos, con las propiedades de los plásmidos y con capacidad de aceptar insertos grandes.

Vectores de expresión

Los vectores de expresión son plásmidos construidos con propiedades especiales que les permiten expresar el fragmento insertado y detectar dicha expresión mediante diferentes mecanismos. Las condiciones indispensables de un vector de expresión son la presencia en su DNA de un promotor reconocido por la polimerasa de RNA del huésped, ya sea fágico o bacteriano (por ej., promotor de T7); un sitio de reconocimiento del ribosoma (RBS) o secuencia de Shine-Dalgarno antes del ATG inicial; y señales de terminación de la transcripción. La presencia de marcadores seleccionables (resistencia a antibióticos, sensibilidad a proteína tóxica, etc.) depende del tipo de vector. Existen diversas estrategias para producir la proteína recombinante de forma fácil de detectar y en cantidades adecuadas para su purificación. Algunos ejemplos consisten en la generación de proteínas de fusión entre el inserto y una proteína codificada en el vector, que pueden detectarse, por ejemplo, con emisión de fluorescencia (Green Fluorescence Protein, sistema pGlow-Topo) o cromatografía de afinidad a metales (IMAC) para detección de poli Histidinas (sistema pEL B), etc.

Para obtener una proteína recombinante in vitro existen varios sistemas de expresión posibles, dependiendo de las características de la proteína (proteínas secretorias o estructurales, estado de glicosilación en péptido maduro, etc.), la finalidad de la purificación (estudios estructurales, generación de anticuerpos monoclonales, etc.), además de considerar previamente la forma en la cual se desea purificar la proteína expresada. Estos sistemas de expresión son: bacterias, levaduras, baculovirus y células de mamíferos.

Aplicaciones

Las aplicaciones del uso de la tecnología del DNA recombinante son múltiples y en los últimos años se ha incrementado notablemente dada la disponibilidad de sistemas de detección estandarizados que permiten acelerar los tiempos necesarios para obtener resultados, haciendo la aplicación sencilla y repetible. En la figura 18-5 se esquematizan algunos usos y aplicaciones.

Obtención de proteínas recombinantes de mamíferos

Una serie de hormonas como la insulina, la hormona del crecimiento, factores de coagulación, etc. tienen un interés médico y comercial muy grande. Antes, la obtención de estas proteínas se realizaba mediante su extracción directa a partir de tejidos o fluidos corporales. En la actualidad, gracias a la tecnología del DNA recombinante, se clonan los genes de ciertas proteínas humanas en microorganismos adecuados para su fabricación comercial. Un ejemplo típico es la producción de insulina que se obtiene a partir de la levadura *Saccharomyces cerevisae*, en la cual se clona el gen de la insulina humana.

Vacunas recombinantes

El sistema tradicional de obtención de vacunas a partir de microorganismos patógenos inactivos puede comportar un riesgo potencial. Muchas vacunas, como la de la hepatitis B, se obtienen actualmente por ingeniería genética. Como la mayoría de los factores antigénicos son proteínas, lo que se hace es clonar el gen de la proteína correspondiente.

SECUENCIACION DE DNA

El método enzimático de Sanger (fig. 18-6) se basa en la extensión específica de la cadena de DNA a partir de un primer, por la acción de la DNA polimerasa, y la introducción de dideoxinucleótidos (ddNTPs) trifosfato en la cadena en formación.

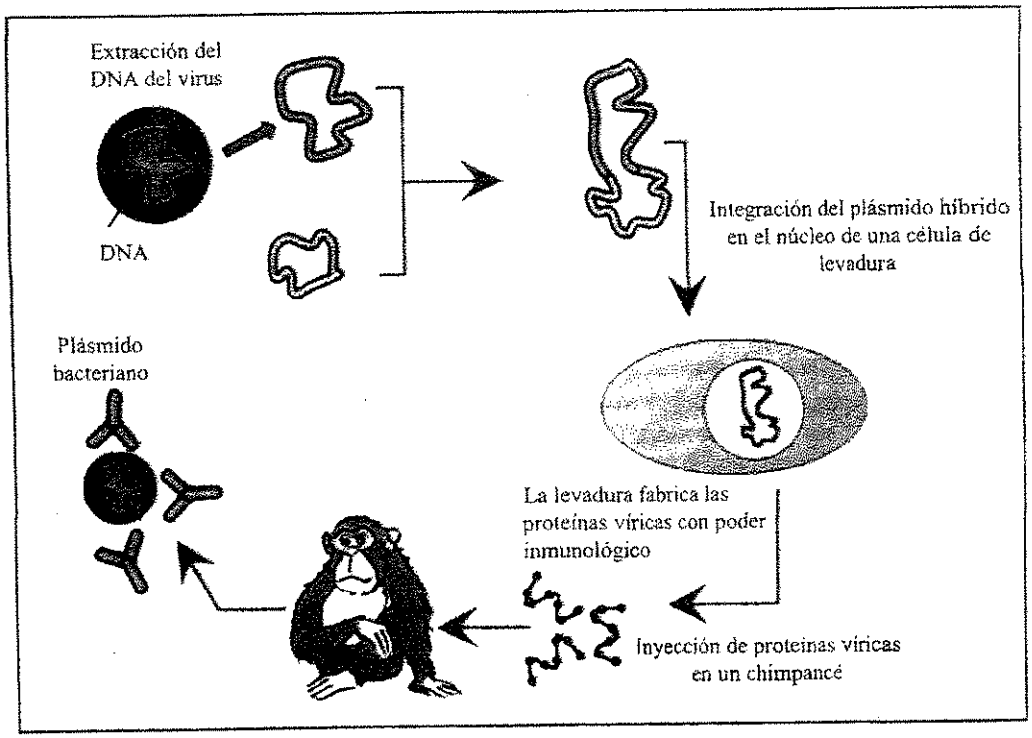


Figura 18-5. Aplicaciones de la tecnología del DNA recombinante.

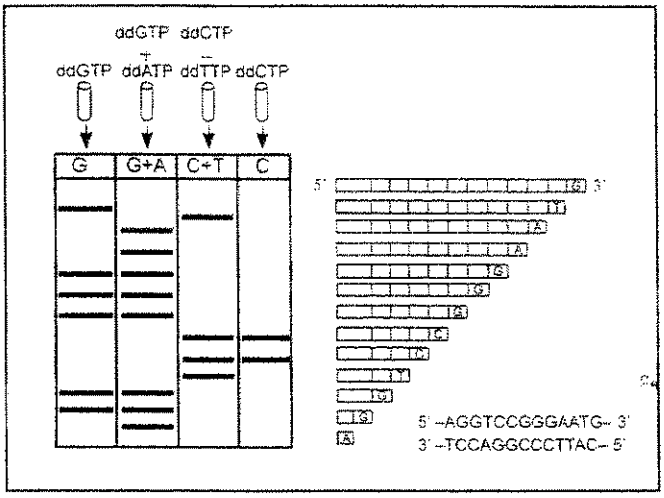


Figura 18-6. Procedimiento para secuenciación de DNA ideado por Sanger y col. (1977).

Los 2′, 3′ ddNTPs carecen de un residuo -OH en posición 3′ de la deoxirribosa. Se incorporan a la cadena en crecimiento por medio del trifosfato 5′, pero al carecer del hidroxilo 3′ no pueden formar enlaces fosfodiéster con nucleótidos sucesivos y la cadena queda interrumpida. En la reacción se usan dNTPs convencionales, además de los ddNTPs, de modo tal que compiten entre ellos y se producen poblaciones de oligonucleótidos terminados A, C, G o T en la cadena molde.

Actualmente, la secuenciación se realiza en equipos automatizados que utilizan los mismos principios básicos establecidos por Sanger y col. (1977), pero empleando los cuatro dideoxinucleótidos (ddNTPs) trifosfato en una misma reacción, los cuales se diferencian con cuatro fluorocromos distintos que son "leídos" por un láser, y la información se registra en forma de un cromatograma, que es la representación gráfica de los picos de luz emitida a diferentes longitudes de onda en cada posición leída.

Estrategias de secuenciación del genoma

- El DNA genómico se corta aleatoriamente en fragmentos, que se separan en distintas clases de tamaños y se insertan en distintos tipos de vectores, cada uno con una capacidad media diferente (por ej., los YAC portan insertos entre 100 y 2000 kb; los cósmidos, unas 40 kb).
- Se preparan mapas físicos de baja resolución a base de clones solapados de insertos de YAC.
- Se preparan mapas físicos de alta resolución, preparados para la secuenciación, por medio de la subclonación en cósmidos de fragmentos aleatorios de insertos de YAC.
- Finalmente, se escoge un conjunto de clones de cósmidos con solapamientos mínimos, sus insertos se rompen aleatoriamente y se subclonan en vectores para la secuenciación (derivados del fago M13, plásmidos de la serie pUC, etc.).

Por cada cósmido hay que secuenciar unos 800 clones de fago M13, con un tamaño medio de inserto de 400 pb, y la secuencia de 40 kb del inserto del cósmido original se ensambla computacionalmente. Este enfoque de secuenciación aleatoria (*shotgun*) obliga a secuenciar muchas veces (unas 8 o 10) el mismo segmento de secuencia, con la ventaja de asegurar una mayor fiabilidad de los datos obtenidos. Sin embargo, presenta varios inconvenientes: hay que disponer previamente de buenos mapas; los YAC son inestables y muchos de ellos son quimeras, artefactos de clonación que no reflejan el orden genómico, y esta metodología no se puede automatizar totalmente.

Nuevas metodologías de análisis genético

La revolución del DNA recombinante nos provee de herramientas y técnicas para aislar y caracterizar genes individuales; sin embargo, esta metodología de estudio tiene dos grandes limitaciones. Primero, estudiar un gen a la vez es laborioso y costoso. Segundo, esta metodología de estudio se basa en un punto de vista reduccionista de la biología, ya que es sabido que los genes no funcionan en forma aislada sino que miles de ellos deben trabajar coordinadamente en las actividades biológicas que ocurren en cualquier organismo. La segunda revolución en la biología molecular comprende la genómica, que incluye el estudio de los genomas enteros e incorpora las modernas técnicas de mapeo, secuenciación, hallazgo de genes y análisis funcional. Las herramientas de la genómica y la bioinformática permiten obtener y analizar muchos más datos en cortos periodos.

La revolución genómica comenzó en la década de 1990 con el Proyecto Genoma Humano. Los objetivos iniciales del proyecto fueron el mapeo y la secuenciación del genoma con el fin de identificar la totalidad de los genes. Su primera fase involucró la creación de un mapa genético de alta densidad que se utilizó como andamiaje para el ensamble del mapa físico de los clones de DNA (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Durante el progreso del proyecto fueron secuenciados también los genomas de muchas bacterias y algunos eucariotas; éstos incluyen varios patógenos humanos y otros organismos de gran utilidad como modelos experimentales (*Drosophila melanogaster, Caenorhabditis elegans y Saccharomyces cerevisiae*). A medida que el volumen de datos de secuencias fue creciendo se desarrollaron paralelamente varias metodologías diseñadas para el estudio funcional de los genes.

Análisis de la expresión génica. El desarrollo de nuevas tecnologías basadas en la secuenciación a gran escala de cDNA y la utilización de microarreglos de DNA han permitido el estudio simultáneo de la expresión de miles de genes. Estos estudios pueden demostrar el efecto de diferentes condiciones experimentales sobre el perfil de expresión génica, ayudando a reconocer grupos de genes que se expresan diferencialmente y en forma coordinada en respuesta al cambio producido. Los microarreglos utilizan pequeños soportes sólidos donde las secuencias de diferentes genes (DNA o cDNA) son inmovilizados en localizaciones fijas. En general se usan como soportes portaobjetos, chips siliconados o membranas de nailon, a los cuales se expone a una muestra cuyo perfil de expresión génica (transcripción de mRNA) se desea analizar. La importancia de

BAC: Cromosoma artificial de la bacteria (*bacterial artificial chromosome*).
YAC: Cromosoma artificial de levadura (*yeast artificial chromosome*).
Clones conformados por un gran segmento de DNA (100,000 a 200,000 bases) de otras especies, insertado en el genoma de una bacteria o de levaduras, respectivamente.

esta metodología radica en que en un pequeño espacio se puede analizar la expresión de miles de genes.

Análisis de la expresión y estructura proteica. Varias técnicas de separación de alta resolución, como la electroforesis en geles de dos dimensiones, pueden utilizarse para el fraccionamiento de mezclas complejas de proteínas. A su vez, otras tecnologías, como la espectrometría de masas, pueden ser utilidad en la identificación de proteínas individuales en forma rápida y confiable. De esta forma es posible analizar y comparar la expresión diferencial de miles de proteínas en diferentes muestras. Se han lanzado varios programas mundiales de genómica estructural encargados de resolver la estructura de cientos de proteínas. Estos programas buscan cubrir la mayor parte de las familias proteicas y de esta manera incrementar la frecuencia de asignación de la función que poseen los diferentes genes.

Otro aspecto de la genómica que probablemente poseerá un gran impacto en la medicina es el análisis de la variabilidad genética de los individuos. En este capítulo se describió el uso de secuencias de DNA como herramientas de diagnóstico para la identificación de variantes génicas particulares asociadas con enfermedades. Más recientemente, estas técnicas basadas en los mismos principios básicos han evolucionado para la tipificación a gran escala de polimorfismos de simples nucleótidos (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP).

Los SNP consisten en cambios genéticos en un nucleótido que pueden ocurrir en la secuencia de DNA de un organismo. En general, se hallan fuera de las zonas codificantes, por lo que no producen cambios físicos en los individuos, salvo aquellos cambios que están involucrados en el desarrollo de algunas patologías, o que puedan intervenir en la respuesta a determinado fármaco o a regímenes. En no mucho tiempo, los clínicos podrán evaluar la susceptibilidad de sus pacientes a una enfermedad determinada, analizando sus DNA en la búsqueda de determinados patrones de SNP. Otra aplicación potencial de los SNP es para el estudio de la respuesta a las drogas y la individualización de la terapéutica en medicina.

BIBLIOGRAFIA

Doly HC. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7:1513.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; 1626 pp.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467.

Southern E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 1975; 98:593.

Capítulo 19

ANTIMICROBIANOS

Elida Gentilini

Este capítulo relata los mecanismos básicos de acción de los antibióticos y los mecanismos más comunes de resistencia bacteriana.

DESARROLLO HISTORICO

La terapéutica antiinfecciosa hasta el siglo XIX fue estrictamente empírica. Desde el siglo XVI, datan antecedentes sobre el uso de antisépticos para prevenir el crecimiento microbiano, como los compuestos mercuriales para el tratamiento de sífilis. En el siglo XIX, nativos de Sudamérica (indios del Perú) utilizaban la corteza de chinchona (que contiene quinina), para tratar eficazmente el paludismo, sin saber que actuaba directamente sobre el parásito.

La posibilidad de utilizar sustancias antibacterianas in vivo de baja toxicidad para el hombre y los animales con fines terapéuticos se inicia en 1904 con las investigaciones del médico alemán Paul Ehrlich, quien experimenta con colorantes de anilina como bactericidas, y culmina en 1910, con la síntesis del salvarzán (arsfenamina, un compuesto arsenical activo frente al treponema responsable de la sífilis, así como ante otras espiroquetas).

En 1935, Domagk marca el primer hecho importante en la historia de la quimioterapia de las infecciones bacterianas sistémicas. Demuestra que el rojo Prontosil protegía a los ratones frente a la infección estreptocócica sistémica, con un efecto curativo. Más tarde Trefouel, en Francia, comprueba que la molécula intacta del Prontosil carecía de actividad antibacteriana in vitro, pero que los pacientes a los que se les administraba el colorante eliminaban por la orina un producto incoloro, la sulfanilamida, que era activa in vitro.

El segundo hecho importante ocurre con la penicilina, la primera sustancia producida por microorganismos que inhibe el crecimiento de otros microorganismos (antibiótico), utilizada como quimioterápico. Esto da inicio a la llamada "edad de oro" de la terapéutica antimicrobiana.

Alexander Fleming, en 1929, reconoce el efecto antibiótico al observar la inhibición del desarrollo de estafilococos en un cultivo contaminado con un hongo *Penicillium* (fig. 19-1).

Ante esta situación, Fleming realiza experimentos y observa que el caldo en el cual cultivaba el hongo durante 1 o 2 semanas a temperatura ambiente adquiría propiedades bacteriolíticas y bactericidas frente a muchas bacterias patógenas. Dicho caldo contenía la sustancia inhibitoria a la que llamó penicilina.

Pasaron varios años luego de estas observaciones, hasta que Ernest Chain y Howard Florey, en 1940, retomaron los experimentos y purificaron suficiente cantidad de penicilina para probar su eficacia frente a infecciones producidas por estafilococos, estreptococos y bacilos de la gangrena. Durante la Segunda Guerra Mundial, la penicilina se prueba en los soldados heridos, sin dejar dudas sobre su acción. Debido a la insistencia del ejército para que se pusiera en condiciones de emplearla, Estados Unidos inició la industrialización y utilización masiva.

Entre las décadas de 1940 y 1950, se descubren otros antimicrobianos, como la estreptomicina, a partir de un cultivo de *Streptomyces griseus*, el cloranfenicol a partir de *Streptomyces venezuelae* y la oxitetraciclina a partir de *Streptomyces rimosus*. Luego, rápidamente, se desarrollan otras sustancias con acción antibacteriana, entre ellas, aminoglucósidos, penicilinas sintéticas, cefalosporinas y quinolonas.

El uso terapéutico de estos fármacos en medicina veterinaria y humana constituye una de las contribuciones más importantes, al aumentar el espectro de enfermedades infecciosas que se pueden prevenir o curar. No obstante, las bacterias demuestran una notable capacidad para desarrollar resistencia a los agentes antibacterianos.

La tabla 19-1 resume la terminología básica utilizada en el presente capítulo.

Antimicrobiano es una definición más amplia que la de antibiótico; no obstante, el uso del término antibiótico se extiende para incluir agentes antibacterianos elaborados parcial o totalmente por síntesis química, como las sulfonamidas y las quinolonas, que no son producidas de manera natural.

La selectividad se explica por las diferencias estructurales y bioquímicas entre las células eucariotas y procariotas. Por ejemplo, la penicilina ejerce un efecto bactericida sobre la bacteria por inhibir la síntesis de la pared celular, no existiendo una estructura comparable en las células de los mamíferos.

Para el caso de los hongos (que son células nucleadas) o los virus (que se replican empleando la maquinaria genética de las células parasitadas), se han desarrollado fármacos antifúngicos y antivirales, de creciente eficacia en la clínica.



Figura 19-1. Descubrimiento de la penicilina. Alexander Fleming tomó esta fotografía en 1929. (Fuente: Introducción a la Microbiología. Tortora, Funke, Case. Ed. Acribia. 1983.)

Tabla 19-1. Terminología

Antimicrobiano incluye a toda sustancia de origen natural, semisintética o sintética, que mata o inhibe el desarrollo de un microorganismo, causando escaso o nulo daño al huésped.

Antibiótico es una sustancia química, producida naturalmente por un microorganismo y que, en bajas concentraciones, destruye o inhibe el desarrollo de otros microorganismos.

Quimioterápicos *son sustancias químicas que actúan inhibiendo reacciones metabólicas esenciales sobre el microorganismo blanco y son relativamente inocuas para el metabolismo de las células del huésped.*

Actividad bacteriostática es el valor de la actividad antimicrobiana que **inhibe** el desarrollo de un microorganismo. Esta se determina in vitro enfrentando una concentración constante de bacterias frente a una serie de diluciones del antibiótico. La concentración más baja de antibiótico que inhibe el desarrollo bacteriano (que es el tubo que posee la dilución más alta de antibiótico y que no presenta desarrollo visible) se denomina concentración inhibitoria mínima **(CIM)**.

Actividad bactericida es el valor de la actividad antimicrobiana que **mata** a un microorganismo determinado. Esta se determina in vitro enfrentando una concentración constante de bacterias frente a una serie de diluciones del antibiótico. La concentración más baja que mata al 99,9% de la población bacteriana se denomina concentración bactericida mínima **(CBM)**.

Combinaciones antibióticas: 1) Sinergismo: combinación de dos antibióticos que hace que éstos tengan mayor actividad bactericida juntos que separados. **2) Antagonismo:** combinación de antibióticos que hace que la actividad de uno de ellos interfiera con la actividad del otro (por ej., su actividad conjunta es menor que la actividad de cada uno por separado).

PROPIEDADES DE UN ANTIBIOTICO IDEAL

El antibiótico ideal empleado con fin terapéutico debe reunir una serie de condiciones:

- Tener una toxicidad selectiva para el agente infeccioso, lo que implica escasa o nula toxicidad para las células del huésped y alta para el patógeno.
- Penetrar en los tejidos y las células del organismo para ejercer su acción sobre el agente infeccioso.
- Alcanzar la concentración adecuada para ejercer su efecto en el foco de la infección y que se excrete lentamente.
- Poseer una acción más bactericida que bacteriostática. Los agentes bactericidas matan a los microorganismos, y los bacteriostáticos inhiben el desarrollo, interviniendo los mecanismos de defensa del huésped en la erradicación final de la infección.
- No alterar los mecanismos de defensa naturales del hospedador (fagocitosis, producción de anticuerpos, entre otros).
- No generar aparición rápida de resistencia.
- Poseer un amplio espectro de acción sobre los microorganismos que con mayor frecuencia se aíslan.
- Permanecer activo en presencia de plasma, líquidos corporales, exudados.
- Poseer actividad antibacteriana in vitro.
- Ser estable para garantizar un período razonable de almacenamiento.
- Ser económicamente accesibles.
- No producir efectos colaterales indeseables en el huésped (alergia, lesiones en riñones, aparato digestivo, sistema nervioso u otros).

RESISTENCIA DE LOS MICROORGANISMOS A LOS ANTIMICROBIANOS

El desarrollo de cepas resistentes hace necesaria la determinación de la susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos provenientes de muestras biológicas. Esta se lleva a cabo mediante pruebas in vitro de susceptibilidad, que permiten seleccionar los quimioterápicos según la sensibilidad demostrada por el microorganismo causal.

Los métodos empleados son, entre otros, la difusión con monodiscos de antibióticos (método de Kirby-Bauer), la determinación de la concentración inhibitoria mínima del antibiótico (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM). Estas pruebas están cuidadosamente estandarizadas, con el objeto de mejorar el valor predictivo clínico de los resultados. Desde 1958, el Comité Nacional de Estandarización de Laboratorios Clínicos (NCCLS) estableció un Subcomité de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana Veterinaria (VAST). Gracias al desarrollo del NCCLS-VAST, se están generando los criterios interpretativos de los agentes antimicrobianos veterinarios específicos con el empleo de aislamientos animales, datos farmacocinéticos recolectados de especies animales blancos y ensayos clínicos llevados a cabo en tales especies.

Tipos y mecanismos generales de resistencia

La resistencia de los microorganismos frente a los antibióticos puede ser natural o intrínseca, mutacional o adquirida.

Natural o intrínseca: es la consecuente de la estructura y la fisiología natural de la especie, y está codificada en el cromosoma de todas las cepas. Los mecanismos de resistencia natural pueden producirse por impermeabilidad al antibiótico, eflujo o presencia de enzimas inactivantes.
Este tipo de resistencia se presenta en todos los integrantes de un género microbiano frente a determinados antibióticos. Ejemplo: *Pseudomonas aeruginosa* es naturalmente resistente a cloranfenicol, aminopenicilinas, macrólidos, tetraciclinas, cefalosporinas de primera y segunda generación (C1G y C2G), glicopéptidos y ácido nalidíxico. Las enterobacterias son naturalmente resistentes a vancomicina y la mayoría de los grampositivos, a polimixina B.

Mutacional: es la derivada de mutaciones espontáneas en la información contenida en el cromosoma (por alteración de

la secuencia natural de nucleótidos en el DNA). Las mutaciones pueden ocurrir en genes preexistentes en las células o en genes adquiridos.

Mutaciones en genes preexistentes: pueden afectar tanto a los genes estructurales como a los regulatorios.

- *En genes estructurales:* pueden aparecer mutaciones puntuales, por ejemplo, en *Mycobacterium* spp, con un rápido desarrollo de resistencia a estreptomicina y a rifampicina. También puede ocurrir una mutación gradual en nucleótidos individuales en diferentes genes, con aparición de resistencia escalonada; por ejemplo, a las fluorquinolonas.
- *En genes regulatorios:* por ejemplo, mutaciones en genes responsables del sistema regulador de la AMP-C (véase β-lactamasa cromosómica inducible) por la inducción de C1G, C2G y C3G, originándose alto nivel de resistencia y de amplio espectro a los antibióticos β-lactámicos.

Mutaciones en genes adquiridos: en la familia de las β-lactamasas (enzimas que causan resistencia a los antibióticos β-lactámicos), aparecen mutaciones en TEM y SHV. Cambios mínimos en la estructura molecular de las β-lactamasas pueden generar grandes diferencias en la función de la enzima. Por ejemplo, un cambio de un nucleótido simple puede convertir la β-lactamasa TEM-1 en TEM-12; un segundo cambio en un nucleótido simple puede convertir a la TEM-12 en TEM 26, con aumento de resistencia a ceftacidima.

Adquirida: es la adquisición de un carácter de la resistencia previamente ausente en la bacteria.

La transferencia del material genético responsable de la resistencia, puede ocurrir por conjugación, transducción y transformación, procesos básicos de transferencia de genes entre bacterias.

Los elementos genéticos que participan en la transferencia de genes de resistencia son los plásmidos, los transposones, DNA de bacteriófagos y recientemente los integrones y casetes genéticos de resistencia.

Conjugación: es el proceso más importante, extendido en bacterias gramnegativas e incluso en grampositivas. La célula donadora transfiere a la célula receptora, a través del pili sexual, copias de genes de resistencia mediados por plásmidos.

Transformación: es la transferencia de DNA desnudo de una bacteria a otra. Las células deben ser competentes para poder incorporar el DNA, clivarlo y recombinarlo. En general se produce entre géneros muy relacionados, debido a la necesidad de una alta homología de secuencias de nucleótidos para que ocurra la recombinación. Se presenta principalmente en los géneros *Streptococcus* spp y *Neisseria* spp.

Transducción: es el proceso por el cual el DNA del plásmido es incorporado por un bacteriófago y luego transferido a otra bacteria. Ejemplo: la transferencia del gen de β-lactamasa de estafilococos resistentes a otro estafilococo sensible. Este mecanismo de transferencia de DNA es poco importante en la diseminación de resistencia, debido a la especificidad de los bacteriófagos.

Elementos que participan en la transferencia de genes de resistencia

Plásmidos: son DNA circulares extracromosómicos y: 1) se autoduplican; 2) son heredables; 3) pueden tener otras funciones: factores de virulencia, cambios metabólicos; resistencia a metales pesados; 4) pueden estar presentes en bacterias filogenéticamente distintas.

Transposones: son secuencias cortas de DNA, conocidas como "genes saltarines". Pasan de un plásmido a otro, de un plásmido al cromosoma o viceversa.

La propiedad de todos los elementos transportables es la capacidad para moverse e integrarse dentro de secuencias del DNA extraño, mediante una recombinación no homóloga. Este tipo de recombinación determina que el mismo transposón pueda estar en plásmidos o cromosomas de bacterias no emparentadas, con genes de antibioticorresistencia idénticos.

Los transposones, a diferencia de los plásmidos, no se autoduplican.

La mayor parte de los transposones están contenidos en plásmidos, los que pueden ser pasados entre especies bacterianas, con una rápida diseminación de resistencia.

Integrones: son una familia de elementos genéticos móviles, capaces de integrar y expresar genes de resistencia a antibióticos.

Los integrones no pueden realizar autotransposición, pero se asocian a plásmidos y transposones que median como vehículos, para su transmisión intra o interespecie.

Un integrón es un sistema de recombinación de sitio específico, que contiene una enzima integrasa y un sitio específico de captura de uno o varios genes de resistencia. Los genes capturados se presentan como casetes genéticos móviles.

Los casetes genéticos contienen un gen de antibioticorresistencia y un sitio de recombinación específico. Las integrasas catalizan la integración o escisión del casete de resistencia en el sitio específico del integrón.

En el integrón, existen dos promotores: uno transcribe la integrasa y otro, dirige la transcripción de los casetes genéticos integrados. Hasta el momento no se han encontrado casetes con promotores propios.

Los casetes genéticos codifican resistencia para antibióticos β-lactámicos, aminoglucósidos, sulfas, eritromicina, tetraciclinas, y rifampicina.

Los mecanismos de resistencia bacteriana para cada grupo de antimicrobianos se describen a continuación, junto con los mecanismos básicos de acción.

MECANISMOS BASICOS DE ACCION ANTIBIOTICA

Inhibición de la síntesis de la pared celular

La mayoría de los antibióticos que tienen este mecanismo de acción se clasifican como β-lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenemes, monobactámicos e inhibidores de β-lactamasa). Otros fármacos que interfieren en la síntesis de la pared celular son: vancomicina, bacitracina, fosfomicina, teicoplanina, isoniacida, etambutol, cicloserina y etionamida.

Antibióticos β-lactámicos

Los antibióticos β-lactámicos comparten un anillo central de cuatro átomos, denominado anillo β-lactámico. El mecanismo de

acción de este grupo consiste en inhibir la síntesis de la pared celular. Estos antibióticos se diferencian por el segundo anillo lateral, lo que les otorga características farmacocinéticas diferentes y permite la clasificación del grupo en: Penam (incluye a todas las penicilinas), Carbapenem (imipenem, meropenem), Oxapenam (ácido clavulánico), Cefem (cefalosporinas y cefamicinas) y Monobactam (*aztreonam*) (tabla 19-2).

Mecanismo de acción: las bacterias presentan proteínas que tienen afinidad por la unión con antibióticos β-lactámicos, denominadas proteínas ligando de penicilina (PLP). La mayoría de las PLP están asociadas con la membrana citoplasmática y una proporción relativa están localizadas entre la pared celular, en particular en el espacio o hendidura de la invaginación que precede a la división celular.

Las PLP son enzimas (transpeptidasas, carboxipeptidasas y endopeptidasas) encargadas del ensamblaje de la matriz rígida que forma la pared celular, el peptidoglucano. Accionan entrelazando las cadenas, cortando los péptidos y formando puentes. Al ser bloqueadas las PLP por cualquier antibiótico β-lactámico que se une eficientemente a ellas (al confundirse con un monómero normal en la síntesis de la pared), se inhibe la transpeptidación en el último paso de la síntesis del peptidoglucano. Esta inhibición conduce a la formación de un peptidoglucano poco resistente. En principio, la bacteria detiene su crecimiento (acción bacteriostática); más adelante, por efecto osmótico del contenido citoplasmático sobre la membrana celular, al no encontrar ya una pared celular rígida que tolere dicha presión, ocurre el vaciamiento celular y la posterior digestión por las enzimas autolíticas que continúan actuando (acción bactericida). Como la síntesis del peptidoglucano es necesaria para que actúe el β-lactámico, la lisis sólo se produce en células en crecimiento. En las células que no se dividen, las autolisinas no actúan. Esto indica que los β-lactámicos son de acción bactericida lenta, que sólo actúan cuando las bacterias se encuentran en fase de división celular.

La eficacia de los antibióticos β-lactámicos está en relación con el tiempo que permanecen en cantidades por encima de la concentración necesaria para matar al patógeno. El efecto posantibiótico es de 2 horas para bacterias grampositivas y menos o nada para gramnegativas.

Penicilina

Las penicilinas derivan de diferentes especies del género *Penicillium*. De los cultivos de este hongo, se aísla el ácido 6-aminopenicilánico (fig. 19-2).

Al acoplar el grupo amino libre del ácido penicilánico a los grupos carboxilo libres de diferentes radicales es posible sintetizar diferentes tipos de penicilina (tabla 19-2). Estos radicales son los que van a determinar las propiedades farmacológicas esenciales de cada fármaco resultante.

El mecanismo de acción es el de los antibióticos β-lactámicos.

Cefalosporinas

Las cefalosporinas son sustancias antimicrobianas producidas por algunos hongos del género *Cephalosporium*. Son compuestos β-lactámicos formados por un núcleo de ácido 7-amino-cefalosporánico (fig. 19-3) La unión de grupos laterales R originó cefalosporinas con espectro y actividad antimicrobiana diferentes (tabla 19-2). El mecanismo de acción es similar al de los antibióticos β-lactámicos.

El descubrimiento de las cefamicinas condujo a una creciente estabilidad frente a las β-lactamasas de las bacterias gramnegativas, incluyendo *Bacteroides fragilis* y *P. aeruginosa*. Son similares a las cefalosporinas, pero se derivan de actinomicetos.

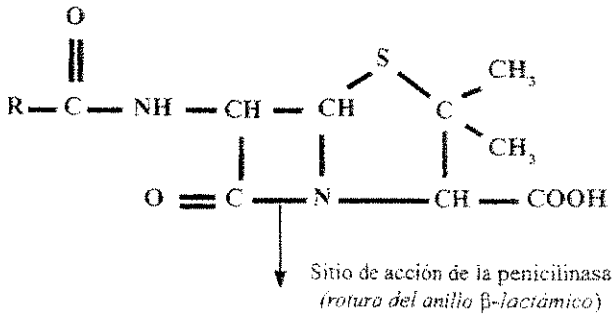


Figura 19-2. Fórmula estructural de la penicilina. Ácido 6-aminopenicilánico.

Las cefalosporinas se clasifican en generaciones, que en términos generales se caracterizan como:

- C1G: actividad antibacteriana grampositiva, administrada por vía parenteral o en ocasiones oral.
- C2G: actividad antibacteriana grampositiva y gramnegativa administradas por todas las vías.
- C3G: actividad antibacteriana grampositiva reducida, pero gramnegativa aumentada, administradas por vía parenteral y oral en algunos casos.
- C4G: actividad antibacteriana grampositiva y gramnegativa aumentadas, administradas por todas las vías.

La actividad antimicrobiana es la de los antibióticos β-lactámicos.

Las cefalosporinas, por lo general, son activas contra los estreptococos β-hemolíticos y estafilococos productores de β-lactamasas, pero no contra los estafilococos meticilinorresistentes. Entre las enterobacterias en ausencia de resistencia adquirida, son susceptibles. Sólo algunas cefalosporinas (C3G y C4G) son efectivas contra *P. aeruginosa*. En las bacterias anaerobias no formadoras de esporas, la actividad es variable. Los anaerobios productores de β-lactamasas, incluyendo *Bacteroides fragilis*, son notablemente resistentes a la cefoxitina.

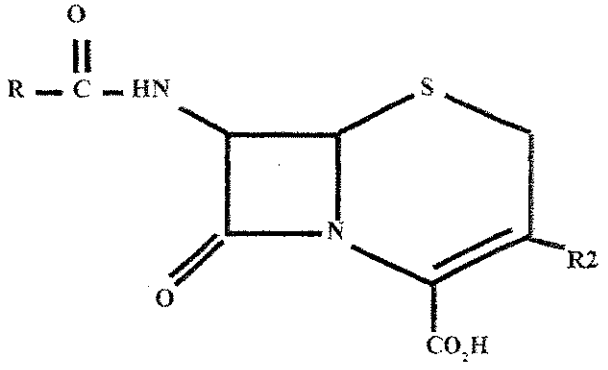


Figura 19-3. Fórmula estructural de las cefalosporinas. Ácido 7-aminocefalosporánico.

Tabla 19-2. Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular

- **β LACTAMICOS**
  - Penicilinas naturales
    - Penicilina G o bencil-penicilina
    - Penicilina V
    - Penicilina G sódica
    - Penicilina G potásica
  - Penicilinas resistentes a las penicilinasas
    - Meticilina
    - Nafcilina
    - Oxacilina
    - Cloxacilina
    - Dicloxacilina
  - Aminopenicilinas
    - Ampicilina
    - Amoxicilina
  - Carboxipenicilinas
    - Carbenicilina
    - Ticarcilina
  - Ureidopenicilinas
    - Mezlocilina
    - Piperacilina
  - Carbapenemes
    - Imipenem
    - Meropenem
  - Monobactam
    - Aztreonam
  - Inhibidores de β-lactamasas
    - Acido clavulánico
    - Tazobactam
    - Sulbactam
  - Combinaciones de β-lactámicos con inhibidores de β-lactamasas
    - Amoxicilina-Clavulánico
    - Ticarcilina-Clavulánico
    - Ampicilina-Sulbactam
    - Piperacilina-Tazobactam
  - **Cefalosporinas**
    - C1G
      - Cefalotina
      - Cefalexina
      - Cefradina
      - Cefazolina
      - Cefaloridina
    - C2G
      - Cefaclor
      - Cefamandol
      - Cefuroxima
      - Cefatrizina
    - C3G
      - Cefotaxima
      - Ceftriaxona
      - Ceftacidima
      - Cefoperazona
      - Cefixima
      - Ceftibuten
      - Ceftiofur
    - C4G
      - Cefepima
      - Cefpiroma
    - Cefamicinas
      - Cefoxitina
      - Cefotetán

Otros antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular.

- Glucopéptidos
  - Vancomicina
  - Teicoplanina

Bacitracina. Fosfomicina. Isoniacida. Etambutol. Cicloserina. Etionamida.

Mecanismos de resistencia

A continuación se describen los mecanismos más importantes de resistencia a los antibióticos β-lactámicos.

Resistencia mediada por PLP

1) Modificaciones de las PLP: pueden ocurrir por:

a) Distribución anómala en cantidad y/o calidad de PLP: aparecen por mutación de las PLP (por ej., *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina). En los enterococos, por mutaciones espontáneas, se producen PLP de baja afinidad (por ej., *Enterococcus faecium*) resistentes a penicilina o ampicilina.

b) *Adquisición de una nueva PLP2a:* ausente en los estafilococos sensibles.

Esto lleva a una menor afinidad por todos los β-lactámicos, aumenta la cantidad de antibiótico necesaria para saturar las PLP, aumenta la CIM y, por consiguiente, hay resistencia.

La PLP2a sólo se encuentra en estafilococos meticilinorresistentes y puede ser expresada bajo inducción de meticilina. El gen *mec*A es el determinante genético central de la meticilinorresistencia y está localizado en una región, llamada *mec*. Esta región contiene genes regulatorios para la expresión del *mec*A, así como determinantes adicionales de resistencia, resultando la aparición de multirresistencia (resistencia a gentamicina, eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol).

2) Inactivación enzimática por β-lactamasas: la resistencia a los antibióticos β-lactámicos se debe principalmente a la producción de β-lactamasas, que los inactiva por apertura del anillo β-lactámico.

La producción de β-lactamasas puede ser extracelular, como ocurre en los estafilococos, o en el espacio periplásmico, como sucede en los bacilos gramnegativos. Estos últimos, producen mayor variedad de β-lactamasas que las bacterias grampositivas. Se han descrito más de 200 enzimas distintas.

Las β-lactamasas pueden ser sintetizadas por codificación de DNA cromosómico, plasmídico y también transposónico.

Algunas son específicas para penicilinas (penicilinasas); otras, para cefalosporinas (cefalosporinasas).

La clasificación actual de las β-lactamasas se basa en la combinación de descripciones fenotípicas (sustrato, perfil de inhibidores), Bush y col. (1995) y grupos moleculares (secuencia de aminoácidos, nucleótidos) de Ambler. En general, aunque existe correlación, se prefieren los métodos funcionales para la clasificación, pues ínfimos cambios moleculares, pueden determinar grandes diferencias funcionales. Por ejemplo, una mutación que produce un cambio de nucleótido puede convertir la β-lactamasa TEM-1 en TEM-12, y otro cambio, puede transformar la TEM-12 en TEM-26, con diferentes efectos sobre la hidrólisis del sustrato (ceftazidima).

Las β-lactamasas clase B de Ambler o grupo 3 de Bush son metaloenzimas (IMI-1) denominadas carbapenemasas que afectan a todos los β-lactámicos, incluso a los carbapenemes.

Las β-lactamasas clase D (OXA-1, OXA-2), son serinenzimas débilmente inhibidas por inhibidores de las β-lactamasas (IBL).

En la tabla 19-3, se describen ejemplos de la clasificación de algunas β-lactamasas.

a) β-lactamasa cromosómica inducible y β-lactamasa cromosómica no inducible:

1) ***β-lactamasa cromosómica inducible:*** la amp-C, es de la clase molecular C de Ambler (o tipo 1 de Bush); el gen responsable de la producción es el *amp C*. Esta β-lactamasa es cromosómica, inducible y sometida a un complejo mecanismo de regulación del que participa el reciclaje del peptidoglucano. Está presente en más del 90% de las cepas de *P. aeruginosa* y también pueden producirla, en niveles basales, las enterobacterias *Serratia marcescens, Enterobacter cloacae, Citrobacter freundii, Enterobacter aerogenes, Morganella morganii* y *Providencia* spp.
Debido a la presión de selección causada por el uso abusivo de C1G, C2G y C3G, puede ocurrir que, por mutación, desaparezcan algunos de los genes responsables del sistema regulador (*ampR, ampG, ampD, ampE*) y aparezcan **mutantes espontáneas**

Tabla 19-3. Clasificación de β-lactamasas bacterianas

Grupo de Bush	Sustrato	Cromosómica o plasmídica	Constitutiva o inducible	Inhibición por clavulánico	Enzima representativa	Clase molecular de Ambler
1	Cefalosporinas	C	C/I	–	Cefalosporinasa cromosómica de BGM: AMP C	C
2a	Penicilinas	P	I	+	Pénicilinasas de grampositivos	A
2b	Penicilinas y cefalosporinas	P	C	+	TEM-1, TEM-2, SHV-1, etc.	A
2be	Penicilinas, cefalosporinas y monobactam	P	C	+	TEM-3... TEM-26 SHV-2 a SHV-6 PER-1, PER-2, CTX-M-1, CTX-M-2	A
2c	Penicilina y cloxacilina	P/C	C	+	PSE-1, PSE-3 PSE-4, SAR-1, CAR-3, BRO-1, BRO-2, etc.	A
2d	Penicilina y cloxacilina	P/C	C	+/–	OXA-1 a OXA-12	D
2e	Cefalosporinas	P/C	I	+	Cefalosporinasa inducible	?
3	Betalactamas y carbapenemes	C	I	Inhibibles por EDTA	L1, IMP-1, etc.	B
4	Penicilinas	C	...	No inhibible por ácido clavulánico	Penicilinasa *Burkholderia cepacia*	?

desreprimidas, generando resistencia de altísimo nivel, e inactivando a todos los β-lactámicos, excepto los carbapenemes. Por ejemplo: *P. aeruginosa* presenta resistencia frente a ceftazidima y frente a piperacilina-tazobactam, siendo los carbapenemes, los únicos 100% efectivos. Estas mutantes no son afectadas por los IBL (clavulánico, tazobactam, sulbactam).
En el caso de las enterobacterias más arriba mencionadas, presentan resistencia frente a carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, C1G, C2G, C3G (manteniendo cierta actividad de las C4G) y monobactam.
Son inductores: las C1G a C3G, cefoxitina, imipenem, meropenem y ácido clavulánico.

2) ***β-lactamasa cromosómica no inducible:*** *E. coli* y *Shigella* presentan una β-lactamasa cromosómica no inducible de clase C (ampC) que se expresa en niveles muy bajos, por lo que no se observa resistencia frente a β-lactámicos. Cuando estas enzimas se hiperproducen, aparece resistencia frente a ampicilinas, carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, IBL, C1G, cefamicinas, y también, según el nivel de hiperproducción, pueden afectar a C3G, aunque los carbapenemes y C4G mantienen la actividad antimicrobiana.

b) ***β-lactamasas plasmídicas transferibles:*** a diferencia de las cromosómicas, son β-lactamasas constitutivas, codificadas en plásmidos.
β-lactamasas plasmídicas de espectro ampliado (BLEA). Las β-lactamasas mediadas por plásmidos son importantes al ser transferibles por conjugación entre especies y géneros relacionados. Las más frecuentes son TEM-1, TEM-2, SVH-1, que afectan a aminopenicilinas, ureido y carboxipenicilinas, C1G y poco a cefoperazona.
La TEM-1 mediada por plásmidos que codifica resistencia a la ampicilina se ha diseminado en *E. coli* y actualmente se encuentra en otras enterobacterias.
Las especies más frecuentes que producen BLEA son: *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Salmonella* spp y *Shigella* spp.
Estas enzimas son afectadas por IBL, pero la actividad de éstos está limitada por la cantidad de β-lactamasa producida y la actividad intrínseca del antibiótico unido al IBL.
β-lactamasas plasmídicas de espectro extendido (BLEE). Aparecen por mutaciones puntuales de genes que codifican β-lactamasas plasmídicas (derivan de las BLEA). Estas afectan a la mayoría de los antibióticos β-lactámicos y por lo general son susceptibles a los inhibidores de las β-lactamasas. Son producidas por *Klebsiella* spp y otras enterobacterias. En la Argentina, son CTX-M-2 y derivadas de SHV.
β-lactamasas resistentes a los inhibidores. Estas enzimas derivan de TEM-1, TEM-2. Son conocidas como IRT (*Inhibitor Resistem* TEM *mutant*). Se caracterizan por conferir resistencia a aminopenicilinas, carboxipenicilinas, ureidopenicilinas y a los inhibidores de las β-lactamasas (sulbactam, tazobactam o ácido clavulánico). No tienen actividad hidrolítica sobre el resto de los β-lactámicos.

c) ***β-lactamasas plasmídicas de cocos grampositivos:*** el mecanismo más común de resistencia a penicilina que presentan *S. aureus* y estafilococos coagulasa negativos aislados en la Argentina, a partir de distintas infecciones en caninos y de mastitis bovina, es por producción de β-lactamasas plasmídicas inducibles.
La resistencia de los enterococos aparece sobre todo en *E. faecalis* frente a penicilina y ampicilina, por producción de β-lactamasas plasmídicas. La resistencia se da en el mismo gen que codifica resistencia a gentamicina y a los demás aminoglucósidos, a excepción de la estreptomicina.

3) Impermeabilidad: el antibiótico no puede entrar a la célula a través de los canales porínicos de la membrana externa, por lo tanto se evita la interacción entre el antibiótico y el sitio diana (PLP). La resistencia puede ser:

a) *Intrínseca:* como ocurre con las porinas de *P. aeruginosa* (oprF es la más importante), que son de 12 a 100 veces menos permeables que las de las enterobacterias (*E. coli*). Esto determina que *P. aeruginosa* sea naturalmente más resistente frente a los antibióticos que pasan por porinas. Todos los β-lactámicos con carga negativa, penicilinas, ampicilinas, C1G, C2G, no actúan sobre *P. aeruginosa*.
Los micoplasmas y las formas-L bacterianas, poseen una resistencia natural a los antibióticos β-lactámicos, debido a la ausencia de pared celular.

b) *Mutacional:* cambios en la proteína (porinas) modifican el tamaño o la carga de los poros impidiendo el paso del antibiótico, por ejemplo: *Acinetobacter* spp (poros de tamaño pequeños). También, aparecen mutantes que carecen de porinas, por ejemplo: oprF, como ocurre en *P. aeruginosa*, con resistencia a ceftazidima y piperacilina; o mutantes que carecen de oprD2, y se convierten en resistentes frente a imipenem.

4) Eflujo: algunas bacterias reconocen a moléculas (antibióticos u otro tipo de moléculas), que tengan las características que quieren expulsar, a través de los canales porínicos. En este caso, por ejemplo, les es más difícil extraer antibióticos hidrofóbicos. Sólo son efluidos los antibióticos anfipáticos (combinan hidrofilia con hidrofobicidad) y que poseen de 1 a 2 cargas positivas. Este mecanismo de resistencia es poco frecuente en la mayoría de los β-lactámicos, pues tienen carga negativa neta. El meropenem es, sin embargo, anfótero como todos los carbapenemes y es más anfipático que imipenem. Por tal motivo puede ocurrir que meropenem sea efluido e imipenem no (fig. 19-4) en mutantes en las que se presente la bomba de eflujo *oprM, mexA, mexB*.

Esta bomba de eflujo es común para cefoxitina, cloranfenicol, minociclina y ciprofloxacina.

Tolerancia: se presenta en algunos cocos grampositivos (estafilococos, estreptococos, enterococos), debido a la falta de activación de las enzimas autolíticas; la penicilina inhibe el crecimiento, pero no posee efecto bactericida.

Glucopéptidos

Los glucopéptidos son antibióticos que poseen una estructura química compleja. Los representantes de este grupo son vancomicina y teicoplanina.

Actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular de las bacterias grampositivas en fase de crecimiento, en un sitio blanco diferente al de los β-lactámicos, formando uniones con el D-alanil-D-alanina terminal del dipéptido muramil.

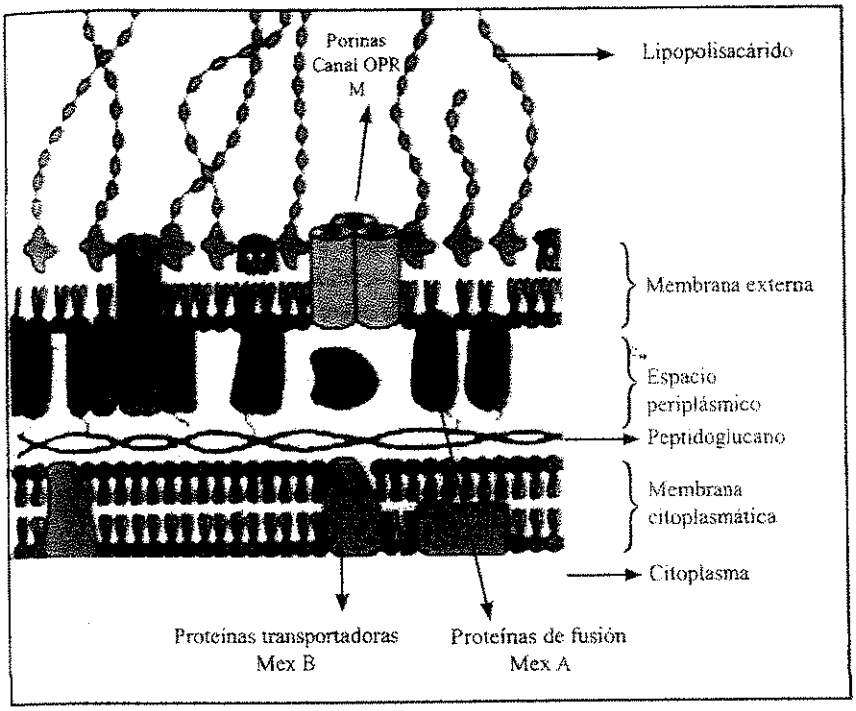


Figura 19-4. Representación esquemática de la estructura de la pared de bacterias gramnegativas, relacionada con el eflujo.

La vancomicina se recomienda en infecciones producidas por bacterias grampositivas resistentes a β-lactámicos, como ocurre con los estafilococos meticilinorresistentes y algunos enterococos. En veterinaria, su uso está limitado, debido al costo y a la necesidad de infundir este antibiótico por vía endovenosa. La teicoplanina, en cambio, puede administrarse por vía intramuscular y considerarse para su uso en infecciones animales.

La avoparcina es otro glucopéptido, que fue muy utilizado en Europa como promotor de crecimiento en cerdos y pollos. El uso llevó a la selección de cepas de enterococos vancomicinarresistentes (EVR).

Los enterococos naturalmente presentan resistencia intrínseca a muchos antibióticos, de ahí la importancia de la aparición de los EVR dado que éstos pueden motivar la aparición de infecciones intratables en humanos, pues clínicamente existen muy pocas opciones para lograr un efecto bactericida.

Mecanismos de resistencia

La antibioticorresistencia es poco habitual, aunque puede aparecer en *Enterococcus* spp, especialmente en *E. faecium*.

Existen cinco fenotipos diferentes de resistencia a vancomicina: *VanA*, *VanB*, *VanC*, *VanD* y *VanE*.

El gen *Van*A codifica la resistencia a todos los glucopéptidos y se asocia a un transposón *Tn1546*, mediado por plásmidos. Las cepas que poseen el fenotipo ***VanA*** poseen altos niveles de resistencia a vancomicina y teicoplanina, son inducibles y han sido observadas en *E. faecium* y *E. faecalis*

Los antibióticos que pueden inducir este tipo de resistencia son, entre otros, vancomicina, teicoplanina, avoparcina y otros antibióticos no glucopéptidos como la bacitracina y la polimixina B.

Los diferentes fenotipos pueden detectarse en el laboratorio por el comportamiento de las cepas en presencia de diferentes concentraciones de vancomicina y teicoplanina.

El fenotipo ***VanB*** afecta sólo a la vancomicina, pero no a la teicoplanina. Es de origen cromosómico y, generalmente, no transferible. El sistema regulatorio se comporta insensible a la inducción por vancomicina.

Las cepas ***VanC*** sintetizan una proteína en forma constitutiva, de codificación cromosómica, no transferible, y producen resistencia de bajo nivel sólo a vancomicina. Esta resistencia ha sido observada en *E. gallinarum* y *E. casseliflavus*.

El fenotipo ***VanD*** se caracteriza por ser inhibido por concentraciones de 4 µ/ml de teicoplanina y por concentraciones de vancomicina iguales o superiores a 64 µ/ml. Se ha observado en *E. faecium* y *E. faecalis*

La resistencia ***VanE*** es similar a *VanC*, confiere bajos niveles de resistencia de vancomicina; las cepas que poseen este fenotipo son sensibles a la teicoplanina. Se ha descrito en *E. faecalis*.

Algunos microorganismos son intrínsecamente resistentes a vancomicina, por ejemplo: *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, lo cual debe considerarse, pues estas bacterias pueden ser confundidas con estreptococos por bacteriólogos poco experimentados.

Es importante destacar que si bien la determinación del tipo de resistencia puede realizarse a través de características fenotípicas, estudiando las CIM de vancomicina y teicoplanina, la adquisición de genes *Van*A o *Van*B por especies con resistencia intrínseca debida a genes *Van*C de *E. gallinarum*, o la adquisición de genes *Van*A por cepas de fenotipo *VanB* pueden enmascarar la verdadera identidad de la cepa de origen clínico.

Se ha detectado resistencia a vancomicina codificada por el gen *Van*A, en *Staphylococcus aureus*.

Polipéptidos

Bacitracina es un antibiótico aislado de *Bacillus licheniformis*. Es un polipéptido que inhibe la síntesis de la pared celular, al interferir con la defosforilación y el reciclado del portador lipídico encargado de transportar los precursores del peptidoglucano a través de la membrana citoplasmática hasta la pared celular. También puede alterar la membrana citoplasmática e inhibir la transcripción del RNA.

Mecanismos de resistencia

La resistencia es por impermeabilidad bacteriana; no se puede entrar.

Las polimixinas son un grupo de polipéptidos cíclicos, derivados *Paenibacillus polymyxa* (antes *Bacillus polymyxa*). Estos antibióticos rompen la estructura de los fosfolípidos de membrana citoplasmática, e interactúan con los LPS de la membrana externa, aumentando la permeabilidad y provocando la muerte celular.

La polimixina B y E o colistina, por su nefrotoxicidad, sólo es de uso tópico en infecciones localizadas (otitis externas, lesiones cutáneas).

Estos antibióticos no son activos frente a bacterias grampositivas, pues carecen de membrana externa.

Fosfomicina

La fosfomicina es un análogo del fosfoenol piruvato, que inhibe de forma irreversible a la enolpiruvil transferasa, la enzima que cataliza el primer paso en la síntesis de los peptidoglucanos de la pared celular.

Es un antibiótico de amplio espectro, activo frente a estafilococos y muchas enterobacterias, pero *P. aeruginosa* es resistente.

Presenta sinergismo con los β-lactámicos y aminoglucósidos.

Mecanismos de resistencia

La resistencia puede ser cromosómica o plasmídica, por diferentes mecanismos:

1) ***Deficiencia en el ingreso***: de origen cromosómico.
2) ***Cambios en la enzima enolpiruvil transferasa***: con afinidad reducida por el fármaco, o por hiperproducción.
3) ***Eflujo:*** deficiencia en la acumulación del fármaco.
4) ***Inactivación enzimática***: mediante la fosfomicina fosforilasa cromosómica y fosfomicina glutatión transferasa plasmídica.

No existe resistencia cruzada con otros antibióticos.

Inhibición de la síntesis de DNA

Quinolonas

Las quinolonas son antibióticos sintéticos que inhiben las DNA girasas o topoisomerasas bacterianas, necesarias para la replicación, recombinación y reparación del DNA. El ácido nalidíxico y los derivados corresponden a la primera generación de quinolonas, hoy en desuso. Estos han sido remplazados por quinolonas más activas, las fluorquinolonas (FQ), como norfloxacina, ciprofloxacina, levofloxacina, entre otras.

Las FQ son bactericidas. Esta actividad está en relación directa con la concentración del antibiótico, y es independiente del tamaño del inóculo hasta la concentración 10^6 UFC/ml. Actúan sobre bacterias que están en fase estacionaria.

La CBM es de 2 a 4 veces superior a la CIM. El Mg^{++} y el pH igual o mayor que 6 aumentan la CIM de la mayoría de las quinolonas.

Todas las FQ tienen mejor concentración en tejido y dentro de las células que en el suero.

Mecanismos de resistencia

La resistencia a las quinolonas ocurre por mutaciones espontáneas cromosómicas. Recientemente se han detectado en aislamientos clínicos, resistencia a quinolonas fluoradas de origen plasmídico.

*1) **Mutaciones en la subunidad α o en la topoisomerasa IV:*** la DNA girasa consta de dos subunidades α y dos β las quinolonas se unen a la subunidad α. La modificación en esta subunidad por mutación de los genes *gyr*A y *gyr*B altera la DNA girasa, generando resistencia. Con menor frecuencia se altera la topoisomerasa IV.

2) ***Incremento del eflujo:*** el eflujo es un mecanismo de expulsión de moléculas (hacia fuera de la membrana externa en el caso de gramnegativos), se logra por un sistema de porinas combinadas desde la membrana citoplasmática a la proximidad de la membrana externa, accionadas por mecanismos de energía (ATP), que constituyen las denominadas "bombas de eflujo".

3) ***Impermeabilidad***: puede obedecer a las siguientes situaciones:
   a) Alteraciones en la incorporación a través de las porinas de la membrana externa, en los bacilos gramnegativos, como ocurre en *P. aeruginosa* y *E. coli*.
   b) Alteraciones en los LPS de la membrana externa por cambios en la saturación por cationes bivalentes (Mg^{++}).

4) ***Fallas de incorporación:*** por mecanismos dependientes de energía a través de la membrana externa, observado en *E. coli*.

La resistencia siempre es cruzada entre las quinolonas, aunque no necesariamente del mismo nivel.

Metronidazol

La actividad antimicrobiana del metronidazol es el resultado de la reducción de su grupo nitrógeno por acción de la nitrorreductasa bacteriana, lo cual da lugar a la formación de metabolitos tóxicos que rompen la molécula del DNA.

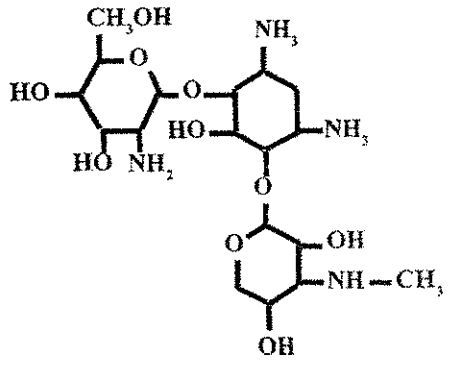
Mecanismos de resistencia

1. Por disminución de la captación de antibiótico.
2. Por eliminación de los metabolitos tóxicos antes de que interaccionen con el DNA.

Este fármaco posee actividad sobre bacterias anaerobias, incluso es eficaz en el tratamiento de infecciones parasitarias como tricomoniasis, amebiasis y giardiasis.

Inhibición de la síntesis proteica

Es el otro gran grupo de antibióticos que se describen a continuación.



Los enlaces glucosídicos unen moléculas de aminoazúcares

Figura 19-5. Estructura de la gentamicina.

Tabla 19-4. Familias y ejemplos de algunos antibióticos

Familia	**Antibiótico**
Estreptomicina	Estreptomicina
Gentamicina	*Gentamicina* Sisomicina Netilmicina
Kanamicina	Kanamicina Amikacina Tobramicina
Neomicina	Neomicina
Aminociclitol	Espectinomicina

Aminoglucósidos

Son aminoazúcares (fig. 19-5) que actúan inhibiendo la síntesis proteica, mediante la unión irreversible a las proteínas ribosómicas 30S (véase fig. 19-9).

Este grupo, según su estructura, se clasifica en varias familias (tabla 19-4).

Son compuestos catiónicos muy hidrosolubles y poco liposolubles. Esto determina una limitada capacidad de penetración a través de la membrana externa (ME) y citoplasmática (MC) de los bacilos gramnegativos.

Los aminoglucósidos (AG) ingresan a la célula en dos etapas. En la primera hay una aproximación a la célula bacteriana y se desplaza competitivamente las cargas positivas de Ca^{++} y Mg^{++} que rodean los polisacáridos en la ME (si hubiera exceso de cationes, se inhibe la entrada). En la segunda etapa, los AG, con sus grupos amino libres, de alta carga positiva, penetran a través de la MC abriendo poros, por los que penetra el AG. Este pasaje es activo, a través de permeasas y de un sistema de quinonas relacionados con la cadena respiratoria y con un gradiente protónico. Esta etapa, a su vez, se separa en dos fases:

- fase I: de transporte lento a través de la MC con gasto de energía;
- fase II: llegan al sitio blanco, se unen a las proteínas ribosómicas 30S y ocurre el ingreso masivo del fármaco. Esta unión tiene dos efectos: 1) la producción de proteínas anómalas, como resultado de errores en la lectura del RNA mensajero (mRNA); y 2) se bloquea la síntesis proteica, por la separación precoz del ribosoma del mRNA.

Por su habilidad para unirse irreversiblemente a los ribosomas, son de acción bactericida. Este efecto es rápido y de dosis dependiente. Contrariamente a lo que ocurre con los β-lactámicos, los AG son activos sobre bacterias en fase estacionaria.

Poseen un efecto posantibiótico que puede persistir durante varias horas.

Como la penetración de los AG es un proceso aeróbico, con gasto de energía, las bacterias anaerobias son naturalmente resistentes.

El medio ácido, el ambiente hiperosmolar o rico en cationes bivalentes, dificultan la entrada del antibiótico a la bacteria y elevan la CIM.

Los estreptococos y los enterococos son resistentes a los AG porque no penetran a través de la pared celular. El tratamiento de estos microorganismos requiere la administración conjunta de un AG con un inhibidor de la síntesis de pared celular (por ej., penicilina, ampicilina, vancomicina).

Mecanismos de resistencia

Las bacterias pueden desarrollar resistencia por tres mecanismos distintos: 1) mutación del lugar de unión en el ribosoma, 2) alteraciones en el transporte al interior de la célula, 3) modificación enzimática del antibiótico.

*1) **Alteraciones en el ribosoma:*** por mutaciones de genes que codifican proteínas ribosómicas del sitio de acción, el AG, si bien entra al interior de la célula, no se puede unir, no se producen las proteínas anómalas y no ocurre la fase II. Este mecanismo es infrecuente, sólo tiene importancia para estreptomicina. En el caso de infecciones por enterococos, y considerando que éstos pueden ser eliminados por la combinación sinérgica de un AG con un antibiótico que actúe sobre la pared celular, esta resistencia es clínicamente significativa.

*2) **Alteraciones de la permeabilidad o transporte:*** son de origen cromosómico. Este mecanismo lo presentan naturalmente las bacterias anaerobias y los estreptococos, ocasionalmente puede aparecer por mutaciones en estafilococos.

*3) **Síntesis de enzimas inactivantes*** transferibles (adenilasa, fosforilasa, acetilasa), codificadas en plásmidos o en transposones, aunque también puede ser cromosómica. La síntesis de estas enzimas es constitutiva, por lo que no depende de la presencia del antibiótico. Este es el mecanismo más importante de resistencia.

Estas enzimas acetilan (mediante acetil CoA) o adenilan y/o fosforilan a los AG (mediante ATP) en diferentes posiciones, ocupadas por hidroxilos o grupos amino.

El antibiótico más difícil de inactivar es la amikacina, por esta razón, muchas cepas de *P. aeruginosa* son resistentes a gentamicina, tobramicina y netilmicina (por las enzimas AAC), pero son sensibles a amikacina (tabla 19-5).

Una bacteria puede producir más de una de estas enzimas, lo que determina diferentes posibilidades de resistencia y también es factible la resistencia cruzada.

Macrólidos

Los macrólidos son antibióticos estructuralmente relacionados. Existen varios miembros de esta familia disponibles en el mercado: los de 14 miembros (eritromicina, claritromicina y roxitromicina), los de 15 miembros (azitromicina) y los de 16 miembros (espiramicina y miocamicina).

Los macrólidos actúan inhibiendo la síntesis proteica. Se unen de manera reversible a la subunidad 50S ribosómica, interactuando en la subunidad 23S, impidiendo la translocación y la transpeptidación en la cadena aminoacídica (fig. 19-9).

Este mecanismo de acción es generalmente bactericida en estreptococos y bacteriostático en estafilococos, aunque, en grandes concentraciones, la eritromicina puede ser bactericida.

El resultado de la eritromicina en las pruebas de susceptibilidad in vitro, salvo excepciones, es representativo de la actividad de los demás miembros de la familia.

Mecanismos de resistencia

Las enterobacterias y la mayoría de los bacilos no fermentadores presentan ***resistencia natural*** pues, por el tamaño y la estructura molecular de estos fármacos, no pueden atravesar la ME.

Tabla 19-5. Enzimas modificadoras de aminoglucósidos en bacterias portadoras de plásmido R

Modificación	Enzimas	Sustratos
Aminoglucósido acetiltransferasa	AAC (3)-I	Gm
	AAC (3)-II	Gn, Tm
	AAC (3)-III	Gn, Km, Nm, Pm, Tm
	AAC (3)-IV	Gn, Km, Nm, Tm, Ak, Ap
	AAC (2)	Gn, Nm
	AAC (6')-I	Km
Aminoglucósido adeniltransferasa	AAD (2")	Gn, Km
	AAD (4')	Km, Tm, Nm, Pm, Ak
	AAD (4' - 4")	Km, Tm, Nm
	AAD (3")	Sm, Sp
	AAD (6)	Sm
Aminoglucósido fosfotransferasa	APH (3')-I	Km, Nm, Pm
	APH (3')-III	Km, Nm, Pm
	APH (2")	Gn, Km, Tm
	APH (3")	Sm
	APH (6)	Sm

Fuente: Terapéutica Antimicrobiana en Medicina Veterinaria. JF Prescott, Editorial Inter-Médica, 2002.
Gn: gentamicina; Ak: amikacina; Km: kanamicina; Nm: neomicina; Sm: estreptomicina; Tm: tobramicina; Ap: apramicina; Pm: paramomicina; Sp: espectinomicina.

*1) **Protección ribosómica:*** por mutación en las proteínas ribosómicas L4 o L22 y en la subunidad 23S del RNA ribosómico. El antibiótico puede unirse aún al ribosoma, pero no interrumpe la síntesis proteica. No es muy frecuente.

*2) **Alteración enzimática del sitio blanco:*** es el mecanismo más común de resistencia. Existe una dimetilación del RNA ribosómico 23S, que impide la unión del antibiótico. Esto ocurre por la enzima adenina-N-metiltransferasa (metilasa), que agrega uno o dos grupos metilo a la adenina del sitio receptor del macrólido. Los genes que codifican este tipo de resistencia se denominan *erm* (eritromicina, ribosoma, metilación). La síntesis de la metilasa puede ser mediada por plásmidos o transposones.

Según la regulación, se reconocen 2 fenotipos de resistencia: MLS_c y MLS_i (M: macrólidos, L: lincomicina, S: estreptograminas B).

Fenotipo MLS_c (constitutivo): la bacteria muestra resistencia cruzada de alto nivel frente a macrólidos, lincosamidas y el grupo B de las estreptograminas (SB) (fig. 19-6).
Fenotipo MLS_i (inducible): los macrólidos de 14 y 15 miembros inducen la desrepresión del gen, que una vez activado, genera resistencia cruzada disociada. En este caso, la bacteria es resistente frente a eritromicina y sensible a clindamicina (fig. 19-7). No obstante, la exposición frente a eritromicina puede desarrollar también resistencia a las lincosamidas.
Los *Streptococcus* spp, a diferencia de los *Staphylococcus* spp, pueden tener resistencia cruzada entre macrólidos de 14, 15 y 16 miembros, lincosamidas y SB, tanto en el fenotipo MLS_i como en el MLS_c.

*3) **Mecanismo de eflujo:*** se presenta sólo en macrólidos de 14 miembros (eritromicina), sin afectar a lincosamidas ni a estreptograminas. En el eflujo, se transporta el antibiótico fuera de la célula, a través de proteínas de transporte codificadas por el gen *mef*A. En este mecanismo, las bacterias tienen el **fenotipo M** de resistencia (fig. 19-8). Las infecciones debidas a bacterias con fenotipo M pueden tener una terapéutica satisfactoria con lincosamidas o macrólidos de 16 miembros.

Lincosamidas: lincomicina, clindamicina y pirlimicina

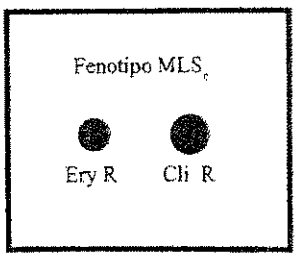
Las lincosamidas son antibióticos bacteriostáticos, activos frente a bacterias grampositivas, anaerobios y micoplasmas. Muchas bacterias gramnegativas son naturalmente resistentes, debido a la impermeabilidad y la metilación del sitio blanco.

El mecanismo de acción es por inhibición de síntesis proteica, al unirse en el sitio ribosómico 50S.

La clindamicina es más activa que la lincomicina, especialmente frente a bacilos anaerobios, estafilococos coagulasa negativos y *S. aureus*.

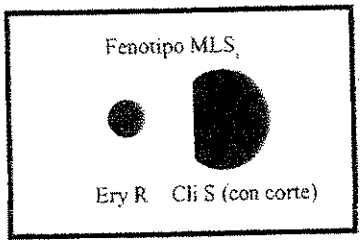
Los mecanismos de resistencia son similares a los de los macrólidos. En general existe resistencia cruzada completa entre lincomicina y clindamicina, y también con los macrólidos y el grupo B de las estreptograminas.

El **fenotipo L** de resistencia, mediado por plásmidos, es el resultado de la síntesis de la enzima lincosamida-nucleotidiltransferasa, codificada por el gen *lin*B. Este tipo de resistencia no afecta a los macrólidos.



Ery: eritromicina; Cli: clindamicina; S: sensible, R: resistente.

Figura 19-6. Esquema representativo del fenotipo MLS_c.



Ery: eritromicina; Cli: clindamicina; S: sensible, R: resistente.

Figura 19-7. Esquema representativo del fenotipo MLS$_1$.

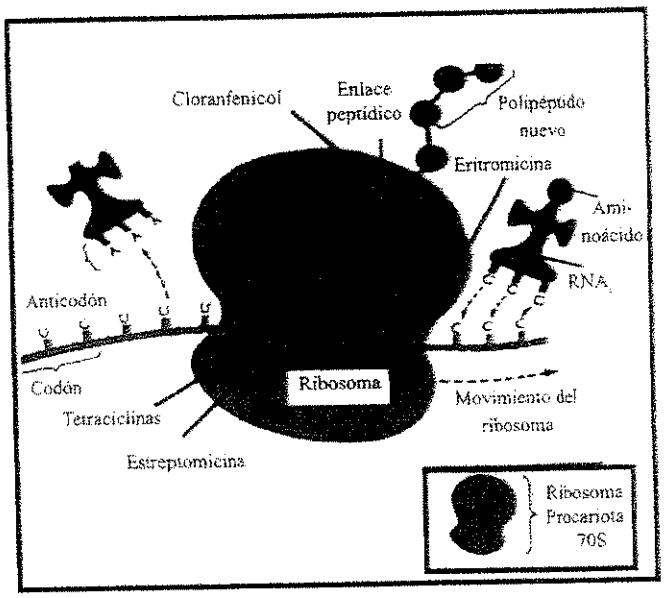


Figura 19-9. Sitios de inhibición de síntesis proteica de algunos antibióticos (Fuente: *Introducción a la Microbiología.* Tortora, Funke, Case. Ed. Acribia. 1983.)

Pirlimicina

La actividad frente a bacterias aerobias y anaerobias es similar a la de la clindamicina. No obstante, en infecciones experimentales, la actividad es de 2 a 20 veces mayor, probablemente por alcanzar altas concentraciones y permanencia en tejidos.

Este medicamento se utiliza en el tratamiento local de la mastitis bovina.

Tetraciclinas

Las tetraciclinas (clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, doxiciclina, minociclina) son antibióticos bacteriostáticos que actúan inhibiendo la síntesis proteica, al unirse en forma reversible a la subunidad 30S (fig. 19-9).

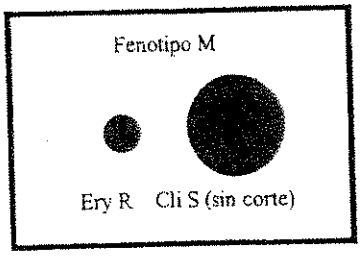
En las bacterias gramnegativas, atraviesan las porinas de la ME por transporte activo, como Tet-Mg^{++}, se acumulan en el periplasma y liberan el Mg^{++}. En las grampositivas se difunden a través de la MC por un proceso activo. Dentro de la célula se unen de manera reversible a los receptores de la subunidad ribosómica 30S y también a proteínas ribosómicas como 16S. Producen interferencia estérica de la unión aminoacil RNA de transferencia al receptor ribosomal. Esto previene el agregado de aminoácidos a la cadena de péptidos en elongación, bloqueando la síntesis proteica.

Son antibióticos de amplio espectro, que inhiben bacterias aerobias y anaerobias, micoplasmas, clamidias y rickettsias.

Mecanismos de resistencia

1) ***Eflujo:*** es el mecanismo más común de resistencia, tanto en bacterias grampositivas como gramnegativas.

2) ***Impermeabilidad:*** la mutación del gen que codifica para la proteína de la porina de la ME, OmpF, da lugar a la aparición de resistencia de bajo nivel a las tetraciclinas y a otros antibióticos (cloranfenicol, quinolonas y β-lactámicos).



Ery: eritromicina; Cli: clindamicina; S: sensible, R: resistente.

Figura 19-8. Esquema representativo del fenotipo M.

3) ***Inactivación enzimática:*** es un mecanismo poco frecuente, detectado sólo en *Bacteroides*.

4) ***Protección ribosomal:*** es el resultado de la producción de proteínas que protegen a la subunidad 30S ribosómica. Se unen al ribosoma, alteran la conformación, se inhibe la unión y se liberan tetraciclinas, sin alterar la síntesis proteica (protegen tetraciclina, doxiciclina y minociclina). Los determinantes están codificados en cromosomas y/o transposones.

Cloranfenicol

Inhibe la síntesis proteica por unión a la proteína L16 de la subunidad 50S, impidiendo la transpeptidación. Es de acción bacteriostática, excepto frente a *Haemophilus* spp, *Neisseria* spp y *Streptococcus pneumoniae*.

Ingresa a la célula por canales porínicos con gasto de energía.

Mecanismos de resistencia

1) ***Inactivación enzimática***: la enzima acetiltransferasa, inactiva por mono o biacetilación de las proteínas ribosómicas, está ampliamente diseminada, siendo plasmídica inducible, salvo en *S. pneumoniae*.

2) ***Eflujo:*** por cambios en las porinas OprF, Omp A, Omp C, codificadas por plásmidos, como por ejemplo, *Pseudomonas* spp y enterobacterias, o cromosómicas, como por ejemplo, en *Haemophilus* influenzae y *Salmonella* typhi.

Rifampicina

La rifampicina es un derivado semisintético de la rifamicina B, producido por *Streptomyces mediterranei*.

Se une a la RNA polimerasa DNA-dependiente inhibiendo la síntesis de RNA.

Es de acción bactericida frente a *Mycobacterium tuberculosis* (actividad intracelular), y es muy activa frente a cocos grampositivos (estafilococos y estreptococos).

La resistencia de los grampositivos a rifampicina es por mutación del gen cromosómico que codifica la subunidad β de la ARN polimerasa.

Las bacterias gramnegativas presentan resistencia intrínseca, por una disminución en la capacidad de captación de la molécula hidrofóbica del antibiótico.

La rifampicina es un antibiótico que rápidamente desarrolla resistencia, razón por la cual se administra siempre asociado a otros antibióticos. Esta característica indica que su uso debería reservarse sólo para el tratamiento de la tuberculosis.

Mecanismos de resistencia

*1) **Intrínseca:*** las bacterias gramnegativas presentan resistencia intrínseca, por una disminución en la capacidad de captación de la molécula hidrofóbica del antibiótico.

*2) **Mutación:*** la resistencia de los grampositivos a rifampicina es por mutación del gen cromosómico que codifica la subunidad β de la RNA polimerasa.

En la figura 19-9 se observan diferentes sitios de inhibición de síntesis proteica de algunos antibióticos.

Antimetabolitos - Sulfonamidas

Son antimetabolitos que, al competir con el ácido *p*-aminobenzoico (PABA), impiden la síntesis del ácido fólico necesario para determinados microorganismos, así como también que el PABA se incorpore dentro de la molécula del ácido fólico; específicamente, compiten con el PABA por la enzima dihidropteroato sintetasa.

Las sulfonamidas no interfieren con el metabolismo de las células de los mamíferos, pues éstos utilizan el ácido fólico preformado (no lo sintetizan), mientras que las bacterias sensibles deben sintetizarlo.

Mecanismos de resistencia

La resistencia puede aparecer por:

*1) **Mutación cromosómica:*** defectos en la penetración de la sulfa, afinidad reducida de la dihidropteroato sintetasa, hiperproducción de PABA.

*2) **Resistencia plasmídica:*** es la más común; puede aparecer impermeabilidad al fármaco, producción de dihidropteroato sintetasa resistentes a las sulfonamidas.

Existe resistencia cruzada completa entre las sulfonamidas. La resistencia plasmídica es la más común. Puede aparecer impermeabilidad al fármaco, producción de dihidropteroato sintetasa resistentes a las sulfonamidas. Existe resistencia cruzada completa entre las sulfonamidas.

Trimetoprima

Es otro antimetabolito que interfiere en el metabolismo del ácido fólico al inhibir la dihidrofolato reductasa. Esta inhibición impide la síntesis microbiana de las purinas y, en consecuencia, del DNA.

La trimetoprima se usa en combinación con sulfametoxazol (TMS), formando compuesto sinérgico y bactericida, que actúa en dos pasos en la síntesis del ácido fólico. Es activa frente a una gran variedad de bacterias grampositivas y gramnegativas.

Mecanismos de resistencia

La resistencia de estos fármacos puede ser consecuencia de varios mecanismos.

*1) **Variantes enzimáticas:*** pueden tener un origen plasmídico codificadores de transposón o síntesis cromosómica de la enzima dihidrofolato reductasa resistente.

*2) **Impermeabilidad y eflujo**:* resistencia intrínseca en *P. aeruginosa*.

*3) **Incorporación de timina/timidina del medio:*** las bacterias que usan timidina exógena son intrínsecamente resistentes (algunos enterococos).

Se reconoce un aumento en la resistencia, sobre todo entre las enterobacterias frente a TMS. Las bacterias con resistencia mediada por plásmidos, en general, exhiben resistencia múltiple, la cual incluye a las sulfas.

ANTIFUNGICOS

Polienos

Nistatina y *anfotericina B* son metabolitos de *Streptomyces* spp.

Actúan formando complejos con el ergosterol, lesionando la membrana citoplasmática, con el resultado de la pérdida iones y metabolitos pequeños del contenido celular.

La **nistatina** se usa en infecciones locales de la piel y la vagina, y también para candidiasis digestivas. Es una droga poco soluble, no se absorbe en cantidades que podrían causar toxicidad en el hospedador.

La **anfotericina B** es efectiva en el tratamiento de micosis sistémicas, pero en la actualidad su uso está limitado, debido a la nefrotoxicidad que provoca, probablemente por unirse débilmente al colesterol de la membrana celular de los mamíferos. Es de amplio espectro y rara vez induce resistencia.

Azoles

Imidazoles: como el ketoconazol y los triazoles (fluconazol e itraconazol), actúan interfiriendo la síntesis del ergosterol en la pared celular de los hongos. Se usan localmente y también pueden administrarse por vía oral, siendo menos tóxicos que la anfotericina B. Son fármacos fungistáticos de amplio espectro.

El clotrimazol, el miconazol y otros azoles se usan tópicamente y se presentan como cremas, polvos y óvulos. Se emplean en el caso de tiñas, candidiasis cutáneas y vulvovaginales.

Griseofulvina: es un antibiótico producido por especies del género *Penicillium*. Es activo frente a infecciones cutáneas superficiales, dermatofitosis del pelo y las uñas. Se absorbe poco y se concentra en el estrato córneo, donde inhibe el crecimiento de las hifas.

Luego de la administración, se acumula en los tejidos queratinizados (piel, folículos pilosos y uñas). Su mecanismo de acción consiste en interferir en la mitosis, afectando sólo a las hifas en crecimiento activo e inhibiendo la reproducción del hongo.

BIBLIOGRAFIA

Betriu C, Culebras E, Gómez M, Rodríguez-Avial I, Sanchez BA, Agrda MC, Picazo JJ. Erythromycin and Clindamycin Resistance and Tlithromycin Susceptibility. Antimicrob Agents and Chemother 2003; 47 (3): 1112-1114.

Denamiel G, Más J, Puigdevall T, Gentilini E. Resistencia fenotípica a eritromicina en *Staphylococcus* spp aislados de perros. InVet. 2004; 6 (1): 29-33.

Gentilini E, Denamiel G, Bentancor A, Rebuelto M, Rodríguez Fermepin M, de Torres RA. Coagulase-Negative Staphylococci and Mastitis. Antimicrobial Susceptibility of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Bovine Mastitis in Argentina. J Dairy Sci 2002; 85 (8):1913-17.

Gentilini E, Denamiel G, Rumi MV, Blanco C, de Torres RA. Evolución de la resistencia de estafilococos coagulasa negativos frente a antimicrobianos de uso habitual en el tratamiento de la mastitis bovina y los mecanismos de resistencia involucrados. InVet 2002; 4 (1):69-75.

Mas J, Denamiel G, Bentancor A, Rodríguez Fermepín M, Gentilini E. Relación de la expresión fenotípica de la meticilino resistencia de un estafilococo coagulasa negativo de origen canino con la presencia del gen *mecA*. InVet 2000; 2 (2): 7-11.

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Microbiología Médica. Sección IV. Cap. 20. 182-190. 4° Ed. Elsevier. 2003.

Prescott JF, Baggott JD, Walker RD. Terapéutica Antimicrobiana en Medicina Veterinaria. Tercera edición. Editorial Inter-Médica. 2002.

PARTE II
BACTERIOLOGIA

Capítulo 20

ESTREPTOCOCOS

Graciela Ana Denamiel

INTRODUCCION

El género está integrado por un grupo grande de microorganismos que reúnen las siguientes características: forma esférica u ovoide con un tamaño entre 0,5 y 2 µm de diámetro. Están agrupados de a pares o en cadenas. Son inmóviles y no esporulados, y algunas especies pueden presentar cápsula. Son grampositivos, anaerobios facultativos y requieren para su crecimiento medios ricos en nutrientes, siendo necesario en algunos casos incubarlos en atmósfera enriquecida con CO_2. Son quimiorganotrofos y presentan un metabolismo fermentativo sobre los hidratos de carbono con producción de ácido, pero no gas. Son catalasa negativos y muchas especies son hemolíticas.

Los *Streptococcus* son parásitos de los vertebrados y habitantes de la boca y el tracto respiratorio. Algunas especies son patógenas para el hombre y los animales.

Taxonómicamente integran la familia Streptococcaceae junto con el género *Lactococcus*.

HISTORIA

Este grupo de microorganismos, denominados estreptococos (del griego *streptos*, sinuoso, torcido), fue descrito desde mediados del siglo IX por investigadores como Billroth, Pasteur, Rivolta, Ogston y Fehleisen, a partir de infecciones en humanos (erisipela y abscesos) y en animales (papera equina). Los estudios fueron continuados en 1884 por Rosenbach, quien aisló un coco a partir de una colecta de un absceso humano, al que le dio el nombre de *Streptococcus pyogenes*, estableciendo el género *Streptococcus*.

En 1887, Nocard y Mollereau aislaron un estreptococo de una vaca y reprodujeron una mastitis experimental en esta especie animal y en una cabra.

En 1933, Rebeca Lancefield introdujo un sistema serológico para la clasificación de los estreptococos β hemolíticos que permitió la comprensión de la epidemiología de las enfermedades producidas por estos microorganismos. Este sistema consiste en dividir a los estreptococos en grupos utilizando una reacción de precipitación y un hidrato de carbono específico de la pared celular denominado antígeno C. La clasificación consiste en la designación de serogrupos específicos que van desde la letra A hasta la H y de la K a la V. En la actualidad se utilizan estas pruebas, útiles sólo para los estreptococos hemolíticos, ya que los estreptococos no hemolíticos son serológicamente diferentes.

En 1937, Sherman propone un esquema de clasificación donde ubica a los estreptococos en cuatro categorías organizadas de acuerdo con la producción de hemólisis, el antígeno polisacárido específico del grupo y pruebas fenotípicas: a) fermentación de azúcares y b) tolerancia a pH 9,5, 6,5% de cloruro de sodio (NaCl) y temperaturas de 10 y 45 °C. Los dividió en grupos denominados piogénicos (que incluyen a los estreptococos β hemolíticos), viridans, láctico y enterococos.

Más recientemente, en 1984, Schleifer y Kilpper-Bälz, por resultados de estudios genómicos (hibridaciones DNA-rRNA 23 S y DNA-DNA), confirmaron que los estreptococos del grupo D, del grupo enterococos, pertenecían a un género diferente, y transfirieron a estos microorganismos al género *Enterococcus*.

Hasta la fecha se reconoce un número grande de especies con una relación filogenética laxa, por lo que en forma continua la taxonomía y nomenclatura de las especies de estreptococos sigue sujeta a modificaciones.

ESPECIE TIPO

Streptococcus pyogenes

ESPECIES

1) *Streptococcus* β-hemolíticos

Streptococcus pyogenes
Streptococcus agalactiae
Streptococcus dysgalactiae subsp. *dysgalactiae*
Streptococcus dysgalactiae subsp. *equisimilis*
Streptococcus equi subsp. *equi*
Streptococcus equi subsp. *zooepidemicus*
Streptococcus canis

Grupo:* *Streptococcus anginosus
Streptococcus constellatus subsp. *pharyngis*
Streptococcus porcinus
Streptococcus iniae
Streptococcus phocae
Streptococcus didelphis

2) *Streptococcus* no β-hemolíticos

Streptococcus pneumoniae
Grupo* *Streptococcus bovis
S. bovis
S. equinus
S. gallolyticus
S. infantarius
S. pasteurianus
S. lutetiensis
Streptococcus suis
Streptococcus viridans
Grupo* *Streptococcus mutans
Grupo* *Streptococcus salivarius
Grupo* *Streptococcus anginosus
Grupo* *Streptococcus sanguinis
Grupo* *Streptococcus mitis

3) Otros cocos en cadenas

Streptococcus acidominimis
Streptococcus pluranimalium
Streptococcus thoraltensis
Streptococcus uberis
Streptococcus parauberis
Streptococcus urinalis
Dolosicoccus paucivorans
Facklamia e *Ignavigranum ruoffiae*
Globicatella sanguinis

HABITAT

Muchos de los estreptococos son saprófitos que se encuentran en el medio ambiente. Otros se hallan como residentes en la boca, el tracto respiratorio, la piel y las mucosas del hombre y de los animales. Algunos tienen la característica de ser muy patógenos.

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS Y COMPOSICION QUIMICA

Son cocos de 0,5 a 2 µm de diámetro, que se agrupan en cadenas de largo variable, dado que provienen de muestras o medios de cultivo, y varían también según la especie. Esta disposición puede apreciarse mejor a partir de medios líquidos.

No forman esporas y todos son inmóviles. Algunas especies presentan cápsula; ésta es una estructura amorfa unida débilmente a la pared celular que está constituida por hidratos de carbono, y varía su composición química de acuerdo con la especie de que se trate. Por ejemplo: *S. pyogenes* presenta una cápsula formada por ácido hialurónico con moléculas repetidas de ácido glucurónico y de N-acetilglucosamina, y la de *S. agalactiae* suele estar formada por glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina y ácido siálico.

CARACTERISTICAS CULTURALES

Los estreptococos tienen requerimientos de crecimiento complejos, debido a la incapacidad de estos microorganismos de generar muchos de los aminoácidos y vitaminas que necesitan, aunque el grado de exigencia varía según las especies. Con respecto a los nutrientes, habitualmente se utilizan medios de cultivo a los que se les agrega sangre o suero. También se pueden emplear, según las necesidades, medios selectivos, que pueden contener sustancias inhibidoras:

- Antimicrobianos, como el medio de Todd Hewitt con ácido nalidíxico y gentamicina
- Sustancias reductoras, como el caldo tioglicolato con cisteína y tioglicolato
- Inhibidores de los microorganismos gramnegativos, como el agar Parcker con azida sódica, entre otros.

Medios selectivos diferenciales: agar de Edwards, constituido por agar infusión carne con el agregado de esculina, cristal violeta, sulfato de talio y sangre bovina, diferencia especies a través de la hidrólisis de la esculina etc.

En medios sólidos crecen formando colonias muy pequeñas de bordes regulares, convexas, transparentes u opacas, con un diámetro de 0,5 a 2 mm. Las cepas productoras de cápsula suelen dar colonias de tipo mucoide. Una misma cepa puede variar y mostrar colonias de diferente forma (*S. pyogenes* varía la morfología de sus colonias en función de la cantidad de proteína M producida). En medios líquidos forman sedimento y a veces dan turbidez. Se desarrollan a partir de los 2 a 3 días de incubación a 37 °C, que es su temperatura óptima, aunque pueden desarrollarse en un rango entre 20 °C y 40 °C. El pH para su proliferación va desde 7,4 a 7,6. Son anaerobios facultativos, y se logra un mejor incremento en el crecimiento de algunas cepas cuando se somete el cultivo a una tensión reducida de O_2 o con un nivel elevado de CO_2.

Tabla 20-1. Cocos catalasa negativos

Prueba	Género	
	Streptococcus	*Enterococcus*
Bilis esculina	-	+
Caldo NaCl 6,5%	-	+

CARACTERISTICAS METABOLICAS

Son quimiorganotrofos y tienen actividad fermentativa sobre los hidratos de carbono, generalmente homoláctica y sin producción de gas.

En medios con sangre (preferentemente de oveja), los estreptococos pueden producir distintos tipos de hemólisis: hemólisis β, que se caracteriza por una lisis total de los eritrocitos; hemólisis α, que es la que se manifiesta por una decoloración parcial alrededor de la colonia; y hemólisis γ, que es la ausencia de hemólisis.

La primera característica metabólica a ser evaluada frente a un coco grampositivo es la presencia de catalasa, enzima que descompone el peróxido de hidrógeno liberando oxígeno libre, y que los estreptococos no la presentan. La pertenencia al género se confirma con la evaluación de la tolerancia a medios con sales biliares al 40% y con cloruro de sodio al 6,5%, siendo habitualmente negativas las dos determinaciones (tabla 20-1).

La prueba de CAMP es utilizada para un diagnóstico presuntivo en la identificación de *S. agalactiae*. Este factor es un antígeno termoestable que actúa con la β-lisina estafilocócica (esfingomielinasa C) para completar la lisis de los eritrocitos. Este fenómeno se caracteriza por una acentuada zona de hemólisis completa cuando los estreptococos del grupo B son sembrados perpendiculares a un trazado de siembra de *Staphylococcus aureus*.

La caracterización de las diferentes especies es compleja y consta de diversas pruebas metabólicas (tablas 20-2 a 20-6).

ESTREPTOCOCOS DE INTERES EN VETERINARIA

CLASIFICACION ANTIGENICA

La estructura antigénica de la pared de algunas especies de estreptococos ha sido muy estudiada, y esto ha permitido su clasificación en grupos y en tipos, utilizados para el diagnóstico y como marcadores epidemiológicos.

En el caso de *S. pyogenes*, además de poseer en su pared celular, el peptidoglucano propio de las bacterias, presenta antígenos específicos de grupo que constituyen un 10% del peso seco de la célula. Son hidratos de carbono conformados por un dímero de N-acetilglucosamina y de L-ramnosa, unidos a su vez al peptidoglucano por puentes fosfatos.

Tabla 20-2. *Streptococcus* relacionados con infecciones en bovinos

Prueba	Especie				
	S.agalactiae subsp. *dysgalactiae*	*S.dysgalactiae* subsp. *equisimilis*	*S.dysgalactiae parauberis*	*S.uberis*	*S.bovis*
Hemólisis	α– β– γ	α– γ	α– β– γ	-	-
Voges Proskauer	+	-	-	-	+
CAMP	+	-	-	v / -	-
Sorbitol	-	-	-	+	-
Bilis esculina	-	-	-	-	+
Esculina	-	v	v	+	+
Hipurato	+	-	-	+ / -	-

Este antígeno es el que se utiliza para ubicar a estos estreptococos en el grupo A (*Group A Streptococci*-GAS) de Lancefield y para diferenciarlo de los otros grupos.

El GAS puede presentar antígenos proteicos responsables de la especificidad de tipo dentro del grupo. Existen varios antígenos, y el principal es un grupo de proteínas tradicionalmente denominadas proteínas M,vinculadas con las cepas virulentas porque guardan relación con propiedades antifagocíticas. La familia de la proteína M de los estreptococos está compuesta por las proteínas Emm (clase I y II), Mrp (FcrA) y Enn. Los antígenos M son resistentes al calor y a los ácidos, pero son destruidos por la tripsina. Poseen un extremo carboxilo que se ancla a la membrana citoplasmática y un extremo amino que se extiende hasta la superficie de la célula; este grupo amino es el responsable de la variedad antigénica observada en más de 80 serotipos de proteína M.

Otra proteína de tipo es la denominada T (resistente a la tripsina), que está conformada por un grupo de alrededor de 25 moléculas antigénicamente diferentes que se encuentran en la superficie de los estreptococos de los grupos A, B, C y G, siendo su función estructural desconocida, pero útil como marcador epidemiológico, para aquellos estreptococos que no expresan a la proteína M. Ambos antígenos, M y T, son independientes y pueden presentarse en varias combinaciones.

Un antígeno adicional es la proteína R, semejante al antígeno M, aunque resistente a la tripsina.

La pared de *S. pyogenes* posee otros componentes antigénicos, como los ácidos teicoicos y la proteína F, que facilitan la unión de la bacteria al hospedador.

El GAS está además subclasificado según la presencia o ausencia de una apoproteinasa cuya expresión causa opacidad en el suero y es conocida como Factor de Opacidad del Suero (OF). Aproximadamente la mitad de los aislamientos de estreptococos expresan el OF y éste guarda relación con ciertos serotipos M. La expresión del OF está generalmente restringida a las especies de GAS que presentan las proteínas M de clase II.

Streptococcus agalactiae utiliza otro marcador antigénico específico de grupo denominado antígeno B, que es un polisacárido de la pared celular compuesto por N-acetilglucosamina, D-galactosa, L-ramnosa y glucitol. El polisacárido B es específico para *S. agalactiae*, aunque a veces otras especies de estreptococos, como *S. uberis*, *S. porcinus* y *S. canis*, son capaces de reaccionar con un suero específico antigrupo B.

La cápsula de *S. agalactiae* presenta antígenos polisacáridos que son específicos de tipo: Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, y antígenos proteicos c, R y X. Ellos permiten clasificar a *S. agalactiae* en serotipos inmunológicamente diferentes. El antígeno proteico c (anteriormente designado como Ic o Ib/c) está conformado por un constituyente denominado ca, que es resistente a la tripsina, uno denominado cb, que es sensible a la tripsina, uno cg y otro cd. El antígeno R se presenta bajo formas diferentes descritas como, R1, R2, R3, R4, Rib y Ra. La frecuencia de aislamientos de los diferentes serotipos varía de un lugar a otro.

El grupo C de estreptococos presenta en la pared celular un antígeno específico compuesto por ramnosa-glucosamina. El grupo D no se clasifica por los hidratos de carbono de la pared sino por un antígeno compuesto de glicerol y ácido teicoico.

La especificidad antigénica de los polisacáridos capsulares se emplea para clasificar a las diferentes cepas de *S. agalactiae* y *S. pneumoniae*.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Determinación antigénica específica de grupo

Existen *kits* comerciales (Api 20 STREP Bio-Merieux, Marcy l'Etoile, France) que utilizan anticuerpos que reaccionan con los hidratos de carbono específicos de grupo de la pared celular de la bacteria, tienen una sensibilidad de alrededor del 90%, por lo cual aquellos que dan un resultado negativo deberían ser cultivados.

Observación directa de la muestra con tinción de Gram

Hay que relacionar la procedencia de la muestra con la presencia de cocos grampositivos en cadena.

Cultivo

Habrá que recordar que los estreptococos tienen requerimientos físicos y químicos complejos para su desarrollo, por lo que será necesario contar con los elementos apropiados en el laboratorio. Podrán evaluarse la presencia o ausencia de hemólisis, así como las determinaciones bioquímicas orientadas a cada especie según la necesidad (tablas 20-1 a 20-6).

Un diagnóstico presuntivo (no confirmativo) de *S. agalactiae* se puede realizar a través de la prueba de CAMP.

RESISTENCIA

Resistencia a los agentes físicos

Son microorganismos muy sensibles a las variaciones de temperatura. Con materia orgánica pueden permanecer viables

Tabla 20-3. *Streptococcus* relacionados con infecciones en pequeños animales

	Especie	
Prueba	*S. pyogenes*	*S. canis*
Hemólisis	β	β
Trehalosa	+	-
Lactosa	+	-
PYR	+	-
Bacitracina	+	-
CAMP	-	+

pocas horas a temperatura ambiente. Generalmente todas las especies mueren a 60 °C durante 30 minutos.

Resistencia a los agentes químicos

Los estreptococos son sensibles a los compuestos yodados y fenólicos, así como a una gran variedad de antimicrobianos. Para ser evaluada la susceptibilidad a los antibióticos hay ciertas recomendaciones a tener en cuenta; el agar Müeller Hinton debe ser suplementado con 5% de sangre de carnero desfibrinada y las placas deben incubarse a 35 °C en atmósfera de CO_2 por 20 a 24 horas.

Por lo general, los estreptococos son sensibles frente a los antibióticos, y en la actualidad se recomienda ensayar con penicilina o ampicilina y eritromicina. La resistencia que muestran algunas cepas de estreptococos frente a los β-lactámicos está asociada a ciertos fenotipos y determinada por la modificación de su sitio blanco, PBP de baja afinidad (proteínas ligadoras de la penicilina, transpeptidasas y carboxipeptidasas), por lo que el β-lactámico no se puede unir y se impide su acción. Otro mecanismo de resistencia es la producción de la enzima β-lactamasa.

Los estreptococos poseen diferentes mecanismos de resistencia frente a los macrólidos que se reconocen como los fenotipos MLS, M y L.

El fenotipo MLS es originado por la producción de metilasas que causan un cambio en la conformación del sitio blanco reduciendo la unión del antibiótico a la subunidad 50S. Este fenotipo puede ser constitutivo ($_c$MLS) o inducible ($_i$MLS), y le confiere resistencia cruzada frente a todos los macrólidos, incluyendo los derivados con núcleos de 14, 15 y 16 átomos de carbono, así como a las lincosamidas y estreptograminas B porque sus receptores ribosomales son comunes o se encuentran próximos. Los genes que la codifican se designan *erm* (*erythromycin ribosome methylation*), y se encuentran en plásmidos y también en el cromosoma asociado a transposones.

El fenotipo M consiste en un mecanismo que incluye un sistema de eflujo activo específico con tres componentes, dos de los cuales median la unión al ATP, mientras que el último es una proteína de membrana, hidrofóbica, que causa la salida del antibiótico. Este fenotipo confiere únicamente resistencia a los compuestos de 14 y 15 átomos de carbono, incluida la eritromicina y sin afectar a los de 16, a lincosamidas y estreptograminas. Este mecanismo está codificado por el gen *mef*A que se transmite por conjugación.

Aún no se han detectado cepas que presenten el fenotipo L, producido por la presencia de una lincosamida nucleotidiltransferasa.

LISOGENIA

Todas las especies de estreptococos pueden presentar esta característica, en la que los bacteriófagos suelen desempeñar un papel importante para la síntesis de enzimas o toxinas. Tal es el caso de *S. pyogenes*, que cuando se encuentra en esta fase produce una exotoxina A, denominada eritrogénica (vinculada con la fiebre escarlatina y con el síndrome de choque tóxico estreptocócico), o *S. equi*, que elabora una hialuronidasa que hidroliza su cápsula.

Tabla 20-4. *Streptococcus* relacionados con infecciones en equinos

	Especie		
Prueba	*S. dysgalactiae* **subsp.** *equisimilis*	*S. equi* **subsp.** *equi*	*S. equi* **subsp.** *zooepidemicus*
Hemólisis	β	β	β
Trehalosa	+	-	-
Sorbitol	-	-	+
Lactosa	v	-	+

MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

Varían según las especies.

Hemolisinas

Participan dos enzimas: 1) estreptolisina O, proteína de PM 60.000, que se inactiva en presencia de oxígeno y, cuando se determina, aparece un título de antiestreptolisina O mayor a 160-200 unidades que nos sugiere infección reciente por estreptococos, y 2) estreptolisina S, proteína que permanece estable en presencia de oxígeno. Su producción es inducida por el suero y es el agente causal de las zonas hemolíticas alrededor de las colonias.

Proteína M

Es una molécula fibrilar con propiedades antifagocíticas que se encuentra localizada en la superficie de los estreptococos del grupo A (existen más de 80 serotipos diferentes). Esta proteína interfiere sobre el depósito de C3 del sistema complemento, en la superficie de la bacteria.

Acido lipoteicoico

Componente celular que actúa mediando la adhesión de los estreptococos del grupo A en las células epiteliales.

Cápsula

Algunos estreptococos pueden formarla, variando su composición química según la especie (GAS: ácido hialurónico). Otorga propiedades antifagocíticas.

Fibrinolisina (estreptocinasa)

Esta sustancia transforma el plasminógeno del plasma humano en plasmina, una enzima proteolítica activa que digiere la

Tabla 20-5. *Streptococcus* relacionados con infecciones en cerdos

	Especie	
Prueba	*S. porcinus*	*S. suis*
Hemólisis	β	-
VP	+	-
CAMP	+	-

fibrina y otras proteínas. De esta manera pueden interferir a los inhibidores inespecíficos del suero.

Hialuronidasa

Enzima que desdobla el ácido hialurónico, componente importante del tejido conectivo, permitiendo la propagación de los microorganismos.

Estreptodornasa (desoxirribonucleasa)

Enzima que despolimeriza el DNA presente en los exudados purulentos y que origina la viscosidad del pus.

Toxina eritrógena

Incluye a las exotoxinas pirógenas denominadas A, B y C antigénicamente diferentes y exclusivas de los estreptococos del grupo A.

IMPORTANCIA

La mayor parte de los estreptococos patógenos de los animales y del hombre son β-hemolíticos y suelen estar asociados a enfermedades supurativas: abscesos, afecciones del tracto reproductor y respiratorio, lesiones de piel, entre otras.

S. pyogenes: es la especie tipo y la más virulenta de este género (tablas 20-1 y 20-3).

Pertenece al grupo A de Lancefield, aunque no es el único estreptococo que presenta el antígeno A (GAS). El principal mecanismo de patogenicidad de esta especie es la proteína M, responsable de su capacidad para evitar la fagocitosis, adherirse, provocar inflamación e invasión.

Fenotípicamente se diferencia porque de todos los estreptococos β-hemolíticos es el único que es inhibido por la bacitracina y da positivo a la reacción pirrolidonil aminopeptidasa (PYR).

S. agalactiae: es un parásito obligado del hombre y varias especies animales, principalmente el bovino. Se reconocen cepas de origen animal y cepas de origen humano, que difieren entre ellas por características metabólicas. Se ha intentado separarlas por estudios de hibridación DNA-DNA, así como por estudios de corridas electroforéticas de sus proteínas, pero hasta el momento todas las cepas, a pesar de las diferencias bioquímicas, pertenecen a la misma especie.

En medios con sangre y cuando son cultivados en anaerobiosis pueden formar colonias con pigmento amarillo-naranja. La presencia de un halo de hemólisis varía según la cepa, pudiendo presentar hemólisis α, β o γ. Para su identificación se utilizan varias pruebas metabólicas (tablas 20-1 y 20-2).

En bovinos se caracteriza por ser uno de los principales agentes productores de mastitis, inflamación de la glándula mamaria que genera importantes pérdidas económicas en la industria láctea.

S. agalactiae se ha aislado en otras especies animales, como perros y gatos (lesiones de piel y endocarditis), peces (meningoencefalitis), y también en ratas y hámsters. En el hombre, el microorganismo está presente en el tracto genital (vagina) y en el digestivo (recto), siendo responsable de septicemias, neumonías, meningitis, artritis, infecciones urinarias y supurativas.

Con respecto a los factores de virulencia, se le reconocen la capacidad de adherirse a las superficies epiteliales, mediante adhesinas proteicas no bien definidas, y el ácido lipoteicoico presente en la pared celular; producción de cápsula (no todas las cepas la presentan) y una β-hemolisina con acción citotóxica directa (citolisina formadora de poros en la membrana celular de las células que infecta). También se describen proteasas, colagenasas, y una hialuronidato liasa que facilitaría la diseminación del microorganismo.

S. uberis y ***S. parauberis*** son responsables de producir mastitis bovina. En algunos casos pueden ser aisladas de animales aparentemente sanos, en la cavidad nasal, el semen, la piel, el intestino y la vagina (tablas 20-1 y 20-2).

Habitualmente en los laboratorios de diagnóstico no se diferencian estas dos especies que son muy parecidas fenotípicamente y tienen un poder patógeno comparable. Una diferencia cultural que permite separarlas es la capacidad de crecer a 10 °C (tabla 20-8).

Como factores de patogenicidad se le reconocen varios mecanismos asociados con la evasión de las defensas del hospedador, que incluyen una cápsula de ácido hialurónico (no todas las cepas la presentan) y proteínas M-like y R-like, así como adhesinas que le permiten fijarse a células epiteliales.

Estas especies de estreptococos no son agrupables por antígenos de grupo, y pueden reaccionar con suero antigrupo E de Lancefield y más raramente con sueros antigrupo B, C, D, G, P y U.

***S. dysgalactiae*:** en 1998 se subdividió a *Streptococcus dysgalactiae* en dos subespecies basándose en el análisis del perfil de migración de proteínas celulares en una corrida electroforética, con cepas animales y humanas. Así se formaron dos grupos que se diferencian fenotípicamente (tabla 20-9).

S. dysgalactiae subsp *dysgalactiae* está relacionado con casos de mastitis bovina, y pueden también aislarse en amígdalas, vagina, lesiones articulares y cutáneas de bovinos y pequeños rumiantes, y *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* incluye cepas que están adaptadas a los animales y otras, al hombre. Las cepas de origen animal son susceptibles de infectar a varias especies animales: en carnívoros está relacionada con neumonías purulentas, infecciones urinarias, abscesos, otitis, etc.; en equinos, con lesiones supurativas diversas, septicemias neonatales, poliartritis, endometritis, onfalitis, infecciones respiratorias, etc. En cerdos se aísla frecuentemente en la cavidad nasal, la piel, las secreciones vaginales y el prepucio. Las cepas de origen humano son microorganismos residentes del tracto digestivo y a veces de las mucosas genitales, capaces de provocar infecciones.

Se han descrito diversos factores de patogenicidad para *Streptococcus dysgalactiae*: adhesinas, producción de enzimas (fibrinolisina, hialuronidasa, estreptoquinasa) y a veces producción de cápsula.

***S. equi*:** presenta dos subespecies. 1) *S. equi* subsp. *equi*, el agente etiológico de la papera o moquillo en los equinos, enfermedad de distribución mundial. Excepcionalmente puede provocar

Tabla 20-6. *Streptococcus* relacionados con infecciones en ovinos

Prueba	*S. ovis*
Hemólisis	α
VP	-
Esculina	+
Hipurato	-
Urea	-
Lactosa	+
Manitol	+
Trehalosa	+
Sacarosa	+
Sorbitol	+

Tabla 20-7. Clasificación serológica del género *Streptococcus*

a) *Streptococcus* β-hemolíticos	
Especie	**Grupo serológico**
Streptococcus pyogenes	A
Streptococcus agalactiae	B
Streptococcus dysgalactiae	
subsp. *dysgalactiae*	C
subsp. *equisimilis*	A, C, G, I
Streptococcus equi subesp. *equi*	C
Streptococcus equi subesp. *zooepidemicus*	C
Streptococcus canis	G
Streptococcus porcinus[a]	E, P, U, V, ninguno, nuevo

b) *Streptococcus* no β-hemolíticos	
Especie	**Grupo serológico**
Streptococcus equinus (S.bovis)	D
Streptococcus gallolyticus (*S.bovis* I)	D
Streptococcus pasteurianus (*S.bovis* II. 2)	D
Streptococcus infantarius (*S.bovis* II. 1)	D
Streptococcus suis	R, S, T

c) Otros *Streptococcus*	
Especie	**Grupo serológico**
Streptococcus uberis/parauberis	Ninguno, E

Aclaraciones correspondientes a las tablas 20-1 a 20-7:
+: reacción positiva > al 95%.
-: reacción negativa > al 95%.
v: reacción variable entre un 6 y un 94%.
VP: prueba de Voges-Proskauer.
BE: Bilis-esculina.
PYR: reacción de pyrrolidonyl aminopeptidasa (hidrólisis de 1-pyrrolidonyl-beta-naphthylamida).
Lactosa, trehalosa y sorbitol: fermentación con producción de ácido.
Hipurato: hidrólisis.
Esculina: hidrólisis.
Urea: determinación de ureasa, enzima que cataliza la hidrólisis de la urea.

septicemias en el humano. Es un microorganismo capsulado. Las colonias tienen un aspecto mucoso, aunque algunas cepas pueden presentar colonias de aspecto rugoso cuando están parasitadas por un fago que posee la información para la producción de una hialuronidasa que hidroliza la cápsula. La virulencia de esta especie está ligada a la proteína M (proteína SeM). El diagnóstico se realiza por el cultivo y aislamiento a partir de líquido de lavado de las bolsas guturales o de hisopados nasofaríngeos. También puede recurrirse a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para determinar a los portadores sanos con fines epidemiológicos. 2) *S. equi* subsp. *zooepidemicus*; puede ser aislado de mastitis bovina y a su vez infectar al humano a través del consumo de leche no pasteurizada. Su virulencia está ligada a una lipoproteína (adhesina), así como a la capacidad de formar cápsula (tablas 20-1 y 20-4).

S. ovis: Collins y col., en 2001, describen a *S. ovis* como una nueva especie dentro de este género. Hasta el momento no tiene antígeno específico de grupo. Todas las cepas informadas fueron aisladas de infecciones clínicas en ovinos (tablas 20-1 y 20-6).

***S. porcinus*:** en 1985 se valida esta especie, perteneciente al grupo E. Cuando se utilizan los *kits* comerciales, algunas cepas pueden reaccionar contra el antígeno del grupo B. El cerdo es el principal reservorio y es el responsable de formar abscesos en nódulos linfáticos. Más raramente se lo ha aislado de endocarditis, neumonías, enteritis, artritis. En otros animales casi no se han registrado aislamientos, pero sí a partir del tracto genitourinario de mujeres en edad reproductiva (tablas 20-1 y 20-5).

S. suis: Kilpper-Bälz y Schleifer, en 1987, proponen esta especie aislada a partir de infecciones respiratorias en cerdos. Este estreptococo forma cadenas cortas y además puede presentar cápsula compuesta por ácido siálico que permite diferenciar a esta especie en 25 serovares. El 80% de las cepas poseen el antígeno de grupo D y las otras son no agrupables o pertenecen a los grupos R, S o T. Rara vez pueden reaccionar con el antígeno de grupo B. Algunas cepas de *S. suis* son capnófilas. Como factores de patogenicidad se describen presencia de cápsula y fimbrias de adhesión (tablas 20-1 y 20-5).

El cerdo es el principal reservorio, y se lo encuentra en las vías respiratorias superiores y en la vagina. Las moscas pueden transportar al microorganismo durante 2 a 5 días y pueden transmitirlo de un animal a otro. Esta especie se caracteriza por resistir largos períodos en el medio ambiente, potenciándose cuando las temperaturas son bajas: 100 días en materia fecal y 54 días a 0 °C. La virulencia depende del serovar y de la cepa. No todas las cepas son responsables del mismo tipo de enfermedad, y pueden ocasionar cuadros de meningitis, septicemias, neumonías y abscesos. *S. suis* es susceptible de infectar a otras especies animales produciendo amigdalitis en perros; infecciones intestinales en gatos, bovinos, equinos, cabras y ovejas; infecciones en pájaros

Tabla 20-8. *Streptococcus uberis* y *S. parauberis*

Prueba	Especie	
	S. uberis	*S. parauberis*
Crecimiento a 10 °C	-	+

Tabla 20-9. Subespecies de *Streptococcus dysgalactiae*

Prueba	Subespecie	
	Streptococcus dysgalactiae subsp *dysgalactiae*	*equisimilis*
Hemólisis	-	β

Tabla 20-10. Grupo *Streptococcus bovis*

Biotipo/prueba	Atg	BE	NaCl	Ma	Mel	Sor	Tre	Dx	Origen
S. equinus (S. bovis)	D	+	-	-	-	-	-	-	Equino, bovino
S. gallolyticus (*S. bovis* I)	D	+	-	+	+	-	+	+	Humano, koala, bovino
S. pasteurianus (*S. bovis* II/2)	D	+	-	-	+	-	-	-	
S. infantarius (*S. bovis* II/1)	D (v)	-	-	-	+	-	+	-	Humano, bovino

Atg: grupo antigénico de Lancefield; BE: tolerancia a la bilis e hidrólisis de la esculina; NaCl: tolerancia al 6,5% de cloruro de sodio; Ma: manitol; Mel: melibiosa; Sor: sorbitol; Tre: trehalosa: fermentación con producción de ácido; Dx: producción de polisacárido extracelular.

e incluso en el hombre, como agente de zoonosis, puede causar meningitis y o septicemias, generalmente a través del contacto con carne de cerdo contaminada.

S. canis: esta especie se puede aislar de la piel, las vías respiratorias superiores y el aparato genital de perros, gatos y de otras especies, como bovino, zorro, visón, conejo y ratas. En perros es responsable de lesiones cutáneas, otitis, faringitis, vaginitis, metritis y abscesos prostáticos. En gatos es frecuente encontrarlo en la vagina y la faringe. Se han informado como raros los aislamientos en humanos. A veces puede reaccionar contra el antígeno del suero B (tablas 20-1 y 20-3).

S. pneumoniae: esta especie es de mucha importancia en medicina humana por causar neumonías, meningitis y por presentar alto nivel de resistencia a los antimicrobianos. Como factores de patogenicidad se describen la presencia de una cápsula polisacárida, dos adhesinas (PspA y PsaA), dos hemolisinas y una neuraminidasa encargada de clivar los residuos terminales de ácido siálico de proteínas, lípidos y oligosacáridos encontrados en los fluidos corporales y las superficies celulares.

S. thoraltensis: es una nueva especie, descrita por Devriese y col. en 1997, y ha sido aislada del tracto intestinal de los cerdos. No existen informes sobre hallazgos en otras especies.

Grupo *Streptococcus bovis*: pertenece al grupo de los estreptococos no hemolíticos siendo la nomenclatura de estas especies confusa y sujeta a debates. Existen cepas de origen animal y otras de origen humano. Pertenecen a este grupo las siguientes especies: *S. bovis*, *S. equinus*, *S. gallolyticus*, *S. infantarius*, *S. pasteurianus* (tabla 20-10).

BIBLIOGRAFIA

Collins MD, Hutson RA, Hoyles L, Falsen E, Nikolaitchouk N, Foster G. *Streptococcus ovis* sp. nov., isolated from sheep. Int J Syst Evol. Microbiol. 2001, 51: 1147-1150.

Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections. Clin Microbiol Rev. 2000; 13: 470-511.

Denamiel G, Gentilini E, Rumi MV, Pérez Monti H. Mastitis Bovina: Tipificación de cocos catalasa negativo. UBACyT VE 010 Veterinaria Argentina; 1997. XIV, (136): 374-379.

Devriese LA. Streptococcal ecovars associated with different animal species: epidemiological significance of serogroups and biotypes. J Appl Bacteriol. 1991; 71: 478-483.

Facklam RR. What happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. Clin Microbiol Rev. 2002; 125, (4): 613-630.

Finch LA, Martin DR. Human and bovine group B streptococci: two distinct populations. The jouARNl of Applied Bacteriology. 1984; 57 (2):273-278.

Kaplan Edward L. Recent evaluation of antimicrobial resistance in β- hemolytic streptococci. Clin Infect Diseases. 1997; 24 (Suppl 1): S89-92.

Rotta J. Pyogenic hemolytic streptococci. In: Bergey's manual of Systemic Bacteriology (Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, Eds) 1986. Vol 2 p. 1047-1051, Williams and Wilkins.

Ruoff KL. *Streptococcus*. In : P.R. Murray EJ, Baron MA, Pfaller FC, Tenover RH, Yolken: Manual of clinical microbiology, 6th ed, American Society for Microbiology, Washington DC, 1995, p. 299-307.

Yildirim AO, Lammler C, Weib R, Kopp P. Pheno-and genotypic properties of streptococci of serological group B canine and feline origin. FEMS Microbiol Lett. 2002. p. 187-192.

Capítulo 21

ENTEROCOCOS

Graciela Ana Denamiel

INTRODUCCION

Este género está integrado por microorganismos que presentan forma esférica u oval, miden entre 0,6 y 2,5 µm de diámetro y se agrupan de a pares o en cortas cadenas. Inmóviles o móviles por escasos flagelos, no forman esporas y algunas especies pueden presentar cápsula. Son grampositivos, anaerobios facultativos y quimiorganotrofos, con actividad fermentativa sobre los hidratos de carbono; producen ácido pero no gas a partir de la glucosa. No son exigentes en sus requerimientos y pueden crecer en condiciones hostiles. Se caracterizan por tolerar temperaturas entre 10 y 45 °C, pH de 9,5, concentración de cloruro de sodio 6,5% y de bilis del 40%.

Los enterococos se hallan ampliamente difundidos en la naturaleza, particularmente en heces de los vertebrados. En algunos casos producen enfermedades piogénicas.

Taxonómicamente es el único género que integra la familia Enterococcaceae.

HISTORIA

Estos microorganismos se encontraban incluidos dentro del género *Streptococcus* y clasificados según Lancefield en el serogrupo D o estreptococos aislados del intestino. A su vez, este serogrupo está subdividido en dos: aquellos capaces de crecer en condiciones hostiles (enterococos) y los que son incapaces de crecer en condiciones hostiles (estreptococos no enterococos).

En 1984, Schleifer y Kilpper-Bälz, por resultados de estudios genómicos, determinaron que ambos grupos de cocos entéricos pertenecían a dos géneros diferentes y propusieron transferir el grupo de los estreptococos del grupo enterococo a un nuevo género, denominado *Enterococcus*.

HABITAT

Los enterococos son bacterias ubicuas presentes en los tractos intestinal, respiratorio superior, genitourinario, y en la piel de los animales y el hombre. También en agua dulce y salada, en el suelo y en vegetales.

ESPECIE TIPO

Enterococcus faecalis.

Las especies están incluidas en el serogrupo D de Lancefield o cocos catalasa negativos aislados a partir del intestino y se clasifican en dos grupos según sus características fisiológicas.

1) **Cocos del grupo D o *Enterococcus*, capaces de crecer en condiciones hostiles:**
Enterococcus faecalis, *E. faecium*, *E. asini*, *E. avium*, *E. canis*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. flavescens*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. haemoperoxidus*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. moraviensis*, *E. mundtii*, *E. pallens*, *E. phoeniculicola*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. ratti*, *E. saccharolyticus*.

2) **Cocos del grupo D no enterococos, incapaces de multiplicarse en condiciones hostiles:**
Streptococcus alactolyticus (o *S. intestinalis*), *S. entericus*, *S. equinus* (o *S. bovis*), *S. gallolyticus* (o *S. caprinus*), *S. infantarius* subsp. *infantarius*, *S. infantarius* subsp *coli* (o *S. lutetiensis*) y *S. suis*.

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS

Son cocos, a veces ovales y elongados, y puede variar su morfología según las condiciones de cultivo. Miden entre 0,6-2 µm y 0,6- 2,5 µm. Pueden presentarse solos o agrupados en diplococos o cadenas cortas; a partir de un caldo, las células aparecen ovales y agrupadas en cortas cadenas, mientras que a partir de un medio sólido pueden aparecer como cocobacilos y formando pequeños racimos. Son grampositivos. No son esporulados. Se caracterizan por ser inmóviles, aunque algunas pocas cepas pueden ser móviles por la presencia de escasos flagelos (*E. casseliflavus*, *E. flavescens*, *E. gallinarum*).

CARACTERISTICAS METABOLICAS

Tienen requerimientos nutricionales mínimos, y crecen bien en medios comunes, como caldo o agar cerebro corazón en 18 a 24 horas a 37°C. Usualmente los enterococos desarrollan a 10 °C y a 45 °C, así como también presentan la capacidad de tolerar temperaturas superiores a los 60 °C durante 30 minutos.

Son aerobios-anaerobios, aerotolerantes. El cultivo se ve favorecido por una incubación en presencia de dióxido de carbono, siendo indispensable para algunas especies (*E. cecorum* y *E. columbae*). Las colonias suelen tener un tamaño entre 0,5 y 1 mm de diámetro, son opacas o ligeramente blanquecinas. Algunas especies dan colonias con un pigmento amarillo (*E. casseliflavus*, *E. flavescens*, *E. mundtii*) cuya producción se ve favorecida al ser cultivadas en agar tripticasa soya e incubadas 24 horas a 37 °C. Pueden producir α-hemólisis o γ-hemólisis en medios con sangre de oveja. En medios con sangre humana, equina o de conejo algunas cepas pueden presentar una β-hemólisis.

Son quimiorganotrofos con metabolismo fermentativo sobre los hidratos de carbono, generalmente homofermentativos (ácido láctico) pero sin producción de gas. Por lo usual son catalasa negativos; a veces, débilmente catalasa positivos como *E. haemoperoxidus*.

Se desarrollan en medios de cultivo con el agregado de bilis al 40% y se caracterizan por hidrolizar a la esculina. Cuando se utiliza medio bilis-esculina o medio bilis-esculina-azida, las colonias de los enterococos se acompañan con un ennegrecimiento del medio. Estas características son utilizadas para la diferenciación

y el diagnóstico presuntivo entre los enterococos y los estreptococos. Crecen en caldo con cloruro de sodio al 6,5%, aunque existen especies que no lo hacen (*E. avium, E. columbae* y *E. cecorum*). Estos microorganismos pueden crecer en medios con telurito de potasio al 0,05%, formando típicas colonias de color negro. La actividad sobre la PYR (pyrroglutamil aminopeptidasa) es una determinación que suele utilizarse para la identificación de los enterococos y es positiva para todas las especies, a excepción de *E. saccharolyticus*, *E. cecorum* y *E. columbae*.

DIAGNOSTICO

Diagnóstico microbiológico

A través del cultivo, el aislamiento y la identificación, incluyéndose varias pruebas metabólicas (tabla 21-1).

Existen tests comerciales para la identificación de este género, el más utilizado es *API 20 Strep* (Bio-Merieux, Marcy l'Etoile, France), aunque estos *kits* sólo pueden detectar un número limitado de especies de enterococos.

Diagnóstico por métodos genómicos

Para una rápida identificación y diferenciación de especies se han realizado estudios recientes orientados a la aplicación de técnicas biomoleculares, útiles con fines epidemiológicos. Algunas de ellas incluyen estudios sobre perfil plasmídico, electroforesis de campo pulsado (PFGE), análisis de restricción del gen ribosomal RNA (ribotyping) e hibridación de ácido nucleico.

CLASIFICACION ANTIGENICA

Se encuentran ubicados, según el esquema de Rebeca Lancefield, dentro del serogrupo D. El antígeno de este grupo no es un polisacárido de la pared celular sino un ácido lipoteicoico asociado a la membrana citoplasmática: compuesto de poliglicerol fosfato en el que parte del glicerol está sustituido por D-alanina y glucosa.

En los enterococos, los antígenos de la pared sirven como antígenos específicos de tipo.

RESISTENCIA

Resistencia a los agentes físicos

Son resistentes al calor, toleran 60 °C durante 30 minutos. Sobreviven en los cultivos durante largo tiempo.

Resistencia a los agentes químicos

Los enterococos son reservorios de genes para la resistencia a los antibióticos; se han podido recuperar cepas resistentes a partir de muestras clínicas (infecciones en animales y hombre), en comida destinada al consumo humano, en objetos inanimados y más recientemente a partir de heces de pollos y de sus carcasas, así como de otros animales. Se han estudiado los factores de riesgo y los reservorios fuera de los hospitales; el uso de antibióticos en las raciones de los animales es un factor importante para la aparición de resistencia en las cepas de origen animal, lo cual genera cepas multirresistentes como consecuencia de la alta exposición a antibióticos. Los patrones de resistencia han sido estudiados por numerosos autores a partir de aislamientos clínicos en humanos.

Los enterococos presentan una resistencia cromosómica natural o intrínseca para los β-lactámicos (penicilinas semisintéticas y cefalosporinas), aminoglucósidos de bajo nivel, sulfonamidas, clindamicina y algunas fluorquinolonas, así como una resistencia cromosómica adquirida, ya sea por mutaciones o por selección con producción de β-lactamasa (Bla +). Con respecto a los aminoglucósidos, la resistencia natural de bajo nivel se debe a un ingreso deficiente del antibiótico y a la presencia de una enzima cromosómica denominada acetilasa.

Otra forma de resistencia es la extracromosómica, que está dada por plásmidos y transposones, y es la responsable del 90% de los casos de resistencia.

Los enterococos pueden presentar resistencia a penicilina y ampicilina debido a la modificación de su sitio blanco, por producción de proteínas ligadoras de penicilina (PBP) de baja afinidad y a veces, con menor frecuencia, por la producción de β-lactamasas.

La resistencia a los glucopéptidos (vancomicina) se presenta con mayor frecuencia en *E. faecium*. Existen diferentes fenotipos: Van A, Van B, Van C, Van D y Van E.

Nunca deben informarse, aunque puedan aparecer como efectivos in vitro, los siguientes antimicrobianos: aminoglucósidos (excepto los de alta concentración), cefalosporinas, clindamicina y trimetroprima-sulfametoxazol.

Estos microorganismos pueden presentar además otras propiedades frente a los antimicrobianos, como **tolerancia** (cuando la concentración bactericida mínima [CBM] es mucho mayor que la concentración inhibitoria mínima [CIM] y **persistencia** (aquellos microorganismo que han escapado del valor de la CIM y tienen una fase logarítmica larga porque no se duplican).

Los enterococos son tolerantes a todos los β-lactámicos a causa de que poseen una PBP de baja afinidad.

Según recomendaciones del *"National Commitee for Clinical Laboratory Standards"* (NCCLS), los antibióticos a ensayar frente a los enterococos son: ampicilina, como el fármaco más representativo para ser probado frente a cepas no productoras de β-lactamasas; sinergismo entre penicilina o ampicilina más un aminoglucósido, o vancomicina sola o combinada con un aminoglucósido están indicados para infecciones graves. Se deben utilizar discos de alta carga para gentamicina (120 µg) y estreptomicina (300 µg); éstos sirven para predecir la sinergia entre penicilina, ampicilina o vancomicina con un aminoglucósido.

Tabla 21-1. Género *Enterococcus*

Prueba/género	*Enterococcus*
Catalasa	-
BE	+
Desarrollo en caldo/NaCl 6,5%	+
PYR	+

BE: crecimiento en bilis al 40% e hidrólisis de la esculina.
PYR: reacción de pyrrolidonyl aminopeptidasa.

FACTORES DE PATOGENICIDAD

Las especies de este género se caracterizan por tener un poder patógeno limitado, pero a pesar de esto, pueden llegar a producir enfermedades graves, sobre todo en humanos. Pueden presentar adhesinas hidrocarbonadas, así como una sustancia de agregación (SA), que es una proteína de aspecto velloso que se encuentra en la membrana citoplasmática e interviene en la colonización al unirse a las células epiteliales. La SA facilita además el intercambio genético por plásmidos.

Algunos enterococos pueden producir β-hemólisis en glóbulos rojos humanos y de caballo, pero no en los de oveja, y esto está

Tabla 21-2. Grupos del Género *Enterococcus*

Prueba/grupo	1	2	3	4	5	6
Arginina	+	+	+	+	-	-
Manitol	+	+	+	-	+	+
Telurito	+	-	-	-/+	-	-
Arabinosa	-	+	-	-	+	-

Grupo 1:
Especie: *Enterococcus faecalis*

Grupo 2:

Prueba/especie	*E. faecium*	*E. gallinarum*	*E. casseliflavus*	*E. mundtii*
Pigmento	-	-	+	+
Movilidad	-	+	+	-

Grupo 3: *E. solitarius*

Grupo 4:

Especie/prueba	*E. durans*	*E. faecalis var*	*E. hirae*
Sacarosa	-	-	+
Rafinosa	-	-	+/-
VP	+	-	+

Grupo 5:

Especie/prueba	*E. raffinosus*	*E. avium*
Rafinosa	+	-

Grupo 6:

Especie/prueba	*E. malodoratus*	*E. pseudoavium*
Rafinosa	+	-

dado por la actividad de una citolisina que favorece también la colonización. Elaboran una gelatinasa y bacteriocinas. Estas bacteriocinas se denominan enterocinas y son sustancias que tienen propiedades inhibitorias específicas sobre ciertas bacterias, como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium* spp, y *Bacillus* spp; tal es el caso de *Enterococcus faecium*, *E. faecalis* y *E. casseliflavus*.

IMPORTANCIA

Históricamente, los enterococos han sido considerados como patógenos oportunistas, dado que se encuentran incluidos entre los microorganismos propios de la microbiota residente del hombre y los animales y están relacionados sólo con procesos infecciosos de individuos inmunosuprimidos. Hoy la situación ha cambiado; en el área de la clínica veterinaria es frecuente hallarlos a partir de infecciones de la glándula mamaria de bovino, cabra y llamas, así como en abscesos y otras infecciones supurativas de perros y gatos.

Los enterococos se caracterizan por poseer un mecanismo eficiente para transferir plásmidos DNA por conjugación. La expresión de este sistema de transferencia por parte de las células dadoras es inducida por un oligopéptido (feromona), secretado por las células receptoras. Esta inducción resulta en un incremento de la expresión de una proteína de superficie (sustancia de agregación o AS) en la célula dadora, que actúa como una adhesina para dar comienzo a la transferencia génica. A través de este mecanismo, estos microorganismos son capaces de incorporar información para modificar ciertas características, como factores de patogenicidad y resistencia a los antibióticos. Esta situación ha sido estudiada desde hace tiempo en el campo de la medicina humana, considerando a los enterococos como microorganismos emergentes y patógenos nosocomiales.

BIBLIOGRAFIA

Day AM, Sandoe JAT, Cove JH, Phillips-Jones MK. Evaluation of a biochemical test scheme for identifying clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. Lett Appl Microbiol. 2001; 33: 392–396.

Devriese L, Pot B, Van Damme L, Kersters K, Haesebrouck F. Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin. Int J Food Microbiol. 1995; 26:187-197.

Domig KJ, Mayer HK, Kneifel W. Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus* spp. 2. Phenoand genotypic criteria. Inter J of Fod Microbiol. 2003; 88: 165-188.

Facklam RR, Sahm DF. *Enterococcus*. *In* : PR Murray, EJ Baron, MA Pfaller, FC Tenover, RH Yolken. Manual of Clinical Microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington DC, 1995, p. 308-323.

Giraffa. Enterococcal bacteriocins: their potential as anti Listeria factors in dairy technology. Food Microbiol. 1995; 12: 291–299.

NCCLS Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard 1999; M31-A, 19 (11) Resplaces M31-T, 17 (11).

Famiglietti A, Quinteros M, Predari S, Corso A, Lopardo H, Casella J, Bantar C, Couto E, Galas M, Soloaga R. Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en cocos grampositivos. Rev Arg de Microbiol. 2003; 35: 29-40.

Manafi M. Fluorogenic and chromogenic enzyme substrates in culture media and identification tests. Int J Food Microbiol. 1996; 31: 45–58.

Manero A, Blanch AR. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. Appl Environ Microbiol. 1999; 65: 4425–4430.

Shepard BD, Gilmore MS. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. Microbes Infect. 2002; 4: 215–224.

Capítulo 22

ESTAFILOCOCOS

Elida Gentilini

INTRODUCCION

Los estafilococos son cocos esféricos, grampositivos, generalmente dispuestos en forma irregular como racimos de uvas. Son catalasa positivos, inmóviles, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos. Fermentan carbohidratos y producen pigmentos que varían desde el color blanco hasta el amarillo o dorado. Actualmente, el género *Staphylococcus* consta de 32 especies y 15 subespecies. Algunos estafilococos forman parte de la microbiota normal de la piel y las mucosas de los mamíferos y las aves; otros están asociados con procesos supurativos, infecciones óseas, genitourinarias, de piel, de tejidos blandos y oportunistas, septicemias e intoxicaciones alimentarias.

HISTORIA

En 1880, Louis Pasteur, a partir de un cultivo en caldo del pus de un furúnculo y de una osteomielitis, describió pequeños puntos reunidos en parejas de dos granos o asociados en pequeños cúmulos. Un año más tarde, Ogston demostró que esa morfología estaba siempre presente en el pus de los abscesos agudos y crónicos, y le dio el nombre de *Staphylococcus* (del griego, *spraphylé*, en racimo de uvas) en razón de su aspecto microscópico.

A partir de 1884, Rosenbach hace un estudio detallado de estas bacterias y describe las variedades de pigmentación dorada y blanca.

En 1940, después del desarrollo de la penicilina (descubierta en 1929 por Alexander Fleming), parecía que el estafilococo estaba vencido, pero debido a su poder de adaptación o capacidad para desarrollar resistencia, se convierte en una bacteria preocupante en la patología infecciosa actual.

En el año 1957, la 7ª edición del Manual de Determinaciones Bacteriológicas de Bergey señala la prueba de coagulasa como fundamental para separar a los estafilococos en dos grandes grupos: el de los estafilococos coagulasa positivos (ECP) y los estafilococos coagulasa negativos (ECN).

Las especies de ECP son: *S. aureus, S. intermedius. S. delphini* y *S. schleiferi* subsp. *coagulans*. Una especie es coagulasa variable: *S. hyicus*, y el resto son ECN.

Los estafilococos (a excepción de *S. schleiferi*, aislado, por el momento, sólo en el hombre) están asociados en los animales domésticos con infecciones de la piel, de los tejidos blandos, de los huesos, el tracto urinario, y con infecciones oportunistas.

Los ECN adquieren cada vez mayor importancia, por su capacidad de desarrollar resistencia a los antimicrobianos de uso convencional en la clínica veterinaria.

HABITAT

Son comensales de la piel y las mucosas, en especial digestivas y rinofaringe. Es el microorganismo más extendido que existe y su difusión en la naturaleza es extraordinaria.

MORFOLOGIA

Los estafilococos son células esféricas, con un diámetro de 0,5-1,5 µm y grampositivos. En las tinciones directas de las muestras clínicas, se encuentran aislados, en pares o formando pequeñas cadenas. Cuando provienen de un cultivo en agar nutritivo, los cocos se disponen en agrupaciones que recuerdan un racimo de uvas. No forman esporas. No presentan flagelos y algunas cepas presentan una capa de polisacáridos extracelulares. Esta capa se encuentra ocasionalmente en los estafilococos cultivados in vitro, aunque se presume que in vivo se halla con frecuencia.

CARACTERISTICAS DE CULTIVO

El género no presenta exigencias nutritivas. En medio líquido, luego de 24 horas de incubación a 37 °C, se desarrollan produciendo turbidez homogénea con abundante depósito en el fondo del tubo y a menudo aparece un crecimiento en forma de anillo en la superficie del medio que se adhiere a las paredes del tubo. En medios sólidos, forman colonias redondas de 1 a 2 mm de diámetro, de contornos netos y superficie lisa, opaca o mucoide.

Según las especies, las colonias pueden ser de color blanco, y al tomar contacto con el aire o la luz, pueden ser pigmentadas. *S. aureus* produce colonias doradas, debido a pigmentos carotenoides que se forman durante su crecimiento, de ahí el nombre de la especie. Estos pigmentos no se difunden al medio, y en medios líquidos y en anaerobiosis no se producen.

Existen medios selectivos diferenciales para el cultivo, como el de Chapman, con NaCl al 7,5%, manitol y rojo fenol como indicador de pH, o el medio Baird-Parker, con emulsión de yema de huevo y telurito de potasio, utilizado para el aislamiento de estafilococos, a partir de alimentos. En este último medio, las colonias de *S. aureus* aparecen negras, brillantes y convexas, rodeadas de un halo claro.

En medios de cultivo con sangre ovina, equina o humana (agar cerebro corazón con el agregado del 5% de sangre desfibrinada), muchos estafilococos son hemolíticos, y producen una zona de hemólisis alrededor de las colonias.

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS

Los estafilococos son catalasa positivos. Utilizan los hidratos de carbono tanto por oxidación como por fermentación. La temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C y el pH óptimo es de 7 a 7,5.

Respiración

Son aerobios o anaerobios facultativos.

PRINCIPALES CARACTERISTICAS DE LOS ESTAFILOCOCOS

S. aureus es la especie que más se ha estudiado. Los ECN han sido objeto de estudio en la última década, tanto en medicina humana como en medicina animal.

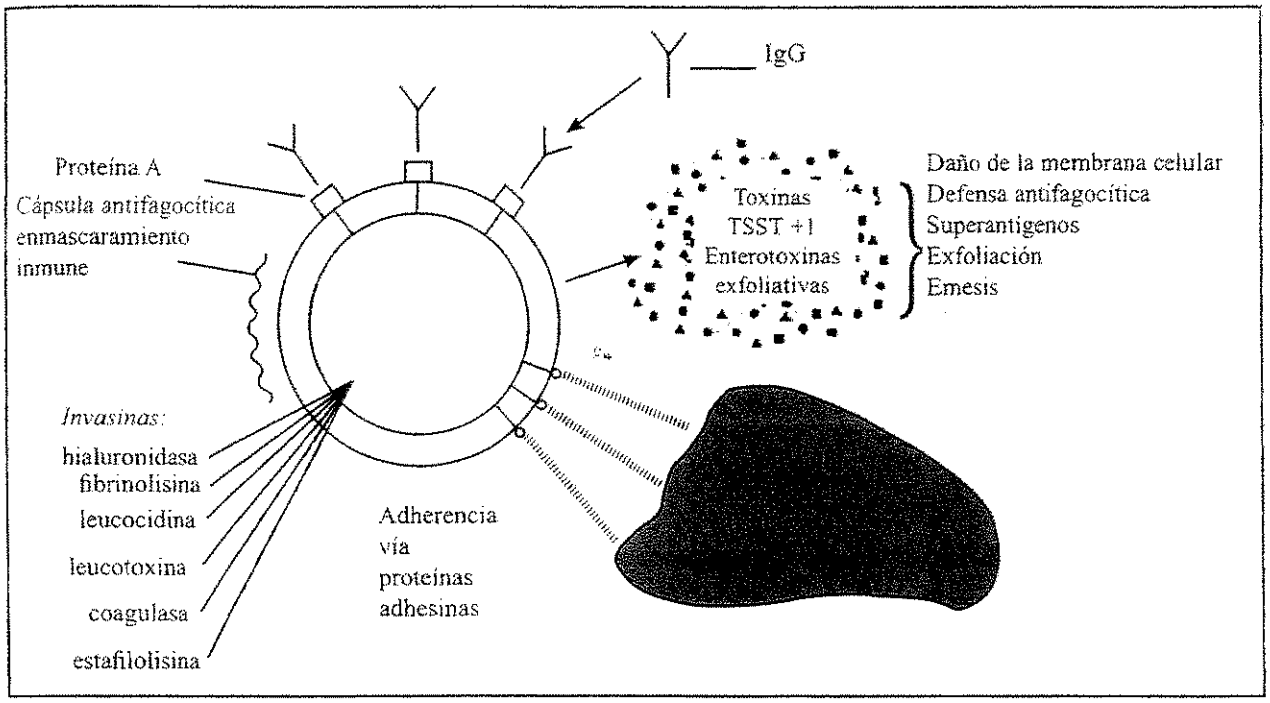


Figura 22-1. *Staphylococcus:* productos celulares relacionados con la patogenicidad.

Cápsula

La cápsula está constituida por polisacáridos unidos laxamente a la pared celular. Se han identificado 11 serotipos capsulares en *S. aureus*. En la Argentina, la mayor parte de los aislamientos responsables de mastitis bovina se asocian con los serotipos 5 y 8. La cápsula protege a las bacterias de la fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares, también facilita que se unan a los catéteres, sondas, prótesis u otro material sintético. Esta propiedad, en los ECN, es indicador de patogenicidad.

Pared celular

El peptidoglucano de la pared celular es importante en la patogenia de la infección. Estimula la producción de interleuquina-1 (que actúa como pirógeno endógeno), de anticuerpos opsónicos en los monocitos, la agregación de los leucocitos polimorfonucleares (responsable de la formación de abscesos), posee actividad parecida a las endotoxinas, y activa al complemento.

La pared celular presenta proteínas de superficie y polisacáridos.

Coagulasa y proteínas de superficie

La superficie externa contiene una proteína denominada factor de agregación o coagulasa de unión, presente tanto en *S. aureus* como en *S. hyicus*. Esta proteína se une al fibrinógeno por una reacción no enzimática y lo convierte en fibrina insoluble, haciendo que los estafilococos se agreguen o formen grupos. La detección in vitro da una reacción parecida a la aglutinación y permite evidenciar el *cumpling factor*. Se realiza en un portaobjetos, mezclando una gota de una suspensión densa de un cultivo de estafilococos con una gota de plasma de conejo.

Existen otras proteínas de superficie relacionadas con la adherencia a los tejidos del hospedador: las proteínas de unión al colágeno, a la elastina y a la fibronectina.

Proteína A

La superficie de muchas cepas patógenas de *S. aureus* está cubierta de manera uniforme con la proteína A. Esta proteína, al combinarse con el fragmento Fc de las moléculas IgG (excepto IgG3), produce agregación de cocos (impide la eliminación inmune mediada por anticuerpos) y es capaz de activar el complemento. Cada molécula de proteína A tiene cuatros sitios de unión al Fc.

La proteína A puede actuar como factor de colonización al adherirse a proteínas involucradas en el proceso de hemostasis.

Acidos teicoicos

Los polisacáridos más importantes son los ácidos teicoicos ligados al peptidoglucano. Su fracción alcohólica es el ribitol en *S. aureus* y el glicerol en *S. epidermidis* y en *S. intermedius*.

Los ácidos teicoicos, por sus uniones específicas a la fibronectina, median en la colonización de los estafilococos a las superficies mucosas del hospedador.

Cuando los ácidos teicoicos están unidos al peptidoglucano poseen actividad inmunogénica.

PRODUCTOS CELULARES RELACIONADOS CON LA PATOGENICIDAD

S. aureus excreta varias proteínas con actividad biológica como enzimas y toxinas.

Enzimas

Coagulasa

Se considera que la presencia de coagulasa es indicador de patógeno potencialmente invasor.

La coagulasa soluble o libre es una proteína similar a una enzima que coagula el plasma oxalatado o citratado del hombre o el conejo, por activación de una sustancia parecida a la protrombina (una globulina, factor de reacción con la coagulasa).

La coagulasa puede depositar fibrina sobre la superficie de los estafilococos, alterando la capacidad fagocítica de los macrófagos o su destrucción en el interior de éstos.

La determinación de la coagulasa libre se realiza colocando en un tubo de hemólisis 0,5 ml de un cultivo de 24 horas en cal-

do, de estafilococos y 0,5 ml de plasma citratado de conejo. La mezcla se incuba a 37 °C. Si la cepa es productora, el medio se coagula en algunos minutos o en horas. La lectura de la prueba se realiza a las 4 y a las 24 horas.

Catalasa

Los estafilococos producen catalasa, la cual convierte el peróxido de hidrógeno tóxico en agua y oxígeno. El peróxido se puede acumular durante el metabolismo de la bacteria o después de la fagocitosis.

Hialuronidasa

La hialuronidasa hidroliza el ácido hialurónico (mucopolisacárido presente en la sustancia intercelular del tejido conectivo) facilitando la diseminación de la infección.

Lipasas

Estas enzimas hidrolizan los lípidos. Su acción incide sobre la supervivencia de los estafilococos, lo cual explica la colonización de estas bacterias en áreas sebáceas de gran actividad.

Nucleasa

El papel en la patogenia de la infección no se conoce con exactitud, pero se considera que la termonucleasa o DNAsa contribuye a la capacidad invasiva de los estafilococos.

Fibrinolisina

También denominada estafiloquinasa, es un activador del plasminógeno, disuelve las redes de fibrina, aumentando la capacidad de invasión del microorganismo.

β-*lactamasas*

Las β-lactamasas son codificadas por plásmidos transmisibles por mecanismos de transducción y probablemente conjugación. Las bacterias productoras de β-lactamasas presentan resistencia frente a antibióticos β-lactámicos (penicilina G, ampicilina, ticarcilina, piperacilina y otros β-lactámicos relacionados).

Supervivencia intracelular

Algunos estafilococos pueden sobrevivir en el interior de los fagocitos; aunque la división es muy lenta, pueden perdurar más tiempo que la célula fagocítica y continuar la multiplicación cuando son liberados.

Exotoxinas

Las exotoxinas producidas por *S. aureus* pueden dividirse en dos grupos: toxinas con actividad sobre membranas y toxinas con actividad de superantígenos.

Hemolisinas

Las hemolisinas, en general, son toxinas con acción nociva sobre las membranas celulares que llevan a la muerte y la lisis de las células. Las hemolisinas tienen actividad de fosfolipasas.

Las toxinas hemolíticas se presentan en forma aislada, en combinación, o no se presentan.

Toxina-alfa

Es la mejor estudiada, actúa sobre una amplia variedad de membranas celulares, como por ejemplo: eritrocitos, leucocitos, plaquetas, fibroblastos y células Hela. Es letal para el conejo cuando se inocula por vía endovenosa y, por vía subcutánea, es dermonecrótica. La toxina-alfa contribuye de manera significativa a la patogenicidad al producir daño en los tejidos después del establecimiento de un foco infeccioso. La mayoría de las cepas humanas y alrededor del 50% de las cepas de origen bovino aisladas de mastitis la producen.

Toxina-beta

Es una esfingomielinasa C que tiene la capacidad para producir la hemólisis caliente-fría, lo cual significa que existe un incremento de la actividad hemolítica si luego de la incubación de los eritrocitos sensibles con la toxina a 37 °C, éstos se enfrían durante un tiempo a 4 °C o a temperatura ambiente. La toxina es una enzima con especificidad de sustrato por la esfingomielina. La degradación de la esfingomielina es la lesión de la membrana que conduce a la hemólisis cuando las células son enfriadas.

La sensibilidad de los eritrocitos a la toxina-beta depende del contenido de esfingomielina. Los más sensibles son los eritrocitos bovinos, ovinos y caprinos.

Toxina-delta

Actúa sobre las membranas biológicas por una acción similar a la de los detergentes. Es una toxina tensioactiva relativamente termoestable. Lesiona eritrocitos, macrófagos, linfocitos, neutrófilos y plaquetas. No tiene especificidad pronunciada para las células de una especie en particular.

Toxina-gamma y leucocidina de Panton Valentine

Son toxinas polipeptídicas formadas por dos componentes. El componente S (proteínas de elución lenta) y el componente F (proteínas de elución rápida), que actúan sinérgicamente para dañar la membrana de las células. La toxina-gamma tiene mayor efecto sobre eritrocitos y la leucocidina sobre neutrófilos y macrófagos.

Toxinas con actividad de superantígenos

Las enterotoxinas, las toxinas exfoliativas y las toxinas del choque tóxico I poseen actividad de superantígenos. Estas toxinas se unen como moléculas enteras al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II y son capaces de inducir la activación inespecífica de los macrófagos y de las células T, con liberación de citoquinas, y aumentar la susceptibilidad a los lipopolisacáridos bacterianos

Enterotoxinas

Raramente las producen cepas de origen animal. Son causantes de intoxicación alimentaria en el hombre. Existen por lo menos seis toxinas solubles (A-E; G-I). Son termoestables y resistentes a la hidrólisis de las enzimas gástricas y duodenales.

Toxinas exfoliativas A y B

Producen la separación intraepidérmica con formación de ampollas y exfoliación posterior. Su acción en los animales no ha sido bien analizada, aunque se la ha descrito en lesiones del estrato granuloso de la epidermis en perros y en las epidermitis exudativas de los lechones.

Toxina-1 del síndrome del choque tóxico

La toxina-1 del síndrome del choque tóxico (TSST-1) anteriormente era conocida como exotoxina pirogénica C y enterotoxina F. Es una toxina termoestable y resistente a la proteólisis.

Casi todas las cepas de *S. aureus* aisladas de mujeres con síndrome del choque tóxico (SST), asociado a la menstruación por el uso de tampones, producen TSST-1.

La enterotoxina B y la C son responsables de la mitad de los casos de SST no asociados a la menstruación.

RESISTENCIA

Dentro de las bacterias no esporuladas, son los más resistentes. Soportan la desecación, sobre todo en los exudados durante semanas; se mantienen vivos a -30 °C en medios líquidos y a 60 °C, durante 30 minutos; también toleran las fluctuaciones de pH entre 4 y 9, y las concentraciones de sal del 7,5%, que se utilizan en los medios selectivos para su aislamiento.

Los estafilococos son inhibidos por sales biliares, colorantes bacteriostáticos, como el cristal violeta, y por desinfectantes, como la clorhexidina.

La resistencia (R) bacteriana frente a los antimicrobianos existe tanto en los ECP como en los ECN, aunque pueden presentar sensibilidad frente a β-lactámicos, aminoglucósidos, rifampicina, lincosamidas y macrólidos.

La resistencia a penicilina es universal y puede darse por la producción de β-lactamasas, o por alteración de las proteínas ligando de penicilinas. La resistencia frente a oxacilina se denomina meticilinorresistencia (MR). La presencia de MR está generalmente acompañada de resistencia frente a gentamicina, eritromicina, cloranfenicol y tetraciclinas. Esta multirresistencia a los antibióticos constituye un serio problema para la salud pública, por la falta de alternativas terapéuticas.

S. aureus es responsable de infecciones intrahospitalarias.

En la Argentina, Gentilini y col., en el año 2000, informaron el aislamiento de *S. carnosus* meticilinorresistente, a partir de leche proveniente de una mastitis bovina, pero hasta el momento no existe información de *S. aureus* MR. Sin embargo, a partir de piodermias y otitis de perros, se han aislado cepas de *S. aureus* y ECN MR.

ESTAFILOCOCOS COAGULASA NEGATIVOS

La identificación de los ECN, según Kloos y Schleifer, se realiza por las pruebas de oxidasa, sensibilidad frente a novobiocina, detección de la enzima β-galactosidasa y determinaciones como utilización de azúcares, ureasa, fosfatasa alcalina, entre otras.

Algunas cepas de ECN producen *slime* o polisacárido extracelular, unido laxamente a las células. Esta sustancia tiene capacidad de adherencia, la cual facilita la colonización y su diseminación en el hospedador. Toda cepa productora de *slime* es adherente, pero no toda cepa adherente es productora de *slime*.

Algunas cepas de ECN pueden poseer el operón *ica* que codifica para la producción del polisacárido intercelular adhesina (PIA), responsable de la formación de biofilm. Este actúa como barrera mecánica, impidiendo la llegada de los antibióticos a los microorganismos y la fagocitosis.

CLASIFICACION SEROLOGICA, BACTERIOFAGICA O LISOTIPO

Los estafilococos pueden tipificarse por los antígenos presentes en su pared celular y capsular. También presentan bacteriófagos que sirven para tipificarlos por su sensibilidad a ser lisados. Este método de tipificación se utiliza para cepas de *S. aureus* de origen humano, bovino y aviar.

Estas clasificaciones se practican sólo en laboratorios de referencia para estudios epidemiológicos.

MODO DE INFECCION Y TRANSMISION

Las infecciones pueden ser endógenas o exógenas, por inhalación, por contacto directo o por ingestión. Portadores sanos e infectados actúan como reservorio.

IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LOS ESTAFILOCOCOS EN VETERINARIA

Participan, en general, en los procesos purulentos, como osteomielitis, artritis, abscesos, conjuntivitis, otitis, piómetra, infecciones urinarias, flemones. Son responsables de enfermedades específicas; *S. aureus* es el principal agente etiológico de la mastitis bovina y también de la botriomicosis equina (infección granulomatosa con abscesos fistulosos del cordón espermático).

En perros y en gatos, *S. intermedius* causa diferentes infecciones: abscesos, piodermias, otitis, conjuntivitis, mastitis, e infecta heridas.

S. hyicus produce epidermitis exudativa y poliartritis en cerdos.

En los animales, los ECN están evolucionando en la inducción de producción de patologías y se encuentran involucrados con las mastitis subclínicas de las vaquillonas. Las especies más frecuentes aisladas son: *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. carnosus*, *S. simulans* y *S. xylosus*. En cabras, *S. caprae*, *S. chromogenes* y *S. epidermidis*.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Muestras

Según la patología, las muestras pueden ser: frotis superficiales, pus, sangre, material aspirado de tráquea, líquido cefalorraquídeo, orina, leche.

Pruebas para la caracterización del género

Una vez establecida la morfología, es decir la agrupación celular que presentan microscópicamente los cocos grampositivos desarrollados en medio de cultivo, se determina:

1) La enzima catalasa que separa a los cocos que pueden estar presentes en una muestra clínica (tabla 22-1).
2) Los criterios para diferenciar los géneros positivos a la catalasa (tabla 22-2).

Tabla 22-1. Separación de los cocos en diferentes géneros según la prueba de catalasa

Prueba de catalasa	*Micrococcus*	*Staphylococcus*	*Streptococcus*	*Enterococcus*
	+	+	-	-

Tabla 22-2. Criterios diferenciales entre *Micrococcus* y *Staphylococcus*

Pruebas	*Micrococcus*	*Staphylococcus*
Tétradas	+	-
Fermentación anaeróbica de glucosa	-	+
Crecimiento en agar con furazolidona	+	-
Resistencia a la lisostafina	R	S
Prueba de oxidasa y bencidina	+	-
Acido teicoico	-	+

R: resistente; S: sensible.

Pruebas para la caracterización de las especies

Una vez identificado el género, las especies se caracterizan mediante las pruebas que se describen en la tabla 22-3.

Los criterios básicos para la identificación de los ECN se basan en la incapacidad de producir coagulasa, la morfología de la colonia, la pigmentación, la determinación de resistencia a novobiocina, la prueba de oxidasa, Voges Proskauer, la producción de fosfatasa, ureasa, β-galactosidasa y la producción de ácido a partir de azúcares.

Pruebas serológicas

En infecciones profundas, como las endocarditis estafilocócicas o la neumonía, se pueden detectar anticuerpos antiácido teicoico. Estas pruebas serológicas son de poco valor práctico.

EPIDEMIOLOGIA

Todos los mamíferos poseen ECN en la piel, siendo frecuente la colonización transitoria con *S. aureus* en los pliegues cutáneos húmedos.

Muchas infecciones pueden tener un origen endógeno (heridas, infecciones urinarias, piodermias), otras se transmiten por contacto directo o por fomites (ropas, utensilios, pezoneras contaminadas).

En la mastitis bovina, los estafilococos penetran en la glándula a través del canal del pezón. El manejo adecuado del rodeo lechero (equipo de ordeño que funcione correctamente; desinfección de pezones después de cada ordeño; tratamiento de todos los cuartos mamarios de las vacas al secado; tratamiento durante la lactación basado en la detección de la mastitis clínica tan pronto como sea posible, con un tratamiento adecuado y registro de éstos; descarte de vacas que no responden satisfactoriamente al tratamiento y continúan con manifestaciones repetidas de mastitis clínica; ordeño de las vacas enfermas al final y eliminación de los animales con mastitis crónica) previene la presentación de mastitis.

La supervivencia en el medio ambiente de estos microorganismos favorece la transmisión indirecta.

Tabla 22-3. Criterios diferenciales para identificación de las especies de ECP. Pruebas de estafilococos coagulasa positivos (ECP)

	S. aureus	*S. intermedius*	*S. hyicus*
Coagulasa	+	+	v
Acido de la Manita	+	-	-
Acido de la Maltosa	+	-	-
Acido de la Trehalosa	+	+	+
Voges Proskauer	+	-	-
Proteína A	+	-	+

TRATAMIENTO

Los estafilococos son ubicuos en la piel y en las mucosas, y es frecuente su introducción a través de las soluciones de continuidad de la piel. Una limpieza prolija de la herida con jabón germicida y la aplicación de un antiséptico (solución yodada, hexaclorofenol al 3%) previene la infección.

Los abscesos cerrados y las lesiones supuradas se tratan mediante drenaje y terapéutica antiséptica o antimicrobiana. Si el estafilococo no es productor de β-lactamasa, la penicilina G es el antibiótico de elección, aunque el porcentaje de cepas sensibles es muy bajo.

Las piodermias graves y extensas, así como los procesos profundos como las osteomielitis, requieren un tratamiento sistémico prolongado con penicilinas resistentes a β-lactamasas (meticilina nafcilina, cloxacilina, dicloxacilina, oxacilina), eritromicina, cefalosporinas, tetraciclinas y vancomicina.

Es difícil erradicar los estafilococos patógenos de animales infectados, debido a que presentan la capacidad de desarrollar resistencia a la mayoría de los antimicrobianos. La vancomicina es el antibiótico útil para tratar estafilococos resistentes a oxacilina; no obstante, se han hallado en algunos países ECN resistentes a vancomicina y *S. aureus* con sensibilidad disminuida a dicho antibiótico.

BIBLIOGRAFIA

Gentilini E, Denamiel G, Llorente P, Godaly S, Rebuelto M, De Gregorio O. Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in Argentina. J Dairy Sci. 2000; 83:1224-1227.

Gentilini EG, Denamiel A, Betancor M, Rebuelto M, Rodriguez Fermepin M, de Torres RA. Coagulase-Negative Staphylococci and Mastitis. Antimicrobial Susceptibility of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Bovine Mastitis in Argentina. J Dairy Sci. 2001; 83:1224-1227.

Gentilini E, Denamiel G, Rumi MV, Blanco C, de Torres RA. Evolución de la resistencia de estafilococos coagulasa negativos frente a antimicrobianos de uso habitual en el tratamiento de la mastitis bovina y los mecanismos de resistencia involucrados. InVet 2002; 4(1):69-75.

Mas J, Denamiel G, Bentancor A., Rodríguez Fermepín, M, Gentilini E. Relación de la expresión fenotípica de la meticilino resistencia de un estafilococo coagulasa negativo de origen canino con la presencia del gen *mecA*. InVet. 2000; 2 (2): 7-11.

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Staphylococcus* y microorganismos relacionados. Microbiología Médica. Cap. 22. 198-212. 4ta. Edición. Elsevier. 2003.

Sordelli DO, Buzzola FR, Gómez MI, Steele-Moore L, Berg D, Gentilini E, Catalano M, Reitz AJ, Tollersrud T, Denamiel G, Jeric P, Lee JC. Capsule expression by bovine isolates of *Staphylococcus aureus* Argentina: genetic and epidemiologic analyses. J Clin Microbiol. 2000; 38 (2): 846-50.

Vadillo S, Piriz S, Mateos E. Género *Staphylococcus*. Manual de Microbiología Veterinaria. Cap. 30. p. 431-436. McGraw-Hill-Interamericana. 2002.

Capítulo 23

ENTEROBACTERIAS

Marta Beatriz Tobía,
Florencia Laura Pantozzi

INTRODUCCION

La familia Enterobacteriaceae pertenece al orden XIII Enterobacteriales. Según la segunda edición 2001 del Manual Bergey de Bacteriología Sistemática, está formada por 41 géneros y más de 100 especies. Muchos de los géneros y especies recientemente reconocidos no tienen importancia clínica para el hombre y los animales.

Hasta hace algunos años, los géneros y las especies eran definidos por análisis bioquímicos y antigénicos. Actualmente se utilizan técnicas de hibridación y de secuenciación de ácidos nucleicos debido a que definen con mayor exactitud la relación de los organismos dentro de la familia.

DESCRIPCION DE LA FAMILIA

La mayoría de los organismos de la familia Enterobacteriaceae comparten las siguientes características: son bacilos gramnegativos de 2-4 µm por 0,4-0,6 µm, no forman esporas, son catalasa positivos y oxidasa negativos, son móviles por flagelos perítricos o no móviles, crecen en medios con peptona o extracto de carne sin el agregado de cloruro de sodio ni otros suplementos, se desarrollan bien en agar Mac Conkey, crecen en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, fermentan la D-glucosa a menudo con producción de gas, reducen los nitratos a nitritos y poseen un contenido de DNA del 39 al 59% de guanina más citosina (G+C). Algunos poseen cápsula.

La temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C, aunque se desarrollan entre 20 y 40 °C.

El tiempo de división varía entre 20 y 40 minutos.

Sobre agar, las colonias son lisas y regulares, y miden aproximadamente 2 mm de diámetro, excepto aquellas de *Yersinia*, que son más pequeñas; *Proteus*, que tiene tendencia a invadir el agar y a formar un tapiz uniforme (*swarming*), y *Klebsiella*, que forma colonias mucosas y de mayor tamaño. En medio líquido, las enterobacterias producen un enturbiamiento uniforme del caldo.

Las propiedades que definen a la familia deben ponerse en evidencia para afirmar que la cepa es una enterobacteria. A partir de ahí se realiza la identificación, fundamentalmente por las características bioquímicas, para estudiar el metabolismo proteico (presencia de ureasa, producción de indol, degradación del triptofano), el metabolismo glucídico (fermentación de azúcares: glucosa, lactosa, sacarosa, etc.), la capacidad de utilizar el citrato como única fuente de carbono, la producción de acetilmetilcarbinol como producto de la degradación de azúcares, la presencia de enzimas decarboxilasas y desaminasas, y la producción de hidrógeno sulfurado, entre las características más importantes.

PARED CELULAR DE LAS ENTEROBACTERIAS

Las enterobacterias son bacilos gramnegativos y como tales poseen una pared celular típica de las bacterias gramnegativas. Dicha pared está constituida desde el exterior al interior: de una membrana externa, de una capa delgada de peptidoglucano y de un espacio periplásmico que recubre la membrana citoplasmática.

La **membrana externa** protege a las enterobacterias de la acción de las sales biliares y de los fermentos digestivos. Está constituida por una doble capa lipídica, dentro de la que se encuentran moléculas de lipopolisacárido (LPS), que comprende tres partes:

- Lípido A, que constituye la endotoxina;
- Core central, formado por el polisacárido de base que constituye el antígeno R;
- Poliosidas de las cadenas laterales, que constituyen los antígenos O.

También se encuentran proteínas; entre ellas, las porinas (*Omp*), que forman canales en la membrana externa para el pasaje de moléculas hidrófilas.

El **peptidoglucano** constituye una capa rígida compuesta por cadenas lineales de poliosidas unidas entre sí por péptidos. El ensamblaje y la remodelación de la pared celular depende de enzimas transpeptidasas y carboxipeptidasas que también intervienen en la unión de las antibióticos β-lactámicos a la pared, permitiéndoles su acción.

En el **espacio periplásmico** se acumulan enzimas que degradan las sustancias necesarias para el metabolismo bacteriano.

La **membrana citoplasmática** está constituida, como todas las membranas celulares, por una doble capa fosfolipídica hidrófoba y proteínas denominadas permeasas que se ocupan de la permeabilidad selectiva.

CARACTERISTICAS ANTIGENICAS

Las enterobacterias poseen diferentes antígenos:

- Antígeno común, denominado ECA (*Enterobacterial Common Antigen*) o antígeno de Kunin. Sólo existe en las bacterias de la familia Enterobacteriaceae, de ahí su interés taxonómico.
- Antígenos O o somáticos, que corresponden a los poliosidas fijados sobre los LPS. Son termoestables y resistentes al calor. Las bacterias que poseen antígenos O son aglutinadas por los anticuerpos correspondientes. Permiten la clasificación de las especies en serotipos o serovares, y poseen un gran significado clínico e epidemiológico.
- Antígeno R, que corresponde al polisacárido del core central. La desaparición del antígeno O lo desenmascara y revela las cepas rugosas, autoaglutinables más fácilmente fagocitadas y menos patógenas.
- Antígeno H o flagelar: sólo existe en las cepas móviles. Son proteínas específicas denominadas flagelinas, termolábiles e inactivadas por el alcohol.

Los **antígenos de superficie** que comprenden:

- Antígenos K o capsulares de naturaleza polisacárida. Provocan reacciones de aglutinación suave en presencia de los anticuerpos específicos. En *Salmonella typhi* se denominan antígeno Vi.
- Antígenos de adherencia o adhesinas de naturaleza proteica presentes en pilis y fimbrias.

HABITAT NATURAL

Las enterobacterias están ampliamente distribuidas en plantas, suelo, agua, y en el intestino del hombre y los animales. Algunas especies ocupan nichos ecológicos muy limitados, como *Salmonella typhi*, que causa la fiebre tifoidea y sólo se halla en humanos. A partir del tubo digestivo, las enterobacterias son excretadas al medio exterior donde sobreviven y proliferan. De la presencia de enterobacterias depende la calidad sanitaria del agua o de un producto alimenticio; la ausencia de estas bacterias garantiza la ausencia de patógenos.

SIGNIFICADO CLINICO

Cepas de Enterobacteriaceae están asociadas a abscesos, neumonía, meningitis, septicemia, y en infecciones de heridas, tracto urinario e intestino, como productores de diarrea. También están implicadas en procesos infecciosos de plantas e insectos.

CLASIFICACION

Orden XIII. Enterobacteriales

Familia I. Enterobacteriaceae

Género I. *Enterobacter*
Género II. *Alterococcus*
Género III. *Arsenophonus*
Género IV. *Brenneria*
Género V. *Buchnera*
Género VI. *Budvicia*
Género VII. *Buttiauxella*
Género VIII. *Calymmatobacterium*
Género IX. *Cedecea*
Género X. *Citrobacter*
Género XI. *Edwardsiella*
Género XII. *Erwinia*
Género XIII. *Escherichia*
Género XIV. *Ewingella*
Género XV. *Hafnia*
Género XVI. *Klebsiella*
Género XVII. *Kluyvera*
Género XVIII. *Leclercia*
Género XIX. *Leminorella*
Género XX. *Moellerella*
Género XXI. *Morganella*
Género XXII. *Obesumbacterium*
Género XXIII. *Pantoea*
Género XXIV. *Pectobacterium*
Género XXV. *Photorhabdus*
Género XXVI. *Plesiomonas*
Género XXVII. *Pragia*
Género XXVIII. *Proteus*
Género XXIX. *Providencia*
Género XXX. *Rahnella*
Género XXXI. *Saccharobacter*
Género XXXII. *Salmonella*
Género XXXIII. *Serratia*
Género XXXIV. *Shigella*
Género XXXV. *Sodalis*
Género XXXVI. *Tatumella*
Género XXXVII. *Trabulsiella*
Género XXXVIII. *Wigglesworthia*
Género XXXIX. *Xenorhabdus*
Género XL. *Yersinia*
Género XLI. *Yokenella*

BIBLIOGRAFIA

Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology. 2nd edition. Volume 2 The Proteobacteria. George M. Garrity, Editor in chief. Springer-Verlag, New York. 2001.

Manual of Clinical Microbiology. 6th edition. Patrick R.Murray, Ellen Jo Baron, Michael A. Pfaller, Fred C. Tenover, Robert H.Yolken. ASM Press. Washington, D.C. 1995.

Capítulo 24

ESCHERICHIA

Alberto Ernesto Parma

INTRODUCCION

Escherichia coli es conocida como habitante saprófito del intestino. Sin embargo, otros serotipos se identifican como un frecuente agente causal de diarrea en animales neonatos, adultos y en el hombre. Las diferentes cepas aisladas de estos procesos se clasifican en patotipos: **enteropatogénicas (EPEC), enteroinvasivas (EIEC), enterotoxigénicas (ETEC), enteroagregativas (EAEC) y verotoxigénicas (VTEC)**, dependiendo de los factores de virulencia que poseen. Aquellas VTEC que han sido causal de colitis hemorrágica o síndrome urémico hemolítico en el hombre se designan **enterohemorrágicas (EHEC)**, siendo entonces este patotipo una subclase de VTEC (tabla 24-1). A pesar de esta distinción, las distintas categorías presentan coincidencias: todas interactúan con la mucosa intestinal, producen enterotoxinas o citotoxinas, y pertenecen a ciertos serotipos O:H.

Clínicamente, la infección puede cursar con grandes pérdidas de agua y electrólitos, colitis hemorrágica, desaparición de las vellosidades de la mucosa intestinal y complicaciones clínicas diversas en vasos sanguíneos mesentéricos, absorción deficiente de alimentos, desnutrición, pérdida de peso y muerte en los casos sin tratamiento. Aunque con menor frecuencia, puede causar infecciones extraentéricas, particularmente en vías urinarias. Anualmente, este agente infeccioso causa importantes pérdidas en la economía rural.

EPIDEMIOLOGIA

Escherichia coli puede hallarse en todo el planeta, aun en el sector antártico. No obstante, la situación geográfica, temperatura y humedad ambiente son factores que determinan su incidencia. En Argentina se distribuye en todo el territorio, abarcando las más variadas especies animales. La prevalencia es mayor en zonas húmedas y cálidas, condiciones que prolongan la sobrevida del microorganismo en el medio ambiente. El suelo y el agua suelen ser las fuentes de infección, contaminados por las eyecciones de los animales diarreicos.

Desde las fuentes, el microorganismo es transmitido al animal por la vía digestiva, a través de la bebida y los alimentos.

La mortalidad es baja si se administra una rápida y oportuna terapéutica, pero puede aniquilar un criadero en pocos días si no se toman medidas a tiempo. El hacinamiento, la falta de higiene, el inadecuado manejo de las guacheras en los rodeos de tambo, son causas de mermas importantes en un establecimiento.

Como es de esperar, los ejemplares más susceptibles resultan ser los neonatos, particularmente si no han recibido adecuada inmunoprotección materna. Por esa razón, la prevalencia es mayor entre los terneros nacidos de madres que no han sido expuestas anteriormente a cepas patógenas de *E. coli* o vacunadas. Su existencia en un rodeo de animales inmunológicamente desprotegidos, crea focos de multiplicación y diseminación de las cepas patogénicas.

CLASIFICACION

De acuerdo con la novena edición del Manual Bergey de Bacteriología sistemática, *Escherichia coli* pertenece al orden de las Eubacteriales, familia Enterobacteriaceae, tribu Escherichieae, género *Escherichia*, especie *coli*.

Junto a otros bacilos gramnegativos, esta bacteria es descrita en la sección quinta, volumen 1 del manual referido.

MORFOLOGIA Y CARACTERISTICAS GENERALES

Escherichia coli se presenta como bacilos rectos, gramnegativos, que miden entre 1 y 1,5 µm x 2 y 6 µm, según las condiciones, y pueden aparecer aislados o en pares.

Entre los elementos constitutivos de su estructura, además de la **pared bacteriana**, se destacan los **pili o fimbrias, la cápsula**, los **flagelos** perítricos y la **membrana externa** (fig. 24-1). Sin embargo, sólo algunas cepas presentan cápsula. Existen cepas sin movilidad y, por consiguiente, sin flagelos. No se han descrito formas esporuladas en *E. coli*.

La cápsula está constituida por polisacáridos que, de acuerdo con variaciones cuali y cuantitativas en los monosacáridos que los componen, originan una amplia gama de **antígenos "K"**.

El **antígeno somático "O"** está determinado por la naturaleza de los azúcares de las cadenas laterales del lipopolisacárido (LPS) que conforma la membrana externa (*"outer envelope"*) de la bacteria. Algunos cambios en la longitud de esas cadenas laterales en

Tabla 24-1. Patotipos de *E. coli*

Tipo	Subtipo
Enteropatogénicas (EPEC)	
Enteroinvasivas (EIEC)	
Enterotoxigénicas (ETEC)	
Enteroagregativas (EAEC)	
Verotoxigénicas (VTEC)	Enterohemorrágicas (EHEC)*

* Causa de colitis hemorrágica o síndrome urémico hemolítico.

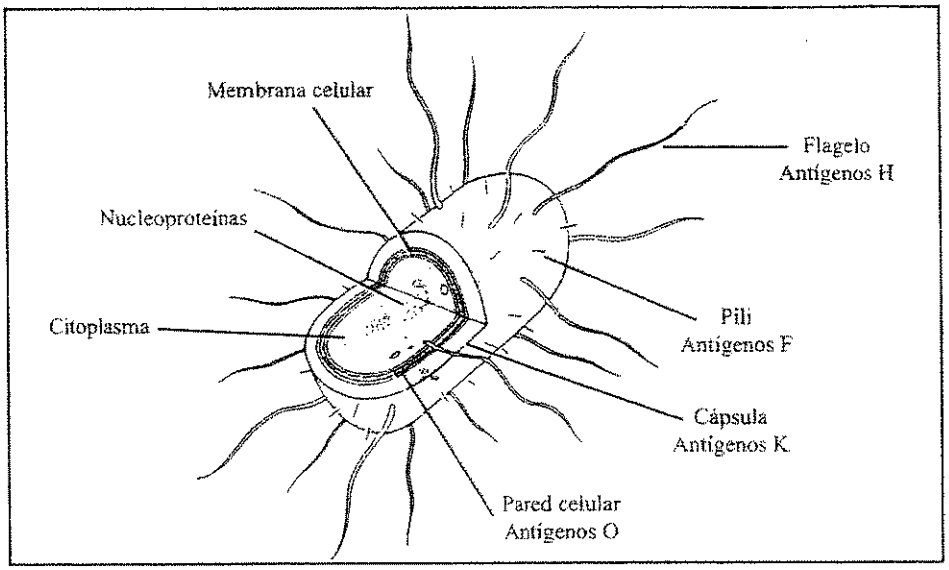


Figura 24-1. Elementos constitutivos de *E.coli.* (Tomado de Tizard, Inmunología veterinaria.)

el LPS determinan si la cepa es lisa (**S**: "smooth") o rugosa (**R**: "rough"). En las cepas R, las cadenas laterales del LPS son inexistentes o muy cortas. Ello determina el aspecto de las colonias en medios sólidos; las lisas son brillantes y húmedas, mientras que las rugosas se presentan como secas y opacas. En los cultivos en medio líquido, esa diferencia se manifiesta como un desarrollo turbio uniforme o en grumos (autoagregación), respectivamente.

Las cepas móviles poseen también un grupo de antígenos proteicos, constituyentes de los flagelos, designados **antígenos "H"**.

Los **antígenos fimbriales** de *E. coli* son estructuras proteicas montadas sobre las fimbrias de tipo I y II. Las fimbrias de tipo I (**F1**), llamadas adhesinas universales, están ampliamente difundidas entre las distintas cepas de *E. coli*, pero no poseen una variedad antigénica muy grande. Se adhieren a estructuras glucolipídicas localizadas en la superficie de los eritrocitos de distintas especies, produciendo hemaglutinación. Este fenómeno puede ser inhibido mediante la adición de manosa, ya que, en el eritrocito, este azúcar forma parte del sitio de unión. Por este hecho, a la hemaglutinación producida por las fimbrias de tipo I se la designa manosa sensible (**MS**). Por su parte, las fimbrias de tipo II también producen hemaglutinación, y se reconoce como receptor a un ganglósido en la superficie de los eritrocitos.

A diferencia de las fimbrias de tipo I, las de tipo II, o **factores de colonización,** reconocen receptores en la superficie de eritrocitos y células epiteliales intestinales provenientes sólo de determinadas especies. Se dice que son hospedador-específicas. La unión es resistente a la adición de manosa (**MR**).

La expresión de antígenos fimbriales de tipo II es dependiente de la temperatura. Las células de *E. coli* desarrolladas a 37 °C se adhieren al epitelio del intestino delgado, mientras que cuando se desarrollan a 18 °C carecen de esa cualidad. Altos niveles de glucosa y glicina en el medio de cultivo también bloquean la expresión de algunas fimbrias de tipo II.

Por lo expuesto anteriormente, la nomenclatura serotípica de *Escherichia coli* se efectúa mediante una expresión que incluye antígenos somáticos (O), capsulares (K), flagelares (H) y fimbriales (F); por ejemplo: **O101:K82:H2:F41**.

Los antígenos fimbriales, codificados casi exclusivamente en **plásmidos**, son entonces:

F1 (adhesinas universales, sin especificidad de especie animal);

F2 (antígeno de adhesión CF1, específico para intestino humano);

F3 (antes llamado CF2, también específico para enterocitos humanos);

F4 (adhesina antes llamada K88, con especificidad preferentemente para cerdos neonatos);

F5 (antigua adhesina K99, hallada en cepas aisladas de bovinos, porcinos y ovinos);

F6 (antes llamada 987P; adhesina hallada en *E. coli* de cerdos y conejos);

F41 (adhesina preferentemente encontrada en cepas aisladas de bovinos y porcinos);

F165 (presente en cepas aisladas de cerdos);

Por razones históricas, los antígenos fimbriales K88 y K99 habían sido designados con la letra "K", mas no son de origen capsular. Los antígenos capsulares son polisacáridos, mientras que los fimbriales son proteicos.

Las enterotoxinas son producidas por ciertas cepas de *Escherichia coli*, con un alto grado de correlación con la expresión de adhesinas. Ambas enterotoxinas, **LT** y **ST**, están codificadas en plásmidos, junto con los genes que otorgan resistencia a antibióticos. La enterotoxina LT (termolábil) es una proteína constituida por una molécula de la subunidad A (PM 27.500) y cinco moléculas de la subunidad B (PM 11.500). La subunidad B se une a un ganglósido receptor situado sobre la superficie de las células epiteliales del intestino, mientras que la subunidad A actúa como activador de la adenilatociclasa.

Las enterotoxinas termoestables (ST) poseen variantes genéticas definidas como ST1a, ST1b. Son proteínas muy pequeñas y por ende actúan como malos inductores de respuesta inmune. ST1a tiene la propiedad de activar la guanilatociclasa en las células del epitelio intestinal, luego de contactar con un receptor de naturaleza glicoproteica, situado en la superficie de las células epiteliales del intestino.

Otro tipo de toxinas que presentan algunas cepas de *Escherichia coli* son las verotoxinas o "Shiga-like toxins", en sus variantes 1 y 2 (VT1, VT2). Dentro de esta sinonimia, el nombre verotoxina (sostenido por los europeos) se debe al efecto citopatogénico que ejercen sobre células Vero en cultivo, mientras que el de Shiga-like toxin se origina en las semejanzas fisiológicas e inmunológicas con las toxinas de *Shigella dysenteriae* tipo I.

Un elemento adicional de virulencia es el **factor necrotizante citotóxico (CNF)**, caracterizado por los efectos citopatogénicos que desarrolla in vitro en células HeLa y confirmados in vivo en enteritis padecidas por distintas especies animales y por el hombre.

Las células HeLa sufren multinucleación y aumento de tamaño. En animales de experimentación, tales como ratones y pollos, es letal. En conejos, ovinos, bovinos, porcinos, se ha documentado también su acción citopatogénica sobre el epitelio intestinal o luego de la inoculación intradérmica. Este factor es intracelular, se libera al medio de cultivo en presencia de mitomicina o por sonicación de las bacterias. Es codificado en un plásmido (plásmido Vir) y en electroforesis, en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), se separa como una proteína de peso molecular 110 k.

RESPUESTA INMUNE

Una respuesta inmune eficiente contra cualquier microorganismo, deberá estar dirigida hacia los antígenos más adecuados, en el momento justo y en el lugar apropiado, de acuerdo con la patogenia de la enfermedad.

Los anticuerpos producidos contra las adhesinas F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P) y F41 tienen la propiedad de inhibir la adhesión de las cepas que portan esos antígenos fimbriales, y evitar la colonización del intestino en distintas especies. Este efecto ha sido comprobado también in vitro, trabajando con preparados de células epiteliales con bordes en cepillo, pertenecientes a distintas porciones del intestino delgado de terneros neonatos.

Los antígenos mencionados, situados sobre el extremo distal de las fimbrias de tipo II, se unen a gangliósidos receptores en la superficie de las células epiteliales, siendo la galactosa un constituyente del sitio de unión.

En un modelo experimental in vitro, anticuerpos monoclonales contra galactosa bloquearon la adhesión de fimbrias de tipo II de *E. coli* a sus receptores.

Dependiendo de la especie animal, los anticuerpos antiadhesinas que elabora una madre mediante inoculación del antígeno o por infección natural son transferidos a la cría por vía transplacentaria o mediante calostro, según corresponda. Esa inmunidad pasiva mostró ser eficaz para disminuir la morbilidad causada por la colibacilosis en los terneros y lechones neonatos. Se ha demostrado que aun luego de 5 semanas de vida, los terneros de madres inmunizadas 6 y 2 semanas antes de la parición poseen títulos aceptables de anticuerpos antiadhesina F5.

Lechones que recibieron de su madre anticuerpos calostrales anti-F4 respondieron mal a la inoculación de antígeno homólogo dentro del primer mes de vida, como causa de un claro efecto inhibitorio. En cambio, esa respuesta confirió una moderada protección cuando el antígeno se aplicó con posterioridad. Los anticuerpos recibidos del calostro materno pertenecen predominantemente al isotipo IgA en el cerdo y a IgG1 en el bovino.

Por otra parte, la existencia de una inmunidad local contra las toxinas termoestable (ST) y termolábil (LT) es deseable para minimizar los efectos nefastos que ellas ejercen sobre la fisiología del epitelio intestinal, provocando grandes pérdidas de agua y electrólitos. La enterotoxina ST, de bajo peso molecular, es un pobre inmunógeno, aunque mejora como tal al ser unida a proteínas mayores que actúan como vehículo. En cambio, la subunidad B de LT, al ser mejor inmunógeno, ha demostrado conferir una adecuada protección a lechones, con producción de IgA específica, cuando se la suministró oralmente. La inmunización con LT de las madres preñadas confirió protección vía calostral.

Efectos semejantes se han logrado en ovinos, caprinos y aves. Debido a que la enterotoxina LT de *E. coli* y la toxina colérica están inmunológicamente emparentadas, la inmunización de madres gestantes con la toxina inactivada de *V. cholerae* permite que sus crías adquieran inmunoprotección pasiva contra LT de *E. coli*.

Como siempre, la dosis de antígeno, el plan de inmunización, el adyuvante empleado, la vía de inoculación, son factores que han mostrado ser decisivos en la obtención de una buena respuesta.

PATOGENESIS Y ASPECTOS CLINICOS

La superficie de las mucosas de los animales provee un apetecible medio para la adherencia de una amplia variedad de microorganismos. Apenas después del nacimiento, las mucosas del tracto respiratorio superior, el tracto intestinal y el tracto genital más bajo van siendo colonizadas por distintos microorganismos no patógenos contenidos en el aire inspirado, los alimentos ingeridos y las excreciones fecales, respectivamente. Estos microorganismos constituyen la llamada "microbiota normal". Otras mucosas, tales como la del tracto respiratorio bajo, el biliar y el tracto urinario alto, son normalmente estériles en condiciones de salud. Todas estas mucosas poseen barreras naturales que impiden la adhesión de microorganismos patógenos. Sin embargo, cuando esas barreras son vencidas, la microbiota patógena va ganando rápidamente las mucosas estériles o los sitios antes ocupados por los microorganismos normales. La patogénesis de las enfermedades infecciosas bacterianas implica distintas interacciones entre el microorganismo y el hospedador. Entre los factores de virulencia de *E. coli* figuran los accesorios de adhesión a la mucosa y una serie de toxinas que van destruyendo las capas más superficiales o más profundas del tejido, y pueden llegar a la septicemia.

El primer paso para desarrollar la patogénesis es la adherencia. La capacidad de una célula de *E. coli* para adherirse a los gangliósidos receptores de las microvellosidades del epitelio intestinal está vinculada a su propiedad de expresar estructuras proteicas de adhesión (adhesinas) sobre las fimbrias. Obviamente, las distintas adhesinas de *E. coli* (F1, F2, F3, F4, F5, F6, F41, F165) reconocerán a sus correspondientes receptores gangliosídicos. Aquellas cepas que no expresen adhesinas no serán capaces de permanecer sobre el epitelio urinario, respiratorio o intestinal, arrastradas por el flujo de líquido. Esta complementariedad adhesina/receptor explica el tropismo por distintos tejidos. Si *E. coli* F4$^+$ se adhiere al intestino de los lechones, es porque ahí encuentra receptores específicos. La misma explicación es válida para cepas que expresan F5 y se adhieren al intestino del ternero. Tales adhesinas se expresan sólo a 37 °C, como señal de que las bacterias se hallan en un animal de sangre caliente.

Mecanismos de defensa del hospedador, tales como la secreción de un mucus con sustancias semejantes a los receptores para adhesinas o la descamación de la mucosa que había sido colonizada por bacterias adherentes, tienden a limpiar la superficie del intestino.

Movimientos ciliares del epitelio respiratorio o corrientes líquidas en el tracto urinario constituyen otro mecanismo defensivo para eliminar microorganismos que no están firmemente adheridos. IgA o IgG_1 inmunes, según la especie y la edad del animal, previenen la adherencia de bacterias a sus receptores.

Se ha descrito un tipo de fimbrias llamadas "p", con la propiedad de adherirse a receptores del epitelio del tracto urinario del humano.

En lo referente al mecanismo de acción de las enterotoxinas, la toxina LT necesita de sus subunidades A y B. Las subunidades B se unen al ganglósido receptor de la mucosa del intestino

delgado, posibilitando la internalización de la subunidad A. Esta incita la activación de la adenilatociclasa, con lo cual se elevan los niveles citoplasmáticos de AMP cíclico. Esto se traduce en la pérdida de iones Na^+, Cl^- y agua.

La toxina ST existe en dos variantes: STa y STb. La primera es hallada en *E. coli* aisladas de lechones y terneros neonatos; actúa sobre el íleon activando la guanilato ciclasa. Los niveles elevados de GMP cíclico interfieren con la bomba iónica, y esto se traduce en pérdida de Na^+, HCO_3^{2-} y disminución de la absorción de Cl^-. La STb se ha hallado en cepas aisladas de diarrea de lechones posdestete, sin que hubiera ejercido acción alguna sobre los niveles de nucleótidos cíclicos. En el animal neonato, estos efectos pueden evitarse mediante una buena transferencia de inmunidad maternofilial. Por el contrario, la situación clínica empeora si las cepas involucradas de *E. coli* son portadoras de adhesinas específicas de la especie hospedadora.

Si bien existen semejanzas entre la patogénesis en distintas especies animales, se observan algunos matices distintivos ligados a los sistemas de cría (intensiva o extensiva) y a la edad del animal (neonato, lactante o posdestete). El porcentaje de mortalidad de la diarrea colibacilar del cerdo neonato es muy alto, y puede afectar a casi la totalidad de la cría. La colonización y la invasión del intestino provocan un adelgazamiento apreciable de la pared, con pérdida de las microvellosidades. La muerte sobreviene por lo general antes de las 24 horas de vida. El aspecto de las deposiciones se corresponde con el de la diarrea líquida blanco-amarillenta. En cambio, en posdestete, cuando se somete al animal a un cambio brusco de su alimentación, suelen aislarse cepas distintas, algunas de ellas productoras de verotoxina y también se aislaron serotipos productores de enterotoxinas y verotoxinas (ETEC-VTEC). A pesar de ello, la mortalidad en la diarrea de posdestete suele ser muy inferior a la padecida por el neonato. En ambos casos, la toxina más frecuentemente hallada de aislamientos en porcinos es la LT y en menor escala las STa y STb. Las adhesinas más frecuentes en estas cepas son F4, y en menor abundancia, F5, F6, F41, F165. Escasos serogrupos (O8, O138, O139, O141) productores de VT2e (variante de VT2) están involucrados en la enfermedad del edema del cerdo destetado o del adulto. Tras la colonización del intestino, las toxinas liberadas ganan el torrente sanguíneo y acceden a los distintos órganos. En la pared de los vasos de menor calibre, se va desarrollando degeneración hialina, edema y transvasación de líquido.

En el ternero, la patogenia es semejante, pero la adhesina más hallada es la F5. La enfermedad se desarrolla preferentemente durante la primera semana de vida, en especial en terneros que no han recibido suficiente cantidad de calostro durante su primer día de vida. Es común detectar STa en esas cepas de *E. coli*, actuando por el mecanismo descrito anteriormente. De no mediar tratamiento, los animales mueren por deshidratación y acidosis. Ciertas cepas más invasivas, con factores necrotizantes citotóxicos, hemolisina y verotoxinas, además de actuar como secuestrantes de hierro, pueden producir septicemia e invadir los tejidos. En estos casos suele desarrollarse meningitis, poliartritis y, por lo general, el animal muere. En rodeos de leche, *E. coli* también suele producir mastitis. Luego de adherirse a la epidermis de la mama, comienza la colonización de los conductos. Un notable fenómeno inflamatorio se desencadena por la acción endotóxica del LPS (lipopolisacárido) sobre la glándula mamaria. Aparte del perjuicio en la producción láctica, estos animales pueden seguir con fiebre, leucocitosis, hipoglucemia y muerte. En los ovinos, la patogenia no es muy distinta de la de los bovinos.

En equinos, *E. coli* puede causar aborto, aunque con muy baja frecuencia. En los potrillos, esta bacteria suele presentarse como responsable de un cuadro febril, con debilidad e invasión de órganos y articulaciones, tras lo cual sobreviene la muerte. En equinos no se observa con frecuencia enteritis causadas por *E. coli*. En cambio, en conejos, los episodios de muerte de cría por diarrea intensa causada por *E. coli* son comunes, e involucran especialmente cepas portadoras de adhesina F6.

En aves, *E. coli* invasivas suelen penetrar por vías respiratorias y producir infecciones generalizadas, septicemia y muerte. También pueden originar lesiones granulomatosas en el intestino, el hígado y el pulmón. Otras veces, el agente infeccioso es transportado en el huevo, el cual fue contaminado en la cloaca o en el oviducto. Perros y gatos frecuentemente manifiestan infecciones urinarias causadas por *E. coli*, agravadas por la expresión de toxinas. Son mucho menos probables los casos de septicemia.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Diagnóstico bacteriológico

Recolección de muestras

Por lo común, las muestras a analizar incluyen heces, hisopados con materias fecales, sangre, orina, leche, abscesos, secciones de intestino, hígado, riñón, bazo. En esos casos, *E. coli* puede ser el agente primario o secundario. En el caso de que el transporte de las muestras hasta el laboratorio demande más de 2 horas, es aconsejable transferir el hisopo a un vial con medio de transporte Stuart. De cualquier manera, ya se transporte la muestra para efectuar la bacteriología, ya se trate de un cultivo puro de *E. coli* enviado para estudios serológicos o de caracterización de factores de virulencia, se debe cuidar que el recipiente esté sellado perfectamente para evitar el desecamiento del material.

Siempre debe rotularse el recipiente, indicando el medio de cultivo usado en el transporte, el tipo de muestra, la manera en que se obtuvo, la fecha de obtención y procedencia. Por fuera, la caja que contiene el recipiente perfectamente acondicionado indicará que se transporta material biológico patógeno, facilitando el número telefónico del remitente para ser consultado en caso de rotura o derrame durante el transporte.

Medios de cultivo selectivos

- **Agar Mac Conkey.** Este medio es apropiado para el aislamiento de enterobacterias a partir de materias fecales, orina, alimentos, aguas residuales, etc.

  Modo de acción: las sales biliares y el violeta cristal ejercen una inhibición significativa sobre las bacterias gram-positivas. La lactosa y el indicador rojo neutro permiten comprobar la degradación de ese disacárido. Las colonias lactosa-positivas (*E. coli*) aparecen rojas con halo turbio; las lactosa-negativas son incoloras. *E. coli* es un fermentador de lactosa.
  Condiciones de cultivo: sembrar las placas por estrías e incubar a 37 °C durante 18-24 horas.

- **Agar EMB (eosina-azul de metileno).** Es un medio selectivo para demostrar la presencia de enterobacterias patógenas y propiciar su aislamiento. No es confirmativo y sólo sirve de orientación.

  Modo de acción: los componentes lactosa y sacarosa permiten distinguir entre distintas enterobacterias de acuerdo con su capacidad de fermentarlos y por el aspecto y el color de sus

colonias. Los colorantes empleados inhiben notablemente el desarrollo de gérmenes grampositivos.
Las colonias de *E. coli* aparecen con la luz transmitida con el centro negro azulado y con la luz reflejada son verdosas con brillo metálico. Las transparentes y de color ambarino suelen corresponder a *Salmonella*, *Shigella*, mientras que las de *Enterobacter*, *Klebsiella* y otras enterobacterias aparecen de mayor tamaño, de aspecto mucoso, confluentes, con el centro pardo grisáceo con la luz transmitida.
Condiciones de cultivo: sembrar las placas por estrías e incubar a 37 °C durante 24 horas.

Medios de cultivo para identificación

- **Caldo MR-VP** (Caldo Rojo de metilo según Voges y Proskauer). Este medio de cultivo se emplea para efectuar el ensayo del "Rojo de metilo", y la reacción de "Voges y Proskauer", para procurar la caracterización de enterobacterias.

  Modo de acción: algunas bacterias, como *E. coli*, emplean glucosa con gran producción de ácido, haciendo descender el pH a menos de 4,4 (el indicador Rojo de metilo vira al rojo). Otras originan un descenso menos acentuado del pH (el indicador permanece de color amarillo si el pH no desciende de 5,1). Al degradar la glucosa, algunos microorganismos producen acetilmetilcarbinol, el cual se detecta mediante la reacción de Voges y Proskauer con el reactivo de O'Meara. *E. coli* da reacción negativa.

- **Agua de triptona (o caldo triptonado).** Se emplea para demostrar la producción microbiana de indol a partir de triptofano.

  Modo de acción: la peptona de caseína es rica en triptofano. Los microorganismos que producen indol a partir de ese aminoácido son identificados mediante el reactivo de Kovacs.
  Condiciones de cultivo: el medio se siembra con una colonia pura del microorganismo a identificar; se incuba durante 12 a 24 horas a 37 °C.
  Luego de la incubación, el cultivo se cubre con 0,5 ml del reactivo de Kovacs. Al cabo de pocos minutos, la capa de reactivo se torna rojo-cereza ante la presencia de indol. *E. coli* es productora de indol a partir del triptofano.

- **Agar citrato de Simmons.** Permite identificar microorganismos, especialmente enterobacterias, que pueden desarrollarse empleando como única fuente de carbono al citrato.

  Modo de acción: el empleo del citrato como fuente única de carbono produce alcalinización del medio, con viraje del indicador azul de bromotimol al azul. *E. coli*, al igual que *Shigella* y *Salmonella*, no puede desarrollarse en las condiciones de este medio de cultivo.
  Condiciones de cultivo: sembrar estriado en la superficie del agar inclinado, a partir de una colonia pura. Incubar a 37 °C durante 24 a 48 horas.

Identificación bioquímica de *E. coli*

La muestra se sembrará en los medios selectivos agar EMB y agar Mac Conkey. Las colonias con las características de *E. coli*, según se describiera en el espacio destinado a esos medios de cultivos, serán confirmadas por las pruebas bioquímicas "IMViC", sigla de formación de indol (**I**), prueba del rojo de metilo (**M**), reacción de Voges y Proskauer (**V**) y la utilización de citrato (**C**).

Escherichia coli se diferencia de otras enterobacterias por presentar pruebas bioquímicas IMViC:

Producción de indol	positiva
Viraje del rojo metilo	positiva
Reacción de V y P	negativa
Utilización citrato	negativa

Mantenimiento de cepas por largo tiempo

El mantenimiento de cepas de interés durante períodos prolongados es aconsejable efectuarlo de esta manera: luego de desarrollarlas durante 24 horas a 37 °C en caldo extracto de carne, se adiciona 15-20% de glicerol estéril y se conserva a -80 °C en viales plásticos con tapa a rosca. Si se desea efectuar la conservación sólo durante algunas semanas y no más de 3 meses, es preferible sembrarlas punzando un tubo de agar extracto de carne y luego de incubarlas en las condiciones referidas, mantenerlas a temperatura ambiente en la oscuridad.

SEROLOGIA

Detección de factores de virulencia

Fimbrias de tipo II (adhesinas hospedador-específicas)

Debido a que las elevadas concentraciones de glucosa y glicina en el medio de cultivo actúan como inhibidores de la expresión de algunas de las adhesinas de *E. coli*, es conveniente cultivar este microorganismo en caldo Minca, a partir de una colonia pura. Luego de desarrollarse durante 18 horas a 37 °C, las células son lavadas con 0,15 M NaCl mediante centrifugación y suspendidas al 10% en la misma solución. La determinación de adhesinas se hace entonces mediante aglutinación en placa empleando sueros específicos contra cada una de ellas (F4, F5, F6, F41, F165).

En el caso de enfrentarse con cepas rugosas, que fácilmente se autoaglutinan en medios líquidos, la detección de adhesinas por aglutinación habrá de ser sustituida por un ensayo de dot-blot inmunoperoxidasa o de inmunofluorescencia, donde los anticuerpos estarán marcados con peroxidasa o isotiocianato de fluoresceína, respectivamente.

Enterotoxinas y verotoxinas

Las enterotoxinas ST y LT pueden ser detectadas mediante enzimoinmunoensayos o ensayos biológicos que miden las lesiones producidas en segmentos de intestino de ciertas especies animales. Las verotoxinas se determinan por los efectos citopatogénicos que inducen en células Vero en cultivo.

Nuestra experiencia en este tema nos hace inclinar por los métodos más modernos de la **biología molecular** que, basados en la reacción en cadena de la polimerasa (**PCR**), permiten una detección nítida, específica y altamente sensible de los genes que codifican para estas toxinas.

Resistencia a antibióticos

Puede efectuarse por los métodos clásicos de inhibición del desarrollo de la bacteria en contacto con discos embebidos en diferentes antibióticos (antibiograma).

Serotipificación (O:K:H)

Los antígenos somáticos, capsulares y flagelares permiten efectuar la serotipificación de las cepas aisladas, empleando an-

tisueros monoespecíficos o poliespecíficos elaborados en conejos contra los distintos antígenos O, K y H. La prueba consiste en una aglutinación en placa a partir de un cultivo en caldo nutritivo. Puesto que los antígenos capsulares (K) enmascaran a los somáticos (O), la reacción con los antisueros anti-O se debe efectuar empleando una suspensión caliente de las bacterias, a los fines de inactivar los capsulares y descubrir los somáticos.

La serotipificación de *E. coli* resulta de interés clínico, ya que existe relación entre determinados serotipos O:K:H y patogenicidad. Sin embargo, aunque la mayoría de las toxinas, adhesinas y factores de resistencia a antibióticos son codificados en plásmidos y éstos pueden transferirse de una bacteria a otra en determinadas condiciones, la correlación entre serotipos y patogenicidad no es tan absoluta y puede presentar excepciones.

TRATAMIENTO

Debido a factores vinculados al manejo de los terneros de tambo, que los hace más susceptibles a *E. coli*, el uso indiscriminado de antibióticos trajo aparejada una mayor resistencia, comparada con la observada en cepas aisladas en rodeos de cría. Entre los antibióticos que muestran ser aún efectivos en nuestro medio se incluyen gentamicina, cloranfenicol y combinación de trimetroprima + sulfametoxazol. La restitución de los parámetros normales del medio interno (hidratación, equilibrio electrolítico y ácido-base) es otro de los puntos a tener en cuenta en la recuperación del animal.

PROFILAXIS

Algunas medidas generales deben ser tenidas en cuenta para evitar deterioros en la sanidad del plantel causados por *E. coli*, con las consecuentes pérdidas económicas. Además de todo aquello concerniente a la inmunoprofilaxis, mencionado en secciones anteriores, es importante permitir que la cría de mamíferos reciba la dosis de calostro adecuada, mantener la higiene del entorno y evitar altas densidades poblacionales.

AGRADECIMIENTOS

Deseo manifestar mi reconocimiento al Dr. Marcelo E. Sanz, por su colaboración en la recopilación del material bibliográfico, y a las instituciones que financian la labor científica (Universidad Nacional del Centro, Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, CONICET, Foncyt, Fundación Antorchas), por hacer posible nuestro avance en este tema.

BIBLIOGRAFIA

Abraham S. Beachey E. Host defenses against adhesion of bacteria to mucosal surfaces. In: Advances in host defense mechanisms. Vol.4, Gallin J. and Fauci A (Eds.). Raven Press, New York. 1985.

Carter G, Cole JJR. (Eds.) Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. 5ta. edición. Academic Press, Inc. New York. 1990.

Neidhardt FC. (Ed. In Chief). *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology. 2nd. Ed. ASM Press, Washington DC. 1996.

Parma AE, Sanz ME. *In vitro* inhibition of *Escherichia coli* K99$^-$ adherence to calf intestine receptors by means of anti-adhesin antibodies. Com Biol. 1992; 10:115-124.

Parma AE, Sanz ME, Blanco JE, Blanco J, Viñas MR, Blanco M, Padola NL, Etcheverría AI. Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. Eur J of Epidemiol. 2000; 16:757-762.

Parma AE, Sanz ME, Viñas MR, Cicuta ME, Blanco JE, Boehringer SI, Vena MM, Roibon WR, Benitez MC, Blanco J, Blanco M. Toxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Argentina. Vet Microbiology. 2000; 72:269-276.

Sanz ME, Parma AE. Desarrollo de un ensayo de dot-blot para la detección de adhesinas en *Escherichia* coli enterotoxigénica. Acta Bioq Clin Latin. 1992; 26:295-298.

Sanz ME, Viñas MR, Parma AE. Prevalence of bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* in Argentina. Eur. J. Epidemiology. 1998; 14:399-403.

Tesh V, O'Brien A. Adherence and colonization mechanisms of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (mini-review). Microbial pathogenesis. 1992; 12:245-254.

Timoney J, Gillespie J, Scott F, Barlough J. (Eds.) Hagan and Brunner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals. 8va. edición, Part I, pp. 61-71. Comstock Publishing Associates, Ithaca (USA). 1988.

Capítulo 25

KLEBSIELLA

María del Luján Tunes

CLASIFICACION

La tribu Klebsielleae incluye cuatro géneros clásicos (*Klebsiella, Enterobacter, Hafnia* y *Serratia*), cada uno de los cuales está constituido por varias especies, y muchas de ellas son patógenas oportunistas para el ser humano. El quinto género de reciente aparición (*Pantoea*) ha sido agregado a fin de reclasificar a la especie anteriormente designada como *Enterobacter agglomerans* biotipo XIII y actualmente denominada *Pantoea agglomerans*.

Es importante señalar que dos de las especies integrantes del género, *Klebsiella* y *Enterobacter*, son conocidas como bacterias coliformes.

FACTORES DE VIRULENCIA

Como enterobacterias, la tribu Klebsielleae posee varios antígenos de superficie.

Somático (O): es termoestable; está constituido por un polisacárido y se emplaza en el sector celular. Es el determinante del subgrupo somático de cada bacteria en la mayoría de los géneros entéricos. Con su endotoxina asociada, este antígeno está formado por cadenas oligosacáridas O unidas a un polisacárido nuclear basal, que a su vez se encuentra unido a un lípido A, constituyéndose así el lipopolisacárido final.

Capsular (K): es el que envuelve el soma bacteriano; por lo general se trata de una sustancia termolábil que impide la fagocitosis del microorganismo al interferir la interacción entre la célula fagocítica y la superficie de la bacteria, o encubriendo los componentes superficiales de la célula bacteriana, permitiendo así que esta última continúe con su actividad invasora del organismo. Como la cápsula recubre toda la superficie celular, puede disimular al antígeno somático e impedir la aglutinación celular con antisuero O (como ejemplo pueden citarse los antígenos Vi de *Salmonella* y B de ciertas variedades de *Escherichia coli*).

Ciliar (H): se encuentran limitados a los flagelos bacterianos, son proteicos y termolábiles. En las enterobacterias flageladas, determinan los serotipos dentro de los grupos somáticos.

Estos microorganismos también pueden actuar por medio de enterotoxinas que afectan directamente el intestino delgado y tienen acción letal sobre algunos animales de laboratorio.

Las endotoxinas son típicamente producidas por las bacterias gramnegativas y su componente químico básico es lipopolisacárido (LPS), que también es integrante estructural de la membrana externa de este tipo de microorganismo. Este LPS se halla distribuido en tres capas: la externa, de carbohidrato, que determina la especificidad antigénica O; la capa media, polisacárida, y la capa interna, constituida por una molécula lipídica denominada lípido A. El LPS es responsable de la disminución de la respuesta inflamatoria aguda y, por ende, de permitir a las bacterias la invasión del organismo hospedador más fácilmente.

IDENTIFICACION BIOQUIMICA BASICA

En la tabla 25-1 se mencionan las características bioquímicas de especies de *Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Hafnia* y *Pantoea*.

La acción fermentadora sobre algunos carbohidratos se describe en la tabla 25-2.

TRATAMIENTO

Son frecuentes las grandes variaciones en lo que respecta a la susceptibilidad a fármacos antimicrobianos. Por esta razón es prudente la permanente actualización del clínico con la finalidad de iniciar un tratamiento tentativo mientras se establece la verdadera sensibilidad a aquéllos. Asiduamente suele presentarse resistencia a cefalosporinas y aminoglucósidos, pero hay que reconocer que los antibacterianos de mayor actividad para todos los integrantes de la familia Enterobacteriaceae siguen siendo la amikacina, las penicilinas

Tabla 25-1. Características bioquímicas de especies de *Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Hafnia* y *Pantoea*

Especies	Indol	Movilidad	Lisina decarboxilasa	Arginina decarboxilasa	Ornitina decarboxilasa	DNAsa a 25 °C	Gelatina a 22 °C
Klebsiella oxytoca	+	-	+	-	-	-	-
Klebsiella pneumoniae	-	-	+	-	-	-	-
Enterobacter aerogenes	-	+	+	-	+	-	-
Enterobacter cloacae	-	+	-	+	+	-	-
Serratia liquefaciens	-	+	+	-	+	V	+
Serratia marcescens	-	+	+	-	+	+	+
Hafnia alvei	-	V	+	-	+	-	-
Pantoea agglomerans	V	V	-	-	-	-	-

Tabla 25-2. Acción fermentadora de algunos hidratos de carbono de distintas especies de *Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Hafnia* y *Pantoea*

Especies	Lactosa	Sucrosa	Sorbitol	Adonitol	Arabinosa
Klebsiella oxytoca	+	+	+	+	+
Klebsiella pneumoniae	+	+	+	+	+
Enterobacter aerogenes	+	+	+	+	+
Enterobacter cloacae	+	+	+	V	+
Serratia liquefaciens	-	+	+	-	+
Serratia marcescens	-	+	+	V	-
Hafnia alvei	-	-	-	-	+
Pantoea agglomerans	V	V	V	-	+

de más reciente aparición y algunas cefalosporinas. Definitivamente, la última palabra la tienen las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos realizadas con cada una de las cepas en estudio.

PROFILAXIS

Por tratarse de bacterias de amplísima difusión en el medio ambiente y en muestras clínicas de variados orígenes, es aconsejable realizar el aislamiento de los enfermos, además de implementar la administración de un tratamiento antibiótico adecuado. También es prudente realizar una correcta purificación del agua de bebida, la cocción adecuada de los alimentos de origen vegetal, la higiene sistemática de heridas (tanto de tejidos blandos como de tejidos duros), el mantenimiento de la esterilidad en soluciones parenterales, la asepsia en todo tipo de cateterismo y, finalmente, es imprescindible mantener la esterilidad del material empleado en transfusiones, perfusiones y cateterismo evitando su reutilización.

GENERO KLEBSIELLA

A fines del siglo XIX, tras los estudios que realizara el microbiólogo Edwin Klebs, el microorganismo denominado *Klebsiella*, también conocida como "bacilo de Friedlander", fue centro de la atención y motivo de investigación por ser el causante de neumonía, enfermedad muy grave y frecuentemente mortal.

Pese a que se le atribuyen patologías de tipo humano, bacterias de esta especie han sido aisladas de muestras de diversas infecciones animales, tales como neumonía y supuraciones en caballos, metritis y cervicitis en yeguas, mastitis bovinas, infecciones en heridas, y también en cuadros de septicemia y neumonía caninas.

CLASIFICACION

En este género se agrupan las siguientes especies: *Klebsiella pneumoniae* (bacteria tipo dentro del género), *K. oxytoca*, *K. ozaenae* y *K. rhinoscleromatis*, *K. ornithinolytica*, *K. terrigena* y *K. planticola*.

La mayoría de las integrantes del género presentan una nomenclatura actual que remplaza a la anterior denominación.

Klebsiella pneumoniae subsp. *ozaenae*: era denominada *Klebsiella ozaenae*.
Klebsiella pneumoniae subsp. *pneumoniae*.
Klebsiella pneumoniae subsp. *rhinoscleromatis*: era conocida como *Klebsiella rhinoscleromatis*.
Klebsiella ornithinolytica: se denominaba *Klebsiella* grupo 47.
Klebsiella oxytoca: era conocida como *Klebsiella pneumoniae* indol positivo.
Klebsiella planticola: antiguamente era denominada especie 2 de *Klebsiella* y también *Klebsiella trevisani*.

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS

Son bastones cortos gramnegativos, no esporulados, capsulados e inmóviles.

CARACTERISTICAS CULTURALES

Las klebsielas se desarrollan bien en medios mejorados (agar sangre, ATS) y en medios especiales para enterobacterias, por lo cual se las aísla en agar Mac Conkey, agar Endo, agar EMB, agar Levine, agar XLD (xilosa-lisina-desoxicolato) y agar VRB (cristal violeta, rojo neutro y sales biliares), etc.

La característica más llamativa de los cultivos de *Klebsiella* spp es que en agar sangre, agar Mac Conkey, agar Endo, agar EMB, ATS (agar tripticasa soya) y otros medios de cultivo comunes dan origen a colonias grandes de tipo mucoide muy adherentes, y al ser tocadas con el ansa se extienden con gran facilidad. Este fenómeno se debe a la presencia de una cápsula que rodea el soma bacteriano.

Por su característica bioquímica de metabolizar la lactosa, en medios con el sustrato adecuado (EMB, Mac Conkey) producen las típicas colonias denominadas "ojo de pescado" por poseer un centro oscuro con brillo metálico o rojo (correspondiente a las bacterias lactosa positivas) rodeado de una zona periférica blanquecina, dado que se trata de una colonia extremadamente mucoide. En el caso especial del medio Mac Conkey, las colonias de *Klebsiella* spp aparecen de color rojo y además el pigmento producido se difunde por lo general en el medio de cultivo circundante a la colonia.

Es importante señalar que no todas las colonias de *Klebsiella* spp son mucoides, de manera tal que algunas especies de *Enterobacter* pueden ser confundidas con *Klebsiella* en las pruebas de identificación.

Con respecto al desarrollo en medios líquidos, las bacterias de este género pueden producir un desarrollo de similares características a las mencionadas para las colonias, lo que les otorga resistencia para ser traspasadas por el ansa o la aguja de siembra.

FACTORES DE VIRULENCIA

Antígenos

O somático o de pared celular de tipo polisacárido.

K capsular, también de tipo polisacárido. Este antígeno induce la producción de anticuerpos específicos útiles para el diagnóstico epidemiológico de las infecciones de tipo nosocomial

de *Klebsiella*. En este género permite la subdivisión en serotipos capsulares y se han reconocido unos 75 tipos.

Toxina

Letal para animales de laboratorio como el ratón, el cobayo y el conejo.

Cápsula

Otorga a la bacteria capacidad invasora y antifagocítica.

PODER PATOGENO

El grado de virulencia de *Klebsiella* varía con la especie bacteriana.

Klebsiella pneumoniae subsp. *ozaenae*
Se trata de una cepa bioquímicamente inactiva de *Klebsiella pneumoniae*. Clínicamente es responsable de provocar ocena.

K. pneumoniae subsp. *pneumoniae*
Es una especie comúnmente aislada de muestras clínicas. La patología que produce se caracteriza por la formación de esputos gelatinosos y fétidos. Tiene una gran actividad destructora sobre el tejido pulmonar afectado cuando no ha sido fagocitada, y origina abscesos crónicos y necrosis pulmonar grave.

K. pneumoniae subsp. *rhinoscleromatis*
Esta es otra cepa bioquímicamente inactiva de *Klebsiella pneumoniae*. Clínicamente produce rinoscleroma, proceso de tipo granulomatoso.

K. ornithinolytica
Esta especie puede ser aislada de muestras clínicas tales como sangre, orina, heridas contaminadas y esputo.

Klebsiella oxytoca
Es una especie comúnmente aislada de muestras clínicas.

K. planticola
Es más común aislarla de muestras de agua y de vegetales; el aislamiento a partir de muestras de origen humano es ocasional.

K. terrigena
Puede ser recuperada a partir de muestras de suelo y agua.

NOCIONES DE PATOGENIA

Las bacterias integrantes de este género se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y en el tracto intestinal de los animales y del hombre.

En medicina humana, *K. pneumoniae* puede dar origen a variadas patologías, tales como enteritis infantil, neumonías, meningitis, peritonitis, septicemia, infecciones urinarias de origen intrahospitalario e infecciones de heridas en humanos adultos.

En casos de neumonía, ésta tiende a la destrucción tisular y origina extensas zonas de necrosis y hemorragias, y puede llegar a abscesos pulmonares, hemoptisis y pleuritis en los casos más graves.

En lo concerniente a *K. ozaenae*, es responsable de rinitis atrófica asociada a infección purulenta de las membranas mucosas nasales. También se han descrito abscesos corneales por acción de este microorganismo, que puede recuperarse de sangre, orina y tejidos blandos en general.

Por su parte, *K. rhinoscleromatis* provoca rinoscleroma, enfermedad granulomatosa infecciosa de las membranas mucosas de nariz, orofaringe y senos paranasales.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

El aislamiento y la identificación de las klebsielas se realiza a partir de muestras de orofaringe, aunque en procesos neumónicos se deba recurrir a muestras profundas del tracto respiratorio (por ej., esputo). También pueden investigarse muestras de sangre, orina, heces, heridas contaminadas y LCR, aunque ocasionalmente (y también dependiendo de la especie) las klebsielas pueden ser aisladas a partir de plantas, suelo y agua.

IDENTIFICACION BIOQUIMICA

Todas las especies de *Klebsiella* son inmóviles, fermentadoras de lactosa y, cuando son productoras de ureasa, hidrolizan la urea de forma lenta. Con la prueba del indol se pueden diferenciar las principales especies. La mayoría de las klebsielas no decarboxila la ornitina.

En la tabla 25-3 pueden observarse las características bioquímicas de distintas especies de *Klebsiella*.

IDENTIFICACION SEROLOGICA

En este género han sido identificados más de 70 serotipos capsulares con reacciones cruzadas entre sí. La preparación de los antisueros combinados implica la reunión de tipos serológicos análogos.

Reacción de Neufeld o del Quellung

Esta prueba (también llamada de reacción capsular) permite identificar distintos serotipos de *Klebsiella* con una exactitud mayor que los antisueros aglutinantes.

Tabla 25-3. Características bioquímicas de distintas especies de *Klebsiella*

Especies	Indol	RM	VP	Urea	Lisina	Ornitina	ONPG	Malonato	Crecimiento a 5 °C	10 °C	41 °C
K. ornithinolytica	+	+	+	V	+	+	+	+	+	+	+
K. oxytoca	+	V	+	+	+	-	+	+	-	+	+
K. ozaenae	-	+	-	-	V	-	V	-	-	-	NR
K. planticola	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
K. pneumoniae	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
K. rhinoscleromatis	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	NR
K. terrigena	-	V	+	-	+	V	+	+	+	+	-

NR: dato no registrado.

Los antisueros disponibles para la mayoría de los serotipos capsulares de *Klebsiella* pueden aplicarse para el desarrollo de este procedimiento.

En esta técnica, al contactar el antígeno (cápsula de *Klebsiella*) con el anticuerpo específico se produce una "hinchazón" de la cápsula bacteriana, lo que la hace más notoria a la visualización microscópica. Es factible que el fenómeno se deba más que al edema capsular a la alteración de sus características de refracción provocada por la unión del antígeno (cápsula) con el antisuero específico; esto logra que la cápsula se torne más notoria.

GENERO ENTEROBACTER

Este género fue creado en 1962, año en que fue separado del género *Klebsiella*. Hasta ese entonces muchas de sus cepas eran conocidas como *Aerobacter aerogenes* por su elevada producción de gas en sus procesos metabólicos.

Las cepas de *Enterobacter* están más relacionadas con patologías humanas que veterinarias, aunque suelen ser aisladas de muestras de mastitis.

CLASIFICACION

El género *Enterobacter* está integrado por las siguientes especies: *E. aerogenes*, Complejo *E. agglomerans*, *E. amnigenus* (biogrupos 1 y 2), *E. asburiae*, *E. cancerogenus*, *Enterobacter cloacae* (y especies anónimas 1, 2 y 3), *E. dissolvens*, *E. gergoviae*, *E. hormaechei*, *E. intermedius*, *E. nimipresuralis*, *E. pyrinus* y *E. sakazakii*.

Sólo para algunas especies corresponden nuevas denominaciones.

Complejo *E. agglomerans* era antiguamente conocido como *Erwinia herbicola* y *E. milletiae*.

E. amnigenus (biogrupos 1 y 2) era denominado Grupo H3.

E. asburiae se denominaba *Citrobacter* atípico y Grupo entérico 17.

E. cancerogenus era anteriormente conocido como *Erwinia cancerogena*, *Enterobacter taylorae* y Grupo entérico 19.

E. dissolvens es la ex *Erwinia dissolvens*.

E. gergoviae se denominaba anteriormente *Enterobacter aerogenes* atípico.

E. hormaechei es la ex Grupo entérico 75.

E. intermedius era conocida como Grupo H1 y como *E. intermedius*.

E. nimipresuralis se denominaba *Erwinia nimipresuralis*.

E. pyrinus era conocida como *Erwinia pirina*.

E. sakazakii tenía como denominación anterior *E. cloacae* con pigmento amarillo.

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS

Se trata de bastones gramnegativos, móviles en su mayoría.

CARACTERISTICAS CULTURALES

E. sakazakii es el único miembro del género que produce pigmento amarillo brillante, especialmente si el cultivo es incubado a 25 °C. Esta especie también tiene la característica de formar colonias "duras", lo que orienta de forma presuntiva la diferenciación con otros agentes pigmentados de la tribu *Klebsielleae*.

FACTORES DE VIRULENCIA

Toxina

Hay producción de una toxina similar a la toxina Shiga. Esta ha sido detectada a partir de heces de niños afectados con síndrome hemolítico.

Enzimas

β-lactamasas codificadas genéticamente y que pueden ser inducidas por sustancias como aminoácidos, ciertos antibióticos y fluidos corporales; esta enzima sólo se evidencia si por efectos del inductor o por mutación genética el gen correspondiente se activa.

PODER PATOGENO

E. aerogenes
Es de aislamiento clínico común.

Complejo *E. agglomerans*
Se trata de un grupo heterogéneo de microorganismos que representan a más de 13 grupos de hibridación de ADN. Como ya se mencionara, el grupo XIII ha sido transferido al nuevo género *Pantoea*.

E. amnigenus biogrupos 1 y 2
Estos microorganismos han sido aislados de muestras humanas, aunque no existen evidencias de que puedan provocar infecciones en el hombre.

E. asburiae
Ha sido recuperado de muestras clínicas humanas de diversos orígenes, como sangre, orina, heces, tracto respiratorio y heridas.

E. cancerogenus
Esta especie ha sido aislada de variadas muestras de origen clínico, incluso sangre y LCR.

Enterobacter cloacae (y especies anónimas 1, 2 y 3).

E. dissolvens
No ha sido recuperado de muestras clínicas humanas.

E. gergoviae
Ha sido hallado en muestras clínicas humanas de tracto respiratorio y urinario. Es raro su aislamiento a partir de sangre.

E. hormaechei
Se lo ha recuperado a partir de esputo, sangre y heridas contaminadas.

E. intermedius
No ha sido aislado de muestras clínicas humanas, pero sí de agua y suelo.

E. nimipresuralis
No ha sido aislado de muestras clínicas humanas.

E. pyrinus
Es patógeno vegetal exclusivo.

E. sakazakii
En neonatos puede provocar bacteriemia, meningitis y abscesos cerebrales.

Tabla 25-4. Características bioquímicas de las especies de *Enterobacter*

Especie	Lisina decarboxilasa	Arginina decarboxilasa	Ornitina decarboxilasa	Rojo de metilo	Voges Prosk	Ureasa	Movil.	Pigmento amarillo
E. aerogenes	+	-	+	-	+	-	+	-
E. amnigenus								
Biogrupo 1	-	-	V	-	+	-	+	-
Biogrupo 2	-	V	+	V	+	-	+	-
E. asburiae	-	V	+	+	-	-	-	-
E. cancerogenus	-	+	+	-	+	-	+	-
E. cloacae	-	+	+	-	+	V	+	-
E. gergoviae	+	-	+	-	+	+	+	-
E. hormaechei	-	V	+	V	+	V	V	-
E. sakazakii	-	+	+	-	+	-	+	+

NOCIONES DE PATOGENIA

Enterobacter aerogenes y *E. cloacae* son las especies halladas con mayor frecuencia a nivel clínico humano. Ambas especies se encuentran ampliamente distribuidas en agua, suelo, vegetales y medio ambiente (alcantarillas), además de integrar la flora entérica normal. También se hallan relacionadas con infecciones que incluyen las de los tractos urinario y respiratorio, además de heridas y, esporádicamente, cuadros meningeos y septicémicos.

E. gergoviae provoca infecciones urinarias y también ha sido recuperado a partir de muestras de sangre y del tracto respiratorio.

Se ha informado que *E. cancerogenus* ha sido aislado de cuadros infecciosos variados, desde infección de heridas y tracto urinario, neumonías y bacteriemias, hasta procesos de osteomielitis a posteriori de fracturas expuestas.

E. intermedius, *E. dissolvens*, *E. nimipressuralis* y *E. pyrinus* han sido aislados de vegetales y del medio ambiente, pero no han sido recuperados aún de muestras clínicas humanas. En cuanto a *E. amnigenus*, aunque no se ha detectado su incidencia en patologías humanas, puede ser considerado como una bacteria originalmente del agua que ha sido recuperada de muestras clínicas.

En medicina humana, *E. asburiae* ha sido aislado de muestras tales como sangre, orina, materia fecal, tracto respiratorio y heridas.

Por su parte, *E. hormaechei* ha sido recuperado de heridas, sangre, esputo, heces, vesícula biliar y oído. Se lo ha responsabilizado de picos septicémicos neonatales en internados en terapia intensiva.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Identificación bioquímica

Enterobacter spp comparte con las especies de *Klebsiella* muchas pruebas bioquímicas, pero las que pueden diferenciar a ambos géneros son la decarboxilación de la lisina y la movilidad, pues en ambos casos *Enterobacter* es positivo.

E. sakazakii puede diferenciarse sin problemas de otros integrantes de la tribu Klebsielleae por su producción de pigmento típico y por la decarboxilación de lisina, arginina y ornitina.

Por su parte, *E. gergoviae* (bioquímicamente muy similar a *E. aerogenes*) es ureasa fuertemente positivo, hecho que permite una rápida diferenciación.

E. cancerogenus puede, mediante una incubación prolongada, desarrollar colonias con centro rojo en medio Mac Conkey, pese a ser una bacteria lactosa negativa.

Por su parte, *E. asburiae* se caracteriza por ser el único miembro inmóvil del género.

En la tabla 25-4 se observan las pruebas bioquímicas empleadas para diferenciar las especies de *Enterobacter* de mayor importancia clínica, mientras que en la tabla 25-5 se puede visualizar el comportamiento ante los carbohidratos.

GENERO SERRATIA

CLASIFICACION

En este género se agrupan las siguientes especies: *Serratia marcescens* (es la de mayor importancia), *S. rubidaea*, *S. odorife-*

Tabla 25-5. Características de comportamiento ante los hidratos de carbono de las especies de *Enterobacter*

Especie	Lactosa	Sucrosa	Adonitol	Sorbitol	Rafinosa	Ramnosa	Melibiosa
E. aerogenes	+	+	+	+	+	+	+
E. amnigenus							
Biogrupo 1	V	+	-	-	+	+	+
Biogrupo 2	V	-	-	+	-	+	+
E. asburiae	V	+	-	+	V	-	-
E. cancerogenus	-	-	-	-	-	+	-
E. cloacae	+	+	V	+	+	+	+
E. gergoviae	V	+	-	-	+	+	+
E. hormaechei	-	+	-	-	-	+	-
E. sakazakii	+	+	-	-	+	+	+

Tabla 25-6. Características bioquímicas de las especies de *Serratia*

Especie	DNAsa a 25 °C	Gelatinasa a 22°C	Lisina	Ornitina	Pigmento	Malonato	Lipasa
S. marcescens	+	+	+	+	V	-	+
S. liquefaciens	V	+	+	+	-	-	V
S. rubidaea	+	+	V	-	V	+	+
S. plymuthica	+	V	-	-	V	-	V
S. ficaria	+	+	-	-	-	-	V
S. fonticola	-	-	+	+	-	+	-
S. odorifera							
Biogrupo 1	+	+	+	+	-	-	V
Biogrupo 2	+	+	+	-	-	-	V

ra (biogrupos 1 y 2), *S. plymuthica*, *S. fonticola*, *S. entomophila*, *S. ficaria* y finalmente el grupo *S. liquefaciens* (que actualmente incluye las especies *S. grimesii* y *S. proteamaculans*, con sus subsp. *proteamaculans* y *quinovora*).

La originalmente denominada *Serratia liquefaciens* es en la actualidad reconocida como un conjunto de varios grupos reunidos por hibridación del DNA. Las especies integrantes de este grupo no pueden ser diferenciadas entre sí por pruebas bioquímicas, por lo cual se ha sugerido que dichos microorganismos sean enunciados como "grupo *Serratia liquefasciens*".

Se ha detectado que, en veterinaria, la especie tipo (*Serratia marcescens*) tiene incidencia ocasional en cuadros de mastitis bovina y otras infecciones eventuales.

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS

Serratia rubidaea produce colonias pigmentadas de rojo. Por su parte, *Serratia plymuthica* también puede originar este tipo de pigmento.

FACTORES DE VIRULENCIA

Antígenos

O (somático), del que se han identificado alrededor de quince variedades.

H (flagelar).

PODER PATOGENO

Durante mucho tiempo, las bacterias integrantes de este género fueron consideradas saprófitas absolutamente benignas, pero actualmente estas mismas especies son reconocidas como patógenos de importancia debido a su capacidad invasora y su resistencia a la mayoría de los agentes antimicrobianos de uso rutinario. Pese a todo, las serratias se consideran patógenos oportunistas.

De todas estas especies, *Serratia marcescens* es la más importante, y con frecuencia se la asocia a infecciones humanas, entre las cuales se destacan neumonía y septicemia, sobre todo en pacientes con patologías reticuloendoteliales malignas y tratamiento quimioterápico. Esta especie también puede ser considerada como una oportunista nosocomial, cuya actividad se ha desarrollado a partir de soluciones desinfectantes contaminadas con este microorganismo y que han provocado procesos meníngeos infantiles.

Como ya se explicara, el grupo *Serratia liquefaciens* incluye las especies actualmente designadas como *S. grimesii* y *S. proteamaculans*, las cuales no pueden ser diferenciadas de las demás integrantes del grupo *S. liquefaciens* por técnicas metabólicas clásicas, pero se diferencian de *S. marcescens* por su actividad sobre la arabinosa.

Por lo general, *Serratia rubidaea* no es aislada de muestras clínicas humanas, aunque se ha descrito un caso de recuperación de esta especie a partir de bilis y sangre de un paciente afectado de carcinoma del tracto biliar.

Por su parte, *S. odorifera* provoca olor a humedad, similar al de "papas sin pelar". De sus dos biogrupos, el biogrupo 1 es generalmente aislado de esputo, aunque ha sido recuperado de procesos sépticos graves en pacientes de edad muy avanzada, así como también en cuadros de sepsis asociada a cateterismo en adolescentes previamente esplenectomizados. En lo que al biogrupo 2 respecta, ha sido recuperado a partir de sangre y LCR.

En cuanto a *S. plymuthica* ha sido aislada de esputo y además de muestras de suelo y de agua. También ha sido sugerida su participación en procesos crónicos, como osteomielitis crónica, infección

Tabla 25-7. Características de comportamiento ante los hidratos de carbono de las especies de *Serratia*

Especie	L-arabinosa	D-arabitol	D-sorbitol	Sucrosa	Rafinosa
S. marcescens	-	-	+	+	-
S. liquefaciens	+	-	+	+	V
S. rubidaea	+	V	-	+	+
S. plymuthica	+	-	V	+	+
S. ficaria	+	+	+	+	V
S. fonticola	+	+	+	V	+
S. odorifera					
Biogrupo 1	+	-	+	+	+
Biogrupo 2	+	-	+	-	-

de heridas y bacteriemias de origen nosocomial, y ha sido aislada de líquido peritoneal en pacientes afectados de colecistitis.

Serratia entomophila no ha sido aislada de muestras clínicas humanas por ser patógena de insectos.

Por su parte, *Serratia fonticola* no es realmente una especie de *Serratia*, pues es un microorganismo de agua y ocasionalmente ha sido aislado de muestras clínicas humanas, por lo general de heridas.

Finalmente, *Serratia ficaria* ha sido aislada a partir de higos y de las avispas que en ellos se encuentran; su aislamiento a partir de seres humanos es extremadamente raro, excepto en casos de ingesta de fruta contaminada. *Serratia entomophila* no ha sido detectada en humanos, pues es patógena de insectos, y por su parte, *Serratia fonticola* es un microorganismo de origen acuático de excepcional aislamiento clínico, aunque ha sido recuperada a partir de heridas infectadas.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Identificación bioquímica

Las bacterias integrantes de este género son las únicas enterobacterias capaces de producir tres enzimas hidrolíticas: lipasa, gelatinasa y DNAsa (tabla 25-6).

El comportamiento hacia los hidratos de carbono se detalla en la tabla 25-7.

GENERO HAFNIA

CLASIFICACION

Este género está integrado por una única especie: *Hafnia alvei*, antiguamente denominada *Enterobacter hafnia*.

En cuanto a *Hafnia alvei* biogrupo 1, no tiene importancia clínica humana o veterinaria, pues es contaminante en el proceso cervecero.

FACTORES DE VIRULENCIA Y PODER PATOGENO

Algunas cepas de *Hafnia alvei* poseen su virulencia asociada al gen *eaeA*, responsable de la adherencia bacteriana a las células epiteliales y de la producción de las lesiones típicas en el epitelio intestinal ciliado. Estas lesiones son similares al deterioro observable en procesos originados por *Escherichia coli* enteropatogénica y enterohemorrágica a nivel de mucosa intestinal.

NOCIONES DE PATOGENIA

Esta bacteria ha sido recuperada de materia fecal de pacientes totalmente asintomáticos. Ha sido aislada de pacientes a partir de sangre, orina y esputo, o con infecciones en heridas, abscesos, etc., así como también de heridas torácicas en pacientes sometidos previamente a este tipo de cirugía.

Actualmente existen evidencias que sugieren que *Hafnia alvei* puede ser causante de gastroenteritis bacteriana aguda.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Identificación bioquímica

Sus reacciones son similares a las del género *Enterobacter*, pero se diferencia de éste por no producir ácidos a partir de lactosa, sucrosa, melobiosa, rafinosa, adonitol, sorbitol, dulcitol e inositol.

GENERO PANTOEA

CLASIFICACION

Instituido en 1989, este género incluye las siguientes especies:, *Pantoea agglomerans*, *P. dispersa*, *P. ananas*, *P. citrea*, *P. punctata*, *P. sterwartii* subsp. *indologenes*, *P. sterwatii* subsp. *sterwatii* y *P. terrea*.

Antiguamente la nomenclatura era la siguiente:

Pantoea agglomerans: esta especie era conocida como *Enterobacter agglomerans* biotipo XIII, *Erwinia herbicola* y *Erwinia milletiae*.
P. dispersa: era conocida como *Enterobacter agglomerans* biotipo III.
P. ananas: ex *Enterobacter agglomerans* biotipo VI.
P. sterwatii subsp. *indologenes:* era denominada *Erwinia sterwatii*.
P. sterwatii subsp. *sterwatii:* id. anterior.

Las **nuevas especies** del género son:

Pantoea citrea
Pantoea punctata
Pantoea terrea

CARACTERISTICAS CULTURALES

Algunas colonias pueden observarse pigmentadas de amarillo.

PODER PATOGENO

Hacia la década de 1970 y en los Estados Unidos *Pantoea agglomerans* fue la responsable del estallido nacional de septicemia por fluidos intravenosos contaminados.

El aislamiento de los miembros de este género puede tener diversos orígenes.

Pantoea agglomerans: origen humano (a partir de sangre, orina, órganos internos y heridas), origen animal y otros (de vegetales, semillas y agua).

Pantoea dispersa: ha sido aislada de humanos, de superficies vegetales, de semillas y del medio ambiente.

Pantoea ananas, *P. sterwatii* (subsp. *indologenes* y *sterwatii*), *P. citrea*, *P. terrea* y *P. punctata:* son fitopatógenas y también han sido aisladas del suelo.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Identificación bioquímica

Pantoea agglomerans y *Pantoea dispersa* son negativas para la decarboxilación de lisina, arginina y ornitina. Se diferencian únicamente por la prueba de la salicina, para la cual *Pantoea agglomerans* es positiva.

BIBLIOGRAFIA

Finegold SM, Martin WJ. Bailey-Scott, Diagnóstico microbiológico. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, 1983.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn (Jr) WC. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Ed. Lippincott. Philadelphia, 1997.

Mac Faddin JF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Panamericana, 1980.

SALMONELLA

María del Luján Tunes, Germán Blas Vigo

INTRODUCCION

El género *Salmonella* recibe su nombre del microbiólogo americano D. E. Salmon. El género *Salmonella* causa la salmonelosis, enfermedad de distribución mundial que afecta a humanos y a animales de sangre caliente y fría, varía según la gravedad de los casos en la morbilidad y mortalidad, y ocasiona importantes pérdidas económicas. La epidemiología de *Salmonella* es muy compleja debido a su distribución ubicua, su creciente número de serovares, su amplio rango de hospedadores y su compleja patogénesis. Habita el tracto intestinal de animales vertebrados e invertebrados, y su excreción da como resultado la contaminación del agua, los alimentos y del medio ambiente.

CLASIFICACION

La más reciente clasificación deriva de estudios realizados sobre la base de técnicas de hibridación del DNA de *Salmonella*. Esto ha permitido determinar que existen dos especies cuya clasificación final se observa en la tabla 26-1.

Pero es muy importante aclarar que, aunque existan sólo dos especies de salmonelas según su hibridación de DNA, tanto las especies como las subespecies mencionadas se encuentran constituidas por más de 2400 variedades serológicas, delimitadas por distintas asociaciones de antígenos somáticos O y flagelares H.

También puede hacerse una clasificación de las salmonelas desde el punto de vista epidemiológico. De esta manera, pueden distinguirse tres grupos diferentes, a saber:

Grupo 1: está integrado por aquellas salmonelas que no tienen afinidad por ningún hospedador en particular y pueden infectar por igual al hombre y a los animales. A este grupo pertenecen la mayor parte de las serovares causantes de salmonelosis, *S.* Typhimurium, *S.* Enteritidis, etc.

Grupo 2: abarca las salmonelas que afectan únicamente al ser humano, o sea, *S.* Typhi, *S.* Paratyphi A y *S.* Paratyphi C. Estas bacterias son transmisibles de manera directa o indirecta del enfermo y/o portador sano al nuevo hospedador.

Grupo 3: está constituido por las salmonelas que se hallan adaptadas a un hospedador animal exclusivamente. Son las siguientes: *S.* Abortusovis (afecta al ovino); *S.* Abortusequi (produce patologías en equinos) y *S.* Gallinarum (causante del tifus aviar).

Otro detalle de interés taxonómico es que cuando se denomina una bacteria, su nombre se escribe con letra cursiva (o itálica) (por ej., *Pseudomonas aeruginosa*); en el caso de *Salmonella*, sus serovares deben ser escritas en letra romana y con mayúscula (por ej., *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, la cual es más conocida por el más práctico nombre de *Salmonella* Typhimurium). Esto se debe a que las serovares no tienen el nivel de especie en la taxonomía bacteriana, por lo cual escapan a la reglamentación del "International Code of Nomenclature of Bacteria", de allí la modificación de su escritura.

Con respecto a *Salmonella bongori* y las serovares de las restantes subespecies de *Salmonella enterica*, debe recordarse que son denominadas con el nombre de la subespecie seguido de la fórmula antigénica específica (por ej., *Salmonella* subsp. IV 50: b : - , designación correspondiente a *Salmonella enterica* subsp. *houtenae* 50: b : -). Por último, cabe señalar que las denominaciones de todas las serovares de *Salmonella* están comprendidas en el Esquema de Kauffmann-White del Instituto Pasteur de París.

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS

Su morfología corresponde a la de la familia Enterobacteriaceae. Se trata de bastones gramnegativos, de 0,7 a 1,5 µm de ancho y 2,0 a 5 µm de largo, móviles por flagelos distribuidos en forma perítrica (únicamente dos especies son inmóviles: *S.* Gallinarum-Pullorum, responsables del tifus aviar y pulloriosis respectivamente, aunque el fenómeno de inmovilidad también puede presentarse en algunas cepas de otras subespecies de salmonelas) debido a la pérdida de sus flagelos. Son anaerobios facultativos y no formadores de esporas.

ANTIGENOS INVOLUCRADOS EN LA SEROTIPIFICACION

El antígeno (Ag) somático (O de pared celular) es polisacárido, termoestable, tipo-específico y se halla en todas las especies. Este antígeno determina el serogrupo y se distinguen dos clases: *mayores* (determinantes del serogrupo) y *menores* (se hallan en algunas salmonelas y serogrupos de éstas), son compartidos por diferentes serovares y no determinan los serogrupos.

El Ag capsular (K) presente es un antígeno termolábil, llamado en *Salmonella* el Ag (Vi), que protege a la bacteria dándole resistencia antifagocítica. Como este antígeno recubre toda la

Tabla 26-1. Clasificación de *Salmonella*

Especie	Subespecie	Hábitat
Salmonella enterica	*enterica* (I)*	Hombre Animales de sangre caliente
	salamae (II) *arizonae* (IIIa) *diarizonae* (IIIb) *houtenae* (IV) *indica* (VI)	Animales de sangre fría Medio ambiente
Salmonella bongori (V)		

* Entre paréntesis se indica la anterior clasificación en grupos.

bacteria, es causa de la inaglutinabilidad con antisuero O; en este caso, la cepa en estudio debe ser sometida a un calentamiento a 100 °C durante 30 minutos, a fin de desnaturalizar dicha cubierta y luego poder realizar la prueba de aglutinación con el Ag somático correspondiente. Se encuentra presente en *S.* Typhi, *S.* Paratyphi C y en algunas cepas de *S.* Dublin.

El Ag flagelar (H) es proteico. Por lo general, estos microorganismos poseen dos fases de Ag. H, diferenciables por medio de aglutinación en tubo de ensayo.

Toxinas

La endotoxina es un complejo lipo-polisacárido-proteína, que debe encontrarse completo para tener real eficacia en su acción patógena.

La enterotoxina es responsable del acúmulo de líquido que se produce en la prueba del ansa intestinal ligada, a posteriori de la administración de un sacarolítico.

PODER PATOGENO

Todas las salmonelas son potencialmente patógenas. En medicina humana están descritas diversas presentaciones de salmonelosis, fiebre entérica, septicemia y finalmente como gastroenteritis. Mientras tanto, en medicina veterinaria se ha determinado que esta bacteria puede provocar septicemia y enteritis aguda, subaguda y crónica, y abortos en diferentes especies animales.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Ante la sospecha de salmonelosis, el material que debe remitirse al laboratorio es variado: se remitirán sangre, orina y heces; si se desea investigar la contaminación con esta enterobacteria, alimentos de distintos orígenes y agua pueden ser analizados convenientemente. El diagnóstico incluye aislamiento, identificación bioquímica y serotipificación de las cepas aisladas.

Es muy importante recordar que, por tratarse de un microorganismo patógeno, en la actualidad se recomienda la aplicación de medidas de bioseguridad. Si el laboratorista debe manipular *Salmonella* Typhi, se exigen medidas de nivel 2 cuando se trate de cepas provenientes de muestras clínicas humanas, veterinarias y/o de alimentos, y de nivel 3 cuando exista riesgo de producción de aerosoles o bien se deba trabajar con grandes cantidades de bacterias. Para el resto de las serovares sólo se deben instituir medidas de bioseguridad del nivel 2.

Características culturales

Todas las especies de *Salmonella* tienen su hábitat en el intestino tanto humano como animal. Pero pese a tratarse de una enterobacteria, su aislamiento no es tan sencillo como puede suponerse, pues la metodología depende del tipo de muestra a estudiar.

Sangre: la muestra debe tomarse durante el pico febril y debe inocularse en un frasco con medio especial para hemocultivo, en proporción 1:10 (1 parte de sangre en 9 de medio). Luego se incuba entre 35 y 37 °C durante 1 semana, y se efectúa un primer repique de control en agar sangre a partir de las 8 horas de incubación, mientras que los controles posteriores dependerán de la turbidez observada en el frasco con el hemocultivo.

Orina o material de abscesos: pueden ser sembrados de inmediato en un medio de cultivo adecuado, como lo son el agar CLDE (diferencial para contaminantes urinarios), BGA (agar verde brillante), SS (*Salmonella-Shigella*), HK (Ektoen) y XLD (xilosa-lisina-desoxicolato).

Alimentos humanos: la muestra (25 g de alimento problema) se coloca en caldo de preenriquecimiento (225 ml caldo lactosado, agua peptonada buferada). Luego se repica 1 ml del caldo de preenriquecimiento en 10 ml de caldo de enriquecimiento (caldo selenito, caldo tetratoinato de Müller-Kauffmann), se toma una ansada del medio de enriquecimiento y se la siembra en un medio sólido selectivo: agar XLD, agar entérico de Hektoen, agar BGA, etc. Las colonias compatibles con el género *Salmonella* se repican a un medio no selectivo como agar Tripticasa Soya, agar nutritivo, etc., a fin de comprobar la pureza del aislamiento. Posteriormente se realizan las pruebas bioquímicas para llegar a identificar el aislamiento como perteneciente al género *Salmonella*. Para identificar la serovar se necesita realizar la serotipificación, como se explicó anteriormente, de acuerdo con los antígenos somáticos (O) y flagelares (H).

Alimentos para animales: aquí pueden hallarse salmonelas en escaso número y también pueden estar acompañadas de microbiota contaminante y/o encontrarse dañadas, de forma tal que el aislamiento de dicho microorganismo puede resultar dificultoso o nulo, según la técnica empleada. El riesgo de un falso negativo se puede reducir mediante la siembra en medios de preenriquecimiento no selectivos, con dos repiques posteriores a medios de enriquecimiento selectivos y dos trasplantes a medios selectivos sólidos.

1. Cultivo en medio no selectivo de preenriquecimiento: agua peptonada buferada.
2. Repique en dos medios líquidos de enriquecimiento selectivo: caldo selenito-cistina o caldo tetrationato de Müller-Kauffmann, caldo soja Rappaport y Vassiliadis (RV), o caldo soja peptona Rappaport y Vassiliadis (RVS). También pueden emplearse otros medios de enriquecimiento, tales como caldo SBM, caldo selenito de Leiffson, caldo TBG, caldo Mossel, caldo PREUSS.
3. Trasplante a dos medios sólidos selectivos: agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD), agar verde brillante (BGA); también puede utilizarse otro medio sólido selectivo. Otras opciones de medios selectivos son: agar bismuto-sulfito de Wilson-Blair, agar BPLS, agar DCLS, agar para *Salmonella* de Önöz, agar VRB.

Materia fecal humana: se aconseja tratar de aislar el microorganismo a partir de heces frescas para obtener mayor porcentaje de éxito; la muestra se obtiene por hisopado a fin de lograr muestras mucoides y/o sanguinolentas.
Posteriormente, esta muestra se siembra en uno o más de los siguientes medios: *selectivos*, tales como agar *Salmonella-Shigella* (SS), agar Hektoen (HK) y agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD); *diferenciales*, como Mac Conkey (MC); *de enriquecimiento*, como caldo selenito, con la finalidad de beneficiar el aislamiento de las salmonelas cuando éstas se hallan en muy pequeña cantidad en el espécimen.
A continuación se procede a repicar en agar selectivo agar bismuto sulfito (BS), agar HK, agar eosina-azul de metileno (EAM o EMB), agar XLD, agar verde brillante (BGA) o agar SS.

Materia fecal animal: en los animales enfermos la infección puede cursar de forma subclínica y, por ende, las muestras tendrán una carga bacteriana escasa que, en ciertos casos, puede llegar a morir en la etapa de adaptación al medio de cultivo durante la primera siembra del material. Es por ello que se impone la metodología aplicada a las muestras de alimentos.
Otra opción para aislar este microorganismo de heces animales es la indicada en la siguiente técnica:

1. Colocar el hisopo con la muestra fecal en una mínima cantidad de caldo peptonado (aproximadamente 1 ml de medio) y efectuar una suspensión con la muestra.
2. A partir de la muestra suspendida, sembrar en un medio de enriquecimiento e incubar 24 horas a 37 °C.
3. Con el resto de la muestra impregnada en el hisopo, sembrar un medio de enriquecimiento, incubando también por 24 horas a 37 °C.
4. De los desarrollos en ambos caldos, repicar a medios de aislamiento.

Los medios de cultivo empleados en el aislamiento y cultivo de salmonelas tienen distintos grados de selectividad y las colonias en ellos desarrolladas pueden tomar diferentes aspectos según los sustratos de cada medio. Estos detalles pueden apreciarse en la tabla 26-2.

Metodología para una identificación clásica

- Preenriquecimiento en medio no selectivo (agua peptonada buferada).
- Enriquecimiento selectivo en caldo tetrationato (Müller-Kauffmann) y en caldo soja peptona Rappaport Vassiliadis (RVS).
- Subcultivo en agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD) y en agar verde brillante (BGA) u otro medio sólido selectivo.

Metodología para una identificación presuntiva rápida

Se han descrito algunos medios de cultivo con la intención de mejorar el aislamiento de salmonelas a partir de muestras fecales. Dichos medios de cultivo tienen propiedades diferenciales, y entre ellos se destacan:

Agar novobiocina-verde brillante-glucosa

Las colonias de especies de salmonelas se observan de tamaño grande y se diferencian de otras enterobacterias por su capacidad de producir H_2S, lo cual le otorga un centro de color negro; además, las colonias aparecen rodeadas de medio teñido de color rojo brillante.

Agar novobiocina-verde brillante-glicerol-lactosa

En este medio, las colonias de salmonelas se visualizan de color negro, debido a que no existe interferencia en la formación de H_2S porque dicha bacteria no produce ácido a partir de la lactosa ni del glicerol (por este motivo, las colonias de *Proteus* y de *Citrobacter* aparecen incoloras, y se diferencian con suma facilidad).

Agar Rambach

Este medio permite inhibir los coliformes por contener sales biliares, y además pone en evidencia a las salmonelas por su capacidad de metabolizar el propilenglicol; por este motivo, sus colonias aparecen de color rojo brillante.

Tabla 26-2. Medios de cultivo empleados para distinguir especies de *Salmonella*

Medio de cultivo	Grado de selectividad	Aspecto de las colonias
Agar BPLS (agar verde brillante, rojo de fenol, lactosa y sacarosa)	Baja	Rosas
Agar EMB (agar eosina, lactosa, azul de metileno)	Baja	Incoloras
Agar MC (agar Mac Conkey)	Baja	Incoloras
Agar DCLS (agar desoxicolato, citrato, lactosa, sucrosa)	Baja	Incoloras
Agar para *Salmonella* (según Önöz) (agar lactosa, sacarosa, tiosulfato, citrato férrico, sales biliares, verde brillane y rojo neutro)	Mediana	Amarillas con centro negro. Medio de cultivo periférico a la colonia de color amarillo.
Agar BGA (agar verde brillante)	Alta	Rosadas, blancas o transparentes sobre fondo rojo
Agar bismuto-sulfito (según Wilson-Blair)	Alta	Borde claro y centro negro, con precipitado periférico negro con brillo metálico (ojo de conejo o de pescado)
Agar HK (agar Hektoen)	Alta	Verde-azuladas, centro negro
Agar SS (agar *Salmonella-Shigella*)	Alta	Incoloras con centro negro
Agar XLD (agar xilosa, lisina, desoxicolato)	Alta	Rojas con centro negro
Caldo RVS (caldo peptona soja de Rappaport y Vassiliadis)	Muy alta	--

Medio semisólido modificado Rappaport-Vassiliadis.

Por su baja concentración de agar (2.7 g‰) este medio de cultivo aprovecha la capacidad de invasión de las bacterias móviles, las cuales forman un halo de crecimiento a partir del punto inicial de inoculación: si de éste borde invasor se toma el inóculo para un repique, el cultivo obtenido será puro. Este medio también inhibe el desarrollo de coliformes, sobre todo cuando se suman el incremento de la presión osmótica, el poder inhibidor del verde de malaquita y una temperatura de incubación de entre 41 y 43 °C.

Identificación bioquímica

Como corresponde a las enterobacterias, las salmonelas son oxidasa negativas y catalasa positivas. Otras pruebas bioquímicas se detallan en la tabla 26-3.

Debe recordarse que este microorganismo es positivo para las pruebas de rojo de metilo, citrato, fermentación de la glucosa, arginina dihidrolasa y decarboxilación de lisina y ornitina; por su parte, es negativa para las pruebas de indol, Voges Proskauer y ureasa.

Lógicamente, debe recordarse que este esquema de identificación bioquímica es muy general, por lo cual pueden existir variaciones en los resultados por depender éstos del metabolismo de cada cepa en particular.

Identificación serológica

Salmonella posee antígenos somáticos O (lipopolisacáridos) y flagelares H (proteicos). Algunas serovares poseen también un antígeno denominado Vi, o antígeno de envoltura o capsular.

Cuando el microbiólogo encuentra aislamientos bacterianos que bioquímicamente se corresponden con especies de salmonelas, la ratificación del diagnóstico se realiza por medio de sueros policlonales que contienen anticuerpos contra la mayor parte de los subgrupos de este microorganismo. Luego, se remiten repiques a laboratorios o centros de referencia, en donde se lleva a cabo la identificación serotípica sobre la base de reacciones de determinantes H y O.

Por último, hay que tener en cuenta que el informe de los resultados de identificación de salmonelas por serotipificación se redacta de la siguiente manera: *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium (antiguamente se incluía la especie; por ejemplo: *Salmonella* Enteritidis serotipo *enteritidis* [1, 9 ,12: g; m: -], *Salmonella* Enteritidis serotipo typhimurium [1, 4, 5, 12: i: 1,2] seguida de su fórmula antigénica). Los números son factores del Ag O que se escriben separados por coma. Luego se colocan dos puntos, las letras indican el Ag H (Fase 1) y los números los Ag H (Fase 2). En caso de carecer de una fase (monofásica), se indica con el signo -.

Estudios complementarios

En la actualidad se cuenta con el sistema de subtipificación molecular para completar con datos accesorios la serotipificación.

NOCIONES DE PATOGENIA

Los microorganismos integrantes del género *Salmonella* están extensamente diseminados en la naturaleza, como comensales y como patógenos del aparato digestivo de los mamíferos domésticos y silvestres, aves, reptiles e insectos, en los cuales pueden llegar a producir una vasta gama de enfermedades.

La *Salmonella* es un parásito intracelular y, por medio de los macrófagos en los que se encuentra, se disemina por todo el organismo afectado aprovechando la vía linfática y sanguínea.

Las diversas especies de *Salmonella* se transmiten por contacto tanto con enfermos como con portadores sanos, aunque, por lo general, las enfermedades tienen un origen alimentario debido a ingesta de comestibles contaminados con este microorganismo. Por este motivo, en la industria alimentaria se realizan monitoreos (también llamados prácticas de vigilancia) de salmonela durante la elaboración de alimentos.

En el ser humano tiene mayor incidencia en lactantes, niños de corta edad y ancianos, y si bien los brotes epidémicos suelen ser pequeños y/o esporádicos en la población, se incrementan cuando ocurren en restaurantes, jardines de infantes, geriátricos y nosocomios.

TRATAMIENTO

Dentro de los antimicrobianos sugeridos para tratar una salmonelosis se encuentran los fármacos que se absorben en el aparato digestivo, tales como ampicilina, tetraciclinas y cloranfenicol. Pero debido al incremento de cepas resistentes a dichos antimicrobianos, y como ya se ha insinuado para otros microorganismos, el antibiograma específico para cada bacteria actuante

Tabla 26-3. Pruebas bioquímicas para la identificación de *Salmonella*

Pruebas bioquímicas	*Salmonella enterica*						*S. bongori* (V)
	subsp *entirica* (I)	subsp *salamae* (II)	subsp *arizonae* (IIIa)	subsp *diarizonae* (IIIb)	subsp *houtenae* (IV)	subsp *indica* (VI)	
Lactosa	-	-	- (75%)	+ (75%)	-	V	-
H_2S	+	+	+	+	+	+	+
Gelatina	-	+	+	+	+	+	-
KCN	-	-	-	-	+	-	+
ONPG	-	-	+	+	-	V	+
Dulcitol	+	+	-	-	-	V	+
Malonato	-	+	+	+	-	-	-
Sorbita	+	+	+	+	+	-	+
L(+) tartrato	+	-	-	-	-	-	-
Mucato	+	+	+	- (70%)	-	+	+
Salicina	-	-	-	-	+	-	-

es el método de elección para determinar el fármaco ante la cual la bacteria problema tiene mayor sensibilidad.

BIBLIOGRAFIA

Finegold SM, Martin WJ. Bailey-Scott, Diagnóstico microbiológico. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, 1983.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn (Jr) WC. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Ed. Lippincott, Philadelphia, 1997.

Asociación Argentina de Microbiología. Microbiología clínica. Infecciones gastrointestinales incluyendo hepatitis. vol. 9. Editado por la Asociación Argentina de Microbiología, Colegio de Bioquímicos de la Provincia de Entre Ríos y Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, 1998.

Laboratorios Merck. Manual de medios de cultivo. 1994.

Mac Faddin JF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Panamericana, 1980.

Terragno R, Caffer MI, Bruno S. Manual de Procedimientos - *Salmonella*. Aislamiento, identificación y serotipificación. Ministerio de Salud. Secretaría de Políticas, Regulación y Relaciones Sanitarias. Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán". Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Departamento de Bacteriología - Buenos Aires, Argentina. 2003.

Capítulo 27

SHIGELLA

María del Luján Tunes

INTRODUCCION

El género *Shigella* está considerado como el principal responsable de la disentería bacteriana, enfermedad que en el ser humano provoca enteritis grave con eliminación de heces diarreicas que contienen mucus, sangre y/o pus. El contagio se realiza por contacto directo o bien por medio de alimentos. Puede producir brotes epidémicos por su enorme transmisibilidad.

CLASIFICACION

Todos los miembros integrantes del género *Shigella* son bastones gramnegativos sin organización definida, no esporulados, sin cápsula aparente, inmóviles, culturalmente no exigentes, oxidasa negativos y fermentadores de glucosa con producción de ácido, o ácido y gas, y su tipo respiratorio es anaerogénico, excepto los biotipos de *Shigella flexneri* 6.

Sobre la base de técnicas de hibridación de DNA, tanto las cuatro especies de *Shigella* como *Escherichia coli* constituyen la tribu Escherichieae por conformar una sola especie bacteriana. Pero debido a que han sido asociadas de manera específica al conjunto de microorganismos productores de disentería bacilar, las especies de *Shigella* han de continuar clasificadas en un género diferente al menos por un tiempo.

Hay cuatro especies de shigelas que constituyen el género. Ellas son *Shigella dysenteriae* (grupo A), *Shigella flexneri* (grupo B), *Shigella boydii* (grupo C) y *Shigella sonnei* (grupo D).

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS

Las colonias de *Shigella* son más pequeñas que las de *Salmonella*, aunque en algunas oportunidades las shigellas del grupo C pueden formar colonias mucoides.

CARACTERISTICAS CULTURALES

Se desarrolla bien en medios especiales para enterobacterias, por lo cual se la aísla en agar Mac Conkey, agar Endo, agar xilosa-lisina-desoxicolato, agar EMB, agar SS y agar Hektoen.

Es importante recordar que sustancias como bilis y verde brillante añadidas al medio con tetrationato inhiben el desarrollo de *Shigella*.

FACTORES DE VIRULENCIA

Antígenos

O somático o de pared celular. Es polisacárido, termoestable, tipo-específico y se halla en todas las especies.

K capsular. Puede encontrarse presente o no, ya que su cápsula es inaparente. Es antígeno termolábil.

Toxinas

Toxina tipo A-B: es liberada al medio en el momento de lisis bacteriana. Después de unirse a las células del organismo hospedador, penetra en ellas y detiene la síntesis proteica ribosomal. En el síndrome urémico-hemolítico daña los vasos sanguíneos del enfermo.

Neurotoxina: también conocida como toxina Shiga, por sus propiedades y actividad es similar a la citotoxina del vibrión colérico y de *Escherichia coli* enterohemorrágica o verocitotoxina.

ShET1 y ShET2: estas endotoxinas inducirían la acumulación de líquido en intestino, lo que derivaría en la producción de la diarrea acuosa característica.

Lipopolisacárido

Favorece el daño celular, pero no parece tener injerencia en la invasión, ni en la multiplicación intracelular, ni en la propagación intercelular de las bacterias.

Plásmido

Acarrea los genes Ipa (sigla inglesa por *invasion plasmid antigen*).

Se encarga de codificar las proteínas Ipa A, B, C y D. Con excepción de la proteína Ipa A, las demás participan en el proceso fagocítico y la lisis de la vacuola fagocítica.

PODER PATOGENO

En líneas generales se trata de un grupo bacteriano con marcada actividad patógena, ya que son necesarias nada más que 2 x 10^2 UFC/ml o gramo de muestra para provocar enfermedad, es decir que con sólo 200 microorganismos viables se puede padecer un proceso infeccioso grave.

En cuadros de shigelosis, el hombre es el hospedador natural y la contaminación se realiza por vía fecal-oral, a partir de una persona enferma, de un portador, o bien de agua, leche y alimentos contaminados con materia fecal por falta de aseo o por moscas. Según la especie de *Shigella* actuante en el proceso infeccioso, los síntomas varían de graves a muy leves, pudiendo hallarse pacientes asintomáticos.

El ciclo infectivo seguido por *Shigella* spp en el organismo mantiene el siguiente orden:

Una vez que *Shigella* penetra en el organismo, se produce la unión entre la bacteria y la célula hospedadora por medio de los receptores que esta última posee.

Por medio de su plásmido, *Shigella* organiza la invasión de la célula hospedadora.

Tras la invasión celular, la bacteria es incluida en una vacuola fagocítica citoplasmática. Esto se produce por la transformación de la proteína del citoesqueleto (actina) en seudópodos que conducen a la bacteria al interior de la vacuola.

Luego, las bacterias se liberan del fagosoma y quedan incluidas en el citoplasma celular. En este punto se acumula actina en un extremo bacteriano formando un apéndice o cola que facilita el movimiento del microorganismo.

Este movimiento temporal bacteriano hace que la membrana celular protruya; esto permite que la bacteria sea fagocitada por la célula vecina mientras se encuentra rodeada de una doble membrana; acto seguido, ambas membranas se lisan y el microorganismo reinicia su ciclo infeccioso.

La multiplicación bacteriana intracelular determina que la célula hospedadora suspenda su síntesis proteica, lo que provoca su muerte inmediata.

PATOGENIA

En medicina veterinaria, *Shigella dysenteriae* provoca infección, por lo general latente en ciertos animales en cautiverio, como sucede con los chimpancés, aunque mediando un cuadro de estrés el animal puede desarrollar síntomas leves. Es factible que dichas infecciones provengan del contacto del animal con los seres humanos, ya que no se han detectado síntomas en animales en estado salvaje.

Cuando se realizan inoculaciones experimentales con este microorganismo, los animales de laboratorio originan resultados variables. En el ratón, la inoculación vía IP es letal; en el conejo, la técnica del asa intestinal ligada produce resultados positivos (acúmulo de líquido y reproducción bacteriana); por su parte, el cobayo instilado por vía ocular presenta síntomas de queratoconjuntivitis.

Shigella dysenteriae, también conocida como bacilo de Shiga, no es únicamente el agente productor de la disenteria bacilar, enfermedad típica de las zonas trópico-cálidas y subdesarrolladas, pues también puede ocasionar bacteriemia (en pacientes inmunodeprimidos o desnutridos) y neumonía, además de otros procesos infecciosos. Las personas afectadas de disentería preferentemente son jóvenes, y en ellas, el microorganismo produce enteritis grave con deshidratación, inflamación y úlceras intestinales. La dosis infectante de *S. dysenteriae* necesaria para provocar síntomas varía entre 10^4 y 10^8 UFC/ml, y para que aparezcan los primeros síntomas se necesitan unas 48 horas de incubación. La mortalidad que provoca es elevada, alrededor de un 20% de los enfermos. De todas las shigelas, es la que produce la patología de mayor gravedad.

Es posible que *Shigella dysenteriae* sea transportada y diseminada por portadores inaparentes o convalecientes capaces de eliminar los bacilos disentéricos por un periodo de 3 a 5 semanas. Por otra parte, se desconoce si existen portadores crónicos para este agente.

Con respecto a su incidencia en humanos, cabe señalar que las shigelas más encontradas en países desarrollados son *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri*, mientras que en países en desarrollo las de mayor incidencia son *Shigella dysenteriae* y *Shigella boydii*.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Metodología para una identificación clásica

Los pasos a seguir son los siguientes:

- Obtención de la muestra por escobillado o hisopado rectal, durante los 3 primeros días del inicio de la enfermedad y antes de administrar antimicrobianos.
- Cultivo en medios para enterobacterias.
- Identificación bioquímica de las colonias lactosa negativas.
- Identificación serológica.
- Estudios complementarios (biología molecular).

Metodología para una identificación presuntiva rápida

Si en la placa de aislamiento se obtienen colonias mucoides lactosa negativas, repicar a medio AHK (agar hierro de Kligler).

Si en el medio AHK se obtienen cultivos que presentan una punción ácida (por ataque a la glucosa), una estría alcalina (sin ataque a la lactosa) y sin color negro (sin producción de H_2S), determinar la capacidad de la cepa para producir ureasa (el resultado debe ser negativo).

Si el cultivo presenta estas características, es prudente contactar la cepa con suero polivalente de *Shigella* a fin de obtener una tipificación presuntiva.

Completar la identificación por determinación de pureza de cultivo y motilidad bacteriana, además de realizar las pruebas bioquímicas complementarias.

Identificación bioquímica

Pese a que las características bioquímicas diferenciales más importantes entre los integrantes del género *Shigella* y *Escherichia coli* se enumeran a continuación, puede ser dificultoso identificar bioquímicamente ambas especies bacterianas debido a ciertas coincidencias que poseen en común ambos géneros de enterobacterias.

Básicamente, puede existir esta confusión si se aísla una cepa de *Escherichia coli* inmóvil, fermentadora lenta de lactosa y bioquímicamente inactiva. De igual manera, pueden surgir dudas en la identificación bioquímica de *Shigella* cuando se aísla una cepa productora de gas a partir de la glucosa, ya que, en líneas generales, estos microorganismos no producen gas a partir de carbohidratos, excepto algunos biogrupos de *Shigella flexneri*. Por su parte, *Shigella sonnei* presenta como peculiaridad que el 2% de sus cepas pueden ser fermentadoras lentas de lactosa y sólo el 1% puede fermentar la sucrosa; pero esta misma especie se diferencia de los otros serogrupos de shigelas y se asemeja a *Escherichia coli* por ser positiva para ONPG y por decarboxilar la ornitina.

Los detalles mencionados y la similitud que ambas especies bacterianas poseen en cuanto a sintomatología y desarrollo de la enfermedad hacen que realmente la forma más segura de identificar entre estos dos géneros al microorganismo actuante en una infección disentérica sean los métodos serológicos.

Identificación serológica

Por técnica de aglutinación en placa se establece la estructura antigénica O mediante antisueros polivalentes. Este método permite la clasificación bacteriana en grupos.

De los cuatro grupos o especies de *Shigella* diferenciados actualmente, los tres primeros (A, B y C) poseen más de 30 serotipos y pueden distinguirse por técnicas serológicas, mientras que el último (D) se identifica por ser ornitina positivo.

Grupo A

Integrado por *Shigella dysenteriae*, tipos 1 a 10.
No son fermentadores de manitol.
Cada tipo posee un antígeno tipo-específico no relacionado con otras shigelas.

Grupo B

Constituido por *Shigella flexneri*, tipos 1 a 6 y variantes X e Y.
Por lo general fermentan el manitol, aunque se han observado variantes no fermentadoras.
Los tipos integrantes del subgrupo se interrelacionan por medio de los antígenos de grupo, aunque cada uno de

Tabla 27-1. Determinaciones bioquímicas más comunes de distintas especias de *Shigella* y *Escherichia coli*

	Shigella				*Escherichia*
	dysenteriae	***flexneri***	***boydii***	***sonnei***	***coli***
Determinación	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	
Indol	V	V	V	-	+
Rojo de metilo	+	+	+	+	+
Voges Proskauer	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	-
Catalasa	V	+	+	+	+
H_2S	-	-	-	-	-
Ureasa	-	-	-	-	-
Motilidad a 37 °C	-	-	-	-	+
ONPG	-	-	-	+	+
Ornitina decarboxilasa	-	-	-	+	V
Fermentación de:					
Glucosa	A	A/G	A	A	A/G
Lactosa	-	-	-	-	+
Manitol	-	+	+	+	+
Rafinosa	-	V	-	-	V
Sacarosa	-	-	-	A*	V
Xilosa	-	-	V	-	V

A*, la producción de ácido puede ser retardada.

ellos tiene un antígeno tipo-específico que lo distingue de otras shigelas.
Basados en diferencias antigénicas de grupo, existen subtipos en los serotipos 1, 2, 3 y 4.
Las variantes X e Y son formas que han perdido su antígeno tipo-específico.

Grupo C

Compuesto por *Shigella boydii*, tipos 1 a 15.
Todos sus integrantes fermentan el manitol.
Tienen antígenos tipo-específicos independientes no relacionados de manera característica con otras shigelas.

Grupo D

Conformado por *Shigella sonnei*.
Este único tipo posee un antígeno tipo-específico que tampoco se relaciona de forma característica con otras shigelas.
De *Shigella sonnei* hay formas antigénicamente diferentes.

Identificación de serogrupos

Se realiza por medio de técnicas de aglutinación en portaobjetos, contactando el antígeno con sueros polivalentes. A nivel comercial se encuentran disponibles antisueros para los grupos A, B, C y D.

Si la aglutinación con sueros O polivalentes se viera frustrada por la presencia de antígeno K (es factible encontrarlo en algunas shigelas), se impone el calentamiento de la suspensión bacteriana a 100 °C en NaCl al 0,5% durante 30 a 60 minutos. Tras inhibir de esta forma el antígeno K, debe reintentarse la identificación con los mismos sueros.

Identificación de serotipos

Se lleva a cabo con antisueros monovalentes específicos para dichos antígenos.

Los antígenos están preparados sobre la base de tipos de antígenos conocidos y absorbidos con suspensiones de cultivos apropiados a fin de obtener antisueros diagnósticos tipo-específicos.

Tipificación con colicina

Se basa en la producción de colicina por parte de las shigelas.

Las colicinas son sustancias similares a antibióticos que, además de ser producidas por ciertas bacterias gramnegativas, pueden llegar a tener un efecto letal sobre otras bacterias de su entorno. *Shigella sonnei* posee quince tipos colicínicos que permiten la tipificación epidemiológica de este agente.

BIBLIOGRAFIA

Acuña AM. et al. Enfermedades transmitidas por alimentos en Uruguay. Montevideo, OPS, 2002.

Bailey-Scott, Diagnóstico microbiológico. Finegold SM, Martin WJ. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, 1983.

Mac Faddin JF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Panamericana, 1980.

Microbiología clínica. Infecciones gastrointestinales incluyendo hepatitis. vol. 9. Editado por la Asociación Argentina de Microbiología, Colegio de Bioquímicos de la Provincia de Entre Ríos y Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, 1998.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger, PC, Winn (Jr.) WC. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Ed. Lippincott, Philadelphia, 1997.

Capítulo 28

YERSINIA

Nestor Oscar Stanchi

INTRODUCCION

Yersinia comprende un grupo de bacterias heterogéneas pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, que pueden crecer a la temperatura de refrigeración. Basado en su heterogeneidad bioquímica y en su relación de DNA, los miembros de este grupo fueron separados en cuatro especies: *Y. enterocolitica*, *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* y *Y. kristensenii*. En revisiones posteriores, el género *Yersinia* comprende 11 especies, tres de las cuales son potencialmente patógenas para el humano: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* y *Y. enterocolitica*. De éstas, *Y. enterocolitica* es la más importante como causa de enfermedad transmitida por alimentos.

Las yersinias tienen forma de bacilos rectos y cortos con tendencia al pleomorfismo. Miden de 0,5 a 0,8 µm por 1 a 3 µm. Son gramnegativas, móviles por flagelos perítricos (excepto *Y. pestis* y algunas cepas de *Y. ruckeri*) a bajas temperaturas (18-27 °C) e inmóviles a 37 °C. *Y. pestis* posee cápsula con coloración bipolar. Son aerobias o anaerobias facultativas, tienen metabolismo tanto fermentativo como respiratorio, siendo su temperatura óptima de 28-30 °C. *Y. pestis* necesita de sangre para mejorar su desarrollo.

Las yersinias son oxidasa negativas. Actualmente sólo las cepas de *Y. enterocolitica* biotipos 1B, 2, 3, 4 y 5 son patógenas. Estos biotipos y *Y. enterocolitica* biotipo 6 y *Y. kristensenii* no hidrolizan la esculina rápidamente (en 24 horas) o fermentan la salicina.

Y. ENTEROCOLITICA

Las cepas de *Y. enterocolitica* y las especies relacionadas pueden ser separadas serológicamente en grupos basados en los antígenos somáticos termoestables. Se describen 54 serogrupos para *Y. enterocolitica* y sus especies relacionadas. Algunos autores proponen simplificarlos en 18 serogrupos. Actualmente, las cepas patógenas perteneces a los serogrupos O:1,2a,3; O:2a,3; O:3; O:8; O:9; O:4,32; O:5,27; O:12,25; O:13a,13b; O:19; O:20; y O:21. Por lo tanto, las cepas patógenas pueden pertenecer a distintos serogrupos, aunque los que causan enfermedad en humanos con más frecuencia son: O:3, O:8, O:9, y O:5,27.

La asociación con enfermedad humana se basa en el consumo de alimento contaminado con *Y. enterocolitica*, desechos animales y aguas no clorinadas. Los alimentos refrigerados son vehículos potenciales, debido a la posible contaminación en la manufactura y en el hogar, sumado a que el microorganismo sobrevive en refrigeración en el almacenaje.

No todas la cepas de *Y. enterocolitica* son patógenas; algunas producen una enterotoxina termoestable (ST) que puede ser detectada por inyección intragástrica de filtrados de cultivos en ratones lactantes, en forma similar a la toxina termoestable de *Escherichia coli*. A diferencia de *E. coli*, *Yersinia* spp produce ST sólo a temperaturas por debajo de 30 °C. Muchas cepas ambientales de *Yersinia* producen esta proteína, mientras que otras altamente virulentas no la producen. De allí que el rol de la toxina ST en la enfermedad denota partes no claras. Las toxinas no se producen en el alimento.

Las cepas de *Yersinia* spp que causan la yersiniosis humana portan un plásmido (41-48 M) asociado con factores de virulencia, como autoaglutinación en ciertos medios a 35-37 °C; inhibición del crecimiento en medios deficientes de calcio y unión al colorante cristal violeta a 35-37 °C; incremento de la resistencia al suero normal humano; producción de una serie de proteínas de membrana externa a 35-37 °C; habilidad para producir conjuntivitis en el cobayo o el ratón, y muerte en ratones adultos y lactantes por inoculación intraperitoneal de organismos vivos.

Los plásmidos asociados con la virulencia pueden ser detectados por gel electroforesis o hibridación de DNA de las colonias. La evidencia reciente, sin embargo, indica que la presencia del plásmido solo no es suficiente para la expresión total de la virulencia de *Yersinia*. La intensidad de la virulencia de algunos plásmidos, tales como la letalidad en el ratón y la conjuntivitis, es variable, dependiendo de los genes portados en el cromosoma bacteriano y el serogrupo, lo cual sugiere que los genes cromosómicos también pueden contribuir a la virulencia de *Yersinia*.

Las cepas virulentas de *Yersinia* invaden las células mamíferas como las HeLa en cultivos celulares. Sin embargo, las cepas que han perdido sus propiedades de virulencia retienen la invasividad a las HeLa, debido a que el fenotipo invasivo de las células mamíferas está codificado por un locus cromosómico. Han sido identificados dos genes cromosómicos de *Y. enterocolitica*, *inv* y *ail*, que codifican el fenotipo de la invasión a células de mamíferos. La transferencia de estos genes en *E. coli* confiere el fenotipo invasivo al hospedador de *E. coli*. El gene *inv* permite un alto nivel de invasión de *Yersinia* a varias líneas de cultivo de tejidos. Sin embargo, los estudios por *Southern blot* muestran que la secuencia del gen *inv* está presente tanto en las cepas invasivas como en las no invasivas. Esto sugiere que el gen *inv* en *Y. enterocolitica* puede no estar directamente correlacionado con la invasividad. La evidencia genética muestra que el gen *inv* es no funcional en los aislamientos no invasivos. El gen *ail* muestra mayor especificidad de hospedador en vista a la invasión celular y parece estar presente sólo en las cepas patógenas de *Yersinia*. El locus *ail*, entonces, puede ser un factor cromosómico de virulencia en *Y. enterocolitica*.

CRECIMIENTO

En los alimentos, el pH óptimo para el crecimiento está en el rango de 4,1-5,1, dependiendo de la temperatura y los acidulantes a un máximo de 10,0, óptimo 7,2-7,4.

En los alimentos envasados al vacío o con mezclas de 100% de N_2 o CO_2/N_2 crece en forma retardada, pero el efecto es más pronunciado a temperatura de refrigeración. Puede crecer con hasta 5% de NaCl (aw=0,945).

EPIDEMIOLOGIA

La transmisión persona a persona puede ocurrir, así como la transmisión dentro de los hospitales. La fuente de infección a

través de animales está principalmente asociada con los porcinos, tanto a través de la lengua y las tonsilas como de los intestinos y las heces. El serotipo O:3 es común en porcinos y puede ser también transportado por animales de compañía. Se han informado aislamiento a partir de ratas e insectos y los alimentos asociados con porcinos y sus productos. También ha sido aislado de productos lácteos, frutas, vegetales y sandwiches. La ingestión de alimentos contaminados es la principal ruta de ingreso.

La diversidad de cepas de *Y. enterocolitica* ha permitido establecer varios biogrupos basados en el comportamiento de las cepas ante las pruebas bioquímicas. La virulencia está mejor sumarizada en términos de estos biotipos, dentro de los biotipos 1B (serotipos O:8, O:4, O:13a,13b, O:18, O:20 O:21), 2 (O:9, O:5,27), 3 (O:1,2,3, O:5,27), 4 (O:3) y 5 (O:2,3) reconocidos como virulentos.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

El aislamiento de *Y. enterocolitica* de alimentos es indiscutiblemente una de las pruebas menos satisfactorias que existen para el estudio de patógenos alimenticios. Una vez aislada una colonia presuntiva de *Y. enterocolitica*, se debe confirmar su pertenencia a un biotipo y serotipo patógeno. El tiempo es, por lo tanto, extenso hasta llegar al diagnóstico definitivo. Es difícil además encontrar un método que sirva como enriquecimiento y que sea selectivo para todos los serotipos. Se ha desarrollado un método de PCR capaz de detectar la presencia de *Y. enterocolitica* patógenas en alimentos.

PATOLOGIA

Las células patógenas de *Y. enterocolitica* ingeridas sobreviven durante el pasaje a través del pH ácido del estómago adhiriéndose a las células de la mucosa de las placas de Peyer (tejido linfático asociado al intestino). La adherencia a estas células se realiza invadiendo las células fagocíticas, multiplicándose extracelularmente y produciendo una respuesta inflamatoria local. El daño a las células epiteliales con función de absorción resulta en mala absorción y pérdida de fluidos (diarrea).

SINTOMATOLOGIA

El período de incubación es de alrededor de 7 días, con un rango de 1-11 días. Los síntomas en niños pequeños (menos de 5 años) son predominantemente de enterocolitis (vómitos, diarrea, fiebre baja y, menos frecuentemente, dolor abdominal). En contraste, los niños mayores sufren dolores abdominales como síntoma más prominente, similar a una apendicitis. Pueden ocurrir bacteriemia y sepsis en individuos inmunocomprometidos.

También puede producir efectos de larga duración, como complicaciones de artritis, septicemia, linfoadenitis, falla hepática y eritema nodoso.

TRATAMIENTO

Los antibióticos no han mostrado capacidad para reducir la gravedad ni la duración de la enfermedad gastrointestinal en niños de menos de 6 años, pero sí pueden prevenir la complicación en niños mayores.

Y. PSEUDOTUBERCULOSIS

Y. pseudotuberculosis es menos ubicua que *Y. enterocolitica*, y a pesar de que está frecuentemente asociada con animales, sólo es aislada rara vez del suelo, el agua o los alimentos. Entre las cepas de *Y. pseudotuberculosis* hay poca o ninguna variación en las reacciones bioquímicas, excepto con los azúcares melobiosa, rafinosa y salicina. Serológicamente (basadas en el antígeno somático termoestable), las cepas de *Y. pseudotuberculosis* están clasificadas en seis grupos, y cada serogrupo contiene cepas patógenas. Las cepas del serogrupo III portan un plásmido de 42 M, como lo hacen las cepas del serogrupo II, que son letales para el ratón adulto.

Los genes de virulencia presentes en el cromosoma de *Y. pseudotuberculosis* también han sido identificados. El gen *inv* es homólogo al de *Y. enterocolitica* y codifica para el factor de invasión a células de mamíferos. El gen *inv* está termorregulado y codifica para una proteína invasiva de PM 103 k, que se une a receptores específicos de las células de mamíferos y facilita la entrada de seudotuberculosis al tejido.

Y. PESTIS

Yersinia pestis es un bacilo gramnegativo, pleomórfico, de tinción bipolar, no móvil, anaerobio facultativo; productor de una de las enfermedades más devastadoras de la humanidad, conocida como peste. Las tres pandemias de peste o muerte negra han producido cientos de millones de muertes. Esporádicamente, hoy día la infección ocurre a nivel selvático a través de ratas y carnívoros que se alimentan de éstas. Los casos humanos también ocurren de manera ocasional, en personas que han sido picadas por la pulga de la rata. En diciembre de 2004 se ha informado en Estados Unidos del caso fatal de un cazador presumiblemente infectado a través de un conejo. Los gatos domésticos pueden padecer la enfermedad y ser diseminadores del microorganismo.

La pulga adquiere el microorganismo al succionar la sangre de los roedores infectados. Estos organismos pierden su cápsula, se multiplican en el tracto intestinal y bloquean parcialmente el proventrículo. Durante la alimentación en el humano, la pulga regurgita algunos microorganismos y se produce la contaminación de la persona picada. Los microorganismos acapsulados son fagocitados y destruidos por los neutrófilos, pero unos pocos sobreviven resintetizando su cápsula. En horas, *Yersinia pestis* está localizada en el bazo, el hígado y los pulmones. Si la infección no es tratada, tiene una mortalidad de hasta el 90%. Los microorganismos que son eliminados por las microgotas producen peste neumónica, que es más difícil de controlar y llega a una mortalidad del 100%.

FACTORES DE PATOGENICIDAD

Plásmido de respuesta de bajo nivel de calcio *(lcr)*, que codifica la habilidad del organismo para crecer en bajos niveles de Ca^{++} (intracelular). También coordina la producción de varios factores de virulencia, tales como el V, W y *yops (Yersinia* proteínas de envoltura).

Proteínas V y W. Estos plásmidos codifican las proteínas asociadas a la proliferación rápida.

Yops es un grupo de 11 proteínas, que están codificadas por plásmidos y son esenciales para la patogénesis en los roedores. Son responsables de la citotoxicidad, la inhibición de la agregación plaquetaria y migración de los fagocitos, y el antígeno de envoltura (F-1) es un complejo proteína polisacárido que es altamente expresada a 37°C en los mamíferos pero no se expresan en las pulgas.

Otros dos plásmidos son el activador de plasminógeno (fibrinolisina) coagulasa: ambos codifican proteínas que promueven la diseminación de las bacterias. El activador del plasminógeno

Tabla 28-1. Características bioquímicas[a] de las especies de *Yersinia*

Reacción	*Yersinia*										
	pestis	*pseudotu-berculosis*	*entero-colitica*	*inter-media*[b]	*frederik-senii*	*kristensenii*	*aldovae*	*rohdei*	*mollaretii*	*bercovieri*	*ruckeri*
Lisina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornitina	-	-	+[c]	+	+	+	+	+	+	+	+
Motilidad											
a 22-26 °C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
a 35-37 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Fenilalanina deaminasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+/-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Celobiosa	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	+/-(+)	+/-(+)	+/-(+)	+/-(+)	+	-	+/-	-	
Sucrosa	-	-	+[c]	+	+	-	-	+	+	+	-
Ramnosa	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
Rafinosa	-	+/-	-	+	-	-	-	+/-	-	-	-
Melibiosa	-	+/-	-	+	-	-	-	+/-	-	-	-
Citrato de Simmons	-	-	-	+/-	+/-	-	-	+	-	-	+
Voges-Proskauer	-	-	+/-(+)	+	+	-	+	-	-	-	-
Indol	-	-	+/-	+	+	+/-	-	-	-	-	-
Salicina	+/-	+/-	+/-	+	+	-(+/-)	-	-	+/-	(+)	
Esculina	+	+	+/-	+	+	-	+	-	(+)	(+)/-	-
Lipasa	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	
Pirazinamidasa	-	-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	

[a] + = positivo luego de 3 días; (+) = positiva luego de 7 días.

[b] Algunas cepas de *Y. intermedia* son negativas para el citrato de Simmons, ramnosa y melibiosa, o rafinosa y citrato de Simmons.

[c] Algunas cepas del biotipo 5 son negativas.

también permite la destrucción de C3b, C5a y 5b, lo cual resulta en una falla de la quimiotaxis, fagocitosis y lisis bacteriana.

DIAGNOSTICO

El diagnóstico se basa inicialmente en la clínica por la apariencia de los bubones y se confirma por cultivo de los nódulos linfáticos. Este procedimiento es muy riesgoso ya que es altamente infeccioso.

PREVENCION Y TRATAMIENTO

La hospitalización y el estricto aislamiento es la regla. La estreptomicina y la tetraciclina son muy eficaces. Los cazadores deben usar guantes cuando limpian sus presas. No se debería comer en picnics o campamentos donde hubiese posible presencia de roedores, y nunca se deben manipular animales o roedores enfermos o naturalmente muertos. No deberían llevarse las mascotas a áreas rurales.

La enfermedad es de informe obligatorio. El manejo y vigilancia de la peste urbana se basa en el control de los roedores.

BIBLIOGRAFIA

Ghaffar A. Zoonosis. PAMB 650/720 Medical Microbiology. Otoño 2003 Lecture: 39-40.

Lake R, Hudson A, Cressey P. *Yersinia Enterocolitica*. In Pork Prepared as part of a New Zealand Food Safety Authority contract for scientific services March 2004.

Olson ME. Human and Animal Pathogens in Manure. Microbiology and Infectious Diseases. University of Calgary. 2004.

ProMED-mail [promed@promed.isid.harvard.edu]. promed@promedmail.org. http://www.chieftain.com/metro/1102799203/2. 11 de Dic. 2004.

ProMED-mail [promed@promed.isid.harvard.edu]. promed@promedmail.org. http://www.collegian.com/vnews/display.v/ART/2004/11/09/419067c0089df. 9 Nov. 2004.

Stephen DW, Feng P, Stanfield JT. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition. Revision A, 1998. Chapter 8.

Capítulo 29

VIBRIO

Nélida Amelia Leardini

INTRODUCCION

Se ubica en la familia Vibrionaceae, denominación propuesta por Véron en 1965, para agrupar bacilos gramnegativos anaerobios facultativos, fermentadores de glucosa, que además son en su mayoría oxidasa positivos y móviles por flagelos polares, a los efectos de diferenciarlos de los integrantes de la familia Enterobacteriaceae, los cuales son oxidasa negativos y en su mayoría móviles por flagelos perítricos. Estudios comparativos de caracteres fisiológicos y genéticos indicarían un origen evolutivo común.

Las especies de *Vibrio* son propias de ambientes hídricos, tanto marinos como de agua dulce, y se las asocia con animales acuáticos. Varias de las especies son patógenas para el hombre, peces, batracios, anguilas, y otros vertebrados e invertebrados.

Dado que los microorganismos que integran esta familia poseen la característica de ser oxidasa positivos, es muy importante, desde el punto de vista microbiológico, no confundirlos con Pseudomonadales, bacilos gramnegativos, no fermentadores, que se desarrollan con dificultad en ausencia de oxígeno. Los llamados bacilos gramnegativos no fermentadores, cuando utilizan hidratos de carbono se lo hacen siempre por la vía oxidativa, excepto cuando existen en el medio compuestos que actúan como aceptores terminales de electrones.

El género *Vibrio* es el más importante de la familia Vibrionaceae. Hasta hace poco tiempo, *Vibrio cholerae* O1 era sinónimo del género, ya que se relacionaba esta especie con las diversas epidemias y pandemias de cólera.

El actual interés por otras especies del género *Vibrio* ha surgido como consecuencia de numerosos casos documentados de infecciones. Aunque la mayoría se produce en zonas costeras, cada vez hay más informes de procesos gastrointestinales y de heridas, tanto en humanos como en animales, que se han dado en regiones interiores, aun alejadas de las costas. Se considera que ello puede deberse al aumento del consumo de productos de mar, especialmente aquellos con poca cocción. También los viajeros podrían contribuir a la diseminación, cuando retornan a su lugar de residencia habitual, sobre todo durante la temporada estival después del período vacacional.

CARACTERES	Vibrionaceae	Enterobacteriaceae
Bacilos gramnegativos	+	+
Fermentadores de glucosa	+	+
Oxidasa	+	-

ESTUDIOS GENOMICOS DE *VIBRIO CHOLERAE*

El análisis del genoma ha mostrado la existencia de dos cromosomas circulares: ori CI (vc); y ori CII (vc), el mayor de aproximadamente 3.000.000 pares de bases y el menor, de 1.000.000 pb.

El porcentaje de G+C es muy similar en ambos cromosomas. En el cromosoma 1 se encuentran la mayoría de los genes requeridos para el crecimiento y el mantenimiento de la viabilidad. Existe además una zona integrón que estaría relacionada con la resistencia a los antimicrobianos. En el segundo cromosoma se hallaron también genes indispensables. En ambos hay orígenes de replicación. Muchos genes están duplicados en los dos cromosomas.

El origen del segundo cromosoma podría ser un megaplásmido, ya que en el cromosoma 1 es muy similar a los cromosomas de cualquier otra bacteria, mientras que el 2 es semejante al de los plásmidos. Además, la presencia de integrones es común en plásmidos. Es probable que este megaplásmido haya sido adquirido por una especie ancestral del género *Vibrio* y que luego se hayan transmitido al cromosoma 2 algunos genes indispensables para la bacteria. La adquisición de ese segundo cromosoma tiene que haber sido un evento ocurrido hace mucho tiempo, porque los porcentajes de G+C son muy similares.

Se supone que la presencia del cromosoma 2 debe conferir a *Vibrio cholerae* alguna ventaja evolutiva, porque de lo contrario se hubiera integrado al cromosoma 1.

ECOLOGIA Y MICROBIOLOGIA DE *VIBRIO CHOLERAE*

Se trata, sin duda, de un microorganismo que se encuentra en dos hábitats bien diferenciados, como lo son el tracto intestinal humano y los ambientes acuáticos. Debido a la grave patología que causa en humanos y los problemas sanitarios que provoca en los diferentes países, sobre todo donde el cólera es endémico, ha recibido enorme atención desde el punto de vista médico. Pero a los ecosistemas naturales donde se encuentra, no se les ha prestado hasta ahora gran atención, y esto es llamativo, dado que el cólera es el más persistente y global problema de salud mundial y lo es mucho más ahora que en décadas pasadas, por los rápidos desplazamientos humanos que causa el uso intensivo y popularizado de la aviación.

Es una enfermedad infecciosa endémica en lugares como India y Bangladesh, pero puede ser emergente o reemergente en cualquier lugar, especialmente en países subdesarrollados, con instalaciones sanitarias inadecuadas o inexistentes. Los riesgos aumentan frente a catástrofes naturales, como inundaciones, terremotos, guerras. A ello se añaden los cambios climáticos y el incremento de la globalización, que agrega áreas geográficas con riesgo de brotes.

Cuando la bacteria ingresa al organismo por vía oral, sigue la ruta digestiva hasta el intestino delgado, donde se adhiere a la mucosa y comienza a producir la toxina colérica (CT). Cuando se genera cantidad suficiente de toxina, causa diarrea intensa y se liberan numerosos microorganismos al ambiente, con lo cual se disemina la enfermedad en forma epidémica.

Siempre se consideró que *V. cholerae* sobrevivía cortos períodos fuera del intestino humano, pero investigaciones de los últimos años demostraron que se encuentra en abundancia naturalmente a lo largo de todo el mundo, en agua dulce, ecosistemas marinos y estuarios, dado que es muy adaptable su actividad metabólica según el medio donde se encuentre. En los ambientes acuáticos se adhiere a superficies de plantas, algas, copépodos, crustáceos e insectos.

A ello debe agregarse la demostración de la supervivencia ambiental de *V. cholerae* durante largos períodos, asociado a algas verdes mucilaginosas (*Anabaena* sp), especialmente cuando las cepas ambientales están codificadas para producir una mucinasa (proteasa soluble).

Aunque algunos brotes de cólera coinciden con la expansión estacional de las algas, no están dilucidados todos los factores que capacitan a este patógeno para persistir en la naturaleza. Resalta la información que indica que puede adoptar formas viables no cultivables (VNC). Es evidente que su adaptación es sumamente dinámica.

EPIDEMIOLOGIA

Si bien la existencia del cólera asiático era conocido desde mucho tiempo atrás, por lo menos desde los tiempos de Hipócrates, es recién a partir del estudio de John Snow, publicado con el título emblemático "Sobre el modo de transmisión del cólera", cuando se demostró que "la vía abierta que le permite extenderse por sí mismo y atacar aún a las clases acomodadas de la comunidad lo constituye el hecho de que las evacuaciones de los enfermos de cólera se mezclan con el agua que se usa para beber y para el consumo doméstico, ya sea atravesando el terreno que rodea pozos o cisternas, o bien corriendo por canales que desaguan en ríos de donde a veces las poblaciones se abastecen de agua". Ese trabajo constituyó un hito de la epidemiología de una enfermedad conocida desde hacía más de mil años, sin que se supiera su origen infeccioso.

Desde el descubrimiento del coma-bacilo por Robert Koch en 1883, hasta 1992 todo el cólera epidémico se consideraba causado por un serogrupo solo, *Vibrio cholerae* O1, el cual está compuesto por dos biotipos con significación epidemiológica: Clásico y El Tor. Estos biotipos se diferencian por pruebas de laboratorio que incluyen sensibilidad a polimixina, hemólisis en agar sangre y aglutinación de eritrocitos de carnero, entre otras. Las cepas El Tor provocan mayor proporción de casos asintomáticos (portadores) que el biotipo Clásico. En la localización más antigua de la enfermedad, en el sur de Bangladesh, predomina el biotipo Clásico, aunque en las últimas pandemias primó El Tor. Además, *V. cholerae* posee dos serotipos principales, Inaba y Ogawa, los cuales comparten un antígeno A. Hay otro serotipo –Hikojima– de rara aparición.

Desde 1817 se han producido siete pandemias de cólera; la más reciente comenzó en 1961 y alcanzó a Sudamérica en los comienzos de 1990. Hasta no hace mucho tiempo era admitido universalmente que la diarrea causada por *V. cholerae* no-O1 nunca podía tomar proporciones epidémicas, semejantes a la enfermedad causada por el serogrupo O1. A partir de octubre de 1992, hubo diversos brotes de diarrea coleriforme grave en el sur de la India (Madras, Madurai, Vellore, Calcuta), en Bangladesh y posteriormente en Tailandia. En Bangladesh hubo más de 100.000 casos informados y alrededor de 1500 muertes a fines de marzo de 1993.

El organismo causal fue una cepa de *V. cholerae* no-O1, sin relación con los serogrupos conocidos de *V. cholerae*. Ese serogrupo epidémico se designó como O139 o "Vibrio Bengal". La toxina producida por este vibrio está muy relacionada con la toxina colérica.

Una de las características prominentes de *V. cholerae* O139, que la diferencia claramente de otras cepas no-O1, es su habilidad para causar brotes explosivos de cólera y diseminarse velozmente. En el lapso de 1 año, a partir del primer brote informado en octubre de 1992, se expandió del distrito este de India hacia Bangladesh, Nepal, Tailandia, Malasia, Singapur y sur de China. Desde el distrito oeste, hacia Pakistán y Arabia Saudita.

Son obvias las semejanzas culturales, fisiológicas y genéticas entre *V. cholerae* O139 y *V. cholerae* O1, especialmente con el biotipo El Tor. La diferencia más importante entre ambas es la presencia de cápsula en *V. cholerae* O139, lo cual lo hace parecido a los *Vibrio cholerae* no-O1. Por ello algunos autores postulaban dos hipótesis sobre su origen:

- La cepa El Tor ha mutado produciendo un nuevo serogrupo;
- Un *V. cholerae* no-O1, desconocido hasta ese momento, habría adquirido los genes necesarios de virulencia de una cepa El Tor. Este segundo supuesto implicaría la existencia de una cepa ancestro de *V. cholerae* O139.

Tabla 29-1. Diferenciación de especies de *Vibrio*

	REACCIONES DE DISTINTAS ESPECIES DE VIBRIO											
	cholerae	*mimicus*	*metschnikovii**	*cincinnatiensis*	*hollisae*	*damsela*	*fluvialis*	*furnissii*	*alginolyticus*	*parahaemolyticus*	*vulnificus*	*carchariae*
Crecimiento en NaCl 0%	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl 1%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa			-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NO_3 a NO_2			-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. de m-Inositol	-	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-
ADH					-	+	+	+	-	-	-	-
LDC					-				+	+	+	-
CDC					-							

* Unica especie oxidasa negativa.

Debido a la gran semejanza (> 98%) en los esquemas de restricción rRNA, se ha definido un clon de vibrios El Tor y vibrios O139, como subtipos VIIIA y VIIIB respectivamente.

Esto concuerda con la sugerencia de que *V. cholerae* O139 pudo haber surgido por interacciones de genes serotipo-específicos de un vibrio El Tor.

La rápida diseminación de esa cepa epidémica de *V. cholerae* no-O1 llevó a pensar en aquel momento sobre la posibilidad del comienzo de la octava pandemia.

PATOGENESIS

Vibrio cholerae es causante de enfermedad humana, porque cuando la bacteria es ingerida, puede adaptarse para colonizar el tracto intestinal. En el intestino delgado ataca la superficie de las mucosas y produce una exotoxina, llamada toxina colérica (CT), la cual actúa sobre las células de la mucosa. Estas células poseen un conjunto de bombas de transporte de iones (Na^+, Cl^-, HCO_3^-, K^+), que en condiciones normales mantienen un estricto control sobre el flujo de electrólitos a través de la mucosa intestinal. Debido a que el agua puede cruzar libremente las membranas, la única vía de control del flujo de agua dentro y fuera del tejido es el nivel de la concentración de iones en los diferentes compartimientos del cuerpo. El efecto de la toxina colérica es el de alterar este balance. Aparentemente no provoca daño tisular, pero disminuye el flujo de sodio dentro del tejido y causa una salida de cloruro (y agua) fuera de él y hacia el lumen, dando como consecuencia una diarrea acuosa masiva y desequilibrio electrolítico. Una persona afectada puede perder 20 litros de agua diarios.

FACTORES DE VIRULENCIA

Hasta hace algunos años, se consideraba que el cólera era una enfermedad simple y bien conocida. Desde ese punto de vista, la virulencia de *V. cholerae* podía ser explicada mediante tres factores:

- Presencia de flagelos, los cuales conducen a la bacteria hasta la superficie mucosa;
- Pili, median la adherencia a las células;
- Exotoxina (toxina colérica), que actúa sobre las células mucosas causando la diarrea acuosa aguda.

Estudios posteriores han demostrado que la secuencia de la enfermedad a nivel molecular es mucho más compleja. La regulación de los factores de virulencia indicaría que la bacteria sufre cambios adaptativos para acomodarse al organismo humano y eso sólo para poder colonizar las mucosas, sin tener en cuenta además los cambios necesarios para la invasión y la infección. Por otra parte, algunas cepas de *V. cholerae* producen conjuntamente otras toxinas, las cuales juegan algún papel. Tampoco las células de las membranas mucosas serían pasivas. Existiría una interacción compleja entre ambas, en la cual las células contribuirían a su propia intoxicación.

Tabla 29-2. Diferenciación de biogrupos de *Vibrio cholerae*

CARACTERES	BIOGRUPOS	
	Clásico	El Tor
Voges-Proskauer	-	+
Polimixina	S	R
Hemólisis de eritrocitos	-	+/d

En la actualidad, los principales determinantes de virulencia en cepas de *V. cholerae* epidémicas se consideran:

- Toxina colérica (CT): una potente enterotoxina.
- Factor de colonización (pili-toxina-regulado).
- Proteína regulatoria (ToxR).

En los últimos años se ha demostrado que esos factores de virulencia están codificados dentro de los genomas de dos bacteriófagos filamentosos.

Además, otro hecho llamativo es el aumento de la frecuencia de cepas carentes de esos factores de patogenicidad denunciadas como causantes de cuadros diarreicos semejantes al cólera, leves a intensos. Esas cepas eran consideradas antes como *V. cholerae* O1 no toxigénico (NT). En algunos países se tiende a mencionar cepas *V. cholerae* O1 variantes.

RECOLECCION Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

Las muestras fecales deben recogerse en los primeros estadios de la enfermedad, dado que el número de microorganismos disminuye rápidamente después de la aparición de los síntomas. Si se inicia terapia antibiótica, la declinación es mayor. En ese caso, la muestra sólo puede ser útil para determinación de anticuerpos antivibrio o antitoxina. Si se demorase más de 2 horas para llegar al laboratorio, debe emplearse un medio de transporte, siendo aconsejado el de Cary y Blair. También puede emplearse agua peptonada alcalina (pH 8,5) para enriquecimiento y transporte, si la demora no fuera mayor de 6 a 8 horas. El envío al laboratorio no requiere refrigeración. Las muestras extraintestinales no imponen procedimientos especiales de recolección o transporte, sólo medios que eviten la desecación.

CULTIVO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACION

Vibrio spp crece bien en los medios sólidos comunes empleados en el laboratorio, agar sangre y agar Mac Conkey. Cuando se procesan muestras intestinales, resultan mejores los medios selectivos, siendo TCBS (tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa) el más usado, ya que se obtiene comercialmente, no necesita esterilización, es muy selectivo y contiene sacarosa, la cual permite la diferenciación de *V. cholerae* (sacarosa positivo) y *V. parahaemolyticus* (sacarosa negativo). Con las colonias aisladas se procede a la identificación por pruebas bioquímicas y desarrollo frente a distintas concentraciones de cloruro de sodio.

De las especies reconocidas en el género *Vibrio*, sólo poco más de una decena se consideran patógenas para el hombre y sólo algunas han sido incriminadas como causa potencial de diarrea.

Para ciertas especies, la identificación serológica es muy importante, tanto clínica como epidemiológicamente. En el caso de *V. cholerae* hay numerosos antígenos O-específicos. Estos antígenos son polisacáridos termoestables, que forman parte del lipopolisacárido de envoltura celular. Los distintos serogrupos no pueden ser diferenciados bioquímicamente.

La determinación de biotipos no es necesaria para control o tratamiento de los pacientes, pero puede ser de gran importancia epidemiológica o en salud pública, para ayudar en la identificación de la fuente de infección, especialmente cuando el cólera es aislado por primera vez en un país o en un área determinada. De acuerdo con lo mencionado, conviene recordar:

Tabla 29-3. Diferencias bioquímicas de *Vibrio* spp causantes de diarrea

	V. cholerae O1/No-O1	*V. mimicus*	*V. parahaemolyticus*	*V. alginolyticus*	*V. fluvialis*	*V. furnissii*	*V. hollisae*
TCBS	Amarillo	Verde	Verde	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Verde
Sacarosa	+	0	0	+	+	+	0
Indol	+	+	+	+/-	-/+	-/+	+
Gas de Glucosa	0	0	0	0	0	+	0
NaCl 10%	0	0	0	+	0	0	0
LDC	+	+	+	+	0	0	0
ADH	0	0	0	0	+	+	0
ONPG	+	+	0	0	-/+	-/+	0
Arabinosa	0	0	+/0	0	+	+	+

* Todos los O-grupos de *V. cholerae* comparten un antígeno flagelar (H) termolábil.
* *Vibrio cholerae* serogrupo O1 posee 3 serotipos o subtipos: Inaba, Ogawa, Hikojima.
* *V. cholerae* O1 posee dos biotipos: Clásico y El Tor.
* La biotipificación no es adecuada para *V. cholerae* no-O1, aun para el serogrupo O139.
* Las pruebas pueden dar resultados atípicos en cepas no toxigénicas de *V. cholerae* O1.

TRATAMIENTO

El tratamiento indicado para la diarrea causada por *V. cholerae* es el remplazo de fluidos. La mayoría de las cepas, en general, son sensibles in vitro a tetraciclinas, cloranfenicol, ampicilina y aminoglucósidos. *V. alginolyticus* es resistente a la ampicilina.

En infecciones de heridas es prioritario desbridarlas y cuidarlas, y en ocasiones mejoran sin antibióticos. En septicemias es conveniente administrar antibióticos parenterales, aunque el resultado final estará determinado por la enfermedad de base.

PERSPECTIVAS FUTURAS

El gran desafío consiste en el desarrollo de vacunas seguras y eficaces para proteger del cólera a enormes grupos poblacionales de gran exposición, debido a las condiciones socioeconómicas imperantes en amplias zonas geográficas, donde esta antigua enfermedad es endémica. También es necesario proteger a los viajeros muy expuestos dentro de un mundo globalizado. Ello estará condicionado a la identificación y caracterización de los inmunógenos y los factores reactogénicos, sobre todo determinar su papel durante el proceso infeccioso. Si en alguno de esos factores fuese posible desacoplar la fracción virulenta de la capacidad protectiva, podría intentarse la producción de cepas vacunales vivas atenuadas.

INFECCIONES POR VIBRIO EN PECES

INTRODUCCION

Aunque el acuocultivo es una ciencia antigua, no ha seguido el ritmo del desarrollo tecnológico de los métodos intensivos de producción animal o vegetal. El manejo exitoso de los sistemas de acuocultivo depende de los mismos principios generales de la agricultura. Para una producción animal masiva y eficiente, se requiere la crianza de animales genética y nutricionalmente estandarizados, en un ambiente muy bien manejado.

Las enfermedades bacterianas epidémicas son comunes en poblaciones densas de peces cultivados o de acuarios. La predisposición a tales brotes está relacionada con la mala calidad del agua, la carga orgánica del ambiente acuático, el manipuleo y transporte de peces, cambios marcados de temperatura, hipoxia y condiciones estresantes.

Altas concentraciones de bacterias asociadas al agua son halladas normalmente en estanques y acuarios. Muchas de estas bacterias acuáticas son patógenos oportunistas facultativos, activados por ambientes adversos u hospedadores debilitados. Pero también existen los patógenos primarios, como los de las aletas de peces, que requieren invadir esos tejidos para su replicación y son incapaces de sobrevivir por largo tiempo en el ambiente acuático fuera del hospedador. La mayoría de los patógenos bacterianos de peces son bacilos gramnegativos aerobios.

Las infecciones por *Vibrio* spp se producen en peces de ambientes marinos abiertos o de estuarios, y su distribución es mundial. Esas patologías, denominadas vibriosis, también se observan en algunos peces de agua dulce. La mortalidad es muy alta, sobre todo cuando se producen en cultivos industriales de peces. Algunas de las patologías poseen un nombre particular, como la peste roja de anguilas, la furunculosis de agua salada y el furúnculo rojo. La diseminación es muy rápida cuando los animales están hacinados en sistemas industriales. En esos casos, la morbilidad puede alcanzar el 100 %. Se destacan las especies más involucradas con estas patologías:

V. alginolyticus
V. anguillarum
V. carchariae (aislado en diversas especies de tiburones)
V. damsella
V. ordalli
V. vulnificus (aislado de anguilas, principalmente en Japón).

Casi todos ellos también causan enfermedad en humanos, después de ingerir peces o mariscos contaminados o por contactos con animales enfermos. La mayor parte de los procesos graves se limita a individuos con inmunosupresión, patología hepática o SIDA. Por ello es importante usar guantes al examinar peces enfermos y lavar rigurosamente las manos con jabones bactericidas. Serían patologías tanto de origen alimentario como laborales.

La infección en los peces comienza con el letargo del animal y el rechazo de alimento, pero cuando avanza la enfermedad, surgen

los problemas de piel, con zonas decoloradas, rojizas y necróticas. Aparecen furúnculos dolorosos, que a veces se rompen hacia el exterior, generando grandes llagas abiertas. Es frecuente el eritema alrededor de la boca y las aletas. Cuando el cuadro se generaliza, se torna sistémico, con el tracto intestinal sanguinolento, pleno de líquidos; además los animales muestran marcada exoftalmia. Todos estos signos no son exclusivos de la vibriosis, dado que se observan en otras patologías bacterianas de peces.

Si bien la vía de infección no está dilucidada, se supone la transmisión oral, puesto que se han aislado varias especies de *Vibrio* en el tracto intestinal de peces sanos. Bajo ciertas condiciones, el microorganismo atraviesa la pared intestinal, produciendo enfermedad diseminada, lo cual infecta a otros peces y genera brotes con gran número de animales afectados.

En los últimos años se han difundido cada vez más los sistemas industriales de cría de peces, los denominados acuocultivos, cuya importancia económica y comercial ha adquirido índices muy significativos a nivel mundial, y nuestro país no está fuera de esa tendencia, sino muy por el contrario, se han volcado numerosos recursos en investigación, ya sea para el cultivo en sí como para el control de las enfermedades que pueden afectar esas verdaderas "granjas de peces".

En esos sistemas comerciales confinados de cría de peces, estos se hallan muy hacinados, de modo que los brotes por infecciones bacterianas se expanden con extrema rapidez. Por ello, igual que en medicina, la prevención del buen estado sanitario de la población es fundamental en el proceso productivo. El control de los microorganismos oportunistas es crítico en condiciones ambientales estresantes, las cuales deben ser evitadas para impedir la diseminación. Si bien la mala calidad del agua o de la alimentación, la superpoblación, el manipuleo incorrecto y la presencia de agentes bacterianos infecciosos son factores que aumentan las posibilidades de brotes infecciosos, ya sea por *Vibrio* u otros organismos, también hay que controlar la presencia de parásitos, los cuales podrían causar lesiones tisulares, generando localizaciones ideales para el inicio del proceso infeccioso bacteriano. Incluso los tan comunes tratamientos químicos que emplean sales de cobre pueden ser dañinos o predisponentes para los peces y desencadenar los brotes por *Vibrio*.

Hay que imponer la cuarentena de los nuevos peces sanos y mantener siempre buenas condiciones sanitarias para minimizar la transmisión y, consecuentemente, los brotes. Los nuevos siempre alejados de los ya existentes. La infraestructura debe mantenerse limpia y se deben desechar los elementos inútiles.

TRATAMIENTO

Además de las buenas prácticas de calidad en el manejo ambiental y poblacional de las estructuras industriales de producción, en ciertos casos es común el empleo de antimicrobianos para evitar brotes infecciosos. Al margen de las pruebas de sensibilidad sobre el microorganismo involucrado, deban seleccionarse aquellos aprobados por FDA (Food and Drug Administration), para uso en instalaciones productoras de peces para consumo en alimentación humana. Se suministran tetraciclinas, particularmente oxitetraciclina, en alimentos que se esparcen en el agua y deben ser empleados durante 10 días. Los animales así tratados no deben ingerirse antes de los 21 días posteriores a la finalización del tratamiento, para asegurar la completa eliminación del antibiótico residual en las partes comestibles. También está prescripto el uso de sulfamidas, asociadas en alimentos flotantes, durante 5 días. En algunos peces, el tiempo de eliminación es de sólo 3 días, cuando el pescado se utiliza pelado, dado que el antibiótico se fija en la piel. En los salmones, el tiempo de eliminación es de 6 semanas, ya que no se pelan durante el procesamiento. Cualquier antibiótico puede ser útil si la cepa es sensible a él y si el pez ingiere suficiente alimento para mantener la concentración del medicamento en el torrente circulatorio durante todo el período requerido. Estos agentes también se usaron para peces ornamentales, aunque en esos casos se descargaba directamente el antibiótico en la pecera; pero esta modalidad hoy se considera de último recurso, y es preferible introducir el medicamento por vía alimentaria o inyectable.

INMUNOTERAPIA

Existen vacunas en el comercio, sobre todo para la vibriosis en salmones. Si bien no están clarificados los mecanismos de inmunidad, se ha comprobado que los peces vacunados sobreviven en mejores condiciones que los no inmunizados. Generalmente son vacunas bivalentes, o sea que dan protección para dos especies patógenas diferentes de *Vibrio* (por ej., *V. anguillarum* y *V. ordalii*). Por lo común son vacunas elaboradas con suspensiones de los microorganismos calentados y sonicados. Se administran por inmersión, inyectables o por vía oral.

BIBLIOGRAFIA

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition, 2001. Williams & Wilkins Co., Baltimore, U.S.A.

Manual of Clinical Microbiology, 8th edition, 2003. ASM Press, Herndon, VA, U.S.A.

Osorio G, Camilli A. Hidden dimensions of *Vibrio cholerae* pathogenesis. ASM News 2003; 69 (8) :396-401.

Albert MJ. *Vibrio cholerae* O139 Bengal. J Clin Microbiol. 1994; 32: 2345-2349.

Mitra R, et al. Cell vacuolation manifestation of El Tor hemolysin of *V.cholerae*. Inf Inmun. 2000; 68 (4) :1928-1933.

Singh DV, et al. Molecular analysis of *V. cholerae* O1, O139, non-O1, non-O139 strains: clonal relationships between clinical and environmental isolates. Appl Environ Microbiol. 2001; 67 (2) :910-921.

Vuddhakul V, et al. Isolation of a pandemic O3:K6 clone of *V. parahaemolyticus* strain from environmental and clinical sources in Thailand. Appl Environ Microbiol. 2000; 66 (6) :2685-2689.

Cerdá-Cuéllar M, Jofre J, Blanch AR. A selective medium and a specific probe for detection of *Vibrio vulnificus*. Appl Environ Microbiol. 200; 66 (2) :855-859.

Chattopadhyay DJ. New phage typing scheme for *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor strains. J Clin Microbiol. 1993; 31 :1579-1585.

Hoge CW. Epidemiology and spectrum of *Vibrio* infections in a Chesapeake bay community. J Infect Dis. 1989; 160 :985- 993.

Kreger AS. Cytolytic toxins of pathogenic marine *Vibrio*. Source of bacterial proteins toxins. Academic Press Inc. 1991.

Nakasone N, Iwanaga M. Pili of *Vibrio cholerae* non-O1. Infect Immun. 1990; 58:1640-1646.

Capítulo 30

AEROMONAS

Nélida Amelia Leardini

INTRODUCCION

Los microorganismos que ahora se conocen como *Aeromonas* probablemente fueron descritos en el siglo XIX (1890) por Zimmerman, quien a partir de aguas para beber aisló bacterias que se desarrollaban en forma de colonias puntiformes; de allí que las denominó *Bacillus punctatus*.

La patogenicidad de cepas de *Aeromonas*, llamadas también *Bacillus hydrophilus*, frente a ranas, lagartos y aun animales de sangre caliente (gatos, perros, roedores, palomas y aves de corral) fue demostrada poco tiempo después de la publicación de Zimmerman. Las infecciones humanas no fueron documentadas hasta pasado 1950, cuando se aisló de material de autopsia de una mujer muerta por miositis metastásica. Desde entonces, los informes sobre patología por *Aeromonas* han aumentado en forma constante.

Otro grupo de organismos fue descrito en 1894 como *Bacterium salmonicida*, hoy llamada *Aeromonas salmonicida*, el cual es patógeno para peces, por lo cual su control tiene un papel económico muy importante en la cría industrial de estos animales. Posee características fenotípicas distintas de las otras especies de *Aeromonas* (es psicrófilo e inmóvil), pero los estudios de DNA indican una relación cercana entre especies móviles e inmóviles.

En la última década hubo un aumento del interés por este género como patógeno humano y animal. Ello se debe a su asociación con enfermedad gastrointestinal, a los potenciales factores de virulencia y a su complicada taxonomía actual.

EPIDEMIOLOGIA

Aeromonas es una bacteria saprófita de amplia distribución, fundamentalmente en ambientes acuáticos de agua dulce y también salobre. Es un patógeno oportunista en peces y en humanos. Es también reconocido como un comensal del intestino de animales de sangre fría, peces, reptiles, anfibios y sanguijuelas. Se ha postulado que *Aeromonas* es un simbionte intestinal y que sus enzimas proteolíticas contribuirían a la digestión de los alimentos que ingiere el hospedador. Existe controversia sobre si son parte de los microorganismos fecales del humano. La portación intestinal humana es rara, siendo más frecuente en los trópicos.

Caselitz habría sido el primero en describir la enteropatogenicidad de *Aeromonas* spp en 1958. Este autor aisló en forma reiterada una cepa de *Aeromonas* en un niño con enteritis de Jamaica y demostró la presencia de aglutininas en el suero. Estos hallazgos fueron seguidos rápidamente por otros informes, que involucraban en especial cepas que ahora serían clasificadas como *A. sobria* o *A. hydrophila*. Otro rasgo en común fue la relación de tales infecciones con regiones subdesarrolladas de India, Malasia, Jamaica y Tailandia. Contrariamente *A. caviae*, ha sido considerado siempre como un agente etiológico, aun en casos que no implicaban viajes previos y recientes a países en desarrollo.

Evidencias clínicas y epidemiológicas indicarían que ciertas especies de *Aeromonas* son realmente enteropatógenas, a pesar de no cumplirse todos los postulados de Koch (falta de modelo animal). Precisamente uno de los más interesantes síndromes clínicos asociados con especies de *Aeromonas* han sido las graves infecciones de heridas ocurridas en individuos, después de ser sometidos a terapia con sanguijuelas medicinales.

Ultimamente hubo un incremento en el uso de esta práctica antigua para eliminar la congestión venosa subsiguiente a cirugía plástica o microvascular, que involucran trasplantes o injertos de piel. Hay publicaciones que citan casos de infecciones por *Aeromonas* resultantes de tal terapia. La recuperación se logró luego de desbridar las heridas y con tratamiento antibiótico. La fuente de la enfermedad parecen ser las sanguijuelas (*Hirudo medicinalis*), las cuales portan simbióticamente aeromonadales en su intestino, a efectos de facilitar la digestión enzimática del material hematológico que ingieren.

Ciertamente hoy se acepta que sobre todo cepas de *A. hydrophila* son capaces de causar enfermedad en peces, en anfibios y en humanos, quienes pueden sufrir infecciones a través de heridas abiertas en contacto con el agua, o por ingestión de un número suficiente de microorganismos presentes en el agua o en alimentos contaminados.

Se admite que pueden provocar gastroenteritis en personas sanas o cuadros septicémicos en inmunodeprimidas, o en pacientes con procesos oncológicos. En relación con la gastroenteritis, prosiguen algunas controversias. Según algunos autores, se asocia a dos tipos diferentes de gastroenteritis. Cuadros similes a coléricos con diarrea acuosa y otros de tipo disentérico con diarrea mucosanguinolenta. No se conoce la dosis infectante, pero hay casos estudiados donde la ingesta accidental de agua fue escasa y, sin embargo, se aisló *A. hydrophila* de las heces del enfermo. Todas las personas serían susceptibles de adquirir gastroenteritis, pero se observa con más frecuencia en niños pequeños, y las infecciones más graves se dan cuando hay compromiso previo de la salud.

En esta controversia sobre la participación de *Aeromonas* spp en cuadros gastrointestinales, hay estudios recientes procedentes de la India donde se han aislado 67 cepas de *Aeromonas* spp como patógeno único en las heces de 1485 pacientes con gastroenteritis aguda. *Aeromonas hydrophila* fue el aislamiento predominante (64,2%), seguido por *A. sobria* (28,4%) y *A. caviae* (7,4%).

Otro estudio también originario de la India, cuyo objetivo ha sido establecer diferencias entre las especies de *Aeromonas* de origen clínico respecto de las provenientes del ambiente, en relación con sus caracteres bioquímicos, serogrupos y factores de virulencia, a efectos de encontrar un marcador fenotípico de enteropatogenicidad, no mostró diferencias significativas útiles. La diferencia detectada en la capacidad de producir b-hemolisina en un alto porcentaje de cepas ambientales no resulta un marcador satisfactorio de enteropatogenicidad, justamente por su gran distribución ambiental y la baja incidencia de gastroenteritis por *Aeromonas* spp provenientes del ambiente.

En cuanto a la asociación con el origen alimentario, *A. hydrophila* se ha encontrado con más frecuencia en peces y en mariscos, aunque también se halló en muestras comerciales de carnes rojas (cordero, bovino, porcino) y en aves de corral.

TAXONOMIA

En la edición del Manual de Bergey (1984, volumen 1), se citaban sólo cuatro especies del género *Aeromonas*, identificables por sus caracteres fenotípicos: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria* y *A. salmonicida*. De esta última se presentaban tres subespecies: *salmonicida*, *achromogenes* y *masoucida*. Aún en aquel entonces se postulaba que la clasificación de *Aeromonas* no estaba absolutamente establecida a nivel específico y se pensaba que *A. salmonicida* y las especies de *Aeromonas* móviles constituían dos agrupamientos distintos.

Smith (1963) propuso un nuevo género, "*Necromonas*", para ubicar las cepas de *A. salmonicida*. El nombre "*Necromonas salmonicida*" fue sugerido como alternativa para cepas de *A. salmonicida* productoras de pigmento marrón y "*N. achromogenes*" para las no pigmentadas. Los estudios de homología de DNA desecharon estas propuestas al demostrar el grado muy cercano de relación de *A. salmonicida* con las especies móviles. Basado en marcadores bioquímicos, Schubert (1967, 1969) sugiere las tres subespecies de *A. salmonicida*.

A partir de 1984, se incluyen cuatro especies nuevas sobre la base de características fenotípicas: *A. media*, *A. veronii*, *A. eucrenophila*, *A. schubertii*. Además se incorpora otra subespecie de *A. salmonicida* subsp. *smithia*. Toda esta diferenciación fenotípica no refleja cabalmente la gran heterogeneidad genética del género, tal como se ha demostrado por hibridación DNA-DNA.

Los marcadores fenotípicos no permiten una identificación confiable a nivel de genoespecies (grupos de hibridación). Sin embargo, para los laboratorios de diagnóstico microbiológico es muy importante la identificación fenotípica, ya que implica diferencias epidemiológicas, clínicas y de perfiles de sensibilidad antibiótica, entre las especies. Esto puede resumirse merced a las correlaciones de etiopatología halladas:

A. veronii biotipo sobria asociada a bacteriemia.
A. schubertii asociada a infección de heridas en contacto con agua.
A. caviae relacionada con diarrea en pediatría.
A. hydrophila con heridas infectadas y procesos relacionados con el uso de sanguijuelas.

En la última edición del Manual de Bergey (2001), se han presentado grandes cambios taxonómicos para este género, en primer lugar en cuanto a la aceptación de la familia Aeromonadaceae, que dejó así de pertenecer a la familia Vibrionaceae, sobre la base de evidencias genéticas moleculares. Por otra parte, se incluyeron nuevas especies de más reciente descripción, tal es el caso de *A. bestiarum* correspondiente al grupo de hibridación 2, descrita por primera vez en 1996, y *A. popoffii*, especie nueva propuesta por Huys y colaboradores en 1997. En años posteriores, ese mismo grupo de investigación ha descrito *A. hydrophila* subespecie *dhakensis* (2002) y *A. hydrophila* subespecie *ranae* (2003). En *Aeromonas salmonicida* se ha publicado la nueva subespecie *pectinolytica* (2000).

Los grupos de hibridación HG1 (*Aeromonas hydrophila*), HG2 (*A. bestiarum*) y HG3 sin denominación (aunque algunos investigadores la consideran *A. salmonicida*) están muy relacionados fenotípicamente, de modo que se consideran especies genómicas dentro del fenotipo *A. hydrophila*.

PATOGENESIS

Se citan varios tipos de infecciones por *Aeromonas*. En heridas por contacto con agua o suelo, en inmunocomprometidos, septicemia, abscesos, infecciones respiratorias y del tracto gastrointestinal. En todos los casos, la patogenicidad está asocia-

Tabla 30-1. Correlación de especies genómicas y fenotípicas de *Aeromonas*

GH DNA	GENOESPECIES	FENOESPECIES	HUMANOS	FRECUENCIA
1	*A. hydrophila*	*A. hydrophila*	Sí	++
2	*A. bestiarum*	*A. hydrophila*	Sí	+
3	Inmóviles /psicrófilas			
	A. salmonicida subsp *salmonicida*	*A. salmonicida*	No	
	A. salmonicida subsp *achromogenes*		No	
	A. salmonicida subsp *masoucida*		No	
	A. salmonicida subsp smithia		No	
	Móviles/mesófilos			
	Sin nombre	*A. hydrophila*	Sí	+
4	*A. caviae*	*A. caviae*	Sí	++
5 A	*(A. media)*	*A. caviae*	Sí	+
5 B	*A. media*	*A. media*	No	
		A. caviae	Sí	+
6	*A. eucrenophila*	*A. eucrenophila*	No	
7	*A. sobria*	*A. sobria*	No	
8	*A. veronii* biovar sobria	*A. sobria*	Sí	++
9	*A. jandaei*	*A. jandaei*	Sí	+
10	*A. veronii* biovar veronii	*A. veronii*	Sí	+
11	*A. encheleia*	*A. encheleia*	No	
12	*A. schubertii*	*A. schubertii*	Sí	+
13	Sin nombre	Grupo 501 (indol+; LDC-)	?	
14	*A. trota*	*A. trota*	Sí	+
15	*A. allosaccharophila*	*A. allosaccharophila*	?	
16	*A. popoffii*	*A. popoffii*	No	

da, pero no siempre demostrada, con la producción de varias toxinas: hemolisinas, citotoxinas, enterotoxinas.

La única especie donde se demostró un posible factor de patogenicidad ha sido *A. salmonicida*, donde una capa adicional externa a la pared celular de cepas autoagregativas, llamada capa S, evidenció actividad significativa al incrementar la dosis letal un 50% (DL_{50}), de 1000 a 10.000 veces, cuando fue inyectada por vía intraperitoneal en salmones jóvenes. La posible presencia de factores de virulencia fue reconocida en los primeros estudios relacionados con esta bacteria. Se han descrito varias enzimas extracelulares y toxinas, algunas de ellas bien caracterizadas por su actividad in vitro, aunque no siempre los resultados pudieron correlacionarse con su modo de acción. Es posible que diferentes cepas segreguen productos con estructuras distintas, pero con actividades biológicas similares.

Alfa hemolisina: en la patogénesis de la enfermedad es quizás la de menor importancia. Es una proteína con un peso molecular de 65.000, termolábil (10 minutos a 56 °C) e inactivada por enzimas proteolíticas. Induce cambios citotóxicos reversibles en varias líneas celulares.

Beta hemolisina: es citotóxica para gran variedad de líneas de células, y ha sido purificada y caracterizada con el nombre de aerolisina. Es termolábil a 56 °C durante 10 minutos. Es letal para ratones, pero no es enterotóxica en asa intestinal de conejo. Según algunos estudios, la beta hemolisina es considerada como una enterotoxina citotóxica. Esto indicaría la posibilidad de que hubiera más de una, ya que hay grupos con diferentes pesos moleculares.

Enterotoxina citotónica: fue descrita como enterotoxina extracelular, termolábil a 60 °C durante 20 minutos y con un peso molecular de 15.000. Induce secreción de fluido intestinal, sin daño de mucosas, tanto en conejos como en ratas. La actividad biológica es parecida a la de la toxina colérica (CT), o la toxina termolábil de *E. coli* (LT), pero han fallado las pruebas de neutralización que indiquen alguna relación inmunológica entre CT o LT con *Aeromonas*-toxina.

Ha sido demostrada otra enterotoxina, la cual reacciona en forma cruzada con antisuero anti-CT. Este factor se produce en niveles altos cuando las cepas se desarrollan a 37 °C en medios líquidos con extracto de levadura y con agitación. Esta toxina se ha purificado recientemente y está libre de actividad hemolítica y citotóxica. De este modo existiría la evidencia de que *Aeromonas* es capaz de producir dos moléculas de enterotoxinas diferentes, una que cruza con antisuero-CT y otra que no.

Se han detectado varios mecanismos diferentes de hemaglutinación e incluso una hemaglutinina soluble. Estos mecanismos podrían hacer capaces a estas bacterias de ligarse a células epiteliales del tracto gastrointestinal, requisito previo para la patogenicidad en otros enteropatógenos, como *E. coli*, *Vibrio cholerae* o *Shigella*. Se ha demostrado invasividad en algunas cepas en ensayos con células HEp-2.

La patogénesis de *Aeromonas* implicaría una interacción compleja de sus variados factores de virulencia. La presencia de pili rectos y minipili le confiere gran capacidad de colonización por adherencia. La mayoría de los investigadores sostienen que la enteropatogenicidad está restringida a *A. hydrophila* y *A. sobria*. Otros relacionan *A. caviae* con procesos infantiles, debido a los informes existentes.

Si bien no quedan dudas sobre su acción en infecciones extraintestinales, su capacidad como enteropatógeno permanece controvertida. La investigación de una respuesta inmune ayudaría a resolver su papel.

Algunos estudios demostraron la producción de anticuerpos en estudiantes americanos que contrajeron enteritis por *A. hydrophila* y *A. sobria* en México. Hubo respuesta de IgA secretora intestinal, la cual fue extraída de heces al primero y quinto día de la presentación del cuadro. De los 11 sujetos, todos aumentaron 4 veces o más el título de IgA, mientras que 14 pacientes con *A. caviae* y *P. shigelloides* no variaron su título.

Informes recientes de marzo de 2004 indican la secuenciación y caracterización de los genes del sistema secretorio tipo III (TTSS) de *Aeromonas hydrophila*, el cual sería necesario en la patogénesis de este microorganismo. Se considera que esta identificación puede ayudar en el futuro desarrollo de vacunas apropiadas y contribuir a un mejor conocimiento de la patogénesis.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

No requiere medios de transporte ni de cultivo especiales. Sobrevive bien en solución fisiológica tamponada, con glicerol, y se desarrolla en los medios empleados para enterobacterias y en agar sangre.

En muestras con abundantes microorganismos normales asociados como son las heces, se utilizan medios selectivos con ampicilina, dado la resistencia natural que presentan la mayoría de las cepas a este antibiótico. Los más usados son agar sangre con 10 mg/l de ampicilina o bien agar cefsulodina-irgasan-novobiocina, un medio comercial mucho más selectivo que el anterior. Puede incrementarse el número de aislamientos positivos, haciendo un enriquecimiento previo en agua peptonada alcalina, o en solución salina tamponada.

El agar TCBS empleado para *Vibrio* no es conveniente, ya que resulta inhibitorio para *Aeromonas* spp. En agar Mac Conkey desarrolla dando colonias claras, ya que la mayor parte de las especies son lactosa negativas. En cultivos en agar sangre se observan colonias hemolíticas en la mayoría de las cepas de *A. hydrophila* y *A. sobria*, siendo *A. caviae* casi siempre no hemolítica.

Por tratarse de un bacilo gramnegativo, móvil por flagelos polares, de rápido crecimiento, fermentador de glucosa, oxidasa positivo (propiedad que lo distingue de Enterobacteriaceae), la primera etapa de la identificación consiste en realizar las pruebas que diferencian los géneros de *Vibrionaceae*.

Muchas cepas de *Aeromonas* no son detectadas en heces debido a la fermentación de sacarosa en TSI. Algunas también fermentan lactosa y producen un desarrollo coliforme en agar Mac Conkey y en medio de Kliger.

Actualmente la clasificación de *Aeromonas* a nivel de especies se basa en estudios de homología de DNA, contenido G+C, composición polisacarídica del LPS de la envoltura celular y los caracteres bioquímicos. Por técnicas moleculares se han determinado numerosas genoespecies, las cuales no siempre correlacionan con las fenoespecies.

En los últimos años hubo un interés exponencial sobre este género, con la aparición de nuevas especies y esperándose en un futuro la descripción de otras.

SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

Aeromonas spp son generalmente resistentes a ampicilina y antibióticos relacionados, pero sensibles a la mayoría de las otras drogas de uso corriente. Sin embargo, el tratamiento específico debe basarse en pruebas de sensibilidad, dado que se ha descrito resistencia a varios antibióticos. En el estudio antes citado, realizado en la India, la mayoría de los aislamientos fueron sensibles a gentamicina y ácido nalidíxico, pero con su resistencia cromosómica propia frente a ampicilina y otros antibióticos.

Además hay citas publicadas donde se mencionan factores predisponentes en diarrea asociada a *Aeromonas*, cuando los

pacientes tuvieron terapia antimicrobiana previa reciente para procesos no relacionados con diarrea y las cepas de *Aeromonas* pudieron adquirir la resistencia.

Como regla general se establece que son resistentes a ampicilina, penicilina, carbenicilina, ticarcilina y cefalosporinas de primera generación. Para el tratamiento de infecciones invasivas graves, puede esperarse una buena actividad con cefalosporinas de tercera generación, cloranfenicol, fluoroquinolonas y aminoglucósidos. En general se considera que *A. hydrophila* y *A. caviae* son menos resistentes que *A. sobria*. También se ha demostrado que esta última muestra menor sensibilidad a la acción bactericida del suero. Como marcadores diferenciales, es importante recordar que *A. trota* es ampicilina sensible y *A. veronii* biotipo sobria es sensible a cefalotina.

INFECCIONES POR *AEROMONAS* EN ANIMALES

Una de las enfermedades bacterianas más comunes asociada con condiciones estresantes en agua dulce, estanques de cultivo o acuarios es la infección por *Aeromonas hydrophila*. Todas las especies de peces de agua dulce parecen ser susceptibles. Son factores predisponentes las deficiencias nutricionales, las lesiones traumáticas, el parasitismo y los cambios bruscos de las temperaturas estacionales, como sucede con otros microorganismos.

La forma aguda está caracterizada por signos de una infección septicémica, con enrojecimiento externo y hallazgo de hemorragias en el peritoneo y las vísceras. El control de la infección está dirigido a eliminar los factores predisponentes.

AEROMONAS SALMONICIDA

Es un bacilo gramnegativo, inmóvil, productor de pigmento, descrito originalmente como causal de enfermedad septicémica en salmónidos (furunculosis) y peces dorados (enfermedad ulcerosa). Es también patógeno grave de muchos otros peces de agua dulce y marinos, y puede causar alta mortalidad. En la forma aguda, se observan hemorragias en las aletas, la cola, los músculos, las agallas y los órganos internos. En las formas crónicas, hay áreas focales de edema, hemorragia, y desarrolla necrosis tisular de músculos. Estas lesiones progresan a abscesos crateriformes, los cuales drenan hacia la superficie por la piel (furúnculos). Se produce licuefacción necrótica del bazo y el riñón.

El diagnóstico se hace por aislamiento del agente etiológico en cultivo puro, a partir de los tejidos infectados y su identificación posterior.

La prevención más efectiva es evitarlo, ya que *A. salmonicida* es un patógeno obligado de peces. Tanto éstos como sus huevos han de ser obtenidos de fuentes libres de enfermedad. Los linajes infectados deben ser eliminados, e igualmente los reservorios de peces salvajes.

Tabla 30-2. Marcadores diferenciales mínimos de *Aeromonas* y *Vibrio*

	VIBRIO		*AEROMONAS*
	Halofílicos	No halofílicos	
ODC	d	+	-[1]
NaCl 6%	+	d	-
NaCl 0%	-	+	+
Sensibilidad a 0/129 (150 mg)	+	+	-

[1] *Aeromonas veronii* biovar *veronii* es ODC (+).

ENFERMEDADES BACTERIANAS EN REPTILES

Se observan en todos los órdenes reptilianos. Son muy comunes las infecciones oportunistas causadas por bacilos gramnegativos. Tanto en las infecciones bacterianas como micóticas, debe ser considerado el estado nutricional del animal y corregir las deficiencias. El diagnóstico incluye el cultivo del material sospechoso, el cual debe incubarse en forma diferencial a 22 y 36 °C. El tratamiento antibiótico es mejor realizarlo por inyección parenteral, dado que el grado de absorción de los fármacos a través de la pared intestinal en animales con anormalidades clínicas es variable, y la regurgitación es frecuente.

SEPTICEMIA

Es causa común de muerte. La enfermedad sistémica puede ser precedida por trauma, abscedación local, parasitismo o estrés ambiental. Miembros del género *Aeromonas* son aislados frecuentemente.

DERMATITIS ULCERATIVA (enfermedad de las escamas)

Se observa en serpientes y lagartos. Un exceso de humedad puede ser causa predisponente. La infección secundaria por *Aeromonas* u otras bacterias puede conducir a septicemia y muerte si se demora el tratamiento.

ABSCESOS

Causados por lesiones traumáticas, heridas por mordeduras, o mala calidad ambiental. Se observan con frecuencia en todos los órdenes. Entre los organismos aerobios involucrados, figura en primer lugar *Aeromonas*.

ESTOMATITIS INFECCIOSA

Es común en serpientes, lagartos y tortugas. Es rápidamente caracterizada por petequias en la cavidad oral. A medida que las condiciones empeoran, se desarrolla material caseoso a lo largo de la arcada dental. En casos graves la infección se extiende a las estructuras óseas de la boca. Dado que *Aeromonas* es un habitante oral normal de estos animales, es frecuente aislarlo junto con otros bacilos gramnegativos y grampositivos. Si el caso es mal manejado, puede agregarse una infección respiratoria o gastrointestinal.

INFECCIONES RESPIRATORIAS

También son comunes. La incidencia puede ser influida por parasitismo respiratorio y/o sistémico, temperatura ambiente desfavorable, condiciones insalubres, enfermedad recurrente y malnutrición. Son signos frecuentes la respiración con la boca abierta, descarga nasal y disnea. El aislamiento de *Aeromonas* es frecuente, pero la mayoría de las infecciones respiratorias son mixtas.

ENFERMEDADES DE ANFIBIOS

Los anfibios más usados son el sapo leopardo y el sapo buey. La mayoría de los especímenes de laboratorio son recogi-

Tabla 30-3. Diferenciación metabólica de las especies de *Aeromonas* más frecuentes

	A. hydrophyla	*A. caviae*	*A. veronii* biovar sobria	*A. veronii* biovar veronii	*A. schubertii*	*A. jandaei*	*A. trota*
Indol	+	+	+	+	-	+	+
LDC	+	-	+	+	+	+	+
ODC	-	-	-	+	-	-	-
Esculina	+	+	-	+	-	-	-
Glucosa/Gas	+	-	+	+	-	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	-	-	-
Salicina	+	+	-	+	-	-	-
Arabinosa	+	+	-	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	+	-	+	+
VP	+	-	+	+	-	+	-
KCN	+	+	V	V	-	s/d	s/d
Elastasa	+	-	-	-	-	-	-
CEFALOTINA	R	R	S	S	S	R	S
AMPICILINA	R	R	R	R	R	R	S
O129 10 µg	-	-	-	-	-	-	-
150 µg	-	-	-	-	-	-	-

+ (90% o más) - (10% o menos) V Variable s/d sin datos disponibles * excepciones

LDC: Lisina decarboxilasa; ODC: Ornitina decarboxilasa; VP: reacción de Voges Proskauer; KCN: Cianuro de potasio; O129 compuesto vibriostático (di-isopropil pteridina).

dos en estado salvaje, pero existen varias colonias de criadero. Son comunes en ellas la malnutrición, el parasitismo y ciertas enfermedades bacterianas y virales. Crías adecuadas y buenos cuidados son elementos clave para encarar el manejo de anfibios para uso de laboratorio. Además puede emplearse selectivamente el tratamiento individual o masivo en ciertas patologías.

Aeromonas hydrophila es uno de los agentes causales del llamado síndrome de la pata roja (septicemia bacteriana). Son factores predisponentes la malnutrición y mantener en agua de pobre calidad a anfibios recién recibidos. Los signos clínicos pueden incluir letargo, adelgazamiento, ulceraciones de piel, nariz y dedos, y las características hemorrágicas cutáneas puntiformes de patas y abdomen. Las hemorragias también suelen ocurrir en los músculos esqueléticos, la lengua y la membrana nictitante. En casos agudos, estos signos pueden estar ausentes. Los focos inflamatorios y necróticos del hígado, el bazo y otros órganos constituyen las evidencias histológicas de infección sistémica.

BIBLIOGRAFIA

Albert MJ, et al. Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. Isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. J Clin Microbiol. 2000; 38: 3785-3790.

Altwegg M. Biochemical identification of *Aeromonas* genospecies isolated from Humans. J Clin Microbiol. 1990; 28: 258-264.

Altwegg M, et al. *Aeromonas*–associated gastroenteritis after consumption of contaminated shrimp. Eur J Microbiol Infect Dis. 1991; 10:44-45.

Bin Kingombe CI, et al. PCR detection, characterization, and distribution of virulence in *Aeromonas* spp. Appl Environ Microbiol. 1999; 65(12): 5293-5302.

Cahill MM. A Review: virulence factors in motile Aeromonas species. J Appl Bacteriol. 1991; 69: 1-16.

Carnahan AM, et al. *Aeromonas trota* sp. nov., an ampicillin-susceptible species isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol. 1991; 29: 1206-1210.

Filler G, et al. Acute renal failure in an infant associated with cytotoxic *Aeromonas sobria* isolated from patient's stool and from aquarium water as suspected source of infection. J Clin Microbiol. 2000; 38 (1): 469-470.

Hanninen ML, et al. *Aeromonas* species in fish, fish-eggs, shrimp and freshwater. Int. J Food Microbiol. 1997; 34(1): 17-26.

Huys G, et al. *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* subsp. nov. isolated from children with diarrhea in Bangladesh and extend description of *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila*. Int J Evol Syst Bacteriol. 2002; 52: 705-712.

Janda JM. Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. Clin Microbiol Rev. 1991; 4: 397-410.

Kay W. Purification and disposition of a surface protein associated with virulence of *Aeromonas salmonicida*. J Bacteriol. 1981; 147: 1077-1084.

Santos JA, et al. Hemolytic activity and siderophore production in different *Aeromonas* species isolated from fish. Appl Environ Microbiol. 1999; 65 (12): 5612-5614.

Capítulo 31

PLESIOMONAS

Nélida Amelia Leardini

INTRODUCCION

Es aún un género con una sola especie, *Plesiomonas shigelloides*. Fue descrita por primera vez en Estados Unidos en 1947 por Ferguson y Henderson, a partir de una muestra fecal de un paciente sin historia clínica conocida. Los autores la designaron cepa C27 y la caracterizaron como un organismo móvil de la familia Enterobacteriaceae. La cepa mostraba un antígeno somático similar al antígeno principal de *Shigella sonnei* fase I, y fue relacionada bioquímicamente como un paracolon anaerogénico. Previo a la adopción de su nombre actual, la posición taxonómica de *P. shigelloides* ha sido muy incierta y esto se refleja en las diferentes denominaciones sufridas: *Pseudomonas shigelloides*, *Escherichia*, *Pseudomonas michigani*, *Aeromonas shigelloides*, *Fergusonia*, *Scatomonas*, *Vibrio shigelloides* y *Plesiomonas shigelloides*.

Plesio, en griego, significa "vecino" (de *Aeromonas*), por ello en determinado momento se la había incluido en una nueva familia, Aeromonadaceae; pero por sus características la posición taxonómica de *Plesiomonas* proseguía incierta, hasta que en la edición del Manual de Bergey (2001), considerando que las plesiomonadales se presentaban muy cercanas al género *Proteus*, ha sido incorporada dentro de la familia Enterobacteriaceae.

EPIDEMIOLOGIA

El hábitat normal son las fuentes acuáticas. Ocasionalmente son infectados animales de sangre fría y humanos. La infección natural en animales de sangre caliente es muy rara. Pertenece a los microorganismos intestinales normales de peces de agua dulce, sobre todo de ríos y lagos tropicales y subtropicales. Esto fue confirmado en una investigación realizada en Ruanda.

Algunas veces se aísla de aguas superficiales y de heces de aves y mamíferos que viven en contacto con aguas contaminadas. Raramente se encuentra en heces de personas sanas.

La distribución acuática de *P. shigelloides* está limitada por su dificultad para desarrollarse y sobrevivir a bajas temperaturas, y por su carencia de halofilismo. Esto contribuye a que haya sido encontrada en agua dulce y en estuarios, especialmente en climas tropicales, como ya se enfatizó.

El grupo de hospedadores es más amplio que el de *Aeromonas*, ya que incluye peces de río, ostras, mariscos, ofidios, monos, perros, gatos, cerdos, cabras, aves de corral y ganado. *P. shigelloides* ha sido responsable de brotes de gastroenteritis en focas de criadero.

La mayoría de las cepas de *P. shigelloides* de origen humano han sido aisladas de heces de pacientes diarreicos en áreas tropicales y subtropicales (Africa, sur de Asia, Tahití, Cuba), en Japón y en Australia. Es rara en Europa y Estados Unidos. Varios estudios epidemiológicos señalan a esta especie como agente probable de diarrea humana. Esto se apoya en su baja tasa de portación, la relación con el consumo de mariscos, ostras o agua no tratada, y la aparición de brotes con identificación de los serotipos predominantes, sin otros enteropatógenos asociados en el proceso gastrointestinal. En humanos ha sido aislada principalmente de heces de pacientes con diarreas esporádicas o epidémicas.

En infectología humana, su carácter de agente patógeno está restringido a dos presentaciones clínicas. La más común es una enfermedad diarreica acuosa, la cual se ha encontrado en personas con antecedentes de exposición en los ambientes acuáticos naturales, consumo de peces o mariscos, contacto con reptiles o anfibios, y viajes a países subdesarrollados. Los picos estacionales asociados a diarreas se producen en meses cálidos. Si bien no existen amplios estudios para corroborar su carácter de enteropatógeno, en Japón ha sido bien descrito. Merced a una exhaustiva revisión de viajeros que retornaban a ese país a través del aeropuerto de Kansai, con síntomas de enfermedad diarreica, se encontró microbiológicamente que la incidencia de *Plesiomonas shigelloides* se había incrementado del 23,2% en 1987 al 77,8% en 1999. Durante el período de estudio se confirmó que 1149 de los 1659 pacientes estudiados eran positivos (69,3%). La infección fue caracterizada como una diarrea acuosa, con cinco deposiciones diarias y tres días de persistencia. Ese trabajo fue útil para establecer que si bien las infecciones por *P. shigelloides* son leves y autolimitadas, ese microorganismo contribuye en forma significativa a episodios de "diarrea de viajeros" en los países orientales.

La otra presentación mencionada es un cuadro septicémico, a veces asociado a meningitis, principalmente en infantes, luego de partos complicados y prolongados. En esos casos se ha detectado una letalidad de hasta el 70%. También ese tipo de cuadro se ha observado en adultos esplenectomizados.

PATOGENESIS

La diarrea asociada a *P. shigelloides* ocurre a cualquier edad y es generalmente de carácter secretora, pero las pruebas de enteropatogenicidad son aún dudosas. Contrariamente, las infecciones extraintestinales son infrecuentes, aunque se han citado casos de septicemia, artritis, endolftalmitis, celulitis y meningitis. Su patogénesis permanece poco conocida.

Las infecciones gastrointestinales suceden aparentemente como consecuencia de ingestión de alimentos o agua contaminada. Hay poca información disponible sobre su estabilidad en presencia de sales biliares y enzimas (lisozima) o sobre los mecanismos involucrados en la adherencia, quimiotaxis y penetración del epitelio intestinal y su capa mucosa.

La invasividad de *P. shigelloides* depende de la cepa y de las pruebas empleadas. La prueba de Sereny ha dado resultados negativos, pero Binns y Olsvik encontraron invasividad para células HeLa. Los perfiles plasmídicos de los aislamientos probados fueron diversos, pero no hubo evidencia de plásmido de invasividad semejante a *Shigella*.

Tampoco se observó correlación entre invasividad y posesión de antígenos de *Shigella sonnei*. La invasividad potencial de ciertas cepas de *P. shigelloides* podría explicar los síntomas de

disentería declarados en algunos casos y sostener la conclusión de que esta bacteria es un enteropatógeno. La producción de toxina también se mantiene controvertida. Los principales inconvenientes para establecer la enteropatogenicidad de este microorganismo son la falta de un modelo animal y la incapacidad para identificar mecanismos potenciales de virulencia en la mayoría de las cepas asociadas con infecciones intestinales.

IDENTIFICACION

La incidencia del género *Plesiomonas* es baja y no posee exigencias nutricionales. Crece bien en los medios comunes para enterobacterias o en agar sangre, por ello, si está presente en cantidades importantes, puede ser aislado sin dificultad. El agua peptonada alcalina para enriquecimiento de la muestra no está totalmente aceptada, y existen discrepancias. Un medio comercial selectivo para *Aeromonas*

Tabla 31-1. Caracteres mínimos diferenciales entre los géneros *Plesiomonas*, *Aeromonas* y *Vibrio*

	Aeromonas	*Plesiomonas*	*Vibrio*
Sensibilidad a O/129	R	S*	S
TCBS 0	0	+	
NaCl 0%	+	+	-/+(V)
NaCl 6%	**0**	**0**	V
Gas de glucosa	+*	0	0*
Gelatinasa, DNAsa	+	0	+*
Fermentación			
manitol	+*	0	+*
m-inositol	0	+	0*
L-arabinosa	+/-	-	-/+
Ornitina decarboxilasa	0*	+	+*
Lisina decarboxi**lasa**	+*	+	+*

* Excepciones.
TCBS: medios selectivos para *Vibrio* con sacarosa como marcador.

Tabla 31-2. Reacciones bioquímicas de *Plesiomonas shigelloides*

Indol	+	**Acidificación de:**			
Rojo de metileno	(+)	Glucosa	+	Hidrólisis de esculina	-
Voges-Proskauer	-	Adonitol	-	Mucato	-
Citrato de Simmons	-	L-Arabinosa	-	Tartrato de Jordan	d
Producción de SH_2	-	D-Arabitol	-	Utilización de acetato	(-)
Hidrólisis de urea	-	Celobiosa	-	Lipasa	-
Fenilalanina	-	Dulcitol	-	DNAsa	-
Lisina decarboxilasa	+	Eritritol	-	Reducción de NO_3	+
Arginina decarboxilasa	+	D-Galactosa	+	Oxidasa	+
Ornitina decarboxilasa	+	Glicerol	d	ONPG	+
Movilidad	+	m-inositol	+	Citrato de Christensen	-
Hidrólisis de gelatina	-	Lactosa	-	Utilización de tirosina	-
Crecimiento en KCN	-	Maltosa	+	Prueba del filamento	-
Utilización de malonato	-	D-Manitol	-	(desoxicolato de Na 0,5%)	
Gas de glucosa	-	D-Manosa	(+)		
		Melobiosa	-	**Crecimiento en:**	
		α-metil-D-Glucósido	-	NaCl 0%	+
		Rafinosa	-	NaCl 1%	+
		L-Ramnosa	-	NaCl 6%	-
		Salicina	V	O/129 sensible (10 μg)	+
		D-Sorbitol	-	O/129 sensible (150 μg)	+
		Sacarosa	-	Cefalotina sensible	+
		Trehalosa	+	Pigmento soluble marrón	-
		D-Xilosa	-	β-hemólisis	-

y *Plesiomonas* (agar-verde brillante-inosita-sales biliares) permite detectar la fermentación del inositol por *Plesiomonas*.

No deben emplearse medios con ampicilina para aislamiento de *Plesiomonas*, dado que una cantidad considerable de cepas son sensibles a ese antibiótico. En agar Mac Conkey produce colonias claras (lactosa negativa). En agar sangre no da hemólisis beta. En medio TSI o Kliger reacciona como *Shigella*.

P. shigelloides es heterótrofa. Fermenta glucosa y otros pocos hidratos de carbono, con producción de ácido, sin gas. Es oxidasa y catalasa positiva. Reduce nitratos a nitritos. El rango de temperaturas de desarrollo fluctúa entre 8 y 45 °C, lo cual sostiene la dificultad de hallarla en aguas frías. La tolerancia al cloruro de sodio varía entre 0 y 5%, y el rango de pH dentro del cual se desarrolla es 4 a 9.

Marcadores salientes de identificación son la oxidasa positiva y gelatinasa negativa. La mayoría se muestran sensibles al compuesto vibriostático O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridina). Por ello podrían ser confundidas con especies de *Vibrio*.

Microscópicamente se observan como bacilos gramnegativos con dimensiones que varían entre 2 y 3 µm de longitud por 0,8 a 1 µm de ancho. Son móviles mediante dos a cinco flagelos polares lofótricos (penachos). En cultivos jóvenes puede encontrarse un flagelo lateral de menor longitud de onda. También existen cepas monótricas y hasta las hay inmóviles.

Es importante destacar que cuando se efectúan estudios de diagnóstico serológico en bacterias aisladas de procesos gastrointestinales, hay que tener muy especial cuidado en la correcta identificación metabólica previa, ya que *Plesiomonas shigelloides* comparte estructura antigénica con ciertas especies de *Shigella*, especialmente con las del grupo D, *Shigella sonnei*, lo cual conduce a identificar *Plesiomonas* como *Shigella*, error que puede provocar serios problemas de tipo epidemiológico y no sólo microbiológico.

TERAPEUTICA

La mayoría de los aislamientos son sensibles a los antibióticos empleados para bacilos gramnegativos aeromonadales. Existe cierta confusión en la literatura sobre la resistencia de *P. shigelloides* frente a ciertos antibióticos β-lactámicos, tales como las penicilinas. Un exhaustivo estudio halló resistencia natural uniforme a todas las penicilinas ensayadas, roxitromicina, claritromicina, lincosaminas, glucopéptidos y ácido fusídico. Las cepas evaluadas presentaron resistencia natural o intermedia a estreptomicina, eritromicina y rifampicina.

BIBLIOGRAFIA

Chida T, Okamura N, Arakawa E. The complete DNA sequence of the O antigen gene region of *Plesiomonas shigelloides* serotype O17 which is identical to *Shigella sonnei* from I antigen. Microbiol Immunol. 2000; 44 (3) :161-172.

Henderson DP, Wyckoff EE, Oldham AL. Characterization of the *Plesiomonas shigelloides* genes encoding the hemme utilization system. J Bacteriol. 2001; 183 (9) :2715-2723.

Janda JM, Abbot S. Expression of hemolytic activity by *Plesiomonas shigelloides*. J Clin Microbiol. 1993; 31 :1206-1208.

Knebel U, Sloot N, Rieman JF. Gastroenteritis due to *Plesiomonas*-rare cases in the western world. Med Klin. 2001; 96 (2) :109-113.

Morbidity and Mortality Weekly Report. Aquarium-associated *Plesiomonas shigelloides* infection. 1989; 38 (36):617.

Puchenkove SG. *Plesiomonas* in sea medium and some hydrobionts. Mikrobiol Z. 2001; 63 (4) :20-26.

Shepherd JG, Wang L, Reeves PR. Comparison of O-antigen gene clusters of *Escherichia coli* (*Shigella*) *sonnei* and *Plesiomonas shigelloides* O17: *sonnei* gained its current plasmid-borne O-antigen genes from *P. shigelloides* in a recent event. Infect Immun. 2000; 68 (10) :6056-6061.

Shigematsu M., Kaufman ME, Charlett A, Pitt TL. An epidemiological study of *Plesiomonas shigelloides* diarrhea among Japanese travelers. Epidemiol Infect. 2000; 125 (3) :523-530.

Stock I, Wiedemann B. Beta-lactam susceptibility patterns of *Plesiomonas shigelloides* strains: importance of inoculum and medium. Scand J Infect Dis. 2001; 33 (9) :692-696.

Stock L, Wiedwmann B. Natural antimicrobial susceptibility of *Plesiomonas shigelloides* strains. J Antimicrob Chem. 2001; 48 :803-811.

Tzanetea R, et al. *Plesiomonas shigelloides* sepsis in a thalassemia intermedia patient. Scand J Infect Dis. 2002; 34 (9) :687-689.

Capítulo 32

PSEUDOMONAS

Elida Gentilini

El género *Pseudomonas* está integrado por numerosas especies, ampliamente distribuidas en la naturaleza, el suelo, el agua y en todo lugar donde exista materia orgánica en descomposición. De todas las especies (más de 100) que integran este género, *Pseudomonas aeruginosa* es la única que en el hombre y los animales reviste una enorme importancia clínica, aunque raramente constituye el agente primario de la enfermedad. El aislamiento en cultivo puro de *P. aeruginosa* constituye un fuerte indicio de patogenicidad, en especial en pacientes con tejidos debilitados por quemaduras o traumas, con heridas, neoplasias, inmunosuprimidos o con antecedentes de tratamiento con antibióticos y corticoides, por la resistencia que presenta esta bacteria a numerosos antibióticos.

Existen especies que ocasionalmente pueden ser patógenas para las plantas y los vegetales.

El género *Pseudomonas* está integrado por bacilos gramnegativos, móviles por flagelos polares, aerobios estrictos, aunque algunas especies pueden utilizar procesos de denitrificación como forma de respiración anaeróbica. Crecen con facilidad en medios nutritivos simples. Son bacilos no fermentativos, oxidasa positiva. Algunas especies son productoras de pigmentos solubles en agua.

Palleroni (1984), por estudios de hibridación del rRNA/DNA, clasifica al género en cinco grupos, donde *P. aeruginosa* integra el grupo I, dentro de las *Pseudomonas* fluorescentes. Actualmente algunos de estos grupos tienen la categoría de géneros (por ej., el grupo II, integrado por *P. mallei*, *P. speudomallei* y *P. cepacia*, hoy constituyen el género *Burkholderia*).

En la actualidad, *Pseudomonas* pertenece a la familia Pseudomonadaceae, del orden Pseudomonadales, clasificado como Gammaproteobacterias dentro de las Proteobacterias, según la segunda edición del Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (2001).

Pseudomonas aeruginosa es la especie tipo.

PSEUDOMONAS AERUGINOSA

HABITAT

Es un microorganismo de amplia distribución en la naturaleza, que se encuentra frecuentemente en el suelo, el agua, en todo lugar donde exista materia orgánica en descomposición y ocasionalmente en la piel, la nasofaringe, el tubo digestivo del hombre y en animales sanos.

MORFOLOGIA

P. aeruginosa es un bacilo gramnegativo de 0,5 a 1 µm por 3 a 4 µm, móvil por la presencia de uno a tres flagelos polares. Posee pili y fimbrias. No forma esporas. Algunas cepas están rodeadas de una capa de mucus o polisacárido extracelular denominado *slime*, con capacidad de formar biofilm.

FISIOLOGIA

Características de cultivo y bioquímicas

Es un bacilo aerobio estricto, utiliza el oxígeno como aceptor final de electrones, aunque puede crecer en un ambiente anaeróbico empleando nitratos como aceptor terminal de electrones.

No tiene exigencias nutritivas y crece en medios comunes de laboratorio. En medios sólidos puede formar dos tipos de colonias: una grande, de 3 a 5 mm de diámetro, lisa, con centro elevado y bordes ondulados (se parece a un huevo frito), y otra pequeña (alrededor de 2 mm), rugosa y convexa. En ocasiones se puede observar un tercer tipo de colonias de aspecto mucoso, cuando las cepas aisladas son productoras de *slime*.

También puede cultivarse en agar Mac Conkey y en todos los medios utilizados para el crecimiento de las enterobacterias.

Un medio selectivo de elección es agar cetrimida, por la resistencia que presenta esta especie a los compuestos de amonio cuaternario.

P. aeruginosa es quimioorganotrofa y se considera mesófila. No se desarrolla a 4 °C pero sí entre los 10 y 42 °C, siendo la temperatura óptima de crecimiento de 35 °C. Su crecimiento a 42 °C ayuda para diferenciarla de otras especies que integran el género.

Se desarrolla en 24-48 horas a pH 7. Los cultivos desprenden un aroma dulzón muy característico, "como de uvas", que ayuda a la identificación.

Las *Pseudomonas* son capaces de producir pigmentos. *P. aeruginosa* produce por lo menos cuatro pigmentos: piocianina, fluoresceína o pioverdina, piorrubina y piomelanina, siendo la única especie que produce piocianina, un pigmento azul-verdoso. Este pigmento no colorea las colonias, sino que se difunde en el medio, favoreciendo la detección y facilitando el diagnóstico de laboratorio.

La piocianina (del griego, "pus azulado") es producida por casi el 90% de las cepas y es responsable del característico pus azul de las heridas. Gessard, en 1882, la aisló en cultivo puro y demostró que el pigmento azul-verdoso que aparecía en los apósitos quirúrgicos era producido por *P. aeruginosa*; este pigmento posee actividad antibacteriana e incluso fungicida.

La piocianina (*N*-metil-hidroxifenazina) es una fenacina soluble en agua, cloroformo y éter.

La pioverdina o fluoresceína emite fluorescencia a la luz ultravioleta. Es soluble en agua e insoluble en cloroformo. Ambos pigmentos son productos de oxidación de precursores incoloros.

Algunas cepas producen piorrubina de color rojo y piomelanina de color marrón-negro.

La producción de pigmentos depende de la presencia de hierro en el medio de cultivo o sustrato en el cual se desarrollan.

P. aeruginosa elabora bacteriocinas o piocinas, sustancias de acción bacteriostática sobre otras cepas del mismo género.

Bioquímicamente es catalasa y oxidasa positiva (la presencia de citocromo oxidasa permite diferenciar a las pseudomonas de las enterobacterias), licua la gelatina, es ureasa positiva, posee la enzima arginina dihidrolasa y es capaz de reducir los nitratos.

En agar sangre produce β-hemólisis. No fermenta los carbohidratos, pero muchas cepas oxidan la glucosa.

Utilizan el citrato de sodio como única fuente de carbono.

En la tabla 32-1 se detallan las principales características metabólicas diferenciales entre *P. aeruginosa, P. fluorescens* y *P. putida.*

Características serológicas

P. aeruginosa es antigénicamente heterogénea. Los serotipos están basados en el antígeno O (termoestable); y éste es el marcador más constante.

La respuesta inmunitaria frente al lipopolisacárido (LPS) se manifiesta por la producción de IgM. Se han identificado otros antígenos, flagelares, fimbriales, mucoides y de exoenzimas como proteasas y elastasas.

Factores de agresión de *Pseudomonas aeruginosa*

La virulencia de este microorganismo es multifactorial. Presenta componentes propios de la célula, como el LPS, pili, alginatos y productos extracelulares, como enzimas y toxinas.

P. aeruginosa, por conjugación a través de plásmidos R, codifica resistencia a la mayoría de los antibióticos, y ésta se manifiesta unida a la resistencia a metales pesados. Esta característica le permite sobrevivir en condiciones en que muy pocos microorganismos lo hacen.

Factores de adherencia: los pili facilitan la adhesión a las células epiteliales, permitiendo la colonización. También coloniza tejidos profundos y expuestos, como ocurre en las quemaduras y heridas.

Las cepas productoras de *slime* forman como una biopelícula, que impide la acción de los anticuerpos. La actividad de los antibióticos sobre las cepas productoras de alginato está influenciada por la carga negativa de los polisacáridos. Es así como los antibióticos con carga negativa (cefalosporinas de tercera generación y la piperacilina) son repelidos. En cambio, los aminoglucósidos y las polimixinas (colistina), al ser atrapados por su alta carga positiva, penetran el alginato, explicando la acción local de estos antibióticos. La acción de los factores de adherencia puede ser favorecida por la actividad de proteasas de células del paciente (las proteasas traqueales liberan a las células epiteliales de la capa de fibronectina que normalmente impide la adherencia de *P. aeruginosa*).

Endotoxina: el lípido A, componente de la endotoxina de la pared celular, con efectos biológicos en la sepsis bacteriana.

Exotoxina: es uno de los factores de virulencia más importantes. Es letal para el ratón. La acción de la exotoxina A sería responsable de la dermatonecrosis que ocurre en las quemaduras, del daño de córnea en las infecciones oculares y del daño tisular de las infecciones pulmonares crónicas. La toxina también es inmunodepresora y tóxica para los monocitos y la médula ósea de los animales y los humanos. Esta exotoxina tiene una acción similar a la toxina diftérica, pero es menos potente.

Exoenzimas S y T: producen un daño en las células epiteliales, lo que facilita la diseminación de las bacterias, la invasión tisular y la necrosis.

Enzimas proteolíticas: la mayoría de las cepas producen enzimas proteolíticas capaces de degradar una amplia variedad de sustratos, como elastina, caseína, colágeno, gelatina, fibrina. Proteasas extracelulares: elastasas, proteasa alcalina.

Elastasas: Las A (serina proteasa) y las B (metaloproteasa de cinc) actúan de manera sinérgica para degradar la elastina y destruir los tejidos. Actúan también inhibiendo la quimiotaxis y la función de los neutrófilos, favoreciendo la diseminación de las bacterias. Las infecciones crónicas por *Pseudomonas* se caracterizan por la formación de anticuerpos frente a las A y las B, y por el depósito de los inmunocomplejos en los tejidos infectados.

Proteasa alcalina: al igual que las elastasas, contribuye a la destrucción tisular y a la diseminación de *P. aeruginosa*, inactiva el complemento e interfiere con la respuesta inmune del hospedador. En las neumonías graves, probablemente la acción más drástica sea la rápida y masiva destrucción de las cilias traqueales.

Fosfolipasa C: es una hemolisina termolábil que rompe los lípidos y la lecitina, facilitando la destrucción tisular y la diseminación.

Ramnolípido: hemolisina termoestable que altera los tejidos que contienen lecitina. Se asocia con la inhibición de la actividad ciliar del tracto respiratorio.

Enterotoxina: causa diarrea durante la infección intestinal.

Piocianina: la piocianina colabora en la transformación del oxígeno en superóxido y peróxido de hidrógeno. El hierro unido al sideróforo de *P. aeruginosa* denominado pioquelina puede catalizar la producción del radical hidroxilo. La combinación de piocianina y pioquelina, producida durante el desarrollo de la bacteria en el huésped, puede desempeñar un papel importante en el daño tisular, especialmente en las zonas ricas en oxígeno, como el pulmón. La piocianina, además, posee actividad antimicrobiana.

Tabla 32-1. Características metabólicas diferenciales entre *P. aeruginosa, P. fluorescens* y *P. putida*

Características metabólicas	*P. aeruginosa*	*P. fluorescens*	*P. putida*
Crecimiento a 4 °C	-	+	(+)
Gelatinasa	+	+	-
Reducción de nitratos	+	(+)	-
Producción de piocianina	+	-	-
Producción de fluoresceína	+	+	-

+: positivo; -: negativo.
(+): *generalmente positivo, depende de la cepa.*

RESISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS

Es una bacteria resistente y puede mutar a cepas multirresistentes durante el tratamiento. Se han identificado numerosos mecanismos de resistencia (fig. 32-1).

Los mecanismos de resistencia son: 1) resistencia natural o intrínseca: codificada en el cromosoma de todas las especies; 2) resistencia mutacional: la impermeabilidad y el eflujo en betalactámicos, la desrepresión de β-lactamasas cromosómicas, el eflujo y la alteración de la DNA girasa que inactivan a las quinolonas fluoradas, y 3) adquirida: mediante plásmidos por conjugación de enzimas inactivantes de aminoglucósidos y β-lactamasas plasmídicas transferibles.

PODER PATOGENO

Es raro que sea agente primario de infección; existen factores que predisponen a la aparición de una infección por *P. aeruginosa*.

Los pacientes más expuestos a infecciones son, en general, los inmunodeprimidos, con quemaduras graves y extensas, heridas traumáticas, con procesos respiratorios, neoplasias, antecedentes de tratamientos con corticoides y antibióticos, y los animales jóvenes.

En todas las especies animales, *P. aeruginosa* es responsable de abscesos, diarreas, infecciones urinarias, genitales, respiratorias, de heridas e infecciones intrahospitalarias (tabla 32-2).

RESISTENCIA A AGENTES FISICOS Y QUIMICOS

Pseudomonas aeruginosa puede sobrevivir durante largos períodos a temperatura ambiente en sitios húmedos: baños, pisos, instrumental, llaves de agua. Es capaz de crecer en agua destilada. Es muy sensible a la desecación...

No resiste temperaturas elevadas; a 55 °C durante 1 hora pierde la viabilidad.

Es resistente a altas concentraciones de compuestos de amonio cuaternario, como la cetrimida y el cloruro de benzalconio.

Resiste en soluciones concentradas de clorhexidina y hexaclorofeno y en soluciones jabonosas y cremas que contengan yodados. Es sensible a pH ácido y a las sales de plata.

Ante una infección, el profesional debe indicar un estudio de susceptibilidad antes de prescribir un antibiótico.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Muestras: orina, pus, exudados, raspados de la superficie de los tejidos infectados.

El aislamiento y la identificación se realiza sembrando la muestra en medios simples durante 24-48 horas a 35 °C, en aerobiosis. El desarrollo en medio sólido se manifiesta por la aparición de colonias translúcidas, extendidas, con bordes ondulados semejantes a un huevo frito. La mayoría de las cepas produce piocianina que, al difundirse al medio de cultivo, aparece de color azul verdoso, lo cual facilita la identificación. En agar sangre produce β-hemólisis. Los cultivos tienen un olor a uvas característico.

Al colorear un extendido, se observan bacilos gramnegativos, cuya morfología no se diferencia de las enterobacterias. La movilidad se puede demostrar por observación entre porta y cubreobjetos.

Los bacilos son: oxidasa positiva, licuan la gelatina, peptonizan la leche tornasol, utilizan el citrato, reducen el nitrato, no producen indol. La prueba de óxido-fermentación (O/F) es positiva para oxidación.

La identificación de otras especies del género requiere una amplia batería de pruebas fisiológicas.

En general, las cepas de *Pseudomonas* se pueden tipificar por serología, sensibilidad a bacteriófagos (fagotipificación), patrones de sensibilidad a antibióticos, y producción de piocinas. Las técnicas de epidemiología molecular (DNA o RNA ribosómico) permiten clasificar las cepas con mayor sensibilidad y especificidad.

EPIDEMIOLOGIA

Es un microorganismo ubicuo; las causas de una infección dependen del estado del paciente y del ambiente que lo rodea.

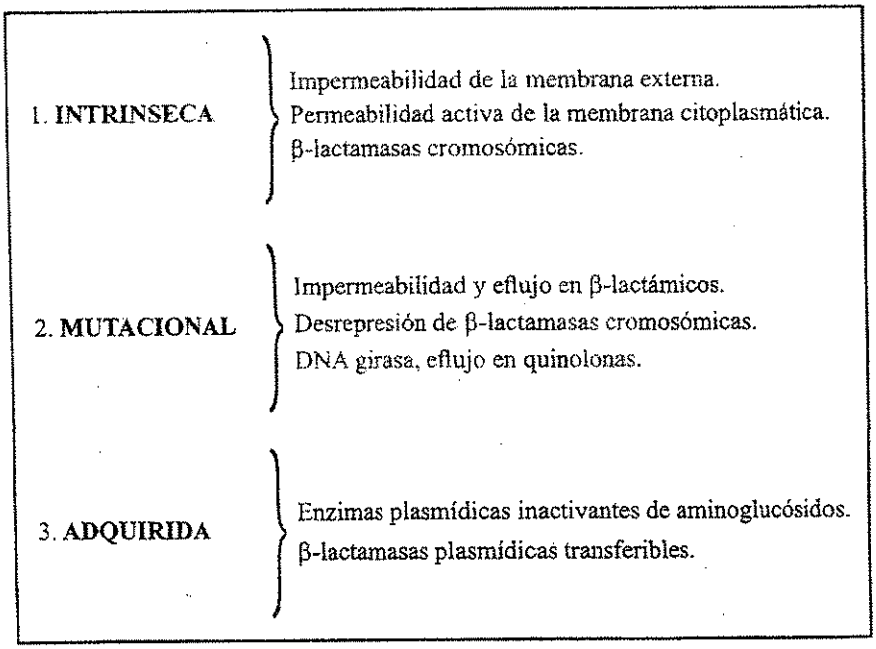


Figura 32-1. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en *P. aeruginosa*.

Tabla 32-2. Infecciones producidas por *P. aeruginosa* en diferentes especies

Especies	Principales infecciones producidas por *P. aeruginosa*
Caninos y felinos	Otitis externa, conjuntivitis, infecciones urinarias, óseas, muerte perinatal, prostatitis, piómetra, infecciones y septicemias posquirúrgicas.
Equinos	En yeguas, asociada a *Klebsiella pneumoniae*, produce metritis e infertilidad, infecciones oculares, abscesos pulmonares, aborto.
Bovinos	Mastitis, aborto, infecciones de piel, artritis.
Ovinos	Dermatitis.
Cerdos	Procesos respiratorios, enteritis.
Aves de corral	Infecciones respiratorias, septicemia.
Visón	Neumonía hemorrágica.
Hombre	Infecciones urinarias, de heridas, oído interno, pulmonares (fibrosis quística), válvulas cardíacas, septicemia, diarrea, infecciones nosocomiales.

P. aeruginosa, al presentar requerimientos nutricionales mínimos, prosperar en ambientes húmedos, tanto en los hospitales veterinarios como en los de humanos, se puede recuperar del ambiente (por ej., en quirófanos, en mangueras de aparatos de anestesia, respiradores mecánicos, equipos de diálisis, baños, pisos); debido a la resistencia, se recupera también de soluciones y jabones desinfectantes. Estas características aumentan las posibilidades de infección de un paciente comprometido, colonizando el tracto respiratorio, el digestivo, y contaminando heridas, fundamentalmente en los que reciben tratamientos prolongados con antibióticos.

TRATAMIENTO Y CONTROL

P. aeruginosa presenta una característica inherente a su fisiología: la resistencia a varios antibióticos. Asimismo, durante el tratamiento, muchas cepas sensibles se vuelven resistentes al adquirir enzimas inactivantes por medio de plásmidos de resistencia o al mutar las proteínas de los canales porínicos o inducir alteraciones en el sitio diana (véase Resistencia a los antibióticos). A esto se debe sumar que algunos antibióticos, como los aminoglucósidos, se inactivan en sitios de infección con pH ácido, como ocurre en los abscesos.

El profesional, con las consideraciones anteriores y los resultados de antibiogramas, indicará el tratamiento con algunos de los siguientes antibióticos:

Aminoglucósidos: gentamicina, amikacina.
Polimixinas (colistina).
Cefalosporina de tercera generación: ceftazidima y cefoperazona.
Quinolonas: enrofloxacina.

La antibioticoterapia será exitosa si el tratamiento se cumple y las defensas del hospedador favorecen la evolución de la infección.

En los hospitales, teniendo en cuenta la presencia ubicua del microorganismo es imposible eliminar a *Pseudomonas*. Para controlar la infección, es prioritario prevenir la contaminación y regular el uso de los antimicrobianos.

BIBLIOGRAFIA

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1984. *Pseudomonadaceae*. Palleroni N. 141-213. Ed. Williams and Wilkins.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2002. Taxonomic Online of Procaryotic Genera. Garrity GM, Winters M and Searles DB. (2nd) Edition.

Boyd A, Chakrabarty AM. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide. J Indus Microbiol. 1995; 15:162-168.

Gentilini E, Denamiel G, Escalada J y López Amoedo M. Sensibilidad de distintas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen animal y humano, frente a desinfectantes y antisépticos de uso corriente. Veterinaria Argentina.1991; VIII (76): 396-99.

Gentilini E, Denamiel G, Escalada J y López Amoedo M. Sensibilidad de distintas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen animal, por el método de antibiograma semicuantitativo en agar. Veterinaria Argentina. 1990; VII (69): 627-30.

Gentilini E, Hallú R, Rebuelto M, Denamiel G, Albarellos G, Otero P. Cambios en la sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* de origen animal y humano frente a algunas quinolonas. Rev de la Sociedad de Medicina Veterinaria. 1998; 77 (6): 26-32.

Gessard C. Sur les colorations bleue et verte des lignes a pansements. C R Acad Sci. 1882; 94: 536-538.

Microbiología. Zinsser. 1997. *Pseudomonas*. Cap 37. 785-794. 20ª. Edición. Editorial Panamericana.

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Microbiología Médica. 2003; Sección IV. Cap. 32. 293-298. 4ta. Edición. Elsevier.

Vadillo Machota S, Píriz Durán S, Mateos Yanes EM. Manual de Microbiología Veterinaria. *Pseudomonas*. 2002; Cap. 18 p. 261-268. McGraw-Hill, Interamericana.

ACTINOBACILLUS

Fabiana Moredo, Carlos Juan Perfumo

INTRODUCCION

Actinobacillus pleuropneumoniae (*Haemophilus pleuropneumoniae*) es el agente etiológico de la pleuroneumonía porcina, enfermedad infecciosa de origen bacteriano que produce las mayores pérdidas económicas en las explotaciones porcinas de nuestro país. Estas se deben principalmente a la alta mortalidad, a los costos de los tratamientos, así como al decomiso de los animales faenados. Su importancia epidemiológica está en relación con la producción intensiva en confinamiento. En Argentina, fue descrita por primera vez en 1964. La vía más importante de diseminación es la aerógena, y la enfermedad se transmite, principalmente, por contacto directo de cerdo a cerdo. El período de incubación y el curso de la enfermedad son muy variables, dependiendo del estado inmunológico de los animales, las condiciones ambientales, la dosis infectante y la virulencia de la cepa, pudiendo desarrollar cuadros clínicos de curso sobreagudo, agudo y crónico.

Si bien todas las categorías (edad/etapa) son susceptibles, los cerdos en crecimiento/engorde se ven particularmente afectados.

A. pleuropneumoniae es considerado un parásito obligado del tracto respiratorio porcino, que puede ser aislado de cavidad nasal, amígdalas y pulmones de animales infectados.

EPIDEMIOLOGIA

La gravedad del cuadro epidemiológico, clínico y patológico depende de los serotipos actuantes, de los factores ambientales y de los antecedentes de la granja.

A. pleuropneumoniae es un parásito del tracto respiratorio del cerdo, con una alta especificidad de especie. En infecciones sobreagudas y agudas, se puede encontrar no sólo en lesiones neumónicas sino también en descargas nasales. Los animales que sobreviven a la infección aguda se transforman en portadores, y el microorganismo se halla principalmente en las lesiones pulmonares necróticas y/o en las amígdalas y, menos frecuentemente, en la cavidad nasal.

El período de incubación puede ser muy variable. Infecciones experimentales demuestran que una exposición a un gran número de microorganismos puede llevar a la muerte dentro de pocas horas a pocos días, y la exposición a un bajo número de bacterias puede resultar en una enfermedad subclínica.

Si bien el cerdo es susceptible a cualquier edad, en granjas endémicamente afectadas, la presencia de anticuerpos calostrales condiciona la edad de presentación a partir de las 6 a 8 semanas. En la fase aguda de la enfermedad, la morbilidad es generalmente alta. La mortalidad puede variar dependiendo de la virulencia de la cepa y de las condiciones ambientales, aunque generalmente es alta. Tanto la morbilidad como la mortalidad pueden exacerbarse por la presencia de otras enfermedades, como Aujeszky y el síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS). La incidencia de la pleuroneumonía está asociada con el estrés.

La principal vía de diseminación es la aerógena y la infección se transmite principalmente por contacto directo entre cerdos o a través de pequeñas gotas. En presentaciones agudas, la infección no se observa en todos los corrales, debido a que los movimientos del aire, como la transmisión indirecta por el personal, condicionan la difusión de la enfermedad intragranja. La transmisión por pequeños roedores o pájaros es dudosa, y los humanos no son hospedadores naturales de *A. pleuropneumoniae*. La supervivencia del microorganismo en el medio ambiente es de corta duración, en exudados (mucus u otros componentes orgánicos) sobrevive pocos días y en el agua limpia a 4 °C, por períodos de más de 30 días.

La transmisión entre las piaras ocurre cuando se introduce un animal portador en una población que no ha tenido contacto previo con el microorganismo. La transmisión aérea entre granjas debe considerarse, pero hasta el momento no ha sido demostrada. Tanto el movimiento como la mezcla de cerdos de distintos orígenes aumentan el riesgo de pleuroneumonía. Factores como hacinamiento y condiciones climatológicas adversas (cambios bruscos de temperatura y humedad relativa alta), sumada la mala ventilación, estimulan el desarrollo y la diseminación de la infección, y consecuentemente también afectan la morbimortalidad. Por esto, no es raro que la alta incidencia de brotes se observe en las etapas de engorde y terminación.

CLASIFICACION

A. pleuropneumoniae pertenece al género *Actinobacillus*. Junto con los géneros *Pasteurella* y *Haemophilus* conforman la familia Pasteurellaceae.

El género *Actinobacillus* comprende 18 especies: *A. arthritidis, A. capsulatus, A. delphinicola, A. equuli* subsp. *equuli, A. equuli* subsp. *haemolyticus, A. hominis, A. indolicus, A. lignieresii, A. minor, A. muris, A. pleuropneumoniae, A. porcinus, A. rosii, A. scotiae, A. seminis, A. succinogenes, A. suis, A. ureae.*

MORFOLOGIA Y CARACTERISTICAS GENERALES

Actinobacillus pleuropneumoniae es un bacilo corto o bacilo pleomórfico, encapsulado. Mide 0,1-0,4 por 0,4-1,0 µm. Se los puede observar solos, de a pares o más raramente formando cadenas. No forman esporas. Son gramnegativos, aunque también se observa coloración irregular. Inmóviles. Anaerobios facultativos. La temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C. Los cultivos primarios son muy adherentes a la superficie del medio de cultivo. Tienen metabolismo respiratorio de tipo fermentativo. Acidifican la glucosa, pero no forman gas. Reducen los nitratos a nitritos. No forman indol y son ureasa positiva. Como característica distintiva tienen actividad β-hemolítica (hemólisis completa) en agar sangre. Para su desarrollo, requieren la presencia del factor sanguíneo V (NAD: dinucleótido de adenina y nicotinamida) y, en los aislamientos iniciales, una atmósfera enriquecida con 5% de CO_2. La dependencia del factor V permite diferenciar dos biotipos: el bio-

tipo 1 es NAD-dependiente y el biotipo 2 es NAD-independiente, pero requiere la presencia de nucleótidos piridínicos específicos o precursores de nucleótidos piridínicos para sintetizar NAD.

ESTRUCTURA

La estructura de *A. pleuropneumoniae* se adapta al modelo general de bacterias gramnegativas. La pared celular, recubierta por una cápsula bien definida en la mayor parte de los serotipos, está integrada por lipopolisacáridos (LPS), proteínas y una fina capa de peptidoglucano. Separada de ésta por el espacio periplásmico, se encuentra la membrana plasmática. Mediante microscopia electrónica se observaron fimbrias perítricas, aunque desaparecieron más allá del tercer subcultivo.

Los estudios sobre el material capsular de *A. pleuropneumoniae* permitieron comprobar que su composición química variaba según los serotipos. Según la estructura existen tres grandes grupos: los serotipos 5a, 5b y 10 presentan una cápsula con secuencias repetidas de azúcares que permanecen unidos por uniones glucosídicas; los serotipos 2, 3, 6, 7, 8, 9 y 11 presentan polímeros de elevado peso molecular, del tipo del ácido teicoico, en los que los azúcares están unidos mediante enlaces fosfodiéster; el tercer grupo está representado por los serotipos 1, 4 y 12, que presentan polímeros mucho más inestables, al estar unidos por medio de enlaces fosfato, fácilmente hidrolizables. Igualmente, se observó un grado de desarrollo capsular diferente, según los serotipos, pues mientras en los 1, 3 y 5 la cápsula es una estructura bien definida, en los 2 y 7 tan sólo se presenta como una capa tenue y discontinua alrededor de la pared celular.

El LPS está constituido por el lípido A y el polisacárido O. El primero está formado por ácidos grasos, grupos fosfato y glucosa. El polisacárido O está integrado por un núcleo de ácido 3-desoxi-D-manooctulosónico, glucosa y heptosa, y cadenas laterales (antígeno O), que varía en longitud y estructura según el serotipo. En *A. pleuropneumoniae* se describieron cepas lisas, semirrugosas y rugosas, condicionadas a la presencia completa (por ej., en los serotipos 2, 4 y 7), parcial (serotipos 1 y 5) o a la ausencia de su cadena lateral O (serotipos 3 y 6).

Respecto de las proteínas de membrana externa (OMP), los perfiles de serotipos 1-8 son muy similares; en ellos se pueden observar tres proteínas comunes a todos y a otras especies de los géneros *Actinobacillus* y *Pasteurella*. Por el contrario, otros grupos y en función de una serie de proteínas establecen siete perfiles electroforéticos diferentes, dos de los cuales estarían compartidos por cada uno de los pares de serotipos 1-9 y 2-6, mientras que los otros cinco vendrían representados por cada uno de los serotipos restantes. También se caracterizó una lipoproteína (OmlA), que está presente en los serotipos 1, 2, 5a, 8, 9, 11 y 12, y una proteína común a los doce serotipos del biotipo 1. Se describieron dos proteínas que se expresan en condiciones de carencia de hierro y otra que lo hace en presencia de maltosa.

ANTIGENOS: SEROTIPOS

En función de los polisacáridos de superficie (antígeno K) tan heterogénea, el biotipo 1 incluye doce serotipos, que se denominan mediante números cardinales consecutivos; dentro de los serotipos 1 y 5 se han descrito dos subtipos que se diferencian con las letras "a" y "b"; el biotipo 2 presenta 6 serotipos. El antígeno O del LPS bacteriano es también responsable de la especificidad de serotipos, junto con el antígeno capsular. Los grupos de serotipos 1, 9 y 11; 3, 6 y 8; 4 y 7, en los que la estructura química de la cadena O es similar o incluso idéntica, no pueden ser diferenciados atendiendo a este criterio. Existe una prevalencia nacional y regional entre los diferentes serotipos: en Estados Unidos, el 1, 5 y 7; en Brasil, los serotipos 1, 3, 5a, 5b, 7 y 11. En nuestro país se describieron los serotipos 1, 3, 5, 7, 8 y 12.

FACTORES DE VIRULENCIA

Hasta el momento, se identificaron por lo menos 7 factores de virulencia diferentes:

- cápsula
- proteínas de membrana externa
- lipopolisacáridos de membrana externa
- extractos solubles
- proteasas
- factores de permeabilidad
- endotoxinas
- exotoxinas

Las toxinas Apx pertenecen a la familia de toxinas RTX, que producen poros en diferentes tipos de células blanco. De acuerdo con su peso molecular y a su actividad biológica, hemólisis y citotoxicidad, se denominan ApxI, ApxII, ApxIII y ApxIV. Son producidas en diversas combinaciones por los diferentes serotipos de *A. pleuropneumoniae*, de lo que resulta su diferente poder patógeno.

Si bien la mayoría de los serotipos son capaces de producir las mismas lesiones, existen ciertas diferencias atribuidas, en parte, a la producción de las diferentes combinaciones de las toxinas Apx, la cantidad de polisacáridos de superficie y los LPS. Así, los serotipos 1, 5, 9 y 11, que producen ApxI y ApxII, están asociados a cuadros de alta morbimortalidad; los serotipos 2, 3, 4, 6 y 8, que secretan ApxII y ApxIII, son de menor patogenicidad. Algunos serotipos –7, 10 y 12– sólo secretan una toxina y son de baja patogenicidad.

PATOGENESIS Y RESPUESTA INMUNE

En la patogénesis de la pleuroneumonía porcina hay tres etapas básicas: colonización, evasión de los mecanismos de defensa y daño de los tejidos del hospedador.

Colonización: es la habilidad de un patógeno de adherirse a células hospedadoras o superficies y multiplicarse dentro del organismo; es un prerrequisito necesario para la producción de la enfermedad. En estudios de adherencia in vivo, se demostró que *A. pleuropneumoniae* no tenía buena afinidad por cilias ni epitelio de la tráquea o bronquios; en contraposición, se observó una estrecha afinidad por las cilias de los bronquiolos terminales y las células epiteliales alveolares. De esta manera se observó que, si bien *A. pleuropneumoniae* se podía aislar de amígdalas y cavidad nasal, se unía preferentemente a las células del tracto respiratorio inferior. La colonización del tracto respiratorio superior depende del material infeccioso encontrado por el animal (por ej., gotas de aerosoles o secreciones mucosas). Los aerosoles producidos a través de estornudos son partículas lo suficientemente pequeñas para penetrar dentro del tracto respiratorio inferior, obviando la necesidad de colonizar el superior.

Las fimbrias y los LPS son las estructuras bacterianas que intervienen en la adherencia.

Como paso siguiente a la adherencia, y para que se constituya la enfermedad, la bacteria debe tener la capacidad de adquirir todos los nutrientes esenciales para su desarrollo. Dentro del

tracto respiratorio están restringidas la cantidad y la calidad de carbohidratos y de ciertos nutrientes. La habilidad de superar estas limitaciones nutricionales dentro del hospedador se puede considerar como un mecanismo de patogenicidad. Uno de estos mecanismos consiste en sobreponerse a la restricción de hierro. *A. pleuropneumoniae* presenta un gran número de factores que están involucrados en la adquisición y captación de hierro. Es capaz de utilizar transferrinas porcinas, y no de otras especies animales, compuestos hem, como hem libre, hemina, hematina y hemoglobina, como única fuente de hierro. En los pulmones porcinos, también están presentes diferentes sistemas de captación de nutrientes esenciales para la supervivencia de la bacteria.

Evasión de los mecanismos de eliminación del hospedador: la eficacia de los mecanismos de defensa del hospedador contra la infección bacteriana de los pulmones depende de la rapidez con la que el tracto respiratorio elimina las bacterias. Los mecanismos inmunes respiratorios se dividen en dos: inespecíficos (aparato mucociliar, complemento, fagocitos) y específicos (mecanismos mediados por linfocitos).

El mecanismo de eliminación mucociliar es muy importante para proteger a los pulmones del proceso infeccioso. Hasta el momento, no se conocen los efectos de *A. pleuropneumoniae*, per se, sobre la actividad mucociliar.

Las bacterias no eliminadas por el funcionamiento mucociliar normal todavía lo pueden ser por acción de células fagocíticas. En animales sanos, los macrófagos (alveolares, intersticiales e intravasculares) son los fagocitos predominantemente encontrados en el tracto respiratorio inferior, mientras que el número de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) es por lo general bajo y se incrementa rápidamente cuando comienza la infección. Los macrófagos alveolares (AM) están estratégicamente situados en la interfase aire-superficie alveolar, siendo las primeras células con las cuales se encuentran los microorganismos inhalados. Los macrófagos pulmonares intravasculares (IM), adheridos a las células endoteliales de los vasos sanguíneos, son rápidamente dirigidos a las áreas de inflamación y necrosis pulmonar de los cerdos infectados con *A. pleuropneumoniae*. Los IM y AM porcinos parecen tener funciones diferentes; IM son predominantemente citolíticos, mientras que AM son fagocíticos. El principal rol de los IM en la pleuroneumonía es la eliminación de células y detritos celulares de la sangre.

Luego de la fagocitosis y a diferencia de los macrófagos, los PMN pueden matar efectivamente a *A. pleuropneumoniae*. Se presume que esto se debe a la capacidad bactericida más potente. *A. pleuropneumoniae* puede sobrevivir más de 90 minutos dentro de los macrófagos; durante este tiempo se produce la liberación de las toxinas Apx, lo que puede resultar en la lisis de estos fagocitos. *A. pleuropneumoniae* produce varios factores que pueden contribuir con su habilidad para sobrevivir dentro de los macrófagos: cápsula y LPS, cobre-cinc superóxido dismutasa (SodC); proteínas de estrés y amonio.

Los principales factores envueltos en el deterioro de la función fagocítica de los macrófagos y los PMN son las toxinas ApxI, ApxII y ApxIII.

Daños en el tejido del hospedador: la mayoría de las consecuencias patológicas de la pleuroneumonía se atribuyen a las toxinas Apx, las cuales ejercen efectos citotóxicos sobre varios tipos celulares directa o indirectamente, estimulando a los fagocitos activados a liberar mediadores de la inflamación.

La activación de los macrófagos alveolares e intravasculares se debe a las toxinas Apx y a los LPS, que inducen la liberación de metabolitos tóxicos del oxígeno (anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo), así como también enzimas proteolíticas y varias citoquinas. *A. pleuropneumoniae* induce una rápida producción local de citoquinas proinflamatorias interleuquina-1a (IL-1a), IL-b, IL-6 e IL-8. El reclutamiento rápido y la activación de los PMN induce la liberación de radicales tóxicos de oxígeno.

Los LPS de *A. pleuropneumoniae* activan la vía alternativa del complemento, ocasionando la atracción y activación de PMN y macrófagos, así como también estimulan la liberación de mediadores inflamatorios que ocasionan la activación plaquetaria, la vasodilatación y la constricción de las vías aéreas respiratorias.

El daño de las células endoteliales producido por las toxinas Apx, sumado a la activación del factor XII por los LPS, inicia la coagulación, la fibrinólisis y el sistema de las quininas. La activación de la vía de la coagulación ocasiona la activación plaquetaria y la formación de microtrombos, la isquemia localizada y la necrosis subsiguiente, las cuales son características de la pleuroneumonía porcina aguda.

Recientemente se descubrió una cuarta toxina ApxIV, producida por todos los serotipos de *A. pleuropneumoniae*. Esta toxina es antigénicamente distinta a las demás y sólo se produce in vivo. Su contribución en la patogénesis de *A. pleuropneumoniae* todavía no está clara. Además de las toxinas Apx y los LPS, *A. pleuropneumoniae* también secreta proteasas, las cuales pueden contribuir con la patogénesis de la infección.

Conocer la patogénesis de la infección y los factores de virulencia de *A. pleuropneumoniae* que la ocasionan ayudará en el futuro al control de la enfermedad y al desarrollo de una vacuna efectiva.

ASPECTOS CLINICOS

En la presentación de curso sobreagudo, el único signo es la muerte súbita, que se produce en el transcurso de 12 horas. En la presentación aguda, los signos clínicos incluyen: fiebre, disnea (respiración abdominal), anorexia, ataxia, vómitos, diarrea, cianosis y muerte. Los cerdos que no mueren entre las 24 y las 36

Tabla 33-1. Toxinas Apx producidas por los diferentes serotipos de *A. pleuropneumoniae*

	Actividad		Serotipos
	Hemolítica	Citotóxica	
ApxI	Fuerte	Fuerte	1, 5a, 5b, 9, 10, 11
ApxII	Débil	Moderada	Todos menos el 10
ApxIII	Ninguna	Fuerte	2, 3, 4, 6, 8
ApxIV[a]	Débil	ND[b]	Todos

[a] A diferencia de las otras toxinas Apx, ApxIV sólo se produce in vivo. [b] ND: no determinado.

Tabla 33-2. Principales actividades bioquímicas de *A. pleuropneumoniae*

Requerimiento de factor V	+	Producción de SH_2	+	Ribosa	+
Reacción CAMP	+	Reducción de nitratos	+	Manosa	+
Ureasa	+	Reducción de nitritos	+	Manitol	+
Indol	-	β-galactosidasa (ONPG)	+	Sorbitol	-
Producción de porfirina*	+	Fosfatasa alcalina	+	Arabinosa	-
Hemólisis	+**	Producción de ácido a partir de:		Ramnosa	-
Catalasa	v	Glucosa	+	Galactosa	+
Oxidasa	v	Lactosa	v*	Maltosa	+
Ornitina decarboxilasa	-	Sacarosa	+	Trehalosa	-
Arginina dihidrolasa	-	Fructosa	+	Dulcitol	-
Lisina decarboxilasa	-	Xilosa	+	Salicina	-

* Producción de porfirina a partir de ácido d-aminolevulínico. ** Se describieron algunos aislamientos no hemolíticos. v: entre el 11 y el 89% de los aislamientos son positivos. v*: la variabilidad del resultado depende del grupo fenotípico.

horas pueden progresar a la forma crónica. En éstos se observa tos crónica intermitente, respiración abdominal, anorexia y marcado retraso del crecimiento. Estos animales son considerados como portadores de *A. pleuropneumoniae*.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

En cuadros sobreagudos y agudos, el diagnóstico presuntivo de la pleuroneumonía porcina se basa en el comportamiento epizootiológico, los signos clínicos y las lesiones macroscópicas. El diagnóstico definitivo requiere el aislamiento del agente etiológico por procedimientos clásicos de bacteriología o su identificación en los tejidos por métodos de biología molecular o inmunohistoquímicos.

La enfermedad crónica se diagnostica a través de la observación en el frigorífico de las lesiones pulmonares características; en estos casos, el aislamiento bacteriano es mucho más difícil, siendo el método de elección, junto con la observación de las lesiones, la serología; es decir, la detección de anticuerpos.

La infección subclínica, con ausencia de lesiones pulmonares, es la más difícil de diagnosticar. Al igual que en el caso anterior, el mejor método para controlar este tipo de infección es la serología. Es un método indirecto, debido a que se detecta la respuesta inmunológica de los animales frente a una infección pasada. La prueba seleccionada debe poseer muy buena sensibilidad y especificidad, ya que el diagnóstico se realiza en granjas donde no se observa ningún problema que pueda hacer pensar que *A. pleuropneumoniae* está presente.

Para el aislamiento primario de *A. pleuropneumoniae*, la muestra de elección es un trozo de pulmón afectado, que debe enviarse al laboratorio en un recipiente estéril y refrigerado a 4 °C. No deben transcurrir más de 48 horas desde que se toma la muestra hasta que se procesa el órgano en el laboratorio de microbiología. La muestra debe remitirse perfectamente identificada y acompañada con el correspondiente protocolo. Si proviene de un área normalmente estéril, como es el caso del pulmón, se pueden utilizar diversos medios enriquecidos: agar chocolate, agar PPLO y agar sangre; estos últimos adicionados con extracto de levadura o NAD. Luego de incubar durante 48 horas a 37 °C, en atmósfera enriquecida con 5% de CO_2, se observan colonias pequeñas (entre 1 y 2 mm), redondas, opacas y de color gris. Dentro de ellas se pueden diferenciar dos tipos: unas de aspecto céreo que se adhieren al asa de siembra y presentan sobre el medio cierta elevación redondeada, y otras de aspecto brillante, más aplanadas. Si se utilizaron medios adicionados con sangre entera, se observarán amplias zonas de β-hemólisis rodeando las colonias. En caso de que las muestras provengan de áreas que se encuentran normalmente colonizadas (amígdalas, exudado nasal) se utilizan medios de cultivo selectivos: medio enriquecido, adicionado con antibióticos (bacitracina, lincomicina), antimicrobianos no antibióticos (cristal violeta) y antifúngicos (nistatina). El agar PPLO enriquecido con extracto de levadura, suero equino,

Tabla 33-3. Características bioquímicas diferenciales entre *A. pleuropneumoniae* y otros patógenos respiratorios porcinos

	Actinobacillus					Taxón C	*H. parasuis*
	pleuropneumoniae	*suis*	*minor*	*porcinus*	*indolicus*		
Req. Factor V	+	-	+	+	+	+	+
Ureasa	+	+	-	-	-	-	-
CAMP	+	-	-	-	-	-	-
Hemólisis	+	+	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	+	-	-
Manitol	+	-	-	+	-	-	-
Lactosa	v	+	+	+	-	-	-
Arabinosa	-	+	-	-	-	+	-
Rafinosa	-	+	+	+	+	-	+

v: la variabilidad del resultado depende del grupo fenotípico.

glucosa y NAD permite crecimientos precoces, incluso al cabo de 6 horas con una cápsula bien desarrollada, cuya presencia produce iridiscencia característica cuando las placas se observan con luz oblicua; el medio PPLO es uno de los de elección para la tipificación y preparación de antígenos. Del mismo modo, se consiguen buenos crecimientos, en un tiempo similar, en caldo PPLO, con los mismos ingredientes que su variante sólida.

La identificación bioquímica básica se realiza demostrando la presencia del factor CAMP, producción de ureasa y requerimiento de factor V. Las principales actividades bioquímicas de *A. pleuropneumoniae* se enumeran en la tabla 33-2; en la tabla 33-3 se describen algunas características diferenciales con otras especies próximas que también se aíslan del tracto respiratorio porcino.

Los aislamientos se pueden confirmar, como *A. pleuropneumoniae*, utilizando técnicas de biología molecular como reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La determinación del serotipo se realiza a través de métodos serológicos que utilizan anticuerpos policlonales y monoclonales. Están descritas diferentes técnicas de serotipificación, como aglutinación, coaglutinación y difusión en gel, que utilizan como antígeno diferentes estructuras bacterianas (células enteras, cápsula, LPS). Se recomienda la realización de la serotipificación de los aislamientos para confirmar el diagnóstico bacteriológico y esto es esencial cuando se están considerando programas de vacunación con el objetivo de erradicar la enfermedad. También demuestran la distribución de los serotipos y la situación epidemiológica de la granja. Asimismo, se incluyen técnicas más sencillas de realizar, como diferentes variedades de ELISA, utilizando como antígenos extractos celulares o LPS de cadena larga. En todas estas técnicas deben considerarse las reacciones cruzadas con *A. suis* y otros miembros de la familia *Pasteurellaceae*.

TRATAMIENTO

La terapia antibiótica es eficiente sólo en la fase inicial de la enfermedad, cuando se puede reducir su mortalidad. Diversos agentes antimicrobianos se utilizaron para la prevención y el tratamiento de las enfermedades respiratorias porcinas: amoxicilina, ampicilina, ceftiofur, danofloxacina, enrofloxacina, eritromicina, lincomicina, lincomicina-espectinomicina, tiamulina, oxitetraciclina, tilosina, tilmicosina, y se obtienen diferentes resultados. Sin embargo, ninguno de ellos tiene afinidad específica contra *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Como complemento final del diagnóstico bacteriológico se recomienda la realización de pruebas de sensibilidad antimicrobiana con la finalidad de establecer los antibióticos apropiados para el tratamiento de la enfermedad.

PROFILAXIS

Para el control de la pleuroneumonía se desarrollaron una gran variedad de vacunas. Se dividen principalmente en dos grupos: las bacterinas y las constituidas por subunidades bacterianas. La vacunación con bacterinas es serotipo específica con inmunidad cruzada entre los serotipos que comparten determinantes antigénicos. También es importante el tipo de adyuvante utilizado, dado que algunos pueden afectar la eficacia; debe prestarse atención en cerdos que tienen como finalidad el consumo humano, ya que hay adyuvantes que producen efectos no deseados, como lesiones granulomatosas en el sitio de inyección. Las vacunas pertenecientes al segundo grupo son las que están en continuo desarrollo o son comercializadas, y consisten en una variada combinación de subunidades estructurales, como toxinas y proteínas de membrana externa. Se observó una gran cantidad de antígenos protectores: toxinas, combinación de toxinas y proteínas de membrana externa, productos extracelulares y antígenos estructurales y funcionales, como las proteínas captadoras de hierro. Generalmente, este tipo de vacunas protegen contra todos los serotipos.

Normalmente, la vacunación se realiza cuando los anticuerpos maternos decaen, a fin de otorgar un alto nivel de protección y evitar la mortalidad, reducir la morbilidad y la cantidad de tratamientos requeridos, incrementar la ganancia de peso diaria y aumentar el índice de conversión. Las vacunas no evitan el estado de portador, pero son muy útiles en los programas de erradicación. La decisión de vacunar debe ser estudiada con detenimiento; no sólo se debe considerar el costo de la mortalidad sino también los beneficios que se obtienen en los parámetros productivos.

BIBLIOGRAFIA

Bossé JT, Janson H, Sheenhan B, Beddek A, Rycroff N, Kroll JS, *A. pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. Microbes and Infect 2002; 4:225-235.

Frey J, Bosse JT, Chang YF, Cullen JM, Fenwick B, Gerlach GF, Gygi D, Haesebrouck F, Inzana TJ, Janse R. *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytolysins, pleurotoxin and their genes. J Gen Micro 1993; 139:1723-1728.

Gottschalk M, Broes A, Fittipaldi N. Recent developments on *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Proceeding. American Association of Swine Veterinarians 2003; 387-393.

Inzana TJ. Virulence properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Microb Pathogen 1991; 11:305-316.

Moredo FA, Zielinski G, Gottschalck M, Perfumo CJ. Aislamiento e identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 7 de cerdos con pleuroneumonía en la República Argentina. XXI Cong Chileno de Microbiología "Dr. Janis Grinbergs M." Octubre de 1999. Valdivia, Chile.

Perfumo CJ, Sanguinetti RH, Idiart J, Giacoboni G, Moredo F, Vigo G. Impacto económico de la pleuroneumonía por *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovariedad 1 en cerdos, en una granja de ciclo completo con un plan de vacunación. Rev Med Vet 2000; 81(5):385-388.

Rodríguez Ferri EF. Caracterización y prevalencia de cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en España. Avances en tecnología porcina 2002; 219.

Shope RE, White DC, Leidy G. Porcine contagious pleuroneumonia. II. Studies of the pathogenicity of the etiological agent *Haemophilus pleuropneumoniae*. J Exp Med 1964; 119:369-375.

Sirois M, Higgins R. Biochemical typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Vet Microbiol 1991; 27:397-401

Taylor DJ. Disease of Swine. 8ª ed. Iowa State Univ Press. Ames, Iowa (USA), 1999; p.343-354

Capítulo 34

HAEMOPHILUS, HISTOPHILUS Y AVIBACTERIUM

Horacio Raúl Terzolo,
Ana Rita Moreira

INTRODUCCION

Estos tres géneros de la familia *Pasteurellaceae* fueron originalmente descritos dentro del género *Haemophilus* y *Pasteurella*. Son microorganismos gramnegativos inmóviles, no esporulados y que fermentan la glucosa sin producir gas.

En su origen, las especies del género *Haemophilus* se han definido por su requerimiento de uno o ambos factores de crecimiento: el factor termoestable X (hemina) y el factor termolábil V o Coenzima I (dinucleótido de adenina y nicotinamida o NAD). El primero es un derivado de la hemoglobina, mientras que el segundo se puede obtener a partir de extracto de levadura o de ciertas bacterias, como por ejemplo, *Staphylococcus aureus*. Estos factores están en la sangre hemolizada o caliente, aunque también se encuentran en la yema de huevo y en algunos tejidos vegetales. La dependencia de uno o ambos factores de crecimiento era antes una condición imprescindible de pertenencia al género *Haemophilus*. Actualmente, esta dependencia carece del valor taxonómico que originalmente se le había asignado, pues existen cepas genéticamente idénticas que varían en sus requerimientos debido a la adquisición o pérdida de un plásmido. En este género se incluyen varias especies muy patógenas para el hombre y causantes de graves enfermedades, como meningitis, artritis, septicemia, neumonía, etc. *Haemophilus parasuis*, agente etiológico de la poliserositis o enfermedad de Glässer de los porcinos, sólo requiere el factor V. Otros hemófilos de interés veterinario son *Haemophilus haemoglobinophilus*, habitante del tracto genital del perro y causante de septicemias en cachorros; *Haemophilus felis*, habitante del tracto respiratorio de los gatos y ocasionalmente asociado a neumonías obstructivas; *Haemophilus paracuniculus*, agente de neumonías en conejos; y *Haemophilus influenzaemurium*, agente de neumonías en ratas. Cabe comentar que tres especies patógenas del género *Haemophilus* han sido transferidas a otros géneros y su nomenclatura actual es: *Taylorella equigenitalis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Gardenerella vaginalis*.

El género *Histophilus* incluye a una única especie, *Histophilus somni*, que comprende a microorganismos de los rumiantes, antes descritos como *Haemophilus somnus*, *Haemophilus agni* o *Haemophilus ovis*. Esta bacteria crece mejor en medios con sangre, aunque no requiere de ninguno de los factores de crecimiento. Para su desarrollo en medios de cultivo artificiales requiere la adición de vitamina B_1 o tiamina. Es el agente causal de la meningoencefalitis tromboembólica (MET) de los bovinos y provoca varias enfermedades sistémicas respiratorias y reproductivas de los bovinos y ovinos.

El género *Avibacterium* agrupa a varias especies bacterianas de las aves, dependientes o independientes del factor V. *A. paragallinarum* es el agente causal de la coriza infecciosa de la gallina. *A. gallinarum* es un agente bacteriano asociado a coriza, cólera y ocasionalmente tenosinovitis. *A. avium* y *A. volantium* son especies de poca patogenicidad aisladas del tracto respiratorio.

HAEMOPHILUS PARASUIS: POLISEROSITIS Y NEUMONIA PORCINA

LA ENFERMEDAD Y SU EPIDEMIOLOGIA

La enfermedad de Glässer o poliserositis es una enfermedad cosmopolita de presentación esporádica que puede causar brotes muy graves en animales susceptibles. *Haemophilus parasuis* es de distribución cosmopolita y está presente en casi todos los criaderos, incluso en aquellos con buena sanidad. En los establecimientos donde la bacteria es endémica, las cerdas madres desarrollan una fuerte inmunidad calostral, la cual persiste en altos niveles en sus lechigadas hasta alrededor de la cuarta semana de vida. Como consecuencia de la inmunidad pasiva, aunque *Haemophilus parasuis* esté presente en el establecimiento, la infección de los lechones es mínima o nula. En general, los cerdos se infectan y permanecen como portadores subclínicos, cuando todavía están pasivamente protegidos, desarrollando así su propia respuesta inmune. En los criaderos donde la inmunidad materna es baja se puede desarrollar una enfermedad grave en los lechones lactantes, particularmente cuando provienen de madres primerizas.

La bacteria es muy lábil y sólo sobrevive unas pocas horas fuera del animal hospedador, aun cuando se la conserva en medios de cultivo muy nutritivos, siendo los animales portadores la fuente de infección y el reservorio para el hato. Este microorganismo tiene una relación simbiótica con otras bacterias y virus respiratorios. Por ejemplo, es común la asociación con virus de la influenza porcina y micoplasmas. Recientemente se ha demostrado que el virus de la seudorrabia destruye las células epiteliales del aparato respiratorio y genera focos de alveolitis y bronquiolitis necrotizante que son luego colonizados por *Haemophilus parasuis*. La asociación con estos microorganismos provee un ambiente favorable para la multiplicación pulmonar. Los animales que enferman de neumonía contagian directamente a otros por medio de estornudos y diseminación de *Haemophilus parasuis* a través de gotas del tracto respiratorio o, indirectamente de la contaminación de los implementos de los corrales de cría.

Haemophilus parasuis puede producir una enfermedad sistémica en cerdos de cualquier edad y estado productivo. Esta forma septicémica se denomina poliserositis, pues afecta a todas las membranas serosas del organismo. Ocurre en piaras libres de *Haemophilus parasuis* que no están inmunológicamente protegidas. Los brotes de la enfermedad suelen ocurrir cuando se introducen animales portadores en una piara libre de la infección. *Haemophilus parasuis* es agente primario de rinitis purulenta y tradicionalmente se lo consideraba un agente secundario de neumonía, asociado a varios otros agentes patógenos. Sin embargo, varios estudios recientes describen a cepas de *Haemophilus parasuis* como causantes primarios de neumonía fibrinopurulenta

y por ello ahora se lo considera agente causal de una enfermedad en franco aumento o emergente.

MORFOLOGIA Y CARACTERISTICAS GENERALES

Este microorganismo presenta un alto grado de pleomorfismo que varía entre cocos y cocobacilos aislados a largos bacilos y filamentos agrupados en largas cadenas. Requiere NAD y para su aislamiento es recomendable el uso de medios de cultivo ricos, como el agar Columbia o agar base con sangre equina hemolizada. Se desarrollan mejor con el agregado de CO_2 pero este gas no es indispensable. Después de 24 horas de incubación, las colonias son pequeñas, translúcidas, lisas y brillantes. Con mayor tiempo de incubación pueden aparecer colonias mucoides debido al desarrollo de una cápsula superficial compuesta por un polisacárido acidófilo. Las cepas capsuladas forman cocobacilos, mientras que las acapsuladas tienen mayor tendencia al pleomorfismo y presentan estructuras bacilares y filamentosas. Además, *Haemophilus parasuis* desarrolla fimbrias cuando se cultiva en la membrana corioalantoidea de huevos embrionados de gallina.

COMPOSICION ANTIGENICA

Se reconocen 15 serovariedades basadas en pruebas de inmunodifusión. El antígeno que brinda especificidad es un polisacárido termorresistente. Las serovariedades más prevalentes son las 5, 4 y 13. Dado que se describen muchas cepas inclasificables, es muy probable la existencia de serovariedades adicionales menos comunes. Molecularmente, *Haemophilus parasuis* constituye un grupo homogéneo de bacterias con la mayoría de las cepas cruzando entre sí con una homología de alrededor del 85%. La cepa Nagasaki (serovariedad 5) es una excepción pues tuvo sólo un 65% de identidad con el resto de las cepas de *Haemophilus parasuis*. La comparación de las secuencias del 16S rRNA reveló que *Haemophilus parasuis* fue la especie más estrechamente relacionada con *A. indolicus* (Taxón F), cuyos niveles de similitud variaron entre 97,4 y 97,7%. De hecho, las diferencias entre estas dos especies son mínimas y consisten en la producción de indol y ácido de la rafinosa por *A. indolicus* (tabla 34-1).

RESPUESTA INMUNE

Dado que los lechones generalmente se infectan en las granjas durante la primera semana de vida, éstos deben ser vacunados lo antes posible. La inmunidad materna juega un papel fundamental en la protección de los lechones. La inmunidad pasiva no interfiere con la vacunación sino que incrementa la protección. Los lechones vacunados con bacterias inactivadas entre la primera y la tercera semana de vida, que son hijos de marranas también vacunadas y con altos títulos de anticuerpos maternos, no desarrollan enfermedad cuando son experimentalmente desafiados con las mismas cepas vacunales. Por el contrario, cuando estos animales se vacunan del mismo modo pero provienen de madres sin vacunar, desarrollan la enfermedad cuando son desafiados con las mismas cepas vacunales. Por lo tanto, siempre se deben vacunar tanto las madres como los lechones.

Además de las 15 serovariedades reconocidas, existen muchas otras inclasificables y menos frecuentes, e incluso también se aíslan cepas apatógenas. Dada la diversidad de cepas existentes es altamente recomendable la vacunación con cepas autóctonas. En general, la protección cruzada entre las serovariedades es parcial o nula. Por ejemplo, cuando los porcinos son vacunados con vacunas bivalentes, que incluyen las serovariedades 4 y 5, y luego son desafiados con las serovariedades 13 y 14, sólo existe protección parcial contra la enfermedad, puesto que los animales enferman aunque se reduce la mortalidad y la intensidad de las lesiones. Por otro lado, los porcinos vacunados con la mencionada bacterina bivalente no tienen absolutamente ninguna protección cuando son desafiados con las serovariedades 2, 12 u otra serovariedad no serotipificable.

Tabla 34-1. Diferenciación de cepas NAD dependientes de origen porcino de la familia *Pasteurellaceae*

Características bioquímicas	**Otras *Pasteurellaceae* NAD-dependientes**					
	H. parasuis	*Actinobacillus pleuropneumoniae*	*Actinobacillus minor*	*Haemophilus* Taxón C	*Actinobacillus porcinus*	*Actinobacillus indolicus*
Ureasa	-	+	+	-	-	-
Hemólisis	-	+	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	+
Fermentación de:						
Glucosa	+	+	+	+	+/-	+
Lactosa	-	-	+	-	+/-	+/-
Sacarosa	+	+	+	+	+/-	+
Manitol	-	+	-	-	+/-	+/-
Xilosa	-	+	+/-	-	+/-	+/-
L-Arabinosa	-	-	-	+	+/-	-
Rafinosa	-	-	+	+	+/-	+

Fuentes: Moller y Kilian, 1990; Rapp-Gabrielson, 1992; Moller y col., 1996.
Nota: *A. minor* era conocido anteriormente como *Haemophilus* taxón "Grupo Minor"; *A. porcinus* era conocido anteriormente como *Haemophilus* sp Taxones D y E; *A. indolicus* era anteriormente conocido como *Haemophilus* sp Taxón F.
Clave: + indica que más del 90% de los aislamientos son positivos; - indica que menos del 10% de los aislamientos son positivos; +/- señala reacciones inconstantes entre aislamientos.

PATOGENESIS

Las serovariedades han sido utilizadas como indicadores de virulencia. La inoculación intraperitoneal de lechones libres de patógenos específicos (SPF) con las serovariedades 1, 5, 10, 12, 13 y 14 o no tipificables causó alta morbilidad o mortalidad al cuarto día posinfección; estas serovariedades se han clasificado como altamente virulentas. Las serovariedades 2, 4 y 15 causaron poliserositis, aunque no la muerte, y se clasificaron como moderadamente virulentas. Las serovariedades 3, 6, 7, 8, 9 y 11 no produjeron muerte ni enfermedad y se clasificaron como avirulentas.

Mediante técnicas de perfiles proteicos celulares completos por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) de *Haemophilus parasuis* se ha sugerido que cepas patógenas comparten un grupo principal de proteínas de peso molecular de alrededor de 37. Las cepas avirulentas que carecen de estas proteínas se clasifican como PAGE Tipo I y las virulentas que las poseen se designan como PAGE Tipo II. Aproximadamente el 90% de las cepas virulentas aisladas de órganos de animales enfermos se confirman como PAGE Tipo II, mientras que las obtenidas de la mucosa nasal varían entre un 75% de Tipo I y un 25% de Tipo II, o bien se aísla un 50% de cada tipo.

La asociación de la virulencia con la presencia de cápsulas ha generado controversias. La mayoría de las cepas de *Haemophilus parasuis* aisladas de la mucosa nasal de animales sanos son capsuladas, mientras que las cepas aisladas de sangre y órganos internos suelen ser acapsuladas. Se ha demostrado que el pasaje in vivo transforma en capsuladas a cepas que originalmente no tienen cápsula, mientras que mediante pasajes in vitro las cepas que originalmente son capsuladas reducen cuantitativamente su expresión. Por otro lado, aunque *H. parasuis* expresa fimbrias por pasaje in vivo, la adherencia por éstas no es indispensable para la colonización del tracto respiratorio superior. Los lipooligosacáridos (LOS) de ambos tipos de perfiles proteicos de PAGE son el principal componente de la membrana externa y las cepas virulentas y avirulentas comparten los mismos perfiles de LOS.

Este microorganismo tiene la capacidad de cruzar la barrera mucosa e invadir el torrente sanguíneo. Sin embargo, se desconocen los factores implicados en la invasión sistémica de *Haemophilus parasuis*. Se especuló que el aislamiento de *Haemophilus parasuis* de la porción media de la cavidad nasal estaría relacionado con casos de rinitis supurativa aguda, pérdida de cilias y degeneración celular en las mucosas traqueal y nasal. No obstante, no pudo confirmarse, ni por microscopia electrónica ni por inmunohistoquímica, que *Haemophilus parasuis* colonizara específicamente estas áreas con pérdida de cilias o con degeneración celular. Es posible que estos daños celulares puedan deberse a una citotoxina soluble de *Haemophilus parasuis*.

Se demostró la producción de neuraminidasa (sialidasa) en el 90% de los aislamientos de campo. Esta enzima genera canales en la capa de carbohidratos de las células del hospedador. Adicionalmente, la neuraminidasa interfiere con las defensas de las mucosas del animal al disminuir la viscosidad de la mucina.

ASPECTOS CLINICOS Y PATOLOGICOS

La presentación clínica depende de la localización de las lesiones inflamatorias y de la asociación de *Haemophilus parasuis* con otros agentes. Los signos clínicos incluyen pirexia y apatía, seguidos por inapetencia y anorexia. La enfermedad de Glässer está caracterizada por poliserositis fibrinosa, poliartritis y meningitis. También pueden observarse neumonías agudas sin poliserositis. En concordancia con estas lesiones, los síntomas son disnea, dolor que se evidencia por chillidos, dificultades locomotoras debidas a problemas articulares y, cuando se afectan las meninges, síntomas nerviosos de incoordinación y temblores. *Haemophilus parasuis* muy a menudo produce septicemia y su endotoxina induce coagulación intravascular con formación de microtrombos en diversos órganos y tejidos, particularmente en el tejido muscular esquelético. Según la localización de los trombos se producen distintos síntomas clínicos. Así, por ejemplo, se han descrito casos de miositis del músculo masetero con linfoadenitis submandibular supurativa y notable inflamación aguda de los carrillos. Una forma de presentación más leve es la rinitis purulenta sin extensión del proceso infeccioso, ya sea porque los animales tienen cierto grado de inmunidad o porque las cepas actuantes son menos patógenas.

Una vez pasado el brote agudo de la enfermedad, la piara puede permanecer con animales que sufren secuelas crónicas. El aborto de las madres primerizas y la cojera crónica de los verracos son las secuelas más frecuentes. Incluso después que los tratamientos con antibióticos aparentan haber controlado completamente la enfermedad, en pariciones sucesivas siguen apareciendo animales con problemas de disnea, pérdida de peso, cojera y aspereza del pelaje. En estas piaras, el rendimiento productivo es bajo y el control definitivo sólo se logra con una buena inmunización.

Las lesiones microscópicas primarias consisten en un exudado serofibrinoso o fibrinopurulento en el peritoneo, pleura o pericardio, las articulaciones del carpo y el tarso, y las meninges. El exudado está formado por fibrina y neutrófilos con menor cantidad de macrófagos. Menos frecuentemente se puede producir enfermedad septicémica muy aguda con cianosis, edema subcutáneo y pulmonar, siendo la muerte, en estos casos, muy rápida.

DIAGNOSTICO

El diagnóstico se basa en la historia de la piara, los signos clínicos y los hallazgos de necropsia. La historia de la piara es muy importante pues generalmente los brotes se producen en criaderos libres de la enfermedad en los cuales se han introducido animales de otros orígenes. El aislamiento de *Haemophilus parasuis* de los órganos y las lesiones patognomónicas de la enfermedad se requiere para confirmar el diagnóstico. Sin embargo, a veces es difícil recuperar el microorganismo por su fragilidad, por sus altas exigencias nutritivas y porque suele estar asociado con muchas otras bacterias similares. En estos casos, el empleo de pruebas de PCR u otras de biología molecular puede facilitar el diagnóstico. Es muy importante seleccionar animales en su fase aguda de la enfermedad y sobre todo que no hayan sido medicados con antibióticos. Las mejores posibilidades de recobrar *Haemophilus parasuis* se obtienen cultivando superficies serosas y exudados, líquido cefalorraquídeo y sangre de corazón. Lo importante es seleccionar animales que cursen la enfermedad en forma aguda, aun cuando las lesiones sean todavía incipientes.

Para aislar *Haemophilus parasuis* se han usado diluciones en medios selectivos con antibióticos, basados en el agregado de sangre equina hemolizada. Se utilizan pruebas bioquímicas (tabla 34-1) para distinguir *Haemophilus parasuis* de otras bacterias NAD dependientes, la mayoría con baja patogenicidad, excepto *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Todas estas bacterias suelen estar presentes y generalmente tienen abundante desarrollo cuando se cultivan muestras de la cavidad nasal, las amígdalas o los pulmones. Además, de un mismo porcino pueden aislarse diferentes cepas de *Haemophilus parasuis*, incluso de distintas

serovariedades, siendo algunas de ellas virulentas y otras no. Lo ideal es poder serotipificar los aislamientos o efectuar estudios de biología molecular como "fingerprints" de DNA.

El diagnóstico más difícil es el de los casos de bronconeumonía sin presentación de poliserositis o síntomas nerviosos. En este tipo de presentaciones, lo más común es la asociación de varios agentes infecciosos. La poliserositis es más común en porcinos de 4 a 12 semanas y ocurre más frecuentemente en otoño e invierno; el microorganismo que se aísla con mayor asiduidad es *Haemophilus parasuis* (36%) seguido por *Mycoplasma hyorhinis* (18%) y, con mucha menor frecuencia, *Streptococcus suis* y *Pasteurella multocida*. En casos de meningitis con sintomatología nerviosa debe hacerse un diagnóstico diferencial con *Streptococcus suis* mediante aislamiento de las bacterias de los fluidos cerebroespinales. En general, el diagnóstico diferencial debe incluir otras infecciones bacterianas, como las causadas por *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Actinobacillus suis*, *Salmonella choleraesuis* variedad *kunsendorf* y *Escherichia coli*.

El diagnóstico serológico de *H. parasuis* es poco preciso. La detección de anticuerpos se ha efectuado por fijación del complemento, hemaglutinación indirecta y pruebas de ELISA. Los mejores resultados se obtuvieron con pruebas de ELISA efectuadas con células enteras de *Haemophilus parasuis*, detectando tanto anticuerpos de infección como maternos.

TRATAMIENTO Y DESINFECCION

En caso de aparecer un brote de esta enfermedad, lo más conveniente es comenzar el tratamiento de inmediato. Inicialmente se deben administrar antibióticos apropiados por vía parenteral. Cabe señalar que los tratamientos administrados sólo por vía oral son ineficaces. Todos los animales de una piara deben ser tratados y no solamente aquellos que evidencien síntomas clínicos. Es aconsejable iniciar los tratamientos con altas dosis pues es necesario que los antibióticos alcancen, además de los órganos internos y la sangre, lugares de más difícil penetración, como el fluido cerebroespinal y las articulaciones. El antibiótico que se seleccione depende de la resistencia de las cepas aisladas en el establecimiento, pero si ese dato no está disponible, deben tenerse en cuenta los tratamientos anteriores para efectuar rotaciones de los antibióticos. La mayoría de las cepas de *Haemophilus parasuis* son sensibles a la ampicilina, amoxicilina, fluorquinolonas, cefalosporinas, gentamicina, espectinomicina, ceftiofur y sulfamidas potenciadas con trimetoprima. Pueden combinarse tratamientos inyectables con 3 días de medicación en el agua. Muchas cepas son resistentes a la penicilina, tetraciclinas, eritromicina y otros aminoglucósidos. La desinfección y limpieza de las instalaciones y utensilios, junto con la aplicación de productos desinfectantes en el agua de bebida, son medidas complementarias que pueden aplicarse para evitar la difusión de la enfermedad.

PROFILAXIS

Cuando se sabe que una piara está libre de casos clínicos debidos a *H. parasuis*, bajo ningún concepto deben introducirse animales de otro origen en el establecimiento. Debe tenerse en cuenta que los porcinos portadores son la vía más común de introducción de la infección. Del mismo modo debe tenerse cuidado en no trasladar implementos de crianza entre granjas diferentes sin previa desinfección. En general, las medidas de bioseguridad deben ser muy exigentes y deben extremarse con el personal involucrado en el manejo de los animales.

Es muy distinta la situación de una piara infectada. Es un hecho conocido que las piaras que tienen animales portadores de *Haemophilus parasuis* en sus fosas nasales tienen una mayor resistencia cuando son expuestos a cepas patógenas. Por este motivo, no es conveniente realizar la eliminación completa de *H. parasuis* de los lechones portadores mediante tratamientos con antibióticos pues lo mejor es que éstos estén colonizados. Una medida adecuada es incrementar la edad del destete para que los lechones compartan más tiempo con sus madres y así tengan mayor oportunidad de ser colonizados por cepas autóctonas, recibiendo también protección por el calostro. De acuerdo con los antecedentes de cada granja, se deben balancear muy bien los tiempos exactos de destete, puesto que un destete demasiado tardío puede permitir el desarrollo de brotes de otras enfermedades, entre ellas, la pleuroneumonía infecciosa.

Uno de los métodos de protección experimentados fue infectar los lechones de 5 días de vida por vía oral con 1×10^3 unidades formadoras de colonias de una cepa virulenta. En este período, los anticuerpos maternos son muy altos y protegen adecuadamente a los lechones infectados durante unas 4 a 6 semanas después del nacimiento. Estos lechones desarrollan su propia inmunidad mientras actúan los anticuerpos maternos, de tal manera que cuando éstos desaparecen al ser destetados, ya quedan bien protegidos por sus propios anticuerpos. Si bien este procedimiento ha sido exitoso en algunas granjas, no siempre es recomendable introducir bacterias virulentas, sobre todo si existen otras enfermedades concomitantes.

Lo mejor es vacunar a todos los animales del establecimiento con bacterinas autóctonas o combinar éstas con vacunas inactivadas comerciales. En todo caso debe tenerse en cuenta que cada vacuna inactivada o bacterina siempre debe administrarse en 2 dosis separadas para lograr un efecto búster. Los lechones pueden vacunarse entre la primera y la tercera semana de vida y revacunarse a los 3 meses de edad. Las marranas deben estar vacunadas cuando se destetan, de modo tal que la última vacunación sea administrada 3 semanas antes del parto subsiguiente. Es necesario efectuar revacunaciones anuales de los verracos.

Otra de las medidas profilácticas excepcionales que se han recomendado en establecimientos en los cuales la enfermedad es un gran problema, es la inclusión de antibióticos en la ración de las marranas, 7 días antes y 7 días después del parto, así como también su agregado en las dietas lácteas de los porcinos. Sin embargo, estos antibióticos no deben ser usados en forma rutinaria pues así se genera resistencia en las bacterias.

HISTOPHILUS SOMNI: SINDROMES RESPIRATORIOS, REPRODUCTIVOS Y NERVIOSOS DE LOS BOVINOS Y OVINOS

LA ENFERMEDAD Y SU EPIDEMIOLOGIA

En general, las infecciones por *Histophilus somni* ocurren en animales de todas las edades, desde fetos hasta adultos, aunque ciertas presentaciones clínicas específicas pueden tener una particular predilección por un tejido u órgano, dependiendo de la edad, del estado fisiológico del animal y del medio ambiente en donde se cría. Se ha descrito la transmisión horizontal de la bacteria acantonada en las cavidades nasales de animales portadores hacia otros libres de la

infección. El estrés y el virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) son los agentes predisponentes más comunes.

Histophilus somni está comúnmente asociado a enfermedades respiratorias y afecta a animales de todas las edades, aunque es más frecuente en bovinos jóvenes, causando la denominada "neumonía enzoótica del ternero". A pesar de que muchas de las neumonías de los terneros están frecuentemente asociadas con múltiples agentes bacterianos o víricos, a veces se produce una neumonía crónica, con alta morbilidad y mortalidad, que es exclusivamente causada por *Histophilus somni*. En muchos de estos casos, la adquisición de la enfermedad se debe a una infección intrauterina de la madre, con el nacimiento de terneros enfermos o debilitados con diversos desórdenes, entre los que pueden incluirse desde lesiones articulares hasta meningitis.

Histophilus somni ha sido recuperado del tracto genital de vacas y del semen y del prepucio de toros aparentemente sanos. Hay autores que sugieren que el toro representa uno de los reservorios más importantes de *Histophilus somni*. La alta proporción de portadores de *Histophilus somni* en el tracto urogenital indica que este sitio debería considerarse como el principal foco de infección, pues el microorganismo puede ser inhalado, ingerido o bien trasmitido por vía venérea desde este lugar.

La meningoencefalitis tromboembólica (MET) es una enfermedad del ganado bovino criado en "feedlots", donde tiene mayor prevalencia durante los meses de invierno. Es poco frecuente en ganado para carne y leche criado sobre pasturas. Generalmente se presenta en animales jóvenes, desde los primeros meses de vida y hasta los 2 años de edad.

MORFOLOGIA Y CARACTERISTICAS GENERALES

Histophilus somni es un cocobacilo gramnegativo, altamente pleomórfico en primoaislamiento, aunque pierde el pleomorfismo con sucesivos subcultivos. No presenta cápsula ni fimbrias. No requiere ninguno de los factores de crecimiento X o V. Se desarrolla en infusión cerebro-corazón o agar Columbia con el agregado de 5-10% de sangre bovina u ovina. La incorporación de vancomicina (5 µg/ml), neomicina (5 µg/ml), azida de sodio (50 µg/ml) y nistatina (100 UI/ml) permite el aislamiento de la bacteria a partir de muestras contaminadas. En los medios para pruebas bioquímicas, la sangre se remplaza con el agregado de una mezcla *ana-ana* de suero bovino y ovino más 1 µg/ml de pirofosfato o monofosfato de tiamina o vitamina B_1. En primoaislamiento requiere una atmósfera enriquecida con un 10-20% de CO_2. Luego de 2 días de incubación a 37 °C, aparecen colonias de 1-2 mm, redondeadas, lisas, brillantes, butirosas y de débil color amarillo-grisáceo, que torna amarillo intenso a medida que los cultivos envejecen. Generalmente no son hemolíticas, aunque en algunos cultivos alcanza a percibirse una leve hemólisis α débil que sólo se visualiza por debajo de las colonias. La fermentación de hidratos de carbono ha arrojado resultados consistentes con glucosa, manosa, trehalosa y xilosa, que son siempre fermentados (positivos), y con dulcitol y rafinosa, que nunca son fermentados (negativos). Las cepas bovinas y ovinas tienen gran similitud molecular (más del 99,4%), aunque pueden diferenciarse mediante PCR *rpoB* DNA amplificado con análisis de restricción específica utilizando la enzima *HincII*.

COMPOSICION ANTIGENICA

Con anticuerpos policlonales adsorbidos en forma cruzada se han clasificado 4 serovariedades con un alto grado de similitud antigénica. Los LOS de la membrana externa presentan gran variación fenotípica. Mediante anticuerpos monoclonales de ratón, se han determinado 6 tipos antigénicos basados en diferencias restringidas a la cubierta superficial de los LOS con un alto grado de variación al azar, lo que determina una alta heterogeneidad antigénica en una misma cepa.

RESPUESTA INMUNE

Existen cepas comensales y virulentas. Sólo estas últimas son capaces de invadir el torrente circulatorio y producir septicemia. Cuando una cepa patógena invade el torrente circulatorio es capaz de evadir la respuesta inmune, mientras que una cepa comensal no puede hacerlo. Las cepas patógenas tienen múltiples mecanismos de evasión de la respuesta inmune. In vitro las cepas capsuladas son resistentes a la acción bactericida de una mezcla de sueros inmunes, mientras que las cepas acapsuladas son sensibles. Las cepas virulentas adsorben la IgG del huésped por la fracción Fc, es decir, por la parte inactiva de la inmunoglobulina; de este modo se anula la respuesta inmune al impedir la opsonización de los fagocitos por los receptores Fc e interferir con el efecto bactericida del complemento. La variación fenotípica de los LOS produce, en una misma cepa, una diversidad de antígenos de membrana externa. *Histophilus somni* también produce una citotoxina que interfiere con la acción bactericida de los fagocitos; de este modo, la bacteria sobrevive intracelularmente dentro de los macrófagos y allí está protegida de la acción de los anticuerpos humorales.

Es muy importante considerar la hipersensibilidad en las infecciones por *Histophilus somni*. La respuesta primaria a la infección pulmonar es una elevación de la clase IgE y una hipersensibilidad que desencadena reacciones de "tipo asmático". La inoculación intradérmica de extractos celulares del microorganismo produce reacciones cutáneas de inflamación e hinchazón que sólo ocurren en los animales que han enfermado. Por otro lado, no existe relación entre el grado de protección frente al desafío con bacterias virulentas y el nivel de anticuerpos circulantes o humorales. Este hecho, junto con la capacidad de supervivencia intracelular de *Histophilus somni*, nos indica que es necesario desarrollar inmunidad celular para lograr una protección adecuada.

PATOGENESIS

Histophilus somni es capaz de adherirse a una gran variedad de tipos celulares bovinos, incluyendo las células de los endotelios vasculares, las de los cornetes nasales y las de los epitelios vaginales. Todas las cepas capaces de adherirse presentan autoaglutinación. La adherencia de *Histophilus somni* a las células endoteliales produce la contracción de estas células, exponiendo así el subendotelio de colágeno. No se conoce el mecanismo por el cual *Histophilus somni* causa esta contracción, pero ésta produce la formación de trombos a los cuales sigue una vasculitis con multiplicación de este microorganismo dentro de los trombos. Histológicamente, en las lesiones iniciales se observa inflamación e infarto de los capilares y las vénulas. La reacción subsecuente involucra a los tejidos adyacentes afectando grandes vasos sanguíneos y desencadenando isquemia e infarto.

Histophilus somni puede producir septicemia pues posee receptores de transferrina específicos del bovino, que son proteínas de membrana externa (PME) de 105 y 73 kDa. Otra proteína de membrana externa de 31 kDa lisa los eritrocitos bovinos, pero no se ha demostrado que esta hemolisina sea un factor de virulencia significativo. Las cepas que causan neumonía tienen una PME de 40

kDa que juega un rol importante en la patogenia de la enfermedad en el tracto respiratorio, puesto que se ha demostrado que los antisueros provenientes de bovinos inmunizados contra estas proteínas proveen protección pasiva contra neumonías experimentales.

Las cepas patógenas de *Histophilus somni* tienen una marcada resistencia a la muerte intracelular debido a que son capaces de inhibir la producción del anión superóxido (O_2^-). Esta inhibición ha sido demostrada con macrófagos alveolares y leucocitos polimorfonucleares.

Histophilus somni tiene dos proteínas responsables de la adherencia de la fracción Fc de las inmunoglobulinas del bovino: una proteína de 270 kDa, denominada p270, que liga específicamente a los isotipos IgG2, IgA e IgM; y otra de 41 kDa, que aunque es la PME más importante de *Histophilus somni*, sólo liga débilmente a las IgG1, IgG2, IgA e IgM.

La pérdida o ganancia de epitopes, también conocida como variación de fase, ocurre tanto in vivo como in vitro. Cuando el bovino establece una respuesta inmune humoral, la variación de fase de los LOS resulta en la selección de cepas variantes que poseen determinantes antigénicos no reconocidos por los anticuerpos del hospedador. Esta variación de fase es en realidad la expresión de cambios moleculares que mimetizan a la bacteria con estructuras idénticas a los antígenos oligosacáridos del huésped, como por ejemplo, los glucoesfingolípidos. Junto a la mencionada estructura esquelética de los LOS, *Histophilus somni* también contiene fosfocolina, fosfoetanolamina y grupos fosfatos, que están unidos a los LOS de las cepas que colonizan el tracto respiratorio. Estos fosfatos son los responsables de la variación antigénica de las cepas causantes de neumonías.

La sialización de los LOS es otro importante mecanismo de evasión de la respuesta inmune humoral. El ácido siálico es el nombre genérico de un grupo de 20 formas diferentes de ácido neuramínico, que se encuentra presente en la mayoría de las células de los animales superiores. La sialización es la unión química del ácido siálico a residuos terminales de carbohidratos, usualmente galactosa. La sialización es usada para camuflar antígenos carbohidratados extraños al huésped, puesto que es una función natural en la embriogénesis, en la cual el trofoblasto del embrión en desarrollo queda protegido de los anticuerpos maternos. Este mecanismo resulta adverso cuando es utilizado por bacterias para evitar ser detectadas por el sistema inmune. La sialización explica por qué las cepas de *Histophilus somni* que colonizan el tracto genital pueden ser abortigénicas, puesto que mediante este mecanismo de camuflaje evaden la respuesta inmune materna.

ASPECTOS CLINICOS Y PATOLOGICOS

Histophilus somni bloquea los capilares e interrumpe el flujo sanguíneo a órganos vitales, provocando muerte celular y ocasionando una diversidad de síntomas clínicos, entre los que predominan los del tracto reproductivo y urinario, los del tracto respiratorio y formas septicémicas, además de otras presentaciones clínicas de menor relevancia.

Si se afecta el tracto reproductivo de vacas preñadas, la infección puede producir la muerte del feto durante cualquier período de la gestación, con el subsiguiente aborto e infección uterina. Cuando esta infección se prolonga en el tiempo, el proceso infeccioso se extiende a la vagina y el síndrome abortigénico puede repetirse. Otra manifestación clínica es la infertilidad y la consecuente repetición de celos, ocasionada por muerte embrionaria precoz. Debido a que *Histophilus somni* ha sido aislado del tracto urinario y del prepucio de toros, se ha especulado que este microorganismo podría ser venéreamente trasmitido. Por otra parte, esta bacteria se elimina por orina y descargas vaginales de animales infectados. Los animales susceptibles criados en sistemas intensivos (feedlots) están en estrecha proximidad con animales infectados y pueden adquirir el microorganismo aspirando los aerosoles producidos por las descargas urinarias sobre pisos duros o carentes de pastura, desarrollando así una presentación clínica respiratoria.

Este microorganismo tiene la habilidad de colonizar tanto el tracto respiratorio superior como el inferior. En terneros se puede presentar la denominada "difteria", en la cual se interrumpe el flujo sanguíneo de la laringe provocando necrosis, muerte y descamación de estos tejidos. El ternero afectado manifiesta dificultad para deglutir, balar y respirar, y a medida que la enfermedad avanza, se afecta también la tráquea. Cuando *Histophilus somni* alcanza los pulmones, se desarrolla una neumonía muy grave. Esta neumonía puede causar la muerte rápida del animal, aun antes de que se detecte cualquier otro signo clínico. Muy a menudo *Histophilus somni* es el agente primario de neumonía, pero suele ser rápidamente desplazado y sobrecrecido por otras bacterias como *Pasteurella multocida* y *Mannheimia* spp.

A partir de infecciones primarias de los tractos genitourinario o respiratorio, *Histophilus somni* puede ganar acceso al torrente sanguíneo. Los signos clínicos que se manifiestan en las formas septicémicas de esta enfermedad dependen de dónde el organismo se adhiera, colonice o bloquee los vasos sanguíneos. La gravedad de la presentación clínica depende del lugar en donde ocurre el bloqueo de flujo sanguíneo y de la extensión de tejido que resulta afectado. Cuando el bloqueo de los vasos sanguíneos ocurre en el cerebro o en la médula espinal y sus meninges, se produce la MET. Los animales afectados manifiestan síntomas nerviosos, tales como envaramiento, caminar en círculo, alteraciones locomotoras, ceguera, convulsiones y, finalmente, coma y muerte. Cuando el bloqueo del flujo sanguíneo ocurre en el corazón, se produce un ataque cardíaco por una miocarditis grave. Si el bloqueo circulatorio se produce en los músculos estriados, es común la renguera o el entumecimiento, siendo en estos casos frecuente la invasión de los tejidos musculares afectados por *Clostridium chauvoei*, agente causal de la mancha de los terneros. Cuando el bloqueo ocurre en el tracto gastrointestinal, la necrosis y la consecuente atonía de la porción intestinal afectada generan una proliferación exacerbada de clostridios, y se produce enterotoxemia. Si el bloqueo ocurre en el hígado, el tejido hepático necrosado resulta un ambiente apropiado para el desarrollo del *Clostridium haemolyticum* y el desencadenamiento de la hemoglobinuria bacilar.

La forma septicémica de la enfermedad también puede producir secuelas como artritis crónica, hinchazón articular y renguera crónica. También existen otras presentaciones de la enfermedad que son menos frecuentes, como por ejemplo, otitis o conjuntivitis. En la primera se produce una descarga fluida de color amarillento que mana del canal auditivo. En la segunda se produce congestión ocular y lagrimeo profuso. Además se han descrito algunos casos aislados de mastitis aguda, que pueden evolucionar hacia mastitis gangrenosa o infección sistémica.

DIAGNOSTICO

Al principio, cuando existe una gran diversidad de presentaciones clínicas con enfermedades concomitantes, el diagnóstico es difícil. Cuando se producen lesiones hemorrágicas en los músculos esqueléticos, cardíacos o en segmentos del intestino, estas lesiones son muy similares a las producidas por enfermedades clostridiales y, de hecho, varias especies de *Clostridium* spp pueden ser recuperadas.

La apertura de la laringe permite evidenciar las típicas lesiones de "difteria", que a menudo se complican con invasiones secundarias por *Spherophorus*, *Pasteurella*, *Mannheimia* y *Corynebacterium* spp. También puede producirse una traqueítis necrótica cuando *Histophilus somni* se asocia al virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR). Los animales que se recuperan de esta traqueítis complicada desarrollan un síndrome respiratorio caracterizado por tos crónica causada por lesiones polipoides en la tráquea.

Posteriormente, cuando aparecen formas clínicas patognomónicas, el diagnóstico se facilita. Una vez que la enfermedad se instala en el establecimiento ganadero, las infecciones uterinas se presentan inexorablemente. Los rodeos afectados mantienen la infección en su tracto reproductor, siendo éste el reservorio primordial del microorganismo y el sitio de elección para la búsqueda de la bacteria en animales portadores. En fetos abortados, el diagnóstico se puede efectuar fácilmente mediante el aislamiento del agente en cultivo puro a partir de líquido de abomaso y pulmones, o cualquier otro órgano interno. En terneros y novillos el envío de pulmones con lesiones de neumonía es de elección para el aislamiento del agente. En animales con síntomas nerviosos debe hacerse un diagnóstico histopatológico diferencial con encefalitis espongiforme bovina, poliencefalomalacia y listeriosis, entre otras. Cuando la muerte de los animales es hiperaguda, virtualmente no existen lesiones macroscópicas y el diagnóstico debe basarse en las lesiones microscópicas y en la detección del agente causal. En casos agudos de septicemia, los hallazgos observados en la necropsia incluyen neumonía, pleuritis fibrinosa, pericarditis, laringitis, exceso de fluido fibrinoso en las articulaciones, petequias renales y meningitis. En estos casos, el fluido cerebroespinal es opaco y puede coagular cuando se lo recolecta. Cuando la infección se prolonga, las lesiones descritas se hacen más evidentes, particularmente en los pulmones, la laringe, las articulaciones y el cerebro. En estos casos aparecen en el cerebro los típicos focos de hemorragia y necrosis que son patognomónicos de la MET.

El diagnóstico serológico tiene muy poca utilidad, puesto que esta bacteria, además de autoaglutinar, tiene reacción serológica cruzada con varios géneros bacterianos como *Actinobacillus*, *Listeria*, *Bordetella*, *Moraxella*, *Yersinia* y *Pasteurella*.

TRATAMIENTO Y DESINFECCION

Es necesario instaurar un tratamiento lo antes posible para detener el progreso de esta enfermedad en el rodeo. Si los síntomas clínicos no se detectan a tiempo y el tratamiento se retrasa, la supervivencia de los animales gravemente afectados es muy difícil. Por lo tanto, apenas realizado el diagnóstico, se deben inyectar antibióticos de última generación, como por ejemplo: enrofloxacina, ceftiofur, tilmicosina y florfenicol. Otros antibióticos de vieja generación que podrían utilizarse son la tetraciclina, penicilina y sulfamidas. Debido a la aparición de cepas resistentes es recomendable verificar la eficiencia de los antibióticos empleados mediante antibiogramas. Debe tenerse en cuenta que los antibióticos sólo detienen el desarrollo de este germen, siendo el sistema inmune del animal el que realmente controla la aparición de la enfermedad clínica. Por ello es necesario realizar tratamientos prolongados con los antibióticos, pues su suspensión prematura puede provocar recidivas de la enfermedad y nuevos brotes en el rodeo. El empleo de desinfectantes, como la fumigación de galpones con amonios cuaternarios, o el uso de formalina, hipoclorito de sodio o soda cáustica para los pisos de cemento, sólo tienen un fin práctico en bovinos estabulados o en animales criados en feedlots.

PROFILAXIS

La prevención de *Histophilus somni* se debería basar principalmente en la inmunización. Dado que los anticuerpos humorales no tienen ninguna relación con la protección y se trata de un patógeno de localización intracelular, la mejor vacuna que se podría lograr en un futuro sería una basada en bacterias vivas atenuadas. Puesto que aún no se cuenta con ella, es necesario que se administren vacunas oleosas basadas en la fracción aniónica de proteínas externas de membrana, desarrolladas en medios ferropénicos y con el agregado de la fracción LOS de la pared celular de cepas locales de *Histophilus somni*. Se deben administrar dos dosis separadas por un intervalo de 3-4 semanas, administrando la primera dosis a partir del mes de vida del ternero.

Cabe comentar que si se utilizan bacterinas preparadas con células completas de *Histophilus somni* puede obtenerse un resultado contraproducente debido a que estas vacunas incrementan la morbilidad y producen un efecto adverso sobre los macrófagos alveolares. Además, se ha demostrado que el gel de hidróxido de aluminio aumenta la respuesta de IgE y por lo tanto su inclusión en las bacterinas está totalmente contraindicada, pues podría incrementar las reacciones de hipersensibilidad en los bovinos que estén cursando el estadio inicial de una neumonía.

AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM: CORIZA INFECCIOSA DE LA GALLINA

LA ENFERMEDAD Y SU EPIDEMIOLOGIA

Es una enfermedad cosmopolita de la gallina doméstica; otras especies animales no se enferman exceptuando los faisanes y las gallinas de Guinea. Es más frecuente en otoño e invierno. No causa mortalidad, pero tiene muy alta morbilidad y disminuye la producción de huevos en el pico de la postura. Se ha descrito también septicemia en pollos parrilleros con decomisos en la faena. Es común la asociación de *A. paragallinarum* con otros agentes bacterianos y víricos. Cuando *A. paragallinarum* se asocia con otros agentes se agrava el curso de la enfermedad y se la denomina "coriza infecciosa complicada".

Dado que esta bacteria tiene una capacidad muy limitada de supervivencia en el medio ambiente, los principales reservorios de infección son aves con infección crónica y portadores sin signos clínicos evidentes de la enfermedad. Algunos estudios epidemiológicos sugieren que este microorganismo podría ser introducido en granjas por vía aerógena.

MORFOLOGIA Y CARACTERISTICAS GENERALES

A. paragallinarum es una bacteria gramnegativa de 1 a 3 µm de longitud por 0,4 a 0,8 µm de ancho, inmóvil y no esporulada. Son cocobacilos muy pleomórficos y disociados que se disponen en cadenas cortas y algunos filamentos. En frotis de mucus nasal es común observar formas bacilares más largas con gránulos metacromáticos. Se desarrolla a 37 °C con 5 a 10% de CO_2 en medios muy nutritivos, como saco vitelino de huevos embrionados, infusión cerebro-corazón, carne de pollo, medio Casman o medio Columbia, entre otros. Estos medios deben ser enriquecidos con la forma reducida de NAD (25 µg/ml de medio) o la forma oxidada (100 µg/ml), excepto

cuando se cultivan las cepas independientes del NAD. El NAD reducido u oxidado puede ser directamente agregado a los medios de cultivo, puede ser provisto a partir de extractos de *Saccharomyces cerevesiae* o levadura de panadería, o bien puede ser producido in situ mediante el cultivo de cepas nodrizas (*Staphylococcus aureus*). Se desarrolla en agar Columbia con el agregado de 7% de sangre equina y con o sin el agregado de bacitracina, 5 UI/ml; cloxacilina, 5 µg/ml, y vancomicina, 20 µg/ml. Requiere 1,5% de cloruro de sodio. Se logra mayor desarrollo cuando se agrega un 0,1 a 0,3% de suero inactivado de pollo. Las colonias son lisas, transparentes, no pigmentadas y no hemolíticas, y adquieren aspecto mucoide e iridiscente cuando las cepas son capsuladas.

Existen cepas de *A. paragallinarum* independientes del NAD.[2,6] Hasta la fecha, únicamente se ha informado el aislamiento de cepas independientes en Sudáfrica (serovariedades A-1 y C-3) y México (serovariedades B-1 y C-2). Se ha logrado transformar in vitro cepas dependientes del NAD en independientes mediante transformación génica mediada por un plásmido.

COMPOSICION ANTIGENICA

Se reconocen tres tipos de antígenos: L (sensible al calor y a la tripsina), HL (sensible al calor y resistente a la tripsina) y HS (estable al calor y resistente a la tripsina). Los antígenos L existen en tres formas (L1, L2 y L3). Los antígenos L1 y L2 son respectivamente responsables de la especificidad de los serogrupos A y C. El resto de los antígenos (L3, HL y HS) son comunes a todas las cepas. En general, las estructuras antigénicas de tipo lipopolisacárido y proteínico son muy importantes para la patogenicidad. Además, las cepas pueden tener una cápsula superficial de ácido hialurónico que recubre y enmascara a todos estos antígenos.

La patogenicidad y la inmunogenicidad de las cepas están directamente correlacionadas con la capacidad hemaglutinante. Es muy importante usar la prueba de hemaglutinación para clasificar las cepas vacunales, puesto que estos antígenos son cruciales en la protección, y sus tipos y variantes deben estar muy bien representados en la formulación antigénica que se emplee en las bacterinas. Inicialmente, mediante pruebas de aglutinación en portaobjetos, Page identificó tres serogrupos de *A. paragallinarum*, designados como A, B y C. Posteriormente, Kume y col. mediante pruebas de inhibición de la hemaglutinación, identificaron siete hemaglutininas (HA-1 a HA-7) distribuidas en tres serogrupos (I, II y III). Blackall y col. modificaron la clasificación hasta reconocer nueve serovariedades distribuidas en tres serogrupos (A-1, A-2, A-3, A-4, B-1, C-1, C-2, C-3 y C-4). Las cepas de los serogrupos B y C generalmente deben ser tratadas por medios físicos, químicos o ambos para que puedan expresar su actividad hemaglutinante. Este fenómeno se debe a que las hemaglutininas están ocultas por una cápsula superficial de ácido hialurónico.

RESPUESTA INMUNE

Cuando se utilizan vacunas inactivadas no existe protección cruzada entre serogrupos. Por ello, las bacterinas comerciales varían según el área geográfica en donde se utilizan. Lo más común son las bacterinas bivalentes (serovariedades A-1 y C-1) y trivalentes (A-1, B-1 y C-2). Actualmente se considera que los aislamientos B "variantes" representan una nueva inmunovariedad, y se designa al inmunógeno que incluye todos estos aislamientos como bacterina tetravalente (A-1, B-1, C-2 y "variante B"). En otras regiones existen vacunas que incluyen 2 tipos de cepas C que no tienen protección cruzada entre sí. A diferencia de lo que ocurre con la respuesta inmune desencadenada por las vacunas inactivadas, que sólo es específica para cada serogrupo, si las aves han sufrido un brote natural de la enfermedad, desarrollan fuerte protección cruzada entre los tres serogrupos.

PATOGENESIS

Mediante modelos de reproducción de la enfermedad para determinar gravedad de lesiones, difusión horizontal y poder de invasión, se demostró que las cepas de *A. paragallinarum* tienen distintos grados de patogenicidad. Las serovariedades B, C-1 y C-3 son las más patógenas. Las cepas B son consistentemente patógenas y causan lesiones de coriza aguda, con alto grado de contagio y difusión. Las cepas de referencia y las de laboratorio generalmente han perdido su patogenicidad original. Se han aislado cepas no hemaglutinantes que son totalmente avirulentas.

Los antígenos hemaglutinantes, o hemaglutininas, son las estructuras relacionadas con la antigenicidad, patogenicidad e inmunogenicidad. El requisito de adherencia al tracto respiratorio tiene estrecha relación con la hemaglutinación porque los eritrocitos y las células del epitelio respiratorio comparten receptores comunes del tipo D-manosa. Una cepa de *A. paragallinarum* es patógena si es capaz de adherirse a las células que tapizan el epitelio respiratorio. Esta adhesión habilita a la bacteria para colonizar la superficie de las células epiteliales y resistir la remoción mucociliar del tracto respiratorio. La protección activa de la gallina inmunizada depende de la presencia de anticuerpos humorales inhibidores de la hemaglutinación en el suero sanguíneo. Se ha demostrado que se puede conferir una sólida protección pasiva frente al desafío administrando a la gallina por vía intraperitoneal anticuerpos monoclonales de ratón, específicamente dirigidos contra las hemaglutininas de *A. paragallinarum*.

Las cepas de *A. paragallinarum* que producen septicemia pueden adquirir hierro mediante proteínas de membrana externa de 94 y 53 kDa, que son específicas para la transferrina de pollos y respectivamente equivalentes a las proteínas fijadoras de transferrina 1 y 2 de otras especies bacterianas. Asimismo, se han aislado proteínas de 62 y 66 kDa en asociación con las proteínas 1 y 2 fijadoras de la transferrina. Se ha demostrado que para lograr la expresión in vitro de estas proteínas es necesario cultivar a las bacterias en medios de cultivo completamente privados de hierro libre, ya que su presencia anula la expresión fenotípica de estas proteínas.

Además, *A. paragallinarum* produce la bacteriocina "hemocina", portada por un plásmido, que inhibe a otras bacterias gramnegativas no patógenas del tracto respiratorio superior de las aves, favoreciendo así su propia colonización. Actualmente se sabe que las cápsulas no intervienen directamente en el proceso de adherencia sino que protegen a las bacterias de otros mecanismos de defensa, como la fagocitosis.

ASPECTOS CLINICOS Y PATOLOGICOS

Dada la labilidad de la bacteria en el ambiente, el contagio sólo se produce a través de aves portadoras. La duración del período de prepatencia varía según la vía de entrada: 1 día después de una inoculación intrasinusal; 2 días luego de una instilación nasal; 4 días por contacto con agua infectada, y de 6 a 14 días por transmisión aérea. Las aves pueden tener diarrea y el consumo de agua y alimento generalmente se reduce. Los signos característicos incluyen exudado nasal seroso o mucoso, estornudo, inflamación de senos infraorbitarios, edema facial y conjuntivitis. La sinusitis

suele estar asociada con conjuntivitis o queratitis. La inflamación de los barbillones puede ser evidente en gallos reproductores. También se puede escuchar estertor traqueal cuando las aves tienen muy afectado el tracto respiratorio inferior. Los síntomas clínicos persisten durante 3 a 7 días y luego se produce su remisión. Los cambios patológicos que se desencadenan a partir de las 20 horas posinfección (PI) alcanzan su máxima severidad entre los 7 y 10 días PI y la reparación subsiguiente recién finaliza entre los 14 y 21 días PI. En las gallinas ponedoras, esta enfermedad puede causar desde baja o nula mortalidad hasta, en algunos casos, cierto grado de mortalidad. Siempre se acompaña de una importante pérdida en la producción de huevos, la que puede llegar hasta el 60%, aunque habitualmente oscila entre el 10-40%. En pollos parrilleros puede causar un cuadro de "cabeza hinchada", con decomisos en mataderos por lesiones de celulitis fibrinopurulenta de la cabeza y barbillones, neumonía, aerosaculitis y pericarditis organizadas con presencia de masas caseosas. En estos casos, *A. paragallinarum* se ha aislado de varios órganos internos, articulaciones e incluso del interior de los globos oculares, con o sin lesiones de queratitis.

El cuadro respiratorio es mucho más grave en aquellos casos en los que *A. paragallinarum* se asocia con otros agentes infecciosos (coriza complicada). Con *Mycoplasma gallisepticum*, las lesiones respiratorias se agravan y aumenta la mortalidad, siendo comunes las neumonías y aerosaculitis caseosas complicadas con *E. coli*. En estos casos se prolonga la duración de la enfermedad hasta 50 días, muchas veces cuando las lesiones ya se encuentran en franca remisión y *A. paragallinarum* ya no puede aislarse del tracto respiratorio. En ese estadio es muy común que *A. gallinarum* (ex-*Pasteurella gallinarum*) produzca lesiones muy graves de sinusitis y panoftalmía purulentas, con pérdida del globo ocular y remplazo de su contenido por masas caseosas. *A. gallinarum* es el agente infeccioso oportunista más común en gallinas ponedoras, mientras que en aves más jóvenes, como pollos parrilleros, la bacteria más frecuentemente asociada es *E. coli*. Otros agentes esporádicamente asociados son *Ornithobacterium rhinotracheale* y *M. synoviae*, y con menor frecuencia *Gallibacterium anatis*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella enterica* y *Chlamydia psittaci*. Las asociaciones virales más frecuentes son bronquitis y laringotraqueítis infecciosas y viruela.

Los cambios microscópicos se limitan principalmente a la mucosa de los cornetes nasales y los senos infraorbitarios. La lesión básica observada es un infiltrado inflamatorio de la mucosa respiratoria con efecto citotóxico en el epitelio y marcada estimulación de las glándulas mucosas intraepiteliales. También se observa infiltración marcada de mastocitos en la lámina propia de las membranas mucosas de la cavidad nasal. Los productos de los mastocitos, los heterófilos y los macrófagos pueden ser responsables de los intensos cambios vasculares y el consecuente daño celular que conduce al cuadro de coriza.

DIAGNOSTICO

Para el aislamiento bacteriológico se recomienda el estudio de tres a cinco aves con signos agudos de coriza. El procedimiento de toma de muestras se debe efectuar con estricta esterilidad. Una vez sacrificada el ave, se separa la cabeza del cuerpo y se remite sólo la cabeza al laboratorio, enviando otros órganos sólo si se sospecha que se trata de un caso septicémico. Lo más recomendable es el cultivo antes de las 5 horas debido a la reducida viabilidad de *A. paragallinarum*. En caso de que las aves no puedan procesarse de inmediato, se pueden remitir las cabezas congeladas. Se cauteriza la piel de la región infraorbital, se practica una incisión sobre el seno infraorbitario afectado y se separa la piel en la incisión para exteriorizar el seno paranasal. Otro procedimiento consiste en seccionar transversalmente ambos picos cerca de su base y exponer así los cornetes nasales afectados. En ambos casos se introduce un hisopo estéril, previamente humedecido en cualquier caldo nutritivo o en solución tamponada de fosfatos a pH neutro, tomando las correspondientes muestras del interior del seno o de la parte interna de las coanas. Los hisopos se siembran en placas agar selectivo, como se refirió anteriormente. La identificación de *A. paragallinarum* debe efectuarse mediante pruebas bioquímicas y enzimáticas diferenciales (tabla 34-2).

Se ha desarrollado una prueba de PCR específica para *A. paragallinarum*. Esta prueba es rápida y los resultados se obtienen aproximadamente en 6 horas. Por PCR se identifican aislamientos tanto dependientes como independientes de NAD. El perfil de endonucleasas permite reconocer grupos de brotes epidemiológicamente relacionados. Los resultados indican que las granjas pueden tener infección recidivante causada por una sola cepa de *A. paragallinarum* que reaparece a intervalos. Se demostró que las aves de remplazo son el mayor reservorio de coriza infecciosa. Los estudios con endonucleasas sugieren que los aislamientos independientes de NAD corresponden a los mismos clones de las cepas clásicas dependientes del NAD. Mediante perfiles de ribotipificación se estableció la epidemiología molecular de brotes de la enfermedad.

O. rhinotracheale produce un cuadro "corizoide" caracterizado por retraso del crecimiento, incremento en la mortalidad y disminución considerable de la producción de huevos. Las principales lesiones son aerosaculitis y neumonía. La diferenciación entre *O. rhinotracheale* y *A. paragallinarum* no es difícil, aunque cuando están presentes cepas *A. paragallinarum* independientes del NAD se requieren pruebas bioquímicas y patrones de fermentación de carbohidratos. Otros microorganismos implicados en pollos con enfermedad sugestiva de coriza infecciosa son *A. volantium*, y *A. avium*, tanto dependientes como independientes del NAD (tabla 34-2). En pollos parrilleros, la coriza debe ser diferenciada del "síndrome de cabeza hinchada" por virus de la rinotraqueítis infecciosa del pavo (TRT). También se cita que la hipovitaminosis A y la viruela, en ocasiones, pueden producir signos clínicos similares de coriza. La artritis del tarso por *A. paragallinarum* es poco frecuente, pero su existencia señala la necesidad de efectuar un diagnóstico diferencial con otros agentes bacterianos o víricos que causan artritis.

Se han descrito varias pruebas serológicas para la detección de anticuerpos contra *A. paragallinarum:* precipitación en gel, aglutinación en placa, aglutinación en látex y ELISA. De todas ellas, la prueba de inhibición de la hemaglutinación es la más usada. Paneles de anticuerpos monoclonales han sido empleados para identificar *A. paragallinarum*, principalmente mediante pruebas de inhibición de la hemaglutinación y ELISA.

TRATAMIENTO Y DESINFECCION

Se han empleado varios agentes quimioterápicos y antibióticos como estreptomicina, espectinomicina, la combinación estreptomicina-espectinomicina o las combinaciones sulfacloropiridazina-trimetroprima y sulfadimetoxina-trimetroprima, entre otras. Las quinolonas nicotinato de norfloxacina y enrofloxacina han proporcionado excelentes resultados en el tratamiento de esta enfermedad. Se informó del tratamiento experimental de pollos parrilleros con coriza infecciosa empleando enrofloxacina y clorhidrato de bromhexina, y se demostró que la combinación de estas drogas redujo el tiempo de aparición de los signos clínicos y mejoró la conversión alimenticia, a

Tabla 34-2. Diferenciación de *O. rhinotracheale*, *A. paragallinarum*, *A. avium*, *A. volantium* y *Pasteurella* sp "A"

Pruebas	*O. rhinotracheale*	*A. paragallinarum*	*A. avium*	*A. volantium*	*Pasteurella* especies A
Catalasa	-[a]	-	+	+	+
Pigmento	-	-	+	+	-
Microaerofilia	+	+	-	-	-
β-galactosidasa	+	+[b]	-	+	V
Arabinosa	-	-	-	-	+
Galactosa	+	-	+	+	+
Maltosa	+	+[b]	-	+	V
Manitol	-	+	-	+	V
Sorbitol	-	V	-	V	-
Sacarosa	-	V	+	+	+
Trehalosa	-	-	+	+	+

[a]: el 90% de las cepas de *O. rhinotracheale* son catalasa negativas.
[b]: Los *H. paragallinarum* NAD independientes son negativos a la prueba de β-galactosidasa y a la fermentación de la maltosa.

diferencia de los pollos que sólo recibieron enrofloxacina. Siempre que sea posible es recomendable realizar pruebas de sensibilidad para seleccionar el antimicrobiano más adecuado.

La aplicación de programas de desinfección continuos en granjas de gallinas ponedoras y pollos parrilleros, administrando cloruro de didecildimetilamonio o N-alquil dimethyl bencilo cloruro de amonio, tanto en el agua de bebida como en aspersión por gota gruesa, reducen significativamente el impacto de la enfermedad en aves vacunadas. Sin embargo, estos tratamientos son ineficaces en aves sin inmunizar. Debe considerarse que la aplicación de tratamientos y desinfecciones en las granjas afectadas por la enfermedad nunca elimina totalmente la infección. Las aves portadoras, en granjas con edades múltiples, mantienen y perpetúan la infección. Por ello, lo más recomendable es instaurar un programa de desinfección y bioseguridad permanente junto con la inmunización de todas las nuevas aves que ingresen al establecimiento.

PROFILAXIS

Es fundamental la compra de aves recriadas libres de la infección. La cría y la recría de las aves de reposición debe realizarse separadamente de las aves de mayor edad. Se debe vacunar y revacunar a las pollas en recría para que adquieran inmunidad antes de que alcancen el pico de postura, que es cuando se tornan muy susceptibles. Las vacunas inactivadas son oleosas u acuosas con gel de hidróxido de aluminio. Las pollas deben estar muy bien inmunizadas antes de que sean subidas a las jaulas de postura, sobre todo en criaderos de edades múltiples, debido a que se contagian cuando son puestas en contacto con aves adultas portadoras. La inmunidad se desarrolla a partir de la segunda semana posvacunación y tiene larga duración. Se recomienda vacunar con un nivel mínimo de antígeno de 100 millones de bacterias (1×10^8) por dosis de cada cepa vacunal. Las aves se inyectan por vía subcutánea detrás del cuello o por vía intramuscular en la pechuga. Para las pollas en recría es conveniente vacunar antes de las 16-18 semanas de vida, administrando 2 dosis separadas por un intervalo de 3 a 4 semanas. Si los antecedentes de la enfermedad lo requieren, la primera dosis se puede administrar a pollas en recría a partir de las 5-6 semanas de vida. Si es necesario, se pueden vacunar pollos parrilleros con media dosis administrada a los 15 días de vida, lográndose así protección adecuada hasta la faena.

BIBLIOGRAFIA

Angen O, Ahrens P, Kuhnert P, Christensen H, Mutters R. Proposal of Histophilus somni gen. nov., sp. nov. for the three species incertae sedis. '*Haemophilus somnus*', '*Haemophilus agni*' and '*Histophilus ovis*'. Int J Syst Evol Microbiol. 2003; 53:1449-56.

Blackall PJ, Christensen H, Beckenham T, Blackall LL, Bisgaard M. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Hemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinorum* gen. nov., *Avibacterium paragallinarum* com. nov., *Avibacterium avium* com. nov. and *Avibacterium volantium* com. nov. Int J Syst Evol *Microbiol* 2005; 55:353-62.

Blackall PJ, Terzolo HR. Coriza infecciosa: Revisión de métodos diagnósticos y vacunas. Rev. Arg. Microbiol. 1995; 27: 156-174.

Howard MD. Antigen Characterization of *Haemophilus somnus* Lipooligosaccharide. Thesis of Master Sci., Faculty of Veterinary Medical Sciences, The Virginia Polytechnic Institute and State University pp.1-55, 1998.

Huberman YD, Bueno DJ, Terzolo HR. Evaluation of the protection conferred by a disinfectant against clinical disease caused by *Avibacterium paragallinarum* serovars A, B and C from Argentina. Avian Dis. 2005; 49: 588-591.

Humphrey JD, Stephens LR. "*Haemophilus somnus*": A review. Vet. Bulletin 1983; 53: 987-1004.

Moreira AR, Terzolo HR, Odriozola E, Salamanco AG, Casaro AP, Arnaude J. Bronconeumonía asociada a *Haemophilus somnus*. Rev. Med. Vet. (Bs.As.) 1987; 68: 36-38.

Muirhead MR, Alexander TJL. Manejo sanitario y Tratamiento de las enfermedades del cerdo. Referencia para la Granja. Editorial Inter-Médica S.A.I.C.I. Primera Edición. Capítulo 9: 359, 2001.

Olivera S, Pijoan C. *Haemophilus parasuis*: New trends on diagnosis, epidemiology and control. Vet. Microbiol. 2004; 99: 1-12.

Rapp-Gabrielson VJ. *Haemophilus parasuis*. En: Enfermedades del Cerdo. Eds. Straw BE, D'allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ. Editorial Inter-Médica S.A.I.C.I. 8° Edición. Capítulo 36. pp. 385-390, 2000.

Soriano Vargas E, Terzolo HR. *Haemophilus paragallinarum*: Etiología de la Coriza Infecciosa. Vet. México 2004; 35: 245-259.

Soriano Vargas E, Terzolo HR. Epizootiología, prevención y control de la Coriza Infecciosa. Vet. México 2004; 35: 262-279.

Terzolo HR. Revisión sobre Coriza Infecciosa: Propuestas de investigación para su diagnóstico y control. Rev. Med. Vet. (Bs. As.) 2000; 81: 262-269.

Terzolo HR, Sandoval VE, González Pondal F. Evaluation of inactivated infectious coryza vaccines in chickens challenged by serovar B strains of *Haemophilus paragallinarum*. Avian Pathology 1997; 26: 365-376.

Capítulo 35

ERYSIPELOTHRIX

Germán Blas Vigo

INTRODUCCION

El género *Erysipelothrix* se encuentra distribuido ampliamente en la naturaleza: suelo, agua, diferentes especies animales, etc. y tiene una distribución mundial. En la actualidad, dentro de este género se incluyen dos especies aceptadas: *rhusiopathiae* y *tonsillarum*, y dos especies aún sin denominación que antiguamente eran los serotipos 13 y 18. *E. rhusiopathiae* causa una enfermedad denominada erisipela, que ocasiona grandes pérdidas económicas en porcinos, pavos, patos y cabras; puede ser transportado por una gran variedad de especies de aves, peces y mamíferos, y aparentemente no les ocasionaría enfermedad. También ha sido aislado del tegumento externo de peces y mariscos. *E. tonsillarum* ha sido aislado de agua, de diferentes especies animales y de tonsilas de porcinos sanos.

Desde el punto de vista económico, las explotaciones porcinas son las más afectadas, en menor medida las de pavos y ovinos.

El género *Erysipelothrix* comprende bacilos grampositivos, sin esporas, inmóviles, acapsulados, no son ácido alcohol resistentes y son anaerobios facultativos.

EPIDEMIOLOGIA

Este microorganismo fue aislado por primera vez por Koch de un ratón de laboratorio. Más tarde, Pasteur lo aisló de cerdos y estableció que esta bacteria era la causal de erisipela porcina. Esta enfermedad fue descrita en todos los continentes. En nuestra región, en Chile, se produjo un brote de erisipela porcina en el año 1964. En la República Argentina, *Erysipelothrix rhusiopathiae* fue aislado por primera vez en el año 1946, a partir de lesiones cutáneas humanas. Luego, se aisló de sangre e hígado de ternero, médula ósea de corderos, baños antisárnicos, agua de mar y tegumento de pescados. Recientemente, en la República Argentina, fueron descritos cuadros agudos/subagudos sistémicos no cutáneos en cerdos, de los cuales se aisló *E. rhusiopathiae*, y cuadros cutáneos de los que se aisló este microorganismo a partir de piel y tonsilas. Un alto porcentaje de cerdos albergan el microorganismo en sus tonsilas, siendo de esta manera el principal reservorio del agente y una fuente muy importante de infección.

Es un habitante nativo de la microbiota intestinal en porcinos y otras especies animales, por lo tanto es eliminado constantemente por las heces al medio ambiente, del cual es ingerido otra vez por los animales, lo que provoca una reinfección permanente.

La entrada de *E. rhusiopathiae* a una granja sin antecedentes clínicos o patológicos de la enfermedad puede producirse por la introducción de nuevos animales. Estos portadores asintomáticos o subclínicos eliminan la bacteria a través de la materia fecal y secreciones oronasales, mientras que, en cerdos con signología clínica, la eliminación se realiza por secreciones nasales, materia fecal, orina y saliva. La contaminación del piso, el agua de bebida y el alimento por secreciones y excreciones favorece la difusión en forma indirecta. Otras fuentes de infección para los porcinos son la harina de pescado y otras especies animales susceptibles, en particular pavos, roedores y ovinos.

La etapa de mayor susceptibilidad en los cerdos es desde los 3 meses hasta los 3 años de edad. La gravedad del cuadro epizootiológico, clínico y anatomopatológico de la erisipela porcina dependerá de la virulencia del serotipo actuante, de la puerta de entrada (digestiva o cutánea), del estado inmunitario del animal o del lote y de la ingestión de micotoxinas inmunosupresoras. También, los cambios climáticos súbitos parecen contribuir a la aparición de la enfermedad.

Es un microorganismo resistente a condiciones adversas, puede sobrevivir por meses en tejidos animales como carne congelada, animales muertos y harina de pescado. Es muy resistente al salado y ahumado de carnes. En materia fecal porcina, permanece viable por un largo período bajo condiciones climáticas favorables.

La erisipela en aves se presenta en forma aguda septicémica, pudiendo provocar en algunas ocasiones muerte súbita. El estado de portador tendría importancia epidemiológica. En Chile, se ha aislado de pollos parrilleros con síndrome edematoso. En la República Argentina hasta el momento no se ha aislado de aves. En ovinos, la forma más común de erisipela es la poliartritis y la puerta de entrada principal sería la cutánea.

En el hombre, es el agente causal de erisipeloide, una lesión cutánea que ocurre principalmente como enfermedad ocupacional en personas que manipulan y procesan carne, cuero o pescado, como veterinarios, laboratoristas y cazadores. Ocasionalmente fue aislada de endocarditis y puede llegar a producir un cuadro septicémico agudo. La enfermedad fue incluida dentro de las zoonosis por FAO/OMS.

CLASIFICACION

Recientemente se sugirieron cambios en la taxonomía de esta bacteria. Sobre la base de técnicas de hibridación DNA-DNA, se determinó que el género *Erysipelothrix* comprende como mínimo dos especies: *rhusiopathiae* y *tonsillarum*; esta última se diferencia por la no fermentación de la sacarosa y la ausencia de patogenicidad para el cerdo, y comprendería los siguientes serotipos: 3, 7, 10, 14, 20, 22 y 23. La especie *rhusiopathiae* comprendería los serotipos: 1a, 1b, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 19, 21 y N. Los serotipos 13 y 18 se clasificarían como dos nuevas y separadas especies.

MORFOLOGIA Y CARACTERISTICAS GENERALES

Erysipelothrix es una bacteria grampositiva que tiene la característica de decolorarse rápida y fácilmente, por lo cual en muchas ocasiones se la observa de color rosado como si fuera gramnegativa. Tiene forma de bacilo, delgado, recto. Su tamaño es de 0,2 a 0,4 µm de ancho y 0,8 a 2,5 µm de largo, con extremos redondeados, cuando se encuentra en forma lisa. Se observan

filamentos de hasta 60 µm o más de longitud cuando se encuentra en forma rugosa.

Es inmóvil, acapsulado, carece de espora. Anaerobio facultativo, microaerófilo. Presenta colonias S y R; las primeras miden de 0,1 a 1,5 mm de diámetro, de superficie brillante, convexas y bordes netos, constituidas por bacilos pequeños, aislados de infecciones agudas. Las colonias R son más grandes, planas, opacas, de bordes irregulares que presentan formas filamentosas largas, provenientes de infecciones crónicas. Sobre agar sangre produce una hemólisis estrecha tipo α. El tiempo de incubación es de 48 horas, a una temperatura de 37 °C, con un rango que oscila de 5 a 42 °C. Se desarrolla en un rango de pH de 6,8-8,2, siendo el óptimo de 7,2 a 7,6. El crecimiento mejora con el agregado de glucosa â" una concentración de 0,2 a 0,5%, de suero equino al 5-10%.

Es catalasa y oxidasa negativo. Produce ácido pero no gas de glucosa, galactosa, fructosa, lactosa, maltosa, dextrina y N-acetilglucosamina. Puede producir tardía y débilmente ácido de manosa y sucrosa. Indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer y citrato negativo. No reduce los nitratos. Produce ácido sulfhídrico. No licua la gelatina pero crece en una forma característica de cepillo limpiatubo incubado a 22 °C. No hidroliza la urea, hipurato de sodio, esculina, almidón, celulosa y caseína. Produce hialuronidasa y neuraminidasa, dos enzimas involucradas en la virulencia de las cepas.

Desarrolla en presencia de fenol al 0,2%, telurito de potasio al 0,05%, azida de sodio al 0,1% y cristal violeta al 0,001%; estas sustancias son usadas para darle selectividad a los medios.

ESTRUCTURA ANTIGENICA

Se le reconocen cinco componentes, dos de los cuales son los que tienen un papel preponderante en la antigenicidad. Uno produce inmunidad; es un antígeno de naturaleza glicolipopéptida, termolábil y es utilizado en la elaboración de vacunas. El otro antígeno es un hapteno termoestable que consiste en fragmentos de peptidoglucanos de la pared celular; es el empleado para clasificar la especie en serotipos.

Antigénicamente *E. rhusiopathiae* tiene 29 serotipos y subtipos. Los serotipos son designados con números arábigos y los subtipos, con letras: 1a, 1b, 2a, 2b, 3, 4, 5... hasta 26 y N. La identificación de las cepas en serotipos se realiza por reacciones de precipitación en sistemas de doble difusión en gel. Se emplea como antígeno un extracto extraído por calor en autoclave de la cepa a serotipificar, y se enfrenta a los antisueros de las cepas estándares de referencia de cada serotipo. Las cepas que no poseen antígeno tipo específico se denominan N y se caracterizan por no producir reacción de precipitación con ninguno de los antisueros tipo específico.

La mayoría de los serotipos se han encontrado primariamente en cerdos y peces. En Sudamérica se describieron por primera vez en el mundo los serotipos 5, 6 y 12 en Brasil, en Argentina, el 21 y el 22, y recientemente uno nuevo en Chile.

En la región, fue encontrado en Uruguay el serotipo 4. En Argentina, el 2 de agua de mar, el 6 de pescado marino y los serotipos 4, 5, 10, 19, 21 y 22 de cerdos normales y pescados marinos. Recientemente fueron descritos los serotipos 1b y 2 de cerdos con erisipela. En Chile fueron encontrados los siguientes serotipos: 1a, 1b, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23 y N, y uno nuevo de pescados marinos y cerdos sanos y enfermos.

En EE.UU., los serotipos 1 y 2 constituyen entre el 70 y el 80% de los aislamientos de cuadros clínicos agudos en cerdos; en Japón, el 18% (serotipo 1) y el 74% (serotipo 2) de los aislamientos de artritis, linfoadenitis y endocarditis crónica observados en frigoríficos. En China, el serotipo 1 fue aislado de cuadros de erisipela aguda, mientras que los serotipos 1 y 2 fueron aislados de cuadros crónicos. Por lo tanto, en cerdos con erisipela los serotipos 1 y 2 son los más prevalentes.

Enzimas

A la bacteria no se le conoce la producción de toxinas, pero la mayoría de las cepas produce hialuronidasa y neuraminidasa. Las cepas más productoras de hialuronidasa por lo general son del serotipo 1 y se ha especulado sobre la correlación entre la virulencia y la producción de esta enzima.

Todas las cepas producen, en diferente cantidad, neuraminidasa, y parece existir una buena correlación entre el nivel de actividad de esta enzima y la virulencia. La neuraminidasa se encuentra en menor proporción en cepas avirulentas o de baja virulencia en relación con las altamente virulentas.

La neuraminidasa no es el único factor responsable de patogenicidad. Se observa una menor velocidad de crecimiento en cepas de baja virulencia respecto de aquellas de alta virulencia, sin embargo, este factor no es interdependiente con la producción de neuraminidasa.

Las cepas de *E. rhusiopathiae* varían en virulencia y los factores responsables de esta variación son desconocidos. No hay una relación evidente entre virulencia y estructura química, antigénica o morfológica, a excepción de la actividad neuraminidásica.

RESPUESTA INMUNE

En la infección, las opsoninas séricas tendrían un importante papel. La fagocitosis es llevada a cabo primariamente por mononucleares, seguida por polimorfonucleares. La respuesta inmune, tanto humoral como mediada por células, está dirigida a la neuraminidasa y a los componentes de la pared celular.

La formación de inmunocomplejos y las reacciones de hipersensibilidad, responsables de las lesiones visibles, señalan que la inmunidad es principalmente de tipo humoral. Se demostró que los anticuerpos contra la neuraminidasa son protectores contra infecciones experimentales en ratón.

En cerdos, la resistencia o susceptibilidad de ciertas razas o familias se debe en primer lugar a la presencia de grados variables de inmunidad adquirida naturalmente o a una inmunidad activa. Los lechones de madres inmunes tienen protección por varias semanas luego del nacimiento; el grado y la duración de esta inmunidad pasiva están relacionados con el estado inmune de la madre. Una infección aguda induce inmunidad adquirida activa.

En cerdos, la persistencia de antígenos en tejidos articulares actúa como un estímulo crónico para la reacción inmune y el desarrollo de artritis (con hipersensibilidad del tipo III); por otra parte, un proceso secundario autoinmune a la infección es responsable de algunos de los cambios crónicos de la articulación (hipersensibilidad del tipo II).

PATOGENESIS

El curso de la enfermedad depende de la virulencia de la cepa y de la susceptibilidad del hospedador, dada por grados variables de inmunidad. La intensidad del cuadro puede aumentar con factores predisponentes como infestaciones parasitarias, toxicidad subclínica de aflatoxinas en los alimentos, factores ambientales y estrés por cambios bruscos en la alimentación, temperatura ambiente y fatiga.

Las cepas de baja virulencia, cuando el hospedador está parcialmente inmune, pueden provocar una infección no sistémica,

Tabla 35-1. Serotipos de *Erysipelothrix rhusiopathiae* identificados a partir de casos de erisipela porcina según la granja, las categorías de cerdos, la presentación clínica (morbilidad-mortalidad) y los órganos procesados

Granja	Categorías	Presentación clinicopatológica/curso	Morbilidad/ mortalidad	Organos procesados	Serotipos
1	Desarrollo y engorde. Hembra de remplazo	Muerte súbita (aguda y subaguda sistémica) y cutánea (subaguda)	Mortalidad 4,2%	Líquido articular, corazón, pulmón, tonsilas, bazo y piel	10, 2
2	Desarrollo y engorde	Muerte súbita (subaguda sistémica)	< 2%	Bazo, tonsila, líquido articular	No tipificada
3	Recría 2 y terminación	Cutánea (subaguda)	Morbilidad 3-13% según categorías	Piel y tonsilas	1b
4	Hembra de remplazo	Cutánea (sin datos)	Morbilidad < 1%	Piel	2
5	Recría 1	Muerte súbita (subaguda sistémica)	Sin datos	Sangre, linfonódulos, bazo y piel	2
6	Engorde	Cutánea (agudo/subagudo)	Sin datos	Piel	10
7	Desarrollo	Cutánea (subaguda)	Sin datos	Piel	2
8	Desarrollo	Cutánea (aguda)	Morbilidad 20,8%	Piel	No tipificada

sólo una lesión local de piel; la bacteria se elimina sin producir septicemia y la lesión desaparece.

Enfermedad aguda del cerdo

La especie más susceptible es la porcina, en la que produce cuadros agudos, subagudos o crónicos. El cuadro agudo se caracteriza por una septicemia de presentación abrupta y, si el animal sobrevive, a los 2 o 3 días se observan lesiones cutáneas características de forma romboidal. El cuadro subagudo, de patogenia similar, tiene una presentación más leve y de menor duración.

Enfermedad crónica del cerdo

El cuadro crónico es el que produce mayores pérdidas económicas como consecuencia de la artritis, localizada principalmente en las articulaciones del carpo, el tarso, escapulohumerales y femorotibiorrotulianas, y el decomiso de carcasas en el frigorífico. La presentación crónica puede ser secuela del cuadro agudo o subagudo, o puede originarse por infección subclínica. También puede causar endocarditis. Las lesiones se producen principalmente en las válvulas cardiacas.

La mayoría de los aislamientos bacterianos en el cerdo corresponden a cepas de los serotipos 1 y 2; el primero de cuadros septicémicos agudos, el serotipo 2 de artritis, urticaria, y el serotipo 1 o 2 de endocarditis.

Enfermedad en aves

En aves, la enfermedad se caracteriza por un cuadro agudo con muerte súbita de un número variable de animales que presentan debilidad, anorexia y diarrea. En pavos, la lesión más común de observar es la tumefacción de la carúncula. Se observaron artritis y endocarditis en pavos y gansos.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

En casos de erisipela aguda, el cultivo se puede realizar por hemocultivo en animales vivos, aunque lo más recomendable es tomar muestras de órganos internos de animales recién necropsiados, como bazo, hígado, riñón, líquido sinovial de diferentes articulaciones afectadas. De lesiones cutáneas es posible cultivar el microorganismo desde las zonas profundas de la piel lesionada.

E. rhusiopathiae tiene un buen desarrollo en caldo o agar triptosa carne con un 10% de suero. El aislamiento se puede realizar utilizando medios con o sin sustancias selectivas o por inoculación en el ratón. Los animales de laboratorio utilizados son el ratón y la paloma. Para muestras contaminadas es recomendable el empleo de medios selectivos, éstos se logran con el agregado de sustancias como azida de sodio al 0,1% y cristal violeta al 0,001%. Un método muy efectivo para el aislamiento es la inoculación de ratones por escarificación de la oreja: los animales mueren generalmente a los 5-6 días posinoculación y se puede recuperar el microorganismo en forma pura del bazo, el hígado y la sangre del corazón.

La identificación definitiva se realiza mediante sus características tintoriales, de cultivo y pruebas bioquímicas. También se puede realizar la identificación específica de las cuatro especies de *Erysipelothrix* por medio de una técnica de PCR. Recientemente fue

desarrollada una técnica de PCR que permite realizar el diagnóstico de erisipela porcina directamente de los órganos del animal.

Los métodos de diagnóstico serológico no son muy eficaces para poder detectar animales infectados, pero recientemente se ha desarrollado una prueba de ELISA indirecta con una alta especificidad y una alta sensibilidad, que sería eficaz para detectar la presencia de anticuerpos protectores resultantes de la vacunación o maternos y también los anticuerpos producidos por la infección natural. Esta prueba tendría un potencial importante para el control efectivo en la erisipela porcina.

TRATAMIENTO

Los fármacos de elección son la penicilina, la ampicilina y la cefalotina. Luego le siguen la tetraciclina, la tiamulina, la clindamicina y la eritromicina que tienen buenos resultados. No son recomendables el cloranfenicol, la gentamicina, la estreptomicina y la vancomicina.

PROFILAXIS

La vacunación contra erisipela se realiza en cerdos y aves para prevenir brotes de la enfermedad. La inmunidad activa se logra con vacunas vivas avirulentas o con vacunas muertas (bacterina) adsorbidas en gel de aluminio. La mayoría de las vacunas comerciales vivas son preparadas con los serotipos 1 y 2; las bacterinas utilizan cepas del serotipo 2.

La vacunación en el cerdo provoca una inmunidad de 3 a 5 meses y protege sólo contra la forma aguda de la enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

Bisgard M, Norrung V, Torne N. Erysipelas in poultry. Prevalence of serotypes and epidemiological investigations. Avian Path. 9: 355-362. 1980.

Copes J, Nievas V, Vigo G, Sánchez M, Bagnis G, Martín V, Sanguinetti H, Perfumo C. Aislamiento e identificación serológica de *Erysipelothrix rhusiopathiae* en cerdos con lesiones sistémicas compatibles con las del mal rojo en la República Argentina. Rev Biomed. 12: 244-248, 2001.

De Diego Al, Norrung V. El *Erysipelothrix rhusiopathiae* en la República Argentina. I. Aislamientos. Gac Vet. 40:771-774, 1978.

Norrung V, De Diego A. I. El *Erysipelothrix rhusiopathiae* en la República Argentina. II. Investigación serológica. Gac Vet. 40: 775-778, 1978.

Pereyra N, Campá M, Cané F, Comba E, Vigo G, Perfumo CJ. Mal Rojo del Cerdo. Primera descripción en la República Argentina de un caso con lesiones cutáneas típicas. Vet Arg. 15: 498-502, 1998.

Sánchez ML. Erisipela: estudio sobre patogenia y características epidemiológicas en Chile. Monograf Med Vet. 1,3 2:3-7. 1991.

Sánchez M. Erysipelothrix. En. Stanchi N y col. Temas de Microbiología Veterinaria. Ed. Sur. 1996.

Sánchez ML, González A, Meulle-stef V, Borie C. Serotipificación de cepas de *Erysipelothrix rhusiopathiae* provenientes de cerdos portadores sanos. Av Cs Vet. 4,1: 63-68.1989.

Takahashi T, Sawada T, Takagi M, Seto K, Kanzaki M, Maruyama T. Serotypes of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains isolated from slaughter pigs affected with chronic erysipelas. Jpn J Vet Sci. 46: 149-153, 1983.

Takahashi T, Fujisawa T, Tamura Y, Suzuki S, Marumatsu M, Sawada T, Benno Y, Mitsuoka T. DNA relatedness among *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains representing all twenty-three serovars and *Erysipelothrix tonsillarum*. Int. J Sist. Bacteriol. 42: 469-473, 1992.

Wood RL. Erisipelas. En: Leman, A. D. et al ed. Diseases of swine. 7th ed. Ames, Iowa State University Press. p. 475-486, 1992.

Capítulo 36

LISTERIA

Nélida Amelia Leardini

INTRODUCCION

Sus antecedentes etiopatológicos y microbiológicos se remontan a principios del siglo pasado, aunque no se hayan conservado los cultivos para poder compararlos con cepas actualmente conocidas. En 1926, Murray y col. describieron en Inglaterra un microorganismo causante de infección generalizada con producción de mononucleosis en conejos y también en cobayos. Esos fueron los primeros reconocimientos como patógeno animal. Dado que no encontraron descripciones anteriores y teniendo en cuenta sus caracteres morfológicos y su acción sobre células mononucleares, lo designaron *Bacterium monocytogenes*.

Por estudios posteriores, siempre sobre aislamientos en animales, observando la producción de focos necróticos en hígado y en homenaje al científico Lister, se creó un nuevo género con el nombre *Listerella hepatolytica*, pero por su similitud con los anteriores aislamientos de Murray luego pasó a llamarse *Listerella monocytogenes*. Aproximadamente antes de mediados del siglo pasado, el género se cambió por su actual nomenclatura de *Listeria* y la enfermedad que causa se conoce como listeriosis.

El género *Listeria* fue incluido primero en un grupo amplio de bacterias corineiformes, pero a partir de la secuenciación de la fracción 16S rRNA, fue cambiando su posición filogenética, siendo compatible con el bajo contenido de guanina y citosina (G+C) de su DNA (menor de 50%), la presencia de ácidos lipoteicoicos y la carencia de ácidos micólicos.

Desde el momento de su descubrimiento, la única especie conocida fue durante largo tiempo *Listeria monocytogenes*, hasta la descripción de *L. denitrificans* por Prévot en 1961, la cual fue transferida posteriormente al nuevo género *Jonesia*, creado por Rocourt en 1987. En la actualidad, por estudios de homología DNA-DNA y secuenciación de la fracción ribosomal 16S, se ha demostrado que el género *Listeria* contiene dos líneas de descendencia. Una de ellas comprende a *L. monocytogenes* y varias especies muy relacionadas genómicamente, tales como *L. innocua*, *L. ivanovii* (la cual posee dos subespecies: *L. ivanovii* y *L. londoniensis*), *L. welshimeri* y *L. seeligeri*. La otra línea posee una sola especie: *L. grayi*, la cual incluye las cepas de la anteriormente denominada *L. murrayi*, hoy eliminada como especie diferente. Este ordenamiento del género *Listeria* está basado en los resultados obtenidos por análisis de multilocus enzimático.

Listeria monocytogenes es la única especie hasta el momento considerada patógena para el hombre, mientras que en infecciones animales además se menciona *L. ivanovii* como causa ocasional de aborto. Sin embargo, a partir de una revisión bibliográfica se han encontrado seis artículos que citan 7 aislamientos de *L. ivanovii* en listeriosis humana. A las restantes especies no se les asigna patogenicidad. Hay una mención bibliográfica de 1986, donde se describe en Suiza un caso de meningitis por *L. seeligeri*. La especie no patogénica hallada más frecuentemente es *L. innocua*.

CARACTERES DEL GENERO

Debido a su pleomorfismo, *Listeria* puede ser confundida con *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y aun con *Lactobacillus*.

Son bacilos grampositivos no esporulados, no capsulados, no ramificados, pequeños, casi cocoides, aislados o en cadenas cortas. Su tamaño es de 1 a 2 µm de longitud, pero en cultivos viejos o en fase rugosa se presentan formas filamentosas que pueden alcanzar hasta 20 µm. Por su apariencia cocobacilar y por formar a veces cadenas cortas, pueden ser confundidos con estreptococos, así como con corinebacterias cuando presentan su forma bacilar, aislados o en pares. Son microorganismos móviles por medio de 1 a 5 flagelos perítricos, los cuales se generan mejor a temperaturas menores de 25 °C, siendo su motilidad mayor a temperatura ambiente que por incubación a 36-37 °C, ya que a estas temperaturas son aflagelados o tienen sólo un flagelo y aparecen como inmóviles. La motilidad es de gran importancia diagnóstica.

El rango óptimo de temperaturas para su desarrollo es de 30 a 37 °C, pero pueden crecer en pocos días a temperaturas tan bajas como 4 °C, o sea, valores térmicos de refrigeración. Esta característica, que no es usual para la mayoría de las bacterias, tiene valor predictivo y constituye un gran problema para la industria alimentaria, tan dependiente del mantenimiento de las cadenas de frío.

Las colonias son pequeñas, de 1 a 2 mm de diámetro al cabo de 1 a 2 días de incubación a 36 °C, lisas, brillantes y en algunos cultivos muy parecidas a las de enterococos. Cuando se las observa con luz oblicua, adquieren un tono azulado pálido. Todas las especies de *Listeria* poseen un metabolismo anaeróbico facultativo; son aerófilas pero se desarrollan bien en microaerofilia.

Listeria monocytogenes	*Listeria grayi*
Listeria innocua	
Listeria ivanovii	
Listeria ivanovii subsp *ivanovii*	
Listeria ivanovii subsp *londoniensis*	
Listeria welshimeri	
Listeria seeligeri	

Son productoras de catalasa y la oxidasa es negativa. Utilizan glucosa y otros carbohidratos, dando productos finales ácidos. Tanto la prueba del rojo de metilo como la de Voges-Proskauer son positivas. Producen hidrólisis de esculina en horas. No hidrolizan gelatina, ni urea. No producen indol, ni ácido sulfhídrico (H_2S). Como se mencionó anteriormente, poseen bajo contenido de guanina y citosina en su DNA, fluctuando entre 36 y 38% de G+C.

Son bacterias muy resistentes a factores adversos. Toleran concentraciones de 10% de cloruro de sodio, incluso hay estudios de sobrevivencia con 20% de esta sal. Resisten altos tenores de nitritos y de ácidos, mucho más que otros microorganismos. Lo mismo sucede frente a peróxido de hidrógeno. A 0 °C no muere, sólo frena su desarrollo. La temperatura máxima de crecimiento asciende a 45-50 °C. El rango de pH es de 4,4 a 9,6, es decir, hasta ambientes de gran alcalinidad. A pH bajos permanece viable cierto tiempo, pero sin multiplicarse.

DISTRIBUCION NATURAL

Es una bacteria absolutamente ubicua. Todas las especies son de amplia distribución geográfica y se hallan en la naturaleza, ya sea desde el punto de vista estrictamente ambiental, y por hallarse también muy difundidas en numerosas especies animales en las cuales pueden provocar patologías, o bien permanecen como colonizantes intestinales, contribuyendo así a la persistencia en el hábitat y como consecuencia de ello, a la contaminación de los alimentos que serán consumidos por el hombre.

Listeria monocytogenes se ha encontrado y puede vivir en cualquier lugar relacionado con el suelo, el estiércol y las pasturas. También en hojas en putrefacción, aguas residuales, polvo ambiental, ensilado, ganado, diversos animales de granja, aves de corral, pájaros, peces, crustáceos, insectos, tracto intestinal humano y de muchos animales domésticos. Hay estudios que demuestran que en humanos existe un 5% de portadores sanos. Ese porcentaje se eleva entre los trabajadores rurales y de los mataderos.

Listeria prospera mejor en condiciones aeróbicas donde el pH es 5,5 o mayor. No la favorecen condiciones de excesiva acidez. Por lo tanto, las capas superiores del silo, cuando éste no ha sido conservado en buenas condiciones, pueden portar gran cantidad de microorganismos.

Ha sido aislada de todo tipo de ganado: bovino, ovino, caprino, porcino, en animales salvajes y aun en algunos de parques temáticos. Se considera que el ganado ovino es el que presenta mayor excreción intestinal de *Listeria*.

Debido a su amplia distribución ambiental es imposible evitar que los animales estén en contacto con esta bacteria, pero es importante recordar que su hábitat fundamental es el suelo y la materia orgánica vegetal en descomposición. Es aquí donde sobrevive y se desarrolla. Justamente ese ambiente es rico en celobiosa y otros disacáridos derivados de plantas, y se ha demostrado que ellos inhiben en esta bacteria la producción de algunos de sus más importantes factores de virulencia: la listeriolisina y la fosfolipasa C fosfatidil-inositol específica.

Esto llevaría a pensar que la bacteria ha evolucionado hasta producir estos factores que le otorgan patogenicidad. Recién cuando ingresa en hospedadores animales o humanos, y cuando éstos son susceptibles, se desarrolla la enfermedad. La enfermedad en rumiantes está asociada frecuentemente a la alimentación con silo que contiene esta bacteria. Los rumiantes domésticos jugarían un papel clave en el mantenimiento de *Listeria* en el ambiente rural, a través de un ciclo de enriquecimiento fecal-oral.

SIGNIFICACION CLINICA

L. monocytogenes es el principal agente etiopatológico de enfermedad causada por especies de este género y conocida como listeriosis.

Al principio se postuló como una zoonosis, dado que fue descrita primero en animales y posteriormente en el hombre, razón por la cual se creyó que la transmisión era del animal al hombre. Luego se observó que era una enfermedad común al hombre y a los animales, y por ello se la denominó como una antropozoonosis. En ambos casos se manifiesta por las formas nerviosa, septicémica o genital (con aborto o parto prematuro).

En los animales se considera que es una enfermedad esporádica enzoótica en los rumiantes, y que puede desarrollarse de manera epizoótica en aves de corral y roedores. En veterinaria, los primeros signos de la enfermedad que se describen en el ganado son: fiebre, pérdida de apetito y depresión. Aunque no siempre se presenta, el síntoma más notable es el que le da el nombre de "enfermedad circular", ya que el animal con listeriosis frecuentemente camina en círculos. Otros síntomas son los movimientos incoordinados, la inclinación contra los objetos como si buscara apoyo, y una parálisis progresiva. En casos graves el animal muere dentro de los 2 o 3 días después de la aparición de los síntomas, pero en otros puede sobrevivir por más de 2 semanas. Las hembras preñadas infectadas, aunque no tengan síntomas de listeriosis, pueden abortar.

Los abortos en bóvidos se producen con más probabilidad durante los últimos 2 meses de preñez, mientras que en ovinos y caprinos frecuentemente a las 12 semanas o con posterioridad. Tanto en bovinos como en ovinos, puede haber retención de placenta después del aborto.

Además no debe olvidarse que la listeriosis también se encuadra como enfermedad ocupacional en veterinarios y granjeros, siendo la mayoría de los casos provocados por manipulación de ganado enfermo y sus fetos, o muestras de tejidos animales infectados. En algunas situaciones se trata de infecciones cutáneas primarias, sin implicancias sistémicas. En medicina humana también se han registrado accidentes profesionales con episodios clínicos.

Se describe como infección hospitalaria, en casos de contactos de enfermos, en neonatología, tocoginecología (cuando hay infección intrauterina), o bien a través de equipamiento que actúa como vehículo inanimado de transmisión.

Cuando la listeriosis humana emerge con mayor incidencia e importancia en centros urbanos con respecto a las comunidades rurales, las autoridades a cargo de la salud pública deben admitir que el contacto con animales no siempre es la fuente de transmisión. En ese momento surge la sospecha de la transmisión alimentaria como mayor causa de listeriosis en humanos.

La población susceptible a la infección listérica incluye principalmente a mujeres embarazadas, neonatos, inmunocomprometidos, gerontes, trasplantados renales y de médula, alcohólicos y diabéticos. En los niños, puede haber muerte intrauterina y en los nacidos vivos, meningitis y septicemia, con el dramático caso extremo de la granulomatosis infantiséptica del recién nacido. En las madres pueden no existir síntomas septicémicos, ni del sistema nervioso central. Pero en las embarazadas debe vigilarse mucho la aparición de cuadros símil gripales leves: cefaleas, pirexia, mialgia, fatiga, síntomas gastrointestinales, los cuales podrían presentarse justo antes o durante la enfermedad. Jamás hay que olvidar que si bien la incidencia es baja (en Estados Unidos informan 1000 a 1500 casos anuales), la letalidad de esta patología es altísima, con 250 a 350 muertes/año en el mismo país indicado,

a pesar de contar con uno de los más extraordinarios esquemas de vigilancia epidemiológica.

MECANISMOS DE TRANSMISION

En la actualidad, se postula el tracto gastrointestinal como el sitio primario de entrada del microorganismo en el hospedador.

L. monocytogenes es una bacteria intracelular facultativa. Se usa como modelo experimental para estudiar mecanismos bacterianos de invasión. En infecciones invasivas es mejor que *Shigella* spp para infectar ratones, dado que les produce una infección sistémica, y se ha constituido en un excelente modelo animal para determinar virulencia. La inoculación intraperitoneal de *L. monocytogenes* en ratas preñadas es muy útil para estudios de transmisión transplacentaria. En animales gnotobióticos, se usa la vía oral para lograr iguales resultados y resulta así un modelo más natural para la listeriosis fetal. Se considera que la transmisión de esta enfermedad se realiza esencialmente por vía digestiva. La diferencia entre los aislamientos infectivos de aquellos que no lo son reside en que que estos últimos son eliminados más rápidamente del intestino ciego, lo cual sugiere que la sobrevida en el intestino favorece la infectividad, tal como se observó después de la inoculación intragástrica. Este microorganismo invade tanto células fagocíticas como no fagocíticas. Receptores CR3 del complemento, junto con otros factores aún no bien caracterizados, estarían involucrados en la adhesión a los fagocitos. Después de invadir la barrera intestinal son fundamentales dos tipos de células para que se produzca la infección: los macrófagos y los hepatocitos.

Es un patógeno invasivo que atraviesa el endotelio celular y se disemina en la placenta y el sistema nervioso central. Su interacción con las células endoteliales es crucial para la patogénesis de la listeriosis. Se ha demostrado que la listeriolisina O (LLO), secretada por la bacteria, actúa como un estímulo inflamatorio potente para inducir la activación de las células endoteliales durante el proceso infeccioso.

Han sido identificados varios factores de virulencia de *L. monocytogenes* y se los ha caracterizado a niveles molecular y de biología celular, incluyendo la hemolisina (listeriolisina O), dos fosfolipasas, una proteína (ActA) y varias internalinas. Esos estudios han brindado gran cantidad de información sobre los mecanismos empleados por este patógeno facultativo intracelular, para interactuar con las células de los hospedadores mamíferos, la evasión de los mecanismos de matanza de las células del hospedador y la diseminación desde una célula infectada a otras. La secuencia descrita indica que el ingreso a la célula es favorecido por la internalina A (InlA), la cual es muy semejante a la proteína M propia de los estreptococos del grupo A de Lancefield. Se menciona que otra proteína de superficie (p60) podría participar en la invasión de algunos tipos de células. Después de la internalización, *L. monocytogenes* se encapsula en un compartimiento unido a la membrana. En los fagocitos la mayor parte de los microorganismos son probablemente destruidos dentro de la vacuola fagocítica. Los que logran sobrevivir en la vacuola o en el compartimiento unido a la membrana de los fagocitos no profesionales, se liberan por lisis de la vacuola, regida por la listeriolisina O (LLO) y una fosfotidil inositol fosfolipasa (PI-PLC). La bacteria ingresa al citoplasma de la célula hospedadora, donde se multiplica. Luego, se produce la polimerización de la actina y el movimiento intracelular, regidos por el gen *actA*, para finalmente llegar a la diseminación célula-célula mediante una fosfatidil colina fosfolipasa (PC-PLC).

Es por estos mecanismos que se producirá enfermedad, la cual en la mayoría de las especies se manifestará bajo las formas ya mencionadas: septicémicas, nerviosas y genitales. Estas presentaciones son comunes a humanos y animales, dado que se deben al tropismo peculiar que presenta la bacteria hacia órganos genitales y tejido nervioso. En publicaciones del siglo pasado ya se registraba que en laboratorios involucrados en el diagnóstico de rabia, a veces encontraban *L. monocytogenes* en vez de virus rabia, como causa de patologías en el sistema nervioso central.

Como se ha mencionado al comienzo del capítulo, la vasta distribución ambiental y mundial de este microorganismo patógeno facultativo implicaría un alto riesgo poblacional de exposición cotidiana, pero siempre llamó la atención que el porcentaje de infectados y la morbilidad fueran relativamente bajos. Es posible que en la mayoría de los contactos con esta bacteria, simplemente se produzca una colonización transitoria en aquellos individuos inmunocompetentes, o bien una enfermedad leve, no típica, que pasa inadvertida y sin tratamiento específico. En aquellos casos con un cuadro típico, constituye una infección gravísima y con elevada tasa de mortalidad, que a veces supera el 30%, como ya se indicó, por lo cual el diagnóstico correcto es crucial.

Existen nuevos estudios conducentes a distinguir entre variedades de *Listeria monocytogenes* peligrosas e inofensivas, los cuales explicarían por qué, a pesar de su amplia distribución, la listeriosis no es una enfermedad infecciosa muy común, aunque cuando sucede es de enorme peligrosidad. Es sabido que un mínimo de serovariedades causan la mayoría de los casos.

Por secuenciación y caracterización del contenido genómico de cepas epidémicas de *L. monocytogenes* serovar 4b, en comparación con cepas no epidémicas de serovar 1/2a, se encontraron diferencias sustanciales entre ambos grupos, fundamentalmente en proteínas de superficie y en el metabolismo de hidratos de carbono, las cuales probablemente les conferirían ventajas selectivas tanto en la supervivencia ambiental, como infectantes de los hospedadores.

ESTRUCTURA ANTIGENICA

Listeria spp posee antígenos somáticos (O) y flagelares (H), los cuales permiten su clasificación en serotipos; se reconocen 16 serovariedades cuya identificación es importante para la determinación del primer nivel discriminatorio de diagnóstico y vigilancia. No hay correlación entre especies y serovariedades, excepción hecha del serotipo 5, el cual corresponde sólo a *L. ivanovii*.

L. monocytogenes se clasifica en 4 serogrupos por antígeno somático: 1/2, 3, 4 y 7. En cuanto a su antígeno flagelar, permite distinguir 13 serovariedades. El serogrupo 1/2 con serovariedades a, b, c y d; grupo 3, serovares a, b, c, d; grupo 4 con 3 serovares a, b, c; grupo 7, serovares a, b, c. Este método de serotipificación corresponde al esquema de Seeliger, Donken y Voet de 1979.

Hubo estudios posteriores, entre ellos los de Piffaretti (1989), Bibbs (1990), Rasmussen (1991) y Brosch (1994), todos ellos ya con empleo de técnicas moleculares, que sugirieron la existencia de 2 sublíneas genéticas.

De todos modos, este método de fenotipificación resulta rápido y sencillo para una primera discriminación, aunque presenta limitaciones en epidemiología de brotes, dada su baja capacidad discriminatoria. La mayoría de los aislamientos humanos corresponden a los serotipos 4b, 1/2a y 1/2b. En cuanto a los aislamientos de origen alimentario, también éstos son los grupos más frecuentes. Hace poco tiempo en forma excepcional se han citado en Finlandia aislamientos de serogrupo 3, en un lote de manteca importada de Francia.

Todas las especies no patógenas del género *Listeria*, excepto *L. welshimeri*, comparten uno o más antígenos somáticos con

L. monocytogenes: incluye 13 serotipos: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7
L. ivanovii: serotipo 5 solamente
L. innocua: 3 serotipos: 4ab, 6a, 6b y otro serotipo aún indefinido
L. welshimeri: 2 serotipos: 6a, 6b
L. seeligeri: 4 serotipos: 1/2b, 4c, 4d, 6b y otro serotipo no definido

L. monocytogenes. Esto significa, en la práctica del laboratorio, que la serotipificación de *L. monocytogenes* sin caracterización previa a nivel de especie no es adecuada y puede inducir a serios errores tanto a nivel clínico como industrial o comercial, con los consiguientes trastornos legales y económicos.

Se incluye un listado de los serotipos involucrados en las diferentes especies, a efectos de clarificar el concepto de serología cruzada. Se evidencian 16 serotipos diferentes dentro del género *Listeria*, pero varios de ellos compartidos por las distintas especies.

SENSIBILIDAD A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

Por lo general, *L. monocytogenes* es sensible a la mayoría de los antibióticos en uso, excepto a las cefalosporinas, especialmente las de última generación, y a la fosfomicina. El perfil de sensibilidad y resistencia de este microorganismo ha permanecido bastante estable durante largo tiempo. Las otras especies de *Listeria* muestran también un comportamiento similar. Es de resaltar que la mayor parte de los aislamientos tanto de origen clínico como ambiental responden uniformemente a ese patrón, de modo que puede predecirse la sensibilidad antibiótica con elevada probabilidad, por lo cual no resulta obligatorio efectuar pruebas de sensibilidad en cada caso particular. Por estudios in vitro, es sensible a penicilina, ampicilina, eritromicina, gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol y rifampicina. La mayoría de ellos son bacteriostáticos. El esquema terapéutico recomendado consiste en la asociación de ampicilina con aminoglucósidos. Por investigaciones in vitro y con modelos animales, los aminoglucósidos demostraron un incremento de la actividad bactericida de la penicilina sobre *L. monocytogenes*.

Como las cefalosporinas no son útiles para el tratamiento de este microorganismo, nunca deben indicarse ante sospecha de listeriosis, razón por la cual hay que enfatizar la importancia del aislamiento y la identificación de la bacteria.

En los últimos tiempos se han notificado resistencias de origen plasmídico frente a cefalosporinas, macrólidos y tetraciclina. También se han informado aislamientos de mutantes resistentes a rifampicina y se ha caracterizado por secuenciación el gen *rpoB*. Otra publicación de importancia es la referente al aislamiento de una cepa multirresistente de *L. monocytogenes* en aborto séptico, la cual presentaba resistencia a eritromicina, tetraciclina y cloranfenicol. Estudios posteriores de esa cepa permitieron observar la pérdida simultánea de los tres marcadores de resistencia, lo cual sugería que éstos estaban codificados por el mismo plásmido. Este caso demostró que *L. monocytogenes* resistente a antibióticos puede encontrarse aun en pacientes no tratados previamente. También se ha aislado una cepa de *L. monocytogenes* multirresistente a partir de líquido cefalorraquídeo de un neonato que había desarrollado meningitis 21 días después del nacimiento. Están publicadas investigaciones de caracterización del plásmido codificante de multirresistencia, en aislamientos causantes de endocarditis.

Recientemente en Italia han demostrado por primera vez mediante análisis molecular que cepas de *L. monocytogenes* presentes en alimentos pueden ser la fuente de genes de resistencia a tetraciclina capaces de diseminarse a otros microorganismos. Si bien estos aislamientos no son comunes, esos trabajos inducen a modificar la premisa de que todos los aislamientos son sensibles y se requiere implementar monitoreos para poder detectar la aparición de cepas resistentes.

Si se correlaciona el alto porcentaje de letalidad en la infección listérica mencionada con la gran sensibilidad que muestra esta bacteria frente a la mayoría de los antibióticos empleados, resulta a todas luces muy enigmático. Pero si recordamos que es un microorganismo intracelular facultativo, en ciertas etapas, durante la invasión y diseminación en el hospedador, estará protegido de las concentraciones útiles extracelulares del antibiótico suministrado, con lo cual el tratamiento se complica. Esto demuestra que el manejo terapéutico de la listeriosis impone sólidos conocimientos de la biología del agente causal y de los antimicrobianos útiles.

PROCEDIMIENTOS DE CULTIVO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACION

Como se mencionara en otros párrafos, la búsqueda del microorganismo deberá realizarse a partir de localizaciones normalmente estériles (sangre, líquido cefalorraquídeo), o bien en muestras con microbiota propia, que en algunos casos puede estar en gran concentración y enmascarar un bajo número de la bacteria buscada, o dificultar el aislamiento de *L. monocytogenes*. En estos últimos casos (muestras de origen alimentario, ambientales, portación), la metodología es muy rigurosa y requiere una serie de etapas que pueden incluir:

- Muestreo
- Preenriquecimiento (4-6 horas)
- Enriquecimiento selectivo (24-48 horas a 30 °C)
- Aislamiento selectivo
- Purificación
- Tipificación
- Pruebas de patogénesis in vivo (optativas)
- Cuantificación (optativas)

Manipulación de muestras

Es criterio en veterinaria, cuando el cuadro clínico implica encefalitis, el envío al laboratorio de la cabeza del animal para extraer asépticamente el cerebro.

Cuando existen infecciones genitales, se deben remitir un trozo de placenta y algunos cotiledones, junto con el feto. Las muestras deben ser extraídas en forma aséptica, y deben ser refrigeradas y enviadas rápidamente para su estudio. Es de rigor el uso de guantes y ropa protectora cuando se manipulan estos materiales, dado el peligro que implica el microorganismo como patógeno en humanos.

En ciertos animales adultos, como en los rumiantes, no siempre se observan lesiones graves en los casos mortales de encefalitis, pero sí pueden encontrarse focos necróticos en el hígado, el bazo y los pulmones de fetos, neonatos y diferentes animales monogástricos adultos. Deben efectuarse investigaciones histopatológicas sobre el útero, el hígado, el bazo y el pulmón,

para detectar múltiples focos pequeños de necrosis. Cuando se produce encefalitis, las lesiones se encuentran en mayor grado en el tronco cerebral y en la médula cervical anterior.

Las muestras obtenidas de sitios normalmente estériles pueden sembrarse directamente en placas de agar tripticasa soya con 5% de sangre ovina o equina. Si las muestras proceden de localizaciones clínicas con microbiota propia, de los alimentos o del ambiente, deben ser sometidas previamente a un proceso de enriquecimiento selectivo, antes de cultivarlas en medios sólidos para aislamiento.

Durante mucho tiempo, los métodos de enriquecimiento para este microorganismo se basaron sólo en su carácter psicrófilo; se mantenían los cultivos en medios líquidos no selectivos durante 2 o 3 meses a 4 °C, al cabo de los cuales se efectuaban las siembras en medios sólidos diferenciales y selectivos.

A partir de la aparición de los grandes brotes de listeriosis en la década de 1980, cuando se relacionaron los alimentos como fuente de transmisión de *L. monocytogenes*, se desarrollaron numerosos métodos rápidos de enriquecimiento y luego de identificación, los cuales son aplicables no sólo a muestras de origen alimentario, sino también a muestras de procesos infecciosos humanos, animales y aun ambientales relacionados con el hábitat.

Todos esos nuevos métodos de enriquecimiento y aislamiento se basaron en la incorporación de sustancias inhibidoras del contenido microbiano asociado, tales como clorhidrato de acriflavina, cloruro de litio, ácido nalidíxico, cicloheximida, sulfato de colistina, fosfomicina, sulfato de polimixina B, ceftazidima.

Aunque centros de investigación oficiales y privados de diversos países han desarrollado varios métodos de enriquecimiento, ninguno de ellos presenta una eficacia del 100%, por lo cual cada país o institución debe normatizar los controles, indicando el método que emplea para los estudios, y aun en algunas instituciones se emplean dos métodos simultáneamente, para incrementar la sensibilidad. Las metodologías más usadas son las designadas con las siglas USDA (United States Department of Agriculture), FDA (Food and Drug Administration), ISO (Internacional Standard Organization/Comité Association Francaise de Normalisation), IDF-FIL (International Dairy Federation/Fédération Internationale de Laiterie).

Debe señalarse la importancia de tener siempre presente que para la detección de *L. monocytogenes* en muestras con microbiota habitual, ya sea de origen humano, animal, alimentario o ambiental, se requieren tres etapas sucesivas y complementarias:

a) enriquecimiento en medio líquido selectivo;
b) aislamiento e identificación presuntiva;
c) confirmación de la identificación.

Identificación

En forma convencional se realizan una serie de pruebas mínimas, las cuales incluyen la tinción por el método de Gram, la observación de su morfología de pequeños bacilos delgados, cortos, grampositivos, corineiformes, a veces en empalizadas y otras en cortas cadenas o formas cocoides sueltas. Es de gran importancia detectar la movilidad mediante desarrollo en medios líquidos a temperaturas menores de 30 °C durante 8 a 24 horas y montaje en fresco, con microscopia por contraste de fases, donde se observarán movimientos de rotación débiles y contráctiles o volteretas acrobáticas. Puede descartarse *Listeria* si se encuentran cocobacilos o bacilos largos con movimientos rápidos de traslación en forma de desplazamiento natatorio. Otro método consiste en la siembra en medio sólido por punción en agar motilidad (0,35% de agar), incubación a 25 °C durante 48 horas, al cabo de lo cual se produce un desarrollo típico difuso en forma de sombrilla, en la línea de puntura media. Si fuera negativo, proseguir incubando un total de 5 días y controlar diariamente.

Otra prueba de gran valor es la de la catalasa, la cual se realiza a partir de una colonia típica haciendo una suspensión en una gota de peróxido de hidrógeno al 3%, colocada sobre un portaobjetos limpio y cuidando no arrastrar hematíes del medio de cultivo. Las especies de *Listeria* son catalasa-positivas, lo cual se demuestra por formación de burbujas de gas.

Si las características morfofisiológicas y la reacción de catalasa sugieren la posibilidad de *Listeria* spp, inocular placas de agar sangre de carnero o caballo, para determinar la presencia de hemolisinas. Las placas deben tener la superficie bien seca antes de ser empleadas.

Dibujar un cuadriculado en la base de la placa, marcando tantos espacios como cepas a estudiar. Tomar una colonia típica a partir de una placa de agar tripticasa soya y sin extender depositar en forma de toque en una de las cuadrículas, para poder probar varias cepas simultáneamente. Incubar 24 horas y observar la producción de hemólisis.

Existe además una técnica muy importante para estimular la β-hemólisis: la denominada prueba de CAMP (Christie-Atkins-Munch-Peterson), la cual, si bien es una investigación optativa en el esquema diagnóstico de *Listeria*, es muy útil para la confir-

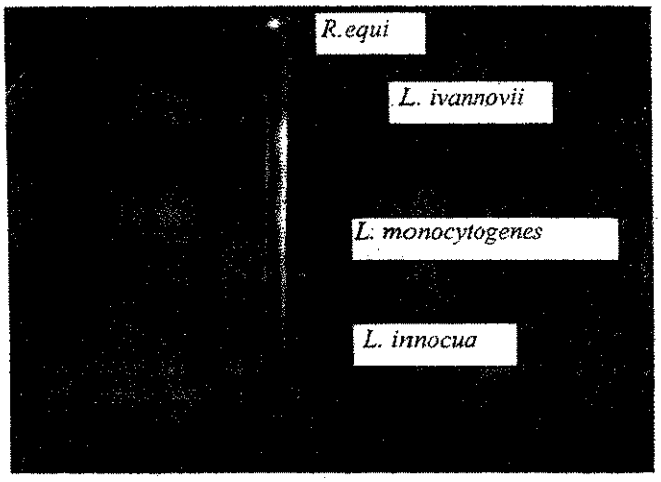


Figura 36-1. Prueba de CAMP para diferenciar las especies de *Listeria*. Reacción con *Rhodococcus equi*.

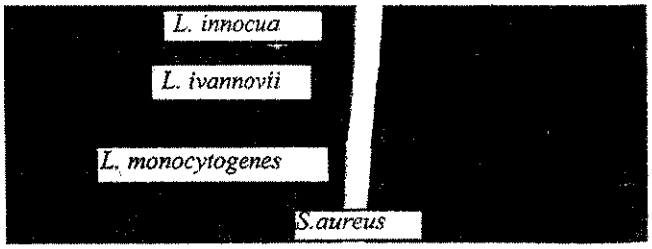


Figura 36-2. Prueba de CAMP para diferenciar las especies de *Listeria*. Reacción con *S. aureus*.

L. monocytogenes y *L. seeligeri* son S+ / R- *
L. ivanovii es S - / R +

S: *Staphylococcus aureus*; R: *Rhodococcus equi*.

* Con carácter excepcional se hallan cepas de *L. monocytogenes* S+ / R+.

Tabla 36-1. Diferenciación bioquímica de especies de *Listeria*

Caracteres	*L. grayi*	*L. innocua*	*L. ivanovii* subespecie *ivanovii*	*L. ivanovii* subespecie *londoniensis*	*L. mogocytogenes*	*L. seeligeri*	*L. welshimeri*
Hemólisis beta	–	–	++	++	+	+	–
CAMP reacción							
- *S. aureus*	–	–	–	–	+**	+	–
- *R. equi*	–	–	+	+	+/–	–	–
L-ramnosa	V	V	– *	–	+	–	V
D-xilosa	–	–	+	+	–	+	+
Manitol	+	–	–	–	–	–	–
Alfa-metil-D-manósido	+	+	–	–	+	–	+
Ribosa	V	–	+	–	–	–	–
Almidón	+	–	–	–	–	ND	ND
Hipurato hidrólisis	–	+	+	+	+	ND	ND
Nitrato reducción	+/–	–	–	–	–	ND	ND

* Cepas atípicas raras pueden ser L-ramnosa negativa.
** El sinergismo con *R. equi* debe ser considerado con cautela.

mación de especies, en particular cuando la inoculación en agar sangre no resultó definitoria. La estimulación de las hemolisinas presentes en el microorganismo se debe a dos factores: la esfingomielinasa C de *Staphylococcus aureus* (enzima que también se encuentra disponible comercialmente impregnada en discos de papel) y una colesterol oxidasa producida por una cepa de *Rhodococcus equi* (figs. 36-1 y 36-2).

Para realizar la prueba, en una placa de agar sangre ovina, sin humedad excedente, se siembra en trazo fino vertical un cultivo joven de *S. aureus* cepa ATCC 49444 o ATCC 25923, y paralelamente en el extremo opuesto de la placa, un trazo idéntico de *R. equi* cepa ATCC 6939. Luego, entre ambos trazos verticales de las cepas patrón mencionadas, se estrían en forma horizontal y paralela, los cultivos de *Listeria* en estudio, sin que lleguen a tocar los trazos de los patrones. Después de 24 y 48 horas de incubación a 35 °C, se observan las placas para ver la hemólisis en la zona de influencia de las estrías verticales de *S. aureus* y *R. equi*.

Se completa la caracterización mediante estudios de actividad metabólica frente a diversos sustratos, fundamentalmente carbohidratos, los cuales, con escaso número de pruebas mínimas, contribuyen a la clasificación de las especies. A través de una reducción aproximativa puede establecerse un perfil útil.

LA LISTERIOSIS COMO ENFERMEDAD DE ORIGEN ALIMENTARIO

Es ya un hecho irrefutable que la principal vía de adquisición de la listeriosis es la transmisión de *Listeria monocytogenes* a

Tabla 36-2. Esquema simplificado para identificación de *Listeria* spp

Especies	Arilamidasa	Prueba de CAMP		Producción de ácido	
		S. aureus	*R. equi*	Ramnosa	Xilosa
L. monocytogenes	-	+	-	+	-
L. innocua	+	-	-	V	-
L. ivanovii	+	-	+	-	+
L. seeligeri	ND	+ débil	-	-	+
L. welshimeri	ND	-	-	V	+
L. grayi	ND	-	-	V	-

través de los alimentos, pero lo más espectacular es que, si bien la mayoría de los cuadros de la enfermedad causada por este microorganismo constituyen casos esporádicos, con frecuencia un largo período de refrigeración parece haber contribuido a la producción de los grandes brotes, los cuales recién comenzaron a ser detectados en la década de 1980. Esto ha motivado un incremento notable de esfuerzos tendientes a la prevención de esta enfermedad, mediante exhaustivos controles en la producción y manipulación de productos alimentarios, no sólo en la planta fabril, sino en la comercialización y el almacenamiento, aun el domiciliario, dadas las peculiares características de este microorganismo, que le permiten no sólo persistir en frío, sino además multiplicarse bajo condiciones de refrigeración. Tolera altas concentraciones salinas (fiambres, embutidos) y se desarrolla en un amplio rango de pH (jugos de frutas, quesos fermentados). Por lo tanto, la emergencia de la listeriosis como enfermedad transmitida por alimentos (ETA) desde principios de la década de 1980 ha obligado a las autoridades de salud y de comercio, especialmente en los países industrializados, a implementar amplias campañas de divulgación para brindar información adecuada sobre los riesgos y sobre cuáles son los grupos poblacionales más expuestos. Esas recomendaciones deben ser observadas en forma rigurosa por las personas más susceptibles a la enfermedad, como las mujeres embarazadas y los individuos con compromiso inmunológico.

La significación de *L. monocytogenes* como patógeno transmitido por alimentos es muy compleja. Ya se dijo que la mayoría de los casos de listeriosis de origen alimentario son esporádicos, pero parecería que un largo período de refrigeración contribuiría a los brotes. La gravedad y la letalidad de la enfermedad requieren medidas preventivas adecuadas, pero las características del microorganismo son tales que resulta irreal esperar que todos los alimentos estén libres de *Listeria*.

Este dilema ha generado intensos debates y ha promovido el desarrollo de investigaciones en áreas muy diversas como el uso de métodos convencionales y rápidos para detectar *L. monocytogenes* en alimentos, la genética de su virulencia, la tipificación molecular del microorganismo y la investigación epidemiológica de la enfermedad.

Listeria está presente en una amplia variedad de alimentos, tanto crudos como procesados. Es capaz de sobrevivir y desarrollarse en muchas sustancias alimenticias durante el almacenamiento. Inspecciones efectuadas en Inglaterra mostraron que el 6% de 18.000 muestras examinadas eran positivas con más de 1000 UFC/g. En otros estudios, hubo un 11% de muestras refrigeradas de los alimentos consumidos por los pacientes con listeriosis, que fueron positivas para *L. monocytogenes*. El 10% de esas muestras positivas tenían más de 100 UFC/g.

La leche y los productos lácteos estuvieron entre los primeros alimentos estudiados profundamente para investigar la presencia de *Listeria*.

Las fuentes exógenas de contaminación de la leche incluyen alimento (pienso), deposiciones fecales de vacunos portadores sanos y el ambiente de granja. Son poco comunes las vacas con mastitis por *Listeria monocytogenes*. Cuando sucede, excretan 10^5 UFC/ml.

Gran variedad de quesos, especialmente blandos, pueden estar contaminados con frecuencias del 2 al 10% y concentraciones de *Listeria* de entre 10-10^7 UFC/g.

Los quesos blandos tienen un pH que favorece el desarrollo abundante de *Listeria*. Hay correlación notable entre el desarrollo de *Listeria* y el pH (>5,5).

Los helados también presentan con frecuencia contaminación por *Listeria* (0,3-2% de las muestras probadas), pero con poblaciones comúnmente bajas (<1 UFC/g) de microorganismos. La manteca y el yogur es raro que estén contaminados: en el caso del yogur, posiblemente porque los cultivos termofílicos inhiben a *L. monocytogenes*.

Las carnes y los productos cárnicos, incluyendo carne de vaca, cerdo, jamón, salchichas, tanto ahumadas como fermentadas, salame, paté, carnes picadas de diversos orígenes, están relacionados con contaminación con *L. monocytogenes*, siendo principalmente superficial, excepto en los productos molidos o pastas de carnes, donde se halla la bacteria en toda la masa.

La prevalencia de contaminación en productos cárnicos, sean crudos o procesados, puede llegar a ser muy alta, entre 1 a 70% según los casos.

L. monocytogenes es capaz de desarrollarse sobre carnes, dependiendo la facilidad de su crecimiento de diversos parámetros, como pH (tener en cuenta que a pH menores de 4 se destruye), temperatura, microbiota indígena presente, tipo de tejido (magro o graso), curado o no de los ingredientes.

También se detecta elevada contaminación en las aves de corral, principalmente en pollos, ya sean parrilleros listos para comer, precocidos, congelados o refrigerados.

Cabe sin embargo aclarar que en los productos cárnicos donde se encuentra *L. monocytogenes*, la población de bacterias es normalmente baja. El 80-90% de las muestras, tanto las procesadas como las crudas, tienen una concentración menor de 10 a 100 UFC/g.

Los vegetales frescos (repollos, pepinos, rábanos, papas) no están a salvo de la presencia de *L. monocytogenes*, pero generalmente el número de bacterias es escaso. Es distinta la situación en el caso de ensaladas de vegetales como zanahorias y tomates, cuyo pH no es adecuado para el desarrollo. Resulta evidente que el origen de la contaminación de los vegetales está ligado al suelo (debe recordarse que es capaz de resistir varios meses en el suelo), tierra, estiércol (incluso abono animal), vegetales en descomposición, agua, efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales. En mariscos y pescados, especialmente pescado ahumado, existe alta prevalencia de *L. monocytogenes*, pudiendo superar el 25%. En camarones, langostas y langostinos es muy bajo, del orden de 0,2 a 2 UFC/g. Pero los riesgos aumentan en los pescados ahumados, con poblaciones de *Listeria* mayores de 10^4 UFC/g. Investigaciones llevadas a cabo durante la producción y el almacenamiento de salmón ahumado evidencian que la población de *L. monocytogenes* se mantiene estable en la marinación y el ahumado, pero el aumento se produce durante la conservación del producto terminado y refrigerado entre 4 y 10 °C.

Si bien a principios de 1980 la demostración de la listeriosis como una enfermedad transmitida por alimentos (ETA) fue una verdadera revolución en la infectología humana, en veterinaria y en la industria alimentaria, lo sucedido a fines del siglo pasado con la aparición de una gastroenteritis febril aguda en personas inmunocompetentes, modificó completamente lo descrito hasta el momento respecto de la sintomatología de la enfermedad, su período de incubación y el grupo de población susceptible. Pasó de ser una patología con un período de incubación prolongado y variable entre 11 y 70 días, con manifestaciones clínicas hospedador-dependiente, propia de añosos, neonatos, embarazadas e inmunocomprometidos, con sepsis, meningitis y abortos como principales manifestaciones, a presentarse en forma de un cuadro intestinal con fiebre, dolor abdominal, diarrea y cefaleas, en

individuos sanos, con un periodo de incubación de 1 día y como enfermedad autolimitada en 2 o 3 días.

El primer brote fue descrito en Italia en 1996, entre alumnos y docentes en dos comedores estudiantiles, abastecidos por la misma empresa. El alimento incriminado fue una ensalada de atún con choclo y se demostró en los granos de maiz la presencia de *L. monocytogenes*, serotipo 4b, con idéntico perfil de DNA que el hallado en las heces de los enfermos (123/141). Posteriormente se citó, en 1997, un brote de gastroenteritis y fiebre en Estados Unidos, debido a consumo de leche chocolatada; en el mismo año, en Dinamarca en una guardería, y otro en Finlandia en 1999, por consumo de trucha ahumada. Todos ellos fueron investigados mediante técnicas moleculares, para correlacionar el origen del brote.

Después de estos hallazgos, se modificaron conceptos sobre la epidemiología de la listeriosis, postulándose que la enfermedad invasiva podría ser precedida por síntomas gastrointestinales, o sea que brotes de gastroenteritis febril causados por ingesta de alimentos contaminados y no reconocidos en su momento serían luego causantes de los casos esporádicos de listeriosis invasiva, con su presentación sintomatológica clásica.

A la problemática de la infección listérica de origen alimentario, debe incorporarse una nueva señal de alerta con motivo de los hallazgos citados en una publicación reciente (Science Febrero 4, 2004), donde se sugiere que *Listeria monocytogenes* puede evadir los mecanismos de defensa del hospedador ocultándose en la vesícula biliar de individuos sanos, y que cuando la vesícula vuelca su contenido en el intestino como parte del fenómeno regular de la digestión de los alimentos, *L. monocytogenes* vuelve a colonizar el intestino; así se diseminaría la listeriosis de modo semejante a la fiebre tifoidea, a partir de los portadores sanos.

PREVENCION DE LA CONTAMINACION DE LOS ALIMENTOS

Dado lo expuesto precedentemente y teniendo en cuenta que estamos frente a un microorganismo muy dañino, que puede ser hallado en gran diversidad de alimentos, y que sus efectos son devastadores en ciertos grupos poblacionales de alto riesgo y de gran interés para la Salud Pública, casi todos los países han adoptado una serie de normas preventivas de divulgación general para reducir el riesgo de esta enfermedad. En la actualidad, el CDC (Communicable Disease Center), el principal centro de vigilancia de enfermedades de Estados Unidos, estima en alrededor de 2500 la cantidad de personas con listeriosis grave por año, de las cuales mueren 500, a pesar de la declinación producida en su incidencia por la implementación de programas y la creación de redes de control de los alimentos.

ADVERTENCIAS GENERALES PARA REDUCIR RIESGOS

- Limpiar con frecuencia el refrigerador.
- Guardar en heladera los alimentos listos para el consumo, a temperaturas controladas menores de 6-8 °C.
- Consumir lo más rápido posible los alimentos perecederos.

ADVERTENCIAS PARA GRUPOS DE RIESGO (PRINCIPALMENTE EMBARAZADAS, ANCIANOS, INMUNODEPRIMIDOS)

- No ingerir salchichas o fiambres semejantes, sin calentamiento previo hasta ebullición.
- No comer quesos blandos, como camembert, brie, roquefort, queso fresco, queso blanco y otros similares, salvo que estén elaborados con leche pasteurizada.
- No comer patés o carnes untables refrigeradas. Pueden ingerirse si son productos enlatados o conservados.
- No comer mariscos ahumados refrigerados, a menos que se cocinen en condiciones y recipientes adecuados. Productos como bacalao, salmón, trucha, caballa y atún están rotulados como ahumados en general, nuevo estilo, salmón feteado o curado, arenque ahumado, tasajo, charqui. Se encuentran en el sector de fiambres refrigerados o de venta de comestibles preparados (delicatessen). Pueden consumirse si son enlatados o conservados.
- No beber leche no pasteurizada, ni comer alimentos elaborados o que contengan leche no pasteurizada.

PRACTICAS HIGIENICAS UTILES PARA TODAS LAS ENFERMEDADES DE ORIGEN ALIMENTARIO

Consisten en cuatro etapas básicas para lograr seguridad alimentaria sobre la base de un programa de educación.

LIMPIEZA
Lavar las manos con agua y jabón, y las superficies del ambiente culinario con agua caliente y detergente.
Después del contacto con alimentos crudos, deben lavarse manos, tablas, platos, utensilios.

SEPARACION
Evitar cruzar la contaminación.
Guardar alimentos crudos separados de los vegetales, frutas, panes y cualquier otro producto listo para ser ingerido.
No usar los mismos utensilios que se han empleado para cortar productos crudos, para posterior uso en cocidos listos para comer.

COCCION
Emplear temperaturas seguras.
Si se pertenece a un grupo de riesgo para listeriosis, recalentar los fiambres, la carne cortada fría, las aves de corral (pollos) y cualquier producto del estilo "delicatessen".

ENFRIADO
Refrigerar o congelar rápidamente todos los productos perecederos, incluso los alimentos listos para comer.

BIBLIOGRAFIA

Barbuddhe SB, Chaudhari SP. The occurrence of pathogenic *Listeria monocytogenes* and antibodies against listeriolysin-O in buffaloes. J Vet Med Infect Dis Vet Public Health. 2002; 49 (4): 181-184.

Chhabra AT, Carter WH. A predictive model that evaluates the effect of growth conditions on the termal resistance of *Listeria monocytogenes*. Int J Food Microbiol. 2002; 78 (3): 235-243.

Crum NF. Update on *Listeria monocytogenes* infection. Curr Gastroenterol Rep. 2002; 4 (4): 287-296.

Doumith M. et al. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* by comparative genomics and DNA arrays. Infect. Immun. 2004; 72: 1072-1083.

Graham JC, et al. Hospital-acquired listeriosis. J Hosp Infect. 2002; 51 (2): 136-139.

Mizuki M, et al. Comparison of host resistance to primary and secondary *Listeria monocytogenes* infections in mice by intranasal and intravenous routes. Infect Immun. 2002; 70 (9): 4805-4811.

Nolla-Salas J, et al. Spontaneous *Listeria monocytogenes* peritonitis: a population-based study of 13 cases. Am J Gastroenterol. 2002; 97 (6): 1507-1511.

Portnoy DA, Auerbuch V, Glomski IJ. The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogensis and cell-mediated immunity. J Cell Biol. 2002; 158 (3): 409-414.

Pourshaban M et al. Transferable tetracycline resistance in *Listeria monocytogenes* from food in Italy. J Med Microbiol. 2002; 51: 564-566.

Tham W et al. *Listeria monocytogenes* subtypes associated with mortality among fallow deer. J Zoo Wild Med. 1999; 30 (4): 545-549.

Unnerstad H et al. *Listeria monocytogenes* in faeces from clinically healthy dairy cows in Sweden. Acta Vet Scand. 2000; 41 (2): 167-171.

Wu Fone-Mao, Muriana P. Cloning, sequencing and characterization of genomic subtracted sequences from *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol. 1999; 65 (12): 5427-5430.

Capítulo 37

PASTEURELLA

Oscar Roberto Linzitto

INTRODUCCION

El género *Pasteurella* forma parte de la familia Pasteurellaceae, junto a los géneros *Actinobacillus* y *Haemophilus*, constituyendo el grupo de microorganismos designados **HPA**. Desde la primera descripción realizada por Rivolta en 1877, el género *Pasteurella* ha sufrido numerosos cambios en su ubicación taxonómica. La clasificación no es absoluta y está sujeta a constantes cambios. Rosenbuch y Merchant en 1939 le dieron el nombre de *Pasteurella multocida*. El Manual de Bergey detalla las siguientes especies: *Pasteurella multocida*, *P. haemolytica* (actualmente corresponde al género *Mannheimia haemolytica* al igual que *P. granulomatis* [*Mannheimia granulomatis*]), *P. pneumotropica*, *P. urea*, *P. aerogenes* y *P. gallinarum*.

Posteriores investigaciones basadas en diferentes análisis genéticos y propiedades fenotípicas distinguen 11 especies en el género *Pasteurella*: *P. multocida* ssp *multocida*, *P. multocida* ssp *septica*, *P. multocida* ssp *gallicida*, *P. dagmatis*, *P. canis*, *P. gallinarum*, *P. anatis*, *P. stomatis*, *P. langaa*, *P. avium*, *P. volantium* y dos especies definidas como P. sp. A y P. sp. B.

El género *Pasteurella* se reclasifica y se integran seis nuevas taxas, incluyendo *P. caballi*, *P. betti*, *P. lymphangitis*, *P mairii* y *P. trehalosi*. Estudios filogenéticos realizados en 1992 lograron separar dentro del género *Pasteurella* dos subramas: las ramas 3A y 3B. La rama 3A contiene *P. gallinarum*, *P. volantium*, *P. avium*, *P.* sp. *A*, *P. anatis* y *P. langaa* y taxón C, y la rama 3B comprende *P. multocida* ssp *multocida*, *P. dagmatis*, *P. stomatis*, *P. canis* y P. sp. *B*. Una nueva subrama 3D incluye *P. langaa*, Bisgaards taxón 2 y taxón 3, *P. anatis* y *Actinobacillus salpingitidis*.

Como se ha visto, el género *Pasteurella* ha sufrido permanentes cambios y es posible que con las nuevas tecnologías éstos se profundicen aún más, hasta permitir una mejor ubicación de las especies de este género.

P. multocida es una de las pasteurelas de mayor relevancia en medicina veterinaria con tres subespecies *P. multocida* ssp *multocida*, *P. multocida* ssp *septica* y *P. multocida* ssp *gallicida*, que incluye a 5 serotipos capsulares (A, B, D, E y F) basados en el antígeno capsular y en 16 serovariedades o serotipos basados en los antígenos somáticos. Cabe consignar que *P. haemolytica* ha sido excluida del género y forma parte del género *Mannheimia*, y *P. anatispestifer* constituye el nuevo género *Riemerella*.

HABITAT

Pasteurella multocida es un microorganismo de distribución mundial, habitante y comensal de membranas y mucosas de las vías respiratorias altas, cavidad oral, tracto genital y digestivo de animales mamíferos y aves. Es comensal del tracto respiratorio, en la cavidad oral de perros en un alto porcentaje y en gatos en un 40%. Se han registrado relaciones variables entre *P. multocida* subespecie *multocida* y *P. multocida* subespecie *septica*, y no se conocen bien los porcentajes de coexistencia de cada una. *P. multocida* subespecie *septica* es comúnmente aislada de pájaros, pavos, pollos y patos. *P. multocida* subespecie *gallicida* es más prevalente en palmípedos.

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS

Pasteurella multocida incluye microorganismos ovoides o bacilos cortos, gramnegativos, que presentan coloración bipolar, cuando se obtienen de tejidos, sangre o de aislamientos recientes en cultivos. Su tamaño es de 0,4 x 1,0-1,5 µm de largo, son no esporulados, inmóviles, aerobios y anaerobios facultativos, y en subcultivos repetidos pueden ser pleomórficos.

CARACTERISTICAS CULTURALES

Pasteurella multocida crece en condiciones aeróbicas en medios enriquecidos con sangre o suero, como en agar nutritivo suplementado con 5% de sangre bovina, equina u ovina. En agar nutritivo se desarrolla, pero menos intensamente. No crece en medio agar Mac Conkey. Se han descrito diferentes medios selectivos para el aislamiento de *Pasteurella multocida*, como el CGT citado por Knight o el sugerido por Avril y col., en el que se utilizan el Medio Müeller Hinton con el agregado de amikacina y vancomicina.

Hay una considerable variación de las colonias, relacionada con la virulencia del microorganismo. Se reconocen tres tipos de colonias: lisas (S) pequeñas y redondas, mucoides (M) grandes, y mucosas y rugosas (R) que son raras y normalmente carecen de cápsula.

Las colonias de *P. multocida* en agar sangre son normalmente no hemolíticas, de color gris, translúcidas, con un característico olor dulce. Bisgaard ha observado algunas cepas de *P. multocida* con cierta actividad hemolítica. Colonias mucoides han sido descritas en aislamientos obtenidos de gatos, conejos y bovinos. Otros autores distinguen tres tipos de colonias al usar el estereomicroscopio con luz transmitida oblicuamente: las iridiscentes, las azules y las intermedias.

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS

Metabolizan la glucosa por fermentación con producción de ácido pero no de gas. Se utiliza el medio de Hugh y Leifson para demostrar su metabolismo fermentativo. Dan positiva la reacción de oxidasa y producen enzimas nitratorreductasas. Las reacciones bioquímicas más usadas para la separación de *Pasteurella* incluyen decarboxilación de la ornitina, producción de indol, reacción de la catalasa, ataque a la urea y producción de ácido a partir de la maltosa, manitol, dulcitol, sorbitol, arabinosa y trehalosa. Fermentación de maltosa y glicerol para cepas de *P. multocida* ssp *multocida* y *P. multocida* ssp *septica*. En la tabla 37-1 se consignan algunas de las pruebas bioquímicas importantes para la caracterización del género *Pasteurella*.

Tabla 37-1. Pruebas bioquímicas para caraterizar bacterias del género *Pasteurella*

Oxidasa	+
Catalasa	+
Motilidad	-
Temperatura de crecimiento	37 °C
Glucosa Fermenta sin gas	+
Ureasa	V
Nitratos	+
Crecimiento en agar Mac Conkey	- V

CARACTERISTICAS ANTIGENICAS Y SEROLOGICAS

Pasteurella multocida no dispone de características antigénicas uniformes. Presenta un antígeno somático O, donde se reconocen 16 serotipos o serovariedades que se determina por la prueba de inmunodifusión en agar por el método de Heddleston con antisueros específicos. Namioka también desarrolló un esquema serológico basado en los antígenos somáticos, con métodos de aglutinación. Además posee antígenos capsulares, que no siempre suelen detectarse y se demuestran por la técnica de hemaglutinación pasiva de Carter. Hasta el presente se reconocen los tipos capsulares A, B, C, D, E y F.

Roberts caracterizó los tipos I, II, III y IV sobre la base de la prueba de seroprotección en ratones y los correlacionó con el origen de las cepas aisladas de *P. multocida*, con las especies de animales afectados y la fermentación del dulcitol, la arabinosa y la xilosa.

Carter caracterizó los tipos capsulares A, B, C y D, y promovió el uso de este esquema serológico utilizando la técnica de hemaglutinación pasiva. Demostró una fuerte correlación entre las cepas aisladas y las especies de animales susceptibles que serían equivalentes a los tipos I, II, III y IV de Roberts. En la tabla 37-2, se consignan los tipos capsulares de *P. multocida*, las afecciones patológicas que producen y los animales hospedadores.

CARACTERISTICAS PATOGENICAS Y ESPECIES AFECTADAS

En las aves, especialmente en gallinas, producen el cólera aviar. Por lo usual, la forma aguda se presenta como una septicemia bacteriana con elevada morbilidad y baja mortalidad, y en cerdos está asociada a la rinitis atrófica relacionada con otros factores concurrentes. En ovinos, caprinos y bovinos *P. multocida* está relacionada con la enfermedad del embarque o fiebre del transporte. En ocasiones produce enfermedad en humanos a partir de heridas por mordeduras y arañazos de perros o gatos. La bacteria causa una variedad de enfermedades en humanos y es el microorganismo aislado con más frecuencia. En la tabla 37-3, se detallan las especies afectadas, los cuadros clínicos y los tipos antigénicos predominantes.

FACTORES PATOGENICOS

Los factores de virulencia de *Pasteurella multocida* estarían asociados a sustancias tóxicas que han sido demostradas en cepas de rinitis atrófica del cerdo, cuyos filtrados producen infiltrados importantes cuando se inoculan intradérmicamente a cobayos, y actuarían como dermotoxinas que a su vez producen daños celulares cuando se inoculan a cultivos de tejidos. La endotoxina (LPS) y la cápsula citotóxica estarían asociadas como factores patogénicos. La septicemia hemorrágica es causada por dos serovares de *P. multocida*: B:2 y E:2; el antígeno capsular es determinado por la prueba de hemaglutinación indirecta de Carter y el numeral 2 representa el antígeno somático O, y es determinado por la prueba de precipitación por inmunodifusión en agar, desarrollada por Heddelston.

TRANSMISION

Todos los mamíferos y aves pueden ser colonizados por pasteurelas. En humanos pueden ocurrir infecciones por mordeduras, rasguños o arañazos de animales portadores. La transmisión animal a animal puede ocurrir por ingestión o inhalación. El agua de bebida y los alimentos contaminados por animales portadores o enfermos sería una de la fuentes de contaminación habituales.

SIGNOS CLINICOS

Un variado rango de signos pueden ser observados en infecciones causadas por *Pasteurella multocida* y varían según la naturaleza de la infección. En los casos peragudos, se observan pocos signos y la muerte en goteo puede ser el único signo en la explotación. En los casos más evidentes se observa descarga seromucosa a partir del pico o la boca, la nariz y los ojos; cianosis, depresión general y diarrea. En infecciones crónicas, los signos dependen de la localización de las lesiones: en las patas o articulaciones, y en los tejidos subcutáneos de la cabeza, el oviducto y el tracto respiratorio.

PATOLOGIA

Pasteurella multocida puede causar neumonías o septicemias en muchas especies de animales y aves. En algunos casos puede causar infección crónica de las vías respiratorias superiores y del oído medio, especialmente en conejos; procesos neumónicos en bovinos, ovinos, caprinos y otras especies y mastitis severas en rumiantes. Las pasteurelas de serotipo D toxigénicas son respon-

Tabla 37-2. Tipos capsulares de *Pasteurella multocida*, enfermedad y animales afectados

Tipo capsular	Cuadro clínico	Especie animal
Tipo A	Cólera de las aves	Aves
Tipo B	Pasteurelosis epizoótica o septicemia hemorrágica	Bovinos
Tipo C	Poco frecuente	Perros y gatos
Tipo D	Neumonías	Bovinos, ovinos, cerdos, aves de corral
Tipo E	Septicemia hemorrágica	Bovinos
Tipo F	Procesos respiratorios	Pavos

Tabla 37-3. Manifestaciones patológicas y tipo capsular predominante

Especie animal	Cuadro clínico	Tipo antigénico
Aves	Cólera, rinitis, sinusitis, artritis, infección crónica, neumonía	A – D - F
Bovinos y búfalos	Septicemia hemorrágica, pasteurelosis aguda	B
Caprinos	Neumonía enzoótica	A
Cerdos	Neumonía, rinitis atrófica	A – D
	Septicemia hemorrágica	B
Conejos	Enfermedad respiratoria aguda y crónica	A – D
	Conjuntivitis, rinitis	
Humanos	Endocarditis, infección de heridas	A
Perros	Infección latente de faringe y tonsilas	A
Ovinos	Pleuroneumonía aguda y crónica	A

sables del síndrome de rinitis atrófica en cerdos, mientras que las del tipo A, no toxigénicas normalmente complican los casos de neumonía enzoótica porcina. Hay importantes diferencias de virulencia entre los dos tipos de *Pasteurella*: el A afecta las vías respiratorias inferiores y el D afecta las vías respiratorias superiores y es de tipo toxigénico. En conejos producen catarro, infección crónica de las vías respiratorias superiores y del oído medio.

En humanos está asociada a infección de heridas por mordeduras o arañazos de gatos o perros, y progresa a una celulitis, abscesos, tenosinovitis, osteomielitis y artritis séptica. En las vías respiratorias causa infección del tracto superior, incluyendo sinusitis, otitis media, mastoiditis, epiglositis y faringitis; rara vez causa infección del tracto respiratorio inferior, con neumonía, absceso pulmonar y empiema. Puede causar endocarditis, infección de injertos vascular y pericarditis. Es poco común como causal de meningitis, empiema subdural y absceso de cerebro; cuadros de meningitis han sido asociados con lamidos o mordeduras de gatos. Esta enfermedad ocurre en personas mayores de edad. Rara vez causan desórdenes gastrointestinales; cuando éstos ocurren incluyen apendicitis, abscesos hepatoesplénicos y peritonitis. Se han reportado casos de peritonitis en pacientes dializados, abscesos periorbitales, conjuntivitis, úlcera de córnea y endoftalmitis, pielonefritis, abscesos renales, epididimitis y cervicitis. En aves, las lesiones son las típicas de una septicemia bacteriana, con disturbios vasculares, hiperemia pasiva y congestión; petequias y equimosis en la subserosa abdominal, mucosa intestinal, cavidad torácica y abdominal. Es común observar en el bazo y el hígado áreas focales múltiples de necrosis coagulativa o de necrosis generalizadas en la mayoría de los órganos. Los pulmones suelen estar incriminados. Se observan artritis caseosa e inflamación productiva de la cavidad peritoneal y de los oviductos en las formas crónicas.

CARACTERISTICAS PATOGENICAS EXPERIMENTALES

Inoculación en animales

Se utilizan ratones libres de *Pasteurella* para inoculación experimental de cepas aisladas de casos naturales de *P. multocida* por inyección subcutánea, intraperitoneal o intramuscular del espécimen. Cepas virulentas de *P. multocida* pueden producir la muerte en ratones susceptibles dentro de las 48 horas posteriores a la inoculación. *P. multocida* se puede recuperar del bazo, el hígado y de sangre cardiaca de los animales inyectados. El costo de los ratones y los valores éticos observados en el uso experimental de animales deberían ser reconsiderados y replanteados, sobre la base de los derechos de protección a los animales.

DIAGNOSTICO

Un diagnóstico acertado de la enfermedad debe estar basado en la historia, los signos clínicos, la necropsia de los animales y el aislamiento de *P. multocida* de los individuos enfermos y necropsiados. Improntas de hígado podrían colorearse con la técnica tintorial de Wright y podrían observarse microorganismos bipolares en el microscopio de luz. *P. multocida* pueden ser aislada directamente de los siguientes órganos: corazón, pulmón, hígado y médula ósea. A partir de aves vivas se pueden tomar muestras del mucus nasal o de la mucosa cloacal, y cultivarlas en agar sangre a 35-37 °C en atmósfera aeróbica y/o microaerofílica. Ciertas cepas de *P. multocida* y *P. avium* biotipo 1, *P. volatium* y *P. especie A* dependen para su crecimiento de la incorporación del factor V.

Métodos genotípicos para identificación de *Pasteurella multocida*

En la actualidad existen dos tipos de pruebas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), especie específica, una de ellas basada en la proteína P6 like (PSL), donde se han probado los 16 serotipos somáticos reconocidos hasta el presente de *P. multocida*, y otra PCR desarrollada por Towsend en 1998.

Los métodos se basan en el análisis del DNA cromosómico y del DNA plasmídico; el primero incluye análisis de restricción de endonucleasas (REA) y PCR. No obstante la disponibilidad de estas técnicas, su uso está muy limitado en la epidemiología de las pasteurelosis.

Mutters usa hibridación DNA-DNA y establece relaciones genotípicas entre las especies de la familia Pasteurellacae: *P. multocida* subespecie *multocida*, *P. multocida* subespecie *séptica* y, *P. multocida* subespecie *gallicida* y otras especies como *P. canis*, *P. stomatis*, *P. dagmatis*, *P. anatis*, *P. langaa*, *P. gallinarum*, *P. volatium*, *P. avium*, *Pasteurella* especie *A* y *Pasteurella* especie *B*.

Perfil proteico de *Pasteurella multocida*

Han sido utilizados en forma limitada en el género *Pasteurella* modernos métodos de tipificación fenotípica basados en la separación de proteínas, incluyendo la proteína principal de membrana (OMP), el análisis de proteínas de la pared celular (WCP) y la técnica denominada multilocus enzima electroforesis (MLEE).

TRATAMIENTO, PREVENCION Y CONTROL

Generalmente los tratamientos con sulfas y antibióticos como penicilina y tetraciclina suelen ser utilizados con éxito. Es conveniente prever la posibilidad de mordeduras protegiéndose con guantes y máscaras, especialmente con animales agresivos.

Una de la formas de prevenir la enfermedad o reducir el número de casos en la población de animales susceptibles es

inmunizar con vacunas que incluyan las cepas prevalentes en la región o explotación. Se utilizan vacunas con cepas mutantes que suelen dar reacciones cruzadas con diversos tipo de *Pasteurella*.

ASPECTOS DE SALUD PUBLICA

Aún no se conocen casos auténticos de infecciones humanas debido a los serotipos B:2 y E:2; sin embargo, ya que otros serotipos de *P. multocida* pueden causar una variedad de infecciones humanas se deberán tomar precauciones para minimizar la exposición a las variedades de *P. multocida* que causan la septicemia hemorrágica. La mayor parte de los perros y gatos son portadores de *P. multocida* que colonizan la cavidad bucal y se transmiten por mordedura. Al morder el animal transmite el microorganismo a la herida, y horas después se producen los signos de la inflamación con tumefacción, enrojecimiento y dolor. El proceso puede afectar tejidos profundos y complicarse con artritis séptica y osteomielitis.

Mannheimia haemolytica

HABITAT Y TAXONOMIA

Mannheimia haemolytica es un microorganismo integrante de la familia Pasteurellaceae. Se considera agente etiológico de enfermedades de aves y mamíferos. Siendo controvertido su papel patógeno, se lo aísla frecuentemente de infecciones respiratorias. Algunos autores lo consideran agente primario y otros como un organismo secundario. Dentro del género *Mannheimia haemolytica* es la especie más importante en medicina veterinaria. La mayoría de las serovares aisladas de bovinos y ovinos son hospedadores normales de sus vías respiratorias. En los bovinos *M. haemolytica* es responsable de neumonías y en los pequeños rumiantes produce neumonías, mastitis y septicemias.

Infecciones en aves

Harbourne informó aislamientos de una bacteria hemolítica de hígados de pollos jóvenes y pavos. Nicolet aisló cultivos puros de *M. haemolytica* de neumonías y salpingitis. Matthes informó infecciones por *M. haemolytica* en aves con alta morbilidad y baja mortalidad. Janetschke aisló *M. haemolytica* de pulmones y oviductos de pollos y gallinas con lesiones patológicas en tracto respiratorio, hígado y oviducto, y Hacking obtuvo aislamientos de este microorganismo en pollos y gallinas a partir de hígado y sangre del corazón. Su presencia produce caída de la postura de huevos, aerosaculitis, peritonitis, salpingitis y, en algunos casos, enteritis combinada con hepatitis.

Infecciones en bovinos

Las serovares 1 y 2 de *M. haemolytica* son aisladas de la nasofaringe de animales sanos. Una infección clínica se manifiesta como consecuencia de situaciones de estrés, como el transporte, que origina la fiebre del transporte, favorecida por el agrupamiento de animales, las malas condiciones climáticas o los cambios bruscos de la alimentación. Las infecciones respiratorias virales y la micoplasmosis constituyen factores predisponentes a favor de la multiplicación local de *M. haemolytica* alterando los mecanismos de defensa pulmonar. La inspiración favorece el ingreso de bacterias a las vías respiratorias profundas, la colonización de los alvéolos y la multiplicación. Clínicamente, se observa estado general disminuido, fiebre, abatimiento, disnea grave y a menudo los animales mueren en 24 a 48 horas. Las lesiones consisten en una pleuroneumonía o neumonía broncoalveolar fibrinosa o fibrinohemorrágica con presencia de focos necróticos.

Infecciones en pequeños rumiantes

M. haemolytica está en la nasofaringe, la boca, y las amígdalas de los animales sanos. La contaminación de corderos y cabritos se produce en las primeras horas del nacimiento con el contacto con sus madres. La serovar más frecuente es la 2 y las menos frecuentes son 1, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14. La infección clínica se traduce por desórdenes respiratorios y septicemias asociados a factores predisponentes. Los corderos presentan signos respiratorios moderados con exudado seroso y tos, que luego se agrava con neumonía y fiebre. Ciertos individuos mueren en pocas horas y otros presentan disnea pronunciada. En ausencia de tratamiento, la tasa de mortalidad puede alcanzar al 10%. Las mastitis pueden resultar de una infección de la mamas por vía ascendente. Los corderos portadores de *Mannheimia haemolytica* en la boca contaminan los pezones de las mamas.

FUENTE DE MUESTREO

La toma de muestras en los casos agudos se realiza a partir de hisopados traqueales, lavados broncoalveolares y/o aspirados de exudados de las vías respiratorias u otras vísceras afectadas, como hígado, oviducto, ovario, sacos aéreos, cavidad peritoneal; en animales muertos, a partir de un fragmento de pulmón que presente lesión. *Mannheimia haemolytica* puede estar presente en las cavidades nasales de animales sanos.

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS Y TINTORIALES

Son bacilos o cocobacilos, inmóviles, no esporulados, gramnegativos, aerobios o anaerobios facultativos o microaerófilos; su tamaño oscila entre 0,2 y 0,5 por 1,2 a 2 µm.

CARACTERISTICAS CULTURALES

En agar base nutritivo, crecen con cierta dificultad entre 24 y 48 horas de incubación. Las colonias son de 2 mm de diámetro, redondeadas, amarillentas y lisas. También crecen en medios selectivos como agar Mac Conkey, donde desarrollan colonias lactosa negativas al inicio del crecimiento con un diámetro de 1 mm aproximadamente y luego, a las 48 horas se observan colonias lactosa positivas. En agar almidón dextrosa, en 24 horas, crecen colonias de 2 a 3 mm de diámetro lisas, redondas, translúcidas, con cierta iridiscencia. En caldo infusión de ternera, se observa ligera turbidez uniforme, después de 24 horas el medio tiende a clarificarse y formar un depósito granuloso. En agar sangre bovina luego de 24 horas de incubación a 37 °C en atmósfera normal, las colonias son lisas, grisáceas, con un diámetro de entre 1 y 2 mm. Presentan hemólisis tipo β.

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS

Las características bioquímicas utilizadas para la identificación de *Mannheimia haemolytica* se detallan en la tabla 37-4.

Tabla 37-4. Características bioquímicas de *Mannheimia haemolytica*

Oxidasa	+
Catalasa	+
Requerimiento de factor V	-
Nitrato reductasa	+
Fosfatasa alcalina	+
D-Fructosa	+
D-Manitol	+
Sacarosa	+
Citrato	-
Mucato	-
Crecimiento en caldo CNK	-
Rojo de metilo	-
Voges Proskauer	-
Hidrógeno sulfurado	-
Ureasa	-
Hidrólisis de la arginina	-
Lisina decarboxilasa	-
Fenilalanina desaminasa	-
Gelatinasa	-
Hidrólisis del Tween 20	-

CARACTERISTICAS ANTIGENICAS Y SEROLOGICAS

El uso de la hemaglutinación pasiva permite diferenciar 12 serovariedades en *Mannheimia haemolytica*: 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 16 y 17.

CARACTERISTICAS PATOGENICAS

La patogenicidad obedece a la acción de componentes estructurales, tóxicos, metabólicos y enzimáticos.

Las cepas de *Mannheimia haemolytica* de serovar 1, cultivadas in vitro, elaboran dos tipos de fimbrias. Una rígida de 12 nm y otra flexible de 5 nm, que podrían ser las responsables de la adhesión a las células de las vías respiratorias.

Su cápsula está constituida por polisacáridos, de composición variada según las serovares. Es elaborada durante la fase exponencial de su crecimiento in vivo. Las cepas aisladas de tráquea, bronquios o alvéolos presentan un material capsular importante. Esta estructura se adhiere a las células epiteliales, es quimiotáctica para los neutrófilos, pero se opone a la fagocitosis y confiere resistencia a la lisis por el sistema complementario. Experimentalmente, los anticuerpos dirigidos contra la cápsula son aptos para proteger a los animales de un desafío con cepas virulentas.

El lipopolisacárido (LPS) es un constituyente de la membrana externa. Los LPS de las serovares 2 y 8 carecen de cadenas laterales, los otros tienen un LPS completo. La actividad endotóxica del LPS de *Mannheimia haemolytica* es similar a otras bacterias gramnegativas. Provoca la reacción de Schwartzman en la piel del ratón, es piretógena para el conejo, letal para el embrión de pollo y activa la vía alterna del complemento. La inyección endovenosa de LPS a terneros induce la liberación de tromboxano A2, prostaglandinas, serotonina, AMPc y GMPc. Estos mediadores son en parte responsables de los signos clínicos del shock endotóxico.

Después de su instilación en las vías respiratorias, el LPS se fija sobre las membranas celulares, activa el complemento a nivel de los alvéolos, conduce al flujo de neutrófilos, la formación de edemas, hemorragias y atelectasias.

In vitro, el LPS es citotóxico para las células endoteliales, lo que podría explicar las lesiones hemorrágicas, necróticas y la exudación de fibrina observadas en los pulmones de los animales infectados.

Las antiendotoxinas dirigidas contra el LPS de *Mannheimia haemolytica* no son eficaces para proteger a los animales en una infección experimental.

Proteínas y lipoproteínas de membrana externa de *Mannheimia haemolytica* son aptas para alterar la función de los neutrófilos e inhibir la fagocitosis.

Las leucotoxinas son proteínas que están relacionadas con la patogenicidad de estas bacterias y forman poros en las membranas celulares. La leucotoxina de *Mannheimia haemolytica* es susceptible de fijarse, de manera no específica, sobre la membrana de los glóbulos rojos y ejercer una acción hemolítica moderada.

Las enzimas extracelulares activan las plaquetas, facilitan la colonización de los alvéolos pulmonares y disminuyen la resistencia a los mecanismos de defensa.

La neuraminidasa es producida por todas las cepas y facilita la colonización de las mucosas, constituyendo parte de los factores patogénicos de la mayoría de las cepas virulentas de *Mannheimia haemolytica*.

DIAGNOSTICO

Se realiza sobre la base de la anamnesis de la población afectada, los signos y síntomas clínicos, y el aislamiento y la identificación de *M. haemolytica* según características culturales, bioquímicas y serológicas. Las muestras obtenidas de las lesiones se cultivan en medios ricos como agar Columbia o agar triptosa enriquecido con 5% de sangre de bovino o ternero, o 10% de suero equino. Se incuban en atmósfera normal o con un adicional del 5% de CO_2. Después de 24 horas de incubación, las colonias son circulares, de un tamaño de 1 a 2 mm. El diagnóstico ulterior se orienta a las características morfológicas, al tipo respiratorio, a la presencia de la oxidasa, la reducción de nitratos y la acidificación de la glucosa, y a otras pruebas basadas en otros caracteres bioquímicos, sumados a la serotipificación. La determinación de serovar puede ser útil para estudios epidemiológicos. La prueba de hemaglutinación pasiva y la de coaglutinación resultan de las pruebas prácticas en uso actual para la determinación de las serovares prevalentes.

TRATAMIENTO

Los animales pueden ser tratados con antibióticos de uso convencional, pero lo conveniente es realizar pruebas de la sensibilidad a los antibióticos y quimioterápicos para instalar el tratamiento adecuado. Se conoce la aparición de cepas resistentes a los tratamientos realizados con sulfas, penicilinas y tetraciclinas en bovinos, y, en menor proporción, en ovinos.

PROFILAXIS

Los cuidados sanitarios estrictos disminuyen las posibilidades de enfermedad de los animales susceptibles. La inmunización con las serovariedades prevalentes puede proteger a la mayoría de los animales. Se han desarrollado inmunógenos basados en antígenos capsulares, proteína principal de membrana, lipoproteínas de membrana externa, leucotoxinas, proteína A y proteína B, que podrían tener un papel protector.

Riemerella anatipestifer (*Pasteurella anatipestifer*)

TAXONOMIA Y HABITAT

Riemerella anatipestifer es un microorganismo ubicado taxonómicamente como un nuevo género dentro de la familia Pasteurellaceae. Es una bacteria distribuida extensamente en el mundo, se la ha aislado de animales domésticos y salvajes. Es agente causal de las serositis y septicemia aguda o crónica en patos y pavos. Afecta a los animales durante los primeros días de vida, ingresando a través de las vías respiratorias altas o por picotazos en la piel y eventualmente por picaduras de mosquitos. También se ha reportado su presencia patógena en otras aves, como faisán, cordorniz, perdiz, y ha sido reproducida experimentalmente en pollos. Asimismo se ha aislado de pulmón en neumonía exudativa de cerdos.

SIGNOS CLINICOS

La infección se presenta en animales jóvenes, con morbilidad y mortalidad altas. Cuando el microorganismo ejerce acción patógena en los animales susceptibles, se presenta con escasos síntomas: descarga nasal y ocular, anorexia, incoordinación motriz, temblores, debilitamiento, postración, artritis, tos, estornudos, disnea, diarrea, coma y muerte.

Las lesiones más frecuentes son inflamación muscular del intestino, hígado, bazo, artritis, pericarditis fibrinosa, aerosaculitis, sinovitis y meningitis fibrinosa.

FUENTE DE MUESTREO

La toma preferencial de muestras, en los casos agudos, es partir de los exudados de las vías respiratorias. Otras fuentes alternativas son los sacos aéreos, el hígado y la sangre cardíaca.

CARACTERISTICAS CULTURALES

No se desarrolla en agar Mac Conkey, en citrato de Simmons, en agar cetrimide ni en caldo con KCN. Crece bien en medios enriquecidos, como agar suero, agar sangre y agar chocolate. La temperatura óptima de crecimiento es 37 °C; puede crecer a 45 °C en atmósfera microaerofílica, enriquecida con CO_2, se facilita el crecimiento, y en el término de 24 horas se observan colonias pequeñas de 1 a 1,5 mm de diámetro, lisas, convexas, brillantes y transparentes. En los cultivos viejos las colonias son grandes y tienen aspecto mucoide. En agar sangre las colonias no son hemolíticas ni pigmentadas (a excepción de una cepa de *Riemerella anatipestifer*-like que produce un pigmento amarillo).

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS Y TINTORIALES

Las bacterias son gramnegativas, no móviles, bastón o bacilo no esporulado, simple, en pares o cadenas cortas, suelen presentar coloración bipolar y a veces formas de filamentos cortos. El tamaño es de 0,2 a 0,5 por 1,0 a 2,5 µm.

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS

Se diferencia en dos grupos: *Riemerella anatispetifer sensu stricto* indológenas y *Riemerella anatipestifer like* no indológenas. Los carbohidratos son escasamente utilizados, la acidificación de la glucosa depende del tiempo de incubación o es negativa, y la de la lactosa es negativa. Licua la gelatina. El ataque a la urea y al indol es variable. No son hemolíticos. Las pruebas de oxidasa y catalasa son positivas, y la de nitrato-reductasa, negativa. Da resultado negativo a las pruebas del rojo de metilo, fenilalanina desaminasa, hidrólisis de la esculina y el citrato de Simmons.

En la tabla 37-5, se destacan las pruebas bioquímicas elementales para la identificación de los géneros *Riemerella* y *Pasteurella*.

CARACTERISTICAS ANTIGENICAS Y SEROLOGICAS

Sobre la base de los antígenos de la pared celular, se logran diferenciar 21 serovariedades, también conocidas como inmunotipos. Se utiliza la prueba serológica de inmunoprecipitación por inmunodifusión en agar. Se ha detectado que las serovariedades 1, 2 y 5 son prevalentes en el medio ambiente. La determinación de la serovar tiene gran importancia epidemiológica y para la elección de inmunógenos para la inmunoprofilaxis.

DIAGNOSTICO

El diagnóstico se basa en los signos, síntomas clínicos y lesiones de los animales enfermos, y en el aislamiento y la caracterización del agente causal. Es recomendable el aislamiento en medio agar chocolate o agar sangre, con incubación a 37 °C en jarra con vela o con atmósfera del 5% de dióxido de carbono. Los aislamientos caracterizados bioquímicamente como *Riemerella anatipestifer* deberían ser serotipificados, a fin de disponer de información necesaria para seleccionar cepas con fines vacunales y epidemiológicos.

MEDIDAS DE CONTROL Y PREVENCION

Medidas prácticas de cuidados y control son importantes para la prevención de la infección. La aplicación de rígidas medidas sanitarias y de despoblación es necesaria para la eliminación de la enfermedad. Se utilizan bacterinas comerciales, al igual

Tabla 37-5. Pruebas bioquímicas elementales para la identificación de los géneros *Riemerella* y *Pasteurella*

Características	*Riemerella anatipestifer* (*sensu stricto*)	*Pasteurella* sp
Pigmentación	-	-
Crecimiento en agar Mac Conkey	-	-
Crecimiento en aerobiosis (agar sangre a 37 °C)	Generalmente +	+
Catalasa	+	+
Ureasa	d	-
Reducción de nitratos	-	+
Indol	d	d
Gelatinasa	Generalmente +	-
Hidrólisis de la esculina	-	-
ONPG	-	d
Acidificación de glucosa	d	+
Asimilación del L-malato	-	-

d = variable

que vacunas con cepas vivas atenuadas y autovacunas con los inmunotipos de *R. anatipestifer* más frecuente en el medio, para el control y la prevención de la enfermedad.

Instalada la enfermedad, se usan de manera combinada antibióticos y quimioterápicos como estreptomicina o sulfaquinoxalina, al inicio del tratamiento. Lo conveniente es realizar estudios de sensibilidad a los quimioterápicos y antibióticos para instalar una terapéutica más acertada.

Se ha detectado *Riemerella anatipestifer* sensible a tetraciclina, ampicilina, estreptomicina, neomicina, lincomicina y la asociación con trimetoprima-sulfametoxazol y resistencia a la penicilina, fosfomicina, bacitracina y la eritromicina.

BIBLIOGRAFIA

Pasteurella

Carter GR. Studies on *Pasteurello multocida*. I. A hemagglutination test for the identification of serological types. Am J Vet Res. 1955; 16:481-484.

Carter GR. Correlation between hemagglutinating antibody and mouse passive protection in antipasteurella (*Pasteurella multocida*) sera. Can J Microbiol. 1964; 10: 753-756.

Deeb BJ, Di Iacomo RF, Bernard BL, Silbernagel SM. *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* infections in rabbits. J Clin Microbiol. 1990; 28:70-75.

Heddleston KL, Gallagher JE and Rebers PA. Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. Avian Dis. 1972; 16:925-936.

Heddleston KL, and Wessman G. Characteristics of *Pasteurella multocida* of human origin. J Clin Microbiol. 1975; 1: 377-383.

Henry BS. Dissociation in the genus *Brucella*. J Infect Dis. 1933; 52:374-402.

Kovacs N. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature (London) 1956; 178:703.

Little PA, and Lyon BM. Demonstration of serological types within the non-hemolytic pasteurellas. Am J Vet Res. 1943; 4: 110-112.

Namioka S. Antigenic analysis of *Pasteurella multocida*. Natl Inst Anim Health Q. 1970; 10:97-108.

Rimler RB, Brogden KA. *Pasteurella multocida* from rabbits and swine: serologic types and toxin production. Am J Vet Res. 1986; 47: 730-737.

Roberts RS. An immunological study of *Pasteurella septica*. J. Comp. Pathol. Ther. 1947; 57:261-278.

Mannheimia haemolytica

Angen Ø, Aalbaek B, Falsen E, Olsen JE, Bisgaard M. Relationships among strains classified with the ruminant *Pasteurella haemolytica*-complex using quantitative evaluation of phenotypic data. *Zbl Bakt*. 1997; 285: 459-479.

Biberstein EL, Gills MG. The relation of the antigenic types to the A and T types of *Pasteurella haemolytica*. J Comp Pathol. 1962; 72: 316-320.

Biberstein EL, Gills MG, Knight H. Serological types of *Pasteurella haemolytica*. Cornell Vet. 1960; 50: 283-300.

Bisgaard M, Phillips JE, Mannheim W. Characterization and identification of bovine and ovine *Pasteurellaceae* isolated from the oral cavity and rumen of apparently normal cattle and sheep. Acta Path Microbiol Immunol Sect. *B*. 1986; 94: 9-17.

Burriel AR. Isolation of *Pasteurella haemolytica* from grass, drinking water, and straw bedding used by sheep. Current Microbiol. 1997; 35: 316-318.

Davies RL, Donachie W. Intraspecific diversity and host specificity within *Pasteurella haemolytica* based on variation of capsular polysaccharide, lipopolysaccharide and outer-membrane proteins. Microbiology. 1996; 142: 1895-1907.

Diker KS, Akan M, Hazirogiu R. Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolated from pneumonic ovine lungs. Ve. Rec. 1994; 134: 597-598.

Macinnes JI, Borr JD. The family Pasteurellaceae: modern approaches to taxonomy. Can J Vet Res. 1990; 54: S6-S11.

Scott MJ, Jones JET. The carriage of *Pasteurella haemolytica* in sheep and its transfer between ewes and lambs in relation to mastitis. J Comp Path. 1998; 118: 359-363.

Srinand S, Hsuan SL, Yoo HS, Maheswaran SK, Ames TR, Werdin RE. Comparative evaluation of antibodies induced by commercial *Pasteurella haemolytica* vaccines using solid phase immunoassays. Vet Microbiol. 1996; 49: 181-195.

Straus DC, Purdy CW, Loan RW, Briggs RF, Frank GH. In vivo production of neuraminidase by *Pasteurella haemolytica* in market stressed cattle after natural infection. Current Microbiol. 1998; 37: 240-244.

Riemerella anatipestifer (Pasteurella anatipestifer)

Cooper GL. *Pasteurella anatipestifer* infections in California turkey flocks: circumstantial evidence of a mosquito vector Avian Dis. 1989; 33: 809-815.

Ganiere JP, Brocas J, Prudhomme M, Villate D. Mise en évidence de l'infection de canards et d'oies par *Pasteurella anatipestifer* en France. Revue Méd Vét. 1983;134: 713-717.

Hinz KH, Ryll M, Köhler B, Glünder G. Phenotypic characteristics of *Riemerella anatipestifer* and similar microorganisms from various hosts. Avian Pathol. 1998; 27: 33-42.

Segers P, Mannheim W, Vancanneyt M, De Brandt K, Hinz KH, Kersters K, Vandamme P. *Riemerella anatipestifer* gen. nov., comb. nov., the causative agent of septicemia anserum exudative, and its phylogeny affiliation within the *Flavobacterium* - *Cytophaga* rRNA homology group. Int J Syst Bacteriol. 1993; 43: 768-776.

Vancanneyt M, Vandamme P, Segers P, Torck U, Coopman R, Kersters K, Hinz KH. *Riemerella columbina* sp. nov., a bacterium associated with respiratory disease in pigeons. Int J Syst Bacteriol. 1999; 49: 289-295.

Vandamme P, Segers P, Ryll M, Hommez J, Vancanneyt M, Coopman R, De Baere R, Van de Peer Y, Kersters K, De Wachter R, Hinz KH. *Peliste-ga europaea* gen. nov., sp. nov., a bacterium associated with respiratory disease in pigeons: taxonomic structure and phylogenetic allocation. Int J Syst Bacteriol. 1998; 48: 431-440.

Capítulo 38

CAMPYLOBACTER

Horacio Raúl Terzolo, María Catena

INTRODUCCION

Las campilobacteriosis, enfermedades anteriormente descritas como vibriosis, son conocidas desde hace muchos años en el hombre y en los animales. El género *Campylobacter* causa enfermedades en animales de producción que ocasionan importantes pérdidas económicas y varias especies bacterianas tienen carácter zoonótico. Con la descripción de nuevas técnicas bacteriológicas fue posible obtener condiciones óptimas para el desarrollo de estas bacterias y se logró aislarlas con facilidad de diversos materiales clínicos y del medio ambiente. El uso de técnicas de hibridación DNA-rRNA, y AFLP fingerprinting, permitió asignar una nueva posición taxonómica al género *Campylobacter*. La frecuente recuperación de organismos pertenecientes a este género modificó sustancialmente los conceptos de diversas enfermedades. En algunos casos se confirmó y demostró la importancia de estos microorganismos como agentes etiológicos de enfermedad, pero en otros su frecuente aislamiento de individuos aparentemente sanos hizo que fueran considerados parte de la flora normal. Dos enfermedades de los porcinos que se creía durante muchos años que estaban causadas por *Campylobacter* tienen como etiología a otros agentes etiológicos bacterianos: la disentería a *Treponema hyodysenteriae* y la adeomatosis intestinal a *Lawsonia intracelularis*. Actualmente se sabe que el género *Campylobacter* coloniza las mucosas entéricas, bucales y genitales de casi todos los mamíferos y aves, coexistiendo diversas especies saprófitas con otras patógenas. Además, existe una amplia difusión del género *Campylobacter* en todo tipo de aves marinas e incluso constituyen parte de la flora bacteriana de los moluscos bivalvos.

TAXONOMIA

Campylobacter pertenece a la clase Epsilonprotobacteria, orden I Campylobacterales y familia Campilobactereaceae, que comparte con los géneros *Arcobacter* y *Sulfurospirillum*. El género *Campylobacter* está en constante cambio; el número de especies se incrementa a medida que se incluyen nuevos integrantes debido a la implementación de distintas técnicas de cultivo y disminuye cuando ciertos ex-*Campylobacter* han sido reclasificados como *Helicobacter* o *Arcobacter*. Incluso el género *Helicobacter* ya no pertenece a la familia Campilobactereaceae. Hasta la fecha se han descrito las siguientes especies: *C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. jejuni*, *C. coli*, *C. hominis*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *C. helveticus*, *C. lanienae*, *C. sputorum*, *C. mucosalis*, *C. concisus*, *C. rectus*, *C. gracilis*, *C. curvus* y *C. showae*. Además de las especies, se describen biovares genéticamente emparentados pero que se diferencian entre sí por pruebas bioquímicas. Por ejemplo, *C. sputorum* se subdivide en *C. sputorum* biovar *sputorum* (catalasa y ureasa negativos), *C. sputorum* biovar *faecalis* (catalasa positivo y ureasa negativo) y *C. sputorum* biovar *paraureolyticus* (ureasa positivo y catalasa negativo). Además se reconocen subespecies, que en realidad tienen la misma característica que los biovares pues su diferenciación es estrictamente bioquímica dentro de la misma especie, por ejemplo, *C fetus* subsp *fetus* y *venerealis* y *C. lari* subsp *ureasum* y *subantarcticus*.

EPIDEMIOLOGIA

Los *Campylobacter* tienen una distribución mundial. Casi todas las especies se encuentran en el tracto entérico de los mamíferos, aves, reptiles, moluscos e incluso insectos, estos últimos actúan como vectores mecánicos. La enteritis en el hombre se produce por las denominadas campilobacterias termofílicas (*C. jejuni*, *C. coli*). La transmisión más frecuente es por vía oral, por medio de alimentos o agua contaminados, aunque algunas especies que habitan el tracto genital se transmiten por vía venérea. Otra forma de presentación de la enfermedad en el hombre, menos común y de manifestación esporádica, se produce cuando pacientes debilitados o muy enfermos se infectan con cepas de *C. fetus* subsp *fetus* capaces de producir septicemia e incluso abortos. Esta presentación es mucho más común en animales, como es el caso de los abortos esporádicos en bovinos, ovinos, visones y en otras especies animales (*C. jejuni* y *C. fetus* subsp *fetus*). Cuando la enfermedad se produce por bacterias adaptadas para producir infecciones específicas del tracto genital se produce infertilidad, como ocurre en los bovinos (*C. fetus* subsp *venerealis* y *fetus*). En el tracto genital de los bovinos habitan también otras bacterias del género *Campylobacter* que, en general, no producen enfermedades reproductivas. Entre ellas la más frecuente es el *C. sputorum* biovar *sputorum* (descrito anteriormente como biovar *bubulus*). Otras especies que pueden ocasionalmente aislarse del tracto genital son: *C. sputorum* biovar *faecalis*, *C. jejuni*, *C. coli* y *C. hyointestinalis*.

En los últimos treinta años *C. jejuni* ha sido descrito como el principal agente causal de diarreas esporádicas en seres humanos. Sin embargo, también son causantes de enfermedad gastroentérica humana *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. fetus*, *C. upsaliensis*, *C. sputorum*, *C. concisus* y *C. curvus*. En el tracto digestivo de los animales varias especies de *Campylobacter* han sido aisladas simultáneamente; se citan a continuación en orden decreciente de prevalencia: en los bovinos, *C. jejuni*, *C. hyointestinalis*, *C. coli* y *C. fetus*, en ovinos *C. jejuni*, *C. coli* y *C. sputorum* biovar *faecalis*; y en los porcinos, *C. coli* (antes también *C. hyoileyi*), *C. jejuni*, *C. hyointestinalis*, *C. mucosalis* y *C. fetus*. En el tracto digestivo de las aves de corral predomina *C. jejuni*, y en las marinas, *C. lari* subsp *ureasum* y *subantarcticus*. En otras especies animales, que incluyen a perros, gatos y roedores, no se han hecho estudios completos de flora entérica sino sólo estudios dirigidos a la búsqueda selectiva de *C. jejuni*. En los perros y gatos además de *C. jejuni* se aíslan las especies fastidiosas *C. upsaliensis* y *C. helveticus*. En el hombre, *C. concisus*, *C. rectus*, *C. curvus*, *C. showae* y *C. sputorum* biovar *sputorum* han sido aislados de placas dentales, tratamientos de conductos y saliva. *C. gracilis*, *C. rectus* y *C. showae* están asociados a enfermedad periodontal humana.

C. concisus ha sido aislado de seres humanos con bacteriemia, infecciones gastroentéricas y úlceras podales. *C. hyointestinalis* ha sido aislado de los órganos genitales y digestivos de los bovinos y porcinos, y también de pezuñas bovinas secundariamente asociadas a bacterias anaerobias productoras de "foot-roof". *C. hominis* y *C. lanienae* han sido aislados de heces humanas provenientes de personas sanas, y se desconoce hasta la fecha si son patógenas.

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS

Campylobacter deriva de una palabra griega que significa "bacilo curvo". Su nombre fue propuesto para diferenciarlos de del género *Vibrio*. Son bacilos curvos, espiralados o con forma de "S", gramnegativos y de 0,5 a 5 µm de largo y 0,2 a 0,8 µm de ancho. Generalmente tienen un solo flagelo (monotrico) o en ambos polos (anfitrico), siempre sin vaina de cobertura. La motilidad de la bacteria es característica y en forma de tirabuzón; rápida para las pequeñas campilobacterias termofílicas y algo más lenta para las grandes formas espiraladas del *C. fetus*. Su contenido de guanina+citocina varía entre el 28 al 38%. Son microaerófilos pues requieren una reducida cantidad de oxígeno atmosférico, cuya proporción varía con su metabolismo. No oxidan ni fermentan los carbohidratos.

Mediante observación macroscópica de colonias características y observación microscópica a través de tinción de fucsina fenicada diluida 1/10 en agua destilada u observación directa por contraste de fase, se puede obtener una clasificación preliminar en tres grupos:

1) Grupo *jejuni-C.coli*: colonias que se difunden y tienen brillo metálico, células bacterianas pequeñas y finas con pequeña amplitud de onda y transformación cocoide rápida;
2) Grupo *fetus-hyointestinalis*: crecimiento que difunde poco o nada y de aspecto mate, células grandes con gran amplitud de onda y transformación cocoide negativa; y
3) Grupo *sputorum*: colonias que no se difunden y se pegan al agar, células cortas con forma de coma y transformación cocoide variable.

La transformación cocoide es un estadío natural de las campilobacterias termofílicas. La prueba consiste en dejar expuestas durante 6 días a temperatura ambiente y al aire las placas con los cultivos. Luego de ese período de incubación se examinan los cultivos con los frotis de fucsina fenicada. Si la transformación cocoide es positiva todos los bacilos curvos se transforman en cocos. Si es negativa, las formas bacilares permanecen inalteradas.

TECNICAS DE AISLAMIENTO Y CARACTERISTICAS CULTURALES

El aislamiento de las especies de interés veterinario se puede efectuar con facilidad utilizando medios de cultivo selectivos, atmósferas microaerofílicas y una temperatura de incubación adecuada. El medio Skirrow original (sin agregado de cefalosporinas) es el más recomendable para aislar *C. fetus* de material proveniente del tracto genital o fetos: agar base sangre adicionada con 5 al 7% de sangre equina lisada, vancomicina (10 µg/ml), sulfato de polimixina B (2,5 UI/ml) y lactato de trimetoprima (5 µg/ml). La sangre lisada se prepara calentándola a 56 °C, en baño María con agitación, durante 45-50 minutos. Este medio tiene la ventaja de permitir el aislamiento simultáneo de bacterias de los géneros *Campylobacter* y *Brucella*.

Para la búsqueda de distintas especies del género *Campylobacter* en la materia fecal de los bovinos es recomendable el uso de medios mucho más inhibidores, como el medio Preston, que tiene rifampicina, además de otros antibióticos; este medio se puede tornar más selectivo mediante el agregado de antimicóticos como la nistatina. Esta precaución debe tomarse debido a la abundancia de *Bacillus* spp y hongos en la flora intestinal de los rumiantes. Cabe señalar que la adición de cefalosporinas a estos medios de cultivo permite sólo el aislamiento de campilobacterias termofílicas (*C. jejuni*, *C. coli* o *C. lari*), por lo cual su uso no es recomendable para estudios en los que se buscan, además, otras especies de interés veterinario.

Para el aislamiento de especies sensibles a los antibióticos, como *C. upsaliensis* y *C. helveticus* de materia fecal de perros y gatos, se realiza una suspensión de materia fecal al 20% y se incuba a 37 °C durante 30 minutos. Luego de la incubación se toman 50 µl de la suspensión y se colocan sobre una membrana filtrante de 0,6 µm en una placa de agar sangre que se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente. La placa se incuba a 37 o a 42 °C en microaerofilia con 3% de oxígeno o bien en una atmósfera anaerobia compuesta por 10% H_2, 10% CO_2 y 80% N_2.

Las atmósferas microaerofílicas más adecuadas son las que contienen entre un 3 y un 6 % de oxígeno, un 10% de CO_2 y el resto de N_2 o H_2. Es importante destacar que un 3% de oxígeno es ideal para *C. hyointestinalis*, *C. sputorum*, *C. mucosalis* y *C. lari*, mientras que un 6% es adecuado para *C. jejuni*, *C. coli* y *C. fetus*. Un procedimiento muy adecuado para todas las especies es proveer primero un 3% de oxígeno durante el primer día de incubación y luego un 6% en los días restantes. Sólo dos especies, *C. mucosalis* y *C. concisus*, son dependientes del hidrógeno; el resto puede aislarse mediante atmósferas ricas en nitrógeno. La forma de preparación de las atmósferas puede ser efectuada mediante mezcla de gases o el uso de sobres generadores comerciales.

Todas las especies se desarrollan bien a 37 °C, siendo ésta la temperatura recomendable para el aislamiento. El uso de temperaturas de 42 °C sólo permite el crecimiento de campilobacterias termofílicas; si lo que se pretende es su aislamiento, entonces dicha temperatura es recomendable porque se acelera el proceso a sólo 18 horas de incubación. Cuando se incuba a 37 °C, las placas deben examinarse al tercero y quinto día de incubación.

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS

Las pruebas más comunes para biotipificar a estas bacterias son la resistencia a discos de ácido nalidíxico (NAL) y cefalotina (CEF) de 30 µg, producción de hipurato de sodio y ácido sulfhídrico (SH_2) en medios Kligler o triple azúcar-hierro (TSI) y medio hierro-bisulfito-piruvato (FBP). *C. jejuni* y *C.coli* son sensibles al NAL y resistentes a la CEF, *C. hyointestinalis* y *C. fetus* son resistentes al NAL y sensibles a la CEF, y *C. sputorum* es sensible al NAL y a la CEF. *C. jejuni* es la única especie hipurato positiva y por esta propiedad se diferencia de *C. coli*. La producción de SH_2 permite diferenciar al resto de las especies: *C. sputorum* lo produce en TSI y FBP, *C. hyointestinalis* sólo en TSI y *C. fetus* es negativo para ambas pruebas. A su vez pueden separarse las subespecies de *C.fetus* mediante la prueba de producción de SH_2 en medio sensible con cisteína y tiras de subacetato de plomo para captar la producción del ácido y la prueba de tolerancia y reducción del selenito de sodio. La subespecie *fetus* es la única que crece con selenito de sodio y siempre produce SH_2 en la prueba sensible. La subespecie *venerealis* nunca crece con selenito de sodio y varía la producción de SH_2 en el medio sensible. Dis-

tintos porcentajes de glicina (del 0,6 al 1,9%) se han usado para subdividir a ambas subespecies en biotipos. Sólo hidrolizan la urea *C. sputorum* biovar *paraureolyticus* y *C. lari* subsp *ureasum*. Existen pruebas comerciales para la tipificación de las diferentes especies y subespecies, como los sistemas API.

ESTRUCTURA ANTIGENICA Y SEROTIPIFICACION

La estructura antigénica del género es muy diversa. Las distintas especies de *Campylobacter* no están relacionadas entre sí. Las dos subespecies de *C. fetus* (subsp *venerealis y fetus*) son casi idénticas e incluso comparten antígenos comunes. Por otro lado, si bien las cepas pertenecientes a las mismas especies tienen antígenos comunes, dentro de cada una de las especies es posible diferenciar varios serotipos. Las especies más estudiadas son *C. jejuni* y *C. coli*, que se serotipifican por sus antígenos termoestables mediante hemaglutinación pasiva o esquema de Penner y Hennessy, y por sus antígenos termolábiles mediante aglutinación o esquema de Lior. *C. fetus* es antigénicamente más homogénea; se han descrito cinco grupos serológicos usando antígenos celulares enteros (esquema de Marsh y Firehammer) y dos grupos A y B basados en antígenos termoestables "O" (esquema de Morgan); actualmente se utiliza el esquema de Berg, que se basa en una combinación de propiedades bioquímicas y serológicas. Sobre la base de los antígenos termolábiles superficiales de *C. mucosalis* se describen tres grupos serológicos (A, B y C).

RESPUESTA INMUNE

Los estudios más detallados han sido llevados a cabo en pacientes infectados con *C. jejuni*. Los individuos infectados desarrollan anticuerpos séricos que han sido investigados por una variedad de técnicas que incluyen aglutinación, fijación del complemento, ensayo bactericida, inmunofluorescencia indirecta, enzimoinmunoensayo (ELISA) y ELISA en gel difusión (DIG-ELISA). Los antígenos de las campilobacterias termofílicas por lo general se autoaglutinan, por lo cual se recomienda la utilización de antígenos sonicados, formolados o extractos glicoproteicos. En el resto de las especies de *Campylobacter*, los antígenos preparados con técnicas convencionales son adecuados. La respuesta inmune que se detecta depende del tipo de prueba serológica que se utilice: la prueba de aglutinación en tubo detecta predominantemente la fracción IgG, la aglutinación en placa sólo la fracción IgM, la fijación del complemento reacciona con ambas, los conjugados para inmunofluorescencia con IgM, IgG e IgA, el antígeno bactericida exclusivamente con IgM y las pruebas de ELISA pueden prepararse para detectar todas las fracciones.

La detección de anticuerpos séricos en estudios de campilobacteriosis genital bovina se ha realizado mediante hemaglutinación pasiva, aglutinación, precipitación y ELISA, para detectar los antígenos de célula entera y de las proteínas de la capa superficial de *C. fetus*, denominada "S-Layer (+)". En rumiantes sanos se ha comprobado la presencia de anticuerpos aglutinantes contra antígenos somáticos que presentan reacción cruzada con otras bacterias gramnegativas y son denominados "anticuerpos naturales". En el caso de animales infectados, tanto en forma natural como experimental, los anticuerpos humorales inducidos tienen comportamiento diferente durante la infección y se presentan en forma independiente a la tasa de anticuerpos locales que están presentes en la mucosa del tracto reproductor femenino. También tiene relación la puerta de entrada del inmunógeno (antigeno), y se detecta un mayor título de anticuerpos en suero, en los animales vacunados por vía subcutánea que por vía intrauterina. Los niveles relativos de IgA son mayores en la vagina que en el útero. Predomina la IgG que llega por transudación sérica. La IgG1 parece desempeñar en el bovino la mayoría de las actividades locales de la IgA. La IgA es producida localmente sin guardar relación con la tasa de anticuerpos séricos, existiendo en algunos casos estimulación antigénica vaginal o uterina con producción local de IgG e IgA específicas para *C. fetus*. La IgA tiene capacidad de opsonizar al *Campylobacter*, mientras que la IgG, junto con los polimorfonucleares, provoca la lisis bacteriana.

FACTORES PATOGENICOS O DE VIRULENCIA

Enteritis

Sólo el ser humano y los primates se enferman por *C. jejuni* y en menor grado por *C. coli*. Si bien se han descrito enteritis similares en ovinos, bovinos, porcinos y caninos, estos animales generalmente no manifiestan signos clínicos de la enfermedad. Se aisla *Campylobacter* tanto de animales sanos como de animales con enteritis.

Adherencia

Existen metodologías para determinar la adhesión de las cepas de *Campylobacter* a cultivos celulares. Así se demostró la adhesión de *C. jejuni, C. fetus* subsp *fetus* y *C. hyointestinalis* a los bordes en cepillo de enterocitos bovinos y la de *C. jejuni* al íleo ligado de conejo. Se ha relacionado esta adherencia con la capacidad hemaglutinante de *C. jejuni*. En *C. jejuni* y *C. fetus* se detectaron estructuras similares a pilis perítricos de adherencia que sólo se desarrollan cuando las bacterias son cultivadas en medios de cultivo con sales biliares. Se demostró que las mutantes no piliadas tienen reducida su posibilidad de colonización.

Colonización

Las campilobacterias son bacterias mucosa-asociadas y están totalmente adaptadas para colonizar el ambiente mucoso de las superficies intestinales. Estas bacterias espiraladas se mueven mejor y más rápido en soluciones con viscosidad similar a la del mucus. Su infección produce una notable depleción de las células caliciformes y, consecuentemente, su presencia se acompaña de abundante mucus en la luz intestinal. Se considera que la colonización del mucus es un paso esencial en la patogénesis. Los rumiantes gnotobiotes, libres de bacterias, son masivamente colonizados con *C. jejuni, C. coli* y *C. hyointestinalis*, y producen heces con abundante mucus, aunque sin padecer síntomas de enteritis o diarrea. En estos animales, las campilobacterias se encuentran en la luz intestinal, siempre asociadas a partículas de mucus, en el interior de las células caliciformes o asociadas al mucus que se acumula en los fondos de saco de las criptas intestinales.

En terneros, lechones y cachorros gnotobióticos, y en lauchas neonatas, la colonización por campilobacterias es distinta a la de los animales convencionales; en los gnotobiotes las campilobacterias preferentemente colonizan el ciego y el intestino grueso, mientras que en los animales convencionales, que tienen microorganismos normales, es mucho más común la colonización del intestino delgado. Es posible interferir la colonización mediante la administración oral de bacterias de la flora normal, fenómeno denominado "inhibición competitiva". Este mecanismo evita con éxito la colonización de las campilobacterias termofílicas.

Invasión

En algunos trabajos experimentales se demuestra que la invasión puede ser uno de los mecanismos de la diarrea, mientras que en otros, a pesar de lograrse una muy buena colonización del tracto entérico, no pudo demostrarse el pasaje de ningún *Campylobacter* a los tejidos subyacentes. La disparidad de los resultados experimentales se debe a que distintas cepas, dentro una misma especie, poseen diferente capacidad de invasión. Existen cepas de *C. jejuni* que 12 horas después de ser inoculadas a pollitos de 3 días de edad penetran en el epitelio del intestino delgado y ya a las 24 horas pueden ser detectadas dentro de los fagocitos de la lámina propia. El diferente grado de penetración de la membrana corioalantoidea de embriones de pollo, de 11 días de incubación, es un modelo experimental para evaluar la diferente capacidad de invadir. Del mismo modo, la invasión uterina o el aislamiento a partir de hemocultivos tomados 10 minutos después de la infección oral se ha utilizado en lauchas para evaluar la patogenicidad de cepas humanas de *C. jejuni*. En varias especies animales es bastante frecuente la bacteriemia transitoria de muy corta duración. En terneros convencionales, inoculados por vía oral con *C. jejuni* (aislados de intestino bovino), se ha demostrado el pasaje de esta bacteria a varios órganos internos; al primer día posinoculación (PI), circunscribiéndose al bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos al segundo día PI y sólo colonizando el intestino al tercer día PI. En cambio, por esta misma vía oral, *C. jejuni* y *C. coli* provenientes de abortos bovinos se aíslan a partir de hemocultivos hasta 42 días después de la infección. Por otro lado, se ha demostrado que las cepas de *Campylobacter fetus* adaptadas a colonizar el aparato reproductor de hembras bovinas fueron capaces de adherirse pero no de invadir cultivos de células Hep-2.

Producción de toxinas

Todas las especies del género *Campylobacter* poseen endotoxinas. La actividad endotóxica ha sido determinada por la prueba dérmica de Schwartzman, realizada en conejos con bacterias muertas por el calor de las especies *C. jejuni*, *C. coli* y *C. sputorum* biovar *sputorum*. Se ha demostrado que la trombosis y la inflamación que se producen en las infecciones por *C. fetus* se debe a una actividad endotóxica local. Además, las campilobacterias producen enterotoxinas y citotoxinas. Se ha descrito una enterotoxina lábil al calor (LT) que produce redondeamiento (efecto citotóxico) de células tumorales de la glándula adrenal del ratón (Y1) tanto en *C. fetus* subsp *fetus* como en *C. jejuni*. Una toxina diferente de *C. jejuni* produce elongación (efecto citotónico) e incremento de los niveles de adenosín monofosfato (AMP) cíclico intracelular en cultivos celulares de ovario de hámster chino, células HeLa, Vero y Hep-2. El parecido entre esta toxina y la del vibrión colérico es muy marcado: ambas actúan por los mismos mecanismos y están antigénicamente muy relacionadas; los anticuerpos contra la toxina colérica bloquean la actividad de la toxina de *C. jejuni*. Sin embargo, no son idénticas, pues estudios de hibridación del DNA han demostrado que los genes que codifican para la enterotoxina de *C. jejuni* no están completamente relacionados con los genes que codifican para la toxina LT de *E. coli* o de *Vibrio cholerae*. Sólo el hombre y los primates son susceptibles a esta toxina similar a la del *V. cholerae* y esto explica por qué los animales en general son portadores asintomáticos de las campilobacterias termofílicas. Recientemente se describió un factor tóxico, letal para células HeLa, CHO, Vero y Hep-2, que causa distensión progresiva y posterior letalidad celular. Este factor recibió la denominación de "*cytolethal distending toxin*" (CLDT). Esta toxina es poco conocida, a pesar de que ha sido encontrada en un alto porcentaje de los filtrados de cultivos de *Campylobacter* causales de síndrome diarreico humano.

Plásmidos

Se ha demostrado que la resistencia a la tetraciclina de algunas cepas de *C. jejuni* y *C. coli* está mediada por plásmidos. El mecanismo de transferencia de estos plásmidos probablemente involucra a la conjugación e implica un contacto de célula-célula, ya que ni la transformación del DNA ni la transducción por bacteriófagos han podido ser evidenciadas.

CAMPILOBACTERIOSIS GENITAL BOVINA

C. fetus subsp *fetus* y subsp *venerealis* causan en el bovino una enfermedad reproductiva, denominada campilobacteriosis genital bovina, que se caracteriza por infertilidad y abortos esporádicos. La prevalencia en los rodeos oscila entre un 8,5% y un 20%. Ambas subespecies, muy similares y genéticamente indistinguibles, son capaces de producir en forma indistinta cualquiera de estas dos presentaciones clínicas.

En el macho, *C. fetus* se localiza en las criptas prepuciales y en el glande del pene, mientras que en la hembra coloniza principalmente el área cervicovaginal. El toro es un portador asintomático que transmite y difunde la enfermedad durante la monta natural o bien indirectamente mediante inseminación artificial. La curación espontánea de un toro infectado rara vez ocurre pues las campilobacterias varían la presentación de sus antígenos de superficie y no invaden los tejidos subyacentes, lo cual hace que la respuesta inmune local sea mínima y que éstas permanezcan durante largo tiempo colonizando las mucosas genitales.

C. fetus subsp *fetus* y *C. fetus* subsp *venerealis* son transmitidos en forma venérea, localizándose en la hembra en el fondo de vagina. Durante la faz progestacional, los microorganismos penetran en el útero, donde se fijan a la mucosa, produciendo endometritis, y en algunos casos salpingitis, lo cual puede provocar la muerte precoz del embrión; en este caso, la hembra puede retornar al servicio 28 a 35 días después de iniciado el celo. Como mecanismo de muerte embrionaria se postula una disminución de la tensión de oxígeno y nutrientes esenciales para el embrión durante el período de prenidación, y la presencia de mucinasas, con lo cual se retarda así la nidación con posterior muerte del embrión. Por otro lado, trabajos de fertilización in vitro de óvulos bovinos en presencia de *C. fetus* subsp *venerealis* indican que aparentemente no se afectan la fertilización ni el desarrollo embrionario temprano.

Para intentar la eliminación de la infección, durante varios años se había recomendado el descanso sexual de la hembra entre un servicio y el siguiente. Hoy se conoce por diferentes ensayos que el tiempo requerido para que el útero se recobre de los efectos de la infección es muy variable, pudiendo transcurrir desde 1 hasta 8 meses. En algunos casos se ha demostrado que la hembra nunca logra eliminar totalmente la infección de *C. fetus*, lo cual permite que esta bacteria sobreviva en la mucosa del área cervicovaginal durante largos períodos, hasta 24 meses. Además, se ha comprobado que algunas de las hembras infectadas son capaces de llevar una preñez a término. Todas estas hembras son consideradas portadoras asintomáticas. Esta infección persistente se debe a un factor de virulencia: la capa superficial S [S-Layer(+)], que es una estructura cristalina de proteínas de elevado peso molecular. Estas proteínas poseen tanto secuencias conservadas como variables y presentan diferente estructura y tamaño (tetragonal o hexagonal). Esta heterogeneidad se relacionaría con

la variación antigénica, siendo éste un factor determinante para la persistencia de las campilobacterias en el tracto reproductor. Dicha variación es usualmente observada en un pequeño número de proteínas inmunodominantes superficiales que constituyen un importante atributo de virulencia en patógenos que residen en las superficies mucosas. De este modo, *C. fetus* elude la respuesta inmune, ya que la bacteria es capaz de cambiar su estructura antigénica superficial a mayor velocidad que la capacidad del sistema inmune para producir nuevos anticuerpos que reconozcan a las nuevas variables antigénicas superficiales.

El sistema inmune tiene una gran influencia sobre la persistencia de esta bacteria en el tracto reproductor. Las cepas "S Layer(-)" pueden ser fácilmente fagocitadas por los macrófagos mientras que las cepas "S Layer(+)" son resistentes a la fagocitosis y a la actividad bactericida del suero, dos de los mecanismos de defensa más importantes contra las bacterias extracelulares gramnegativas. Ello se debe a la incapacidad del componente C3b del complemento para adherirse a la superficie de las células "S Layer(+)" en presencia de suero inmune, que impide de este modo la activación del componente C5-9. Se desconoce la causa de la incapacidad del componente C3b de fijarse a la superficie de las células de la mucosa, pero podría estar relacionada con la ineficiencia de dichas células para activar la vía alternativa del complemento. Sin embargo, las cepas S Layer(+), que no fijan el complemento en presencia de sueros inmunes, también pueden ser opsonizadas por vía de receptores Fc de las células fagocíticas.

Como se mencionó anteriormente, los polimorfonucleares y los macrófagos del bovino eliminan al *C. fetus* en presencia de IgG pero no en presencia de IgA, que sólo inmoviliza a *C. fetus*. La existencia de numerosos polimorfonucleares e IgG_1 en el útero después del estro previene la adhesión y la colonización, pero luego, al disminuir el número de fagocitos durante las otras fases del ciclo estral, las campilobacterias alojadas en el área cervicovaginal son capaces de invadir el útero. En el cérvix y en la vagina, la inmunidad local del tracto genital elimina una proporción importante de la población bacteriana. A esta acción se contrapone la variación antigénica de *C. fetus* y el enmascaramiento de antígenos, similares a otras bacterias gramnegativas que habitan el tracto reproductor. Se permite así la evasión de una subpoblación de *C. fetus* con su posterior multiplicación en la superficie mucosa sin penetración en los tejidos, motivo por el cual se desencadena una respuesta inmune muy limitada, que permite así el desarrollo de una infección persistente. De este modo, *C. fetus* puede permanecer indetectado por el sistema inmune durante un tiempo variable, hasta que finalmente se produce una endometritis, cuya infiltración celular de los linfocitos y otros fagocitos es probablemente la que desencadena la respuesta inmune contra los antígenos de esta subpoblación de *C. fetus*. En estas condiciones, una nueva variante antigénica de *C. fetus* puede aparecer de manera espontánea y ser seleccionada por la acción del sistema inmune, produciéndose de este modo una nueva infección persistente.

ABORTOS ESPORADICOS POR *CAMPYLOBACTER* EN OVINOS Y CAPRINOS

El mecanismo del aborto ovino consiste en septicemia a partir de una infección entérica preexistente. Se presenta durante la etapa tardía de la preñez. Aproximadamente la mitad de los abortos por *Campylobacter* son producidos en ovinos por la especie *C. jejuni* y la otra mitad, por *C. fetus* subsp *fetus* (serotipo B). Las hembras pueden presentar descargas uterinas, lo cual constituye una forma de diseminación de los agentes causales. Los fetos abortados presentan lesiones hepáticas necróticas patognomónicas de esta enfermedad. En caprinos se han descrito también abortos similares y causados por *C. jejuni*.

ENTERITIS POR *CAMPYLOBACTER* EN CANINOS Y PORCINOS

En general, la enteritis es excepcional en animales y las campilobacterias deben ser consideradas parte de la flora normal. Además, sólo el hombre y los primates son sensibles a la acción de la toxina de las campilobacterias que es similar a la toxina del *Vibrio cholerae*. Como excepción se cita a *C. coli* como agente causal de enteritis porcina e invasión de macrófagos, y a algunas cepas patógenas de *C. jejuni* para cachorros criados en las condiciones de hacinamiento propias de los caniles.

HEPATITIS AVIAR

La denominada "hepatitis vibriónica aviar" fue una enfermedad esporádica de las gallinas ponedoras, descrita en Estados Unidos en la década de 1950, que luego desapareció por completo de los criaderos industrializados. Se caracterizaba por cursar con baja morbilidad y mortalidad, presentando las aves afectadas lesiones necróticas en el hígado de donde se obtenían cultivos puros de *C. jejuni*. Esta enfermedad pudo ser reproducida experimentalmente con *C. jejuni*, pero sólo cuando las aves fueron inmunodeprimidas con ciclofosfamida. De modo que es posible su reaparición ocasional si coexiste una cepa virulenta con enfermedades o factores inmunosupresivos.

CONTAMINACION FECAL DE LOS ALIMENTOS PARA CONSUMO HUMANO

Experimentalmente se demostró en voluntarios humanos que sólo se necesitan 500 unidades formadoras de colonias (UFC) de *C. jejuni* en 200 ml de leche para enfermar de diarrea. Las vacas que excretan *C. jejuni* pueden eliminar simultáneamente varios serotipos y no presentan ningún síntoma. Considerando que las vacas de tambo excretan entre 10^6 y 10^{10} UFC/g, la probabilidad de contaminación de la leche es muy alta. Las campilobacterias también son parte de la flora normal de los porcinos, estando los animales naturalmente colonizados entre un 48% y un 100%, y con 10^2 a 10^5 bacterias por gramo de materia fecal. Las campilobacterias termofílicas deben ser consideradas habitantes normales de los intestinos de las aves de corral como pollos, pavos y codornices. Si bien es posible obtener pollos parrilleros libres de *C. jejuni*, en general la contaminación en los criaderos es muy frecuente y es común encontrar más de 10^5 UFC/g en contenidos cecales. Además está demostrado el rol que juegan los insectos, particularmente la mosca doméstica, en la dispersión de estas bacterias. De este modo, la contaminación de las carnes por heces en los mataderos suele ser un hecho muy frecuente.

ASPECTOS CLINICOS

Los síntomas clínicos son poco evidentes. La campilobacteriosis genital bovina afecta únicamente a las hembras del rodeo. Son más susceptibles las vaquillonas o las vacas que no han tenido contacto con el agente causal. Los principales signos clínicos son: repeticiones del celo, alargamiento del ciclo estral, disminución

de los porcentajes de preñez; en general no se afecta el servicio ni la concepción. Los abortos suelen producirse entre el quinto y séptimo mes de preñez, aunque pueden ocurrir en cualquier momento de la gestación.

A pesar de ser muy comunes y abundantes en el tracto digestivo de los animales, en general las campilobacterias no producen ninguna enfermedad entérica. Por ejemplo, la prevalencia de *C. jejuni* en heces de perros de la ciudad de Buenos Aires fue determinada en un 14%, pero no causan enfermedad en estos animales. Sólo se ha descrito diarrea por *C. jejuni* en cachorros de muy corta edad y criados en caniles.

MUESTREO Y DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

La remisión de heces para cultivo bacteriológico puede hacerse directamente en frascos con tapa a rosca dejando una pequeña cámara de aire. En ese ambiente, debido al hermetismo y a la acción de los microorganismos fecales, se desarrolla una atmósfera microaerofílica que permite la conservación de las campilobacterias hasta 6 días sin que disminuya significativamente el número de los aislamientos. Para el transporte de campilobacterias fecales se emplean medios de cultivo pobres en nutrientes, como el medio semisólido de Cary y Blair modificado por Blaser, con reducida cantidad de agar (1,6 g/l).

La toma de muestras para el control de la campilobacteriosis genital bovina se realiza rutinariamente en los reproductores machos a partir del esmegma prepucial, el cual es transportado en solución fisiológica formolada o fenolada para realizar inmunofluorescencia directa. En los rodeos problema también se puede efectuar el muestreo del mucus cervicovaginal de las hembras que presenten mortalidad embrionaria, siendo lo más recomendable solicitar el cultivo bacteriológico. En caso de detectarse abortos, las muestras de elección para cultivo bacteriológico son el contenido de abomaso y los órganos parenquimatosos, en especial el pulmón fetal. Si se encuentra la placenta, ésta también puede ser enviada al laboratorio. Si las muestras fetales han sido extraídas asépticamente, pueden ser directamente cultivadas sobre placas de agar sangre sin inhibidores. Para muestras contaminadas, como placenta, los cultivos siempre deben ser realizados en medios selectivos, pues de lo contrario los contaminantes sobrecrecen con facilidad a las campilobacterias, que tienen un desarrollo mucho más lento. Para el aislamiento a partir de esmegma prepucial de toro, debido al alto grado de contaminación de estas muestras, el "medio selectivo de transporte y enriquecimiento" (TEM) es el más adecuado. Para el mucus cervicovaginal, debido a la presencia de bacterias de la flora vaginal y al bajo número de campilobacterias presentes, es recomendable efectuar un preenriquecimiento selectivo antes de realizar la inmunofluorescencia y el cultivo en placas de agar selectivo, siendo de elección el caldo Brucella semisólido con el agregado de antibióticos.

TRATAMIENTO

Dado que el cuadro diarreico es excepcional y autolimitado en caninos jóvenes, en general es innecesario el uso de antimicrobianos para su tratamiento; en caso de efectuarse, el medicamento de elección es la eritromicina. En toros de cabaña, si tienen mucho valor económico, se pueden intentar tratamientos sistémicos y locales con antibióticos y quimioterápicos (estreptomicina, oxitetraciclina, dimetridazole, etc.), asociados con inmunizaciones.

PROFILAXIS

Para reducir el grado de contaminación de las campilobacterias termofílicas en las aves de corral es recomendable la administración oral de flora normal a pollitos recién eclosionados en la planta de incubación. El lavado de las carcasas y la aplicación de desinfectantes químicos e irradiación gamma son todas medidas tendientes a reducir el grado de contaminación de las carnes. El adecuado envasado en condiciones estériles y la cadena de frío en todo el proceso de comercialización de los productos alimenticios son claves para disminuir la incidencia de estos agentes. La pasteurización de la leche es un efectivo método de descontaminación. La desecación, el congelado y la salazón de los alimentos son efectivos para eliminar las campilobacterias. Las medidas higiénicas tradicionales de preparación y cocción de los alimentos son seguras y deben ser estrictamente aplicadas.

El único modo de controlar a la campilobacteriosis genital bovina en los rodeos de cría extensiva es el empleo de bacterinas con alta capacidad inmunizante, especialmente en vacas y vaquillonas, y el estricto control de los toros para la eliminación del rodeo de todos los animales infectados. Para prevenir adecuadamente la transmisión venérea de esta enfermedad todos los animales del rodeo deben ser vacunados con dos dosis subcutáneas, separadas entre sí por 15 días de intervalo, teniendo la precaución de que la última dosis sea aplicada 15 días antes del servicio. Las bacterinas deben contener cepas que expresen distintas variables de "S Layer (+)". Los toros también pueden vacunarse aunque siempre debe constatarse la curación de los mismos mediante exámenes de laboratorio seriados, para evitar así la introducción de animales infectados en el rodeo. Dado que la curación muchas veces no es factible, es recomendable eliminar de los toros infectados.

Para la prevención de los abortos esporádicos en las majadas de ovejas es aconsejable el uso de bacterinas multivalentes oleosas contra cepas de *C. jejuni* y *C. fetus* subsp *fetus*. Es indispensable que dichas vacunas sean preparadas con los serotipos prevalentes en las áreas geográficas adonde están destinadas.

BIBLIOGRAFIA

Ballabene NC, Terzolo HR. Evaluación de antimicrobianos y atmósferas para el aislamiento de *Campylobacter fetus* subsp del tracto genital bovino. *Rev Arg Microbiol.* 1992; 24: 113-125.

Butzler JP. Campylobacter infection in man and animals. Ed. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, USA. pp. 246, 1984.

Catena M. Campilobacteriosis genital bovina: inmunopatogenia de la mortalidad embrionaria. Tesis Doctoral en Ciencia Animal de la UNCPBA 1-134, 2002.

Catena M, Callejas S, Soto P, Aba M, Echevarría H, Monteavaro C, Mazzolli A. Efectos de la infección experimental con *Campylobacter fetus venerealis* sobre la preñez temprana en vaquillonas. In Vet: 2003, 1: 37-44.

Cipolla A, Casaro A, Terzolo H, Estela E, Brooks B, Garcia M. Persitence of *Campylobacter fetus* subespecies *venerealis* in experimentally infected heifers. *Vet Record*, 1994, 134: 628.

Engberg J., On S. L. W., Barrington C. S., Gerner-Smidt, P. Prevalence of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, and *Sutterella* spp. in Human Fecal Samples as Estimated by a Reevaluation of Isolation Methods for Campylobacters Appl Environ Microbiol. 2004; 70: 4415–4418.

Garcia MM, Eaglesome MD, Rigby C. Campylobacters important in veterinary medicine. *Vet Bulletin*. 1983; 53: 793-818.

Matsuda M., Moore J. E. Urease-Positive Thermophilic *Campylobacter* Species. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70(8): 4415–4418.

Penner JL. The genus *Campylobacter*: a decade of progress. *Clin Microbiol Rev.* 1988; 1: 157-172.

Terzolo HR. Identification of Campylobacters from bovine and ovine faeces. *Rev Arg Microbiol.* 1988; 20: 53-68.

Terzolo HR, Paolicchi FA, Moreira AR, Homse A. Skirrow agar for simultaneous isolation of *Brucella* and *Campylobacter* species. *Vet Record.* 1991; 129: 531-532.

Terzolo HR, Argento E, Catena MC, Cipolla AL, Martínez AH, Tejada G, Villa C, Bentancor L, Campero CM, Cordeviola JM, Pasini MI. Procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la campylobacteriosis y tricomoniasis genital bovina. Comisión Científica Permanente de Enfermedades Venéreas de los Bovinos. Balcarce. CERBAS-INTA. pp. 33, 1992.

Vandamme P, Dewhirst F, Paster, B.J. On, S. L. W. Genus I. *Campylobacter.* In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second edition. 2005. Ed. Spriger. 1147-1168.

Capítulo 39

BRUCELLA

In memoriam †Raúl A. Bowden*

Pablo C. Baldi, Juliana Cassataro, Diego J. Comerci, Silvia Estein, Carlos A. Fossati, Guillermo H. Giambartolomei, Fernando A. Goldbaum, Jorge C. Wallach

INTRODUCCION

El género *Brucella* está compuesto únicamente por bacterias patógenas de mamíferos, en los cuales producen enfermedades crónicas. De las especies que integran el género, al menos cuatro son patógenas para el hombre, quien adquiere la infección a partir de los reservorios animales. Por ello, la brucelosis (enfermedad producida por *Brucella*), en sentido amplio, es considerada zoonosis.

Desde el punto de vista económico, la brucelosis provoca importantes pérdidas a la producción pecuaria debido a problemas reproductivos que afectan a los bovinos, ovinos, caprinos y porcinos (abortos, neonatos débiles, metritis, subfertilidad o infertilidad), con la menor producción en carnes, leche y lanas que ello conlleva.

La enfermedad humana, con frecuencia crónica e incluso invalidante, aunque rara vez mortal, acarrea a su vez pérdidas de horas de trabajo y costos derivados del tratamiento.

Reseña histórica

Dejando aparte antiguas referencias de la época de Hipócrates, puede decirse que la brucelosis fue descrita por primera vez en el mundo por Marston en 1859 en la isla de Malta, en el mar Mediterráneo. Allí, se presentó una epidemia de "Fiebre del Mediterráneo" entre la población civil y miembros de la Armada Británica destacada en la isla, con algunos casos fatales, de los cuales Sir David Bruce logró el aislamiento de una bacteria (que denominó *Micrococcus melitensis*) a partir del bazo. En 1905, Horrocks demuestra la presencia de *M. melitensis* en la leche de las cabras, que era consumida por las personas afectadas. Esto permite establecer la primera cadena epidemiológica. En forma independiente, en Dinamarca, Bang aísla de vacas una bacteria asociada al aborto, que denomina *Bacterium abortus*. En 1914, en los EE.UU., Traum se atribuye el aislamiento de una bacteria causante de abortos en cerdas. En 1918, la bacterióloga Alice Evans muestra la relación estrecha existente entre las bacterias aisladas por Bruce y por Bang, y propone agruparlas en un mismo género; ella señala también que las infecciones humanas por *B. melitensis* no pueden distinguirse por seroaglutinación de aquellas causadas por *B. abortus*. Es en 1920 cuando Meyer y Shaw proponen la creación del género *Brucella*. La infección humana por *B. abortus* es confirmada en Sudáfrica en 1924.

En 1929, Huddleson desarrolla en EE.UU., medios bacteriológicos que permiten la diferenciación del género en tres especies (*B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*). La cepa vacunal *B. abortus* S19 es aislada en 1923 por Buck, en tanto su poder protector en bovinos se demuestra en 1930. Wilson y Miles proponen en 1932 un esquema antigénico, basado en la existencia de dos antígenos, A y M, presentes en proporciones variables en las tres especies conocidas en esa época.

Las vacunas muertas surgen a partir de 1945, con la cepa *B. abortus* 45/20 propuesta por Mc Ewen y Priestly. Por otra parte, Elberg obtiene la cepa mutante *B. melitensis* Rev.1, probada como vacuna viva en cabras, en 1957. En esa época, Renoux en Túnez pone a punto la vacuna muerta *B. melitensis* H38, y Stonner y Lackman aíslan *B. neotomae* de la rata *Neotoma lepidae* en EE.UU.

El primer aislamiento de *B. ovis* en el carnero es atribuido a McFarlane, Salisbury, Osborn y Jebson en Nueva Zelanda en 1950, pero es Buddle el que propone su denominación como tal. En 1968, Carmichael y Bruner, en EE.UU., aíslan por vez primera *B. canis* de una perra.

En 1994 se informó el aislamiento de *Brucella* spp en la foca común (*Phoca vitulina*) y el delfín común (*Delphinus delphis*) en Escocia, y en un feto abortado de un delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*) cautivo en un oceanario de los Estados Unidos. Desde entonces se ha informado el aislamiento de *Brucella* o la detección de anticuerpos anti*Brucella* en numerosos mamíferos marinos (cetáceos y pinnípedos) del Artico, el Atlántico Norte, el Mediterráneo, el Pacífico Norte y Sur, y la Antártida. Los estudios moleculares y de perfil metabólico han demostrado que estos aislamientos no corresponden a ninguna de las especies ya conocidas, por lo que se trataría de una nueva especie. Se ha propuesto denominar a esta especie *Brucella maris*, aunque otros autores sostienen que las especies aisladas de cetáceos y pinnípedos son diferentes y deberían denominarse *B. cetaceae* y *B. pinnipediae*, respectivamente. Se han descrito al menos tres casos de infección humana por *Brucella* marina, uno en un operario de un laboratorio de investigación y otros dos en ciudadanos peruanos que posiblemente adquirieron la infección por consumo de cebiche y desarrollaron neurobrucelosis.

En Argentina, la enfermedad se conoce desde el siglo pasado, y se le atribuye a Bernier, en Buenos Aires, su primera descripción. Villafañe-Lastra y Rosenbusch confirman años después la infección en nuestros rodeos. En 1925 se notifica el primer aislamiento de *B. abortus* por Ruppert. En 1930 se comunica el primer aislamiento de *B. melitensis* de un caso humano, por Fernández Itburrat. En 1934 se aísla *B. suis* de bovinos. En ovinos, Szyfres y Chappel aíslan *B. ovis* en 1962, mientras que la presencia de *B. canis* es confirmada más recientemente en Córdoba.

EPIDEMIOLOGIA

Los animales infectados eliminan *Brucella* al medio, contaminando el ambiente (pastos, aguas, establos). La eliminación es particularmente importante durante el aborto o los partos infecciosos, y se han reportado cifras tan altas como 10^{12} UFC *Brucella* por gramo de tejido cotiledonario de vacas. En estos casos, los loquios, la orina, la leche y los fetos están infectados.

* Este capítulo fue escrito originalmente por el Dr. Raúl A. Bowden para el libro Temas de Microbiología Veterinaria. Para este libro, el capítulo ha sido actualizado y ampliado por el resto de los autores en homenaje a este entrañable experto prematuramente fallecido.

La eliminación continúa en forma importante durante los 45 días posparto. La leche es también una vía de eliminación significativa y fuente principal de infección para el hombre.

En el medio, *Brucella* sobrevive por períodos relativamente largos, teniendo en cuenta que es una bacteria no esporulada. En el suelo húmedo y el estiércol usado como abono, se registran tiempos de sobrevida de hasta 80 días. En el polvo, según la humedad ambiente, entre 15 y 40 días. Esto hace que *Brucella* pueda diseminarse eficientemente de un medio infectado a uno indemne; los recipientes de leche o agua, las camas, los instrumentos contaminados, los zapatos, perros y aves le sirven de vehículo.

Los neonatos pueden adquirir la infección in utero o al nacer. En algunos casos, las hembras pueden contraer una brucelosis latente que, epidemiológicamente, es de especial peligrosidad ya que, siendo indetectable por las pruebas de diagnóstico habituales, los animales pueden terminar abortando en su primera gestación y contaminar así el medio con enormes cantidades de *Brucella*.

Numerosas especies salvajes pueden infectarse con *Brucella* y, en algunos casos, se sospecha que pueden mantener y transmitir la infección a los animales domésticos. Se desconoce aún como llega la infección a los mamíferos marinos y cuál es su papel epidemiológico.

La enfermedad en el hombre es un reflejo de la situación en los animales, ya que éste interviene como un hospedador accidental. Se pueden distinguir dos situaciones. En la población general, la infección sobreviene habitualmente por consumo de productos lácteos contaminados. Los quesos frescos son los de mayor riesgo, en especial los de oveja y de cabra; la desecación o la fermentación provocan la muerte de *Brucella*, pero los plazos son variables y difíciles de determinar (en algunos quesos, *Brucella* puede sobrevivir unos 6 meses). En la población de alto riesgo, la infección se produce por estrecho contacto con el animal infectado, siendo el caso de los veterinarios, criadores, empleados de mataderos y laboratoristas; estos últimos también pueden infectarse al manipular cultivos de *Brucella*. La brucelosis es, pues, considerada legalmente como una enfermedad profesional.

La brucelosis está distribuida a nivel mundial, siendo pocos los países que han declarado estar libres de ella. *B. melitensis* es la especie más difundida, seguida por *B. abortus* y *B. suis*. Sin embargo, dentro de cada continente, la distribución de las especies es diferente, y sigue en general a la de sus hospedadores preferenciales. En nuestro país están presentes las cuatro especies de *Brucella* patógenas para el hombre, así como *B. ovis*. Las biovariedades aisladas en la Argentina son: *B. abortus* 1, 2, 4 y 6, *B. suis* 1 y "atípicas", y *B. melitensis* 1. Los datos de prevalencia y distribución con que se cuenta son, empero, limitados y esporádicos. A título informativo, en la provincia de Buenos Aires se han hallado, en estudios del último decenio, entre un 30 y un 50% de rodeos lecheros sospechosos utilizando la prueba del anillo en leche (véase más adelante). Las cifras son algo menores en las provincias de Córdoba, Entre Ríos, Santa Fe y en el noroeste (Catamarca, Jujuy). La prevalencia individual fluctúa entre un 1 y 10%. En los rodeos vacunos de cría, la prevalencia individual se sitúa entre 1 y 7%. En los últimos años, gracias a la implementación voluntaria de acciones de saneamiento y a una mejora sustancial en la cobertura vacunal, las cifras se han ido reduciendo, sobre todo en los rodeos lecheros sometidos a una mayor presión técnico-económica. Son aún más escasos los datos referentes a majadas y hatos, siendo los casos declarados de brucelosis humana los que informan indirectamente sobre la situación en aquéllos, lo cual permite presumir una situación de alta prevalencia, especialmente en el noroeste del país. La infección por *B. ovis* en lanares está ampliamente difundida según se desprende de muestreos parciales y esporádicos en Buenos Aires y Patagonia.

CLASIFICACION

En la actualidad, el género *Brucella* pertenece al phylum de las Proteobacterias dentro de la clase α-proteobacterias, clasificación que se basa en el análisis de la secuencia del RNA de 16S. Este taxón agrupa patógenos de humanos o animales como *Rickettsia*, *Bartonella*, *Ochrobactrum* y *Anaplasma*, y los no patógenos (*Agrobacterium*) o endosimbiontas (*Rhizobiaceae*) de vegetales.

Dentro del género *Brucella* se distinguen seis especies de acuerdo con las características culturales, metabólicas y estructurales, de patogenicidad y huésped preferencial. Además, como ya se ha mencionado, se ha propuesto la incorporación al género de las dos nuevas especies de *Brucella* aisladas de mamíferos marinos.

Género

Brucella son cocobacilos gramnegativos (véase Morfología) aerobios estrictos, inmóviles, sin cápsula y no esporulados. Poseen metabolismo de tipo oxidativo, y pueden utilizar los nitratos como aceptor de electrones. En general no fermentan los azúcares. No utilizan el citrato como única fuente hidrocarbonada. Las pruebas de oxidasa y catalasa son positivas. No producen indol ni acetil-metil-carbinol. La actividad ureasa es variable. No atacan la gelatina ni modifican la leche. Son mesófilos.

Brucella no posee plásmidos ni mecanismos de conjugación. Sin embargo, se ha encontrado en diferentes especies y biovariedades que el genoma de *Brucella* está distribuido en dos cromosomas independientes (replicones), de tamaño diferente; el más pequeño posee numerosas deleciones e inserciones, mientras que en *B. suis* bv. 3 se ha hallado un único cromosoma (tabla 39-1).

El DNA de *Brucella* contiene 55-58 mol% de guanina + citosina. Se ha determinado que *Brucella* no tiene homología con otras bacterias de composición de DNA similar, tales como *Agrobacterium tumefaciens* y *Escherichia coli*, ni con especies similares por su fenotipo, como *Francisella tularensis* o *Bordetella bronchiseptica*. Por el contrario, *Ochrobactrum intermedium* sp nov. ha resultado la bacteria más cercana a *Brucella*, con la que además comparte antígenos.

El género *Brucella* presenta una homogeneidad genética remarcable con una hibridación DNA-DNA entre sus especies y la cepa tipo *B. melitensis* 16M > 96%. Esto ha llevado a postular la existencia de una sola especie dentro de *Brucella*; sin embargo, los bacteriólogos siguen hallando útil y práctica la actual denominación que contempla los huéspedes preferenciales.

Como se verá más adelante, recientemente han sido secuenciados los genomas de *B. melitensis* 16 M y *B. suis* 1330, mientras que la secuenciación de *B. abortus* y *B. ovis* está en curso. El estudio del genoma ha permitido la identificación de secuencias específicas de especie que en el futuro podrían ser útiles para el diagnóstico. Asimismo, se espera que este avance contribuya al desarrollo de nuevas vacunas a través de un mejor conocimiento de los factores de virulencia.

Especies

La diferenciación de *Brucella* en especies se basa en el espectro de hospedadores preferenciales, en la sensibilidad a los bacteriófagos y en el perfil del metabolismo oxidativo.

Existe un buen número de fagos específicos de *Brucella*. Se los ha dividido en seis grupos sobre la base de la actividad de las dife-

Tabla 39-1. Genoma de *Brucella*

Especie/biovar	Replicones	Tamaño de cromosomas (Mb)	Tamaño del genoma total (Mb)
Brucella abortus	2	2,10 - 1,15	3,25
Brucella melitensis	2	2,10 - 1,15	3,25
Brucella ovis	2	2,10 - 1,15	3,25
Brucella suis bv. 1	2	2,10 - 1,15	3,25
Brucella suis bv. 2	2	1,85 - 1,15	3,00
Brucella suis bv. 3	1	3,10	3,10
Brucella suis bv. 4	2	1,85 - 1,15	3,00

rentes especies y fases. Un esquema simple de tipificación propuesto utiliza cuatro fagos: Tbilisi (Tb), Izatnagar (Iz), Weybridge (Wb) y R/C. La reactividad de estos fagos se presenta en la tabla 39-2.

La comparación del consumo de oxígeno utilizado en la oxidación de un conjunto de aminoácidos y azúcares constituye la base del estudio del metabolismo oxidativo. Este permite diferenciar las *Brucella* en especies, ya que cada una de ellas presenta un "patrón" respiratorio definido y constante. La determinación se lleva a cabo en respirómetros del tipo de Warburg, y constituye un ensayo complejo que, además, debe realizarse en laboratorios de alta seguridad (nivel 3). Esto hace que este estudio sea actualmente efectuado por unos pocos laboratorios en el mundo, y se reserve a la identificación final de cepas.

Las cepas aisladas de mamíferos marinos forman un grupo relativamente homogéneo que difiere del resto de las especies (más del 77% presenta homología con el DNA de *B. melitensis*). *B. pinnipediae* requiere CO_2 para su crecimiento y no fermenta la galactosa, mientras que *B. cetaceae* tiene caracteres opuestos.

Genómica comparativa del género Brucella

En la actualidad, se cuenta con más de 200 genomas bacterianos concluidos y otros tantos en ejecución. El genoma completo de *Brucella melitensis* 16M y el de *Brucella suis* 1330 fueron publicados en 2002; en la actualidad se ha concluido el genoma de *Brucella abortus* 2308 y se está avanzando con el de *Brucella ovis*.

El genoma de *Brucellae* está compuesto por dos cromosomas circulares: el cromosoma I (ChrI) de 2,1 Mpb y el cromosoma II (ChrII) de 1,2 Mpb. Ambos cromosomas tienen un origen evolutivo complejo y distinto. El ChrI presenta un alto grado de conservación de orden y estructura génica con cromosomas bacterianos del grupo α2 de las proteobacterias (grupo al que pertenece el género). En cambio, el ChrII tiene un claro origen plasmídico, ya que muestra similitudes con los plásmidos de simbiosis de *Rhizobium* spp y con los de virulencia de *Agrobacterium* spp. La comparación de las secuencias genómicas entre *B. melitensis*, *B. suis* y *B abortus* indica que más del 90% de los genes presentan 98-100% de identidad a nivel nucleotídico y en el orden génico, lo que refuerza la idea de que *Brucella* es un género monoespecífico. El ChrI codifica 2280 ORF, mientras que el ChrII codifica 1214 ORF (el número de ORF difiere según la especie debido a diferencias en el proceso de anotación). Hay una notable asimetría en la distribución de las distintas categorías de genes entre ambos cromosomas. El ChrI codifica la mayoría de la maquinaria metabólica para procesos como transcripción, traducción y síntesis proteica. Posee además un alto porcentaje de proteínas de fagos debido a la inserción de restos de cromosomas virales. En cambio, el ChrII presenta un alto porcentaje de genes involucrados en transporte de membrana, metabolismo energético central e intermedio, y regulación. La mayoría de las funciones plasmídicas se encuentran también en el ChrII, así como los tres *clusters* de genes para biosíntesis de flagelo y el sistema de secreción tipo-IV.

A pesar de que el genoma de *Brucellae* presenta muy pocos elementos repetitivos, se observan ciertas inversiones que han ocurrido probablemente por eventos de recombinación no homóloga estables. La mayoría de la diferencias en el contenido genético de las tres especies son el resultado de eventos de deleción especie-específica y eventos de integración de fagos linaje-específicos. Todos estos ordenamientos cromosómicos dan cuenta de las diferencias en el complemento genético de las brucelas como se muestra en el diagrama de Venn (fig. 39-1).

B. suis es la especie con mayor cantidad de genes únicos debido a las inserciones mencionadas. *B melitensis*, en cambio, sólo posee dos genes únicos que en realidad son transposasas, por lo que podría considerarse que, al igual que *B. abortus*, no posee genes especie-específicos. El patrón de ordenamientos cromosómicos indica claramente que tanto *B. melitensis* como *B. abortus* comparten un ancestro común no compartido por *B. suis*, es decir que esta última ha evolucionado separadamente del linaje que contiene a las primeras.

Pero los ordenamientos cromosómicos a gran escala no son los únicos fenómenos que distinguen a las especies. La inspección de las secuencias codificantes indica que las brucelas han sufrido, en forma especie-específica, un número importante de inactivaciones génicas causadas por mutaciones puntuales o microdeleciones que generaron codones de finalización de traducción o corrimientos en el marco de lectura, procesos que condujeron a la formación de seudogenes. *B. abortus* contiene 179 seudogenes; 119, *B. melitensis*, y 64, *B. suis*.

La inactivación genética no muestra una distribución al azar respecto de las categorías funcionales. Por el contrario, los

Tabla 39-2. Diferenciación de las especies de *Brucella* por fagotipia

Especies	Lisis por los fagos[1]			
	Tb	Wb	Iz	R/C
Brucella melitensis	-	-	+	-
Brucella abortus	+	+	+	-
Brucella suis	-	+	+	-
Brucella neotomae	-	+	+	-
Brucella ovis	-	-	-	+
Brucella canis	-	-	-	+

[1] Suspensiones de fagos ajustadas a la "dosis habitual de prueba".

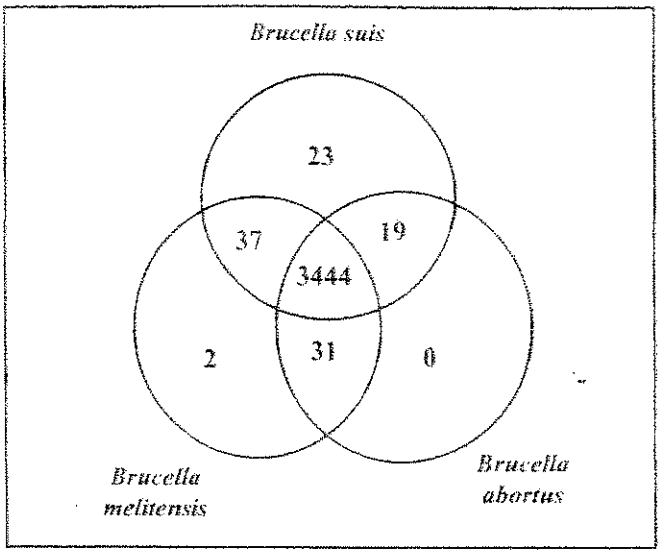


Figura 39-1. Complemento genético en *Brucellae*.

seudogenes se acumulan mayoritariamente en el transporte de membrana (17-24% del total de seudogenes según la especie), la síntesis de estructuras de membrana externa (9%) y la regulación transcripcional (6%). Este proceso de reducción en el complemento genético de transporte podría ser la consecuencia de la adaptación al estilo de vida intracelular en un ambiente protegido (la vacuola replicativa) cuya provisión de nutrientes es constante y estable, y en el cual la diversidad de transportadores (fenómeno típico de bacterias del suelo) deja de ser una ventaja adaptativa y se torna dispensable. Considerando el alto grado de conservación genética entre las tres especies, la acumulación diferencial de seudogenes en reguladores transcripcionales y estructuras de membrana externa podría estar relacionada con la especificidad del hospedador, la cual estaría dada no por diferencias en el complemento génico sino por diferencias en la regulación de la expresión genética.

No se han encontrado genes de virulencia obvios, como toxinas, cápsulas o citolisinas. Sin embargo, se han identificado ciertos genes de virulencia potenciales, como hemolisinas, proteasas, invasinas, adhesinas y autotransportadores, cuya función en la virulencia no ha sido aún estudiada. Aunque *Brucella* es un género no móvil, el ChrII codifica tres *clusters* de genes flagelares con la estructura típica de los operones flagelares de α-proteobacteria. No obstante, varios de estos genes son seudogenes que difieren entre las tres especies, lo que explica el fenotipo no móvil. Esta observación sugiere que probablemente las brucelas derivan de un ancestro flagelado, pero han perdido estas estructuras de manera independiente durante el proceso de especiación.

Dado que la mayoría de los autotransportadores conocidos están involucrados en funciones relacionadas con el proceso de invasión, es lícito sospechar que la diferencia en el número de autotransportadores activos y la variación de secuencia entre ellos puede tener un efecto directo en la capacidad de cada especie para interaccionar con su hospedador específico.

Las tres especies carecen de los genes necesarios para la síntesis de glucógeno, el principal polisacárido de reserva celular. Además, la vía de síntesis de polihidroxibutirato, otro polímero de reserva, está incompleta. Mucho se ha especulado sobre la capacidad de *Brucella* para sobrevivir en el ambiente, incluso se ha postulado que potencialmente podría metabolizar compuestos derivados de lignina debido a la presencia de genes de la vía del beta-cetoadipato y homoprotocatecuato, ambos característicos de microorganismos del suelo. Sin embargo, la incapacidad para sintetizar polímeros de reserva sugiere que la bacteria no podría mantener un ciclo de vida fuera del hospedador.

Varios aspectos de la biología de *Brucella* siguen sin ser completamente comprendidos. Es de esperar que las secuencias genómicas de las distintas especies de *Brucella* junto a las de otras α-proteobacterias proporcionen los datos necesarios para encarar nuevos y más profundos estudios de genómica comparativa y proteómica, los cuales contribuirán significativamente al entendimiento de los procesos evolutivos que condujeron a la emergencia de estos patógenos.

Biovariedades

Las especies de *Brucella* en fase S presentan variedades (biovariedades) que, además de marcadores propios, tienen rasgos epidemiológicos diferentes entre sí. Las biovariedades se diferencian (tabla 39-3) por sus requerimientos de CO_2 para crecer, por la producción de H_2S, según su crecimiento en presencia de colorantes inhibidores (tionina y fucsina básica), y por su aglutinabilidad por sueros monoespecíficos anti-A, anti-M (antígenos asociados al polisacárido O) y anti-R. Estos marcadores tienen también un valor suplementario para la identificación de especies.

MORFOLOGIA

General

Las brucelas son bacterias gramnegativas, de forma cocobacilar y un tamaño de 0,5-0,7 µm x 0,6-1,5 µm. En general aparecen aisladas, pero pueden presentarse en pares o pequeños grupos. No son pleomórficas, salvo en cultivos viejos. Son bacterias acapsuladas, no esporuladas e inmóviles. En algunas coloraciones empleadas para su observación en improntas o frotis, como la de Stamp, aparecen como acidorresistentes.

Bajo condiciones disgenésicas (presencia de antibióticos o agentes químicos), *Brucella* puede presentar formas L, pleomórficas, que varían desde esferoplastos de 1-15 µm hasta cuerpos de 50 µm.

Constituyentes bacterianos principales

Siendo las bacterias del género *Brucella* microorganismos gramnegativos, su envoltura celular está formada por una membrana interna, una membrana externa y un espacio periplasmático intermedio. Este contiene algunas enzimas y proteínas relacionadas con el transporte de solutos y un gel glucopeptídico denominado peptidoglucano, responsable de la forma e integridad osmótica de la bacteria. La membrana externa contiene distribuidos asimétricamente fosfolípidos, proteínas y un lipopolisacárido (LPS) considerado el principal antígeno.

Componentes de membrana: Lipopolisacárido

Las diferentes cepas de *Brucella* son clasificadas habitualmente como "lisas" ("smooth", S) o "rugosas" ("rough", R) sobre la base del aspecto de las colonias obtenidas por cultivo en medio sólido. El aspecto diferente de esas colonias depende de la particular expresión en la superficie de las bacterias del LPS. El LPS de *Brucella* spp presenta una organización similar a la de las enterobacterias. Se distinguen, pues, tres regiones que difieren desde el punto de vista genético, químico y biológico. Ellas son: el lípido A, profundamente inserto en la hoja externa de la membrana externa; un oligosacárido intermedio, llamado núcleo (o "core"), y el polisacárido O (PSO), conocido también como cadena o antígeno O. Existen dos tipos principales de LPS: el LPS-S y el LPS-R (fig. 39-2).

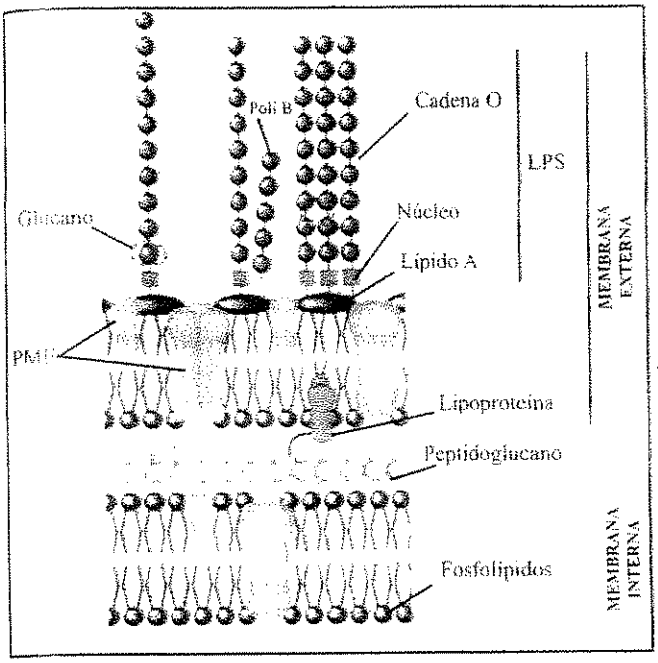


Figura 39-2. Esquema de la membrana de *Brucella* lisa.

La diferencia en la composición química entre los dos es la presencia de PSO sólo en el primero. El LPS-S es, en realidad, una familia heterogénea de moléculas de longitud diferente. A diferencia de la mayoría de las endotoxinas, el LPS de *Brucella* no es pirogénico, no activa la cascada del complemento; es un mitógeno muy débil de linfocitos B y un muy mal inductor de citoquinas inflamatorias.

El lípido A de *Brucella* presenta diferencias respecto de los lípidos A de las enterobacterias. La parte glucídica está representada por un disacárido compuesto de 2,3 diamino-2,3-dideoxi-D-glucosa y de glucosamina. La parte lipídica está compuesta por ácidos grasos de cadena relativamente larga, de tipo saturado, como el esteárico y el palmítico, y también de tipo hidroxilado, ligados por uniones de tipo éster. El lípido A de *Brucella* no contiene fosfatos, ni etanolamina ni azúcares neutros. Las diferencias en la composición podrían explicar la menor toxicidad del LPS de *Brucella* respecto de los LPS de las enterobacterias.

El núcleo, porción que liga al lípido A con la cadena O (en el LPS-S), contiene glucosa, manosa y KDO (ácido 3, deoxi-D-mano-2-octulosonico), y no contiene heptosas ni fosfatos. Un aminoazúcar, la quinovosamina, está presente sólo en el núcleo del LPS-S, pero no en el LPS-R, y conectaría el núcleo a la cadena O.

El PSO es la porción más distal del LPS-S respecto del soma bacteriano, y por ello, la más expuesta. En *Brucella* se lo describe como un homopolímero lineal compuesto por *n* residuos de N-formil-perosamina (4,6-dideoxi-4-formamido-alfa-D-manopiranosilo). La distribución de bandas de LPS-S, observada en electroforesis, evidencia una heterogeneidad importante en la longitud de los PSO. En la mayoría de las cepas, el PSO se halla presente en el LPS-S. En cambio, en la cepa *B. melitensis* B115, rugosa, el PSO sólo se halla en forma libre en el interior de la bacteria.

Los antígenos A y M, definidos en 1932 por Wilson y Miles por pruebas de adsorción cruzada, como los antígenos dominantes en *B. abortus* y *B. melitensis*, son estructuras presentes en el PSO del LPS-S de *Brucella*. Las uniones entre los residuos de N-formil-perosamina pueden ser de dos tipos: alfa 1,2 o, alfa 1,3. El modo según el cual las uniones se alternan a lo largo del PSO determina la configuración de epitopes A o M, importantes en la definición de las biovariedades de *Brucella*. Se ha sugerido que el epitope M estaría formado por dos residuos de perosamina unidos por ligaduras alfa 1,3, limitados de cada lado por dos residuos unidos por ligaduras de tipo 1,2. El epitope A, por su parte, estaría

Tabla 39-3. Diferenciación de *Brucella* en biovariedades

Especie	Biovar	CO_2	H_2S	Tion	Fuc	A	M	R
Brucella melitensis	1		-	+	+	-	+	-
	2	-	-	+	+	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	+	-
Brucella abortus	1	-	+	-	+	+	-	-
	2	+	+	-	-	+	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-
	4	+	+	-	+	-	+	-
	5	+	-	+	+	-	+	-
	6	-	-	+	+	+	-	-
	9	-	+	+	+	-	+	-
Brucella suis	1	+ o -	-	+	-	+	-	-
	2	-	-	+	-	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	-	-
	4	-	-	+	-	+	+	-
	5	-	-	+	-	-	+	-
Brucella neotomae		-	+	-	-	+	-	-
Brucella ovis		+	-	+	-	-	-	+
Brucella canis		-	-	+	-	-	-	+
Brucella maris		+ o -	-	+	+	+	-	-

CO_2: requerimiento de dióxido de carbono para desarrollo; H_2S: producción de ácido sulfhídrico; Tion: crecimiento en presencia de tionina (20 mg/ml); Fuc: crecimiento en presencia de fucsina básica (20 mg/ml); A, M y R: aglutinación frente a sueros monoespecíficos hiperinmunes de conejo antiantígenos A, M y cepas rugosas, respectivamente.

formado por un trecho de unos cinco residuos unidos todos por uniones alfa 1,2. Ambas uniones, 1,2 y 1,3, han sido halladas en todas las biovariedades de *Brucella*, sin embargo, la proporción de aquéllas es diferente para cada biovariedad (tabla 39-3).

Las cepas de *Brucella* en fase lisa presentan reactividad antigénica cruzada con otras bacterias gramnegativas. Esa comunidad antigénica se debe a la similitud de las cadenas de PSO. Por ejemplo, *Yersinia enterocolitica* O:9 presenta un PSO idéntico al hallado en *B. abortus* biovar 1. Otras bacterias que presentan reacción cruzada son: *Salmonella landau*, *Pseudomonas maltophilia* 555, *Vibrio cholerae* y *E. coli* O:157.

Además de los epitopes A y M existen otros, denominados comunes o "C" por hallarse tanto en cadenas A o M dominantes. De estos epitopes C, algunos son exclusivos de *Brucella*, mientras que otros están presentes también en *Yersinia* (C/Y).

Existe además un polisacárido denominado "hapteno nativo" que se halla en la superficie, entremezclado con los LPS y desprovisto de lípido A. Su rol biológico es desconocido, aunque ha sido empleado en pruebas serológicas de inmunodifusión, de alta especificidad.

Proteínas de la membrana externa (OMP)

En estrecha asociación con los LPS, se hallan en la membrana externa un número importante de proteínas (tabla 39-4). Algunas de ellas se encuentran, además, fuertemente unidas al peptidoglucano, característica ésta que las diferencia de las OMP presentes en enterobacterias. Estas proteínas se han dividido en tres grupos de acuerdo con su peso molecular, a saber: Grupo 1, proteínas de entre 89 y 94 k; Grupo 2, con peso molecular comprendido entre 35 y 40 k, y Grupo 3, entre 25 y 30 k. Las proteínas de los grupos 2 y 3 se encuentran en mayor cantidad y son conocidas como Omp "mayores". Las proteínas del Grupo 1 junto con otras con pesos moleculares de entre 10 y 20 k son denominadas Omp "menores". Se conoce que las proteínas del Grupo 2 funcionan como porinas, mientras que las proteínas del Grupo 3 son similares a las Omp A. Se ha demostrado que las Omp 10, 16 y 19 son lipoproteínas. A través de diversos estudios se ha confirmado la inmunogenicidad de las Omp y su posible utilidad como vacunas.

Componentes periplasmáticos

El espacio periplasmático, comprendido entre las membranas externa y la citoplasmática, está constituido por el mucopéptido, formado por peptidoglucano con glucosamina, ácido murámico, alanina, ácido glutámico y ácido α-diaminopimélico. En este espacio se han identificado proteínas tales como p39, bp26 y Cu/Zn superóxido dismutasa. Además se ha informado la asociación de lipoproteínas con el peptidoglucano y con la membrana externa.

Antígenos citosolubles

La fracción citoplasmática contiene DNA, RNA, la fracción ribosomal, y una gran cantidad de proteínas solubles. El empleo de anticuerpos monoclonales, las técnicas electroforéticas y de microsecuenciación aminoacídica N-terminal están permitiendo una caracterización general de los componentes proteicos citoplasmáticos de *Brucella*. Recién en los últimos años, gracias a los métodos de biología molecular, que han permitido la secuenciación del genoma de *B. melitensis* y *B. suis*, se ha logrado profundizar el conocimiento de estas proteínas. Conocidos los genes, resta aún encontrar la función de la mayoría de las proteínas codificadas.

En la actualidad ya se han clonado los genes que codifican para algunas proteínas citoplasmáticas, y se ha logrado su expresión en forma recombinante. Esto ha permitido una mayor caracterización de estas proteínas, especialmente en cuanto a la identificación de la actividad biológica. De las proteínas relacionadas con la función ribosomal se ha identificado y clonado una proteína de 24 k similar en un 48% al factor liberador ribosomal de *E. coli*; también se ha caracterizado la proteína ribosomal L7/L12. Por complementación genética y clonado molecular se han identificado proteínas involucradas en la biosíntesis y transporte de sacáridos. En cuanto al sistema del metabolismo del hierro, se ha clonado una proteína que es en un 69% similar a la bacterioferritina de *E. coli*, y también se ha demostrado la presencia de proteínas involucradas en la captación de éste. Además se hallaron y clonaron, por complementación funcional en *E. coli*, los genes de enzimas involucradas en la biosíntesis de prolina y leucina. Por otro lado, también se han obtenido en forma recombinante proteínas relacionadas con el estrés térmico, tales como la proteína Hsp60, llamada BA60K, o la DnaK. Se ha informado la presencia y el clonado de otras proteínas, como la serina proteasa, o la lumazina sintetasa, entre otras.

El poli B es un antígeno obtenido por acción del ácido tricloroacético sobre *B. melitensis* B115. Se lo ha usado para el diagnóstico en prueba de inmunodifusión radial, precipitándolo con los sueros de bovinos infectados naturalmente, pero no con el de los vacunados. Si bien su componente principal es un

Tabla 39-4. Proteínas de membrana externa de *Brucella*

Proteína (k)	Tipo/Función	Asociación al peptidoglucano	Identificación		Abundancia relativa
			Acm [1]	Gen [2]	
8	Lipoproteína	Sí	No	No	Menor
10	ND	No	Sí	Sí	Menor
16,5	Lipoproteína	No	Sí	Sí	Menor
19	ND	No	Sí	Sí	Menor
25	ND	Sí	Sí	Sí	Mayor
31	ND	Sí	Sí	Sí	Mayor [3]
36	Porina	Sí	Sí	Sí	Mayor
89	ND	No	Sí	No	Menor

ND: no definida; 1: anticuerpo monoclonal; 2: gen clonado (y en algunos casos, secuenciado); 3: *B. abortus* no expresa OMP31.

glucano cíclico b(1-2) de 17 a 24 monómeros, su antigenicidad está basada en la presencia de PSO, lo cual concuerda con la presencia de éste en el citoplasma de la cepa rugosa de la cual se lo obtiene. Los glucanos cíclicos son producidos también por otras Proteobacterias, como *Rhizobium* y *Agrobacterium*, y, por los resultados obtenidos estudiando mutantes incapaces de sintetizarlos, se los ha relacionado con la capacidad de invadir raíces y con la virulencia, respectivamente.

El NH o hapteno nativo es un producto similar al PSO cuya identidad ha sido materia de controversias. Se encontraría entremezclado con el LPS-S, sin ligarse al núcleo y fijado por uniones polisacárido-polisacárido.

CARACTERISTICAS CULTURALES

Las brucelas son aerobios estrictos. Algunas cepas requieren de un enriquecimiento de la atmósfera con un 5-10% de CO_2, el cual es utilizado como nutriente. No requieren de los factores V ni X, pero sí de biotina, tiamina y nicotinamida, elementos que se encuentran en los medios habituales de cultivo que se describen más adelante. Algunas especies y biovariedades se desarrollan mejor si el medio se enriquece con 5-10% de suero. No se desarrollan en medios selectivos con sales biliares, telurito o selenito.

El crecimiento in vitro es relativamente lento si se lo compara con otras bacterias gramnegativas, como las enterobacterias.

En medio líquido se desarrollan pobremente; las cepas en fase lisa (S) enturbian levemente el medio, produciendo un sedimento muy fino. Las cepas en fase rugosa (R) pueden formar una película en superficie, el sedimento es más granular y la turbidez, variable.

En medios sólidos no se observan colonias hasta pasados por lo menos 3 días de cultivo. En medios selectivos, el desarrollo es aún más lento, y no se deben descartar los cultivos sin crecimiento aparente hasta pasados 10 días. Observadas a trasluz, las colonias aparecen redondas, pequeñas (1-2 mm) de bordes enteros, traslúcidas y de un color miel pálido. Observadas desde arriba, su color aparece blanco marfil o perlado, y su aspecto, convexo.

No todas las especies o cepas de *Brucella* presentan la misma velocidad de crecimiento; por ejemplo, *B. canis* y las biovariedades 1 y 3 de *B. suis* se desarrollan de modo relativamente rápido, en tanto que *B. melitensis*, y en particular la cepa vacunal *B. melitensis* Rev.1, son mucho más lentas.

Observación de colonias para determinación de fase

Debido a la tendencia de *Brucella* a disociarse (cambio de fase) durante su cultivo, y a los cambios antigénicos y de virulencia que dicha variación provoca, el control de fase en los cultivos es una etapa esencial en procesos tales como (i) la elaboración de vacunas (*B. abortus* S19 y *B. melitensis* Rev.1), (ii) la producción de antígenos celulares para diagnóstico y (iii) la selección de colonias para tipificación ulterior.

Existen varios métodos para la determinación de fase, todos ellos basados en propiedades de superficie de *Brucella*. El método de Henry consiste en la observación con lupa de las colonias atravesadas por un haz de luz que incide oblicuamente (45°) por debajo. Así, las colonias lisas aparecen redondas y azul-verdosas, en tanto que las rugosas presentan un aspecto más seco, granular y de color amarillento o blanquecino. En el método de White y Wilson, las placas de Petri son inundadas por unos 10 a 15 segundos con una solución de cristal violeta. Una vez descartado el líquido, bajo la lupa, las colonias en fase lisa aparecen relativamente claras, por no captar el colorante; las rugosas, en cambio, aparecen teñidas de distintos tonos de violeta, a veces con "grietas" en su superficie. Otro método se basa en la propiedad de las células en fase rugosa de autoaglutinarse cuando las colonias son suspendidas en una solución 1:1000 de acriflavina; las células en fase lisa quedan en suspensión homogénea.

RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmunitaria anti *Brucella* ha sido estudiada desde hace largo tiempo, con una orientación definida hacia el diagnóstico. Es por ello que su conocimiento ha seguido principalmente la evolución de las técnicas serológicas. Sólo recientemente, la relación entre la respuesta inmune y los mecanismos de resistencia natural y adquirida comienzan a ser explorados. Sin embargo, el riesgo de trabajar con *Brucella*, el tiempo necesario para desarrollar la infección y la laboriosidad para el aislamiento y la numeración han limitado los estudios en estas especies. Los modelos animales, esencialmente en el ratón, están permitiendo disecar los complejos mecanismos inmunológicos implicados en la resistencia.

La respuesta del hospedador a la infección por *Brucella* es variable, dependiendo de varios factores, a saber: (i) del hospedador (idiosincrasia, edad, sexo, estado reproductivo [gestación o vacuidad], estado inmunológico [exposición previa, vacunación]) y (ii) del agente (dosis infectante, virulencia de la cepa).

Respuesta inmune humoral

En las especies domésticas, la mayoría de la información proviene, como se ha visto, de estudios realizados mediante las pruebas serológicas y alérgicas de uso corriente. Dado que cada prueba detecta de modo preferencial ciertas inmunoglobulinas, esto ha permitido el estudio de su evolución tras la infección o vacunación. La participación de los diferentes isotipos de Ac en las pruebas ha sido mejor estudiada en el bovino; aunque la respuesta de los ovinos y caprinos a la infección muestra una tendencia similar, deben tenerse en mente las diferencias entre especies y evitar extrapolaciones. La mayoría de las pruebas de uso corriente emplean bacterias enteras o antígenos enriquecidos en componentes de la membrana externa, por lo que estos ensayos detectan fundamentalmente Ac anti-LPS. En consecuencia, la cinética de anticuerpos medida con pruebas serológicas clásicas refleja la evolución temporal de la respuesta anti-LPS.

Tras un primer contacto con *Brucella* por vacunación, la serología se vuelve positiva a la primera o segunda semana, con un predominio de Ac de clase IgM durante las primeras 2 semanas. La respuesta a IgG comienza también tempranamente, antes que la IgM llegue a su pico, y puede alcanzar su máximo entre la tercera semana y el mes. En general, tras la vacunación de las hembras prepúberes sanas, los niveles de Ac declinan hasta niveles no significativos en el término de 3 a 6 meses, es decir, para el momento de su entrada en servicio. Los Ac residuales son en general de clase IgM. Esto ha permitido establecer programas de control médico-sanitario (véase más adelante) con vacunación y descarte de reactores serológicos.

Tras una exposición a cepas virulentas, la respuesta serológica se manifiesta luego de 4-10 semanas (e incluso más). Aun en condiciones experimentales, se observan variaciones importantes entre los animales. La infección crónica se caracteriza en el bovino por la síntesis prolongada de IgG1. Los niveles de Ac IgG2 pueden variar de acuerdo con el individuo, en tanto que los de Ac IgG1 sufren una disminución en el período próximo al parto, debido a la derivación suero-calostro propia de esta Ig en el vacuno. En la leche de los animales infectados pueden aparecer Ac de origen sérico (IgG1), así como de origen local (IgM e IgA).

No todas las pruebas serológicas detectan los distintos isotipos con la misma eficiencia. La tabla 39-5 presenta en forma resumida la participación de las Ig en distintas pruebas.

Como se explicó anteriormente, la respuesta detectada por las pruebas clásicas está dirigida hacia el LPS-S. Sin embargo, los individuos infectados responden a todos los componentes bacterianos. La respuesta contra algunas proteínas solubles, revelada por ELISA, parece relacionarse con el tipo de infección; las infecciones de cepas virulentas inducen Ac contra proteínas frente a las cuales no se observa respuesta tras la vacunación. Por lo general, las respuestas de Ac antiproteínas son menos vigorosas que las anti-LPS y aparecen más tardíamente que estas últimas en el transcurso de la infección. Por otra parte, mientras que los niveles de IgM anti-LPS pueden ser muy elevados, los de IgM antiproteínas son generalmente bajos. Estas características de la respuesta humoral antiproteínas deben ser tenidas en cuenta en el momento de diseñar pruebas diagnósticas basadas en antígenos proteicos. En el campo de la brucelosis humana cabe destacar que el inicio del tratamiento antibiótico en pacientes con infección muy reciente (2 semanas o menos) puede inhibir el desarrollo de anticuerpos contra proteínas citosólicas.

Respuesta inmune celular

Los microorganismos como *Brucella*, capaces de establecer una infección intracelular persistente, son potentes inductores de respuestas inmunitarias mediadas por células. Estas han sido estudiadas utilizando pruebas in vitro (blastogénesis, también llamada prueba de transformación linfocitaria) e in vivo (intradermorreacción). Los linfocitos de animales infectados reaccionan precozmente frente a *Brucella*, como se ha observado realizando pruebas de blastogénesis usando como antígenos extractos solubles ricos en proteínas. Estas respuestas son detectables incluso antes que los Ac séricos. Sin embargo, debido a la variedad de los antígenos y métodos empleados, y de las respuestas individuales, este método no ha permitido diferenciar vacunados de infectados, ni resolver el problema de las reacciones cruzadas. La respuesta in vitro de los linfocitos tampoco se ha podido correlacionar con la protección.

Los animales vacunados o infectados por cepas virulentas desarrollan una reacción de hipersensibilidad de tipo IV (mediada por células) cuando son inyectados intradérmicamente con extractos de *Brucella*. Esta respuesta evidencia un contacto previo con *Brucella* pero no está relacionada con la protección. Algunos animales infectados y serológicamente positivos no responden a la prueba intradérmica, y presenta un estado anérgico no aclarado.

Control inmune de la infección

No se conocen aún las bases de la resistencia a la brucelosis. Entre los bovinos, existirían animales (familias) cuyos fagocitos controlarían mejor la multiplicación de *Brucella* que otras. En cuanto a los mecanismos específicos, en el ratón se ha podido determinar que tanto los anticuerpos como los linfocitos T colaboran en la resistencia. Los Ac son especialmente eficaces en las primeras etapas de la infección, siendo los Ac anti-LPS-S eficaces frente a especies en fase lisa, mientras que los Ac anti-LPS-R y anti-PME lo son frente a infecciones por especies rugosas. Los Ac dirigidos contra componentes internos (proteínas citosólicas) de la bacteria no desempeñan ningún papel protector frente a la infección, ya que su antígeno blanco les resulta inaccesible mientras la bacteria está intacta.

Los linfocitos T actúan a través de la secreción de linfoquinas, activando los macrófagos, los cuales tendrían finalmente el control de la infección. Aún no está clara la participación de otros mecanismos celulares, como por ejemplo, la citotoxicidad celular. Resultados obtenidos en nuestros laboratorios han mostrado la participación de linfocitos citotóxicos $CD4^+$ y $CD8^+$ en la lisis de células infectadas por *Brucella*. Las células $CD8^+$ median esta citotoxicidad por la vía de las perforinas, mientras que las $CD4^+$ utilizan la vía Fas-FasL.

PATOGENIA

En los rumiantes, la infección se adquiere sobre todo por vía oral, nasal o conjuntival. Luego de haber atravesado las mucosas (o la piel lesionada) *Brucella* se localiza en los ganglios linfáticos regionales (retrofaríngeos, parotídeos y submaxilares entre los más frecuentes) para desde allí diseminarse hacia otros órganos linfoides, como el bazo, los ganglios ilíacos y los retromamarios. El período de incubación está relacionado con el estado fisiológico de la hembra. En la hembra no gestante, la infección permanece locali-

Tabla 39-5. Actividad de los Ac según isotipo en distintas pruebas serológicas para brucelosis

Prueba	Isotipos			
	M	G1	G2	A
SAL	+	+/-	+	-
2-Me	-	+/-	+	-
RB (a)	+ (b)	+	-	-
FC	-	+	-	-
ELISA	+ (c)	+ (c)	+ (c)	+ (c)
Antiglobulina	+ (c)	+ (c)	+ (c)	+ (c)
PAL	+	+/-	-	+

(+) activa, (+/-) poco activa, (-) inactiva.

SAL: seroaglutinación lenta en tubo (prueba de Wright); 2-Me: prueba de 2 mercaptoetanol; RB: prueba de rosa de Bengala; FC: prueba de fijación del complemento; ELISA: del inglés "enzyme-linked immunosorbent assay" (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas); PAL: prueba del anillo en leche (o "ring test").

(a) La prueba de rosa de Bengala se toma como ejemplo de prueba a antígeno acidificado. En otras pruebas similares, la participación de los isotipos no ha sido documentada.

(b) La actividad de IgM en esta prueba puede ser variable según el lote de antígeno.

(c) La detección depende de la especificidad del segundo Ac utilizado (anti-Ig total, anti-IgG1, etc.).

zada en los ganglios retromamarios. Durante la gestación, *Brucella* invade el útero en donde se multiplica masivamente. Allí provoca una endometritis con ulceración de los espacios intercotiledonarios y compromiso del alantocorion, de los cotiledones placentarios y de los líquidos fetales. Los fetos desarrollan hiperplasia linfoide, depleción tímica y neumonía hematógena. En el caso de una primoinfección, el proceso culmina de modo característico con el aborto en el último tercio de la gestación. La retención de placenta y la metritis son secuelas frecuentes. El aborto es menos observado en gestaciones subsiguientes, aunque las hembras quedan infectadas, y eliminan *Brucella* con cada parto. Los neonatos pueden infectarse vía intrauterina, origen de brucelosis "latentes". En el macho, la enfermedad se caracteriza por orquitis y/o epididimitis, y a menudo también prostatitis y seminovesiculitis. En ocasiones se producen artritis y sinovitis no supurativas.

En el cerdo, la infección por *B. suis* se caracteriza por el aborto y la esterilidad de las marranas, la orquitis en el verraco y por una elevada mortalidad en los lechones recién nacidos. La transmisión se produce principalmente por las vías oral y genital. La infección es de tipo pantrópico con una fase de bacteriemia relativamente prolongada, de alrededor de 2 meses. Se observan con frecuencia parálisis y cojeras en los machos. La gran variabilidad en la respuesta serológica complica el diagnóstico, el cual se realiza en esta especie con un criterio colectivo.

En el ovino, la infección por *B. ovis* (epididimitis contagiosa del carnero) se transmite por vía genital. En la hembra, la infección es efímera; en los raros casos de abortos, los productos de éste y la leche están contaminados. El período de incubación es variable, aunque en general los cultivos de semen son positivos a la quinta semana de infección. La lesión principal es la epididimitis con atrofia testicular, que corresponde al desarrollo de espermatoceles; la esterilidad es la principal secuela.

Además de poder infectarse con *B. melitensis*, *B. abortus* o *B. suis*, el perro y otros cánidos pueden contraer brucelosis por *B. canis*. La transmisión ocurre por vía oral y venérea, y la bacteriemia tiende a ser duradera, pudiendo llegar a los 2 años, hecho a tener en cuenta para intentar el hemocultivo. En la hembra provoca abortos tardíos (en la última quincena de la gestación) y esterilidad; en el macho provoca epididimitis y dermatitis escrotal.

Brucella se caracteriza por establecer infecciones crónicas. Esto está en relación con su capacidad para sobrevivir y multiplicarse dentro de los macrófagos. Los mecanismos de entrada a éstos no se conocen aún, aunque se piensa que podrían intervenir LPS y PME ligados a receptores del macrófago de tipo manosa e integrinas, respectivamente. La supervivencia intracelular ha sido asociada con la presencia de diferentes sustancias o estructuras de *Brucella*. Entre éstas se hallan la secreción de nucleótidos de guanina, inhibidores del metabolismo del macrófago, la secreción de catalasa y de dos superóxido-dismutasas (capaces de inhibir la producción de radicales oxidantes derivados del oxígeno), la secreción de un sideróforo (ácido 2,3 dihidroxibenzoico) quelante del Fe (catalizador de reacciones como la de Haber-Weiss, también generadora de radicales oxidantes).

Otros fenómenos que pueden relacionarse con la supervivencia intracelular son la inhibición de la fusión entre el fagosoma y los lisosomas, observada en macrófagos tras la fagocitosis y la localización en el retículo endoplásmico granular en células distintas de los fagocitos profesionales. Se sabe que el genoma de *Brucella* contiene genes *virB* homólogos a los que, en otras bacterias, codifican un sistema de secreción denominado tipo IV. Aunque en el caso de *Brucella* no se conocen los factores que podrían secretarse por ese sistema, se ha demostrado que las cepas de *B. abortus* en las que se han introducido mutaciones en genes *virB* tienen, en comparación con las cepas salvajes, una capacidad reducida o nula de establecer un nicho de replicación dentro de la célula infectada, lo cual sugiere que el sistema tipo IV secreta determinados factores que modulan el tráfico vacuolar intracelular para beneficio de la bacteria. En modelos murinos se ha atribuido la esplenomegalia y una inmunodepresión T pasajera a un particular espectro de linfoquinas presentes en etapas precoces de la infección. En estos modelos, el interferón gama, a través de la activación del macrófago, participa en el control de la multiplicación de *Brucella* en dicha célula.

ASPECTOS CLINICOS

En los rumiantes, la enfermedad pasa desapercibida, siendo el único signo clínico el aborto, el cual se produce durante el último trimestre de la gestación. Las crías pueden nacer muertas o débiles. En general hay retención de secundinas, con los signos asociados a una metritis. En los machos, suele estar afectado el tracto reproductor, con orquitis uni o bilateral, y frecuente compromiso de próstata y vesículas seminales. Pueden observarse sinovitis y artritis, en especial del miembro posterior. En los carneros infectados por *B. ovis*, el signo más saliente es la epididimitis uni o bilateral, frecuentemente palpable.

En los cerdos, además de los abortos, son frecuentes las cojeras debidas a artritis del tren posterior. La enfermedad es de rápida difusión, lo que hace que muchos animales puedan aparecer afectados al mismo tiempo.

En los perros, los abortos se presentan sin signos premonitorios, y pueden repetirse. Se observan también metritis con flujos vaginales. En los machos, orquitis, epididimitis, prostatitis. En ambos sexos, linfoadenitis y bacteriemia muy prolongada.

Cuando la *Brucella* infecta al hombre, puede provocarle una severa infección aguda, que cursa con bacteriemia. Si la enfermedad se diagnostica tempranamente y se trata en forma adecuada, tiene una evolución en general favorable. Actualmente constituye una enfermedad de baja mortalidad, sin embargo, en algunos individuos, deja secuelas discapacitantes de magnitud variable.

Entre los principales signos de la enfermedad se incluyen: fiebre, adenopatías, hepatomegalia, esplenomegalia, pérdida de peso, alteración del perfil de enzimas hepáticas, vómitos, etc. Los pacientes con frecuencia refieren síntomas tales como mialgias, artralgias, cefaleas, raquialgias, astenia, escalofríos, trastornos del sueño, depresión, etc.

En el curso de una brucelosis aguda, la infección sistémica puede presentarse de manera más pronunciada en un determinado órgano o sistema, configurando una **complicación**. Cuando un órgano está afectado sin signos de enfermedad sistémica se considera que la brucelosis está **localizada o focalizada**. Las focalizaciones son muy variadas y para algunos autores guardan relación con la vía de entrada del germen. Las localizaciones más frecuentes son: osteoarticular (20-85% de los casos), hepática (30-60%) y neurológica (2-5%).

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Métodos directos

Bacteriológico

El diagnóstico bacteriológico, a través del aislamiento de *Brucella*, es el único diagnóstico de certeza. En los animales de producción (pequeños y grandes rumiantes, cerdos) permite,

además, relativizar y comparar los resultados de pruebas serológicas de presunción. En el hombre permite evaluar la eficacia del tratamiento y confirmar el diagnóstico clínico y/o serológico.

Toma de muestras, remisión y procesamiento

Las muestras a remitir deben ser enfriadas inmediatamente luego de su extracción y, si han de ser enviadas a sitios alejados (12 horas o más de viaje), deben ser congeladas. Deben transportarse en envases estancos. Es conveniente un recipiente impermeable en el que irá envuelta la muestra, rodeado de un material absorbente y todo condicionado en un recipiente sólido apto para su transporte.

Leche: deberá obtenerse de todos los cuartos en las vacas y de cada mama en las ovejas y cabras; en total unos 20 ml.

Hisopados vaginales: el período posparto o posaborto es el ideal; se extiende a veces por 4-6 semanas.

Sangre: 10 ml, con citrato de sodio como anticoagulante. En el caso de los perros, las muestras de sangre se inyectan directamente en el frasco de medio bifásico.

Membranas fetales: especialmente cotiledones, o porciones de éstos; se eligen aquellos que macroscópicamente aparecen como más afectados. Estas muestras pueden contener un muy alto número de bacterias, por lo que deben manipularse con sumo cuidado.

Fetos: contenido estomacal, trozos de bazo, ganglios, pulmón.

Tejidos sólidos: los trozos de bazo, ganglios linfáticos, pulmón o cotiledones fetales son macerados en solución salina estéril antes de su siembra. La homogeneización de estos tejidos aumenta las probabilidades de aislamiento, respecto de la simple siembra por contacto o frotamiento entre el tejido y la superficie del medio de cultivo.

Medios de cultivo

El cultivo de *Brucella* puede tener diferentes objetivos: aislamiento e identificación, mantenimiento de cepas en laboratorio (con fines de investigación), o bien preparación en masa de células para vacunas o para antígenos de diagnóstico.

Excepto en el tercer caso, se utilizan principalmente medios sólidos; esto favorece la identificación, tiende a evitar la disociación o cambio de fase, y limita el crecimiento de otros microorganismos indeseables de rápido desarrollo.

Medios base enriquecidos

La mayoría de las cepas de *Brucella* crecen bien en medios base disponibles comercialmente, como los de tripticasa-soya, triptona-soya, Bacto-triptosa. También pueden emplearse los medios base para agar sangre. En el caso de *B. ovis* y la biovariedad 2 de *B. abortus*, debe agregarse un 2-5% de suero (equino o bovino). El agar-papa ha sido muy utilizado en el cultivo de la cepa *B. abortus* S19, para la producción de vacuna en pequeña escala.

Medios selectivos

El procesado de muestras contaminadas (hisopados vaginales, esperma, tejidos placentarios macerados, etc.) requiere el uso de medios selectivos para inhibir el desarrollo de aquellos contaminantes de crecimiento rápido que podrían dificultar el aislamiento de *Brucella*. Los medios selectivos se logran incorporando antibióticos a los medios base citados arriba. Existen varias fórmulas, como las de Kuzdas y Morse, de Farrell, y de Thayer-Martin. El medio de Farrell incluye cicloheximida, bacitracina, polimixina B, vancomicina, ácido nalidíxico y nistatina. Este medio resulta, sin embargo, inhibidor para *B. ovis*, por lo que para el aislamiento de esta especie se prefiere el medio de Thayer-Martin. Recientemente se ha recomendado la utilización del medio de Skirrow (en su origen, destinado al aislamiento de *Campylobacter*) para el aislamiento de *Brucella*.

Medios bifásicos

Son medios destinados al cultivo de muestras líquidas de gran volumen. Se caracterizan por poseer una fase sólida, la cual está en contacto con un caldo.

En brucelosis humana, el hemocultivo para búsqueda de *Brucella* se realiza en los llamados "frascos de Castañeda". En ellos, la muestra de sangre es vertida directamente en la fase líquida. Los frascos son "acostados", con lo que se inunda la superficie del medio sólido, y de inmediato vueltos a la posición vertical e incubados. Periódicamente, cada unos 5 días, se observa la superficie de la fase sólida en busca de colonias. Si no las hay, se vuelve a bañar la superficie del medio sólido y se vuelven a incubar parados. El ciclo se repite hasta la obtención de colonias o su descarte.

Las muestras líquidas de origen animal generalmente llegan contaminadas al laboratorio. En estos casos, los medios bifásicos pueden usarse haciéndolos selectivos por el agregado de antibióticos, como ya se comentara.

Aislamiento por inoculación en animales de laboratorio

En ciertas oportunidades (muestras sumamente contaminadas, indisponibilidad de medios selectivos, muestras con pequeños números de *Brucella*), la inoculación al cobayo o al ratón resulta un método de elección para aumentar las probabilidades de aislar *Brucella*. Las muestras sólidas deben hacerse líquidas por homogeneización y decantación, en tanto que las líquidas se inyectan directamente. Se recomienda inyectar al menos 2 cobayos, por vía subcutánea, con 1-2 ml de la muestra. La mitad de los cobayos se sacrifica a las 3 semanas y el resto a las 6 semanas. Durante la necropsia se buscarán lesiones macroscópicas a nivel de bazo (esplenomegalia), ganglios (adenopatías), hígado (abscesos/necrosis), testículos y epidídimos (abscesos). De los órganos afectados se intentará el aislamiento por siembra en medios enriquecidos con suero. También se obtendrán muestras de suero para realizar una prueba de aglutinación. Por lo general, la positividad de esta última es suficiente para llegar al diagnóstico de brucelosis.

En el ratón, la inoculación es por vía endovenosa (0,1-0,2 ml), y se lo sacrifica 1 semana después para extracción y siembra del bazo.

Identificación de Brucella

Todo cultivo sospechoso de ser *Brucella* debe ser controlado en pureza a fin de determinar rápidamente sus características. Para ello se han de sembrar en varios medios al mismo tiempo, con el fin de acelerar la identificación. Dichos medios pueden ser agar sangre y medio de Mac Conkey. Toda colonia hemolítica o que muestre fermentación de la lactosa en el agar Mac Conkey no es *Brucella*. Las colonias pequeñas no hemolíticas y no fermentativas se repicarán en agar glucosa con rojo fenol. Ninguna *Brucella* fermenta la glucosa (a excepción de *B. neotomae*, exótica para nuestro país). Toda *Brucella* en fase lisa se aglutina con antisueros anti*Brucella* lisa. Las brucelas rugosas lo hacen con antisueros anti*Brucella* rugosa. Estos antisueros no dan reacción cruzada con aquellos gérmenes que pudieran ser confundidos con *Brucella* (*Acinetobacter*, *Campylobacter fetus*, *Moraxella*, *Bordetella bronchiseptica*). Es posible diferenciar rápido colonias de *B. ovis* de *B. melitensis*

rugosas, ocasionalmente aisladas de ovinos, mediante una sencilla prueba de coaglutinación con Ac monoclonales.

Brucella es positiva a la prueba de la catalasa. Las pruebas IMViC son todas negativas. En general es oxidasa y ureasa positiva, y reduce los nitratos a nitritos. No coagula la leche ni licua la gelatina. Produce H_2S. *B. ovis* sale de la regla en cuanto a que es negativa a la oxidasa, la ureasa y la prueba de nitratos.

Otros métodos directos

La presencia de antígenos de *Brucella* en tejidos ha sido explorada mediante enzimoinmunoanálisis (ELISA) o aglutinación pasiva, pero su límite de detección no ha sido suficientemente bajo para su aplicación práctica. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) comienza a ser estudiada, y se ha llegado a una sensibilidad en la detección equivalente a unas 100 células de *Brucella*.

Una de las aplicaciones de la PCR es la búsqueda de *Brucella* en alimentos. Dado que todas las especies son potencialmente patógenas, una PCR que identifique sólo género es suficiente. Utilizando muestras de leche tratadas enzimáticamente y primers de regiones espaciadoras del RNA ribosómico, se obtuvo una sensibilidad de detección de $2,8 \times 10^5$ UFC/ml. Algunos de los primers ensayados han mostrado ser altamente específicos; una causa principal de resultados falsos positivos puede ser la presencia de *Ochrobactrum anthropi* bv 1, bacteria relacionada genéticamente con *Brucella*. Aunque su presencia en muestras animales es improbable, puede presentarse en las de origen humano.

Algunos ensayos de PCR han sido diseñados para la identificación de especies basada en la amplificación de secuencias de inserción (*IS*711) (por ej., AMOS-PCR, que diferencia *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* y *B. suis*). Este ensayo ha sido optimizado y permite discriminar entre cepas de campo y vacunales, elemento crítico para cualquier programa de erradicación.

Métodos indirectos

Pruebas serológicas

Aunque el diagnóstico de certeza, de especificidad absoluta, es el bacteriológico, las dificultades propias de su implementación hacen que la serología sea el recurso diagnóstico más utilizado. Las pruebas serológicas dan una evidencia de la infección brucelar, pero cuando son efectuadas en forma uniforme y se las interpreta con criterio epidemiológico, tomando en consideración todo el rodeo, constituyen el instrumento más práctico para el diagnóstico.

La semejanza antigénica, sobre todo a nivel del LPS-S, entre las vacunas y las cepas salvajes explica en parte las respuestas séricas similares provocadas en el animal por la vacunación o por una infección. Esto complica la diferenciación por serología entre los animales infectados y los sanos vacunados. Es por ello que los parámetros a considerar respecto del desempeño de una prueba serológica son la detección del mayor número posible de animales infectados (sensibilidad) y la diferenciación entre infectados y vacunados sanos (especificidad).

La mayoría de las pruebas utilizan antígenos celulares constituidos por suspensiones de *Brucella*, en fase S o R, según el caso (es decir, en fase S para infecciones por *B. abortus*, *B. melitensis* o *B. suis*, y en fase R para infecciones por *B. ovis* o *B. canis*). Estas pruebas permiten la detección de anticuerpos principalmente en el suero o la leche. Cada una de las pruebas detecta Ac de isotipo diferente. La prueba de seroaglutinación lenta en tubo de Wright, la más antigua (1897), es aún utilizada para el diagnóstico de la brucelosis animal y humana, así como para el control de reproductores en operaciones de importación y exportación. Es una prueba semicuantitativa, a pH neutro, muy sensible a Ac de clase IgM, que detecta también IgG2. Su especificidad y su sensibilidad son relativamente bajas. Una derivación suya, actualmente muy poco utilizada, la prueba de Huddleson, se realiza en placa, siendo de lectura rápida (8 minutos). Las pruebas con antígeno tamponado o acidificado (prueba de la tarjeta "card test"), la de Rosa de Bengala, la del BPA ("buffered plate antigen") son todas pruebas de aglutinación rápida en placa que emplean suspensiones de *Brucella* ajustadas a pH 3,65-3,8. En esas condiciones, son esencialmente detectados los Ac de clase IgG1. Son pruebas de elección como tamiz o criba, dada su sensibilidad, bajo costo operativo y sencillez.

La prueba de fijación de complemento aparece como la menos afectada por los Ac residuales posvacunales. En este sentido, puede considerarse como la más específica, y sigue siendo "la prueba" de referencia en brucelosis a nivel internacional. Ha demostrado una alta sensibilidad y especificidad, ya que detecta IgG1 a niveles muy bajos. Existe también un grupo de pruebas orientadas a neutralizar la actividad aglutinante de los Ac de clase IgM, que predominan tras una vacunación. Cada una de ellas actúa por un mecanismo diferente: despolimerización reductora (prueba del 2-mercaptoetanol), precipitación diferencial de globulinas (prueba del rivanol) o desnaturalización térmica (prueba de inactivación por calor). El valor de estos métodos, algunos de ellos utilizados en nuestro medio, no tiene consenso general.

La prueba de la antiglobulina (prueba de Coombs) es utilizada como prueba complementaria, sobre todo en el diagnóstico de la brucelosis humana.

La prueba del anillo en leche (PAL o ring-test) se emplea para la vigilancia de los rodeos sanos y para el diagnóstico en rodeos infectados. Sólo produce resultados satisfactorios con leche bovina. Cuando se la realiza frecuentemente en leche mezcla –leche de tanque–, permite la detección de un gran número de animales positivos y, lo que es también muy importante, con una precocidad superior respecto de las pruebas realizadas en suero. Evidentemente, esta prueba está restringida a las hembras en lactación. Puede ser también usada individualmente con el fin de identificar las vacas positivas.

Más recientemente se ha desarrollado un método para detectar Ac anti-PSO de *Brucella* por polarización de fluorescencia (FPA). Se trata de un inmunoensayo homogéneo en el cual los Ac, al unirse al Ag, cambian la velocidad de rotación de la molécula. Al incidir en ella un haz de luz fluorescente polarizada, el ángulo de difracción cambia en función del Ac unido. Este cambio es medido por un detector que lo traduce en una señal. La especificidad y la sensibilidad de la prueba son en algunos casos superiores a los del ELISA. En nuestro país el FPA, el ELISA de competición y el ELISA indirecto en suero y leche están validados para ser usados en el diagnóstico serológico de bovinos.

Para el diagnóstico serológico de infecciones por especies rugosas se han desarrollado otras pruebas. Cuando se sospecha de una infección por *B. ovis* se utiliza la inmunodifusión en gel de agar (IDGA), donde se enfrenta el suero problema con un extracto salino obtenido a partir de esta especie. Debido a la baja sensibilidad de esta técnica se ha desarrollado un ELISA que detecta Ac anti-LPS-R. Cuando se sospecha de infección por *B. canis* el diagnóstico se realiza utilizando como Ag *B. canis* cepa M^- en una prueba de microaglutinación (tamiz) y mediante un ELISA con ese mismo Ag (prueba confirmatoria).

Los ELISA basados en la respuesta anti-LPS surgen como pruebas muy prometedoras. Sin embargo, no han resuelto aún satisfactoriamente el problema de la especificidad por reacciones posvacunales y reacciones cruzadas.

Con el objetivo de desarrollar métodos más confiables para el diagnóstico de la brucelosis, distintos autores han propuesto evaluar la respuesta inmune humoral contra proteínas de *Brucella*, como una alternativa a la medición de anticuerpos anti-LPS. Una de las estrategias para lograr tal fin ha sido la inmunoadsorción de la fracción citosólica de la bacteria con un anticuerpo monoclonal anti-LPS acoplado a una matriz inerte. Esto permite retener el LPS y obtener una preparación de proteínas citoplasmáticas (CP) libre de LPS, la cual se utiliza como antígeno en ensayos de ELISA. Estos ensayos permiten diferenciar claramente brucelosis activa de inactiva, tanto en humanos como en animales, ya que sólo los individuos infectados presentan anticuerpos anti-CP.

Además de los ensayos de ELISA con fracciones proteicas complejas, se ha evaluado la posible utilidad diagnóstica de proteínas particulares, ya sea citosólicas, periplásmicas o de membrana externa. Entre las proteínas evaluadas se incluyen la lumazina sintetasa, el factor de liberación ribosomal, las proteínas de membrana externa Omp10, Omp16, Omp19, Omp25 y Omp31, la proteína periplásmica BP26 y otras. En general, los ensayos indican que ninguna proteína permite por sí sola la detección del 100% de los casos de brucelosis, lo que hace necesario usarlas en forma combinada para incrementar la sensibilidad diagnóstica. Una gran ventaja de estos antígenos, en comparación con el LPS, es que una misma proteína o fracción proteica permite la detección de infecciones por cepas lisas y rugosas, ya que por lo general las proteínas citosólicas son compartidas por las distintas especies de *Brucella*. Otra gran ventaja, especialmente explotada en años recientes, es que las proteínas pueden obtenerse como proteínas recombinantes, en gran cantidad y con alto grado de pureza, lo cual mejora la estandarización de los ensayos diagnósticos. Sin duda, la disponibilidad de los genomas de las distintas especies permitirá escoger nuevas proteínas como candidatas para ensayar su potencial diagnóstico.

Pruebas alérgicas

Los problemas de especificidad y de sensibilidad encontrados en serología llevaron a explorar el estado de hipersensibilidad inducido por la infección con *Brucella* como método diagnóstico. Entre todos los productos ensayados, la brucelina, desarrollada por el INRA, en Francia y comercializada en este país y en Nueva Zelanda, ha sido la mejor caracterizada. En los animales infectados o vacunados, la inyección intradérmica de brucelina provoca una reacción inflamatoria local de tipo retardado. No es aplicable, por lo tanto, más que en áreas de profilaxis sanitaria (sin vacunación). El interés de su uso es doble. Por una parte, debido a su especificidad elevada. Por la otra, por el hecho de que en los rodeos infectados, aproximadamente la mitad de los animales son detectados, sea por serología o por prueba alérgica, en tanto que un cuarto de los animales son detectados sólo por las pruebas serológicas o alérgicas. El empleo conjunto de ambos métodos llevaría, pues, a un aumento de la sensibilidad global del diagnóstico.

TRATAMIENTO

Debido a las características del control de la brucelosis en los rumiantes, al costo y a la dificultad para diagnosticarla con certeza y evaluar la eficacia (aislamiento del germen), el tratamiento antibiótico no se realiza en dichas especies.

En el hombre, son utilizados varios antibióticos, solos o en forma combinada, de acuerdo, esencialmente, con el tiempo y el grado de evolución de la enfermedad. El tratamiento en el hombre busca reducir la morbilidad, acortar la duración del proceso y disminuir la incidencia de complicaciones. En los casos agudos, se utiliza el cloruro de tetraciclina o la doxiciclina, y se agrega además la estreptomicina. Otra prescripción combina la trimetoprima con el sulfametoxazol. En todos los casos, se recomienda un mínimo de 3 semanas de tratamiento. En las complicaciones propias de la evolución crónica, como las osteomielitis, se pueden utilizar los mismos antibióticos, prolongando su administración (en algunos casos, por un mínimo de 6 semanas).

PROFILAXIS

La lucha contra la brucelosis está basada en dos pilares: la detección de los animales infectados y la vacunación. Las condiciones epizootiológicas particulares en cada zona van a determinar la estrategia más adecuada para el control. Los diferentes países actúan en función de la realidad sanitaria, pero de manera condicionada por el desarrollo económico.

Se pueden describir tres estrategias principales (tabla 39-6) que, sin embargo, no son mutuamente excluyentes: profilaxis sanitaria, médica o mixta. En los tres casos, la detección de los animales infectados es el denominador común. La vacunación permite limitar la difusión de la infección de la manera más económica asegurando la disminución de la prevalencia, aun cuando la eliminación de los animales no se efectúe sistemáticamente.

Las vacunas actualmente utilizadas son la cepa viva atenuada. En nuestro país sólo se utiliza la cepa *B. abortus* S19, destinada a la vacunación de bovinos; en otras partes se utiliza también la cepa *B. melitensis* Rev. 1 para la vacunación de ovinos y caprinos. Con el fin de reducir la probabilidad de reacciones serológicas posvacunales prolongadas, ambas vacunas se administran a las hembras jóvenes, preferentemente prepúberes, 1 sola vez en su vida. En esas condiciones, un 60-65% de las vaquillonas son protegidas de un desafío estándar. Estas cepas vacunales no resultan inocuas para las hembras gestantes (que pueden abortar) y para los machos (que pueden sufrir infecciones genitales crónicas).

Algunos de los métodos ensayados para reducir la duración de las reacciones posvacunales son la administración por vía conjuntival y el uso de menores dosis.

Las vacunas muertas, como la cepa *B. abortus* 45/20 (R) y *B. melitensis* H38 (S) no han hallado consenso debido (i) a las reacciones locales en el punto de inoculación por efecto del adyuvante oleoso incorporado en ambas, (ii) a la actividad re-

Tabla 39-6. Estrategias de lucha contra la brucelosis en función de la situación epizootiológica

Tipo	Objetivo	Sacrificio	Vacunación	Duración
Sanitaria	Erradicación y vigilancia	Obligatorio	Excluida	Permanente
Médica	Reducir prevalencia	Facultativo	Sí	Permanente
Mixta	Control hacia la erradicación	Sí	Sí (edad limitada)	Según prevalencia y costo/beneficio

lativamente débil y variable de la primera y (iii) a la persistente seropositividad generada por la segunda.

Más recientemente se han desarrollado dos nuevas vacunas vivas. La cepa *B. suis* 2, originada en China, ha sido preconizada como vacuna para todos los rumiantes y el cerdo. En China es administrada por vía oral, a través del agua de bebida. Sin embargo, los controles solicitados por la OMS realizados en Occidente han dado resultados muy pobres, por lo que esta cepa no es recomendada actualmente. La cepa vacunal de *B. abortus* RB51, en fase rugosa, empleada en algunos países, ha sido prohibida en Argentina.

Por otra parte, en la actualidad se presenta la necesidad de contar con nuevas vacunas seguras y eficaces. Sería preferible utilizar vacunas en subunidades, ya que éstas no entrañan riesgo de infección y su producción es estandarizable. Todas las estrategias actuales se basan en lograr una respuesta inmune protectora sin riesgos de enfermedad accidental o interferencia en el diagnóstico. En ese sentido, diversos grupos de investigación se hallan abocados al desarrollo de vacunas en cepas vivas de *Brucella* modificadas genéticamente (con deleciones en algunos genes) o bien en antígenos clonados e introducidos en otros vectores (vacunas a DNA) que permitan la diferenciación vacunado-infectado, conservando la capacidad de inducir protección.

DESCONTAMINACION

Las brucelas son termolábiles, por lo cual la pasteurización constituye un método eficaz para sanear alimentos. Por ser sensibles a la acidificación, la carne se descontamina espontáneamente durante su maduración. Para tratamiento de estercoleras se ha recomendado el xilol (1/1000) y la cianamida cálcica (20 kg/m^3) durante 2 semanas. Para tratar superficies se las puede bañar durante 1 hora con soda caústica (2-3%), formaldehído (2%) o hipoclorito de calcio (2,5%), además de fenol y amonios cuaternarios.

BIBLIOGRAFIA

Adams LG (Ed). Advances in Brucellosis Research. Texas A&M University Press, College Station, Texas. 1990.

Alausa OK, *et al*. Joint FAO/WHO expert committee on brucellosis. Sixth report. W.H.O., Geneva. 1986.

Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, Paris. 1988.

Bowden RA. Antigènes de la membrane externe de *Brucella*: étude immunochimique et évaluation de l'activité protectrice. Thèse, Université F. Rabelais, Tours. 1994.

Crespo León F. Brucelosis ovina y caprina. OIE, Paris. 1994.

García-Carrillo C. La brucelosis de los animales en América y su relación con la infección humana. O.I.E., Paris. 1987.

Garin-Bastuji B, Trap D. Brucelloses animales. Techniques de laboratoire. C.N.E.V.A., Maisons-Alfort. 1990.

Nielsen KH, Duncan JR (eds.) Animal brucellosis. C.R.C. Press, Boca Ratón. 1990.

Número especial sobre Brucelosis. Vet Microbiol 2002; 90 :1-4.

Wallach JC, Fossati CA, Baldi PC. Diez preguntas sobre brucelosis humana. En: Infectología para la práctica diaria III, pp. 225-241. Stamboulian, D. (Ed.), Ediciones FUNCEI, Buenos Aires. 1998.

World Health Organization. Brucellosis in Humans and Animals: WHO Guidance. WHO, Ginebra. 2003.

Young MD, Corbel MJ. (eds.) Brucellosis: clinical and laboratory aspects. C.R.C. Press, Inc., Boca Raton, Florida. 1990.

Capítulo 40

BACILLUS

Luis Bentancor

INTRODUCCION

El género *Bacillus* agrupa un amplio y heterogéneo grupo de bacterias de las que se describieron más de 80 especies. La biodiversidad encontrada entre ellas ha llevado a que muchas se agrupen en la actualidad constituyendo otros géneros como *Brevibacillus*, *Geobacillus* o *Paenibacillus*.

El género *Bacillus* está integrado por bacilos productores de endosporas, algunos móviles por flagelos perítricos o con capacidad de elaborar cápsula, grampositivos y aerobios, o anaerobios faculiativos. Presentan la habilidad de desarrollarse sobre una variedad de sustratos y dentro de un amplio rango de temperatura y pH, según la especie.

Todo esto, sumado a la capacidad de esporular que permite su resistencia a factores ambientales adversos, origina su amplia distribución en la naturaleza, sobre todo en el suelo y vegetales, y en el agua. Algunas especies intervienen en procesos de degradación de materia orgánica, otras elaboran compuestos con actividad antimicrobiana y algunas pocas son agentes de enfermedades en el hombre y en los animales superiores, peces e insectos. En el laboratorio se suelen aislar con frecuencia como contaminantes de las muestras clínicas.

La facilidad de cultivo y la rapidez de desarrollo permitieron la elección de este género para realizar estudios metabólicos y genéticos, determinación de secuencias cromosómicas, detección de fagos y de plásmidos, y desarrollos de ingeniería genética, manipulando alguno de estos elementos.

Muchas especies elaboran una serie de enzimas con actividad proteo o lipolítica, aplicables al ambiente en el cual se desarrollan, y otros productos metabólicos de uso industrial, como alcoholes, vitaminas y algunas sustancias antibióticas.

Algunas especies como *B. subtilis* pueden ocasionar infecciones como oportunista en un hospedador inmunocomprometido. *B. cereus* elabora enterotoxinas causantes de enfermedad transmitida por los alimentos (ETA). *B. alvei* (*Paenibacillus alvei*) y *B. thuringiensis* son patógenos para insectos y se emplean como pesticidas sobre cultivos vegetales. *B. stearothermophilus* (*Geobacillus stearothermophilus*) es una especie termófila empleada comúnmente en el laboratorio para realizar el control biológico de un proceso de esterilización.

Bacillus anthracis

Es el patógeno más importante del género descrito por Robert Koch y Luis Pasteur a mediados del siglo XIX. Los postulados de Koch, que constituyen la base de la microbiología médica, se desarrollaron a partir de sus trabajos con esta bacteria. *B. anthracis* es el responsable de una afección mortal de los animales, particularmente bovinos y ovinos, denominada carbunclo, de distribución mundial y transmisible accidentalmente al hombre.

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS

Es un bacilo recto, grande, de 1 a 3 µm por 5 a 8 µm, con extremos truncados. Es inmóvil y grampositivo.

En extendidos de sangre se pueden observar bacilos aislados o en pares rodeados por una cápsula. La cápsula está formada por una capa polimerizada de ácido poliglutámico y sólo se desarrolla en el hospedador, o in vitro, en medios con el agregado de suero, bicarbonato y anhídrido carbónico, condiciones similares a las presentes en el tejido vivo. En los medios comunes de laboratorio no se forma. Se puede demostrar la presencia de cápsula en extendidos a partir de materiales de necropsia mediante la técnica de M' Fadyean, coloreando con azul de metileno. De esta forma se evidencia un material amorfo alrededor de los bacilos, de color púrpura rosado, en correspondencia con la cápsula desintegrada.

B. anthracis forma esporas elipsoidales de ubicación central que no se detectan en el individuo infectado y se desarrollan con facilidad en contacto con el oxígeno y en los medios de cultivo. La esporulación se produce al final de la fase de crecimiento exponencial y el protoplasma residual del bacilo se desintegra una vez que las esporas están completamente formadas.

CARACTERISTICAS FISIOLOGICAS

Es una bacteria aerobia y anaerobia facultativa. No es exigente y se desarrolla en medios de cultivo simples entre las 24 y las 36 horas a 37°C, con un límite de temperatura entre los 12 y los 44 °C.

En medios sólidos forma colonias grandes, elevadas, granulosas, con bordes irregulares, blanco-grisáceas de 2 a 3 mm de diámetro. Observadas con lupa o microscopio de bajo aumento, muestran el aspecto característico, con filamentos, semejante a una "cabellera de medusa". Estas colonias de apariencia rugosa (R) corresponden a cepas virulentas. En los extendidos realizados a partir de ellas se pueden observar largas cadenas de bacilos, con esporas centrales no deformantes parecidas las de una "caña de bambú". Con posteriores subcultivos in vitro se pueden transformar en variantes lisas (S), más pequeñas y con menor virulencia. En los medios con bicarbonato, suero y CO_2, con el desarrollo de la cápsula, las colonias son mucoides (M) y blanquecinas.

En agar sangre no produce hemólisis, lo cual es una característica diferencial con otras especies de *Bacillus*.

En los medios líquidos produce turbidez con flóculos finos y sedimento en el fondo. Suele desarrollar película que flocula rápidamente.

En tubos de gelatina sembrados por punción crece desde la superficie hacia el fondo semejando un pino invertido, y no la licua, o lo hace en forma muy lenta.

Produce catalasa y fermenta varios hidratos de carbono con producción de ácido. La identificación bioquímica rara vez resulta necesaria para el diagnóstico.

Los medios de cultivo con el agregado de 0,5 UI /ml de penicilina inducen la transformación de los bacilos en estruc-

turas esféricas, redondeadas, similares a un "collar de perlas". Esto también se puede lograr colocando un disco con 10 UI de penicilina G sobre la superficie de una placa con agar Müeller Hinton sembrada con el bacilo. Luego de 3 horas de incubación a 37 °C se puede detectar esta característica.

Presenta sensibilidad a un bacteriófago específico denominado fago gamma.

RESISTENCIA

Las formas vegetativas poseen la resistencia común a los bacilos no esporulados. Su punto térmico letal es de 60 °C en 30 minutos.

En los cadáveres de individuos infectados que permanecen entre 25 y 30 °C, sin que el interior tome contacto con el oxígeno ambiental, no tiene oportunidad de esporular y difícilmente se lo pueda aislar luego de 4 a 5 días en estas condiciones. Aquí, además, se establece una competencia con otros microorganismos implicados en el proceso de putrefacción, como clostridios, enterobacterias, o con *Pseudomonas*, cuyas bacteriocinas actúan rápidamente sobre muchas cepas de *B. anthracis*. En cambio, si los cadáveres permanecen a temperaturas entre 5 y 10 °C, se puede recuperar hasta después de 1 mes, aun cuando no haya esporulado.

En contacto con el oxígeno esporula fácilmente dentro de los 60 minutos y resulta altamente resistente a los agentes ambientales, como calor, radiaciones, presiones y compuestos químicos. Puede sobrevivir durante largos períodos contaminando el suelo.

PATOGENIA

Las esporas ingresan al hospedador a través de heridas, picaduras de insectos, por ingestión o por inhalación. Los macrófagos pueden transportarlas a los ganglios linfáticos satélites de la zona de entrada, pero no son bacterias de vida intracelular. En los tejidos germinan y se multiplican, expresando sus factores de virulencia sobre el hospedador. Si éste muere o los bacilos se eliminan al exterior, esporulan y el microorganismo se disemina otra vez en el ambiente.

En los animales, la infección se produce generalmente por la ingestión de las esporas.

En el hombre, según la vía de ingreso del microorganismo, se producen diferentes formas de la enfermedad, con distinta gravedad y pronóstico. La forma más frecuente es el carbunclo cutáneo por la infección accidental a través de picaduras o pequeñas heridas, por lo general en la cara o en los brazos. Raramente las esporas ingresan por inhalación y se introducen a través del endotelio pulmonar directamente en el torrente sanguíneo, lo cual resulta en una afección que suele ser mortal. También pueden ingresar por vía digestiva, con la ingestión de alimentos contaminados, y en casos excepcionales se ha descrito una meningitis carbunclosa, posterior a una septicemia, de pronóstico fatal.

Factores de virulencia

La patogenicidad de *B. anthracis* depende principalmente de dos factores de virulencia: la cápsula y la toxina. Se ha estudiado la importancia de otros elementos presentes, englobados dentro del concepto de estructuras de superficie (SAP: *surface array proteins*).

La superficie del esporo provee la primera interacción entre el microorganismo y la célula blanco. En algunas especies de *Bacillus* y de *Clostridium* se ha observado por fuera del exosporio una estructura de glicoproteínas con prolongaciones filamentosas en su superficie, que se supone contribuye a la unión con los receptores celulares. En *B. anthracis*, esta capa no presenta la organización descrita, es laxa y su importancia radicaría en el hecho de actuar simplemente como una barrera de protección frente a las enzimas celulares del hospedador.

Además de la membrana citoplasmática y de las capas de peptidoglucano presentes en todas las bacterias grampositivas, *B. anthracis* presenta otros dos tipos de estructuras: la cápsula y las proteínas de superficie (SAP y EA1).

La cápsula se considera uno de sus mayores factores de virulencia. Contribuye a que la bacteria evada las defensas del hospedador evitando la fagocitosis y produciendo una septicemia. Es una estructura delgada, no antigénica, compuesta por un polímero de ácido d-glutámico cuyas cadenas presentan un PM entre 20 y 55 k in vitro y se estima que 215 k in vivo. A pesar de que la cápsula de naturaleza peptídica no es común en las bacterias, otras especies como *B. subtilis*, *B. megaterium* y *B. licheniformis* sintetizan polímeros de ácido glutámico que pueden formar una cápsula o ser secretados al medio. En *B. anthracis* sólo se organiza como material capsular lo cual permite la adhesión a los macrófagos por un mecanismo aún desconocido.

La cápsula de *B. anthracis* está codificada por los genes *capB*, *capC* y *capA*, presentes en el locus cap de un plásmido pXO2. Estos tres genes codifican para las enzimas, asociadas a la membrana, que intervienen en los diversos pasos de la síntesis del polímero de ácido glutámico. Los tres genes son suficientes para inducir la síntesis de ácido d-glutámico, si se insertan en el cromosoma de *E. coli*. Un cuarto gen presente en el locus cap, denominado *dep*, está asociado a la despolimerización, en correspondencia con control del tamaño de la cápsula.

Aun cuando *B. anthracis* expresa la cápsula, se evidencian proteínas de superficie (S-layer) sobre el exterior de la pared celular. Estas no son necesarias para la normal producción de la cápsula, pero pueden modificar su fina estructura. Son estructuras proteicas dispuestas como láminas, que cubren al peptidoglucano y se suman a la actividad capsular, incrementando la resistencia a las defensas del hospedador.

Sobre la superficie de *B. anthracis* se encuentran dos proteínas denominadas Sap y EA1, codificadas respectivamente por los genes *sap* y *eag*. En las cepas capsuladas se pueden encontrar una o ambas proteínas. La ubicación de ambos genes en forma consecutiva en el cromosoma bacteriano permite la expresión de éstas en forma simultánea, o de una, si la otra no ha sintetizado, y muestra una regulación de tipo interruptor para la expresión de ambas.

In vivo, EA1 y Sap constituyen los mayores antígenos de superficie. Existen por lo menos unas 18 regiones que codifican para estas proteínas, de las cuales 15 se encontraron en el cromosoma, 2 en el plásmido pXO1 y 1 en el pXO2. En otras bacterias grampositivas se han encontrado regiones con secuencias similares, lo que confirmaría su función en tal mecanismo de unión con las células que parasitan.

Toxinas

La toxina de *B. anthracis* desempeña un papel clave en la patogénesis del carbunclo. Está constituida por tres fracciones proteicas secretadas separadamente al medio. De acuerdo con su actividad in vivo, se denominan:

antígeno protector (PA)
factor letal (LF)
factor edema (EF)

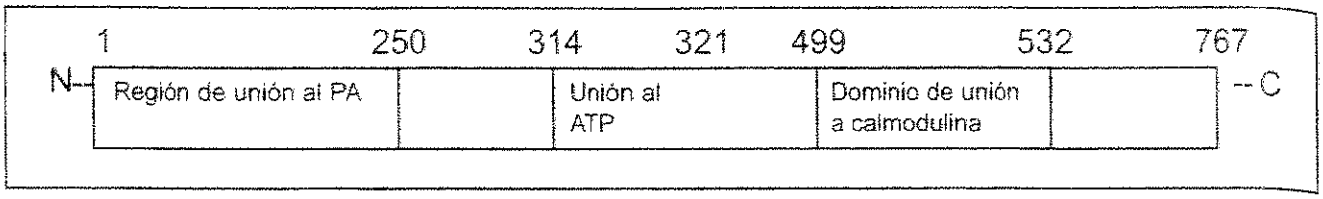


Figura 40-1. Esquema estructural del factor edema (EF).

Estas tres fracciones no presentan acción tóxica si se inoculan por separado, y su asociación de a dos conduce a la formación de un complejo denominado toxina binaria (tipo A-B)

En los animales de experimentación, ratón o cobayo, la inoculación de PA junto con LF (LeTx, toxina letal) por vía endovenosa produce la muerte y la inoculación de PA junto con EF (EdTx, toxina edemática) por vía intradérmica produce edema en la piel.

La acción de las toxinas implica un reconocimiento de las células blanco mediado por el PA, seguido de la endocitosis y el pasaje de EF y de LF al citoplasma.

El PA proporciona el sitio de unión a los receptores celulares y posee la capacidad de interactuar con dos diferentes sistemas enzimáticos, EF y LF, que desencadenan el daño celular.

El PA es una proteína de 735 aminoácidos (aa) que presenta varios dominios funcionales en su interior. La región C terminal del PA es la responsable de la unión al receptor de membrana de la célula. La unión PA-receptor es seguida de una proteólisis limitada de la molécula, con la posterior liberación de un fragmento, PA 20. La porción C terminal restante, denominada PA 63, queda asociada al receptor de membrana de la célula eucariota.

El PA 63 presenta una fuerte afinidad por EF y por LF, a los que se une. Esta unión es seguida por la endocitosis mediada por el receptor celular con la internalización de ambas fracciones al citoplasma de la célula blanco.

El clivaje del PA en PA 63 es fundamental para expresar la actividad de EF y de LF, y se produce por la acción de una proteasa de la membrana de la célula blanco, entre los aa Arg 167 y Ser 168. Esto se demuestra por la ausencia total de toxicidad en las cepas que han sufrido deleción de estos residuos.

El EF es una enzima que presenta actividad de adenilciclasa, acción dependiente de la proteína eucariota calmodulina. Llega al interior celular seguido de la unión al fragmento PA 63. La actividad de adenilciclasa conduce al aumento del AMPc intracelular y a una actividad descontrolada de las quinasas dependientes de éste, lo cual desencadena el cuadro de edema tisular. En el EF se identifica una región N terminal de 250 aa implicada en la unión con PA 63, que presenta homología estructural con la región del LF codificante para idéntica función. Entre los aa 314 y 321 se sitúa una región de unión al ATP y finalmente el dominio de unión a calmodulina entre los aa 449 y 532. La actividad de adenilciclasa es dependiente de la presencia de iones Ca y de calmodulina (fig. 40-1).

Esta estructura está presente en las toxinas de otros microorganismos y las secuencias genómicas que los codifican se encuentran altamente conservadas. EF puede interactuar con lípidos sin dependencia del pH y, en contraste con LF, permanece asociado a vesículas de la membrana celular luego del pasaje al citosol. Probablemente EF sea semejante a las adenilciclasas asociadas a la membrana presentes en las células eucariotas.

El LF es el responsable de los síntomas de shock séptico que se producen en la infección sistémica. Los macrófagos parecen ser su blanco y la actividad intracelular de este factor conduce al aumento y a la actividad descontrolada de algunas citoquinas de alarma, como las interleuquinas 1 y 8 y el TNFα (*tumor necrotic factor*).

Es una enzima de 776 aa identificada como una metaloproteasa de cinc. En su extremo C terminal posee una secuencia conservada (-His-Glu-X-X-His-) similar a la presente en las secuencias codificantes de las neurotoxinas tetánica y botulínica. La región N terminal está implicada en la unión al PA 63 y la C terminal, catalítica, presenta actividad de metaloproteasa. Entre los aa 293 y 376 se encuentra una región con varias secuencias repetitivas de 7 aa (fig. 40-2).

A la unión de EF o de LF al PA 63 le sigue la endocitosis del complejo, que desencadena las lesiones descritas.

El receptor para PA es de naturaleza proteica y se encuentra en muchos tipos de células eucariotas, pero aún no se ha identificado completamente. In vitro, las células CHO resultan sensibles a EF. Por el contrario, las fracciones EF y LF son activas sólo sobre algunas líneas de macrófagos. Estos se lisan luego de 2 horas de incubación con LeTx.

Control genético de la síntesis de los factores de virulencia

La cápsula y las toxinas se producen durante la multiplicación de las formas vegetativas en el hospedador.

Los genes que codifican la expresión de los principales factores de virulencia de *B. anthracis* se encuentran determinados en dos grandes plásmidos, denominados pXO1 y pXO2 (para toxina y cápsula respectivamente) cuya secuencia de DNA se conoce por completo. El contenido de GC (33%) de estos plásmidos es similar al del cromosoma de *B. anthracis*.

El plásmido pXO1 contiene los genes codificantes *pagA*, *lef* y *cya*, que codifican para la expresión de la toxina (para PA, LF y EF respectivamente) y posee también regiones codificantes para

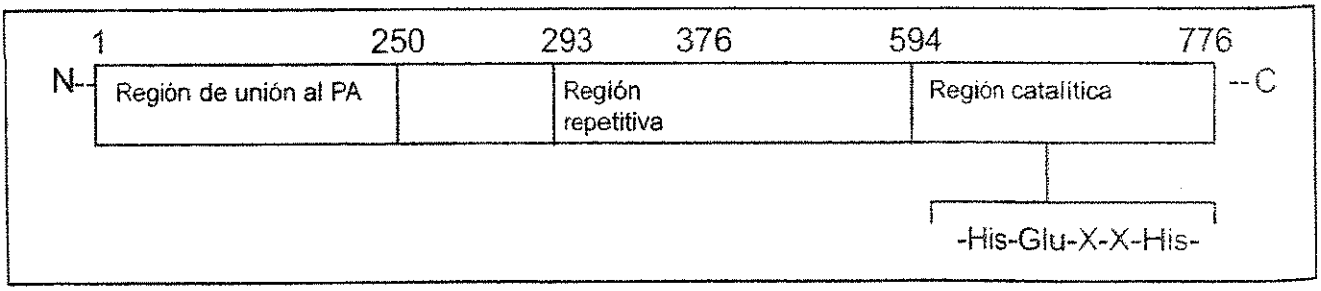


Figura 40-2. Esquema estructural del factor letal (LF).

proteínas regulatorias y para el gen *gerX*, que tiene actividad de operón en el proceso de germinación. Todos estos genes se han secuenciado y clonado, y se ubican en un locus en correspondencia con una isla de patogenicidad. Este locus presenta la capacidad de invertir el orden de su secuencia, como se ha demostrado en algunas cepas. Este plásmido también codifica los genes correspondientes a la síntesis de una topoisomerasa y de un segmento involucrado en su transferencia horizontal.

El plásmido pXO2 transporta en el locus cap los genes *capB*, *capC*, *capA* y *dep* que codifican para la síntesis y degradación de la cápsula y el gen *acpA*, para proteínas con actividad regulatoria. Este plásmido se ha secuenciado a partir de una cepa Pasteur, pero se conoce poco acerca de sus funciones específicas.

In vitro, la síntesis de cápsula y de toxinas se induce por la adición de bicarbonato y resulta dependiente de la temperatura. Estos factores los proporcionan in vivo los mamíferos hospedadores. A nivel de transcripción, la expresión de los genes codificantes de toxinas se encuentra regulada por el bicarbonato y la temperatura, y la expresión de la cápsula, sólo por el bicarbonato. La temperatura se requiere como elemento para la función enzimática y no como regulardor genético.

El plásmido pXO1 posee el regulón atxA donde se encuentra la proteína regulatoria AtxA, responsable de la transcripción del gen *pagA* y de estimular la expresión del gen *capB*, codificante para la cápsula, presente en pXO2. Tanto in vivo como in vitro la expresión de AtxA no depende de la presencia de bicarbonato.

El plásmido pXO2 codifica un activador transcripcional de capB, denominado AcpA, regulatorio de la síntesis de cápsula, dependiente de la existencia de bicarbonato en el medio. No se requiere la presencia de este regulador AcpA para que AtxA actúe estimulando la expresión de *capB*.

Mucho antes del descubrimiento de estos mecanismos genéticos, la atenuación de la virulencia de las cepas de *B. anthracis* con el objeto de elaborar inmunógenos llevó a su eliminación en forma empírica. Las variantes obtenidas por Pasteur por incubación a 42 °C o más tarde con el empleo de antibióticos se corresponden con la pérdida de uno o ambos plásmidos. Las cepas carentes de ellos se denominan "curadas" de los plásmidos.

La pérdida de pXO1 puede ocurrir en condiciones desfavorables para el ciclo bacteriano. Las cepas curadas de este plásmido esporulan con mayor facilidad y frecuencia, crecen pobremente en medios mínimos y resultan más sensibles a la acción de algunos bacteriófagos. Se han encontrado varios fenotipos relacionados con la presencia de este plásmido, además de la producción de toxina.

El pXO2 se pierde con mayor frecuencia y se pueden encontrar cepas pXO2- en aislamientos ambientales. El único fenotipo asociado con este plásmido es la formación de cápsula, aunque con bastante frecuencia se encuentran mutantes que no capsulan y que son pXO2+, probablemente por la pérdida de algún gen. Se cree que este plásmido puede estar asociado con la diferente virulencia encontrada entre cepas salvajes.

La cepa Sterne de *B. anthracis* contiene el plásmido pXO1. La virulencia residual de la cepa Sterne se debe a la producción de toxina y la infección experimental con altas dosis de ella provoca dos síntomas característicos: edema y muerte por shock. Las cepas mutantes derivadas de la Sterne se han empleado para identificar diferentes estadios de la toxicidad sobre las células. La deleción de genes o las mutaciones puntuales con destrucción de la actividad de EF y LF son suficientes para impedir el edema o la muerte, respectivamente, en animales de laboratorio. Las cepas EF- y LF- son menos efectivas para producir edema y muerte que las poblaciones originales. Estas propiedades evidencian el sinergismo existente in vivo entre EdTx y LeTx, lo cual sugiere que ambas toxinas pueden actuar en conjunto en el hospedador. Las mutantes con deleción en el sitio de clivaje del PA no son patógenas.

A pesar de que los macrófagos parecen ser elementos clave en el shock inducido por toxina, los mecanismos moleculares y los eventos que suceden en relación con la muerte por carbunclo no están totalmente aclarados y generan controversias.

DIAGNOSTICO

Bacteriológico

La identificación del microorganismo incluye la demostración de bacilos grampositivos capsulados en extendidos de sangre o tejidos, y el desarrollo en medios de cultivo simples, la ausencia de hemólisis sobre agar sangre, las características de las colonias y la ausencia de movilidad. La prueba del collar de perlas y la sensibilidad al fago gamma completan la identificación.

Mediante una técnica de PCR se puede confirmar la presencia de los genes codificantes para la toxina y para la cápsula.

Serológico

Se han descrito pruebas de inmunofluorescencia, inmunodifusión, ELISA y aglutinación, pero la metodología de aplicación y validez internacional es la de Ascoli-Valente.

Consiste en una prueba de termoprecipitación en medio líquido para detectar *B. anthracis* como antígeno a partir de un tejido. La muestra procedente del individuo sospechoso se coloca en solución salina y se calienta en baño de agua, a 100 °C durante 5 minutos. Se filtra por una gasa. Se enfrenta en un tubo de ensayo con un suero inmune, conocido, que posee anticuerpos capaces de formar un precipitado al unirse con el antígeno específico. La aparición de un anillo blanco en la zona de interfase en un lapso de 15 minutos demuestra la unión antígeno-anticuerpo y entonces se considera que la reacción es positiva.

El ácido glutámico de la cápsula y el polipéptido del citoplasma serían los antígenos presentes en los tejidos, responsables de la reacción. Pueden producirse reacciones positivas débiles frente a otras especies de *Bacillus* similares (*B. subtilis* o *B. cereus*).

Experimental

Si bien en la actualidad existen metodologías de diagnóstico normalizadas internacionalmente y no se aconseja el empleo de animales de laboratorio en forma indiscriminada, en escasas situaciones la inoculación en cobayos o en ratones reproduce de manera perfecta la enfermedad y permite fácilmente el aislamiento del microorganismo (postulados de Koch).

Se pueden inocular ratones o cobayos por vía subcutánea. Los ratones mueren entre las 12 y las 24 horas, y los cobayos en no más de 72 horas, según la virulencia de la cepa inoculada. Las muertes producidas antes de las 24 horas y luego de los 5 días no constituyen una característica específica en esta especie animal.

La muerte se produce por falla respiratoria y se presenta un exudado sanguinolento por las aberturas naturales. La sangre se encuentra sin coagular.

En la necropsia se puede detectar un edema gelatinoso subcutáneo generalizado, sin hemorragias. A partir de las improntas de bazo y de hígado se puede observar una abundante cantidad de bacilos capsulados y sin esporas.

La dosis letal de cepas con alta virulencia para el ratón es de 5 esporas; para el cobayo, de 50 esporas; para la rata, de 1.000.000 (se la considera muy poco sensible a este germen) y para el perro

es mayor de 10.000.000 de esporas. La cepa Sterne requiere entre 1 y 10 millones de esporas como DL para el ratón.

PREVENCION

El carbunclo fue la primera enfermedad sobre la que se aplicó el principio de una vacunación eficaz. En la experiencia de campo de Pouilly Le Fort, en 1881, la cepa de *B. anthracis* obtenida por Pasteur resultó ser la primera vacuna viva aplicada satisfactoriamente.

De las experiencias de Pasteur, quien cultivó este microorganismo a 42 °C para disminuir su virulencia, se obtuvieron 4 tipos de cepas conocidas como Pasteur 1, 2, 3 y 4, de menor a mayor virulencia de acuerdo con el número y el tipo de animales que mataban.

Con las cepas Pasteur 1 y 2 se obtuvieron las primeras vacunas. En 1920, José Lignieres las introdujo en Argentina con un plan de vacunación consistente en una primera dosis con la cepa Pasteur 1 y una segunda con la cepa Pasteur 2.

A partir de allí se emplearon vacunas con cepas derivadas del tipo virulento Pasteur 2. Estas resultaron poco estables por el riesgo de revertir a estados de mayor virulencia y provocar así innumerables accidentes vacunales, sobre todo en animales jóvenes o en hembras preñadas.

A partir de 1950, Max Sterne, en Sudáfrica, trabajó con una variante de *B. anthracis* cultivada con suero y altas concentraciones de CO_2, productora de colonias mucoides que dieron origen luego a formas R avirulentas.

La variante acapsulada conocida como cepa Sterne conserva su poder inmunógeno y mediante estudios moleculares se ha determinado que conserva el plásmido codificante para la toxina, pero ha perdido el que media la formación de cápsula (pXO2-). La cepa Sterne ha demostrado ser estable y no revertir en su patogenicidad, por lo que se la considera avirulenta y de elección para ser manipulada en el laboratorio. En nuestro país, para la elaboración de las vacunas según recomendaciones de la OIE, se emplean las cepas Sterne 34 F2 y CN 3472. Estas vacunas se presentan como una suspensión de esporas en glicerina al 50% y con 0,05% de saponina como adyuvante, para ser administradas por vía subcutánea o intradérmica.

Las vacunas de Pasteur y sus modificaciones fueron durante unos ochenta años los métodos más eficaces aplicados para el control hasta la obtención de la vacuna con cepa Sterne, viva, considerada en la actualidad el agente inmunógeno más eficiente para prevenir el carbunclo en los animales.

El empleo de toxina detoxificada, toxoide, ha demostrado ser muy eficaz como inmunógeno en humanos. En animales presenta una menor eficacia que las vacunas con cepas vivas. Su elaboración requiere el empleo de medios de cultivo especiales y una compleja tecnología y bioseguridad. Este tipo de vacunas "acelulares" está reservado por el momento para administración en el hombre.

A nivel experimental, se ha logrado la transferencia del plásmido pX01 mediante ingeniería genética a otras bacterias de menor riesgo, como *E. coli*, con el objeto de producir fácilmente cantidades elevadas de toxina para su transformación en toxoide vacunante.

TRATAMIENTO

B. anthracis es naturalmente sensible a penicilina y la aparición de cepas de campo que presentan resistencia es escasa. La mayoría de las cepas descritas como resistentes a este antibiótico son variantes de laboratorio derivadas de manipulaciones genéticas.

En los animales afectados, la posibilidad de instaurar un tratamiento antibiótico depende del curso de la afección y de la rapidez del diagnóstico.

En los casos esporádicos que aparecen en un rodeo en forma "de goteo" se puede intentar con éxito el tratamiento de los animales sanos o con una sintomatología emergente, continuando luego el procedimiento con un refuerzo vacunal.

En el humano se emplea como tratamiento penicilina G (1.000.000 UI/día) por vía intramuscular durante 5 días. Se puede remplazar por tetraciclina o eritromicina en situaciones de alergia a dichos medicamentos.

Los cadáveres de los animales infectados no se deben abrir para evitar la esporulación del microorganismo. Se deben destruir por incineración o con compuestos cáusticos, como cal viva, y se debe tratar de dejarlos cubiertos de tierra. Es obligatoria la desinfección de todas las instalaciones y los elementos que tuvieron contacto con los individuos infectados.

Bacillus cereus

Es un bacilo con esporas subterminales, móvil por flagelos de ubicación perítrica, grampositivo, aerobio y anaerobio facultativo, no exigente, productor de catalasa. Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y se puede aislar como patógeno oportunista de infecciones genitales y articulares, y como agente primario en toxinfecciones alimentarias (ETA).

Esta toxinfección se produce en el hombre y sucede por la ingestión de alimentos cocidos y mantenidos a temperatura ambiente, en los cuales las esporas sobrevivientes a la cocción germinan y las formas vegetativas elaboran las toxinas que liberan al medio. Se puede presentar como un cuadro entérico o como un cuadro emético.

B. cereus produce fosfolipasas que provocan la liberación de enzimas de los lisosomas de los neutrófilos e impiden la fagocitosis, hemolisinas detectables in vitro y proteasas que degradan el tejido colágeno. Pero las toxinas vinculadas con las toxinfecciones son las enterotoxinas y la toxina emética.

Las enterotoxinas elaboradas por *B. cereus* aumentan la permeabilidad capilar y poseen efecto citotóxico sobre el epitelio intestinal, lo cual provoca un cuadro de enteritis con diarrea. La toxina responsable del cuadro emético es termoestable, resiste la acción de la tripsina y otras enzimas digestivas, y es probable que se produzca durante el proceso de esporulación.

El diagnóstico se realiza por el aislamiento del microorganismo y/o la detección de sus toxinas, según el tipo de afección

Bacillus subtilis

Es un bacilo esporulado, móvil, que puede presentar una cápsula de polímeros de ácido glutámico, grampositivo, aerobio y anaerobio facultativo, no exigente. Es una bacteria ambiental que puede actuar como patógeno oportunista produciendo infecciones en los animales y también intoxicaciones en el hombre. Se ha aislado de septicemias, mastitis y abortos en ovinos y bovinos.

De este microorganismo se obtuvo originariamente el antibiótico bacitracina.

OTRAS ESPECIES DE *Bacillus*

Dentro de este género existe una variedad de especies que pueden ser patógenos oportunistas en animales superiores o afectar insectos. Comparten la mayoría de las características morfofisiológicas descritas para los *Bacillus* y algunos pueden

confundirse con *B. anthracis*, de donde surge la importancia de un correcto diagnóstico diferencial.

B. licheniformis también es un patógeno accidental en infecciones del hombre y los animales. Junto con *B. megaterium* y *B. subtilis* pueden sintetizar cápsula de polímeros de ácido glutámico.

B. thurigensis y *B. fusiformis* son patógenos para el estado larvario de una variedad de insectos. En la actualidad se emplean como pesticidas, en el control de plagas (mosquitos, coleópteros, langostas y mariposas).

B. cereus, *B. subtilis*, *B. mycoides* (que puede presentar cepas inmóviles) y *B. thurigensis* poseen una morfología similar a *B. anthracis*, con esporas centrales o subterminales no deformantes, y se encuentran antigénicamente relacionados entre sí, por lo que pueden producir resultados positivos en pruebas serológicas como la de Ascoli-Valente.

OTROS GENEROS

La taxonomía actual ha incluido en géneros separados algunas especies que anteriormente se consideraban dentro de *Bacillus*.

El género ***Paenibacillus*** agrupa agentes que se encuentran sobre todo en el suelo y son patógenos de insectos.

Su temperatura óptima de desarrollo es de entre 20 y 30 °C. Las esporas deforman el soma de los bacilos. Durante el proceso de esporulación producen inclusiones cristalinas denominadas cuerpo parasporal, que son protoxinas con actividad sobre larvas de insectos. Los bacilos penetran por vía oral, y por acción de las enzimas digestivas el cuerpo parasporal se separa de la espora y se transforma en toxina. La toxina posee una actividad principal de adenilciclasa, que altera la permeabilidad intestinal y provoca la muerte de las larvas.

Se ubican dentro de este grupo *P. alvei* (*B. alvei*), *P. larvae* (*B. larvae*), *P. coagulans* (*B. coagulans*) y *P. apiarius* (*B. apiarius*). En el cromosoma de estos bacilos se han identificado los genes *cry*, codificantes de las toxinas citadas. Estos genes se han clonado para sintetizar toxinas empleadas como pesticidas en agricultura.

Otro integrante de este género es *P. polymyxa* (*B. polymyxa*), del cual se aislaron cepas productoras de polimixina o de bacitracina.

B. stearothermophilus se incluye actualmente dentro del género ***Geobacillus***, que agrupa especies residentes en el suelo y termófilas.

BIBLIOGRAFIA

Brossier F, Levy M, Mock M. Anthrax spores makes an essential contribution to vaccine efficacy. Infect Immun. 2002; 70, (2): 661- 664.

Girard F. *B. anthracis*, agent causal de l'anthrax. L' Opéron 2001; 6 (19):11-02.

Logan N, Turnbull P. *Bacillus* and recently derived genera. In: Murray P, Baron E, Pfaler F, Tenover F, Yolken R (éd.): Manual of clinical microbiology, 7th edition, ASM Press, Washington, D.C. 357-369, 1999.

Mock M, Fouet A. Anthrax. Annu. Rev Microbiol. 2001; 55 (1): 647-671.

Mock M, Roques B. Progress in rapid screening of *B. anthracis* lethal factor activity. Proc Natl Acad Sci (USA). 2002; 99: 6527- 6529.

Nguyen-The C, Carlin F. Guinebretiere M. *Bacillus cereus* et securité des aliments. Bull Soc Fr Microbiol. 2003; 18: 104-112.

Oficina Internacional de Epizootias. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. OIE Listed Disease. List B, Part 2, Section 2.2, Cap 2.2.1 Organización Mundial de Sanidad Animal. http// www.oie.org 2000.

Pettersson B, Rippere K, Yousten A, Priest F. Transfer of *Bacillus lentimorbus* and *Bacillus popilliae* to the genus *Paenibacillus* with emended descriptions of *Paenibacillus lentimorbus* comb. nov. and *Paenibacillus popilliae* comb. nov. Int J Syst Bacteriol. 1999; 49: 531-540.

Sewell D. Laboratory safety practices associated with potential agents of biocrime or bioterrorism. J Clin Microbiol. 2003; 41 (7): 2801-2809.

Slamte L, Gohar M, Lereclus D. Expression des gènes de virulence chez *Bacillus cereus*, le régulon PlcR. Bull. Soc. Fr. Microbiol. 2003; 18: 123-128.

Capítulo 41

MICOBACTERIAS

Isabel N. de Kantor

INTRODUCCION

Tres micobacterias tienen fundamental importancia en salud animal: *Mycobacterium bovis*, cuyo hospedador primario es el ganado bovino; *M. avium (M. avium* subsp. *avium)*, causante de tuberculosis en aves, y patógena para ciertos mamíferos; y *M. johnei (M. avium* subsp. *paratuberculosis*), agente etiológico de la paratuberculosis.

La tuberculosis bovina y aviar son consideradas zoonosis. Existen algunas evidencias para incluir también la paratuberculosis entre las zoonosis. La lepra, debida al *M. leprae* (que aún no ha podido cultivarse in vitro), afecta al hombre; la enfermedad se ha podido reproducir experimentalmente en armadillos y en primates no humanos. Las denominadas micobacterias "atípicas" o "no tuberculosas", diferentes de *M. tuberculosis* o *M. bovis,* pueden ser causa de enfermedad humana, generalmente asociadas a inmunodepresiones.

Tanto la tuberculosis, la paratuberculosis, como la lepra, son enfermedades crónicas con un prolongado período de infección asintomática. La vía de transmisión aerógena es la más usual en la tuberculosis humana y bovina, y la localización inicial más común ocurre en el pulmón (complejo primario). La paratuberculosis se transmite en rumiantes predominantemente a través de la leche; las lesiones son intestinales y la enfermedad se manifiesta como una diarrea crónica emaciante.

Tanto la tuberculosis bovina como la paratuberculosis originan importantes pérdidas en la producción de proteínas de origen animal (leche y carne). Además, la primera ha tenido y continúa teniendo en ciertas regiones y países, considerable impacto sobre la sanidad animal.

EPIDEMIOLOGIA

En este capítulo describiremos únicamente la tuberculosis bovina, por tratarse de la micobacteriosis de mayor importancia veterinaria. Si bien era conocida desde mucho antes, sus efectos sobre la producción animal y la salud pública se hicieron evidentes a fines del siglo XIX y principios del XX con el desarrollo de la industria ganadera en Europa y América. En la tercera década del siglo XX, cerca del 40% de los bovinos sacrificados en mataderos de Gran Bretaña presentaban lesiones tuberculosas en la inspección postmortem. En esa época, *M. bovis* era el agente causal de cerca del 25% de todos los casos de tuberculosis humana y del 2 al 5% de la tuberculosis pulmonar del adulto, en ese país. La forma primaria en los niños era frecuentemente consecuencia de la alimentación con leche cruda.

Las primeras campañas contra la tuberculosis bovina se iniciaron en Dinamarca, Holanda, Alemania y EE.UU. (1898-1906), sobre la base de la prueba tuberculínica y la segregación de los reactores, en un inicio. Dicha estrategia fue luego sustituida por el sacrificio de los animales reactores a la prueba tuberculínica. En 1917, año en que se inició el Programa de Erradicación, el 3,2% del ganado tuberculinizado en EE.UU. era positivo a la prueba; ese porcentaje fue en 1967 del 0,06%. En esos 50 años se hicieron 470 millones de pruebas tuberculínicas.

Los beneficios económicos de este Programa fueron resumidos por Myers y Steele: el ahorro anual producto del mismo se estimó entre 30 y 300 millones de dólares, por la prevención de la enfermedad humana y por las pérdidas económicas evitadas. Sin embargo estos beneficios deben ser mucho mayores. Si se hubieran mantenido los mismos porcentajes de 1920, de decomiso por tuberculosis en mataderos, para 1990 las pérdidas, en bovinos y porcinos, estarían en el orden de 1000 millones de dólares anuales. En su lugar, en el período 1981-1990 sólo se decomisaron 1200 carcasas, que equivaldrían a cerca de 1.200.000 dólares para toda la década.

La tuberculosis bovina es una de las zoonosis más importantes en América Latina y el Caribe. En la década de 1990, de los aproximadamente 420 millones de bovinos que existían en la región, más de la mitad se hallaba en países aún infectados, estimándose que en América del Sur el número de bovinos con infección tuberculosa podría superar los 4 millones.

Sin embargo, se debe tener en cuenta que la tuberculosis bovina es una infección controlable y erradicable. De acuerdo a la información recolectada por OPS/OMS, en el año 2000, 16 países del Caribe presentaban prevalencias de infección en el ganado bovino menores de 0,1%, y entre 0,1 y 1% sólo R. Dominicana, en esa región. Otros 12 países del resto del continente americano: México, Haití, El Salvador, Guatemala, Nicaragua, Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Ecuador, Perú y Guyana informaron prevalencias mayores al 1% o no contaban con datos actualizados. Existen áreas libres de tuberculosis bovina: Jamaica y Cuba, en el Caribe, con un total de algo más de 5 millones de cabezas; y la zona de Estigarribia en Paraguay, y Cañada Urbanetta, en Zulia, Venezuela, en Sudamérica, con 180.000 cabezas. Se deben destacar los logros del Programa de Control y Erradicación de México (29,5 millones de ganado de carne y 1,2 millones de ganado lechero), en donde 8 estados se hallan en Fase II (erradicación) y otros 9 en la Fase I. En 2003, la tuberculosis ha quedado confinada a algunas áreas y especialmente al ganado lechero.

En la Argentina, de los cerca de 53,5 millones de cabezas bovinas, unos 3 millones son de ganado lechero. La prevalencia de tuberculosis ha ido declinando, aun sin medidas específicas, probablemente debido a la modernización en el manejo ganadero. Entre 1969 y 2002, para una media de 10 millones de bovinos anualmente sacrificados en frigoríficos con inspección veterinaria oficial, el porcentaje de animales con decomisos por aparente tuberculosis, disminuyó de 6,7 a 1,3%. Una encuesta realizada en 160 establecimientos con Inspección Federal entre 1995 y 1997, mostró que 1,35% de 9,5 millones de animales sacrificados había sufrido decomisos por aparente tuberculosis. Desde 1999 se ha puesto en marcha un Programa de Control y Erradicación, basado en la prueba tuberculínica y sacrificio de reactores, sin compensación oficial. El número de establecimientos adheridos al Programa y declarados libres de tuberculosis aumentó de 44 en 1995 a 3455 en 2002, con 1,2 millones de cabezas, predominantemente de ganado lechero. Contribuciones científicas originales, desde el campo de

la epidemiología, la estadística y la biología molecular pueden encontrar aplicación en apoyo a este Programa.

La tuberculosis en porcinos también ha presentado disminución, de acuerdo con los datos de decomiso en frigoríficos y mataderos. Entre 1,5 y 1,7 millones de carcasas fueron inspeccionadas anualmente entre 1969 y 2002, y el porcentaje de decomisos por tuberculosis disminuyó de 8,4 a 0,7%.

Investigaciones realizadas en la década de 1970 confirmaron que el *M. bovis* es el causante de las lesiones granulomatosas en bovinos, con escaso aislamiento de otras micobacterias. También se ha aislado *M. bovis* de liebres, felinos y otros mamíferos. El 90% de las micobacterias aisladas de lesiones de apariencia tuberculosa en cerdos fueron *M. bovis*, y el 10% restante *M. avium*. Ello demuestra la relación epidemiológica de causa-efecto que existe en nuestro país, entre la tuberculosis en bovinos y suinos. El bacilo bovino se aísla con mayor frecuencia de ganglios del tracto digestivo, permitiendo suponer que los cerdos adquieren la infección por vía oral, al alimentarse con suero y leche no pasteurizada.

La información sobre el impacto de esta zoonosis en la salud pública de Argentina, y en general en América Latina, es escasa. Ello se debe fundamentalmente a que el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis pulmonar, la más frecuente, se limita al examen microscópico directo del esputo, con el cual no es posible diferenciar entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* u otras micobacterias. Además, cuando se realizan cultivos, éstos se hacen usualmente en el medio de Lowenstein Jensen (LJ) con glicerina, en el cual el *M. bovis* no desarrolla o lo hace muy tardíamente, por lo que estos casos no son confirmados por cultivo. Solamente cuando se emplea, además del medio glicerinado, otro en el que la glicerina haya sido remplazada por la sal de sodio del ácido pirúvico, tal como el medio de Stonebrink, se puede diagnosticar con certeza la tuberculosis debida al *M. bovis*. Se considera que el porcentaje de casos de tuberculosis pulmonar del adulto debidos al *M. bovis* estaría en la Argentina ente el 1 y 2%.

Existen grupos de riesgo entre los cuales el porcentaje de casos de tuberculosis por *M. bovis* debe ser mucho mayor que el global. Un laboratorio de referencia nacional (Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias E. Coni) está situado en Santa Fe, provincia donde la industria frigorífica y la población vinculada a tareas rurales es muy importante. Allí se efectúan cultivos en medio de LJ y de Stonebrink en cada caso investigado. En el período 1977-2001, sobre casi 150.000 personas investigadas se confirmó tuberculosis en 4243; en 97 de ellas se cultivó *M. bovis*, y en otras 76 se confirmó *M. avium* como causa de enfermedad; los restantes casos fueron debidos a *M. tuberculosis*. El porcentaje de casos por *M. bovis* con respecto a *M. tuberculosis* varió en esos años entre 0,6 y 6%, sin una tendencia definida. El 65% de los casos de tuberculosis bovina tenían relación directa con tareas rurales, frigoríficos o veterinaria. Todos tenían localización pulmonar. La edad promedio fue 45 años. La ausencia de casos extrapulmonares y de tuberculosis infantil permite suponer que la barrera de protección establecida por el hervido o la pasteurización de la leche es efectiva.

El proceso de integración económica subregional en desarrollo y la consiguiente necesidad de mejorar la población ganadera en términos competitivos, hacen indispensable establecer procedimientos sanitarios que limiten el riesgo de introducción de enfermedades y mejoren la sanidad integral de los rebaños nacionales, cumpliendo los requerimientos sanitarios que los importadores aplican en forma creciente.

Tabla 41-1. Clasificación de Runyon de las micobacterias "no tuberculosas"

Grupo	Características principales	Especie tipo
I	Fotocromógenos*	*M. kansasii* *M. marinum*
II	Escotocromógenos**	*M. gordonae*
III	No cromógenos	Complejo *M. avium* Complejo *M. terrae*
IV	De desarrollo rápido (cromógenos y no cromógenos)	Complejo *M. fortuitum* Complejo *M. chelonei* *M. phlei*

*Desarrollan pigmento sólo en presencia de luz
** Desarrollan pigmento aun en ausencia de luz

CLASIFICACION

Las micobacterias son parte de la familia Mycobacteriaceae, orden Actinomycetales y género *Mycobacterium*. Este género está compuesto por bacilos acidorresistentes. Ello significa que al colorearse con fucsina u otro colorante derivado del fenilmetano disuelto en agua fenolada, resisten la decoloración con alcohol ácido, tal como se emplea en el método de Ziehl Neelsen. Las células son procariotas y poseen una pared gruesa, con alto contenido lipídico. Son aeróbicos o microaerófilos.

Las especies del género *Mycobacterium* se identifican en base a propiedades metabólicas y bioquímicas, por su estructura antigénica, sensibilidad a antibióticos y quimioterápicos y por su patogenicidad para diferentes especies animales. Más recientemente se ha agregado la diferenciación genotípica, mediante el empleo de sondas de DNA.

Aunque existen más de 30 especies descritas, interesan fundamentalmente aquellas patógenas estrictas para el hombre y los animales: *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* y *M. avium*, cuyos hospedadores primarios son, respectivamente, el hombre, el ganado bovino y las aves.

En conjunto, las micobacterias se suelen diferenciar en base al tiempo necesario para desarrollar en medios de cultivo, en dos grandes grupos: las de desarrollo lento (más de 7 días a 37 °C), y las de desarrollo rápido (capaces de dar colonias observables en los medios de cultivo en menos de 7 días, aun a temperatura ambiente). Las especies patógenas arriba indicadas son de desarrollo lento.

Agregando al tiempo de desarrollo otra característica también sencilla: la formación de pigmento, Runyon, en 1959, dividió las micobacterias que más corrientemente se aíslan en los laboratorios a partir de muestras clínicas en 4 grupos. En ellos no se incluyeron *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, ni otras especies bien definidas: *M. leprae*, *M. paratuberculosis* y *M. microti*. En la tabla 41-1 se presenta la clasificación de Runyon, que si bien es muy somera, resulta útil para el bacteriólogo clínico.

En 1882, Robert Koch describió por primera vez el agente etiológico de la tuberculosis humana, denominado *Mycobacterium tuberculosis*; obtuvo cultivos in vitro y reprodujo la enfermedad por inoculación a cobayos. En 1898, Theobald Smith diferenció el bacilo tuberculoso humano del bacilo bovino, por las características de los cultivos y su diferente patogenicidad para animales de experimentación. Sin embargo, recién en 1970 se legitimó el nombre de *M. bovis* (Karlson y Lessel) para el bacilo bovino, que constituye parte del complejo *M. tuberculosis*.

Otros componentes de este complejo de especies, antigénicamente muy relacionados pero diferenciables genéticamente, son *M. microti* (Reed, 1957), que se aisló de lesiones en el ratón silvestre y que no presenta patogenicidad aparente para otros mamíferos, *M. africanum* (Castets y col. 1969), subtipos I y II, con caracteres intermedios entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Estas cepas suelen aislarse en Africa, tanto de bovinos como de casos de tuberculosis humana. Recientemente se ha agregado *M. canettii*, subsp de *M. tuberculosis*, que presenta colonias lisas y brillantes. También se han definido dos subespecies de *M. bovis*, ellas son: *M. caprae*, aislado de cabras, especialmente en España, y *M. pinnipedii*, cultivado a partir de lesiones tuberculosas de lobos marinos en Australia, Argentina y Uruguay. Finalmente el BCG (bacilo de Calmette-Guérin) si bien se originó de una cepa de *M. bovis*, constituye una mutante estable, con baja virulencia y algunas propiedades feno y genotípicas diferentes a las del *M. bovis*.

Los métodos de biología molecular, en especial el uso de marcadores genéticos, con técnicas derivadas de PCR y *spoligotyping**, entre otras, han permitido diferenciar estas especies y subespecies y detectar diferencias en el DNA cromosómico, aun entre cepas de una misma especie. Sobre esta base se ha construido un árbol filogenético, en el que a partir de un *M. tuberculosis* ancestral derivarían ramas, algunas con caracteres definidos de especie o subespecie, y otras como "familias", dentro de la especie *M. tuberculosis* [Beijing, Central Asia (CAS1), Latino Americana-Mediterránea (LAM), X, y Haarlem]. Al contrario de lo que se suponía, *M. bovis* no es la especie más antigua, sino que habría derivado, junto con *M. africanum*, de un *M. tuberculosis* ancestral. Dentro del *M. bovis* también se ha podido diferenciar la región de origen, en base a estudios de biología molecular realizados en Sudamérica, lo que puede resultar de utilidad para la vigilancia epidemiológica de la tuberculosis en el ganado bovino.

Teniendo en cuenta los métodos tradicionales de identificación, dentro del complejo *M. tuberculosis* se pueden diferenciar claramente distintas especies (tabla 41-2).

El *M. avium* es la especie tipo dentro de otro complejo de micobacterias antigénicamente muy relacionadas, y que a su vez son diferenciables, por sus propiedades feno y genotípicas y por su espectro de patogenicidad, del complejo *M. tuberculosis*.

Ya Feldman y col. describieron en 1943 cepas semejantes al *M. avium* aisladas de humanos, aparentemente no patógenas para las aves. Estas bacterias fueron denominadas *Mycobacterium intracellulare*. Como parecía imposible diferenciarlas de *M. avium* con pruebas in vitro Runyon, en 1959, propuso que las cepas virulentas para pollos y conejos fueran clasificadas como *M. avium* y aquellas semejantes al *M. avium* pero sin virulencia para estos animales, como bacilo Battey, que es el actual *M. intracellulare*.

Una característica general del complejo *M. avium* es su resistencia a la mayoría de las drogas antituberculosas, al parecer debido a la composición y al grosor de su pared celular lipídica, que impide la penetración de estos fármacos a la bacteria.

El *M. paratuberculosis* (*M. johnei*), agente de la enfermedad de Johne, fue inicialmente descrito por Johne y Frothingham (1895) como un bacilo acidorresistente presente en lesiones de tejido intestinal de bovinos, que demostró gran dificultad para ser cultivado. Sin embargo, cuando al medio de cultivo se agrega micobactina, un hidroxamato (agente quelante del hierro producido por las micobacterias), se obtiene un buen desarrollo in vitro. La dificultad reside en que cuando recién se lo aisla de tejidos, el *M. johnei* es incapaz de producir micobactina en la cantidad requerida para su propio desarrollo en el medio de cultivo, se requieren de 3 a 4 meses para obtener un cultivo primario.

MORFOLOGIA Y CARACTERISTICAS GENERALES

Las micobacterias son bacilos no móviles, no esporulados, pleomórficos, grampositivos. Cuando se cultivan en medio sólido forman colonias lisas o rugosas, por lo general opacas. Como se ha visto anteriormente, poseen la propiedad común de formar complejos estables con colorantes derivados del fenilmetano, que no son decolorados por el alcohol ácido.

Al microscopio electrónico es posible diferenciar los componentes de su pared: una rígida o basal y otra difusa, inestable, más extensa. La primera determina la estabilidad de la forma del bacilo. Está compuesta por una macromolécula no muy diferente de la pared celular de la mayoría de las bacterias grampositivas. El polímero es denominado "mureína" y forma una red que se puede separar por tratamiento con HOK en solución alcohólica. La parte más externa está compuesta por lipopolisacáridos y peptidoglicolípidos.

La estructura de la pared es fundamental para el mantenimiento de su acido-alcohol resistencia. Ella se pierde por tratamientos físicos o químicos que destruyen su integridad, tales como molido (Koch, 1895), sonicación, radiación UV, extracción de lípidos, o tratamiento con detergentes, infección por fagos o autólisis. La membrana actúa como sistema de barrera selectiva.

Los ribosomas son considerados muy posibles sitios de actividad de drogas antituberculosas; la rifampicina, por ejemplo, provoca su desaparición. Se observan frecuentes gránulos de inclusión en el citoplasma, cuya función no está clara.

Middlebrook, Dubos y col. observaron la formación en cuerdas del *M. tuberculosis* cultivado en medio líquido sin *tween*, y demostraron que se debía a la presencia del llamado "factor cuerda": dimicolato de trehalosa, localizado en la pared celular. Se ha hallado que otros componentes de la pared, los sulfolípidos, son capaces de impedir la fusión del fagosoma y el lisosoma dentro del macrófago, cuando la micobacteria es fagocitada. Por ello se los considera un factor de virulencia. Sin embargo hasta ahora no se ha definido una toxina micobacteriana.

Otros antígenos micobacterianos son de carácter proteico y solubles en agua. Poco después de identificar al bacilo de la tuberculosis, Koch obtuvo filtrados de cultivos, que concentró por calor y a los que denominó filtrados "tuberculina".

Este antígeno proteico global ha sido posteriormente purificado y analizado. Empleando ácido tricloroacético Seibert precipitó proteínas de un filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* en medio líquido sintético y a ello se le llamó PPD (*purified protein derivative*, derivado proteínico purificado). Se han hecho preparados similares de cada especie micobacteriana, las que corrientemente se denominan sensitivas. Todas ellas tienen una serie de componentes antigénicos comunes.

Otros antígenos no proteicos del *M. tuberculosis* y del *M. bovis* son los polisacáridos: D-arabino-D-galactano, que es un componente estructural de la pared; D-arabino-D-manamo y D-glucano, que serían reservorios energéticos.

El PPD de *M. avium*, estándar internacional, fue preparado en el Laboratorio Central de Weybridge (Gran Bretaña) en 1953. Existe un Estándar Internacional de PPD de *M. bovis* desde 1987. El PPD de *M. paratuberculosis* se denomina Johnina.

* *Spoligotyping*: spacer oligonucleotides genotyping

Tabla 41-2. Algunas especies ubicadas dentro del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, sus características diferenciales más importantes

Propiedad	*M. tuberculosis*	*M. bovis*	*M. africanum*	BCG
Desarrollo en medio con glicerol	+	-/+	+/-	+
Desarrollo en medio con piruvato	+	+	+	+
Niacina	+	-	-/+	-/+
Nitrato reductasa	+	-	-	-
Pirazinamidasa	+	-	+/-	-
Crecimiento con:*				
-TCH 2 mg/l	+	-	-	-
-CS 30 mg/l	-	-	-	+
-PZA 100 mg/l	-	+	-	+
Patogenicidad:				
-cobayo	+	+	+	-
-conejo	-/+	+	+	-
-hombre	+	+	+	-
-ratón	+	+	+	-

*TCH: hidracida del ácido tiofeno carboxílico, CS: cicloserina, PZA: pirazinamida

Se ha comprobado que los animales infectados con *M. paratuberculosis* reaccionan en las pruebas intradérmicas (ID) al PPD de *M. avium* con semejante intensidad que a la Johnina. Ambas especies contienen componentes antigénicos, en su mayoría comunes. Asimismo, las respuestas al PPD de *M. intracellulare* son indiferenciables de las producidas por PPD de *M. avium* en animales, siempre que los PPD tengan potencia biológica equivalente. Por otra parte, los PPD de *M. tuberculosis*, *M. bovis* o preparados de BCG, conforman un grupo antigénicamente muy semejante entre sí y diferente al anterior.

PATOGENESIS

Las micobacterias patógenas son parásitos intracelulares facultativos. Tanto *M. tuberculosis* como *M. bovis* se mantienen en la naturaleza mediante la transmisión de un hospedador a otro. No se hallan fuera de los seres vivos, salvo en secreciones o excreciones, en cuyo caso se mantienen viables durante un tiempo variable pero limitado, que depende de la temperatura, humedad y presencia de rayos UV. Son varios los mecanismos por los cuales el bacilo se mantiene viable y aún se reproduce dentro del macrófago: impedimento de la fusión del fagosoma con lisosoma, liberación de componentes como el factor cuerda o los sulfátidos antes mencionados, que son tóxicos para el macrófago, inactivación de las enzimas hidrolíticas del lisosoma, etc.

El poder patógeno del *M. bovis* para bovinos se mide experimentalmente por inoculación endovenosa con una cantidad medida de *M. bovis*. Los terneros inoculados con 4 mg de bacilos mueren 15 a 35 días después con tuberculosis miliar generalizada. Una dosis similar de *M. tuberculosis* suministrada por la misma vía sólo ocasiona lesiones ganglionares localizadas. Las lesiones que se observan en bovinos infectados naturalmente con *M. tuberculosis* son siempre pequeñas. Su importancia radica en que producen sensibilización a la tuberculina.

En cuanto al bacilo tuberculoso aviar (*M. avium*), la gravedad de las lesiones depende del inóculo y de la vía de entrada. La infección natural, adquirida generalmente por vía oral, determina lesiones en los ganglios mesentéricos, con baja sensibilización a la tuberculina PPD-bovina. La inoculación experimental de dosis altas, por vía endovenosa, puede ser fatal, con diseminación miliar.

Tanto la infección por *M. tuberculosis* en el hombre como por *M. bovis* en el ganado se adquiere principalmente por vía aerógena. En ambos casos, la fuente de infección es el enfermo tuberculoso, animal o humano, con lesiones pulmonares abiertas (bacilífero) que al toser, elimina pequeñas gotitas (de hasta 10 µm de diámetro) con bacilos que se mantienen en suspensión y son aspiradas por otros individuos. Estas gotitas pueden llegar hasta el alvéolo pulmonar, donde se implantan, y los bacilos, mediante un ambiente favorable, comienzan a reproducirse. Las gotas más grandes pueden quedar retenidas en la vías superiores siendo la causa más frecuente de lesiones en los ganglios cervicales.

Para producir enfermedad, la dosis infectante transmitida por alimentos debe ser mucho mayor que la transmitida por vía respiratoria. Por lo menos el 80 al 90% del ganado bovino tuberculoso habría adquirido la infección por vía aerógena. Cuando las lesiones se localizan en una cavidad, ésta es la torácica y no la abdominal. Los bacilos tuberculosos comienzan a multiplicarse cuando se alojan en el pulmón. Algunos permanecen en el sitio inicial y otros llegan, por vía linfática, hasta el ganglio regional, donde continúan reproduciéndose. Estos ganglios afectados aumentan su tamaño. La lesión (foco) inicial y los ganglios satélites constituyen el **complejo primario.**

El complejo primario en bovinos se presenta en cualquier lóbulo, pero generalmente en la porción dorsocaudal del lóbulo diafragmático. El proceso comienza como una bronquitis terminal con compromiso alveolar, de tal modo que la lesión inicialmente es sublobular o lobular. En algunos casos, puede estar comprometido más de un lóbulo.

La primera respuesta celular frente a la presencia bacilar es un exudado seroso rodeado de leucocitos polimorfonucleares. Aproximadamente 48 horas más tarde éstos son remplazados por monocitos y células mononucleares (epitelioides) de origen local, que van aumentando en número. A los 12-15 días se comienzan a formar células gigantes por fusión de macrófagos y entonces aparecen los linfocitos.

Este **tubérculo** se caseifica en el centro y se forma el **nódulo** blanco grisáceo. La cantidad de linfocitos en el foco aumenta y, paralelamente en esta etapa, aparece la **hipersensibilidad tuberculínica,** junto con la **inmunidad adquirida**. Entonces el organismo es capaz de destruir los bacilos, impidiendo su proliferación. Las lesiones tienden a encapsularse, el nódulo se torna duro, compacto, con abundantes células epitelioides gigantes y tejido conectivo. El foco puede rodearse de un área fibrosa y, más tarde, comienza a caseificarse. Algunos bacilos pueden permanecer viables en estado latente dentro del foco durante períodos prolongados y "reactivarse" cuando las condiciones les son propicias.

Tanto la lesión parenquimatosa como la secundaria ganglionar pueden curar y la infección puede permanecer latente, pero en bovinos, salvo muy raras excepciones, la tuberculosis continúa su progresión.

La infección adquirida en edad temprana en animales desnutridos o con otras infecciones, se expande más fácilmente, con caseificación y destrucción tisular (necrosis). Algunos bacilos pasan al torrente sanguíneo, vía linfática, produciéndose la diseminación hematógena, mediante la cual los bacilos pueden formar nuevos focos en órganos distantes. Otra forma de diseminación se produce por vía aerógena, por aspiración desde tubérculos localizados en tejido pulmonar adyacente a pequeños bronquiolos, que por caseificación descargan bacilos a la luz bronquial, originando focos de neumonía aspirativa en alvéolos tributarios.

La confluencia y licuefacción en áreas caseosas da origen a cavidades (cavernas). El tipo lesional, desde los pequeños nódulos grises hasta las grandes masas de **caseo**, depende del número de bacilos que haya entrado al organismo, de su virulencia y de la resistencia (natural y adquirida) del hospedador.

RESPUESTA INMUNE

El conocimiento acerca de este mecanismo, que aún hoy es incompleto, se inició a partir de un fenómeno descrito por Koch, que lleva su nombre. Koch infectó cobayos por vía sistémica con *M. tuberculosis*, 3 semanas después les administró una nueva dosis de bacilos por vía intradérmica, y observó que en el sitio de la segunda inoculación, después de haberse producido un nódulo que alcanzó su tamaño mayor a las 72 horas, la lesión curaba espontáneamente, aunque el cobayo moría a causa de la enfermedad, como consecuencia de la primera inoculación. Esta inmunidad de manifestación local es diferente a la producida por anticuerpos circulantes. Este tipo de inmunidad se denomina "celular" o "mediada por células" debido al papel fundamental que desempeñan los leucocitos mononucleados (linfocitos T). Koch también demostró que la misma reacción local podía producirse por inoculación intradérmica de tuberculina –un extracto libre de bacilos– lo cual constituye la manifestación de la hipersensibilidad retardada, cuya aparición en el animal y en el hombre infectado, se produce aproximadamente 3 semanas después de la infección, coincidiendo con la aparición de la inmunidad específica.

La transferencia pasiva de la hipersensibilidad tuberculínica mediante células linfoideas y no por medio de suero fue demostrada en el cobayo por Landsteiner y Chase en 1942. Muchos autores confirmaron luego este hecho. Hasta ahora no se ha podido transferir la inmunidad antituberculosa mediante suero de sujetos inmunes. Lurie, en 1942, observó que transfiriendo células linfoideas de conejos normales, se lograba la inhibición del desarrollo del *M. tuberculosis* inoculado al animal. Lefford y Mckaness (1973) lograron transferir la inmunidad antituberculosa en ratones por pasaje de linfocitos de ratones inmunizados con BCG a receptores singeneicos (genotípicamente semejantes).

¿Cómo se manifiesta la inmunidad celular ante el antígeno bacilar? El granuloma constituye la consecuencia de la respuesta inmune. Este consiste en una colección circunscrita de células inflamatorias, principalmente de tipo mononuclear, que se ubican alrededor del antígeno insoluble o particulado. Además del granuloma tuberculoso, existen granulomas de otros orígenes, el antígeno puede o no ser conocido, pero debe estar siempre presente para que haya reacción granulomatosa. La característica común de todos los granulomas es la participación del macrófago y la característica común de los granulomas inmunológicos, la participación predominante del linfocito T.

Cierto tipo de macrófago es capaz de fagocitar al bacilo, procesarlo en el sistema fagosoma-lisosoma, y "presentarlo" al linfocito T *CD4+*, el cual, a su vez, es capaz de reconocer el antígeno procesado cuando éste se halla unido a moléculas de glicoproteínas en la membrana del macrófago (complejo mayor de histocompatibilidad, *CMH*, clase II). El linfocito T *CD4+*, denominado "helper", actúa a través de las citoquinas que libera. Este tipo de linfocito posee una glicoproteína de 57 *kDa*, *CD4*. El macrófago sintetiza y libera interleuquina 1 (*IL-1*), una citoquina soluble que estimula a las células T para que produzcan interleuquina 2 (*IL-2*) que promueve la proliferación de células T en el lugar de acción. En esta etapa se produce una nueva activación bidimensional entre el linfocito T y el macrófago. El primero libera otra linfoquina: el *gamma* interferón, que aumenta la expresión de glicoproteínas "presentadoras" de antígeno por parte del macrófago y un factor de inhibición de la migración de macrófagos (MIF). La función más importante de los linfocitos T es reconocer el antígeno, iniciar la respuesta inmune, dirigir y modular la función de otras células y mantener la memoria (reconocimiento del antígeno).

Algunos fagocitos son incapaces de procesar los bacilos que escapan de los fagosomas y continúan replicándose en el citoplasma. Las células citotóxicas *CD8+* pueden destruir por lisis esos fagocitos infectados, lo que permite que los bacilos que escapan de su citoplasma sean atacados por otros fagocitos inmunológicamente competentes. Las células T *CD8+* con actividad citotóxica son fundamentales en este proceso.

Aunque la mayoría de las células T tienen antigenos receptores con 2 cadenas proteicas: *alfa* y *beta*, existe una minoría de ellas que poseen receptores proteicos con cadenas *gamma* y *delta* (células *gamma/delta*). Se ha observado que éstas abundan en las lesiones tuberculosas incipientes, pero luego son remplazadas por las células con receptores *alfa/beta*. Las células *gamma/delta* son más abundantes en sujetos tuberculino-positivos sanos que en enfermos con tuberculosis activa. Otro grupo de células denominadas NK (*natural killer cells*) tiene actividad citolítica.

Asimismo, los linfocitos T se interrelacionan con otra población linfocítica: las células B, estimulando su crecimiento y su diferenciación mediante linfocinas tales como BCGF (*B-cells growth factor*) y BCDF (*B-cell differentiation factor*). Las células B comienzan a producir anticuerpos (respuesta humoral). Las moléculas antigénicas grandes con determinantes repetidos, por ejemplo polisacáridos y ciertas proteínas, pueden estimular directamente a las células B. Vale decir que el exceso de antígeno puede causar directamente la activación de

las células T supresoras. La respuesta humoral en tuberculosis parece no jugar ningún papel protector. Sin embargo, como se verá más adelante, el aumento de las *IgG* pueden tener relevancia diagnóstica.

El hecho de que la virulencia del bacilo (estímulo antigénico) y la inmunidad del hospedador lleguen a un cierto equilibrio hace posible la cronificación de la enfermedad, y ello a su vez facilita el mantenimiento de las fuentes de infección y el pasaje del bacilo de un animal a otro (cadena de transmisión). La interrupción de esa cadena mediante la detección y sacrificio de los animales infectados es fundamental para el control y erradicación de la tuberculosis bovina.

ASPECTOS CLINICOS

La tuberculosis bovina no presenta signos y síntomas específicos; por lo tanto, el diagnóstico clínico tiene escaso valor. Se trata de una infección crónica en la que en las etapas más avanzadas se observa adelgazamiento, eventualmente ganglios aumentados y tos con producción de secreciones.

La prueba tuberculínica ID con PPD bovino permite determinar la presencia de infección que progresa en un período más o menos prolongado, a lesiones localizadas y llega hasta tuberculosis miliar.

Por lo tanto, con criterio epidemiológico, un bovino tuberculino-positivo significa, con altísima probabilidad, un caso presente o futuro de tuberculosis y una fuente de infección para el rebaño, por lo que debe eliminarse del mismo.

Otros métodos diagnósticos han sido desarrollados más recientemente: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (*ELISA*) para detección de *IgG* anti-*Mycobacterium*, y la prueba de *gamma* interferón, que se basa al igual que la prueba tuberculínica, en la respuesta celular (macrófagos, linfocitos T) al antígeno.

El diagnóstico postmortem es la observación macroscópica de lesiones semejantes a tuberculosis, lo que puede confirmarse por histología y bacteriología.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Cultivo

La condición indispensable para que un resultado sea confiable es haber obtenido una muestra adecuada, es decir, que provenga del sitio donde está ubicada la lesión, que la cantidad recolectada sea suficiente, que la muestra se haya identificado correctamente, que el envase sea adecuado para ese tipo de muestra y que ésta se transporte en condiciones que le permitan mantener sus características originales.

La muestra (ganglios, pulmón u otra víscera) generalmente es recolectada por el inspector sanitario en el matadero. Puede provenir de un animal tuberculino-positivo sacrificado, con o sin lesiones macroscópicas. En algunas ocasiones, es necesario enviar al laboratorio muestras de animales vivos: leche, secreciones respiratorias y material de fístulas, biopsias, etc.

Los órganos deben enviarse en frascos de vidrio o plástico resistentes, de boca ancha, con tapa de rosca. No necesitan estar estériles puesto que la muestra tampoco lo está. La muestra no debe ocupar más de la mitad del frasco, de lo contrario resulta difícil extraerla. También pueden emplearse bolsas de nailon, resistentes, que se cierran con bandas elásticas y se ubican dentro de conservadoras térmicas u otro envase hermético.

Para el transporte, las muestras pueden colocarse en frascos con solución saturada de borato de sodio. El borato es un antiséptico suave. Al llegar, la muestra se debe someter al mismo tratamiento que aquellas transportadas sin agregado de solución de borato. Deben identificarse correctamente con el número del animal y el nombre del establecimiento de procedencia.

Por medio del examen microscópico se puede determinar la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR). Se emplea la coloración de Ziehl Neelsen.

Las muestras obtenidas, tanto de animales sacrificados como vivos, además de micobacterias, pueden contener una variedad de microorganismos. En general, éstos se desarrollan rápidamente en los medios de cultivos, y si la muestra se sembrara directamente en ellos, nunca se lograría aislar la micobacteria buscada, que se encuentra –aun en órganos con lesiones macroscópicas– en número relativamente escaso, y que desarrolla muy lentamente, quedando por lo tanto casi "tapada" por otros gérmenes. En estas condiciones, nos encontramos frente a un "cultivo contaminado". Los responsables de la contaminación son muy variados, pero en general todos son susceptibles a ciertos reactivos a los que las micobacterias son relativamente resistentes. En ello se basa el tratamiento previo o descontaminación que se debe efectuar antes de la inoculación de la muestra al medio de cultivo para aislamiento de micobacterias.

En las muestras de ganglios u órganos, debe seleccionarse la parte del material más apropiada para la investigación y luego, con la porción seleccionada, prepararse una suspensión homogénea. Ambas etapas se realizan en una cabina de bioseguridad o, si se carece de ella, sobre la mesada, trabajando con precauciones de bioseguridad, siempre con el rostro protegido con mascarilla y anteojos, para evitar una infección por proyecciones del material procesado.

La descontaminación de la muestra se realiza con álcalis (NaHO 4%) o ácido (por ej., ácido oxálico al 3%) y neutralización posterior.

El glicerol, la asparagina, el piruvato o el glutamato, aportan los nutrientes básicos, fuentes de carbono y nitrógeno, a los medios usualmente empleados para el cultivo de micobacterias. Los huevos son la fuente nutritiva empleada en las diferentes fórmulas. Los medios más conocidos son Lowenstein Jensen, Stonebrink y Ogawa. Como *M. bovis* no desarrolla bien en presencia de glicerol, el laboratorio de diagnóstico bacteriológico debe contar con 2 medios elaborados con huevo como base: uno con glicerol (Lowenstein Jensen) y otro sin él. En el segundo el glicerol se sustituye con el piruvato de sodio (Stonebrink).

Los denominados medios semisintéticos: Middlebrook 7H9, 7H10, 7H11 pueden ser líquidos o sólidos (por agregado de agar). Los medios con huevo como base son relativamente económicos.

Actualmente se emplean también sistemas de cultivo líquido, con mecanismos de detección, por formación de compuestos fluorescentes, o radioactivos, a partir del CO_2 liberado con el desarrollo de las micobacterias (*BACTEC*, *MGIT*, entre otros). Si bien el tiempo necesario para obtener el resultado se acorta, el costo es alto con respecto a los métodos tradicionales antes mencionados. Por ello sólo se han generalizado en los países del "primer mundo". En Argentina encuentran aplicación en laboratorios de referencia, en salud pública humana. El diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis en animales se hace usualmente postmortem y no tiene, por lo tanto, especial urgencia.

Otras pruebas diagnósticas

ELISA para la detección de anticuerpos IgG *anti-Mycobacterium*

Un ELISA para detección de *IgG* anti PPD ha mostrado, en estudios realizados en Argentina, una especificidad del orden del 95%, pero una sensibilidad limitada, ya que sólo da resultado positivo en casos de tuberculosis con lesiones importantes. En

efecto, los anticuerpos –que no cumplirían ningún papel de defensa del organismo contra el bacilo– aparecen cuando la carga antigénica es elevada (véase secuencia de la respuesta inmune). Esta prueba serológica no es, por lo tanto, útil para erradicar la infección tuberculosa del ganado. Podría tener utilidad en las etapas iniciales del control para identificar los animales con enfermedad avanzada y las fuentes de infección.

Prueba de gamma *interferón*

En la década de 1990 se ha desarrollado una prueba in vitro basada en la inmunidad celular; con ella se detecta la presencia de *gamma* interferón, que es liberado por los linfocitos sensibilizados durante la incubación de una muestra de sangre en presencia de tuberculina PPD. Para esta incubación se emplea sangre heparinizada, luego se separa el plasma y se efectúa con él un ensayo *ELISA*, con empleo de anticuerpos monoclonales anti-*gamma* interferón. Posee alta sensibilidad para el diagnóstico de infección tuberculosa y también alta especificidad.

TRATAMIENTO

Si bien existen antibióticos y quimioterápicos activos contra el *M. bovis* (al igual que contra el *M. tuberculosis*), de ninguna manera se recomienda efectuar quimioprofilaxis o tratamiento de los bovinos u otros mamíferos con diagnóstico de tuberculosis. Ello se debe a varias causas: a) costo y disponibilidad de drogas en las cantidades necesarias para quimioprofilaxis o tratamiento; b) dificultad organizativa para asegurar el tratamiento o la quimioprofilaxis que deberían hacerse para resultar eficaces, por períodos no menores de 6 meses en forma continuada y con más de una droga; c) dificultad para fijar criterios de cura que sean confiables; d) riesgo de seleccionar mediante quimioprofilaxis o tratamiento las mutantes resistentes a drogas, que ya existen en pequeña proporción (10^{-5}, 10^{-6}) en cualquier población bacilar. Ello daría lugar a un problema muy serio: la tuberculosis bovina resistente a la medicación.

BIBLIOGRAFIA

Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, Robinson RA, Huchzermeyer HF, Kantor IN, Meslin FX. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Em Inf Dis* 1998; 4:59-70.

Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, et al. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. *nov. Int J Syst Evol Microbiol.* 2003 ;53:1305-14.

Francis J, Tuberculosis in animals and man. London: Cassel and Co., 1958.

Grange JM. Pathogenesis of Mycobacterial Disease. In: Mycobacteria I. Basic Aspects. Edit. By Gangadharam PRJ, Jenkins PA, New York: Chapman and Hall, 1998. Chapter 5.

Kantor IN, Pereira J, Miguet J, Rovere R. Pouvoir pathogène expérimentale de *Mycobacterium africanum* pour les bovines. *Bull Acad Vet France* 52:499,1979.

Kantor IN, Ritacco V. Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean: Current Status, control and eradication programs. *Vet Microbiol.* 1994; 40:5-14.

Myers JA, Steele JH. Bovine tuberculosis control in man and animals. Saint Louis, Missouri: Warren H. Green Inc., 1969.

OPS/OMS. Seminario Taller de Vigilancia en Tuberculosis Bovina, Informe Final. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia, Julio 2001.

Perez AM, Ward MP, Torres P, Ritacco V. Use of spatial statistics and monitoring data to identify clustering of bovine tuberculosis in Argentina. *Prev Vet Med* 56:63-74, 2002

Sequeira MD, Latini O. Información sobre tuberculosis bovina en humanos en Argentina. INER E.Coni, Ministerio de Salud Pública, Santa Fe, Argentina, 2002.

Torres P. Situación de la tuberculosis bovina en la República Argentina. SENASA, Buenos Aires, 2002.

Zumarraga MJ, Martin C, Samper S, Alito A, Latini O, *et al.* Usefulness of Spoligotyping in Molecular Epidemiology of *Mycobacterium bovis*-Related Infections in South America Journal of Clinical Microbiology, 37: 296-303, 1999.

Capítulo 42

PARATUBERCULOSIS

Fernando Alberto Paolicchi, María Isabel Romano

INTRODUCCION

La paratuberculosis es una enfermedad crónica de los rumiantes producida por *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* que afecta a bovinos, ovinos y otros rumiantes pequeños, provocando enteritis crónica y por ende pérdidas de producción por conversión alimenticia deficiente. La enfermedad también ha sido diagnosticada en primates, ciervos, conejos, zorros y camélidos, además de una diversa población de animales silvestres. Actualmente se asocia a la enfermedad de Crohn en los humanos por lo que es considerada una enfermedad zoonótica.

El agente etiológico de la paratuberculosis fue considerado como una micobacteria de tipo aviar por Johne y Frothingham en 1895, cuando se realizó la primera descripción de la enfermedad. Al poco tiempo se clasificó como una especie diferente denominada *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis*, nombre extremadamente ilustrativo de su patogenicidad que fue sustituido por el de *M. paratuberculosis* y *M. johnei*. En 1990 durante una nueva revisión del complejo *M. avium* se propuso la denominación de *M. avium* subsp *paratuberculosis*, subespecie conocida en su forma abreviada como Map.

La paratuberculosis es reconocida como una importante enfermedad emergente en muchos países y ha sido denunciada aproximadamente en 60, de los cuales en el 30% de ellos la enfermedad ha sido introducida por bovinos u ovinos importados. Lejos de estar disminuyendo, la prevalencia de paratuberculosis se incrementa principalmente en ganado lechero, en ovinos y en ciervos. En Sudamérica, Argentina es pionera en estudios sobre paratuberculosis, la que ha sido diagnosticada en varias especies animales.

EPIDEMIOLOGIA

La paratuberculosis es una de las enfermedades infecciosas más frecuentes del ganado lechero y de carne, tanto de la Argentina como de otros países donde la ganadería es una actividad relevante. En el año 1963 la F.A.O. concluyó que la paratuberculosis era una de las enfermedades que más seriamente afectaba a la "industria ganadera bovina" y actualmente es motivo de intensos programas sanitarios de control en Europa, Estados Unidos y Australia.

La prevalencia de paratuberculosis en Europa oscila entre 7 y 55%, en los Estados Unidos un 40% de los rodeos de más de 300 cabezas están infectados (entre 11 y 18% de portadores subclínicos) y en Australia la prevalencia en rodeos lecheros se encuentra entre un 9 y 22%. En 1984, las pérdidas anuales ocasionadas por *M. paratuberculosis* en los Estados Unidos fueron estimadas en 1.500 millones de U$S y recientes estudios calculan pérdidas entre 200 y 250 millones de U$S por año en la industria láctea. Se ha calculado que cuando la prevalencia de la enfermedad en un rodeo con enfermedad es igual o mayor al 10%, el costo promedio de las pérdidas alcanzaría los 200 U$S/vaca. Por este motivo el control de la enfermedad se considera de alta prioridad, para lo cual la aplicación de planes estatales de control se considera estratégica en países desarrollados.

La paratuberculosis bovina es reconocida en algunas regiones de nuestro país, pero en términos generales existe desconocimiento de la importancia real del problema. La enfermedad causa pérdidas económicas a los productores y a la industria láctea y cárnica, cuando se revela la enfermedad clínica pero también con la presencia de animales portadores subclínicos de paratuberculosis. Estos últimos aparentan estar libres de la enfermedad pero son portadores de *M. paratuberculosis*, lo eliminan en forma intermitente aumentando la contaminación del suelo y un porcentaje finaliza manifestando la enfermedad.

Las pérdidas directas por paratuberculosis son: a) disminución en la producción de carne y/o leche, b) disminución de la fertilidad, con un incremento del intervalo entre partos, c) prematura eliminación de los animales del rodeo, d) pobre conversión alimenticia, e) aumento de la susceptibilidad a otras enfermedades infecciosas (se estima entre 4 a 7 veces mayor desarrollo de mastitis respecto de los no infectados), f) pérdida en el potencial genético y en mercados de exportación, y g) un incremento en los costos derivados del uso de medicamentos.

La infección ocurre principalmente en animales jóvenes (terneros, corderos, bambis) por la vía fecal-oral, aunque también se ha demostrado la vía intrauterina. Los terneros nacidos de vacas portadoras del *M. paratuberculosis* tienen mayor probabilidad de estar infectados que aquellos nacidos de vacas no infectadas. La probabilidad de infección disminuye a medida que la edad progresa, siendo los adultos menos susceptibles, aunque no exentos de contagio, dependiendo de la carga bacteriana a la que estén expuestos.

En vacas lecheras existen algunos factores que aumentan el riesgo de propagar y transmitir la paratuberculosis en un establecimiento: introducción de nuevos animales, sitio de reunión habitual de los mismos, densidad poblacional alta, falta de remoción de materia fecal y lavado deficiente de las ubres previo al parto.

La Argentina no cuenta con una caracterización epidemiológica global de paratuberculosis, pero tampoco existen datos concretos en Sudamérica. La información regional de Argentina indica una seroprevalencia entre el 7,2 y 19,6% en rodeos de cría de la Cuenca del Salado (Provincia de Buenos Aires). Por otro lado, el diagnóstico clínico se ha incrementado en el último tiempo entre un 5 y 10%, siendo los valores previos menores del 3% y observando cambios en el comportamiento de la enfermedad, ya que la presentación clínica es cada vez más frecuente en animales jóvenes (a partir de los 18 meses de edad), incorporando de esta forma a la invernada como otra categoría de riesgo.

Estudios previos en nuestro país estimaron una disminución en la producción de carne y/o leche que alcanzaría hasta un 19%. Según los datos de seroprevalencia de paratuberculosis, la estimación preliminar de las pérdidas económicas referentes al valor bruto de la producción ganadera y de la comercialización y flete, durante el año 2001 se produjeron pérdidas aproximadas de 22 millones de

U$S (zona de cría de la Cuenca del Salado) y de 6,3 millones de U$S (Cuencas Lecheras) en la Provincia de Buenos Aires.

Recientemente se ha promovido el control voluntario de paratuberculosis en establecimientos piloto para caracterizar la población afectada en los distintos sistemas de producción y regiones del país. Estos trabajos permiten reconocer la amplia difusión de paratuberculosis en rodeos lecheros y de carne donde la producción se ha intensificado en los últimos años. Por otro lado, se identificó como una enfermedad de impacto económico para la cría de cérvidos (ciervo colorado) en cautiverio, que la adquieren posiblemente por contacto con bovinos infectados. Afecta la supervivencia de animales jóvenes con probabilidad de muerte en poblaciones con alta prevalencia de animales infectados.

La paratuberculosis en bovinos es una enfermedad infecciosa de progreso lento, requiriendo un considerable número de años desde que se instala en el rodeo hasta que se observan animales con signos. En rodeos cerrados con infección hay un incremento constante en el porcentaje de animales infectados con *M. paratuberculosis*, mientras que en rodeos abiertos sanos se corre el riesgo de incorporar animales infectados si no se realiza el diagnostico previo.

Esta bacteria es resistente a condiciones medioambientales adversas y su supervivencia en un establecimiento con animales enfermos podría estimarse entre 10 y 12 meses en materia fecal o agua estancada. Existe alta probabilidad de encontrar tasas mayores de seroprevalencia de la enfermedad en rodeos bovinos que pastorean áreas con suelos arcilloso-arenosos y arcillosos, donde la infiltración de agua es alta y el pH bajo. Estas micobacterias sobreviven mejor en ambientes ácidos, por lo tanto en suelos con estas condiciones tienen ventajas competitivas con otros microorganismos. También en el caso de ovejas y cabras la mayor prevalencia de paratuberculosis estaría asociada a establecimientos con suelos de bajo pH y menor retención de agua. La deficiencia de Cu (primaria o secundaria) y la de Se podrían afectar negativamente al sistema inmunológico de los bovinos y, en consecuencia, la capacidad de respuesta a la infección con *M. paratuberculosis* predisponiéndolos al desarrollo de la enfermedad.

ASPECTOS CLINICOS

Si en un rodeo bovino se observan animales con diarrea intermitente, pérdida de peso, edema submandibular y desmejoramiento del estado corporal, existen razones para pensar de que la paratuberculosis puede ser la causa.

La observación de casos clínicos de paratuberculosis en determinados momentos productivos (parto) o estacionales (déficit de alimento), sólo representa la parte visible del problema, ya que habrá una proporción mayor del rodeo infectado que son portadores subclínicos de la enfermedad. La paratuberculosis se caracteriza macroscópicamente por una enteritis crónica que produce diarrea y resulta en un proceso de enflaquecimiento y desmejoramiento progresivo por malabsorción y pobre conversión alimenticia, que conduce eventualmente a la muerte del animal enfermo. En un rodeo infectado los animales podrían ser clasificados en cuatro estados: *estado 4*, infectados y clínicamente enfermos; *estado 3*, infectados asintomáticos; *estado 2*, infectados no identificados por las técnicas diagnósticas (falsos negativos); *estado 1*, no infectados (sanos).

Para el estadio clínico de paratuberculosis no existen tratamientos, quedando como único recurso la confirmación con un diagnóstico rápido y la eliminación del animal. En general la enfermedad se presenta en animales adultos o en vaquillonas de primer o segundo servicio, después del parto y en ovinos adultos mayores de 12 meses. En los ciervos, además de la presentación en animales adultos, es frecuente observar la enfermedad en animales jóvenes de 12 a 15 meses de edad, con alta susceptibilidad a la infección y un grado de expresión de la enfermedad muy repentino.

MORFOLOGIA Y CARACTERISTICAS GENERALES

Las micobacterias pertenecen a la clase Actinobacteria, orden Actinomycetales, familia Mycobacteriaceae, género *Mycobacterium*. *M. paratuberculosis* pertenece al complejo *M. avium* (*MAC*) el cual comprende un grupo de micobacterias patógenas para animales y para el hombre, ampliamente distribuidas en el medio ambiente. El grupo incluye: *M. avium* subsp *paratuberculosis* (*Map*), *M. avium* subsp *silvaticum* (*MAS*), *M. avium* subsp *avium*, *M. avium* subsp *hominisuis* (*MAH*) y *M. intracellulare*. *M. paratuberculosis* se caracteriza por su ácido-alcohol resistencia, alto contenido de ácidos micólicos (60 y 90 carbonos) y 69,3% de G+C (guanina-citosina) en su DNA.

Los *M. paratuberculosis* son bacilos rectos, cortos de 1-10 mm por 0,2-0,6 mm, aerobios, de lento crecimiento y presentan para su aislamiento primario dependencia de micobactina (compuesto quelante del hierro) en medios con huevo. Presenta un grado de homología genotípica mayor al 95% con *M. avium* subsp *avium* y alrededor de 8 patrones de restricción de diferencia entre ellos. El genoma de una cepa de *M. paratuberculosis* (cepa K-10) ha sido recientemente secuenciado y consiste en un DNA circular de 4,83 millones de bases y contiene alrededor de 4350 *open reading frame*. Una característica diferencial de *M. paratuberculosis* es la presencia de un segmento de inserción específico denominado *IS*900, que sirve de base para su detección por pruebas de PCR y su diferenciación por RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción).

Las características del desarrollo diferencial entre cepas de *M. paratuberculosis* aisladas con relativa facilidad de los bovinos de aquellas aisladas con mayor dificultad de los ovinos, ha hecho que se considerasen dos posibles variantes de *M. paratuberculosis*, la variedad bovina y la ovina. En ciertos casos la dificultad para cultivar *M. paratuberculosis* de animales con lesiones podría deberse a la presencia de formas metabólicas diferentes de las clásicas, las cuales poseen morfología redondeada y son deficientes de pared celular y se denominan esferoplastos. Estas formas están frecuentemente asociadas con la forma patogénica encontrada en casos de enfermedad de Crohn en humanos. Es incierto si los esferoplastos están presentes en tejidos de animales y humanos con paratuberculosis, pero los estudios de hibridación in situ con *IS*900 utilizando tejido de intestinos, hígado y linfonódulos de animales enfermos fueron positivos donde *M. paratuberculosis* no pudo ser cultivada por los métodos tradicionales, suponiéndose en estos casos la presencia de esferoplastos. La presencia de esferoplastos en animales con paratuberculosis puede representar una forma evolucionada de supervivencia con pérdida de la capa estructural externa de la bacteria para evadir la respuesta inmune del hospedador y permitir la supervivencia dentro de él.

Se ha demostrado que los esferoplastos pueden persistir en el organismo durante largos períodos de tiempo y que pueden resistir la fagocitosis mejor que las formas completas por lo que su función podría ser la de mantener una infección subclínica permaneciendo en células presentadoras de antígeno del epitelio intestinal y en determinado momento transformarse a la forma completa dando lugar a la forma clínica de la enfermedad.

INMUNOPATOLOGIA

La entrada de *M. paratuberculosis* se produce vía oral y la principal localización es el tejido linfoide del intestino delgado. Las bacterias penetran por las células epiteliales de las cúpulas de las placas de Peyer, son transferidas por macrófagos a las zonas interfoliculares, comenzando a desarrollar granulomas localizados o difusos en el resto de la mucosa adyacente dependiendo de la respuesta inmune. Esto último condiciona la manifestación de lesiones, los niveles de anticuerpos y la respuesta inmune celular en ciertas formas patológicas como las focales, multifocales, difusas multibacilares, difusas linfocíticas y difusas intermedias, estando las tres últimas asociadas a manifestaciones clínicas. Aunque no se conocen bien las causas que determinan que una infección paratuberculosa inicial evolucione en una dirección o en otra, se deduce que ello depende de factores de resistencia del animal y de componentes genéticos y ambientales.

M. paratuberculosis está adaptado a sobrevivir en el hospedador a pesar de las reacciones inmunes adversas en contra del mismo, ya que una vez que infecta a los macrófagos interfiere en su interior con la maduración del fagosoma evadiendo la primera línea de defensa del mismo contra patógenos bacterianos. El sistema inmune del hospedador comienza un ataque intenso desde los macrófagos infectados con una rápida respuesta de las distintas subpoblaciones de linfocitos gamma-delta (γδ-LT), CD4 (helper) y CD8 (citotóxicos).

Estos linfocitos interactúan con los macrófagos infectados a través de una compleja red de citoquinas y receptores celulares. *M. paratuberculosis* interfiere en la respuesta de los macrófagos para persistir dentro y el daño es transferido a las células epiteliales intestinales. Los tipos de células del sistema inmune involucradas en la respuesta del hospedador, las citoquinas que las comunican y los factores genéticos del mismo que controlan la infección son los elementos a caracterizar para comprender mejor la patogenia de la enfermedad. Después de la infección con *M. paratuberculosis* la primera respuesta es de tipo celular y con el tiempo los animales infectados establecen una respuesta humoral con desarrollo de altos títulos de anticuerpos.

En la necropsia, los casos más graves son evidentes por la caquexia, atrofia serosa y edemas. Las lesiones más específicas asientan en las porciones terminales del intestino delgado, donde se aprecia que la mucosa aparece engrosada y arrugada. Histológicamente, las lesiones son las de una inflamación granulomatosa que se localiza fundamentalmente en las zonas de tejido linfoide organizado intestinal (placas de Peyer y válvula ileocecal y linfonódulos adyacentes). Las proporciones y especialización de los dos principales tipos celulares, macrófagos y linfocitos, así como la extensión del tejido afectado, varían en función de la forma inmunopatológica presente. La carga de micobacterias presentes en las lesiones también depende de la forma inmunopatológica y oscila desde la presencia masiva de bacilos hasta la más extrema escasez. La localización más constante de las lesiones paratuberculosas, incluso de las más limitadas, es la válvula ileocecal y los ganglios linfáticos yeyunales caudales. Sin embargo, en las formas más extensas se pueden detectar lesiones no sólo en distintas regiones del intestino, sino también en otros órganos y tejidos, de entre los cuales el más comúnmente afectado es el hígado. En ocasiones se observan lesiones asociadas a paratuberculosis como calcificación del endoltelio de válvulas cardíacas y arteria aorta en su salida del corazón.



Figura 42-1. Presentación característica en forma de acúmulos de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. Microscopia electrónica de barrido (Fuente: *Int.Assoc.Paratuberculosis*).

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Para el diagnóstico de laboratorio en la práctica se disponen de métodos básicos y técnicas de biología molecular como: a) medición de la inmunidad humoral o pruebas serológicas, por detección de anticuerpos humorales por ELISA o inmunodifusión (IDA), b) pruebas bacteriológicas, por tinción con Ziehl Neelsen y cultivo de la muestra clínica en medios específicos, c) pruebas de inmunidad celular, por detección de gamma interferón en plasma, d) pruebas moleculares, por PCR y epidemiología molecular y e) técnicas histopatológicas.

Pruebas serológicas

Se aplica en bovinos adultos desde una edad aproximada de 3 años. La mayor la certeza del diagnóstico serológico se presenta cuando el animal manifiesta signos clínicos como diarrea y edema submandibular. Generalmente existe una correlación positiva entre la detección del mayor título serológico en ELISA y la mayor excreción del bacilo por materia fecal. ELISA es la prueba más utilizada en el mundo con una especificidad cercana al 90% y una sensibilidad que en términos generales es del orden del 55 al 65%, pero aumenta con los casos clínicos hasta más de 90%.

Para la detección de paratuberculosis en ovinos tanto ELISA e IDA son valiosos y ambos detectan diferentes subpoblaciones de ovejas infectadas, observándose una mayor sensibilidad con ELISA (98,2-99,5% especificidad y 35-54% sensibilidad). En Argentina el uso de ELISA indirecto en poblaciones de cérvidos infectados con *M. paratuberculosis* ha contribuido a disminuir la prevalencia desde el 18,9% hasta el 2,4% con la aplicación anual del sangrado y eliminación de positivos durante un total de 6 años.

Pruebas bacteriológicas

Tinción con Ziehl Neelsen

La observación microscópica de un frotis de materia fecal, tiene sensibilidad y especificidad bajas para incluirlas dentro del diagnóstico como única alternativa. Sin embargo, siempre debe ser utilizada para estimar la presencia de micobacterias. Por el contrario, la tinción de improntas realizadas a partir de los tejidos afectados con lesiones macroscópicas, es de utilidad en casos de paratuberculosis ya que las micobacterias son claramente

visibles dentro de los macrófagos residentes en la lesión. Sólo es considerado positivo cuando se observan bacilos fuertemente coloreados y agrupados en nidos que contienen entre 10 y 20 células bacterianas.

Cultivo

El diagnóstico denominado "*gold standard*" (prueba de oro) es el aislamiento de *M. paratuberculosis* a partir de muestras de materia fecal, leche, semen o tejidos afectados. El cultivo de la bacteria es difícil, ya que su desarrollo lento (entre 30 y 120 días) se realiza sobre medios especiales con agregado de compuestos indispensables para su desarrollo, generalmente adicionados con antibióticos. Las colonias puntiformes blanquecinas, su crecimiento lento y la dependencia a la micobactina "J" usada como cofactor de crecimiento exclusivo en *M. paratuberculosis* en medios de cultivo sólido como el Herrold, son indicadores de su presencia. El cultivo en medio Herrold debe adicionarse con piruvato y antibióticos para mejorar el crecimiento de la micobacteria e inhibir el desarrollo de contaminantes, respectivamente. Otros medios de cultivo utilizados son el Lowenstein-Jensen, Midddlebrook sólido o líquido enriquecidos o el de Watson-Reid.

A pesar de la importancia del cultivo, no existe estandarización de los métodos utilizados mundialmente y los laboratorios varían en su capacidad para la detección de *M. paratuberculosis*. Existen alternativas al cultivo individual, realizando "*pooles*" de materia fecal de 5-6 bovinos, donde se reduce sustancialmente el costo de un monocultivo. El cultivo debería ser usado para confirmar la infección en animales con resultados positivos en ELISA en las siguientes circunstancias: a) ninguna evidencia clínica, b) costo muy alto al eliminar un animal positivo, y c) inserción de un establecimiento en un programa de control voluntario de paratuberculosis.

Técnicas histopatológicas

En tinciones de rutina con hematoxilina y eosina se observa una enteritis granulomatosa de variable intensidad ubicada en los últimos tramos del intestino delgado, primeros de grueso y linfonódulos y linfáticos adyacentes. La tinción con Ziehl Neelsen es de mucha utilidad en tejidos, y como técnica de mayor sensibilidad confirmatoria la inmunohistoquímica con antisueros anti-*M. paratuberculosis* es altamente recomendable.

Pruebas de inmunidad celular

Detección del gamma interferón: es una prueba que detecta infección temprana ya que identifica una citoquina liberada por los linfocitos en el plasma sanguíneo, luego de incubarlos con el antígeno específico. La prueba es útil sobre bovinos jóvenes recientemente infectados y que aún no han desarrollado anticuerpos séricos dependientes de linfocitos B. La interpretación de un animal positivo dentro del rodeo utilizando la prueba del gamma interferón no es sencilla, ya que el análisis se debe realizar paralelamente al diagnóstico de tuberculosis, y por lo tanto se debe diferenciar al mismo tiempo ambas respuestas en la misma prueba.

Pruebas moleculares

M. paratuberculosis constituye un grupo homogéneo de micobacterias que no son posibles diferenciar claramente por métodos bioquímicos, serológicos u otras técnicas convencionales. De esta forma los métodos moleculares son de mucha utilidad para estudios epidemiológicos de esta especie. Un análisis de la diversidad molecular de las cepas de *M. paratuberculosis* aisladas de diversos animales y humanos ayuda a establecer el grado de heterogeneidad en cepas aisladas en una variedad de hospedadores susceptibles a esta micobacteria. Cepas compartidas entre diferentes hospedadores (bovinos, ciervos, ovinos, humanos) reflejarían un alto grado de transmisión entre especies.

Técnica de RFLP

Para una precisa identificación y estudios epidemiológicos de *M. paratuberculosis*, se utiliza la técnica de RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción) con la secuencia de inserción IS*900*, específica de *M. paratuberculosis* como marcador genético. Esta secuencia de inserción, presente en 15 a 20 copias en el genoma de *M. paratuberculosis*, fue utilizada para diferenciar aislamientos de bovinos y ciervos en Argentina. En este estudio epidemiológico, el RFLP-IS*900* mostró que cepas idénticas infectan bovinos y ciervos y que los genotipos encontrados en Argentina, un 75% de ellos de idéntico patrón, fueron diferentes a los presentes en otros países. La técnica de RFLP es sólo aplicable a cepas cultivadas.

Técnica de PCR

Métodos basados en PCR (reacción en cadena de la polimerasa) permiten identificar y a la vez caracterizar *M. paratuberculosis* aislados de diferentes hospedadores, incluso sin la necesidad de observar las colonias desarrolladas en el cultivo. La técnica de PCR utilizando como blanco de los primers al IS*900*, permite una rápida detección de pocas bacterias presentes en diferentes muestras clínicas tales como materia fecal, sangre, leche, tejidos y biopsias. A pesar de su especificidad, esta técnica no permite diferenciar entre aislamientos de *M. paratuberculosis*. Otro elemento de inserción denominado IS*1311*, ha sido descrito en el cromosoma de *M. paratuberculosis*, aunque este elemento de inserción no es único de estas cepas ya que también se encuentra en *M. avium* y *M. intracellulare*. El análisis de la secuencia IS*1311* en *M. paratuberculosis* de origen bovino mostró que contiene una mutación puntual adicional, que puede ser utilizada para distinguirlas de las cepas ovinas.

Otras técnicas moleculares

MIRU (unidades repetitivas micobacterianas) y VNTR (número variable de secuencias en tándem) se encuentran distribuidas en el genoma de *M. paratuberculosis* como simple copia o como múltiples repeticiones. Algunos de estos *loci* contienen variaciones en el número de repeticiones entre los aislamientos de *M. paratuberculosis*. En un estudio reciente fueron encontrados 44 *loci* VNTR-MIRU en su genoma, identificando polimorfismo en algunas de estas secuencias entre distintos aislamientos de *M. paratuberculosis* y entre esta micobacteria y otras estrechamente relacionadas como *M. avium*, demostrando que pueden utilizarse para genotipificar *M. paratuberculosis* y distinguir especies dentro del complejo *avium*.

La certidumbre del diagnóstico dependerá no sólo de la sensibilidad y especificidad de cada técnica sino de la etapa evolutiva en que se encuentren las lesiones y del tipo predominante de respuesta inmune en el momento de la toma de muestras.

M. paratuberculosis en infecciones humanas

La enteritis granulomatosa provocada por *M. paratuberculosis* en los bovinos posee una sorprendente similitud con una patología similar vista en pacientes humanos denominada enfermedad de Crohn, y por lo tanto se ha sugerido que la paratuberculosis podría ser una zoonosis. El *M. paratuberculosis* es

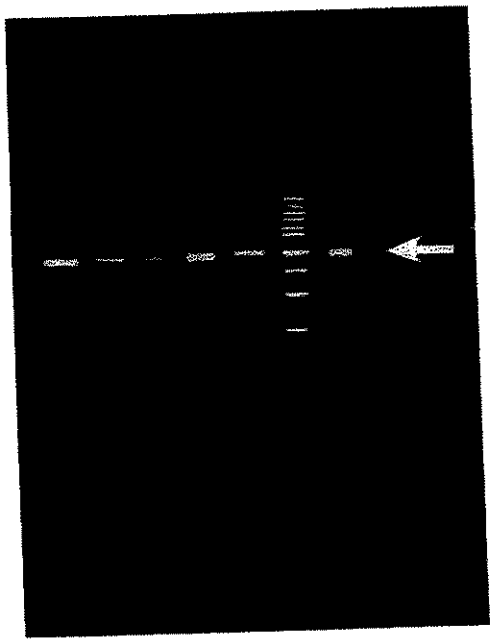


Figura 42-2. Diagnóstico molecular utilizando PCR para identificar cepas positivas al marcador IS*900* específico de *M. paratuberculosis*. La flecha indica el resultado positivo de la muestra junto al marcador de peso molecular.

excretado por la leche de vacas infectadas y presentaría cierta tolerancia térmica al tratamiento de la leche pudiendo sobrevivir a la pasteurización permaneciendo en la leche envasada que se destina a consumo humano.

En trabajos realizados recientemente en EE.UU., Irlanda y Argentina, fueron identificadas cepas bovinas de *M. paratuberculosis* por cultivo de leche comercial, lo que supone un alto riesgo para su transmisión por consumo de leches provenientes de tambos altamente infectados. Recientemente en nuestro país hemos probado a nivel experimental la eficiencia de un pasteurizador

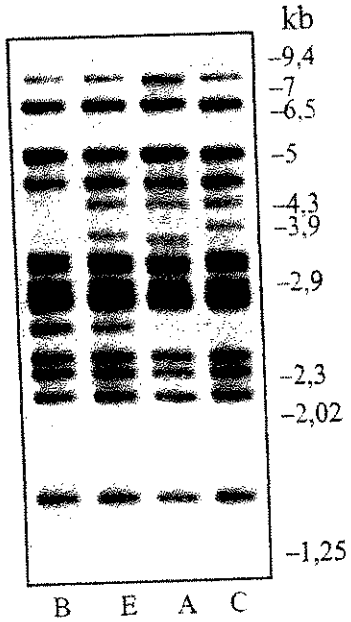


Figura 42-3. Diferentes patrones genéticos (B, E, A, C) de *M. paratuberculosis* aisladas en Argentina y tipificadas por RFLP (Ref: INTA *Vet Microbiol, 1999).*

de leche cruda en el tambo, el que demostró preliminarmente ser efectivo ya que la leche infectada artificialmente con *M. paratuberculosis* y pasteurizada a 73,5 °C por 15 a 30 segundos queda negativa al cultivo. La fuerte evidencia de que la enfermedad de Crohn en los humanos es consecuencia de la infección con *M. paratuberculosis*, ha llevado a ciertos países europeos a solicitar la importación de productos lácteos provenientes de rodeos libres de paratuberculosis y al desarrollo de proyectos nacionales de control e investigación en esta área.

PROGRAMA DE CONTROL

El control de la *M. paratuberculosis* toma tiempo y requiere de cambios en el manejo para minimizar la probabilidad de infección de terneros y detectar los adultos infectados. La vacunación no es recomendable y su uso es muy restringido en algunos países, a pesar de que ciertas evidencias sugieren que en ovinos es ventajoso debido a que disminuye el riesgo de contraer la enfermedad y también la excreción de micobacterias en materia fecal.

Pautas de manejo para el control de la paratuberculosis

Sugerencias propuestas en Argentina para el control de la paratuberculosis que han sido adoptadas de manera voluntaria por algunos productores, han resultado alentadoras en varios establecimientos lecheros y de cría bovina. Este modelo está basado en la experiencia propia, la de otros países y en las características de nuestros sistemas de producción. Algunas pautas preventivas y de manejo se resumen a continuación:

- Los terneros nacidos de madres positivas son susceptibles de contraer la enfermedad ya que en el calostro y la leche se excretan micobacterias.
- El sustituto lácteo para alimentar los terneros en el tambo disminuye la probabilidad de infección. El uso de un pasteurizador controlado para tratar la leche cruda destinada a la alimentación de terneros en las guacheras podría ser útil.
- Cuando se producen muchos casos clínicos en vaquillonas, existe probablemente una alta exposición para el contagio de las terneras destinadas a reposición.
- Siempre se deben reponer las hembras de un rodeo con "terneras hijas de vacas negativas".
- Es deseable determinar la tasa de infección en el rodeo con una técnica serológica como ELISA (la prueba de elección) para bovinos, ovinos y ciervos, eliminando los positivos.
- Todos los adultos del rodeo deben ser sometidos a ELISA y/o al cultivo de materia fecal. Usados en conjunto tendrían una sensibilidad del 60-70% para detectar infecciones subclínicas, ya que su aplicación simultánea mejora la sensibilidad en estos casos.
- En un campo infectado, los potreros muy contaminados con aguas estancadas no deben usarse para pastoreo con animales susceptibles. Los animales jóvenes (terneros, corderos y bambis) deberían ser destinados a potreros con pasturas nuevas y evitar el manejo junto con los adultos.
- Los bovinos que ingresen a cualquier establecimiento deberían tener diagnóstico negativo de paratuberculosis o bien provenir de establecimientos libres de la enfermedad al menos con 4 años de anterioridad a la compra.
- Cualquier programa de trabajo para diagnóstico y control de la enfermedad debe prolongarse durante 5 o 6 años ininterrumpidos; abandonarlo significará volver a subir

la tasa de prevalencia de la enfermedad perdiendo todo esfuerzo previo realizado.

BIBLIOGRAFIA

Chiodini RJ. Immunology: resistance to paratuberculosis. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 1996 12: 313-343.

Kennedy DJ, Benedictus G. Control of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*: infection in agricultural species Rv sci tech Off int Epiz 2001 20 (1): 151-179.

Manning EJB, Collins M. *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. Rv sci tech Off int Epiz. 2001 20 (1): 133-150.

Moreira AR, Paolicchi F, Morsella C, Zumarraga M, Cataldi A, Bigi F, Alito A, Overduin P, van Soolingen D, Romano MI. Distribution of IS900 restriction fragment length polymorphism types among animal *Mycobacterium* subsp *paratuberculosis* isolates from Argentina and Europe. Vet Microbiology. 1999 70: 251-259.

Paolicchi F, Zumarraga M, Gioffre A, Zamorano P, Morsella C, Verna A, Cataldi A, Romano M. Different methods for the diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in a dairy cattle herd in Argentine. J Vet Med "B", 2000 50:20-26.

Paolicchi F, Vagnozzi A, Morsella C, Verna A, Massone A, Porstiansky E, Gimeno E. Paratuberculosis in red deer (*Cervus elaphus*): an immunohistochemical study. J Vet Medicine "B", 2001 48(4): 241-340.

Paolicchi F, Morsella C, Verna A, Spath E, Martinis D, Zumarraga M, Gioffre A, Cataldi A, Romano M. Diagnosis, Epidemiology, and Program of Control of Paratuberculosis in Bovine Herds of Argentina. 7° International Colloquium on Paratuberculosis, Bilbao, España, junio 2002.

Paolicchi F, Verna A, Morsella C, Cipolla A, Seguro R, Gonzalez A. Sobrevivencia de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* en leche bovina sometida a pasteurización y destinada a la alimentación de terneros. XIV Reunión Científica de la Asociación Argentina de Laboratorios de Diagnóstico, Va.Gral Belgrano, Córdoba. Noviembre 2002.

Pavlík I, Horvathova A, Dvorska L, Svatova P, R du Maine, Fixa B, Rychlik I. Homogeneity /Heterogeneity of *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* Strains: Correlation Between RFLP-type and Source (Animal, Environment, Human). Proceedings of the Sixth International Colloquium on Paratuberculosis. February 14-18, Melbourne, Australia. 1999 p. 321-329.

Pérez V, Tellechea J, Badiola JJ, Gutierréz M, García-Marín JF. Relation between serological response and pathological finding in sheep with naturally acquired paratuberculosis. Am J Vet Res 1997 60: 123-127.

Verna A, Morsella C, Casaro A, Paolicchi F. Tipificación de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* a partir de aislamientos de materia fecal y órganos de ciervos. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 2001 35(4): 531-540.

Yayo Ayele W, Machackova M, Pavlik I. The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. Vet Med Czech, 2001 46:205-224.

Capítulo 43

MICOPLASMAS

Raúl Oscar Cerdá

INTRODUCCION

Los micoplasmas son microorganismos procariotas muy particulares por el hecho de carecer de pared celular, poseer un tamaño y un genoma extremadamente pequeños, requerir medios de cultivo altamente enriquecidos, formar colonias microscópicas y de morfología muy peculiar (forma de "huevos fritos") y ser parásitos extracelulares de casi todas las especies animales. Los primeros aislamientos en medios artificiales fueron realizados por Nocard y col. (1898) a partir de ganado bovino con síntomas de pleuroneumonía contagiosa bovina (PCB); hasta ese momento se lo consideraba como un virus filtrable ya que debido a la falta de una pared rígida y su pequeño tamaño podía atravesar fácilmente los filtros de membrana de 0,45 µm. A partir de ese momento diversos investigadores lograron aislar microorganismos similares de diferentes especies animales por lo cual llamaban a sus aislamientos como PPLO, sigla que corresponde al término en inglés "Pleuropneumonia-like organisms" (organismos similares a los de la pleuroneumonía).

EPIDEMIOLOGIA

A pesar de la poca viabilidad de los micoplasmas fuera de su hospedador, su diseminación e infectividad son muy altas así como también su resistencia a las respuestas del sistema inmunitario y a los tratamientos antibióticos para su control y erradicación. La principal vía de infección es la respiratoria por inhalación de aerosoles contaminados con micoplasmas, o por el contacto directo con animales infectados o fomites. El calostro o la leche son fuentes importantes de infección en rumiantes pudiendo contener entre 10^8 y 10^{10} UCC (unidades de cambio de color). En las aves es muy importante la transmisión transovárica, que permite una alta diseminación de este agente desde los planteles de aves reproductoras a su progenie.

Si bien los micoplasmas se caracterizan por ser altamente especie-específicos, la habilidad de algunas especies por compartir hospedadores es particularmente relevante en infecciones de ovejas, cabras y bovinos.

La micoplasmosis se caracteriza por ser una enfermedad de curso crónico y preferentemente de animales confinados o en sistemas de producción intensiva; ocasiona grandes pérdidas económicas por bajas en los parámetros productivos, costos por vacunaciones o tratamientos antibióticos, decomisos en frigoríficos, mortandad, etc.

Las especies de mayor patogenicidad por especie animal se detallan en la tabla 43-1.

Debido a su alta patogenicidad y las pérdidas económicas que ocasionan, los brotes de pleuroneumonía contagiosa bovina (PCB) son de declaración obligatoria y los rebaños infectados deben ser sacrificados.

Varios países de Europa, Oceanía y América con tradición ganadera presentaron brotes de esta enfermedad, pero mediante medidas de sacrificio y cuarentenas lograron extinguirla. No obs-

Tabla 43-1. Especies de micoplasmas de mayor patogenicidad

Especie	Animal	Enfermedad
M. mycoides subsp *mycoides (SC)**	Bovinos	Pleuroneumonía contagiosa (PCB)
M. bovis		Neumonía en terneros, mastitis
M. bovigenitalium		Neumonía en terneros, mastitis
M. mycoides subsp *mycoides (LC)***	Cabras	Pleuroneumonía, artritis, mastitis (PCC)
M. capricolum subsp *capripneumoniae*		Pleuroneumonía
M. agalactiae	Cabras y ovejas	Agalactia contagiosa
M. ovipneumoniae	Ovejas	Neumonía en corderos
M. hyopneumoniae	Porcinos	Neumonía enzoótica (NEP)
M. hyosinoviae		Artritis
M. gallisepticum	Aves	Enfermedad respiratoria crónica (ERC)
M. synoviae		Sinovitis infecciosa (SI)
M. pulmonis	Ratas y ratones	Neumonía

* SC= *small colony* (colonia pequeña), ** LC= *large colony* (colonia grande)

tante, en muchos países africanos continúan observándose brotes. No existen informes de brotes en la República Argentina.

La pleuroneumonía contagiosa caprina (PCC) se ha presentado en forma repetitiva en brotes endémicos en África y en el Medio Oriente. En América se han reportado brotes en Estados Unidos, República Dominicana y Brasil pero no en la República Argentina.

La agalactia en cabras y ovejas se ha observado en el continente africano, el área costera mediterránea y en países asiáticos.

La neumonía enzoótica porcina (NEP) y la enfermedad respiratoria crónica (ERC) de las aves se encuentran diseminadas en prácticamente todos los países del mundo donde se crían estos animales en forma intensiva. Si bien existen programas oficiales de control y erradicación en varios países, la declaración de brotes y el sacrificio de aves reproductoras infectadas con *M. gallisepticum* o *M. synoviae* es cada vez menos frecuente debido al alto costo de esta práctica. Esto ha permitido que estas especies se encuentren ampliamente diseminadas en el mundo, de manera especial en regiones con alta humedad relativa ambiente y con elevada densidad de granjas.

CLASIFICACION

Los micoplasmas fueron separados de la Clase Schizomycetes en el año 1967 y ubicados en una nueva categoría, la Clase Mollicutes, nombre que hace referencia a sus características morfológicas (*molli*: blando; *cutes*: piel).

Según la última actualización del "*Subcomité de Taxonomía de los Mollicutes*" (2003), esta clase se divide en 4 órdenes, 7 familias y 8 géneros, con un total hasta el presente de 190 especies clasificadas y unas 24 aún sin clasificar. Dentro de la Clase Mollicutes sólo las especies de las familia Mycoplasmataceae y Acholeplasmataceae tienen importancia en Medicina Veterinaria. La primera familia se divide, a su vez, en dos géneros, *Mycoplasma* con tropismo por el colesterol y en la que se encuentran las principales especies patógenas y *Ureaplasma* caracterizado por hidrolizar la urea y en la cual se conocen 7 especies de humanos, bovinos, gatos y aves de corral.

Las especies de la familia Acholeplasmataceae se caracterizan por no requerir colesterol para su desarrollo y por ser saprófitos o patógenos oportunistas de distintas especies animales. El resto de las familias pertenecientes a esta clase y nombradas en la tabla 43-2, corresponden principalmente a especies presentes en plantas e insectos.

MORFOLOGIA

Los micoplasmas son microorganismos pleomórficos debido a la falta de una pared celular rígida. Sin embargo, en condiciones de isotonicidad la forma típica de la mayoría de las especies es entre redonda y cocoide y de unos 0,3 a 1 µm de diámetro. Existen formas filamentosas como en la especie *mycoides* con aspecto de hifas de hongos con ramificaciones de hasta unos 100 µm de longitud. Algunas especies presentan una forma piriforme con una esfera en un punto extremo llamada estructura terminal el cual se considera que actúa como elemento de fijación a las células del hospedador (*M. gallisepticum*). La célula está recubierta por una membrana trilaminar lipoproteica. En la capa externa se ubican distintos tipo de proteínas entre las que se destacan las de citoadhesión, fundamentales en los procesos de colonización de tejidos. Algunas especies presentan una estructura capsular. En el citoplasma se observan ribosomas y el DNA circular de doble filamento se presenta en la parte central del citoplasma y se caracteriza por su reducido tamaño ($5x10^8$). Presentan escasa afinidad por los colorantes de anilina por lo cual la coloración de Gram no se utiliza ya que no los tiñe o sólo lo hace débilmente. La técnica más adecuada para su tinción es la de Giemsa modificada y la inmunofluorescencia.

Las colonias de micoplasmas se caracterizan por su pequeño tamaño (0,06-0,4 mm) y su forma peculiar de "huevo frito" en la mayoría de las especies.

INMUNIDAD

Debido a su bajo poder inmunogénico por tratarse de estructuras tan simples y carecer de pared celular, la respuesta inmunológica no es muy buena. Esto también puede deberse a la ubicación tan superficial que presentan los micoplasmas sobre los tejidos. Sin embargo, los animales que se recuperan de la enfermedad se hacen relativamente resistentes a la reinfección. No obstante, animales con altos títulos de anticuerpos pueden infectarse y las vacunas producidas en base a microorganismos muertos para muchas especies de micoplasmas no son suficientemente seguras. Teniendo en cuenta que la mayor parte de los anticuerpos se forman en los tejidos afectados y en los ganglios linfáticos, las vacunas en base a microorganismos vivos, como las recientemente obtenidas para las especies aviares (*M. gallisepticum* y *M. synoviae*), tienen mayor efectividad ya que se replican en las mucosas respiratorias generando producción de inmunoglobulinas locales, IgG e IgA. La inmunidad celular también parece tener algún tipo de actividad sobre los micoplasmas, en especial en las infecciones del tracto respiratorio.

PATOGENESIS

En términos generales los micoplasmas no son gérmenes altamente virulentos debido a la falta de factores de virulencia como cápsulas y toxinas o enzimas agresivas, con excepción de algunas especies (por ej., *M. mycoides* subsp *mycoides*). Por tal motivo las enfermedades que ocasionan son de curso crónico y su mayor o menor gravedad dependerá de factores asociados como el manejo de los animales (densidad poblacional, temperatura, humedad, concentración de amoníaco ambiental, estrés, etc.), la edad de los mismos, la época del año (mayor agresividad en épocas frías) y especialmente infecciones secundarias víricas o bacterianas.

Los tejidos que afectan principalmente los micoplasmas son los respiratorios, genitales y articulares. Según el grado de patogenicidad se pueden diferenciar tres grupos:

- Altamente patógenos, los que ocasionan las enfermedades más graves y son patógenos primarios.
- Patógenos oportunistas que pueden encontrarse en animales sanos y bajo ciertas circunstancias especiales (inmunodepresión, estrés, infecciones mixtas), y que pueden ocasionar enfermedad.
- No patógenos, se encuentran como microorganismos normales en mucosas respiratoria o genital.

Los principales factores de virulencia asociados a los micoplasmas patógenos son la adhesión, las toxinas y productos metabólicos y la resistencia a la fagocitosis.

La **adhesión** o poder de fijación a las superficies celulares es un factor indispensable que permite a los micoplasmas iniciar la infección y colonización de los tejidos (fig. 43-1). Los mecanismos de adhesión varían según la especie de micoplasma y el tipo de célula hospedadora, pero en general están dirigidos por la presencia de proteínas en la superficie de la membrana celular de los micoplasmas (proteínas de citoadhesión). Estas se unen a receptores de sialoglicoproteínas de la célula hospedadora (mucosa

Tabla 43-2. Clasificación de la Clase Mollicutes

Clase Mollicutes	Orden I Mycoplasmatales	Familia I Mycoplasmataceae	Género I (112 especies) *Mycoplasma*
			Género II (7 especies) *Ureaplasma*
	Orden II Entomoplasmatales	Familia I Entomoplasmataceae	Género I (6 especies) *Entomoplasma*
			Genero II (12 especies) *Mesoplasma*
		Familia II Spiroplasmataceae	Género I (34 especies) *Spiroplasma*
	Orden III Acholeplasmatales	Familia I Acholeplasmataceae	Género I (14 especies) *Acholeplasma*
	Orden IV Anaeroplasmatales	Familia I Anaeroplasmataceae	Género I (4 especies) *Anaeroplasma*
			Género II (1 especie) *Asteroleplasma*

Candidatos dentro de la clase Mollicutes: Género *Mycoplasma* (5), Género *Phytoplasma* (8), Grupos sin nombre dentro del género *Spiroplasma* (11)

respiratoria, eritrocitos, macrófagos, linfocitos, etc.) sensibles a la acción de la neuraminidasa (*M. pneumoniae, M. gallisepticum*); en otros lo hacen por mecanismos sobre los que no influyen la neuraminidasa (*M. hominis, M. salivarium, M. pulmonis*).

Las pocas **toxinas** reconocidas como factores de virulencia en los micoplasmas incluyen: hemolisinas; el galactano capsular de *M. mycoides* subsp *mycoides*, una glicoproteína de *M. bovis* y un lipoglucano de las especies de *Acholeplasma* que produce un efecto similar al de las endotoxinas, una exotoxina o neurotoxina proteinácea termolábil en *M. neuroliticum*.

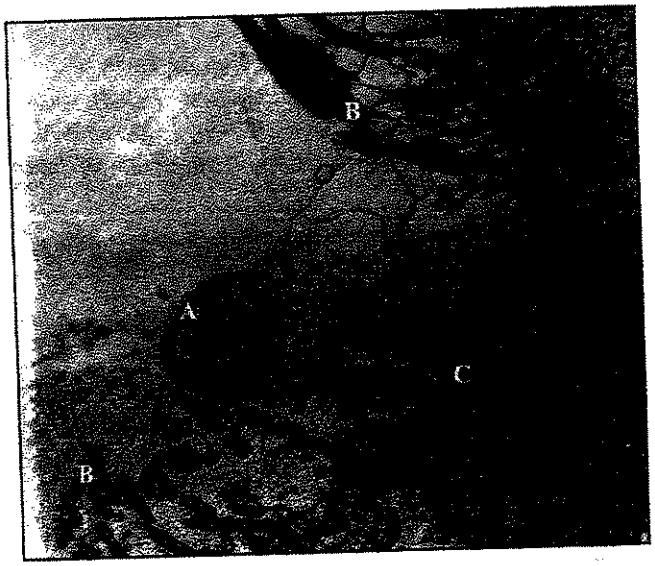


Figura 43-1. Microfotografía electrónica de una sección de tejido traqueal infectado con *M. gallisepticum*. Se observa la adhesión de las células de micoplasma (A) sobre las cilias (B) y la superficie del epitelio traqueal (C).

La producción de **metabolitos tóxicos** como el peróxido de hidrógeno que daña la membrana celular por oxidación de los lípidos de la célula hospedadora y el oxígeno activado que penetra en las células inhibiendo la actividad de las catalasas permitiendo que se acumule el peróxido de hidrógeno, son considerados importantes factores de virulencia.

La **resistencia a la fagocitosis** es una característica estudiada en varias especies y desempeña un papel importante en la cronicidad de las infecciones. Tal resistencia parece estar dada por polisacáridos de envoltura o sus productos solubles.

Otros mecanismos de patogenicidad estudiados son la **capacidad mitogénica** sobre linfocitos lo cual exacerba las respuestas inflamatorias; la generación en el hospedador de **autoanticuerpos** que reaccionan contra antígenos de membrana de los eritrocitos, linfocitos, músculo liso, tejido cerebral y pulmonar y la formación de **inmunocomplejos** que se depositan sobre los tejidos causando daño tisular.

En resumen, todos los mecanismos de virulencia detallados anteriormente generan lesiones tisulares superficiales y reacciones inmunológicas exacerbadas que originan las distintas presentaciones de enfermedades respiratorias, urogenitales y articulares (neumonía, pleuresía, serositis, aerosaculitis, alveolitis, queratitis, conjuntivitis, artritis, sinovitis, mastitis, salpingitis, ooforitis, vaginitis y uretritis). Se considera que la alteración del sistema inmunológico conduce a una progresiva inmunodepresión lo cual sumado al daño tisular incentiva la acción de patógenos secundarios que agravan la enfermedad.

ASPECTOS CLINICOS

Como se mencionó anteriormente, las enfermedades causadas por la mayoría de las especies de micoplasmas son de curso crónico y los períodos de incubación son muy variables ya que en general

requieren de un factor estresante o asociado para que se manifiesten los signos clínicos. En líneas generales, el período de incubación puede ser de algunos días (10-12) hasta semanas e incluso meses. En las presentaciones más suaves los únicos indicadores de infección suelen ser las bajas de productividad (disminución de ganancia de peso, aumento de conversión alimenticia, caída de producción láctea y de huevos, infertilidad, abortos, etc.). La morbilidad por lo común es muy alta afectando a prácticamente todos los animales de un lote, pero la mortalidad es muy baja siempre que no involucre infecciones secundarias. En el caso de la pleuroneumonía contagiosa bovina las manifestaciones clínicas son importantes, con producción de fiebre con temperaturas de hasta 41 °C, inapetencia, tos dolorosa, secreción nasal mucosa líquida, disnea, los animales dejan de comer y se detiene la rumiación y la producción láctea. Cuando se agrava el estado los animales se echan de lado, la temperatura aumenta a 42 °C y mueren luego de una caída abrupta de la temperatura corporal.

En la enfermedad respiratoria crónica (ERC) de las aves por *M. gallisepticum* los síntomas respiratorios varían según las cepas pudiendo llegar a ser muy fuertes con tos, estornudos, ruidos respiratorios y descargas nasales y oculares. La morbilidad suele ser muy alta y la mortalidad puede llegar a un 20-30%. La sinovitis infecciosa (SI) por el *M. synoviae* en general es muy benigna presentándose mayormente como patógeno oportunista a nivel respiratorio. Sólo un bajo porcentaje de cepas afectan las articulaciones ocasionando cuantiosas pérdidas económicas. Las articulaciones más afectadas son la almohadilla plantar y la del corvejón, pudiendo lesionar también la bolsa esternal y las articulaciones del ala.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Teniendo en cuenta que el diagnóstico clínico es muy difícil por la inespecificidad de los síntomas, el diagnóstico de laboratorio es una herramienta fundamental en el control de estos microorganismos. Las técnicas consisten en: 1) aislamiento e identificación; 2) técnicas serológicas para detección de anticuerpos y 3) técnicas moleculares para detección de DNA.

Aislamiento

Esta técnica tal vez sea la menos empleada como método de diagnóstico debido a varios factores adversos como son los altos requerimientos nutritivos de los micoplasmas, la presencia de numerosas especies saprófitas de micoplasmas en los tejidos que dificultan el crecimiento de las especies patógenas, las contaminaciones bacterianas, la alta sensibilidad a las condiciones de transporte e incubación, el lento desarrollo, la necesidad de personal entrenado, etc. Sin embargo, esta técnica sigue siendo de mucha importancia en el diagnóstico y especialmente para fines de investigación o estudios de sensibilidad a antimicrobianos o epidemiológicos. Existen numerosos medios de cultivo especiales para el aislamiento de las distintas especies de micoplasma (Friss, Hayflicks, Chanock, Frey, etc.). Son todos medios muy enriquecidos para brindar a cada especie los sustratos necesarios para cubrir sus requerimientos. Los constituyentes comunes a todos los medios son una base nutritiva proteica (caldo PPLO), extracto de levadura que aporta coenzimas, suero porcino que posee altas concentraciones de colesterol, vitaminas y otros aditivos como inhibidores de contaminantes (acetato de talio y penicilina). Para especies con altos requerimientos (por ej., *M. synoviae*) es indispensable adicionar cisteína y NADH; para los micoplasmas bovinos se requiere adicionar preparados de DNA y para las especies del género *Ureaplasma* el agregado de urea. Según los requerimientos fisiológicos puede adicionarse glucosa o arginina como fuente de energía.

Las muestras a tomar consisten en hisopados de mucosa traqueal, vaginal, uretral, aspiraciones de articulaciones, leche, etc. Estas muestras deben enviarse en medios de transporte con suficiente humedad y refrigeradas y en un plazo no mayor de 24 a 48 horas. En el laboratorio se siembran medios líquidos realizando varias diluciones y sólidos. Las placas con medio sólido se incuban en cámara húmeda a 36 °C y normalmente en presencia de un 10% de CO_2 durante 3 a 7 días o hasta observar la presencia de colonias microscópicas con la morfología típica. La identificación final más empleada es mediante la técnica de inmunofluorescencia directa o indirecta que se practica sobre las mismas colonias en la placa de agar. Si no se cuenta con un microscopio de inmunofluorescencia se pueden clonar las cepas aisladas y realizar pruebas bioquímicas (tropismo por el colesterol, fermentación de la glucosa, hidrólisis de la arginina y de la urea, actividad de fosfatasa, reducción del tetrazolium, producción de "film and spot" –fig. 43-2, etc.) y serológicas (inhibición del crecimiento o del metabolismo).

Técnicas de diagnóstico serológico

Estas son las técnicas más comúnmente empleadas para el diagnóstico de micoplasmosis en las diferentes especies animales debido a su practicidad, rapidez y economía. Consisten en detectar la presencia de anticuerpos específicos en sueros de animales sospechosos mediante antígenos conocidos de micoplasma. Las pruebas más empleadas en el diagnóstico de la PCB han sido la fijación del complemento (FC), la prueba de precipitina y la aglutinación. La FC ha sido la de mayor valor diagnóstico, sin embargo ninguna de estas pruebas es totalmente específica y de uso rutinario. El estudio actualmente más utilizado en cerdos para el diagnóstico de la NEP es el ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), que es de sumo valor para establecer perfiles serológicos dentro de una granja, conocer los títulos de anticuerpos calostrales y evaluar los planes de vacunación. En las aves de corral la prueba más empleada para la detección de *M. gallisepticum* y *M. synoviae* es la aglutinación rápida en placa (ARP) y el ELISA. Por ser altamente sensibles estas técnicas se utilizan como pruebas tamiz confirmándose luego los sueros positivos mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH) la cual es menos sensible que las anteriores pero muy específica.

Técnicas moleculares para detección de DNA

Debido a las dificultades para su aislamiento y a los resultados muchas veces dudosos de las pruebas serológicas, las técnicas moleculares para detección de DNA micoplásmico en tejidos

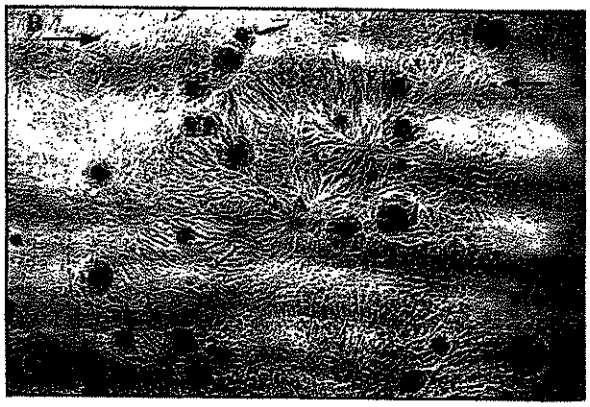


Figura 43-2. Observación de colonias de *M. synoviae* de 10 días de incubación con producción de "*film and spot*". (A) film, (B) spot.

de animales sospechosos son hoy en día las de elección para el diagnóstico de estos agentes. Entre las técnicas moleculares más empleadas se encuentran la hibridación con sondas de DNA marcadas y la PCR o reacción en cadena de la polimerasa. Esta última ha tenido en los últimos años una gran aceptación debido a sus grandes ventajas como su rapidez (obtención de resultados en menos de 24 horas), alta sensibilidad y especificidad. Para muchos países su mayor desventaja sigue siendo su costo y la falta de personal entrenado. Como para otros microorganismos, la prueba consiste en la amplificación de pequeños fragmentos muy específicos del DNA micoplásmico mediante el empleo de un termociclador y su detección final o revelado sobre geles de agarosa.

TRATAMIENTO

Los micoplasmas han demostrado sensibilidad in vitro a varios antibióticos tales como tetraciclinas (clortetraciclina, oxitetraciclina, doxiciclina), quinolonas (enrofloxacina, norfloxacina, danofloxacina), lincosamidas (lincomicina), pleuromutilinas (tiamulina) y macrólidos (eritromicina, espectinomicina, espiramicina, kitasamicina, josamicina, tilosina, tilmicosina, valosina). Sin embargo, muchos de estos compuestos han perdido eficacia en los tratamientos a campo. En la actualidad las drogas consideradas de elección son algunas del grupo de los macrólidos, la tiamulina y la lincomicina. Estas drogas son usadas extensivamente en producción avícola y porcina ya sea en tratamientos preventivos o curativos, en el agua de bebida, el alimento o en forma inyectable en casos agudos. Si bien los antibióticos mejoran considerablemente los índices productivos y controlan los signos clínicos de la enfermedad, es difícil asegurar que se puedan erradicar o eliminar totalmente los micoplasmas presentes en los animales de una granja.

PROFILAXIS

Las vacunas contra PCB (cepa atenuada T1 de *M. mycoides* subsp *mycoides*) es efectiva en la prevención de la enfermedad. La cepa vacunal F38 inactivada se emplea en la prevención de PCC.

Existen numerosas bacterinas comerciales contra *M. hyopneumoniae* que confieren distintos grados de protección lo cual se ve reflejado en la disminución de las lesiones pulmonares y en la mejora de los índices productivos. No obstante, ninguna previene la infección de los animales y aún existen discrepancias sobre los distintos planes de vacunación.

También se cuenta con bacterinas comerciales para *M. gallisepticum* y *M. synoviae* las cuales son útiles para mejorar los índices productivos en lotes infectados pero no son eficaces para impedir la infección ni para desplazarla. Asimismo existen vacunas vivas en base a cepas mutantes termosensibles para *M. gallisepticum* (ts-11) y *M. synoviae* (MS-H) como también una cepa avirulenta para *M. gallisepticum* (6/85). Se aplican por vía ocular o en el agua de bebida entre las 4 y 16 semanas de vida y por única vez. Estas vacunas han demostrado proteger contra las lesiones producidas por los micoplasmas mejorando de esta manera los parámetros productivos y disminuyendo la transmisión vertical. Se requieren más estudios para conocer su real eficacia.

Si bien las medicaciones antimicoplásmicas y las vacunas logran controlar las infecciones y mejorar los parámetros productivos, sólo la obtención de animales libres de enfermedad y su control mediante medidas de estricta bioseguridad pueden garantizar una buena rentabilidad en la producción intensiva. Dentro de ésta se debe considerar la distancia con granjas vecinas, la cual no debería ser menor a los 3 km, distancia de caminos, lavado y desinfección de camiones que ingresan a la granja así como también de todo material o equipo, control de roedores, insectos y aves silvestres, vacío y desinfección total de galpones, control de personal mediante baño y cambio de ropa. Es importante resaltar que si bien los micoplasmas son muy sensibles a los desinfectantes de uso común (formalina, fenoles, cresoles, ácido peracético, yodóforos), en lugares mal desinfectados pueden permanecer por varios días en forma viable e inclusive ser transportados por los insectos y roedores.

BIBLIOGRAFIA

Cerdá RO, Giacoboni GI, Xavier JA, Sansalone PL, Landoni MF. *In vitro* antibiotic susceptibility of field isolates of *Mycoplasma synoviae* in Argentine. Avian Dis. 2002; 46: 215-218.

Cerdá RO, Xavier JA, Petruccelli MA, Etcheyvrrigaray ME. Aislamiento de *Mycoplasma synoviae* de pollos parrilleros y gallinas reproductoras. Primera comunicación en la República Argentina. Analecta vet. 1998; 18,1/2: 41-46.

Delgiudice R, Barile M. Immunofluorescence. In: Methods in Mycoplasmology. First edition. Academic Press Inc. New York (USA) 1983; 1: 431-439.

Frey MC, Hanson R, Anderson DP. A medium for the isolation of avian *Mycoplasmas*. Am J Vet Res. 1968; 29: 2164-2171.

García M, Jackwood MW, Kleven SH, Levisohn S, Johansson KE. Detection of *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae* and *M. iowae* by polymerase chain reaction and species-specific oligonucleotide probes. IOM Lett. 1994; 3: 480.

Kiarie M. Monoclonal antibodies to surface-exposes proteins of *Mycoplasma mycoides* subsp *mycoides* (small-colony strain) which causes contagious bovine pleuropneumonia. Clin Diagn Lab Immunol. 1996; 3 (6): 746-752.

Koshimitzu K. Familia *Mycoplasmataceae*. En Temas de Microbiología Veterinaria. Ed: Stanchi NO y col. 1° ed. 1996; pp. 369-382.

Morrow CJ, Markham JF, Whithear KG. Production of temperature-sensitive clones of *Mycoplasma synoviae* for evaluation as live vaccines. Avian Dis. 1998; 42: 667-670.

Nicolet J. Compendio de Bacteriología Médica Veterinaria. Ed. Acribia, España, 1986, p. 225-241.

Skelly B, Andersen D, Pruss M, Pellegrino R. Prophylactic efficacy of 3-Acetil-4"-Isovaleryl Tylosin in a *Mycoplasma gallisepticum*-Induced Airsacculitis Infection. Avian Dis 1986; 3: 505-509.

FORMAS-L BACTERIANAS

Heiji Sato

INTRODUCCION

Las formas-L bacterianas constituyen una fase bacteriana en la que su pared celular es defectuosa. Muchos microbiólogos y patólogos ya se habían concientizado del significado etiológico de las formas-L en la patología crónica o aguda. El estudio de las formas-L requiere en forma urgente el desarrollo de nuevos modelos experimentales y nuevas técnicas de investigación.

Cincuenta años atrás el premio Nobel Klieneberger aisló colonias minúsculas que recordaban a los organismos causales de la pleuroneumonía bovina de un cultivo de *Streptobacillus moniliformis*. Estas parecían estar creciendo en simbiosis con un bacilo y fueron llamadas L1.* Dienes aisló con éxito colonias en forma-L a partir de muchas otras especies bacterianas y demostró que regresaban a la forma bacilar. Este descubrimiento abrió el camino para una nueva comprensión de la morfología bacteriana y del proceso productivo y muchos investigadores fueron estimulados para estudiar estos fenómenos.

Dos observaciones importantes jugaron un papel crítico en el progreso producido en este campo. Uno fue el descubrimiento de la penicilina que puede inducir la transformación del *Streptobacillus* a forma-L y este hecho fue luego confirmado en muchas otras especies bacterianas. El segundo avance fue el reconocimiento de la necesidad de una protección osmótica para el desarrollo y crecimiento de la forma-L de algunas especies bacterianas (tabla 44-1).

Algunas especies requieren de sueros animales en el medio. También se encontró que esa exposición de bacterias a los efectos de productos químicos bacteriostáticos, antibióticos de inhibición de síntesis de pared celular, aminoácidos, lisozima y otras enzimas muralíticas, a bacteriófagos y sueros hiperinmunes también resultaría en la inducción y crecimiento de formas-L bajo ciertas condiciones como un entorno hiperosmolar.

CLASIFICACION

La terminología o definición de las formas-L es aún controvertida. Una forma-L puede definirse como un tipo especial de crecimiento derivado o inducido en una bacteria seguido de la supresión de su rígida pared celular.

Las colonias de formas-L se asemejan a aquellas del micoplasma y pueden propagarse indefinidamente en presencia del agente inductor en medios apropiados. Alternativamente, cuando el agente inductor es retirado, una forma-L puede retornar a la forma madre bacteriana intacta o se puede transformar en una forma también llamada **forma-L estable**. La forma-L que revierte es llamada **forma-L transitoria**.

Algunos investigadores distinguen a la forma-L en dos tipos:

El **esferoplasto** o forma-L que tiene pared celular parcialmente incompleta.

El **protoplasto** o forma-L que se definió como una carencia completa de pared celular.

El término de "bacteria deficiente en pared celular" es utilizado para describir una variedad de formas bacterianas que muestran morfología anormal y/o requieren de protección osmótica para

Tabla 44-1. Avances en el descubimiento de las formas-L

* Las penicilinas son los agentes inductores más efectivos. Otros antibióticos que interfieren con la síntesis de la pared celular, como la cicloserina, ristocetina, bacitracina, vancomicina y la cefalosporina, han sido también utilizados.

* Alta concentración de aminoácidos, principalmente glicina y fenilalanina y otros agentes como lisostafin y peptidasa, también han sido utilizados en la producción de formas-L.

* Las formas-L pueden ser inducidas por enzimas líticas que digieren el ácido murámico (mureina) de la pared de la célula bacteriana. En *Streptoccocus* la enzima muralítica asociada a bacteriófagos es también efectiva.

* Muchas bacterias gramnegativas pueden convertirse a forma-L en medios con osmolaridad normal o fisiológica. La mayoría de la bacterias grampositivas y algunas gramnegativas requieren mayor protección osmótica para el crecimiento de formas-L.

* El cloruro de sodio, la sucrosa (sacarosa), el magnesio (Mg^+), y la combinación de cloruro sódico, sucrosa magnesio (Mg^+) también resultaron exitosos. La polivinilpirrolidona (PVP) y el polietilenglicol (PEG) demostraron ser útiles como estabilizadores osmóticos.

* L de Instituto Lister

su crecimiento. Tales variantes bacterianas han sido aisladas de especimenes clínicos.

Es muy importante saber que la forma-L representa probablemente una mezcla de organismos de considerable variabilidad que no pueden ser equivalentes excepto en caso de formas-L estables.

Las propiedades de las formas-L pueden estar influenciadas en gran medida por factores físicos, ambientales y biológicos. De los puntos anteriormente mencionados, se debe comprender que el estado actual de nuestro conocimiento de las formas-L es insuficiente y los investigadores deberían incluir mucha más información sobre el tema.

INDUCCION DE LAS FORMAS-L

La inducción y el mantenimiento de formas-L en diversas especies bacterianas no es igual; la llave para el éxito es el ensayo y error. En general, las formas-L son inducidas exponiendo la bacteria a un agente inductor en un medio apropiado. Los requisitos importantes del medio incluyen la consistencia adecuada del gel de agar, la presencia de suero animal y la correcta osmolaridad.

MORFOLOGIA Y ULTRAESTRUCTURA

La morfología de la colonia se asemeja a un micoplasma; la porción central de la colonia está incorporada en el agar y la forma usual es la apariencia de "huevo frito". Sin embargo, la configuración de las colonias es variable, las especies muestran diferencias así como el método de inducción del medio y la historia de los pasajes pueden ser factores importantes. La morfología de la célula es pleomórfica.

REPRODUCCION Y REVERSION

Los mecanismos de multiplicación de la célula parecen variar de división binaria o asimétrica a brotación o segmentación de los cuerpos densos pequeños desde formas esféricas grandes. Sin embargo, el ciclo de vida de las formas-L no está totalmente claro.

Se ha observado que la fase celular de la forma-L es filtrable, probablemente debido a su pequeña forma y/o a su plasticidad celular. Tampoco es bien conocido todavía cómo el genoma se segrega en la formación de nuevos y viables elementos de formas-L. Muchos factores parecen estar involucrados en los procesos de reversión al estado bacteriano. La evidencia para la pérdida de reversibilidad apunta a una alteración genética de las formas-L estables.

ASPECTO GENETICO DE LAS FORMAS-L

La diferencia genética entre bacterias individuales en una población puede ser decisiva en la producción de formas-L. Varios informes sugieren el control genético en la conversión de las formas-L.

La forma-L estable de *Streptococcus pyogenes* mostró ser defectuosa en una etapa importante de la síntesis de pared celular. Inversamente, hay un informe interesante que muestra que la reversión de la forma-L del *Bacillus subtilis* es inducida por el uso del material de la pared celular de *B. subtilis* como un promotor de regeneración de pared de la célula. En la actualidad todavía existen estudios pendientes en el nivel molecular, las investigaciones futuras aclararán este punto. Sin embargo, parece ser muy lucrativo el uso de las formas-L como modelos genéticos para importantes estudios de transformación, transducción, infección por fagos y en tecnología de DNA.

PATOGENICIDAD

En general, las formas-L han fallado en mostrar patogenicidad a menos que la reversión a bacteria ocurra in vivo. Por otra parte, las formas-L de ciertas bacterias retienen la patogenicidad potencial de la bacteria madre. Por ejemplo, la producción de toxina es retenida por la forma-L de clostridios y *Corynebacterium dyphtheriae*. La forma-L de *Streptococcus pyogenes* es capaz de producir tanto proteína M como estreptolisina. Con ciertos factores como la exposición a antibióticos y a enzimas celulares para la producción de organismos defectuosos de pared, las formas-L resultantes han cambiado la susceptibilidad contra antibióticos y ha sido modificado el comportamiento de la defensa del organismo en general.

Los pacientes con infecciones urinarias crónicas, o con septicemia, meningitis, o endocarditis que hayan fallado en demostrar aislamientos de bacterias normales, pueden proveer fuentes fructíferas para el aislamiento de formas-L.

La relación entre las formas-L y la enfermedad intestinal inflamatoria además de su presencia en tejidos mucosos biopsiados fundamentan, en parte, esta etiología. Los homogenados de biopsias de mucosa intestinal en la enfermedad de Crohn, o la colitis ulcerativa mostraron la aparición de formas-L derivadas de *Escherichia coli* y *Streptococcus faecalis*.

Además se relaciona a estos microorganismos con abscesos subcutáneos y artritis.

En resumen, las formas-L pueden no ser patógenos primarios, pero las indicaciones para su supervivencia en tejidos del hospedador y la potencial patogenicidad las califican para estudios posteriores.

INVESTIGACIONES FUTURAS

El microbiólogo, el patólogo experimental y el biólogo molecular moderno pueden ganar mucho con el conocimiento de las formas-L bacterianas. El biólogo evolutivo al estudiar los orígenes de las organelas endosimbióticas en células eucarióticas, puede encontrarse con formas-L al principio de la teoría.

Las investigaciones futuras deberían buscar la presencia de formas-L en el entorno natural de las bacterias, plantas, e insectos con el objeto de establecer su papel en la vida de la bacteria y de las infecciones clínicas.

Es menester que el laboratorista clínico sea consciente de su presencia y de buscar ciertas variantes microbianas sospechosas morfológica y bioquímicamente inusuales en las muestras clínicas.

Traducción y actualización del capítulo:
Nestor Oscar Stanchi

BIBLIOGRAFIA

Belsheim MR, Darwish RZ, Watson WC, Schieven B. Bacterial L-form isolation from inflammatory bowel disease patients. Gastroenterology. 1983; 85 (2): 364-369

Brogan O. The role of the bacterial L-form in urinary tract infection. Br J Urol. 1977 49 (5): 431-436.

Carro T, Pedersen NC, Beaman BL, Munn R. Subcutaneous abscesses and arthritis caused by a probable bacterial L-form in cats. J Am Vet Med Assoc. 1989; 194 (11): 1583-1588.

Kenny GE. Mycoplasmas. En Balows A, y col. Manual of Clinical Microbiology. Fifth Edition. AMS, 1991 p. 481-482.

Muelas JM, Ales JM. Method for Detecting Mycoplasma and Bacterial L-Form Colonies in Relief with an Ordinary Light Microscope by Means of Oblique Light. Appl Microbiol. 1973; 25 (3): 484-488.

Razin S, Oliver O. Morphogenesis of Mycoplasma and bacterial L-form colonies. J Gen Microbiol. 1961; 24: 225-37.

Capítulo 45

LEPTOSPIRAS

Nestor Oscar Stanchi,
Bibiana Brihuega, Eleatrice María de las Mercedes Gatti

INTRODUCCION

Las especies del género *Leptospira* son los agentes causales de la leptospirosis, enfermedad considerada como la zoonosis de mayor distribución en el mundo. Fue separada de otras patologías semejantes en 1886 por Weil, denominándose su presentación ictérica en el hombre como enfermedad de Weil.

En los animales domésticos produce grandes pérdidas económicas por agalactia, abortos y muerte perinatal. La infección puede ser transmitida mediante la orina al humano, causando una enfermedad aguda y sistémica, que cursa con cuadros clínicos caracterizados por cefaleas, fiebre elevada, meningitis e ictericia. La presencia de la infección por su presentación clínica no específica, se considera sólo esporádica determinando que el índice de casos sospechosos esté por debajo de lo real. Se debe tener en cuenta que si el enfermo no es tratado tempranamente, la enfermedad puede progresar, dando cuadros graves, que lo pueden llevar a la muerte.

EPIDEMIOLOGIA

Las enfermedades producidas por *Leptospira* tienen una amplia distribución en el mundo. La República Argentina no es ajena a su presentación esporádica o como brotes de distinta magnitud. En salud humana el reconocimiento de la enfermedad es poco frecuente. Estudios epidemiológicos en personas sanas demostraron una serorreactividad del orden del 6%, indicando contacto con este microorganismo; posiblemente pocos de ellos han tenido manifestaciones graves atribuibles a esta etiología. La presentación ictérica de la enfermedad suele subdiagnosticarse debido a la confusión con otras patologías como hepatitis viral, meningitis viral, etc.

La mayoría de los estudios realizados en animales, al estar basados en las muestras remitidas por profesionales, sólo revelan la eficacia del veterinario en sospechar la enfermedad y no la real presencia de la misma. Estudios realizados en mataderos muestran valores muy amplios desde el 50 al 80% en bovinos. La prevalencia en caninos es del orden del 16%, mientras que en felinos su presentación es rara.

CLASIFICACION

Las leptospiras pertenecen al orden Spirochaetales, familia Leptospiraceae, género *Leptospira*, que comprende dos especies *L. interrogans* y *L. biflexa*. Las especies de este género han sido reclasificadas tomando como base los estudios de DNA. Las especies patógenas (antes *L. interrogans*) son: *L. interrogans*, *L. kirschneri* y *L. noguchi*, *L. fainei*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai* y *L. weilii*, *L. inadai*, *L. alexanderi*. Dentro de las no patógenas (antes *L. biflexa*) están *L. biflexa*, *L. meyeri* y *L. wolbachi*. Serológicamente las patógenas se subdividen en 223 serovares (subespecies) que se agrupan, por compartir determinantes antigénicos, en 25 serogrupos (que no constituyen una categoría taxonómica). Las especies apatógenas (*L. biflexa*) se corresponden con microorganismos de vida libre, a pesar de algunos reportes aislados de leptospirosis producida por esta especie.

La gran diversidad dentro de *Leptospira interrogans* sensu lato (en el sentido latino) está demostrada por las 223 serovares actualmente reconocidas de acuerdo al criterio serológico. La prueba de aglutinación microscópica y el test de absorción y aglutinación cruzada son usados para la clasificación de leptospiras a nivel de serovariedad. Las serovares serológicamente relacionadas son agrupadas funcionalmente en 25 serogrupos. La seroagrupación es un estudio simple que requiere sólo 25 muestras de suero. En contraste, la serotipificación a nivel de serovar necesita una colección completa tanto de las cepas de referencia (223) como sus sueros correspondientes. Además, la adsorción cruzada es un procedimiento complejo y subjetivo.

Desde mediados de la década de 1980, las especies de *Leptospiras* aisladas de animales y humanos fueron diferenciadas en base a estudios de hibridación con DNA-DNA llamándolas *L. interrogans* sensu stricto (en el sentido estricto) (ahora llamada *L. interrogans*), *L. kirschneri*, *L. weilii*, *L. noguchii*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. meyeri*, *L. inadai*, *L. fainei* y *L. alexanderi*. Los serogrupos fueron igualmente distribuidos en las especies: por ejemplo el serogrupo Pomona, comprende las serovares *kunning*, *mozdok* y *tsaratsovo*, las cuales pertenecen a la especie *L. kirsch-*

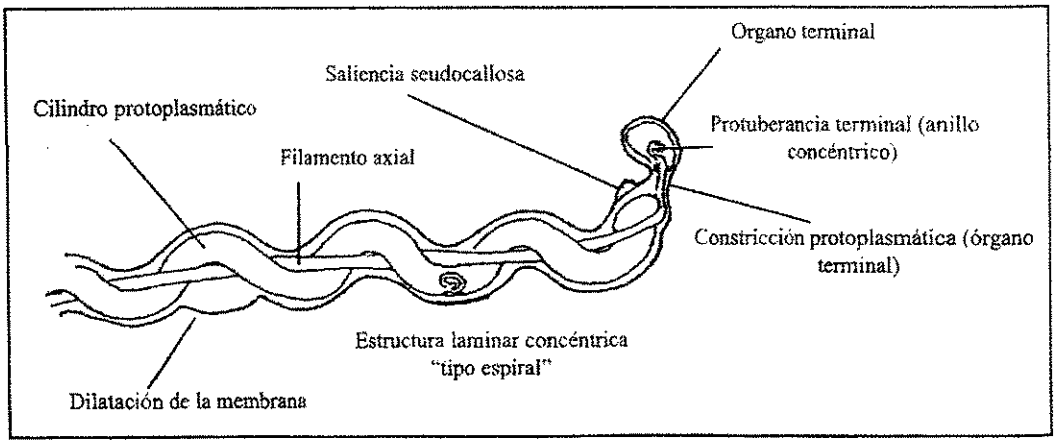


Figura 45-1. Estructura de *Leptospira interrogans*.

neri, mientras que las restantes siete serovares de este serogrupo pertenecen a otras tres especies. Esto lleva a una confusión desde el punto de vista clínico, por lo que continúa utilizándose la clasificación serológica, que es la que se usará en este capítulo.

MORFOLOGIA Y CARACTERISTICAS GENERALES

Las leptospiras son microorganismos de forma helicoidal; cada célula posee un cilindro protoplasmático con 18 o más giros, que forma una espiral apretada. Son flexibles, miden 0,1 µm de diámetro y 6 a 20 µm de longitud. En uno o ambos extremos presentan una forma típica de gancho y sus movimientos característicos aparecen como una rotación alternada alrededor del axis y traslación, sin diferenciación de polos o en dirección de su extremo sin gancho. Una membrana o envoltura externa recubre al microorganismo. El cilindro protoplasmático (CP) contiene los componentes celulares. Este CP tiene una capa de glucopéptido y una membrana citoplasmática que envuelve los contenidos citoplásmicos de la célula. Dos flagelos periplásmicos, también llamados endoflagelos o filamentos axiales, están ubicados entre la envoltura exterior y el CP, insertados subterminalmente uno en cada polo dirigiéndose hacia el centro y raramente sobrepasando la región central de la célula, por lo que no se superponen. Los cuerpos basales flagelares se asemejan a aquellos de las bacterias gramnegativas. Las *L. interrogans* y *biflexa* son morfológicamente indistinguibles. Por su contenido en ácido diaminopimélico pueden diferenciarse de otros microorganismos morfológicamente semejantes.



Figura 45-2. Microscopia electrónica de una leptospira mostrando la típica forma de gancho.

Las leptospiras no pueden visualizarse con el microscopio de luz transmitida y se tiñen mal con los colorantes de anilina. Para observarlas es necesario recurrir a la microscopia de fondo oscuro. La motilidad sin igual de las leptospiras, combinada con su pequeño diámetro, flexibilidad y forma, les permiten pasar a través de filtros de membrana con tamaño de poros de 0,1 µm y migrar a través de medios solidificados hasta con 1% de agar. Son destruidas con facilidad por el calor, los desinfectantes, la desecación y la acidez.

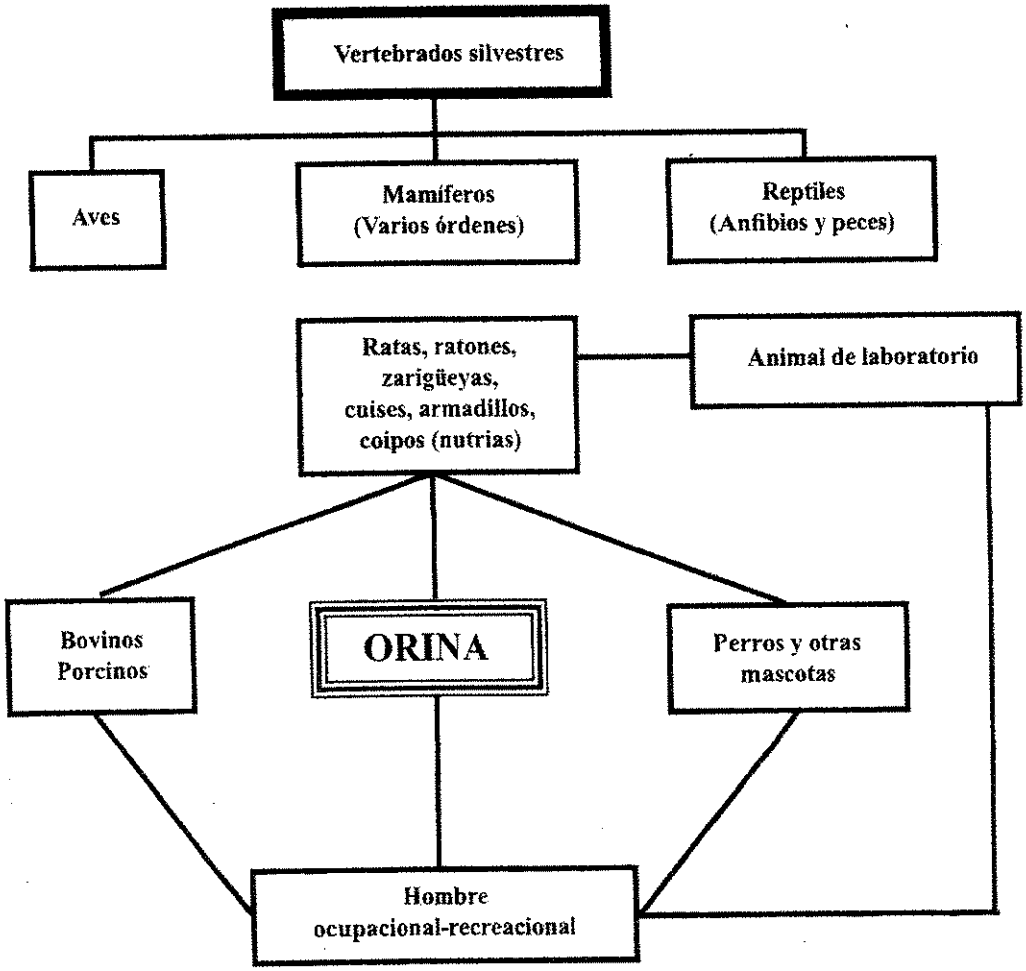


Figura 45-3. Diagrama de la epidemiología de la leptospirosis.

MODO DE TRANSMISION

Las leptospiras patógenas son parásitos de animales domésticos y silvestres. Entre los mamíferos, los roedores (ratas, ratones) son sus reservorios más importantes. Además, coipos, zarigüeyas (comadrejas), zorros, armadillos, cuises y animales poiquilotermos se encuentran entre los responsables de reservar leptospiras en un determinado medio ambiente. Por su contacto con el hombre, los porcinos, bovinos, equinos y caninos también generan brotes de leptospirosis. Durante un brote, pueden participar en la circulación de leptospiras varias especies animales que viven en biocenosis.

Existe una relación simbiótica entre la leptospira y su hospedador que es de gran importancia para la perpetuación de la enfermedad en la población animal. Este es un equilibrio biológico entre algunas cepas de leptospiras y ciertas especies animales en las cuales persisten en los túbulos contorneados renales, sin producir efecto patógeno en su epitelio; esto sugiere que algunas de estas especies son capaces de desarrollar resistencia local previniendo la invasión de sus células por las leptospiras. Es importante enfatizar que este equilibrio se instala sólo en ciertos casos, mientras que en otros se pierde o es mucho más difícil de establecer, padeciendo el animal una forma grave de la enfermedad, que incluso le puede ocasionar la muerte.

La transmisión de las leptospiras del animal al hombre ocurre tanto por contacto directo con orina, sangre u órganos de animales infectados, como de forma indirecta por exposición al medio ambiente contaminado por leptospiras; quizás sea ésta la forma más común. En cualquier situación que se considere, el hombre suele ser el eslabón final de la cadena epidemiológica, ya que no es un hospedador natural, y la transmisión entre humanos sólo es excepcional.

La orina de los animales infectados constituye el vehículo primario por el cual se produce la transmisión de leptospiras entre ellos y el hombre. Son excretadas en la orina de los animales infectados, y su concentración y tiempo de eliminación dependen de la especie afectada. Por ejemplo, un bovino puede eliminar 10^7 leptospiras/ml de orina durante varias semanas a meses. La puerta de entrada puede ser a través de lesiones cutáneas o por las mucosas (conjuntival, genital, nasofaríngea). Los caninos tienen un alto grado de infección y prolongado estadio de portador, siendo la mayoría de las veces los machos los que transmiten la infección.

La transmisión indirecta de leptospiras depende no sólo de su relación con el reservorio, sino también del medio ambiente. La humedad relativa, los suelos con pH neutro o ligeramente alcalino son óptimos para la sobrevida de las leptospiras. El agua es uno de los vehículos más importantes para su transmisión. En el hombre, los deportes acuáticos han hecho aumentar últimamente el número de casos de leptospirosis. Otra forma de contagio puede darse cuando un hombre camina descalzo, tiene pequeñas laceraciones en los pies y pisa orina de roedores infectados o agua contaminada con leptospiras.

Es una enfermedad cosmopolita que encuentra en las regiones tropicales y subtropicales las condiciones ambientales adecuadas para su propagación y mantenimiento en el medio, aunque aun en condiciones extremas de temperatura, han ocurrido casos de infección en bovinos en época invernal en Canadá con temperaturas de varios grados por debajo de cero. Es importante destacar que, el 28% de los casos clínicos detectados en las personas corresponde a áreas densamente pobladas, lo que la clasifica como una importante zoonosis urbana de notificación obligatoria.

RESPUESTA INMUNE

Ante la agresión producida por las leptospiras, el organismo reacciona primariamente con una respuesta sérica caracterizada por la producción de inmunoglobulinas (Ig) del isotipo IgM, que pueden detectarse por el método de aglutinación microscópica (MAT) a los 5 a 7 días del comienzo de la infección. Sin embargo, por técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) pueden evidenciarse unos días antes, acelerando el diagnóstico. Las IgM están dirigidas contra distintos epitopes del microorganismo, pero las de mayor importancia y a las cuales se les asigna actividad protectora son inducidas por el lipopolisacárido (LPS) leptospiral. La producción de IgG es inconstante en el hombre, siendo en muchos casos imposible establecer su expresión; en otros, por el contrario, aparece tan tempranamente como la IgM, al parecer, dependiendo de la cepa actuante.

El nivel de anticuerpos séricos se eleva a su máximo en las semanas que siguen a la infección, disminuyendo luego lentamente, variando su permanencia de algunos meses a varios años. Es importante mencionar que el nivel de anticuerpos desciende levemente luego de la infección para volver a elevarse; este hecho, no bien entendido, suele atribuirse a la terapia antibiótica, aunque según investigadores ingleses, puede ocurrir sin ella.

En los animales domésticos parece seguir el patrón general de producción de Ig; en la etapa aguda se ve involucrada la IgM, para luego producir IgG. Los animales silvestres se comportan sin un patrón fijo, ya que no todos producen reacción evidenciable por el método de MAT y, si lo hacen, suelen establecerse muy bajos niveles de anticuerpos.

La especificidad de las Ig es generalmente de serovar, aunque se observan títulos mayores cuando la cepa infectante es homóloga a la utilizada en MAT. Es común, sin embargo, en las primeras etapas de la infección, la producción de anticuerpos que aglutinen varias serovares del mismo o distinto serogrupo, fenómeno denominado de co-aglutinación.* Este fenómeno tiende a desaparecer más tardíamente prevaleciendo el MAT reactivo contra la serovar infectante. A pesar de ello no puede confirmarse por esta técnica la responsabilidad de una determinada serovar en la infección.

Estudios realizados in vitro sobre la interacción entre las leptospiras y los leucocitos polimorfonucleares (PMN) indican que la fagocitosis es realizada a una tasa menor que la observada en otras bacterias como *E. coli* y *Listeria*. Esto podría deberse al tamaño de la leptospira y a su movimiento activo, que impiden la acción fagocítica. Más aún, se ha observado que *L. biflexa* es destruida por los PMN mientras que *L. interrogans*, en ausencia de anticuerpos, sería capaz de sobrevivir intracelularmente. Si bien este hecho no está bien explicado, parece deberse a que *L. interrogans* posee una catalasa que inactivaría el peróxido de hidrógeno.

La importancia de los anticuerpos en la defensa de la infección estaría dada por la acción opsónica, que a través de la fijación a los fagocitos mononucleares y PMN, permite la ingestión más rápida y la destrucción más eficaz de las leptospiras. Aparentemente, el sistema de complemento no estaría involucrado en la destrucción de estos microorganismos.

PATOGENESIS

Si bien se ha descrito la patología de la leptospirosis en el hombre y los animales, no están totalmente aclarados los mecanismos por los cuales se produce el daño tisular.

* El término coaglutinación también se usa para la aglutinación indirecta producida por *Staphylococcus aureus* cepa Cowan 1.

Las leptospiras patógenas, luego de atravesar las membranas mucosas o la piel del hospedador, pasan rápidamente al torrente sanguíneo distribuyéndose en todos los tejidos. Entre las 24 a 48 horas de la infección, los microorganismos pueden aislarse de todos los tejidos, inclusive del líquido cefalorraquídeo (LCR), aun sin lesión manifiesta del sistema nervioso central (SNC). La capacidad para su rápida distribución en el organismo se debería a que producen hialuronidasa (factor de difusión). No se conoce bien cuáles son los factores responsables de la virulencia de las leptospiras. Es probable que factores inherentes a propiedades virulentas específicas (debido a plásmidos), sumados a factores del hospedador, desempeñen un papel importante en la producción de la infección. Los hallazgos histológicos y clínicos, en humanos y animales, sugieren que la patogenicidad de las leptospiras se debe parcialmente a toxinas, enzimas u otros metabolitos elaborados o eliminados por las leptospiras lisadas. Estos hallazgos presentan similitud con aquellos derivados de bacterias gramnegativas, lo que sustenta con firmeza que las endotoxinas sean responsables de la acción patógena de las leptospiras.

Se ha demostrado que la severidad de las lesiones se correlaciona positivamente con el número de microorganismos presentes, al igual que las muertes que ocasiona. En muchos pacientes infectados se observa anemia hemolítica e ictericia, lo que sugiere el posible rol de las hemolisinas en la patogénesis de la leptospirosis. Aparentemente la hemólisis es causada por fosfolipasas (fosfolipasa A y esfingomielinasa C), demostradas en las leptospiras. Mientras que *L. interrogans* y *L. biflexa* tienen fosfolipasa A, la actividad de la esfingomielinasa C ha sido demostrada sólo en *L. interrogans*.

Investigaciones realizadas en humanos han revelado profundos desórdenes metabólicos de la función hepática. La naturaleza precisa de la lesión subcelular permanece indefinida y aunque la necrosis hepática es infrecuente, la actividad de las transaminasas (glutámico pirúvica y glutámico oxalacética) se encuentra levemente elevada. Evidencias de laboratorio sobre la función hepática, no se correlacionan con los hallazgos histopatológicos. Varias teorías tratan de explicar el fenómeno de la ictericia, ya que la hemólisis, según algunos autores, es un hecho inconstante y si se han obervado estasis intra o extrahepática, se concuerda que la lesión hepatocelular es la razón de la ictericia. Como se mencionó anteriormente, es improbable que este daño sea causado por la acción directa de los microorganismos íntegros; las glicoproteínas serían responsables del efecto citotóxico.

La falla de la función renal es causa de muerte en muchos pacientes; la nefritis intersticial es la lesión renal fundamental, aunque se la ha encontrado sólo tardíamente en el curso de la enfermedad. Estudios histoquímicos y enzimáticos han demostrado daño hipóxico, lo que sugiere isquemia renal (el flujo sanguíneo renal debilitado constituiría la alteración principal de la nefropatía por leptospiras). La deshidratación secundaria por vómitos y disminución de la ingesta de líquidos puede ser responsable de la hipovolemia y de la hipotensión en algunos casos, aunque no se puede excluir la posibilidad de que sean liberadas ciertas enzimas vasoactivas. Un hallazgo temprano de la leptospirosis experimental es la diátesis hemorrágica, que incrementa su gravedad antes de la muerte. El fenómeno hemorrágico ha sido atribuido a la disminución sérica de protrombina o a trombocitopenia, frecuentemente observado por investigadores de Brasil; pero la diátesis hemorrágica es principalmente un fenómeno de lesión capilar. Las hemorragias masivas, principalmente gastrointestinal, aunque raras, pueden producirse y se deben a este daño endotelial. Los signos de irritación meníngea son comunes, y aunque su patogenia permanece oscura, sería la expresión de una reacción antígeno-anticuerpo. La alta incidencia de meningitis puede estar relacionada con la facilidad con que las leptospiras penetran en el LCR en la fase septicémica temprana de esta enfermedad.

Teniendo en cuenta las características proteiformes de su fisiopatología, la diátesis hemorrágica y el deterioro progresivo de la función hepática y renal representan los hallazgos más notables de la leptospirosis grave.

En síntesis: la infección está caracterizada por una rápida proliferación y diseminación de los microorganismos en la mayoría de los tejidos, determinando una intensa y aguda disfunción generalizada. De las mismas características son la rápida formación de anticuerpos específicos con una virtual desaparición de las leptospiras de todos los tejidos con la sola excepción del riñón, incluso antes de que se desarrollen la ictericia, uremia u otras serias secuelas clínicas. Muchos aspectos de la patogénesis de la leptospirosis permanecen aún sin explicar.

ASPECTOS CLINICOS

La enfermedad en los bovinos se manifiesta con temperatura elevada durante 4 a 5 días, depresión, pérdida de apetito, conjuntivitis, anemia y agalactia. Posteriormente la orina se oscurece y puede aparecer encefalitis y, en casos graves, necrosis hepática. Produce aborto, infección congénita e infertilidad. En porcinos las complicaciones más importantes son el aborto y la muerte neonatal.

Los caninos presentan temperatura, conjuntivitis, vómitos y diarreas, complicándose con nefritis e ictericia pronunciada que pueden llevar a la muerte en pocos días. Las serovariedades más comunes halladas son *canicola* (24% de positividad), *icterohaemorrhagiae* y *pyrogenes*. Los felinos no muestran síntomas aparentes aunque se han aislado leptospiras de lesiones renales graves.

En equinos se observa pirexia, anorexia, petequias en las mucosas, conjuntivitis, hemoglobinuria y debilidad muscular. Una complicación común es la iridociclitis (debido a un proceso inmune). En los ovinos y caprinos se produce aumento de temperatura, hemoglobinuria, anemia, infertilidad, aborto y muerte perinatal.

En los casos de leptospirosis humana clínicamente reconocibles, entre el 5-10% de los pacientes evidencia sintomatología correspondiente a la enfermedad de Weil, caracterizada por disfunción hepática, renal o vascular, con alta tasa de mortalidad. La ictericia es el síntoma más característico, con elevación mínima de las transaminasas séricas glutámico pirúvica y glutámico oxalacética. Los casos sintomáticos restantes corresponden a una enfermedad autolimitada, anictérica, la cual puede semejarse a infecciones virales, bacterianas o producidas por rickettsias.

La presentación diversa y frecuentemente no específica de la leptospirosis, indudablemente conduce a un número considerable de casos que pasan sin reconocimiento. Por otro lado, los estudios serológicos realizados en la población de nuestro país indican que numerosas infecciones pasan desapercibidas o presentan características subclínicas.

DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO

El diagnóstico de la leptospirosis basado en los signos clínicos es difícil de establecer porque no son patognomónicos. El diagnóstico es un hecho complejo, en el que deben considerarse la epidemiología, los factores de riesgo, los signos clínicos, las lesiones y los hallazgos de laboratorio.

Características de cultivo

Sin duda, la confirmación se obtiene mediante el aislamiento del agente causal; pero si bien las leptospiras son microorganis-

mos que crecen con relativa facilidad en medios de cultivo, las estadísticas muestran que en menos del 3% de los casos se logra arribar al diagnóstico mediante este procedimiento.

El metabolismo respiratorio es aerobio estricto. Cuando son cultivadas en un medio aireado a 30 °C su tiempo de generación varía entre 7 y 12 horas, con un rendimiento de 6 a 8 por 10^9 células por ml. Los requerimientos nutricionales de las leptospiras son vitaminas B_1 y B_{12} y ácidos grasos de cadena larga, únicos compuestos orgánicos que se requieren. Los ácidos grasos son su más importante fuente de energía y carbono para sus lípidos celulares. Las sales de amonio proveen nitrógeno celular. El nutriente no esencial, piruvato de sodio, reduce el tiempo de crecimiento de las leptospiras patógenas, particularmente las serovares *hardjo* y *ballum*. Las leptospiras incorporan bases externas de purina, pero no de pirídina, en sus ácidos nucleicos. Debido a esto, son resistentes a la actividad antibacteriana de la pirídina análoga, el 5-fluorouracilo (5-FU). Este compuesto es usado en medios selectivos para el aislamiento de leptospiras en muestras contaminadas. Los medios utilizados para el aislamiento y cultivo de leptospiras están enriquecidos con suero de conejo o con albúmina sérica bovina.

Las leptospiras crecen en medios especiales, siendo el más utilizado el de Ellinghausen y Mc Cullough modificado por Johnson y Harris (EMJH), que puede enriquecerse con 1 a 2% de suero normal estéril de conejo. También son usados los medios de Fletcher y Stuart entre otros, que básicamente comprenden soluciones salinas bufferadas y suero normal estéril de conejo al 8-10%. El medio de Fletcher contiene además agar al 0,1-0,2% que lo transforma en semisólido, pudiendo agregarse al medio EMJH la misma cantidad de agar.

Observación directa

Si bien las leptospiras están presentes en la sangre durante la primera semana de la enfermedad, la observación directa en fondo oscuro no se recomienda debido a que se confunden fácilmente con artefactos, como los filamentos de fibrina. En orina las leptospiras pueden visualizarse, previa concentración por centrifugación, en las semanas siguientes por microscopía de fondo oscuro. También pueden observarse y aislarse del LCR hacia el final de la primera semana de la enfermedad. Otro procedimiento para su visualización directa y diagnóstico rápido consiste en la observación por el método de impregnación argéntica (por ej., coloración de Warthin-Starry); sin embargo, estos métodos tienen las mismas limitaciones que la observación en fondo oscuro, y son necesarios gran número de microorganismos y la presencia de artefactos. Los colorantes de anilina no son utilizados ya que las leptospiras no pueden colorearse con ellos, mientras que si bien podría utilizarse la tinción prolongada con Giemsa, se obtienen resultados muy pobres. La observación con fluorescencia indirecta se realiza con Ig de conejos inmunizados con distintas cepas de leptospiras y revelados con anti-Ig de conejo conjugado con fluoresceína, también pueden realizarse estudios semejantes con anticuerpos anti-Ig de conejo conjugados con peroxidasa.

Elección de muestras

Las leptospiras pueden cultivarse a partir de sangre, orina, LCR, y menos frecuentemente de otras muestras clínicas tales como líquido amniótico, fluido pleural, cámara anterior del ojo o materiales de necropsia. Del medio ambiente pueden aislarse principalmente desde el agua y menos a menudo del suelo húmedo. Los cultivos de sangre deben realizarse durante la primera semana (período leptospirémico), preferiblemente antes de administrar antibióticos; luego de ese lapso es poco probable aislarlas. A efectos de evitar factores líticos o inhibidores de las leptospiras presentes en la sangre, se siembran sólo 1 o 2 gotas en los medios mencionados (EMJH y Fletcher). Los cultivos se incuban a 28-32 °C, con observación en fondo oscuro semanalmente a efectos de visualizar la presencia de leptospiras. La observación continúa por el término de 8-12 semanas, aunque se han registrado casos de positividad a los 6 meses del cultivo. El LCR puede cultivarse para leptospiras en el mismo período que la sangre aunque puede inocularse un volumen mayor.

Las leptospiras comienzan a eliminarse por orina desde la segunda semana de la enfermedad y por períodos variables, siendo diferente, la concentración eliminada en distintos días u horas del día. Para su cultivo debe recogerse la orina en forma estéril, descartando la primera porción y luego sembrarla en los mismos medios, aunque es preferible que contengan inhibidores de contaminación bacteriana tales como 5-FU o neomicina y/o realizar diluciones de la orina hasta 10^{-5}.

Inoculación experimental

La inoculación de animales de laboratorio es de uso extensivo por su gran ayuda para lograr el aislamiento de cepas de materiales contaminados, parcialmente inhibidas por antibióticos, y/o anticuerpos, o de difícil desarrollo en medios de cultivo. El procedimiento consiste en inocular por vía intraperitoneal por lo menos 2 animales para cada muestra, siendo las especies más indicadas los cobayos, meriones y hámster, previo control de negatividad frente a leptospiras. Entre los 3-5 días posinoculación se hace la siembra de sangre en los medios EMJH y Fletcher y se investiga la presencia de anticuerpos, teniendo en cuenta la posibilidad del fenómeno de zona en la serología con estos animales. El proceso se repite semanalmente por el término de 1 mes, momento en que se sacrifican y se investiga la presencia de leptospiras en riñón, hígado y bazo, sembrando en los medios citados.

Análisis serológico

Otra posibilidad de acceder al diagnóstico es por intermedio de las pruebas serológicas. Como se mencionó anteriormente, a los 3-7 días del inicio de los síntomas comienzan a evidenciarse anticuerpos que luego de llegar a un nivel máximo inician su descenso y permanecen por tiempo variable (meses o años). Por tal razón la evidencia de anticuerpos por serología no indica infección presente sino sólo su presencia. Para determinar la infección debe realizarse un muestreo "pareado" de sueros con por lo menos 7-10 días de intervalo. Una diferencia de título mayor en dos diluciones indicará infección. Es importante recalcar que la Organización Mundial de la Salud recomienda que ambas pruebas se realicen en el mismo laboratorio, debido a numerosos factores que hacen difícil estandarizar el diagnóstico.

Se han desarrollado varios tipos de pruebas serológicas; sin embargo, la prueba de aglutinación microscópica (MAT) continúa siendo la técnica de referencia internacional. Esta prueba consiste en enfrentar el suero diluido del paciente con cada uno de los antígenos (cultivos vivos o formolados de leptospiras enteras) representativos de todos los serogrupos de leptospiras, o al menos con todas las cepas que han sido aisladas en el país. Se parte de diluciones 1/50 a 1/100 para el caso de humanos, 1/100 en caninos y equinos, 1/200 en bovinos, ovinos, caprinos y porcinos y 1/25 en animales silvestres (aunque es variable según los laboratorios). Luego de un período de incubación de 90 a 120 minutos se observa microscópicamente con fondo oscuro en búsqueda de aglutinación. Se considera reactivo un suero que aglutina el 50% o más de las leptospiras en comparación con un control. Esta prueba es altamente específica y no presenta reacciones cruzadas con otras enfermedades.

Se han desarrollado otras técnicas serológicas que permiten poner en evidencia anticuerpos contra esta enfermedad. Entre las más utilizadas se encuentran la aglutinación macroscópica, que consiste en un antígeno (cultivo de leptospiras en grupos de serovares) de alta concentración, que permite visualizar aglutinación macroscópica en portaobjetos (antígeno de Galton), el empleo de una cepa de *Leptospira biflexa* que permite detectar anticuerpos principalmente en leptospirosis humana (antígeno TR de Mazzonelli) o la detección de IgM por la técnica de ELISA. Esta última tiene gran importancia principalmente para detectar casos de leptospirosis en los primeros 2 a 3 días del comienzo de la infección, período en que la prueba de MAT todavía da resultados negativos. La técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) no es de uso rutinario.

TRATAMIENTO

Sólo las cefalosporinas de tercera generación, ceftizoxima y cefotaxima, podrían ser efectivas para el tratamiento de la leptospirosis. La doxiciclina no sólo tiene valor terapéutico sino, además, valor profiláctico. El uso de la penicilina es actualmente controvertido; en estudios doble ciego* realizados en humanos este antibiótico no pareció tener valor en el tratamiento de la enfermedad, mientras que en otras investigaciones mostró actividad semejante a la doxiciclina.

PROFILAXIS

En la Argentina sólo se procede a la vacunación de animales domésticos, protegiéndolos únicamente contra la enfermedad pero no se eliminan ni evitan el estado de animal portador. La vacunación de caninos debido al enmascaramiento de la infección con el probable contagio al humano es un tema de debate.

En profilaxis humana se han realizado vacunaciones en poblaciones de alto riesgo pero nunca en nuestro país. Otras medidas, tales como el uso de ropa protectora, clorinación de aguas o desratización pueden contribuir en la profilaxis de la enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

Faine S. Guidelines for the control of Leptospirosis. World Health Organization. pub # 67, p.171. 1982

Gatti M, Arias D, Rosetti C, Selva S, Copes J, Lapiace R, Martino P, Stanchi N. Aislamiento de *Leptospira biflexa* a partir de aguas del lago del zoológico de La Plata. Analecta Vet. 2004; 45 (1): 18-20.

Johnson RC. Isolation techniques for Spirochetes and their sensitivity to antibiotics in vitro and in vivo. Rev Inf Dis 1989. 11, supp 6:S1505-S1510.

Stanchi N, Martino J. Aglutinación microscópica para Leptospiras en suero de leche y su relación con valores en suero sanguíneo. Rev Asoc Colombiana Med Vet y Zoot. 1989. 13,1:8-12.

Stanchi N, Francini F, Peluso F, Grisolía C. *Leptospira interrogans* serovar *cynopteri* aislada de sapos (*Bufo arenarum*) de Argentina. Comunicación Previa. Therios 17, 84:198-201, 1991

Stanchi N, Martino P. Evaluación clinicopatológica de la Leptospirosis experimental con *Leptospira interrogans* serovar *pomona* en zarigüeyas (*Didelphis albiventris*). Avances en Cs Vet. (Chile) 1991, 6,2:180-184.

Stanchi NO. Ecología de Leptospiras I y II. Therios 1986, 8, 38 y 39:182-186 y 264-268.

* Estudios en los cuales ni el paciente ni el médico conocen con certeza cuál es la terapéutica dada.

Capítulo 46

BORRELIA

Nestor Oscar Stanchi

INTRODUCCION

El género *Borrelia* comprende un grupo de microorganismos parásitos del hombre y los animales que tienen como característica común ser transmitidos por artrópodos. Las especies patógenas determinan cuadros clínicos en el hombre produciendo la fiebre recurrente, en animales la borreliosis y en ambos la enfermedad de Lyme.

EPIDEMIOLOGIA

Las borrelias tienen en los artrópodos la principal forma de transmisión (*Ixodes dammini, I. pacificus, I. ricinus* entre otros) (fig. 46-1). Son excepcionales las posibilidades de contagio directo. Dado que estos microorganismos son esencialmente parásitos sanguíneos, el vector tiene importancia fundamental.

Enfermedad de Lyme. Es una enfermedad descrita en 1975 en Lyme (Estado Unidos de América) en casos de artritis reumatoidea juvenil. Es transmitida por ciertas garrapatas del género *Ixodes*, con particular importancia *I. ricinus*. La borrelia causante de esta enfermedad, descubierta en 1982 por W. Burgdorfer en Nueva York, también ha sido hallada en mosquitos y tábanos. La distribución de esta enfermedad es extensa (América del Norte, Europa, Asia, Australia y posiblemente Africa). En Argentina sólo existen reportes serológicos sin aislamiento del agente causal en caninos y humanos.

CLASIFICACION

Las especies pertenecientes al género *Borrelia* se encuentran en el orden Spirochaetales y la familia Spirochaetaceae. Las especies más frecuentemente involucradas en la fiebre recurrente del hombre son *B. recurrentis* y *B. duttonii*. Otras bacterias causantes de fiebre recurrente son *B. hermsii, B. venezuelensis, B. hispanica, B. mazzotii, B. parkeri, B. ersica, B. turical* y *B. caucasica* que son menos virulentas. La enfermedad de Lyme es producida por *B. burgdorferi*. Los numerosos aislamientos y diferentes especies involucradas en cuadros clínicos semejantes, conducen hoy día a denominar *B. burgdorferi* sensu lato a aquellas que producen la enfermedad de Lyme, mientras que *B. burgdorferi* sensu estricto define a la verdadera especie de esta denominación. Por otro lado, en medicina veterinaria también son importantes *B. theileri* y *B. anserina*.

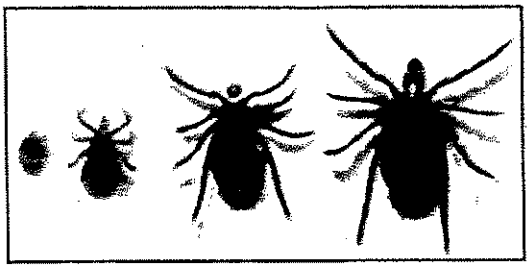


Figura 46-1. Garrapatas, agentes transmisores de las borrelias.

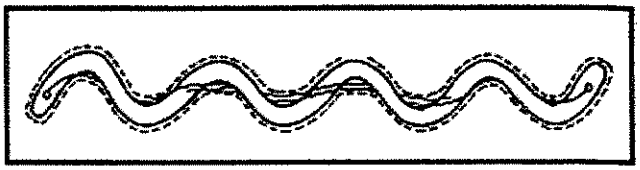


Figura 46-2. Representación esquemática de una borrelia.

MORFOLOGIA

Los microorganismos del género *Borrelia* tienen forma helicoidal con un cilindro protoplasmático que posee de 3 a 10 vueltas, aunque puede llegar hasta 30 espirales, con un arrollamiento en sentido inverso a las agujas del reloj y extremos aguzados (fig. 46-2). Dicho cilindro está envuelto por una membrana externa. Miden 0,2 a 0,5 µm por 3 a 20 µm de largo. Poseen 15 a 20 flagelos periplásmicos, también llamados fibrillas axiales, fibrillas periplásmicas o endoflagelos, originados en cada extremo celular e insertándose subterminalmente. Los extremos de los endoflagelos dirigidos hacia el centro de la célula se superponen con los del extremo contrario. Las borrelias son microorganismos muy móviles, se tiñen bien con los colorantes de anilina, son gramnegativas, aunque también es muy usada la tinción con Giemsa en preparaciones de frotis sanguíneo, pudiéndose completar el estudio con microscopía de campo oscuro.

RESPUESTA INMUNE

Enfermedad de Lyme

La respuesta inmune específica de IgM con frecuencia está dirigida primero hacia el antígeno flagelar y luego se hace policlonal con un aumento de las Ig totales apareciendo entre la tercera y sexta semana de la enfermedad, pudiendo persistir. La elevación de las IgM trae aparejado la generación y circulación de inmunocomplejos y la presencia de crioaglutininas, factor reumatoideo y anticuerpos antinucleares.

La producción de IgG está dirigida principalmente hacia los polipéptidos de superficie y al antígeno flagelar de la *Borrelia*.

PATOGENICIDAD

Enfermedad de Lyme

Aparentemente la patogenicidad de *B. burgdorferi* estaría dada por dos mecanismos: el primero involucra la formación de inmunocomplejos que fijan el complemento que se acumula en las articulaciones del hospedador. Esto trae a la zona células fagocíticas que liberan varias enzimas que atacan a la articulación, erosionando los cartílagos y huesos, causando síntomas de artritis. El segundo mecanismo de patogenicidad involucra al mediador interleuquina I (IL-1), sintetizada por los macrófagos, lo que generaría fiebre, liberación de neutrófilos de la médula ósea y la proliferación de fibroblastos. La liberación de IL-1 estaría dada por los lipopoli-

sacáridos presentes en la envoltura de este microorganismo causando efectos locales y sistémicos en el organismo afectado.

ASPECTOS CLINICOS

Enfermedad de Lyme

Es una patología multisistémica. Después de un periodo de incubación de 3 a 32 días, las bacterias migran hacia la periferia de la lesión inicial (picadura de la garrapata) produciéndose una erupción cutánea anular, mácula o pápula, con descamación central que va tomando las características de un eritema crónico migrante; esta lesión se acompaña de fiebre, cefaleas y fatiga. La bacteria se disemina por vía sanguínea a otros órganos (hígado, cerebro, bazo) evidenciándose después lesiones anulares secundarias en otras partes de la piel. Una segunda etapa se desarrolla varias semanas después, caracterizada por afección cardiaca con arritmia y cardiomegalia; en otros casos, en cambio, se observan signos neurológicos; esta segunda forma no siempre se hace manifiesta. Puede haber signos neurológicos, polirradiculitis, neuritis, meningitis, hasta parálisis facial. Finalmente, más del 60% de los pacientes no tratados tienen como secuela artritis crónica, que puede presentarse incluso varios años después de la picadura infectante. En los caninos produce serios cuadros de artritis y polirradiculitis; los gatos no parecen mostrar signos clínicos a pesar de que aumentan sus títulos de anticuerpos. En equinos los signos clínicos se manifiestan por debilidad, poca fiebre, laminitis en las articulaciones y uveítis. En bovinos puede producir pérdida de peso y abortos, habiéndose aislado el agente etiológico incluso a partir de la leche, a pesar de que éste parece ser un hallazgo de laboratorio ya que la leche no resulta infectante para el hombre.

Otras borreliosis

En medicina veterinaria son importantes también *B. theileri* y *B. anserina*, sobre todo en zonas tropicales. *B. anserina* afecta a las aves de corral, el curso puede ser variable y puede producir septicemia aguda con alta mortalidad. Se observan síntomas como anemia, ictericia, hemorragia y agrandamiento del bazo. *B. theileri* produce en bovinos y ovinos cuadros leves, con temperatura alta.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Observación directa

Durante la espiroquetemia se puede detectar al microorganismo en sangre circulante mediante la observación en fondo oscuro, colocando entre porta y cubre una gota de sangre con anticoagulante (citrato de sodio). También es posible la coloración del frotis sanguíneo con los colorantes usuales en hematología tales como May-Grünwald-Giemsa o Wright. Otra posibilidad es el uso de anticuerpos antiborrelia conjugados con fluoresceína y visualizados con microscopia de fluorescencia.

Aislamiento

Las borrelias pueden cultivarse en medios especiales, aunque su desarrollo no es muy abundante. El desarrollo es más fácil en los primeros cultivos, pero no tanto en los pasajes sucesivos. Los medios de cultivo deben contener ácidos grasos de cadena larga. Existen varios medios con el agregado de suero de conejo o líquido ascítico. Crecen también en huevo embrionado, cultivándose en la membrana alantoidea, donde se multiplica rápidamente y las borrelias aparecen en sangre y órganos del embrión. Son microaerófilas y crecen en pH 7,2-7,4 a 30-37 °C. El medio de Kelly es útil para el aislamiento a partir de sangre de individuos sospechosos de padecer fiebre recurrente. Este mismo medio puede utilizarse para el aislamiento a partir de garrapatas o piojos infectados. Para el caso de *Borrelia burgdorferi* el medio BSK de Kelly modificado (Barbour-Stoenner-Kelly) ha demostrado su eficacia para el aislamiento de este microorganismo.

Cuando el número de borrelias es escaso se aconseja, además, la inoculación en animales de laboratorio con el material a investigar, utilizándose para este fin rata, ratón o hámster lactante; sin embargo por razones humanitarias se recomienda utilizar este método sólo en casos excepcionales. Luego de 7 a 14 días de inoculados los animales, se sangran o sacrifican y se siembra el material en el medio BSK el que se incuba a 30-35 °C durante 3 semanas en atmósfera anaerobia. La observación de los cultivos se hace mediante fondo oscuro.

Diagnóstico serológico

Para el caso de la enfermedad de Lyme, por el contrario, y a pesar de que las pruebas serológicas tienen sus limitaciones, éstas son todavía el único método práctico para confirmar la infección por *Borrelia burgdorferi*. Se utilizan diferentes pruebas, tales como inmunofluorescencia indirecta, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) e inmuno blot. Los títulos superiores a 1/40 para IgM y 1/160 para IgG se consideran positivos, aunque se observan falsos positivos por reactividad cruzada con leptospirosis, sífilis, factor reumatoideo, proteína C reactiva y antiestreptolisina O.

TRATAMIENTO

En la fiebre recurrente la penicilina G parece ser el antibiótico de elección; para el caso de la enfermedad de Lyme pueden utilizarse eritromicina, estreptomicina, amoxicilina en altas dosis, ampicilina, doxiciclina y tetraciclina.

PROFILAXIS

Combatir los piojos y garrapatas es una medida profiláctica que tiende a disminuir la incidencia de la enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

Baranton G. La borréliose dite de Lyme, maladie "nouvelle" identifiée depuis prés de 80 ans. Rev Générale Méd Malad Infect. 1986, 12:747-755.

Bukowski JA. Lyme disease: A tick-borne threat to people and pets. Vet Med. 1988, April: 346-358.

Johnson RC. Isolation techniques for Spirochetes and their sensitivity to antibiotics in vitro an in vivo. Rev Infect Dis 1989, vol.II, sup.6: S1505-S1510.

Mazzonelli J, Hutter E, Brihuega B, Laballen H. Borreliosis de Lyme. Encuesta serológica en Perros. Memorias IV Reunión anual Asoc Arg vet Lab Diag (Tandil). Diciembre 1988.

Schulze T. Prevalence of canine Lyme Disease from an Endemic Area as Determined by Serosurvey Zbl Bakt Hyg A 1986, 263:427-434.

Stanchi N, Balague L. Lyme disease: Antibodies against *Borrelia burgdorferi* in farm workers in Argentina. Journal of Public Health (Brazil) 1993, 27,4:305-307.

Stanek G, Strle F, Gray J, Wormser GP. History and Characteristics of Lyme Borreliosis. CAB International. Edited by Gray J, Khal O, Lane R, Stanek G. *Lyme Borreliosis*: Biology, Epidemiology and Control. 2002.

Steere AC. Lyme disease. New England Jour Med. 1989, 321, 9:586-596.

Wang G, Van Dam AP, Schwartz I, Dankert J. Molecular Typing of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato: Taxonomic, Epidemiological, and Clinical Implications Clin Microbiol Rev. 1999, 12, 4: 633-653

Capítulo 47

BORDETELLA

Carlos Juan Perfumo

INTRODUCCION

La infección del tracto respiratorio por *Bordetella bronchiseptica* ha sido descrita en animales de laboratorio (ratas, ratones, conejos y cobayos), animales de producción (cerdos y conejos), de compañía (perros y gatos) y animales silvestres. En algunas de estas especies, la infección se manifiesta con signos clínicos respiratorios incluyendo retraso del crecimiento y muerte, mientras que en otros es asintomática o subclínica. En la actualidad, el espectro de hospedadores susceptibles se ha ampliado al hombre con inmunodepresión adquirida así como la contaminación de objetos inanimados del medio ambiente. Se realiza una revisión y actualización de la infección natural y experimental producida por esta bacteria en las especies domésticas y animales de laboratorio así como su diagnóstico, tratamiento y control.

CLASIFICACION

El género *Bordetella* comprende 7 especies, 3 de ellas muy relacionadas: *pertussis, parapertussis* y *bronchiseptica* las que tienen tropismo exclusivo por el tracto respiratorio de los mamíferos, *B. avium* que causa coriza en pavos y *B. hinzii, B. holmensii* y *B. trematum* que causan infecciones oportunistas en el hombre. La *B. pertussis* está adaptada exclusivamente al hombre en el que produce la tos convulsa. La *B. parapertussis* afecta al hombre (seudotos convulsa) y ovinos (neumonía no progresiva en corderos) y la *B. bronchiseptica* ha sido aislada de un amplio espectro de hospedadores y es considerada la especie progenitora de las anteriores.

La *Bordetella* es un bacilo gramnegativo, móvil y de escasa o nula actividad bioquímica. No fermenta los hidratos de carbono, no licua la gelatina, es indol e SH_2 negativo, catalasa débilmente positiva y ureasa positiva. En el medio de cultivo de agar Bordet-Gengou a las 48 horas da colonias de 1 mm de diámetro, de aspecto rugoso y de brillo metálico. En agar sangre, las colonias son más grandes, de color grisáceo y bordeadas de halo de hemólisis no muy manifiesta (tabla 47-1).

ENTIDADES PRODUCIDAS POR LA INFECCION POR *BORDETELLA BRONCHISEPTICA*

Cerdo: rinitis atrófica regresiva, bronconeumonía en lechones.

Perro: traqueobronquitis infecciosa (tos de las perreras o *kennel cough*). En ocasiones, el cuadro puede inducirse o agravarse por infecciones concurrentes por adenovirus canino tipo 2 (CAV-2) o parainfluenza canina (PIC).

Gato: enfermedad de las vías aéreas superiores (URTD, *upper respiratory tract diseases*) conjuntamente con los virus calicivirus felino (FCV), herpesvirus felino (FHV) y *Chlamydophila felis*.

Conejos (de producción y de laboratorio): rinitis (coriza) y bronconeumonía.

Ratas, ratones y cobayos: bronconeumonía.

FACTORES DE PATOGENICIDAD (VIRULENCIA)

Los mismos pueden ser clasificados en dos grupos: los que favorecen la colonización y multiplicación y, los que permiten a la bacteria escapar a los mecanismos defensivos del hospedador.

Los del primer grupo están relacionados con la adherencia de la bacteria a la mucosa respiratoria, la que puede producirse por medio de estructuras tipo fimbrias y no fimbrias (adhesinas de naturaleza proteica de la membrana externa). Existen al menos cinco tipos de fimbrias y dentro de los mecanismos de adhesión no fimbrias se incluyen a la hemaglutinina filamentosa (FHA) y pertactina (Pt). La multiplicación de la *B. bronchiseptica* en el tracto respiratorio es facilitada por la disponibilidad de aminoácidos como fuente de crecimiento y de energía y por la producción de sideróforos y proteínas de unión que movilizan hierro a partir de transferrina, lactoferrina y hem de la hemoglobina.

Dentro de los factores de virulencia descritos en *B. bronchiseptica* para escapar por los mecanismos de defensa del hospedador se citan: toxina dermonecrótica (DNT), toxina adenilatociclasa (ACT), citotoxina traqueal (TCT), sistema de secreción tipo III, lipopolisacáridos (LPS) y mecanismos de invasión celular y supervivencia intracelular.

La DNT ha sido considerada la principal toxina relacionada con la virulencia y la protección. Es una citotoxina de naturaleza proteica, vasoconstrictora y mitogénica que inhibe a los osteoblastos y otras células mediante la alteración de la función de *GPT binding protein*. La DNT también es necesaria para la colonización de la *B. bronchiseptica*, para producir lesiones en el epitelio de revestimiento del tracto respiratorio superior/inferior y para inducir, conjuntamente con otras toxinas, osteopenia a nivel de los huesos turbinados de la nariz del cerdo.

La ACT es una hemolisina bifuncional que produce poros en las células hospedadoras y que inhibe la fagocitosis. La TCT es un muramil-depeptídico que estimula la producción de óxido nítrico (ON) y que interfiere en la función mucociliar.

El sistema de secreción tipo III permite a las bacterias gramnegativas traslocar moléculas proteicas efectoras hacia el medio extracelular, la membrana plasmática o el citoplasma de las células eucarióticas, en las que interactúa con numerosas vías de transducción facilitando una mejor interacción con la célula hospedadora. Así se ha demostrado que su eliminación resulta en una menor persistencia de la bacteria en las vías respiratorias.

Tabla 47-1. Características fenotípicas de la *B. bronchiseptica*

Pruebas	Resultados
Coloración de Gram	Gramnegativo
Morfología	Bacilo y cocobacilo
Oxidasa	Positivo
Catalasa	Positivo
Cápsula	Positivo
Movilidad (en medio SIM)	Positivo
Hidrólisis de la urea	Positivo
IMVIC	- - - +
SH_2	Negativo
Fermentación: glucosa, lactosa, sacarosa	Negativo
Crecimiento en agar Mac Conkey	Positivo a las 48 horas
Hemólisis de eritrocitos de ovino en agar Bordet Gengou	Positivo

En las bacterias gramnegativas, los LPS intervienen en la infección mediante una variedad de mecanismos que incluyen: mediación en la adherencia al epitelio ciliado, variación antigénica, mimetismo molecular e inducción de anticuerpos bloqueantes. En particular en *B. bronchiseptica*, los LPS intervienen sólo cuando se ha desarrollado la inmunidad adaptativa favoreciendo su persistencia a nivel de la tráquea y el pulmón.

Los mecanismos de invasión celular y supervivencia intracelular involucran a las células epiteliales y a las dendríticas (presentadoras de antígenos) y favorecen la persistencia de la infección.

REGULACION GENETICA DE LOS FACTORES DE PATOGENICIDAD (VIRULENCIA)

Por técnicas de biología molecular se han identificados los genes relacionados con los antígenos que confieren protección así como los vinculados con la virulencia.

Los diversos factores de virulencia de las 3 especies de *Bordetella* son regulados por un sistema de transducción formado por dos componentes denominados Bvg AS (*Bordetella* virulence genes). Cuando se producen las proteínas inducidas por el *locus* Bvg, las mismas activan una serie de genes de virulencia (vir-activated genes-Vag´s) que son los responsables de las manifestaciones clínicas y patológicas de la infección y reprimen otros (vir-repressed genes -Vrg´s). Este mecanismo de regulación puede ser activado en sentido inverso o ser anulado por ciertas condiciones ambientales, como la temperatura corporal, las concentraciones fisiológicas de Na o K y bajas concentraciones de ácido nicotínico. Cuando las señales del medio ambiente son revertidas se expresa Vrg´s y se reprime Vag´s dando como resultado un cambio reversible del fenotipo de virulencia *B. bronchiseptica* fase I (virulenta) a fase II (avirulenta) aspecto éste denominado modulación. Así, cuando una cepa es Bvg$^-$ (*B. bronchiseptica* fase II), no es funcional y la síntesis de proteínas Bvg-dependientes no se producen aun cuando los genes dependientes estén intactos.

PATOGENIA EN LAS DISTINTAS ESPECIES

En la infección por *B. bronchiseptica*, la puerta de entrada es respiratoria a través de la inhalación de gotas de exudado de un animal con signos clínicos, asintomático o de fomites contaminados. La característica más saliente es la colonización prolongada del epitelio ciliado de las vías áreas, con o sin manifestaciones clínicas dependiendo de la especie animal afectada. Los animales jóvenes son más susceptibles y la manifestación clínica de la enfermedad en algunas especies requiere de la coinfección con otros agentes, en particular virus. El estornudo y la tos son los signos más salientes, y desde el punto de vista histopatológico la marcada infiltración de neutrófilos en las vías áreas es el hallazgo distintivo. El primer paso en la patogénesis de la infección es su colonización en la mucosa respiratoria a través de la adhesión al epitelio ciliado de nariz (cerdos, conejos), tráquea (gatos, cerdos, perros) y bronquios (gatos, perros, animales de laboratorio y cerdos), la que se produce, en condiciones experimentales, a los 3 días posinfección. Las cepas que tienen dicha propiedad son genotípicamente Bvg positivas y dicha propiedad va ligada fenotípicamente in vitro a la formación de colonias lisas, presencia de cápsula, capacidad de producir α-hemólisis de medio de Bordet Gengou y causar dermonecrosis en conejos y cobayos (DNT). Los factores de adherencia bacterianos son varios y cambian según progresa la infección y la respuesta innata o adquirida del hospedador. Así se han identificado FHA, Pt, siendo los receptores de la célula hospedadora hidratos de carbono presentes en los cilios. La persistente adhesión evita su eliminación por el mecanismo de barrido del aparato mucociliar y favorece su multiplicación in situ con la producción y secreción de exotoxinas, DNT, ACT y TCT.

En el cerdo, la colonización por *B. bronchiseptica* es mayor en la mucosa de la nariz que en la de tráquea, bronquio y tonsila y se produce a los 11 días posinoculación. La DNT ocasiona a nivel de la nariz hipoplasia moderada de los huesos turbinados por insuficiencia osteoblástica, y en el pulmón, necrosis y fibrosis alveolar y hialinización de los vasos sanguíneos probablemente sumado a la liberación de citoquinas, en particular TGFα (factor transformador del crecimiento alfa, *transforming growth factor* α), macrófagos y neutrófilos presentes en la inflamación.

En el perro, en condiciones de campo experimentales, la FHA y Pt intervienen en la adherencia y las DNT, ACT y TCT así como las endotoxinas producen necrosis del epitelio de revestimiento de las vías aéreas, facilitan la infiltración de células inflamatorias y suprimen la respuesta inmune humoral y celular.

En el gato, se describe una infección persistente y asintomática, que puede manifestarse por infecciones virales intercurrentes.

En el conejo, se describe una inflamación de los bronquios y bronquiolos caracterizada por hiperplasia y metaplasia del epitelio e hiperplasia de las células globosas, descamación epitelial e infiltración de heterófilos y mononucleares en la luz.

En la rata y el ratón sólo existe información sobre su uso como modelos animales para la reproducción de lesiones compatibles con la rinitis atrófica del cerdo así como estudios sobre la patogénesis de la infección. De estos estudios se ha comprobado que FHA es utilizada para la colonización de la tráquea y que el sistema de secreción tipo III y las fimbrias para su pesistencia en la mucosa. Se considera que estas especies pueden actuar como portadores inaparentes o asintomáticos.

En el cobayo, la infección se presenta con signos clínicos: secreción nasal, disnea, pérdida de peso y aumento de la mortalidad. Se describe un cuadro de bronconeumonía catarral sin compromiso pleural.

DIAGNOSTICO

Aislamiento e identificación de *B. bronchiseptica*

Siendo una bacteria que sólo coloniza el tracto respiratorio anterior o caudal, se deben tomar muestras mediante hisopos, aspirados o lavados de la cavidad nasal, tráquea/bronquios o pulmón. La *B. bronchiseptica* no requiere de medios especiales para su aislamiento primario. Crece bien en agar tripticasa soya o agar fosfato triptosa con o sin agregado de sangre ovina al 5%. Se utiliza el medio agar Bordet Gengou para distinguir diferentes tipos de colonias y como medios selectivos y diferenciales se utilizan agar Mac Conkey o agar Smith-Baskerville con la adición de furaltadona o agar tergitol 7 con el agregado de cloruro de tetrazolium. La caracterización bioquímica se realiza por las pruebas indicadas en la tabla 47-1 y la identificación serológica mediante la prueba de aglutinación rápida en placa con suero policlonal anti-*B. bronchiseptica* fase I.

Serología

Para realizar estudios poblacionales, se utiliza la detección de anticuerpos anti-*B. bronchiseptica* mediante las pruebas de aglutinación lenta en tubo con sueros tratados y no tratados con 2ME y la prueba directa de ELISA. En ambas pruebas se emplea como antígeno la célula bacteriana entera.

Pruebas de biología molecular

Tanto para diagnóstico como para estudios de epidemiología molecular se utiliza la prueba de PCR, mediante la amplificación de fragmentos de DNA de la membrana externa y adhesinas así como una adaptación de la misma denominada *colony lift hybridization assay*.

CONTROL DE LA INFECCION MEDIANTE MEDICACION

Guarda interés en las especies de producción (cerdos, conejos); en los animales de laboratorio, priva el criterio de libres de *B. bronchiseptica*. Como se trata de una infección persistente de superficie a nivel de las vías respiratorias, se debe considerar al seleccionar un antibiótico al cual la bacteria es sensible mediante la realización de antibiogramas, la vía de administración, vía de excreción y persistencia en la misma. Se ha comprobado que la *B. bronchiseptica* es sensible a la mayoría de los antibióticos usados en medicina veterinaria como: tetraciclinas, florfenicol, ceftiofur y fluoroquinolonas.

CONTROL DE LA INFECCION MEDIANTE VACUNACION

En las especies domésticas, la mayor experiencia de su uso se observa en los cerdos para el control de la rinitis atrófica progresiva. Si bien en esta entidad el papel más importante lo cumple la *Pasteurella multocida* toxigénica, las vacunas que sólo incorporan como inmunógeno a dicha bacteria o su toxina dermonecrótica son menos eficaces que aquellas que incluyen células de *B. bronchiseptica* o alguno de sus factores de patogenicidad como DNT inactivado. Las vacunas comerciales en uso son combinación de bacterias muertas (bacterinas) y factores de virulencia inactivados (toxoides) incorporados en un adyuvante (hidróxido de aluminio). Las mismas se aplican por vía subcutánea en 2 dosis con 15 días de intervalo. La edad de vacunación variará de acuerdo al tipo de establecimiento y a la etapa de producción en la cual los animales son más susceptibles o quedan expuestos a una mayor presión infecciosa. En la producción porcina, es común la vacunación a las madres, y cuando disminuyen los anticuerpos calostrales, también a la camada. En los perros y gatos, la *B. bronchiseptica* está incorporada a las vacunas para la prevención de las enfermedades virales.

BIBLIOGRAFIA

Ackermann MR, Register KB, Gentry-Weeks C, Gwaltney SM, Magyar R A porcine model for the evaluation of virulence of *Bordetella bronchiseptica*. J Com Path. 116: 55-61, 1997.

Bemis DA, Shek WR, Cliffoer CB. *Bordetella bronchiseptica* infection in rats and mice. Comp Med. 53: 11-20, 2003.

Harvill ET, Preston A, Cotter PA, Allen AG, Maskell DJ, Miller JF. Multiple roles for *Bordetella* lipopolysaccharide molecules during respiratory tract infection. Infec Immun. 68:6720-6728, 2000.

Keil DJ, Fenwick B. Canine respiratory bordetellosis. Keeping up with an evolving pathogens. En: Recent Advances in Canine Infectious Diseases. Ed. Carmichael, L.E. Ed. International Veterinary Information Service. (www.ivis.org.)

Perfumo CJ, Menéndez NA, Moras ED, Idiart JR. Bronconeumonía en lechones producida por *Bordetella bronchiseptica* asociada a colibacilosis. Rev Med Vet. 61:137-145. 1980.

Perfumo CJ, Petruccelli MA, Brandetti E, Menéndez NA, Venturini MA, Arce EJ. Bronconeumonía del conejo producida por *Bordetella bronchiseptica*. Estudio de un caso de campo. Bol de Cunicultura (España) 7: 33-39, 1984.

Perfumo CJ, Venturini MC, Petruccelli MA, Gómez C, Brandetti E, Menendez NA, Risso MA, Porras AI, Ibargoyen G. Bronconeumonía del conejo producida por *Bordetella bronchiseptica*. II. Reproducción experimental con bacterias vivas y sobrenadante estéril de bacterias sonicadas. Rev Med Vet. 66:78-88. 1984.

Perfumo CJ, Venturini MC, Risso MA, Mercuri G, Petruccelli MA, Herrero MA, Porras AI. Bordetellosis del cobayo. Infección experimental e inmunoprofilaxis. Memorias IV Reunión Anual de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. pag.139-142. Tandil Bs.As. 1990.

Register KB. Recent advances in understanding the role of *Bordetella bronchiseptica* and its virulence factors in swine respiratory diseases. Proceedings 16th IPVS Congress, Melbourne, Australia 17-20 Sept.2000. p. 483-488.

Venturini MC, Perfumo CJ, Risso MA, Gomez CM, Piscopo MV, Sala de Miguel M, Godoy H. Effect of aflatoxin B1 on resistance induced by *Bordetella bronchiseptica* vaccine in rabbits. Vet Microbiol. 25:209-216, 1990.

Yuk MH, Harvill ET, Cotter PA, Miller JF. Modulation of host immune response, induction of apoptosis of NF-kB activation by the *Bordetella* type III secretion system. Mol Microbiol. 35: 991-1004, 2000.

Capítulo 48

NEISSERIA

Nélida Amelia Leardini

INTRODUCCION

Es el principal género dentro de la familia Neisseriaceae la cual está compuesta por microorganismos que pueden presentarse como cocos aislados, en pares (diplococos), en grupos, o algunas especies con forma francamente bacilar o bien cocoide y aún formar cadenas cortas. Algunas cepas son capsuladas. Todos son gramnegativos, pero a veces con tendencia a resistir la decoloración, por lo cual aparecen como grampositivos. Son inmóviles por ausencia de flagelos. Varias especies poseen pili, los cuales entre otras funciones, facilitan la adherencia a las mucosas y por ende la invasividad tisular.

Desarrollan en condiciones aeróbicas. Ciertas cepas crecen en anaerobiosis, pero dando cultivos escasos. Algunas especies requieren una tensión reducida de oxígeno, siendo estimuladas por incremento en la proporción de anhídrido carbónico (capnofilia). El rango de temperatura óptima fluctúa entre 32 y 36 °C aproximadamente, y especies como *Neisseria gonorrhoeae* son muy sensibles a temperaturas aún ligeramente superiores. En cuanto a los requerimientos nutricionales, las hay muy exigentes (*Kingella*, *Eikenella*, ciertas especies de *Neisseria*), mientras otras crecen en medios simples. Todas las especies producen oxidasa. Esto demuestra la gran heterogeneidad de los integrantes de esta familia, la cual fuera descrita por Prévot en 1933.

En la última edición del Manual de Bergey (2001), la familia Neisseriaceae ha sufrido grandes cambios, ya sea por la eliminación de géneros muy importantes como *Moraxella* y *Acinetobacter*, así como la incorporación de muchos géneros nuevos. Está ubicada en la clase II, orden IV Neisseriales, y comprende a los géneros *Alysiella, Aquaspirillum, Catenococcus, Chromobacterium, Eikenella, Formivibrio, Iodobacter, Kingella, Laribacter, Microvirgula, Neisseria, Prolinoborus, Simonsiella, Vitreoscilla y Vogesella*. De todos ellos el más importante es el género I (*Neisseria*). En mucho menor grado son mencionados *Kingella* (gen. IX), *Eikenella* (gen. VI), *Alysiella* (gen. II), *Simonsiella* (gen. XII). Escasamente se considera *Chromobacterium* y en el caso de *Aquaspirillum* se cita especialmente en muestras ambientales.

De acuerdo con lo expuesto, el género *Neisseria* integra la familia Neisseriaceae y los nuevos estudios taxonómicos han postulado la existencia de relación con especies de *Eikenella* o de otros géneros nuevos como *Simonsiella* y *Alysiella*, y aun con integrantes de los grupos CDC EF-4 y M-5. Este último es denominado en algunas publicaciones como *Neisseria paraelongata* y desde 1995 se conoce como *Neisseria weaveri*, asociada a infecciones de heridas por mordeduras de animales, especialmente de perros. La mayoría de estos microorganismos forman parte de la microbiota oral de humanos y animales. Ninguna de las especies del género descrito, se considera hasta el momento que produzcan enfermedades en animales, por ello se hará un breve desarrollo, a efectos de brindar los conocimientos microbiológicos actualizados necesarios para el tema.

El género tratado en este capítulo comprende dos especies patógenas primarias, *N. meningitidis* (meningococo) y *N. gonorrhoeae* (gonococo). Las restantes especies son comensales, tanto del hombre como de animales, y excepcionalmente se mencionan como causa de patología en el hombre.

Las principales especies de origen animal son *N. canis*, *N. caviae*, *N. cuniculi*, *N. iguanae*, *N. ovis*, *N. weaveri*. Para algunas de ellas la posición taxonómica permanece en debate. Todas son muy inactivas frente a los hidratos de carbono y en el caso de *N. canis*, *N. cuniculi* y *N. ovis* presentan la capacidad de hidrolizar tributirina, carácter que no es común en especies del género *Neisseria*, pero es un marcador importante de *Moraxella catarrhalis* (ex *Neisseria catarrhalis*, ex *Branhamella catarrhalis*).

Tabla 48-1. Géneros de familias Neisseriaceae/Moraxellaceae

Características	*Neisseria*	*Moraxella*		*Acinetobacter*	*Kingella*
Morfología	Cocos	Cocobacilares	Cocoides**	Cocobacilares	Bacilar
Oxidasa	+	+	+	0	+
Catalasa	+	+	+	+	0
Acción sobre carbohidratos	+ (0)*	0	0	0/+	+
Saprófito o parásito	P	P	P	S	P
DNAsa/tributirina esterasa	0	0	+	0	0
Crecimiento en Mac Conkey	0	0 (+)	0	+	0

* *Neisseria cinerea* y *N. flavescens* no utilizan carbohidratos.
S: saprófito, P: parásito.
** Ex *Branhamella*

Algunas publicaciones refieren que en delfines se han aislado cepas muy similares a *Neisseria mucosa*, especie comensal humana.

DESCRIPCION

Todas las especies (excepto *N. elongata*) se presentan como diplococos gramnegativos, con los lados adyacentes achatados, como si fueran granos de café o de forma arriñonada. El tamaño de las células varía según las especies, entre 0,6 y 1,5 µm. También influyen en su magnitud el origen del aislamiento y la edad del cultivo, tanto que en algunos pueden observarse células gigantes.

N. elongata, anteriormente conocida como grupo CDC M-6, es en realidad cocobacilar y forma diplobacilos, hallándose también cadenas cortas. Hay especies que son capsuladas y algunas presentan pigmentos carotenoides endocelulares, que varían desde el amarillo franco al amarillo verdoso pálido. Hay especies que producen potentes autolisinas, las cuales lisan el cultivo después de 24 horas de incubación, y por lo tanto hay que trabajar siempre con cultivos jóvenes, tal el caso de *N. gonorrhoeae*.

Muchas cepas de *Neisseria* poseen exigencias nutricionales para su desarrollo y algunas son tan sensibles a la presencia de ácidos grasos, que se requiere la eliminación de los mismos en los medios de cultivos y aun en el algodón de los hisopos con los cuales se toman las muestras. Un ejemplo notable de estas características es *N. gonorrhoeae*, la cual además necesita ser estimulada incrementando el tenor de dióxido de carbono y la humedad en la atmósfera de cultivo. Todas las especies del género son productoras de oxidasa.

La actividad metabólica es variable y la utilización de los hidratos de carbono, cuando se produce, es siempre por vía oxidativa. Al no existir fermentación, la concentración de ácidos a partir de carbohidratos es baja y como además estos microorganismos producen amonio por metabolismo de las peptonas del medio, el cual a su vez neutraliza la escasa acidez que se genera, no deben emplearse los mismos medios usados para estudios metabólicos de enterobacterias, sino otros con bajo contenido de peptonas e indicadores de pH más sensibles, como el rojo de fenol. Por otra parte, no siempre el metabolismo de carbohidratos conduce a un incremento de la acidez, dado que algunas especies prosiguen la degradación hasta moléculas más pequeñas, como el dióxido de carbono y no se acumulan ácidos a pesar que los hidratos de carbono han sido metabolizados. O sea que la técnica de identificación bioquímica en *Neisseria* spp es detectar la producción de ácido, no las rutas metabólicas.

DISTRIBUCION NATURAL

En humanos y ciertos animales, la mayoría son microorganismos habitantes normales de las membranas mucosas de la nasofaringe y la cavidad oral y son habitualmente no patógenas. Excepcionalmente las especies no patogénicas se aislan de otras membranas mucosas y en esos casos se consideran colonizantes oportunistas y no parte de la microbiota normal.

Como se dijo, las especies patogénicas son *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*, o sea que poseen factores de virulencia capaces de provocar enfermedad. Las cepas de *N. gonorrhoeae* siempre son patógenas e infectan la mucosa anogenital y las mucosas expuestas de la zona orofaríngea. *N. meningitidis* puede colonizar naso y orofaringe sin provocar patología, sino un estado de portación, y a su vez también puede colonizar mucosas anogenitales, especialmente en homosexuales. Algunas de las cepas causarán meningitis con característica epidémica y aguda.

Es probable que por las dificultades en la identificación de todas las especies de *Neisseria* y por ser microorganismos que mueren rápidamente (incluso las triviales), las estadísticas de colonización de las especies patógenas presenten datos erróneos, ya que en los últimos trabajos se ha detectado que tanto niños como adultos pueden encontrarse colonizados por varias especies de *Neisseria* y aun por múltiples cepas del grupo *N. subflava–N. sicca*, persistiendo la colonización largo tiempo. También se ha demostrado esa persistencia en el caso de *N. meningitidis* y *N. lactamica*. Hay algunas especies que muestran variación geográfica en su distribución, tal como *N. polysaccharea*.

Aquellas especies que forman parte de la microbiota habitual, si excepcionalmente causan patología lo hacen como oportunistas, favorecidas por las condiciones de base predisponentes del hospedador.

Neisseria meningitidis

Respecto a las especies aisladas exclusivamente en el hombre y como ejemplo de verdadero patógeno humano, se describirá una de ellas, con gran impacto en salud pública en diversos grupos etarios.

EPIDEMIOLOGIA

Es un parásito humano estricto. En la población se encuentra entre 5 y 15% de portación nasofaríngea y esto puede aumentar por cuestiones estacionales y el grado de hacinamiento ambiental. El microorganismo se transmite de persona a persona a través de secreciones respiratorias o por gotitas de Flügge. Generalmente existe una colonización asintomática de la nasofaringe constituyendo un estado de portador, el cual se sabe que puede permanecer por semanas.

En ciertos individuos, posiblemente por una infección respiratoria viral concurrente, la bacteria pasa al torrente circulatorio e invade las meninges. En otros casos, no se produce el cuadro de meningitis sino una septicemia fulminante, con manifestaciones

Agrupamiento de especies por relaciones genéticas

* *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae* están muy relacionadas. Incluso *N. kochii*, especie infrecuente, que en realidad es considerada una subespecie de *N. gonorrhoeae* y no posee un estado taxonómico independiente.

* *N. polysaccharea*, *N. lactamica*, *N. cinerea* y *N. flavescens* están relacionadas con *N. gonorrhoeae*, pero cada una con distintos grados de aproximación.

* Cepas de *Neisseria* spp sacarolíticas tienen relación lejana con los grupos anteriores (*N. mucosa*; *N. subflava* biovar *subflava*; *N. subflava* biovar *flava*; *N. subflava* biovar *perflava*; *N. sicca*).

* Las especies de origen animal están aún más distanciadas de todas las anteriores y algunas de ellas con posición taxonómica incierta. Ciertos autores las ubican en el género *Moraxella*.

HABITAT DE ESPECIES AISLADAS EN ANIMALES

N. canis	Gatos/perros	Comensal en fauces Aislada en humanos por mordeduras animales
N. denitrificans	Cobayos	Comensal en fauces
N. weaveri	Perros	Comensal de tracto respiratorio superior En humanos, por mordeduras de perros
N. iguanae	Iguana	Comensal
N. macacae	Monos	Comensal
*N. ovis**	Ovinos/bovinos	Comensal Causa queratoconjuntivitis en ovinos
*N. caviae**	Cobayos	Comensal en fauces
*N. cuniculi**	Conejos	Comensal en boca

* Especies de posición taxonómica incierta.

dérmicas en forma de petequias, a partir de las cuales puede ser aislado el meningococo.

La infección meningocócica puede adoptar formas atípicas como artritis, neumonía, conjuntivitis, pericarditis, uretritis. Esto sucede como parte de un cuadro sistémico o como una situación aislada.

La meningitis meningocócica es de distribución mundial. En la mayoría de las zonas la enfermedad sigue un esquema endémico, con pequeños brotes aislados. Pero en otras áreas geográficas, ocurren importantes epidemias a intervalos regulares. Los grupos etarios más afectados son infantes, niños y adolescentes, aunque en los casos que hubo últimamente en Argentina, se citaron algunos afectados de más de 30 años.

MORFOLOGIA

Es un coco gramnegativo, frecuentemente en pares (diplococo) con sus lados chatos enfrentados. En muestras de origen patológico se encuentra aislado o en grupos pequeños, intra o extracelulares. Generalmente es capsulado.

IDENTIFICACION

Desarrolla en condiciones aeróbicas, en atmósfera húmeda, dentro de un rango óptimo de incubación de 35-36 °C. El cultivo se estimula por incremento de 5 a 10% de CO_2.

Junto con *N. gonorrhoeae* conforman las especies de *Neisseria* con exigencias nutricionales, pero es mucho menos exigente e inclusive puede crecer en medios no tan enriquecidos, como agar Müeller-Hinton. Por agregado de sangre fresca o calentada (agar-chocolate) se estimula el desarrollo.

Cuando debe ser aislado a partir de muestras con microorganismos propios, tal el caso de nasofaringe en estudios de portación, es aconsejable emplear medios selectivos con mezclas antibióticas, las cuales inhiben el desarrollo de *Neisseria* comensales, a excepción de *N. lactamica* y una especie poco frecuente, *N. polysaccharea*. Por ello desde el punto de vista epidemiológico hay que evitar errores diagnósticos en la identificación.

En los medios enriquecidos, *N. meningitidis* produce al cabo de 18 a 24 horas colonias de 1 a 2 mm de diámetro, lisas, redondeadas y convexas, grisáceas, brillantes. Algunas cepas dan colonias mucoides, muy adherentes a la superficie del medio.

La identificación presuntiva se basa en la observación microscópica y en las pruebas de oxidasa y catalasa, ambas positivas. Se confirma el aislamiento por métodos bioquímicos de utilización de hidratos de carbono. El medio CTA (cystine trypticase agar) es uno de los de elección para detectar producción de ácido a partir de los azúcares. Se inocula en superficie por punción en CTA-glucosa y CTA-maltosa, a una concentración final de 1%.

Excepcionalmente se encuentran cepas que no acidifican. En esos casos se impone la diferenciación con la otra especie patógena, *N. gonorrhoeae*, la cual en principio es mucho más exigente y de desarrollo más lento, además de las diferentes estructuras antigénicas. Es muy importante la correcta diferenciación, en el caso de homosexuales y ante situaciones de violación. Existen métodos comerciales para identificación de *Neisseria* spp, algunos miniaturizados con período de incubación normal y otros por pruebas de detección rápida de la actividad enzimática.

TIPIFICACION

N. meningitidis se clasifica en grupos serológicos basados en la presencia de antígenos polisacáridos capsulares y proteínas de membrana externa. Existen numerosos serogrupos que superan la decena, pero los más conocidos son A, B, C, D, 29E, H, I, K, L, W135, X, Y, Z. De ellos, los hallados con más frecuencia en cuadros sistémicos corresponden a los grupos A, B, C, W135, Y. Los grupos A y C aparecen como los mayores causantes de situaciones epidémicas, mientras que el grupo B está más involucrado en casos esporádicos producidos en períodos interepidémicos o bien esas cepas han sido a aisladas en brotes muy localizados. En comunidades cerradas que incluyen hacinamiento, se han encontrado otros serogrupos tanto en portadores sanos como en procesos infecciosos. Existen métodos empleados en estudios epidemiológicos, basados en la investigación de las proteínas de membrana externa, PCR, electroforesis de campo pulsado, ribotipificación y análisis de multilocus enzimático. Ninguno de ellos forma parte de la rutina diagnóstica de laboratorio.

En el caso de diagnóstico de meningitis meningocócica, dado que el polisacárido capsular difunde en el líquido cefalorraquídeo, este puede ser detectado con reactivos comerciales obtenidos por sensibilización de partículas de látex con antisueros específicos contra el polisacárido de grupo. Es una prueba de aglutinación rápida muy efectiva.

SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

Si bien fue un microorganismo sensible a la mayoría de los antibióticos, desde el momento de la aparición de las cepas productoras de betalactamasas codificadas por plásmidos o con resistencia intermedia (cromosómica), los esquemas terapéuticos debieron ser revisados, sobre todo teniendo en cuenta la importancia de la quimioprofilaxis en los casos de portación nasofaríngea, especialmente en los contactos de pacientes con infecciones meningocócicas, ya sea del ambiente familiar, escolar, militares, religiosos, u otras instituciones con comunidades cerradas, donde es crucial evitar la transmisión para controlar la diseminación de la enfermedad dentro de esa comunidad y desde ella hacia los contactos exteriores.

PREVALENCIA DE NEISSERIA, COMENSALES Y GENEROS RELACIONADOS

Moraxella catarrhalis (ex *Neisseria*, ex *Branhamella catarrhalis*)

Se consideró durante décadas microbiota normal de oro y nasofaringe humana, hasta que se demostró que era causa de infecciones del tracto respiratorio, inclusive sinusitis y otitis media. Actualmente se lo reconoce como un microorganismo patógeno capaz de ocasionar neumonías, enfermedad sistémica, sinusitis, otitis media y oftalmía neonatal. Probablemente esta bacteria coloniza a ciertas personas, quienes serían portadores, tal como se observa con *Neisseria meningitidis*.

N. lactamica

Se halla colonizando fauces de niños más que en adultos. Hay una prevalencia de más del 20% en niños entre 18 y 24 meses, siendo menor en bebés de muy pocos meses de vida y declinando en mayores de 15 años. Este esquema de colonización se asocia al gran consumo de leche de los niños pequeños. Es la única especie capaz de metabolizar lactosa, y esa característica estimularía el aumento de la población de *N. lactamica* en las gargantas de los niños.

A diferencia de *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae* ya mencionados como patógenos verdaderos, esta especie nunca ha sido implicada como patógeno primario, sino como oportunista.

N. flavescens

Se ha mencionado escasamente en brotes de meningitis, pero los aislamientos informados de esta especie no son confiables, porque podrían tratarse de *N. polysaccharea* o *N. cinerea*.

Es imposible determinar con exactitud la portación de *Neisseria* comensales en los estudios previos al inicio de 1990, ya que la mayoría de esos estudios de prevalencia de *Neisseria* spp y *Moraxella catarrhalis* (ex *Neisseria*, ex *Branhamella*), fueron realizados con medios no selectivos, sin inhibidores del desarrollo de otros microorganismos presentes en las muestras, impidiendo la diferenciación de las colonias de especies relacionadas. Por ello se cree probable una subestimación de especies como *N. cinerea*, *N. lactamica*, *N. polysaccharea*, en las tasas de portación de las mismas, debido al sobredesarrollo de las especies sacarosa-positiva (*N. subflava* var. *perflava*, *N. mucosa*, *N. sicca*). Por otra parte, en los análisis hechos previos a la fecha citada, las pruebas empleadas no podían detectar la escasa producción de ácido en el metabolismo de estas especies, mientras que en la actualidad existen nuevas pruebas para identificar con mayor aproximación aún las especies comensales, que antes se descartaban.

Desde entonces se han encarado estudios empleando medios selectivos que inhiben el desarrollo de especies de otros géneros, pero seleccionando las especies comensales de *Neisseria* y *Moraxella catarrhalis*, ya sea diferenciando entre especies asacarolíticas o entre los diferentes grupos de especies.

Autores como Berger y Wulf habían analizado estadísticamente estudios sobre colonización de las fauces de adultos con diferentes especies de *Neisseria*, estableciendo los porcentajes,

Tabla 48-2. Diferenciación de las principales *Neisseria* spp y *Moraxella catarrhalis*

Especies	Crecimiento en medios selectivos	Aspecto de las colonias	Pigmento amarillo	Acidificación de			ONPG	DNAsa Tributirina esterasa
				Glucosa	Maltosa	Sacarosa		
N. gonorrhoae	+	Lisas	0	+	0	0	0	0
N. meningitidis	+	Lisas	0	+	+	0	0	0
N. lactamica	+	Lisas	+/0	+	+	0	[+]	0
*N. subflava**	0	Lisas	+	+	+	0/+	0	0
N. sicca	0	Rugosas	0	+	+	+	0	0
N. mucosa	0	Mucoides	+/0	+	+	+	0	0
N. favescens	0	Lisas	+	0	0	0	0	0
*N. cinerea***	0	Granulares	0	0	0	0	0	0
M. catarrhalis	0	Lisas	0	0	0	0	0	[+]

* La especie *N. subflava* incluye 3 subespecies: *subflava* (maltosa +), *flava* (maltosa y fructosa +) y *perflava* (maltosa, fructosa y sacarosa +).

** Inactiva bioquímicamente excepto $NO_2 \rightarrow N_2$.

Neisseria caviae, *N. ovis*, *N. cuniculi* y *Moraxella catarrhalis* tienen una posición taxonómica incierta.

pero en esos momentos aún no se empleaba la reducción de nitrato como prueba diferencial, por lo cual esos investigadores no podían reconocer *N. mucosa*, y por lo tanto la encuadraban como *N. sicca* o *N. perflava*, sobreestimando a estas especies.

Posteriormente, mediante otros medios encontraron que las cepas asacarolíticas (o sea aquellas que no presentan detección de ácido a partir de glucosa, sacarosa o fructosa) se hallan en el orden del 15% de todos los aislamientos.

Análisis más recientes indicaron que los adultos mostraban dos esquemas de colonización diferentes. Algunos estaban colonizados densamente por varias cepas de las especies sacarosa-positiva (*N. mucosa*, *N. perflava-N. sicca*), mientras que otro grupo poblacional estaba pobremente colonizado por varias especies distintas de *Neisseria*. Lo más notable fue que mientras la mayoría de las personas estaba colonizada por dos o tres especies, el 5% lo estaba por cuatro o cinco *Neisseria* spp, y que esa colonización era persistente, excepto cortos períodos.

Inclusive el otro dato consignado fue que la prevalencia puede variar geográficamente. Cepas de *N. subflava* biovar *perflava* resistentes a colistina, se han aislado en varias oportunidades en Chicago, siendo infrecuente en otros sitios. Mientras que cepas de *Kingella denitrificans* (microorganismo oportunista de otro género de la familia *Neisseriaceae*), se aislaron en el 16% de los pacientes de un condado y jamás en otros lugares.

BIBLIOGRAFIA

Barret SJ, et al. A new species of *Neisseria* from iguanid lizards, *Neisseria iguanae* sp. nov. Let. Appl Microbiol. 1994; 18: 200-202.

Dillon JR. Spread of penicillinase-producing and transfer plasmids from the gonococcus to *Neisseria meningitidis*. Lancet. 1983; i: 779-781.

Dirk A, et al. Genetic diversity of *Neisseria lactamica* strains from epidemiologically defined carriers. J Clin Microbiol. 2001; 39 (5): 1710-1715.

Gold DR. Carriage of *N. meningitidis* and *N. lactamica* in infants. J Infect Dis. 1978; 137: 112.

Guibourdenche M. Isolation of *Neisseria canis* in Mixed Culture from a Patient After a Cat Bite. J Clin Microbiol. 1989; 27: 1673-1674.

Guibourdenche M, Lambert T, Riou J. Isolation of *Neisseria canis* in mixed culture from a patient after a cat bite. J Clin Microbiol. 1989; 27: 1673-1674.

Hendolin P, et al. Use of multiplex PCR for simultaneous detection of four bacterial species in middle ear effusions. J Clin Microbiol. 1997; 35: 2854-2858.

Knapp JS. Historical Perspectives and Identification of *Neisseria* and Related Species. Clin Microbiol Rev. 1988; 1: 415-31.

Knapps JS, Holmes KK. Modified oxidation-fermentation medium for detection of acid production from carbohydrates by *Neisseria* spp. and *Branhamella catarrhalis*. J Clin Microbiol. 1983; 18: 56-62.

Taimor N, Hardy DJ, Bonnez W. *Neisseria elongata* subsp. *elongate*, a cause of human endocarditis complicated by pseudoaneurysm. J Clin Microbiol. 1996; 34 (3): 756-758.

Vedros NA, et al. *Neisseria macacae* sp. nov., a new *Neisseria* species from the oropharynges of rhesus monkeys. Int. J Syst Bacteriol. 1983; 33: 515-520.

Véron M, Grimont F. Relatedness of three species of "false *Neisseriae* ", *Neisseria caviae*, *Neisseria cuniculi* and *Neisseria ovis* by DNA-DNA hybridization and fatty acids analysis. Int J System Bacteriol. 1993; 43 (2): 210-220.

Capítulo 49

MORAXELLA

Nélida Amelia Leardini

INTRODUCCION

El género fue propuesto por Lwoff en 1939 y ubicado en la familia Neisseriaceae en 1968. En 1989 se postuló su exclusión y en 1991 se propuso la creación de una nueva familia, Moraxellaceae, para acomodar en ella a los géneros *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter* y otros organismos relacionados.

En la última edición del Manual de Bergey (2001) la posición taxonómica actual para estos microorganismos se postula según el esquema siguiente:

DOMINIO BACTERIA
PHYLUM BXII
CLASE III
ORDEN PSEUDOMONADALES
FAMILIA MORAXELLACEAE
Con géneros *Moraxella*, *Acinetobacter* y *Psychrobacter*

Los bacilos son muy cortos y gruesos, "regordetes", de allí la denominación de cocoides. Generalmente se disponen en pares o cadenas cortas y es por ello que pueden confundirse con *Neisseria*. Es frecuente observar en los cultivos variaciones de tamaño celular, de la forma y aun la producción de elementos filamentosos o de cadenas. Ese pleomorfismo puede ser estimulado por disminución del tenor de oxígeno o por incubación a temperaturas subóptimas. Resulta muy notable en cultivos envejecidos. Las formas cocoides son más pequeñas y se presentan aisladas o en pares. A veces pueden poseer cápsula. Son gramnegativos, con cierta tendencia a retener el colorante. No poseen flagelos, por lo tanto son inmóviles. En general son aerobios y excepcionalmente en anaerobiosis producen desarrollo escaso. Poseen oxidasa, generalmente también catalasa y son muy sensibles a la penicilina. Estos son marcadores diferenciales primarios entre *Moraxella* y *Acinetobacter*.

Muestran inactividad bioquímica frente a hidratos de carbono. La mayoría tienen exigencias nutricionales (medios complejos con sangre, suero, ascitis) y esa característica constituye una primera clave en la identificación de las especies que integran el género *Moraxella*.

Moraxella lacunata

Es la especie tipo. Muy exigente de suplementos nutritivos, generalmente medios adicionados con suero, a los cuales horadan por licuación, de allí la nomenclatura de la especie. Las cepas de origen humano provienen especialmente de conjuntivitis y aun de conjuntiva sana. También se ha aislado de tracto respiratorio superior y de hemocultivos. Parece ser el agente etiológico de ciertas infecciones oculares (conjuntivitis y queratitis), aunque debido a su gran sensibilidad antibiótica y a su dificultad de cultivo, raramente se recupera de materiales clínicos.

La epidemiología de casos recientes de conjuntivitis y queratitis por *Moraxella* revela que hay dos poblaciones de alto riesgo muy diferentes: gerontes masculinos alcohólicos y adolescentes femeninas. También se ha aislado de conjuntiva sana de cobayos y otros animales.

Moraxella bovis

Es la especie más importante en veterinaria. El primer aislamiento representativo de etiopatogenia fue realizado por Alien en 1919, a partir de queratoconjuntivitis de bovinos. El microorganismo hallado se asemejaba al denominado bacilo de Morax-Axenfeld, reconocido como causante de conjuntivitis humana.

Es un bacilo gramnegativo corto, cocoide, el cual se presenta solo o en pares (diplobacilos) y a veces en cadenas cortas de elementos cocoides. Su morfología microscópica es muy semejante a la de *Acinetobacter* spp, de las cuales es fácilmente diferenciable desde el punto de vista nutricional y por los restantes caracteres bioquímicos.

Son bacterias aerobias, inactivas frente a hidratos de carbono, con exigencias nutritivas, lo cual impone el uso de medios enriquecidos para su desarrollo (sangre, suero).

EPIDEMIOLOGIA

No queda duda que la queratoconjuntivitis infecciosa es la patología ocular más común del ganado en todo el mundo y la mayor causa de deterioro en el animal y de daños económicos por pérdida de producción.

La incidencia anual estimada en Estados Unidos es de 5% y se considera que la mitad de todos los rebaños poseen ganado infectado. Las epizootias ocurren con una morbilidad aproximada del 90%. Es una enfermedad altamente infecciosa de bovinos, ovejas y cabras, caracterizada por blefaroespasmo, conjuntivitis, lagrimeo y distintos grados de opacidad corneal y ulceraciones. Los síndromes clínicos en las tres especies animales son distintos y aparentemente causados por agentes específicos. En bóvidos la causa principal es sin duda *Moraxella bovis*, aunque el virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina y una especie de *Mycoplasma* han demostrado que producen opacidad corneal transitoria. Se considera que estos últimos agentes podrían potenciar la enfermedad por *Moraxella bovis*.

El ganado bovino es el principal hospedero de las llamadas moscas de la cara (*Musca autumnalis*), diferenciables de la mosca doméstica común (*Musca domestica*). Pero también puede alimentarse de secreciones de caballos, ovejas y cabras. Constituyen una plaga para el ganado en campos de pastoreo, no así el confinado en establos alimentados por *feedlot*. Estos insectos poseen un probóscide esponjoso y cuatro bandas longitudinales en el abdomen. Las denominadas moscas de la cara, a veces se encuentran en grandes cantidades alrededor de los ojos y sobre

Tabla 49-1. Algoritmo para la identificación de las especies del género *Moraxella*

CLAVE DE IDENTIFICACION DEL GENERO *MORAXELLA*

Organismos bacilares

A No desarrolla en medios con acetato o sales de NH_4

1	FEA* -	UREA -		
	a	→ Licua coágulo		
	b	→ No hemólisis	NO_2 +	*M. lacunata*
	bb	→ Hemólisis +	NO_2 –	*M. bovis*
	aa	→ No licua coágulo / No hemólisis		
	b	→ NO_2 + colonias		*M. nonliquefaciens*
	bb	→ NO_2 – colonias		*M. atlantae* (M-3)
2	FEA +	UREA +		ex *M. phenylpiruvica* actualmente *Psychrobacter phenylpyruvicus*

B Desarrolla en medios con acetato o sales de amonio

Oligella urethralis (ex *M. urethralis*) (ex M-4)	Acetato 60% FEA 100% NO_2 100%
M. osloensis	

Organismos cocoides

A NO_3 red. + → NO_2 red. + — usual

1	Colonias friables/no hemolíticas	*M. catarrhalis*
2	Colonias butirosas/hemólisis débil	*M. caviae*

B NO_3 red + → NO_2 red – — usual

Hemolítico (usual) — *M. ovis*

C NO_3 red – / NO_2 red + — *M. cuniculi*

No hemolítico

*FEA: fenilalanina desaminasa

la boca del ganado. Las hembras se alimentan de las secreciones faciales (lágrimas, mucus nasal y saliva), para obtener las proteínas para el desarrollo de sus huevos. También se nutren de otras fuentes, como sangre de heridas, o leche de la cara de los terneros. Dado que esas moscas poseen pequeñas espículas rugosas sobre su boca, aun un escaso número de insectos pueden causar gran irritación y daño mecánico sobre los tejidos del hospedador. La actividad alimentaria de las moscas estimula la transmisión de *Moraxella bovis*. Esas moscas además pueden actuar como vectores de larvas de nematodos, agravando el cuadro.

El control de estas moscas es muy difícil. Se han hecho grandes esfuerzos usando diferentes insecticidas y diversas técnicas de aplicación de los mismos. Se han involucrado también en la gravedad del daño otros factores ambientales, como la presencia en los campos de pastoreo de pastos altos espinosos que causan lesiones, las partículas de polvo, la exposición a las radiaciones ultravioletas del sol (fotofobia). Todos ellos actuarían como factores irritativos, exacerbando la acción del microorganismo. Debe recordarse que se trata de una bacteria de gran distribución mundial y que se encuentra no sólo en la conjuntiva de los bóvidos, sino también en sus vías respiratorias superiores, sitios a partir de los cuales es posible aislarla, aunque no exista sintomatología. Se cree que los conductos lagrimales y las secreciones nasales portan el mayor número de estos microorganismos. La transmisión se hace por contacto directo o a través de los vectores mencionados.

Patogénesis de la enfermedad del ojo rosado del ganado

Es el nombre vulgar con el cual se conoce la queratoconjuntivitis bovina, la cual fue por primera vez reconocida como enfermedad infecciosa en 1989. Si bien pueden producirse casos en todo el año, es fundamentalmente una patología con brotes máximos durante la temporada estival. Se caracteriza por el enrojecimiento de la conjuntiva, párpados y el globo ocular.

En la etiopatogenia se discuten factores concurrentes como hemolisinas, pili, leucotoxinas, lipopolisacáridos y diversas enzimas (hialuronidasa, colagenasas). Los exoproductos serían

Tabla 49-2. Características de *Moraxella* y microorganismos semejantes

Pruebas	*Moraxella*									*Neisseria*		
	lacunata	*nonliquefaciens*	*canis*	*catarrhalis*	*lincolnii*	*osloensis*	*atlantae*	*Psychrobacter phenylpyruvicus*	*Oligella urethralis*	*weaveri*	*elongata* subespecies *nitroreducens*	*Gilardi grupo 1*
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+
Desarrollo en Mac Conkey	–	–	+	–	–	V	+	+	+	V	V	+
Movilidad	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
OF glucosa	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Urea	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–
FEA	–	–	–	V	ND	V	–	+	+	+(D)	–	++
Hidrólisis de gelatina	+*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Reducción de NO_3	+	+	+	+	–	V	–	V	–	–	+	–
Reducción de NO_2	–	–	V	+	V	–	–	–	+	+	+	–
Hidrólisis de DNA	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–
Penicilina	S	S	S	R/S	S	S	S	V	S	S	S	S
Forma celular	cocobacilar		cocoide		cocobacilar					bacilar		

*Excepciones OF: Oxidación/fermentación FEA: Fenilalanina deaminasa DNA: ácido desoxirribonucleico

responsables de las alteraciones tisulares, una vez que la bacteria llevó a cabo el proceso de adhesión. La presencia de pili en *M. bovis* es el factor determinante para causar queratoconjuntivitis, dado que contribuyen a la adherencia, etapa previa en el desarrollo de los mecanismos infecciosos.

En 1972, Pedersen fue el primero en demostrar su importancia. Los animales inoculados en zona conjuntival con suspensiones de cepas piliadas, permitieron el aislamiento ocular de *M. bovis* en días subsiguientes y la mitad de esa población de animales desarrolló enfermedad clínica. En cambio, los animales inoculados con cepas no piliadas de *M. bovis*, nunca desarrollaron patología ni fue posible la recuperación del germen. Otros investigadores demostraron luego que los pili aislados y procesados podían ser utilizados con fines vacunales, ya que protegerían al ganado de la enfermedad, cuando se inocula con suspensión de cepas homólogas. Sin embargo, en la naturaleza las cepas de *M. bovis* poseen una amplia variedad de diferencias antigénicas en sus pili. Se han demostrado nuevos tipos antigénicos durante brotes de queratoconjuntivitis y las vacunas que emplean un tipo de pili, podrían no ser protectoras contra cepas heterólogas. Estudios posteriores mostraron que una cepa de *M. bovis* puede producir una subunidad "pilina" y pasar a generar otra subunidad de diferente tamaño de acuerdo al peso molecular.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

El diagnóstico de queratoconjuntivitis infecciosa debe asociar el aislamiento del microorganismo al cuadro clínico, dado que la etiopatogenia puede deberse a distintos agentes microbianos y es muy importante conocer si se está en presencia de un brote, por la prodigiosa capacidad de diseminación del microorganismo, a través de vectores animados e inanimados ya descritos.

La primera etapa consiste en la toma de la muestra con hisopo estéril, tratando de seleccionar material representativo (secreciones, lágrimas). Se aconseja efectuar la recolección en la fase inicial de la enfermedad, cuando hay predomino del agente causal, ya que posteriormente debido a las secreciones abundantes y la presencia de los insectos vectores, puede encontrarse muchos microorganismos de contaminación que enmascaren a *M. bovis*. La siembra debe hacerse en medios enriquecidos (agar sangre, agar chocolate), los cuales deben incubarse a 36-37 °C durante 24-48 horas.

El desarrollo es de colonias pequeñas, redondeadas, grisáceas. En agar sangre son hemolíticas, pero cuando se observan con lupa el halo de hemólisis suele ser muy reducido, de allí que no siempre se detecta la actividad hemolítica en forma macroscópica. Por microscopia se ven cocoides o bacilos cortos gramnegativos. En cultivos viejos muestra marcado pleomorfismo. Las pruebas de identificación incluyen la determinación de presencia de oxidasa positiva, hidrólisis de gelatina y licuación de medios con suero. La reducción de nitratos a nitritos es negativa y es inactivo frente a hidratos de carbono. Pueden completarse los estudios con inmunodiagnóstico diferencial.

TRATAMIENTO

Debe ser preferentemente profiláctico, mediante vacunas específicas y cuidado de las condiciones ambientales. *M. bovis* es muy sensible a la mayoría de los antibióticos, aun a la penicilina. La tetraciclina de acción retardada suele ser el agente de elección, tópica o sistémica. Puede ser necesario agregar tratamiento sintomático, para reducir la inflamación. Actualmente ningún ganadero debiera postergar la vacunación, dado que los costos que implica la diseminación de esta enfermedad infectocontagiosa, son enormemente superiores.

BIBLIOGRAFIA

Baptista PJ. Infectious bovine keratoconjunctivitis. A review. Br Vet J. 1979; 135: 245-242.

Bedford PG. Infectious bovine keratoconjunctivitis. Vet Rec. 1976; 98: 134-135.

Chandler RL. Exposure of bovine cornea to different strains of *Moraxella bovis* and to other bacterial species in Vitro. J Comp Pathol. 1985; 98: 134-135.

Chandler RL. Studies on the pathogenicity of *Moraxella bovis* in relation to infectious bovine keratoconjunctivitis. J Comp Pathol. 1979; 89: 441-448.

Chandler RL. Virulence of *Moraxella bovis* in gnotobiotic calves. Vet Rec. 1980; 106: 364-365.

Elleman TC. Characterization of the pilin gene of *Moraxella bovis* and expression of pili from *M. bovis* in *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun. 1990; 58: 1678-1684.

Enright MC. Phylogenetic relationships between some members of the genera *Neisseria, Acinetobacter, Moraxella*, and *Kingella* based on partial 16S ribosomal DNA sequence analysis. Int J Syst Bacteriol. 1994; 44: 387-91.

Euzeby JP. Nomenclature of the subgenera *Moraxella* and *Branhamella* and of the nine species included in these subgenera and proposal to modify rule 34a of the bacteriological code. Int J Syst Evol Microbiol. 2001; 51 (5): 1939.

Jannes G. Polyphasic Taxonomy Leading to the Proposal of *Moraxella canis* sp. nov. for *Moraxella catarrhalis*-Like Strains. *Int J Syst Bacteriol*. 1993; 43: 438-49.

Moore J, Rutter JM. Antigenic analysis of fimbrial proteins from *Moraxella bovis*. J Clin Microbiol. 1987; 25: 2063-2070.

Rossaur R. Taxonomy of Moraxellaceae fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella, Acinetobacter, Psychrobacter*, and related organisms. Int J Syst Bacteriol. 1991; 41: 310-319.

Capítulo 50

ACINETOBACTER

Nélida Amelia Leardini

INTRODUCCION

Fue propuesto originalmente como género hace más de 40 años. Las bacterias que lo integran son saprófitas, ampliamente distribuidas en la naturaleza. Pueden aislarse del agua, el suelo y los alimentos. Forman parte de los microorganismos normales de la piel y se han recuperado de varias zonas del organismo humano.

EPIDEMIOLOGIA

La mayoría de las especies son patógenos oportunistas, en especial *A. baumannii*, el cual es causa de graves infecciones intrahospitalarias, sobre todo en unidades de terapia intensiva. La incidencia de este microorganismo va en aumento debido a su resistencia a los antimicrobianos.

Las vías de transmisión son a través de respiradores y catéteres contaminados, y por el personal de enfermería colonizado en manos y piel. Las infecciones por *Acinetobacter* pueden ser endémicas o tomar proporciones epidémicas, con brotes importantes y difíciles de controlar. Se cree que el tracto digestivo de los pacientes de terapia intensiva es un importante reservorio epidemiológico para los brotes intrahospitalarios por *A. baumannii*. Se sugiere implementar programas de vigilancia de portación fecal, para lograr el rápido aislamiento de los pacientes cuando se producen esos brotes. Nunca debe olvidarse que este microorganismo posee una gran capacidad para adquirir multirresistencia a los antimicrobianos y para sobrevivir tanto en superficies húmedas como en secas.

Su importancia se infiere si se considera que *A. baumannii* constituye, después de *Pseudomonas aeruginosa*, el segundo en frecuencia de los aislamientos entre los bacilos gramnegativos no fermentadores. También se han descrito cuadros pronunciados de neumonía adquiridos en la comunidad en pacientes de riesgo.

Estudios multicéntricos internacionales de los aislamientos obtenidos de hemocultivos, demostraron que *Acinetobacter* está al tope de las 10 bacterias más comunes causantes de septicemia en 18 de los 44 grandes hospitales europeos investigados.

Es poco usual que bacterias gramnegativas sobrevivan en el ambiente después de ser expuestas a condiciones de desecación, pero sin embargo *Acinetobacter* spp sobreviven en el ambiente y causan graves infecciones. Los investigadores Allen y Green fueron los primeros en informar que la diseminación aérea puede ser la ruta de transmisión en brotes por *Acinetobacter*.

No hay conocimiento hasta el momento de informes sobre procesos infecciosos causados por *Acinetobacter* en veterinaria.

Tabla 50-1. Prevalencia de *Acinetobacter* spp

A. baumannii	67%
A. haemolyticus	7%
Genoespecie 3	7%
A. lwoffii	6%
A. junii	5%
*A. johnsonii**	4%

* No crece a 36 °C

Tabla 50-2. Equivalencia de las denominaciones

Biovariedades clásicas	**Nomenclatura moderna**
anitratus	*A. baumannii*
lwoffii	*A. lwoffii*
haemolyticus	*A. haemolyticus*

TAXONOMIA

Con anterioridad se mencionaron las variables posiciones taxonómicas y las relaciones filogenéticas de este género. Ningún grupo de bacterias ha sufrido tantos cambios, aun de nomenclatura, y el uso de sinónimos obsoletos contribuye a la confusión taxonómica. Primeramente se reconoció una sola especie, *A. calcoaceticus*, pero se admitió que ciertas cepas presentaban inexactitudes taxonómicas, por ello dentro de la especie única se discriminaron grupos fenotípicos, algunos glucidolíticos y otros inactivos frente a carbohidratos. En la última edición del Manual de Bergey (2001), este género forma parte de la familia Moraxellaceae junto con los géneros *Moraxella* y *Psychrobacter*

Para facilitar la práctica en los aislamientos clínicos, se diseñaron biovariedades, de acuerdo a la acción oxidativa sobre glucosa y la actividad hemolítica en medios con sangre, esta última asociada paralelamente con acción hidrolítica sobre gelatina.

En 1986, Bouvet y Grimont del Instituto Pasteur de París, propusieron un esquema nuevo de clasificación basado en homología de DNA. En aquel momento identificaron 12 grupos de

* La antigua biovariedad *A. anitratus* comprende a 3 genoespecies diferenciables en el laboratorio:
A. calcoaceticus (genoespecie 1) no desarrolla a 41 °C
A. baumannii (genoespecie 2) desarrolla a 44 °C
Genoespecie 3 (sin nombre) desarrolla a 41 °C pero no a 44 °C

* La mayoría de las cepas inactivas asignadas a la biovariedad *A. lwoffii*, pertenecen a las genoespecies 8 y 9.

* La mayoría de las cepas hemolíticas, ya sean glucidolíticas o inactivas, pertenecen a la genoespecie 4, conocida como *A. haemolyticus*. Una minoría de cepas hemolíticas está incluida en la genoespecie 6.

* Mayoría de cepas glucidolíticas, no hemolíticas
  Acinetobacter baumannii
* Pocas de ellas son
  Acinetobacter calcoaceticus
* Mayoría de no glucidolíticas, no hemolíticas
  Acinetobacter lwoffii
* Mayoría de hemolíticas
  Acinetobacter haemolyticus
* Las otras especies son infrecuentes.

hibridación, llamados genoespecies. Solamente a 6 se les asignó nombre, mientras que los restantes se designaron con números arábigos, hasta que por pruebas bioquímicas simples pudieran diferenciarse.

Por estudios de hibridación de DNA desde entonces se describieron más de 20 genoespecies del género *Acinetobacter*. De todas las genoespecies, sólo 6 se consideran responsables de la gran mayoría de las infecciones, siendo una de ellas la principal implicada.

A los efectos de facilitar el diagnóstico efectivo de las especies de importancia clínica, se emplea un esquema útil para el informe de los aislamientos más frecuentes.

Estudios posteriores llevados a cabo por Tjemberg y Ursing, demostraron que las genomoespecies 1, 2, 3 y 13, son muy difíciles de separar en el laboratorio clínico, por ello se designan como:

Complejo *A. calcoaceticus - A. baumannii*

Tabla 50-3. Perfil mínimo de diferenciación de *Acinetobacter* y *Moraxella*

	Acinetobacter	*Moraxella*
Oxidasa	–	+
Reducción de nitratos	–	+ (mayoría)
Penicilina (0,1 o 1 U/ml)	R	S (excepto cepas β-lactamasa +)

Tabla 50-4. Diferenciación de *Acinetobacter* y *Moraxella*

Características *Acinetobacter*	*Moraxella*		
Morfología	Cocobacilar	Cocoide*	Cocobacilar
Oxidasa	+	+	0
Catalasa	+	+	+
Acción sobre carbohidratos	0	0	0/+
Saprófito o parásito	Parásito	Parásito	Saprófito
DNAsa/Tributirina esterasa	0	+	0
Crecimiento en Mac Conkey	0 (+)	0	+

* Ex-*Branhamella*

Tabla 50-5. Perfil mínimo de *Acinetobacter baumannii*

Bacilo gramnegativo no fermentado (BNF)
Cocobacilar (cocoide)
Oxidasa negativa
Lactosa 10% reacción positiva fuerte (vía oxidativa)

Consiste en cuatro especies o grupos distintos genotípicamente, pero muy similares fenotípicamente. La ribotipificación sería un método correcto para diferenciarlas.

En 2001 se identificaron dos nuevas especies genómicas, las cuales por secuenciación de la fracción 16S del RNA ribosomal revelaron que son dos linajes distintos del género *Acinetobacter*. Las mismas se denominaron *Acinetobacter ursingii* sp. nov. y *Acinetobacter schindleri* sp. nov. Se demostró que desde el punto de vista clínico y epidemiológico, *A. ursingii* es causante de infecciones diseminadas en pacientes hospitalarios.

IDENTIFICACION

Es sencilla a nivel de género, debiendo diferenciarse de *Moraxella* estrechamente relacionado, así como otras de las llamadas bacterias gramnegativas misceláneas, capítulo en el cual es agrupado aún por ciertos autores.

Son bacilos cortos, cocoides, gramnegativos, pleomórficos y a veces presentan aspecto bacilar. Generalmente son esféricos en fase estacionaria y en cultivos en agar no selectivos, mientras que son cocobacilares en aislamientos jóvenes, sobre todo en etapas tempranas en medios líquidos y a partir de muestras clínicas. En placas de medios sólidos con antibióticos activos sobre la pared celular, se producen formas francamente bacilares. Los cultivos jóvenes también suelen resistir la decoloración, ofreciendo un color intermedio tendiendo a grampositivo. Son inmóviles por carecer de flagelos, son aerobios estrictos y desarrollan sin exigencias nutricionales en medios comunes. Todos crecen bien a 30 °C y la mayoría lo hace también a 35 °C. El perfil oxidasa negativa y catalasa positiva es útil, acorde con su morfología celular, para diferenciarlo de *Moraxella*.

Es nutricionalmente independiente, sin exigencias y la mayoría desarrolla bien en agar Mac Conkey, en el cual producen colonias incoloras (lactosa negativas), redondeadas, mucoides. La especie *A. baumannii* puede mostrar colonias con un centro ligeramente rosado, por oxidación de lactosa. En medios Kligler o TSI dan el perfil alcalino/neutro, típico de los bacilos no fermentadores. El género *Acinetobacter* se caracteriza por dar negativas la mayoría de las pruebas empleadas (oxidasa, reducción de nitratos, decarboxilasas [LDC-ODC-ADH], fenilalaninadeaminasa, producción de indol, β-D-galactosidasa [ONPG], DNAsa, producción de H_2S).

De los más de 20 grupos de homología de DNA encontrados, sólo algunos de ellos podrían ser diferenciados bioquímicamente y a su vez, de estos únicamente 7 poseen nomenclatura: *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. junii*, *A. johnsonii*, *A. lwoffii*, *A. radioresistens* (genoespecie 12). La identificación a nivel de especies es complicada, si se considera la cantidad de genoespecies descritas. Estas técnicas no están al alcance de un laboratorio común, ni aun con el empleo de sistemas de identificación comerciales. Pero debido a la importancia de *Acinetobacter*, es necesario realizar el mínimo de pruebas que conduzcan a una identificación presuntiva.

Teniendo en cuenta que *A. baumannii* es la especie prevalente, deben seleccionarse las reacciones que permitan identificarla

adicionadas a las correspondientes al género, ya mencionadas. El perfil mínimo que lo define:

Morfología celular de bacilo cocoide gramnegativo
Sin exigencias nutricionales
Movilidad negativa
Oxidasa negativa
Utilización de glucosa por vía oxidativa
Desarrollo positivo en caldo incubado a 44 °C (será prueba casi distintiva)
Patógeno oportunista

Para estudios epidemiológicos de brotes por *A. baumannii*, pueden diferenciarse por pruebas de asimilación alrededor de 20 biotipos y también cerca de 34 serovariedades.

SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

A. lwoffii es sensible a la mayoría de los antibióticos, mientras que *A. baumannii* constituye uno de los mayores problemas en infectología debido a su multirresistencia, sobre todo en infecciones intrahospitalarias, en especial en determinadas áreas del nosocomio como las de cuidados intensivos, donde se produce el mayor incremento de la resistencia. Ello impone efectuar cuidadosas pruebas de sensibilidad, frente a cada aislamiento clínico. Las cepas multirresistentes se producen principalmente entre los miembros del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* y algunas cepas de *Acinetobacter haemolyticus*.

BIBLIOGRAFIA

Baille WE. Aerobic bacterial flora of oral and nasal fluids of canines with reference to bacteria associated with bites. J Clin Microbiol. 1978; 7: 223-231.

Bernards AT, et al. Outbreak of septicaemia in neonates caused by *Acinetobacter junii* investigated by amplified ribosomal DNA restriction analysis in four typing methods. J Hosp Infect. 1997; 35:129-140.

Bouvet PJ, Grimont .A. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended description of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. Int J Syst Bacteriol. 1986; 36 :228-240.

Bouvet PJ, Jeanjeans S. Delineation of new proteolytic genomic species in the genus Acinetobacter. Res Microbiol. 1989; 140: 291-299

Gerner-Smidt P. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* Species. J Clin Microbiol. 1991; 29: 277-282.

Gerner-Smidt P. Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. J Clin Microbiol. 1992; 30:2680-2685.

Jellison TK, et al. Epidemiology, resistance and outcomes of *Acinetobacter baumannii* bacteremia treated with imipenem-cilastatin or ampicillin-sulbactam. Pharmacotherapy 2001; 21: 142-148.

Kappstein L. et al. Aerators as a reservoir of *Acinetobacter junii*. An outbreak of bacteriaemia in paediatric oncology patients. J Hosp Infect. 2000; 44:27-30.

Linde, Hans-Jorg, et al. Septicemia due to *Acinetobacter junii*. J Clin Microbiol. 2002; 40 (7): 2696-2697.

Lothorlary O, et al. Nosocomial acquisition of multiresistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors and prognosis. Clin Infect Dis. 1995; 20: 790-796.

Tjernberg L, Ursing J. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. APMIS 1989; 97:595-605.

Capítulo 51

BACTERIAS ANAEROBIAS

Graciela Carloni

Las bacterias anaerobias incluyen una variedad morfológica y fisiológica de bacilos y cocos grampositivos y gramnegativos.

Forman parte de los microorganismos residentes en determinados tractos o aparatos de los seres vivos y, en su mayoría, producen infecciones cuando aumenta su proliferación en dichos sitios o se diseminan y se reproducen en aquellos lugares que no constituyen su residencia habitual. Algunos géneros, como *Clostridium*, también se encuentran en el ambiente. Resultan oportunistas causando enfermedad al combinarse los factores que determinan el medio óptimo para su desarrollo. Algunas afecciones producidas por bacterias anaerobias son endógenas debido a su enorme capacidad para adaptarse a nuevos ambientes y multiplicarse en sinergia con otros microorganismos, sobre todo aerobios que facilitan el ambiente gaseoso para su posterior desarrollo.

Como bacterias anaerobias no pueden crecer en presencia de oxígeno. Carecen de algunos o de todos los sistemas citocromo, catalasa y superóxido dismutasa (SDM) presentes en los aerobios. La capacidad de los anaerobios para tolerar oxígeno o desarrollarse en su presencia varía entre los géneros y aun entre las diferentes especies de ellos. Esta variabilidad se debe probablemente a la presencia completa o rudimentaria de alguno de estos sistemas. La atmósfera anaerobia se obtiene en el laboratorio remplazando el oxígeno ambiental por mezclas de gases que contienen aproximadamente un 80% de nitrógeno o de hidrógeno y un 20% de anhídrido carbónico. Estos porcentajes pueden variar de acuerdo con el grado de anaerobiosis requerido.

La relación de estas bacterias con el oxígeno ambiental lleva a extremar las condiciones de remisión de las muestras al laboratorio y la rapidez de su procesamiento. Aun para algunas especies esporuladas como *Clostridium haemolyticum* y *Clostridium novyi* el contacto con este gas puede detener el proceso de esporulación y destruirlos en las muestras. Los medios de cultivo para bacterias anaerobias se deben preparar en el momento para evitar su oxigenación con el posterior almacenamiento.

Además de la provisión de una atmósfera anaerobia, suelen ser microorganismos exigentes que requieren el agregado de proteínas y vitaminas para su cultivo, lo cual se logra con el aporte de sangre, suero, hemina, vitamina K y extracto de levadura a los medios de cultivo artificiales. También existe una variabilidad de exigencia nutricional dependiendo del género e incluso de la especie microbiana de que se trate.

Todas las bacterias anaerobias elaboran una variedad de enzimas que resultan sus principales factores de virulencia, incluyendo colagenasas, hialuronidasa, fibrinolisina, gelatinasas y otras enzimas proteolíticas, lipasas, lecitinasa, hemolisinas, condroitín sulfatasa, desoxirribonucleasa, fosfatasas y neuraminidasas. Todas estas enzimas resultan de importancia para desencadenar el cuadro patológico que producen.

Si bien cada género presenta un patrón de sensibilidad a antimicrobianos definido, pueden desarrollar resistencia por mecanismos similares a los que presentan las bacterias aerobias. Esto se debe tener en cuenta para no instaurar tratamientos empíricos, sobre todo frente a los bacilos anaerobios no esporulados. Las pruebas de sensibilidad in vitro se deben realizar según metodologías recomendadas internacionalmente para microorganismos anaerobios y para especies de interés en veterinaria.

Los estudios moleculares han permitido detectar genes codificantes de estructuras anatómicas, de factores de agresión y de resistencia, y la posibilidad de su intercambio entre especies. También se ha detectado una complejidad molecular importante que ha permitido una actualización taxonómica con la inclusión de géneros y especies nuevas.

BACILOS ANAEROBIOS NO ESPORULADOS GRAMNEGATIVOS

Dentro de este grupo se incluyen bacilos con características morfológicas variables y con una taxonomía compleja, aún no acordada internacionalmente, por lo que algunos géneros y especies se conocen con diferente sinonimia.

Forman parte de la microbiota residente del hombre y los animales, encontrándose sobre todo en la cavidad oral, el tracto intestinal y algunas especies en el aparato genital.

Tabla 51-1. Géneros de bacterias anaerobias de interés veterinario

Bacilos gramnegativos	
Bacteroides	
Dichelobacter	
Fusobacterium	
Prevotella	
Porphyromonas	
Bacilos grampositivos	
Esporulados	*Clostridium*
No esporulados	*Eubacterium*
	Propionibacterium *
	Actinomyces *
Cocos gramnegativos	
Veillonella	
Cocos grampositivos	
Peptostreptococcus	
Peptococcus	
Peptoniphilus	
Ruminococcus	

* Según especie, no estrictos

Los bacilos anaerobios Gramnegativos presentan el LPS como constituyente de su pared celular, pero con una actividad endotóxica muy débil, en comparación con la que posee el LPS en los bacilos aerobios, debido a la escasa cantidad o ausencia total de la fracción del lípido A. Algunos géneros elaboran cápsula como mecanismo antifagocitario y otros presentan estructuras para adherirse a las células que parasitan como son las fimbrias de adhesión. Pero en todos los casos el poder patógeno principal está dado por la producción de una amplia gama de enzimas proteo y lipolíticas, responsables de la necrosis tisular y de la liberación de ácidos grasos como metabolitos, causantes del olor nauseabundo que caracteriza las lesiones producidas.

Para su cultivo requieren el agregado de hemina, vitamina K y sangre de equino, bovino u ovino a los medios de cultivo. La mayoría son anaerobios estrictos aunque en algunas especies se puede detectar la producción de catalasa. Desarrollan entre los 2 a 7 días según el género, con una temperatura óptima de 37 °C.

La identificación de los géneros se basa en las características morfológicas, el aspecto de las colonias, la detección de pigmentos, la producción de fluorescencia bajo la luz UV y su actividad metabólica sobre diversos sustratos. También se emplea la capacidad de desarrollar en presencia de concentraciones determinadas de antimicrobianos (discos con antibióticos de potencia especial: kanamicina 1000 µg, vancomicina 5 µg y colistina 10 µg).

Género *Bacteroides*

Está formado por bacilos pequeños o cocobacilos de tamaño variable, a veces pleomórficos, que suelen presentar vacuolas en su citoplasma, confundiendo la imagen con esporas. La mayoría de las especies son inmóviles, pero algunas pueden presentar flagelos perítricos y elaboran una cápsula polisacárida con fuerte actividad antifagocítica. Son gramnegativos.

Son residentes de la cavidad oral y del tracto intestinal del hombre y los animales, encontrándose en mayor proporción en intestino grueso.

Suelen elaborar una serie de enzimas que actúan como mecanismos de agresión como son neuraminidasa, hialuronidasa, fosfatasa, DNAsa y también heparinasa y una enterotoxina. El complejo de enzimas conjuntamente con la cápsula resulta responsable de la formación de abscesos y de depósitos de fibrina en las lesiones. Suelen elaborar naturalmente betalactamasas.

Fermentan varios hidratos de carbono con producción de ácido y de gas. También son proteolíticos y se caracterizan por la elaboración de ácidos grasos de cadena corta como metabolitos.

En la actualidad dentro de este género se considera una especie de *B. fragilis* y un grupo complejo que se denomina *B. no fragilis*.

Las especies se diferencian por la actividad sobre hidratos de carbono, la producción de pigmentos, el desarrollo en medios con 20% de bilis, la producción de indol y el ataque a esculina y almidón. La mayoría de las especies no produce catalasa y no son hemolíticas.

B. fragilis constituye el 50% de la masa microbiana presente en la materia fecal del hombre y de los animales, encontrándose en mayor proporción en el íleon y el ciego de los monogástricos. Cumplen un papel importante en la desconjugación de los ácidos biliares y también intervienen en la síntesis de vitamina K en el intestino.

Esta especie está formada por bacilos cortos o cocobacilos de 0,6 x 2 µm, con extremos redondeados y gran cantidad de vacuolas citoplasmáticas. Suele presentar cápsula polisacárida y elaborar enzimas proteolíticas. En agar sangre en 24 horas a 37 °C forma colonias de 2 a 3 mm de diámetro, convexas, grises o blancas. Desarrolla en presencia de kanamicina, vancomicina y colistina, y en medio con 20% de bilis y esculina forma colonias con pigmentación negra a su alrededor, por hidrólisis de esta última. Fermenta hidratos de carbono y reduce nitratos a nitritos. No produce indol.

Se lo cita como agente de infecciones endógenas y de bacteriemias en individuos inmunocomprometidos, tanto en el hombre como en los animales, pero se han aislado cepas productoras de enterotoxinas a partir de animales jóvenes.

Presenta resistencia inherente a los aminoglucósidos y a la penicilina. Se ha descrito la presencia de plásmidos de resistencia a otros antimicrobianos.

El grupo *B. no fragilis* se caracteriza por no desarrollar en presencia de 20% de bilis, de kanamicina y de colistina, y sí ante la presencia de vancomicina. No reducen nitratos. Algunas especies pueden ser móviles y producir catalasa.

Dichelobacter nodosus

Denominado anteriormente *Ristella nodosa* o *Bacteroides nodosus* (del griego *dichelos*: pie hendido).

Es un bacilo ligeramente incurvado de 1 µm de ancho por 3 a 6 µm de largo. Es gramnegativo y presenta granulaciones citoplasmáticas evidenciables con azul de metileno.

Es anaerobio estricto, no produce catalasa oxidasa y nitrato reductasa. No fermenta hidratos de carbono, no produce indol, ureasa, lecitinasa, lipasa, coagulasa, desoxirribonucleasa, ni hialuronidasa. Produce H_2S, hidroliza albúmina, caseína, elastina y gelatina.

El cultivo es dificultoso ya que requiere medios con un elevado aporte proteico y con alta concentración de agar para lograr su aislamiento. Antiguamente se agregaba a los medios de cultivo como enriquecimiento polvo de la capa córnea de las pezuñas animales. En la actualidad se emplean medios con queratina tripsinada, caseína, extracto de levadura, sangre equina y cisteína, incubando en anaerobiosis estricta (90% de H_2 y 10% de CO_2) a 37°C durante 3 a 5 días. El crecimiento se estimula también con el aporte de Tween 80 o de suero equino.

Las colonias pueden tener aspecto perlado, y si la cepa es fimbriada y virulenta se denominan colonias B; aspecto mucoide, llamadas colonias M, si no lo son o, pertenecer a la variante C, de colonias circulares, producidas por las cepas no patógenas. No son hemolíticas ni producen pigmentos.

D. nodosus es un parásito del espacio interdigital de los rumiantes, que produce una afección podal denominada pietín, pernera o enfermedad del espacio interdigital. En el suelo puede permanecer viable durante 2 semanas, en un ambiente húmedo y con temperatura ambiente superior a 10 °C.

Los animales infectados constituyen el reservorio de los microorganismos, pudiendo infectar a individuos de otra especie animal que residan en ese lugar.

Las lesiones podales producidas por factores ambientales (traumatismos o humedad excesiva) y por infecciones concomitantes con otros agentes bacterianos o virales, como también la presencia de cepas virulentas de *D. nodosus*, son los factores desencadenantes del cuadro patológico. Se suele asociar a lesiones producidas por el virus de la fiebre aftosa y por *Fusobacterium necrophorum*. La enfermedad puede cursar en forma benigna con inflamación podal y cura espontánea, o diseminarse en forma ascendente por los miembros con riesgo grave para el individuo afectado.

Dentro de los factores de patogenicidad se describen fimbrias de adhesión, de ubicación polar que contribuyen a una unión estrecha con las células epiteliales permitiendo el progreso de las bacterias dentro del tejido. Están presentes en todas las cepas patógenas y se

encuentran codificadas en el genoma bacteriano principalmente por el gen *fim A* y por otros genes suplementarios, denominados *fim B, fim C*, y *fim Z*. Su composición antigénica es diferente y de acuerdo a ella las cepas se pueden clasificar en 9 serogrupos denominados con letras desde la A hasta la I, según el tipo antigénico de fimbria presente. Estas fimbrias constituyen también un factor importante en el desarrollo de la inmunidad en los animales afectados.

Produce una cápsula delgada pero se discute la importancia que ésta tiene como factor de virulencia.

D. nodosus elabora un conjunto de enzimas proteolíticas implicadas en el desarrollo de las lesiones con actividad sobre caseína, colágeno, elastina, fibrinógeno, gelatina y queratina.

Para determinar la patogenicidad de una cepa se evidencia la producción de estos factores.

El aislamiento resulta dificultoso por las exigencias nutritivas y atmosféricas. La identificación se basa en las características morfológicas, el aspecto de las colonias, la ausencia de actividad sobre hidratos de carbono y la intensa actividad proteolítica. Se puede emplear la técnica de inmunofluorescencia con anticuerpos marcados y también pruebas de amplificación genómica como PCR para el rRNA 16S, sobre todo para estudios epidemiológicos sobre rodeos infectados.

Este microorganismo es sensible a diferentes antimicrobianos como penicilina, tetraciclinas, estreptomicina, macrólidos, cloranfenicol, nitroimidazoles y derivados sulfamídicos. El tratamiento se debe realizar por vía general y también local dada la escasa vascularización de los tejidos queratinizados. La aplicación local de soluciones desinfectantes en base a sulfato de cinc o sulfato de cobre en forma de pediluvios resulta más eficaz que la terapia antibiótica por vía general.

La suma de factores ambientales y microbianos que desencadena la infección indica que la profilaxis debe incluir un conjunto de medidas de manejo de pasturas, movimiento de animales a campos no inundables y prevención de la infección con otros agentes ambientales o biológicos que predispongan el terreno. La infección natural genera una respuesta inmunitaria que evita infecciones posteriores.

Se pueden emplear vacunas elaboradas a partir de microorganismos virulentos, inactivados y con el agregado de adyuvantes. Debido a la diversidad antigénica presente en este género, se aconsejan las vacunas elaboradas con cepas autóctonas o residentes en la región.

Género *Fusobacterium*

Está formado por bacilos inmóviles, con morfología variable, desde cocobacilos a formas filamentosas, con los extremos afinados o "en huso". Presentan una tinción irregular y son gramnegativos.

Suelen encontrarse en la cavidad oral y los tractos gastrointestinal y genitourinario del hombre y de los animales. En la boca se asocian a procesos gingivales o con enfermedad periodontal. Se han aislado de abscesos hepáticos, o perianales, infecciones respiratorias, uterinas y entéricas posteriores a cirugías, traumatismos o enfermedades inmunodependientes, pero siempre relacionados con necrosis tisular. Pueden actuar en conjunto con *D. nodosus* en el pietín de los rumiantes

Se cultivan en medios con el agregado de hemina, vitamina K y sangre equina, en estricta anaerobiosis. El desarrollo puede demorar hasta 5 días, según la especie. Desarrollan en presencia de vancomicina, pero no frente a kanamicina y colistina.

No producen catalasa ni elaboran pigmentos. Poseen poca actividad sobre hidratos de carbono, pero sí sobre proteínas a partir de las cuales producen ácidos grasos como butírico, acético y propiónico. La identificación de especies se basa en la producción de estos y en la detección de indol, lecitinasa, hemolisina, DNAsa, crecimiento con 20% de bilis, hidrólisis de esculina y producción de fluorescencia bajo la luz ultravioleta.

Su patogenicidad se debe a la producción de las enzimas proteolíticas descritas y de exotoxinas con actividad de hemolisinas y de leucocidinas.

Este género comprende unas 15 especies dentro de las cuales *F. necrophorum*, *F. nucleatum* y *F. equinum* son las de mayor interés en veterinaria.

Presentan sensibilidad a la penicilina, el cloranfenicol y la clindamicina. Son resistentes a la eritromicina y a la mayoría de los macrólidos.

Género *Porphyromonas*

Agrupa bacilos cortos o cocobacilos, de 0,3 a 0,6 µm por 0,8 a 1 µm, aislados, inmóviles, gramnegativos (incluidos anteriormente dentro del género *Bacteroides* como especies pigmentadas asacarolíticas).

Son anaerobios estrictos y muy exigentes en cuanto a nutrientes. El cultivo puede demorar hasta 10 días a 37 °C, desarrollando sobre agar sangre colonias pequeñas, de 1 a 2 mm de diámetro, lisas, brillantes y convexas. Las colonias pueden presentar una pigmentación progresiva desde la periferia al centro, generalmente negra, pero también naranja o marrón. El tiempo en que aparece la pigmentación depende del tipo de sangre empleada. Algunas especies producen fluorescencia rosada, naranja o roja bajo la luz ultravioleta.

Desarrollan en presencia de kanamicina y de colistina, pero no frente a vancomicina. No fermentan hidratos de carbono (a excepción de algunas especies), no reducen nitratos, ni desarrollan con 20% de bilis. Algunas especies pueden producir catalasa e indol. Elaboran una variedad de enzimas que degradan compuestos proteicos y que se consideran sus mecanismos de patogenicidad

Se describen como residentes de la cavidad oral de diversas especies animales. Suelen aislarse de encías y placas dentarias en relación con enfermedad periodontal en humanos, caninos y felinos.

Las especies de importancia son *P. asaccharolytica*, *P. levii*, *P. cangingivalis* y *P. canoris*. La identificación de las especies resulta bastante compleja y se basa en la actividad bioquímica y enzimática. Por el momento la identificación genotípica se encuentra en estudio.

Género *Prevotella*

Son bacilos pleomórficos, inmóviles, gramnegativos, anaerobios estrictos y exigentes en nutrientes (incluidos anteriormente en el género *Bacteroides* como especies sacarolíticas con capacidad de elaborar pigmentos).

En agar con el agregado de sangre equina hemolizada, incubando hasta 7 días a 37 °C, pueden desarrollar colonias pigmentadas de marrón o negro y producir fluorescencia bajo la luz ultravioleta.

Desarrollan en presencia de kanamicina y de vancomicina y es variable el crecimiento ante la colistina. No desarrollan en presencia de bilis al 20%. La reducción de nitratos, y producción de indol, catalasa y lipasa es variable según la especie. Fermentan una variedad de hidratos de carbono, dato que también se emplea en la identificación de especie.

Son residentes de la cavidad oral e intestino en el hombre, caninos y felinos. En el hombre se cita *P. brevis* y *P. intermedia*.

P. ruminicola es residente del rumen y del intestino grueso de diversas especies animales, sobre todo herbívoros, donde interviene en procesos de degradación de celulosa.

P. melanogenica se asocia a cuadros de pietín y de lesiones de la cavidad bucal, como gingivitis profundas, en caninos y felinos.

COCOS ANAEROBIOS

Este grupo incluye microorganismos poco descritos como patógenos primarios en medicina veterinaria. Su taxonomía se encuentra en constante revisión por lo que algunos géneros están definidos, pero otros se han separado y se incluyen como nuevos géneros y/o especies.

COCOS GRAMNEGATIVOS

El género *Veillonella* comprende cocos de tamaño pequeño y que no presentan agrupación característica, gramnegativos. Son anaerobios estrictos y exigentes en cuanto a nutrientes.

Desarrollan en presencia de vancomicina y no frente a kanamicina y colistina. No desarrollan en presencia de bilis al 20%. Sobre agar con el agregado de sangre forman colonias pequeñas, transparentes, raramente con producción de pigmento rojizo. Como característica metabólica reducen nitratos, no fermentan glucosa y algunas especies pueden producir catalasa.

Se encuentran como residentes en la boca, tracto respiratorio superior, tracto digestivo y vagina. No poseen mayor significancia clínica que como patógenos oportunistas.

COCOS GRAMPOSITIVOS

Dentro de los cocos grampositivos se incluían clásicamente los géneros *Peptococcus* y *Peptostreptococcus*. Su diversidad ha llevado a la división en otros géneros, según las características morfológicas, fisiológicas y genotípicas.

Las especies microaerófilas y anaerobias facultativas del género *Streptococcus* no se incluyen aquí.

Género *Peptostreptococcus*

Son cocos alargados, que se presentan en pares o cadenas, grampositivos, anaerobios estrictos. En agar sangre forman colonias más grandes que otros cocos anaerobios, de hasta 2 mm de diámetro, blancas grisáceas y opacas. Se describe un olor dulce a partir de los cultivos, asociado a la producción de ácido isocaproico, característica de este género.

Desarrollan en presencia de colistina, la mayoría de las cepas frente a kanamicina y son inhibidos por vancomicina y polianetol sulfonato (SPS). No producen indol ni catalasa. No reducen nitratos. La fermentación de hidratos de carbono es variable.

Actualmente este género comprende una sola especie, *P. anaerobius*.

Género *Ruminococcus*

Dentro de este género se han agrupado todas las especies de cocos grampositivos anaerobios con actividad fermentativa sobre hidratos de carbono y que no producen ácidos grasos volátiles. No suelen tener implicancia como patógenos primarios.

Género *Peptococcus*

Peptococcus niger es la única especie que se ubica actualmente dentro de este género y su característica principal es la producción de ácido butírico y caproico. Se aísla raramente de muestras clínicas.

Género *Peptoniphilus*

Comprende cocos, agrupados en pares, tetradas o cadenas cortas, grampositivos pero que se decoloran rápidamente, anaerobios estrictos y que no poseen actividad sobre los hidratos de carbono. Presentan una concentración de G+C entre 30 y 34.

Desarrollan en 48 horas en agar con el agregado de sangre donde producen colonias diminutas, granulosas, difíciles de suspender en medios líquidos. Son extremadamente sensibles a la acción del oxígeno ya que no resultan viables luego de 4 a 5 horas fuera de la atmósfera anaerobia.

Suelen producir coagulasa, indol y hemolisinas. Reducen nitratos en forma lenta. No producen catalasa. Poseen una importante actividad proteolítica.

Dentro de las especies se mencionan *P. asaccharolyticus* y *P. indolicus*. Este último se encuentra como residente en las mucosas de diversas especies animales, sobre todo en bovinos y cerdos. Puede producir lesiones en conjunto con otros agentes, incluidos estreptococos anaerobios facultativos.

BIBLIOGRAFIA

Euzéby JP. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature. http//:www.bacterio.cict.fr visitado: 2004.

Jousimies-Somer H, Summanem P, Citron D, Wexler H, Finegolg S. Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual, 5°ed, Star Publishing Company, USA. 2002.

Levett PN. Anaerobic Microbiology. A practical approach. The Practical Approach Series. Oxford University Press. 1997.

National Committee for Clinical Laboratory Standards Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. 2002; M11-A5, vol 21, N° 21.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved Standard. 1999; M 31 A, vol 19 N° 11.

Quinn P, Carter M, Markey B, Carter G. Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe Publishing, London, England. 1994.

Rasmussen B, Bush K, Tally F. Antimicrobial resistance in anaerobes. Clin Inf Diseases, 1997; 24 (supl 1): S 10-20.

Schroeder C, Parlor K, Marsh T, Ames N, Goeman A, Walker R. Characterization of the predominant anaerobic bacterium recovered from digital dermatitis lesions in three Michigan dairy cows. Anaerobe. 2003; 9 (3): 151-155.

Capítulo 52

CLOSTRIDIUM

Graciela Carloni

GENERALIDADES

El género *Clostridium* comprende un conjunto de microorganismos muy difundidos en la naturaleza, cuyo hábitat puede ser el suelo, los sedimentos marinos y lacustres, las pasturas, los vegetales en descomposición y el tracto digestivo de diversas especies animales.

Se ubica taxonómicamente dentro de la familia Clostridiaceae. En el Manual de Taxonomía Microbiana de Bergey se describen aproximadamente unas 80 especies de las cuales un gran número no son patógenas. Algunas tienen importancia en tecnología de alimentos y en salud pública. Otras son agentes etiológicos de determinadas enfermedades de los animales, importantes por su repercusión económica en las explotaciones agropecuarias, y otras responsables de severas patologías en humanos. Aproximadamente unas 20 especies se consideran patógenas o han sido aisladas a partir de casos clínicos en humanos o en animales.

Debido a su ubicuidad ecológica y al hecho de que algunas especies del género integran la microbiota residente de especies animales, se los reconoce en muchos casos como causantes de afecciones endógenas y como contaminantes ocasionales en algunos materiales clínicos.

En los animales domésticos los clostridios se comportan, en la mayoría de los casos, como causantes primarios de enfermedad ya que rara vez actúan como invasores secundarios.

Este género comprende un número importante y heterogéneo de especies de bacilos grampositivos, con capacidad de esporulación, anaerobios, con actividad fermentativa sobre carbohidratos y no productores de catalasa. La mayoría son móviles por la presencia de flagelos perítricos y algunas especies poseen la propiedad de elaborar cápsula. Esta es una definición práctica, usada y aceptada generalmente por la mayoría de los bacteriólogos.

Carecen de las enzimas catalasa y peroxidasa que en otros sistemas biológicos protegen de los efectos del deterioro inducido por el oxígeno. También carecen de citocromo oxidasa, enzima involucrada en el metabolismo aerobio, aunque algunas especies poseen superóxido dismutasa. En la práctica el género *Clostridium* se diferencia de otros géneros esporulados aerobios por no producir la enzima catalasa, presente en el género *Bacillus*.

El término anaerobio agrupa microorganismos que generan su energía y sintetizan sus compuestos sin utilizar oxígeno molecular como receptor final de electrones. Los clostridios, a su vez, demuestran una singular graduación en la sensibilidad a este gas, pudiéndose encontrar entre ellos desde especies aerotolerantes hasta anaerobias estrictas.

Si bien el contacto con el oxígeno resulta letal para los microorganismos anaerobios, en el caso de los clostridios la capacidad de formar esporas asegura su sobrevivencia y diseminación en el medio. Las esporas presentan una elevada resistencia a los agentes ambientales y la esporulación se produce con facilidad fuera del hospedador, ya que estas bacterias son altamente sensibles al oxígeno. La cantidad de esporas y la velocidad con que éstas se producen difiere según la especie. Aun en los cultivos jóvenes, ya sea in vitro en fase exponencial de crecimiento como también en el individuo infectado, se pueden detectar formas esporuladas.

TOXINAS

Los clostridios elaboran proteínas con actividad biológica que son las responsables de su patogenicidad, denominadas genéricamente toxinas. En la mayoría de los casos se trata de complejos moleculares con un peso molecular variable entre 22 y 600 k, con actividad enzimática y fácilmente exportables al medio.

La calidad y la cinética de su producción difieren según la toxina y la especie microbiana. Suelen denominarse toxinas mayores o menores de acuerdo a la importancia que poseen en cada patología.

Algunas toxinas se encuentran ligadas a estructuras de la pared celular, en el interior de la bacteria y se evidencian en la fase final de la esporulación, como es el caso de la enterotoxina elaborada por algunos serotipos de *C. perfringens*.

Las toxinas extracelulares, que constituyen la mayoría de las producidas por este género, atraviesan la pared celular y se vuelcan al medio detectándose en su máxima concentración durante la fase logarítmica de crecimiento.

Finalmente, un tercer tipo lo constituyen las toxinas de localización protoplasmática. Estas se acumulan en el citoplasma y se liberan al medio solamente cuando ocurre lisis celular. La temperatura óptima del cultivo para la producción de estas toxinas protoplasmáticas debe ser menor, entre 30 y 35 °C. Son ejemplos de ellas la neurotoxina de *C. botulinum*, la toxina alfa de *C. novyi* y la toxina tetánica.

La actividad biológica de las toxinas permite su identificación y caracterización y se puede evidenciar por los efectos producidos en animales de laboratorio o sobre cultivos de tejidos o, in vitro, detectando la degradación de diferentes sustratos sobre los que actúan como enzimas. Poseen actividades enzimáticas capaces de hidrolizar gradualmente varias estructuras celulares eucariotas, desde la membrana citoplasmática hasta la cromatina nuclear. Pueden tener actividad de neuraminidasa, contribuyendo a la unión con las células del hospedador, de lipasa o fosfolipasa, lisando eritrocitos, de hialuronidasa, contribuyendo a la invasión tisular y de desoxirribonucleasa (DNAsa), destruyendo la estructura genómica de las células musculares que invade. Otras, denominadas neurotoxinas, se unen a receptores del sistema nervioso a nivel de sinapsis neuromuscular, alterando la fisiología de los músculos estriados.

También varían la forma de ingresar y difundirse por el organismo. Algunas toxinas pueden ingerirse preformadas en un alimento, como ocurre con la toxina botulínica. Otras pueden ser absorbidas desde el intestino después de la proliferación anormal del microorganismo causal en las vías digestivas, hecho que ocurre en la mayoría de los cuadros de enterotoxemias.

En otros casos, como sucede en el carbunclo sintomático o en las gangrenas gaseosas, las formas vegetativas del microorganismo elaboran las toxinas cuando las esporas germinan en los tejidos. Estas toxinas ejercen su acción en forma local sobre los tejidos lesionados, se absorben y se difunden produciendo una toxemia generalizada que induce la muerte del individuo afectado.

Por último, otras infecciones se desarrollan con carácter local produciendo lesiones tisulares de menor importancia, pero con la elaboración de potentes toxinas que actúan a distancia como en el tétanos, la hemoglobinuria bacilar y también algunos tipos de enterotoxemias.

El desarrollo de las infecciones clostridiales es el resultado del efecto combinado de la acción local del microorganismo y de la actividad de las toxinas que elabora.

En la tabla 52-1 se mencionan las principales especies patógenas de clostridios, la acción de sus toxinas y la vía por la cual ingresan al organismo hospedador.

GENETICA

En el género *Clostridium* se describe una concentración de G+C con un rango entre 22 y 55 mol %, lo que indica una variedad genómica significativa coincidente con la biodiversidad ya mencionada.

La síntesis de las toxinas descritas se encuentra codificada por genes de virulencia que pueden estar ubicados en el DNA "cromosómico" y/o "extracromosómico", en plásmidos o fagos lisogénicos.

Un ejemplo típico de localización "cromosómica" es *C. difficile*. Los genes que codifican para las toxinas A y B de este microorganismo se encuentran contiguos, dentro de una misma región de su cromosoma. En otras especies se han descrito plásmidos relacionados con esta función, como es el caso de la enterotoxina de *C. perfringens*, o en algunas cepas patógenas de *C. sordelli* y de *C. butyricum*. Estos genes también pueden estar ubicados en fagos en estado lisogénico como ocurre en *C. botulinum* tipo C o en *C. tetani*.

En la mayoría de los casos estos genes comprenden secuencias ubicadas en regiones correspondientes con islas de patogenicidad, flanqueadas por transposones u otros elementos de inserción. Esto, sumado a la codificación en plásmidos o fagos explicaría los cambios en la capacidad de producir toxinas, detectados con frecuencia en las cepas de laboratorio.

Las secuencias codificantes de algunas toxinas se han identificado y clonado en especies de clostridios no portadoras de ellas y en otros microorganismos como *E. coli*, logrando en ambos casos la producción de las mismas.

RESISTENCIA

Las formas vegetativas de los clostridios son sensibles a la mayoría de los agentes físicos y químicos pero como ya se mencionó la facilidad de esporular, los parámetros de aplicación de estos agentes se deben dirigir a las formas esporuladas.

Como género suelen presentar resistencia a sulfamidas, quinolonas, aztreonam y aminoglucósidos pero resultan sensibles a la mayoría de los antimicrobianos de uso en clínica para bacterias anaerobias grampositivas, como penicilina y derivados, tetraciclina, vancomicina, clindamicina y metronidazol. En veterinaria se emplea penicilina G siendo la droga de elección por su eficacia, facilidad de manejo y costo. La información sobre la resistencia a antimicrobianos de las cepas de clostridios aisladas a partir de animales en Argentina es escasa y no se cita resistencia a penicilina en ellas.

La literatura internacional describe genes de resistencia a tetraciclina (*tet*), a eritromicina (*erm*) y a cloranfenicol (*cat*) en *C. perfringens* y en *C. difficile* y la posibilidad de su transmisión a otras especies.

PREVENCION

La ubicuidad de estos microorganismos y la residencia en determinados tractos o aparatos en muchas especies animales, implican que su erradicación sea prácticamente imposible. Se deben adoptar medidas de manejo y programas de inmunización activa para prevenir las diversas enfermedades que producen, tanto en los animales como en el hombre.

Por el sistema y las condiciones de la cría del ganado en Argentina las especies microbianas que presentan mayor importancia son *C. chauvoei, C. septicum, C. haemolyticum, C. novyi, C. perfringens, C. tetani* y *C. botulinum*.

Este perfil endémico se repite en el resto de los países de América y en Sudáfrica, Australia, Nueva Zelanda, regiones con condiciones de explotación ganadera similares a la República Argentina y en menor escala, por razones de dimensión territorial, en Japón. El denominador común de estos países es un predominio de la cría extensiva de ganado.

En Europa, por el contrario, y en otras zonas donde se desarrollan sistemas de cría intensivos, las mayores incidencias se encuentran en las enterotoxemias por *C. perfringens* y *C. sordelli*.

El empleo de vacunas múltiples a partir de cultivos de diferentes especies de clostridios se ha convertido en una práctica habitual en producción animal. Estas vacunas, debidamente elaboradas resultan sumamente eficaces y son recomendables justificando la inversión que su empleo representa.

Tabla 52-1. Clostridios patógenos de animales y su acción

Microorganismo	Vía de entrada	Toxina	
		Sitio de producción	Sitio de acción
C. botulinum	*Oral*	*Fuera del hospedador*	*Sistema nervioso*
C. tetani	*Heridas*	*Heridas*	*Sistema nervioso*
C. chauvoei	*Oral/heridas*	*Masas musculares profundas*	*Músculo*
C. perfringens	*Oral/heridas*	*Intestino/músculos*	*Epitelio intestinal/músculo*
C. septicum	*Heridas*	*Heridas*	*Músculo*
C. haemolyticum	*Oral*	*Riñón*	*Riñón/Sistema nervioso*
C. novyi	*Heridas*	*Subcutáneo y músculo*	*Subcutáneo y músculo*
C. sordelli	*Oral/heridas*	*Intestino/tejidos*	*Intestino/tejidos*

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Debido a la ubicuidad ambiental de estos microorganismos y a sus exigencias de cultivo, se deben seguir determinadas pautas de diagnóstico para no identificar especies invasoras como agentes etiológicos primarios y, por el contrario, para no perder aquellas de cultivo dificultoso o extremadamente lábiles por la acción del oxígeno ambiental.

Las muestras para aislamiento y para detección de toxinas se deben tomar a partir de tejidos frescos evitando la diseminación de especies residentes a tejidos vecinos y la degradación de las toxinas.

El medio de cultivo de elección para el aislamiento es el agar cerebro-corazón o el agar Columbia con el agregado de un 5% de sangre desfibrinada de ovino, equino o bovino. También se pueden emplear medios selectivos con antibióticos para inhibir microorganismos anaerobios facultativos contaminantes de las muestras. Como medios líquidos se pueden emplear el caldo tioglicolato o el caldo TGY (triptona-extracto de levadura-glucosa-cisteína). Es requisito fundamental mantener el pH neutro de los medios durante el cultivo.

El desarrollo se puede detectar entre las 24 y las 72 horas de cultivo a 37 °C en atmósfera anaerobia. Las colonias varían según la especie, pero en general son pequeñas y transparentes o ligeramente grisáceas. Al tomar contacto con el oxígeno se tornan opacas. Algunas especies pueden formar colonias redondas y cremosas, mucoides.

Para diferenciar las especies se consideran las características morfológicas como tamaño, agrupación, ubicación de la espora, movilidad, presencia de cápsula y la actividad metabólica sobre determinados sustratos. Se emplean las reacciones de fermentación de hidratos de carbono, reducción de nitratos, producción de indol y de ácido sulfhídrico y detección de enzimas como ureasa, lipasa, lecitinasa y hemolisinas (véase tabla 52-7).

Algunas especies y/o cepas pueden generar confusión por su dificultad en expresar la presencia de esporas o por producir catalasa en pequeñas cantidades. Si bien el género se define como anaerobio, algunas especies pueden resultar aerotolerantes. La presencia de bacilos grampositivos con esporas, de diferente ubicación según la especie, y la ausencia de desarrollo en aerobiosis nos ubica inmediatamente dentro del género.

La cromatografía en fase gaseosa para detectar la producción de ácidos grasos volátiles se emplea con frecuencia en laboratorios de investigación para confirmar las especies aisladas.

Se puede realizar un diagnóstico presuntivo mediante inmunofluorescencia a partir de improntas de tejidos, pero recordando que su sola presencia no indica que sea el agente etiológico de la afección producida.

Para la determinación de serotipos (toxinotipos) o para la detección de las toxinas se emplean técnicas de seroneutralización en animales de laboratorio, o técnicas de detección in vitro como la prueba de ELISA. Algunas toxinas clostridiales producen efectos definidos sobre cultivos de líneas celulares, pero estas metodologías no se encuentran aún normatizadas o validadas internacionalmente.

La investigación de toxinas en animales de laboratorio se realiza en ratones blancos, de 20 a 25 g, por vía intraperitoneal o endovenosa. El cultivo a tipificar se centrifuga o se filtra para separar la masa bacteriana y se inocula con o sin aplicación previa de tripsina, según la toxina a detectar.

La detección de los genes codificantes para algunas de las toxinas mediante técnicas de PCR resulta una metodología de utilidad aplicable en estudios epidemiológicos o de caracterización de las cepas aisladas.

Otro método efectivo para su aislamiento, actualmente poco empleado, es la inoculación al cobayo. Se suspende la muestra en solución fisiológica y se inocula entre 0,5 a 1 ml, por vía intramuscular en un miembro posterior a dos cobayos jóvenes. Los animales pueden morir o se sacrifican en 48 horas y del músculo afectado se realizan improntas y la siembra en medios de cultivo y atmósfera adecuados. Esta metodología, ya en desuso, permitía la recuperación prácticamente en pureza de muchas especies exigentes en cuanto a nutrientes y atmósfera anaerobia, cuando no se contaba con el equipamiento de laboratorio adecuado.

ESPECIES PATOGENAS DE IMPORTANCIA EN VETERINARIA

C. chauvoei

Es un bacilo pleomórfico, móvil, con espora deformante de ubicación subterminal. Esporula con facilidad dado que es altamente sensible al oxígeno. La espora presenta una elevada resistencia a los agentes ambientales.

Se define como grampositivo en cultivos jóvenes pero pierde la afinidad por los colorantes de anilina cuando ha superado la fase exponencial de crecimiento.

Para su cultivo requiere proteínas y una atmósfera con estricta anaerobiosis. Posee una alta demanda de cisteína que resulta un factor limitante para su desarrollo. También requiere biotina, piridoxina y ácidos pantoténico y nicotínico.

En medios de cultivo sólidos con el agregado de sangre, durante 48 horas a 37 °C en atmósfera anaerobia forma colonias pequeñas, de 2 a 4 mm de diámetro, con una depresión central, rodeadas de una estrecha zona de hemólisis completa, de 1 a 2 mm, que se intensifica si se expone el cultivo al frío (4 °C).

En los cultivos no se detecta la producción de las enzimas catalasa, ureasa, lecitinasa y lipasa. No produce indol volátil y la producción de ácido sulfhídrico es escasa o nula. Fermenta glucosa, lactosa, sacarosa y maltosa con producción de ácido y gas. No fermenta manitol, glicerol e inulina. La fermentación de salicina es variable, según la cepa.

Suele encontrarse como residente en el intestino, hígado, músculo y materia fecal de los herbívoros, especialmente rumiantes.

Es patógeno exclusivo de los animales siendo el agente etiológico del carbunclo sintomático, pierna negra ("black leg") o mancha que se produce principalmente en bovinos y ovinos. Las esporas presentes en el suelo o en las pasturas ingresan a los animales por vía oral y pueden continuar en esta forma o germinar en el tracto intestinal eliminándose por materia fecal para repetir su ciclo. Otras son captadas por los macrófagos de la mucosa intestinal que las transportan al hígado y al músculo estriado donde permanecen latentes. Ante un trauma o una herida que lesionen los tejidos, se produce un ambiente anaerobio favorable, las esporas germinan y elaboran toxinas. Las toxinas aumentan las condiciones para la multiplicación bacteriana, la lesión se incrementa y los productos tóxicos se diseminan vía sanguínea provocando la muerte del individuo afectado.

C. chauvoei elabora un complejo toxigénico dentro del cual se describen cuatro toxinas mayores de naturaleza proteica y con una actividad enzimática determinada.

La toxina *alfa* es una fosfolipasa y contribuye a la lisis de la membrana de las células del huésped, incluidos los glóbulos rojos. Resulta letal cuando se inocula en animales de laboratorio y comparte antígenos con la toxina alfa de *C. septicum*. La toxina *beta*

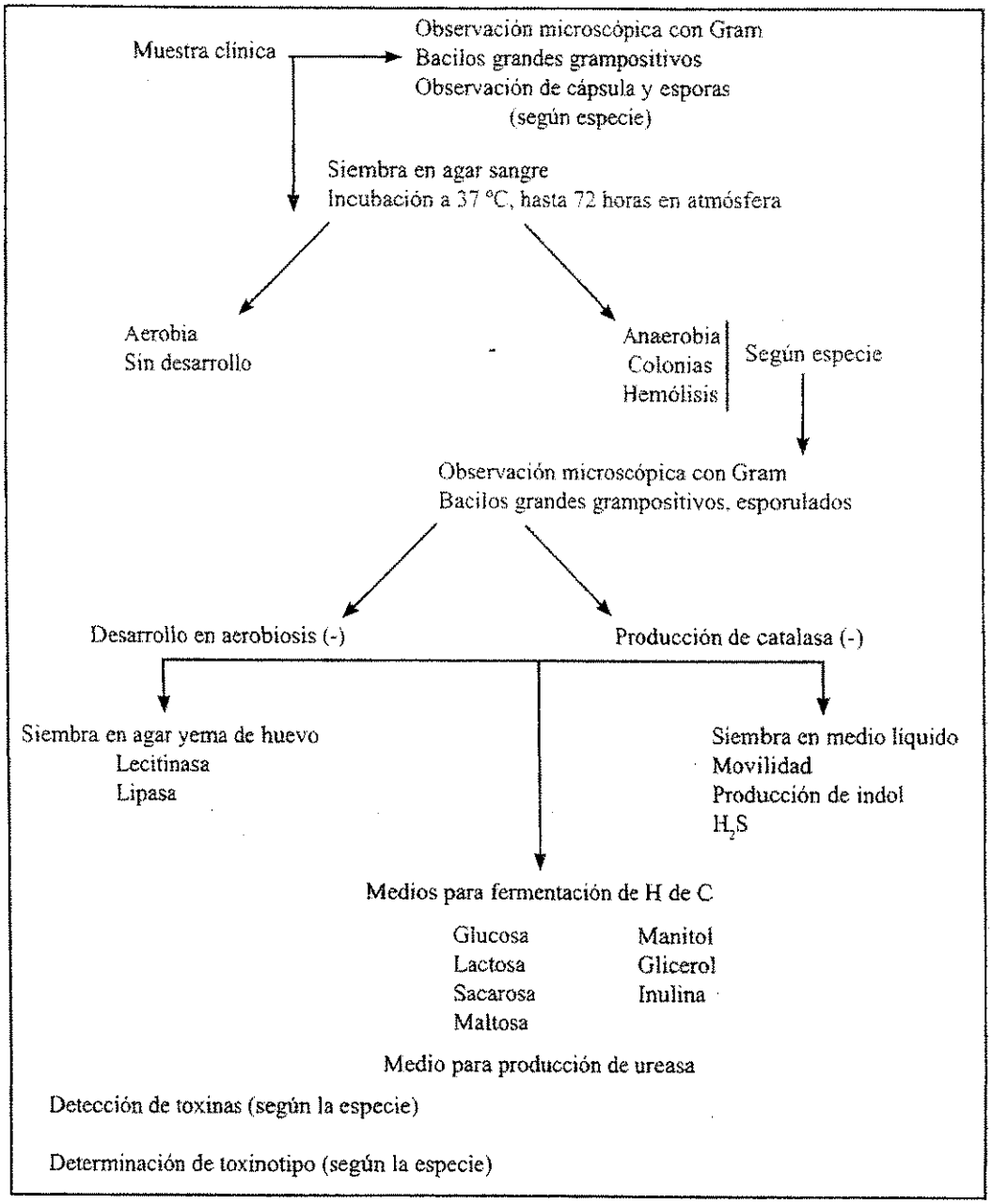


Figura 52-1. Esquema básico de identificación bacteriológica, a partir de muestras clínicas.

como desoxiribonucleasa (DNAsa) es responsable de la degeneración nuclear de las células musculares contribuyendo al proceso de miositis gangrenosa. La toxina *gamma* actúa como hialuronidasa y se inactiva fácilmente por el calor. La toxina *delta* es una hemolisina lábil al oxígeno. También se ha descrito una sialidasa con actividad de neuraminidasa, que participa en la invasividad bacteriana, contribuyendo a la unión con los receptores de las células blanco. Esta posee una marcada preferencia por las mucinas y su producción aumenta notablemente cuando el microorganismo se cultiva en medios con proteínas de origen animal.

Aún no se han identificado las secuencias genómicas codificantes de las toxinas ni los mecanismos moleculares que las regulan.

C. septicum

Es un bacilo pleomórfico que presenta esporas ovales, subterminales y deformantes. Es muy móvil. In vitro tiende a diseminarse por los medios de cultivo sólidos y para aislarlo se deben emplear medios con mayor concentración de gelificantes que la usual. Desarrolla en forma rápida; en 24 horas se pueden observar las colonias irregulares o rizoideas, que presentan hemólisis completa sobre agar sangre.

Se encuentra comúnmente en el suelo y pastos y puede residir en el intestino, siendo invasor postmortem de otros tejidos. Su aparición como contaminante en las muestras y el rápido desarrollo y la invasividad suelen dificultar los diagnósticos.

Es agente primario de gangrenas gaseosas en diversas especies, incluido el hombre. La infección se produce a través de heridas, por contaminación quirúrgica o por infección del cordón umbilical. En los rumiantes, especialmente en ovinos, se produce también por la ingestión de pastos congelados, en zonas de clima muy frío, que producen heridas en el abomaso. Esta afección se conoce como bradsot o braxy.

C. septicum elabora varias toxinas proteicas con actividad enzimática. La toxina *alfa* es una hemolisina que se segrega como

protoxina y por acción de la tripsina se fragmenta en un sitio activo por el cual se une a la bicapa lipídica de la membrana celular eucariota, formando canales en su estructura y produciendo un desequilibrio osmótico que lleva a su lisis. La toxina *beta* posee actividad de DNAsa y de leucocidina. La toxina *gamma* es una hialuronidasa y la toxina *delta* es una hemolisina lábil al oxígeno. También produce neuraminidasa, lipasa y fibrinolisina. Todo el conjunto ocasiona un aumento de la permeabilidad capilar y mionecrosis, desencadenando una toxemia generalmente mortal.

Los genes codificantes de la síntesis de la toxina *alfa* se ubican en el cromosoma bacteriano. Se han identificado y clonado en *Escherichia coli*, permitiendo la elaboración de toxina por este microorganismo.

C. novyi

Es un bacilo esporulado, con espora deformante, móvil. Pierde con rapidez la afinidad por los colorantes de anilina. Es extremadamente exigente en nutrientes y anaerobiosis para su desarrollo. Las colonias se pueden evidenciar entre las 48 y 72 horas de incubación anaerobia.

En estado esporulado se encuentra diseminado en el suelo y puede residir en el intestino y en algunas vísceras de los animales.

Se describen tres toxinotipos de *C. novyi*, A, B y C, aislados de diferentes patologías gangrenosas o necróticas.

C. novyi A es agente de gangrenas en el hombre y en los animales, *C. novyi* B de hepatitis necrótica y *C. novyi* C, se ha aislado de osteomielitis en el búfalo.

La toxina *alfa* es el factor de virulencia más importante. Su codificación genética se encuentra mediada por un fago. La toxina *beta* es una fosfolipasa con actividad hemolítica, necrótica y letal (tabla 52-2).

No se conoce completamente la función de las restantes toxinas, denominadas *gamma*, que es una fosfolipasa con actividad necrotizante, *delta*, una hemolisina lábil al oxígeno, y *épsilon*.

C. haemolyticum

Anteriormente designado como *C. novyi* tipo D. Fenotípicamente es semejante a *C. novyi* tipo B, con la excepción de que produce toxina *beta* en mayores cantidades y no produce toxina *alfa* (tabla 52-2).

Se encuentra esporulado en el suelo e ingresa a los animales por vía digestiva, residiendo en el intestino o en el hígado. Bajo determinadas condiciones germina y produce una afección denominada hemoglobinuria bacilar. Esto ocurre generalmente en animales jóvenes y con antecedentes de parasitosis de alojamiento hepático que destruyen el tejido y crean las condiciones adecuadas para su desarrollo. La producción local de toxina *beta* provoca necrosis hepática y su diseminación por vía sanguínea, hemólisis intravascular y hemorragias, con la muerte del animal.

C. sordelli

Es un bacilo recto, con espora cilíndrica, no deformante, escasamente móvil y grampositivo. No es tan exigente en nutrientes y anaerobiosis como otras especies. Sobre placas de agar sangre en anaerobiosis puede desarrollar en 24 horas a 37 °C, presentando una zona evidente de hemólisis completa.

Tabla 52-2. Toxinas de *C. novyi* y *C. haemolyticum*

	Toxinas	
	Alfa	**Beta**
C. novyi tipo A	+	+
C. novyi tipo B	+	–
C. novyi tipo C	–	–
C. haemolyticum	–	+++

Como actividad bioquímica diferencial produce indol, ureasa y ácido sulfhídrico.

Se encuentra en el suelo e intestino de animales. Se aísla junto con otras especies de gangrenas gaseosas en animales y de contaminantes de heridas quirúrgicas en humanos. Puede causar enterotoxemias sobre todo en animales estabulados o hacinados.

Produce fosfolipasas, una hemolisina lábil al oxígeno, una toxina letal (LT) y una hemorrágica (HT). La TL posee alto PM y presenta una secuencia de aminoácidos similar a la toxina B de *C. difficile* y a la toxina *alfa* de *C. novyi*, pero difiere en los receptores celulares de unión. La codificación para la síntesis de estas toxinas se encuentra a nivel cromosómico.

C. perfringens

Es un bacilo de extremos rectos, que carece de flagelos. Posee esporas ovales de ubicación subterminal, pero en los medios de cultivo usuales raramente se detectan. Algunas cepas pueden formar una cápsula de composición polisacárida compleja que se evidencia con mayor facilidad en aquellas que producen colonias mucoides.

No es muy exigente en cuanto a nutrientes y anaerobiosis. Desarrolla con facilidad en 24 horas a 37 °C en medios con sangre, produciendo colonias de 3 a 4 mm de diámetro, con hemólisis generalmente evidente. Posee una actividad metabólica intensa que facilita su identificación bioquímica (tabla 52-5).

Es un microorganismo residente en el intestino grueso del hombre y de la mayoría de los animales. De allí puede pasar al suelo y las pasturas y también se puede transmitir por contaminación fecal al agua y a ciertos alimentos.

Es agente de gangrenas y de enterotoxemia en el hombre y en los animales.

Las cepas de *C. perfringens* se clasifican en cinco toxinotipos, denominados A, B, C, D y E, según la elaboración de cuatro toxinas mayores denominadas *alfa*, *beta*, *épsilon* e *iota* (tabla 52-3). Estas toxinas se secretan al medio durante la fase exponencial de crecimiento y los sobrenadantes de estos cultivos resultan letales para animales de laboratorio. Cada tipo toxigénico se ha asociado a determinadas patologías. Las cepas tipo A elaboran también una enterotoxina, denominada CPE, responsable de síndromes gas-

Tabla 52-3. Toxinotipos de *C. perfringens*

Tipo	**Toxina mayor**			
	alfa	***beta***	***épsilon***	***iota***
A	+	–	–	–
B	+	+	+	–
C	+	+	–	–
D	+	–	+	–
E	+	–	–	+

troentéricos, que se produce solamente durante la esporulación. Se han encontrado cepas tipos B y E productoras de CPE.

La toxina *alfa* es una fosfolipasa que se adhiere a las membranas celulares provocando su lisis. La producen todos los tipos de *C. perfringens*, aunque en diferentes niveles. Posee actividad de fosfolipasa promoviendo la desorganización de la membrana celular. Tiene acción hemolítica y necrótica y es esencial en el desarrollo de las gangrenas.

Se ha identificado una variedad de toxina *beta*, denominada *beta 2* con actividad citotóxica y necrótica. Se cree que actúa formando poros en la membrana celular. Posee cierta homología estructural con la clásica toxina *beta*, denominada ahora *beta 1*.

La toxina *beta 1* es letal y necrotizante, es muy lábil y puede ser degradada por la tripsina, por lo que su detección resulta dificultosa. Se supone que también induce la formación de poros en las membranas. Las cepas pueden producir *beta 1* y *beta 2* en forma separada o conjunta.

La toxina *épsilon* es una proteína secretada como una forma inactiva. Con la proteólisis demuestra una intensa actividad, uniéndose a la membrana celular y alterando la permeabilidad con la producción de edema.

La toxina *iota* es una sustancia binaria formada por dos proteínas independientes, un componente de unión a la célula (*Ib*) y otro enzimático (*Ia*), que actúan en conjunto. *Ib* reconoce el receptor de superficie celular, ambos se internalizan por endocitosis y la fracción *Ia* se libera alterando la estructura del citoesqueleto.

C. perfringens secreta una variedad de enzimas hidrolíticas que degradan diversos sustratos y contribuyen al daño tisular, denominadas en general toxinas menores (tabla 52-4).

El mapa cromosómico de *C. perfringens* se conoce completamente y la mayoría de los genes de virulencia están caracterizados. Los genes que codifican para la toxina *alfa, theta, kappa* y *mu* se localizan en regiones variables del cromosoma cercanas al origen de replicación (Ori). Solamente los que codifican para neuraminidasas se localizan en regiones conservadas.

Por el contrario, los genes codificantes para toxinas *beta 1* y *2, épsilon, iota* y *lambda* se encuentran en plásmidos de diferentes tamaños (entre 55 y 140 kb).

El gen de la enterotoxina (*cpe*) se ha encontrado en regiones variables del cromosoma en las cepas aisladas a partir de cuadros de intoxicación en el hombre y en plásmidos grandes en las cepas provenientes de enfermedades gastrointestinales humanas y de animales.

La localización de algunos de estos genes en elementos extracromosómicos es probablemente la causa de la diversidad encontrada durante la biotipificación de las cepas. Se ha detectado la movilización de plásmidos mediante conjugación, transposición y posiblemente también a través de fagos. La pérdida y la adquisición de estos elementos explicaría los cambios en la producción de toxinas observados en algunas cepas e implica a *C. perfringens* como un reservorio de genes transmisibles a otras especies dentro y fuera del género *Clostridium*.

Tabla 52-4. Toxinas menores y su actividad enzimática

Toxina	Actividad
theta	Hemolisina
kappa	Colagenasa, gelatinasa
mu	Hialuronidasa
nu	DNAsa
lambda	Proteasa
Neuraminidasas	
gamma	Hemolisina

Tabla 52-5. Genes codificantes para las toxinas de *C. perfringens* y su ubicación

Toxina	Gen	Ubicación
alfa	*plc*	Cromosoma
beta 1	*cpb1*	Plásmido
beta 2	*cpb2*	Plásmido
épsilon	*etx*	Plásmido
iota (Ia)	*Iap*	Plásmido
iota (Ib)	*Ibp*	Plásmido
Enterotoxina	*cpe*	Cromosoma/plásmido
gamma	-	-
theta	*pfoA*	Cromosoma
lambda	*lam*	Plásmido
mu	*nagh*	Cromosoma
nu	-	-
kappa	*col A*	Cromosoma
Neuraminidasa	*nanH, nanI*	Cromosoma

C. botulinum

Es un bacilo grueso de 0,9 a 1,2 por 4 a 6 µm, con esporas ovales de ubicación subterminal, móvil y muy exigente de nutrientes y de anaerobiosis. Requiere un pH neutro para su desarrollo.

Posee amplia distribución en el suelo, vegetales en descomposición y ambientes acuáticos, y también suele estar presente en el intestino de rumiantes, sobre todo en el bovino. En condiciones óptimas las esporas pueden germinar con el desarrollo de las célu-

Tabla 52-6. Caracteristicas de los grupos de *C. botulinum*

Grupo	Toxinas	Actividad proteolítica	Temperatura óptima de desarrollo (°C)	Producción de lipasa	Fermentación de glucosa
I	A, B, F	+	35-40	+	+
II	B, E, F	–	18-25	+	+
III	C, D	–	40	+	+
IV	G	+	37	–	–

Tabla 52-7. Algunas características de identificación de *Clostridium* patógenos de animales

Especie	Movilidad	Producción de						Fermentación de				
		Leciti-nasa	Lipasa	Gelati-nasa	Indol	H_2S	Ureasa	Glu-cosa	Lacto-sa	Saca-rosa	Mal-tosa	Sali-cina
C. botulinum												
I	+	–	+	+	–	+	–	+	–	–	+	V
II	+	–	+	+	–		–	+	–	–	+	V
III	+	V	+	+	V		–	+	–	–	V	V
IV	+	–	–	+	–		–	–	*	–	*	*
C. chauvoei	+	–	–	+	–	–	–	+	+	+	+	V
C. colinum	+	–	–	–	–	–	–	+	–	+	+	–
C. haemolyticum	+	+	–	+	+	–	–	+	+/–	–	–	–
C. novyi												
A	+	+	+	+	–	T	–	+	V	–	+	–
B	+	+	–	+	V	T		+	+	–	–	–
C	+	–	–	–	+	*		+	V	–	*	–
C. perfringens	–	+	–	+	–	+	–	+	+	+	+	V
C. septicum	+	–	–	+	–	+	–	+	+	–	+	+
C. sordelli	+/–	+	–	+	+	+	+	+	–	–	+	–
C. tetani	+/–	–	–	+	V	T	–	–	–	–	–	–
C. difficile	+/–	–	–	+	–	T	–	+	–	–	–	–

Referencias: + : resultado positivo –: resultado negativo V: resultado variable +/–: algunas cepas no producen –/+: algunas cepas producen T: vestigios, según el medio de cultivo * : no se tiene el dato

las vegetativas y la producción de las toxinas, contaminando peces, vegetales o granos ensilados y carcasas de animales muertos.

Las esporas son muy resistentes al calor. Requieren 121 °C durante 20 minutos para su destrucción, mientras que las toxinas se inactivan a 80 °C en 30 minutos o a 100 °C durante 10 minutos.

Se conocen 6 toxinotipos denominados con letras, *C. botulinum* tipos A hasta F, que producen todos una neurotoxina con idéntica actividad, pero diferente en su estructura antigénica, potencia y distribución. *C.botulinum* G se denomina actualmente *C. argentinense*. Las toxinas son las responsables del cuadro de parálisis fláccida característico del botulismo. Son las toxinas más potentes que se conocen: la dosis letal para un humano adulto está estimada entre 0,1 a 1 µg para la toxina botulínica A. Un ejemplo teórico muestra que 1 gramo de toxina diseminado o inhalado puede ser mortal para más de un millón de personas. De hecho esta extrema toxicidad ha convertido a las toxinas botulínicas en una de las principales armas biológicas.

Por el contrario, se emplean puntualmente en diluciones elevadas para el tratamiento de afecciones caracterizadas por una hiperactividad muscular o para trastornos musculares espásticos.

El botulismo se puede originar como una intoxicación, por ingestión de toxina preformada o como una toxiinfección, por ingestión de esporas que germinan en el tubo digestivo produciendo la correspondiente toxina. Son extremadamente raros los casos de ingreso del microorganismo o de la toxina a través de heridas. El ingreso de toxinas por inhalación se puede producir en forma accidental o por acciones de bioterrorismo.

Las cepas de *C. botulinum* son heterogéneas fenotípica y genéticamente y se han reunido en cuatro grupos (tabla 52-6).

El grupo I incluye cepas proteolíticas, que desarrollan con una temperatura óptima de 35 a 40 °C, con las esporas más resistentes al calor, productoras de toxinas A, B, F o una mezcla de A+B, A+F y B+F.

El grupo II comprende cepas sacarolíticas, sin actividad proteolítica, con una temperatura óptima de desarrollo entre 18 y 25 °C, con esporas no resistentes al calor y que sintetizan toxinas B, E o F.

El grupo III incluye cepas no proteolíticas que cultivan a 40 °C como temperatura óptima, con esporas moderadamente resistentes al calor y que producen toxinas C o D. La toxina C es binaria presentando dos fracciones, C_1 y C_2. Los tipos toxigénicos C se denominan C *alfa* o C *beta* según la fracción predominante. El tipo toxigénico D presenta la fracción C_2 en pequeñas cantidades.

El grupo IV comprende cepas proteolíticas que no producen lipasa, pueden o no esporular, cultivan con una temperatura óptima de 37 °C y elaboran toxina G.

Los genes codificantes para las toxinas de *C.botulinum* A, B, E y F se encuentran a nivel cromosómico, para la toxina G, en plásmidos y para las toxinas C y D en fagos.

Las toxinas botulínicas se sintetizan como un precursor inactivo en una cadena polipeptídica de 150 k. Es necesaria la lisis bacteriana para que se liberen. Una vez liberados se fragmentan por las proteasas de la bacteria o por enzimas digestivas como la tripsina, a nivel del N terminal dando origen a dos cadenas, una pesada y una liviana, unidas por un puente disulfuro. Se asocian a proteínas no tóxicas para formar complejos de mayor tamaño, llegando a los 300 k. Esta asociación permite el pasaje por el tracto intestinal evitando la acidez gástrica y la acción de las enzimas digestivas.

La porción C terminal es la responsable de la unión a un receptor de la membrana celular de las neuronas, la región N terminal regula la penetración y la cadena liviana es la responsable del bloqueo de la liberación del neurotransmisor. Las vesículas que contienen la neurotoxina botulínica se ubican en la extremidad presináptica de la neurona (contrariamente a lo que sucede con las vesículas que contienen la toxina tetánica).

Cuando se produce la endocitosis de la toxina ésta ya no se puede neutralizar con anticuerpos. Dentro del citosol la cadena liviana inhibe la liberación de acetilcolina. El músculo no se contrae, dando como resultado una parálisis fláccida.

La profilaxis se basa en medidas de higiene alimentaria y en la vacunación en zonas endémicas. Las toxinas botulínicas mantenidas con formol durante 1 mes a 42 °C, pierden el componente tóxico transformándose en toxoides para uso vacunal. El empleo de suero antibotulínico o de gammaglobulina purificada puede neutralizar la toxina no fijada a las neuronas, pero no la que se ha internalizado.

C. tetani

Es un bacilo largo y fino, de 0,4 a 0,6 por 2 a 5 µm con la característica espora terminal (palillo de tambor). La mayoría de las cepas son móviles. Es muy exigente en cuanto a nutrientes y anaerobiosis, por lo que su cultivo es dificultoso. En agar sangre desarrolla colonias pequeñas de bordes irregulares con un pequeño halo de hemólisis completa a su alrededor. La actividad bioquímica detectada es escasa (tabla 52-7).

Se encuentra en el intestino de animales y excepcionalmente del hombre. Los herbívoros contribuyen a la diseminación de las esporas a través de la materia fecal. Las esporas viables pueden o no germinar en el tubo digestivo, y la toxina formada, así como la administrada por vía oral, no resulta tóxica, ya que se degrada por las enzimas intestinales.

Las esporas ingresan por heridas profundas o con destrucción de tejidos, por el cordón umbilical en recién nacidos o por maniobras quirúrgicas sin asepsia. En el ambiente adecuado el microorganismo se multiplica y sintetiza una neurotoxina que se une a los gangliósidos en las membranas sinápticas impidiendo la exportación de neurotransmisores liberadores de la sinapsis. Las neuronas reguladoras de la médula espinal son las células blanco. El resultado es una hiperexcitabilidad de las neuronas motoras con una contractura generalizada y permanente de la musculatura estriada. Finalmente, se produce la muerte por parálisis espástica de los músculos respiratorios.

C. tetani produce una hemolisina denominada tetanolisina sin significancia patogénica importante y una neurotoxina denominada tetanospasmina, responsable de la sintomatología de la enfermedad. Los genes codificantes de esta toxina se encuentran en un plásmido; la toxina se sintetiza como un precursor inactivo ligado a la pared bacteriana. Con la lisis del microorganismo se libera y se fragmenta por las proteasas bacterianas en una cadena pesada y una liviana. El extremo C terminal de la cadena pesada es el responsable de la adherencia al receptor proteico de la membrana de las neuronas. La región N terminal dirige la penetración de la toxina y la cadena liviana es la responsable del bloqueo de los neurotransmisores. La presencia de anticuerpos puede bloquear este paso. La toxina tetánica no se une a proteínas celulares formando complejos, como ocurre con la toxina botulínica. Esta aparente desprotección es la causa de no presentar actividad por vía oral, ya que resulta expuesta a las enzimas tóxicas del tracto digestivo.

El diagnóstico que se realiza es de tipo clínico ya que el aislamiento del agente demanda tiempo. Para identificar las cepas toxigénicas se puede cultivar en medio sólido con la adición de suero antitetánico, incubando a 37 °C y luego a temperatura ambiente. Alrededor de las colonias toxigénicas se puede observar un halo de precipitación resultante de la formación del complejo toxina-antitoxina.

El tratamiento consiste en administrar suero antitetánico homólogo en los animales y gammaglobulina purificada en el hombre. Se pueden emplear antibióticos como penicilina o tetraciclina en forma local o por vía general para frenar la multiplicación del germen en el sitio de la lesión.

La prevención se basa en la vacunación mediante la aplicación de toxina detoxificada (toxoide) que resulta un excelente inmunógeno. La neurotoxina con el agregado de formol y mantenida durante 1 semana a 38 °C se transforma en toxoide vacunal.

C. difficile

Es un bacilo grande de 0,5 a 1,5 por 3 a 6 µm, generalmente agrupado en cadenas de 2 a 6 células, móvil, con espora deformante y una cubierta cristalina de proteína de superficie (*S-layer*). Es muy exigente en cuanto a nutrientes y requiere el agregado de vitamina K, hemina y cisteína a los medios de cultivo y una anaerobiosis estricta. Desarrolla en 48 horas a 37 °C. Las colonias son grisáceas con bordes irregulares.

Se puede encontrar en el intestino del hombre y de algunas especies de herbívoros y carnívoros. Se elimina por materia fecal. Se discute si el perro puede actuar como transmisor al hombre. Produce una colitis seudomembranosa consecutiva a la administración de determinados antibióticos, generalmente macrólidos, que inhiben otros agentes microbianos presentes en el intestino. Para que se desarrolle el cuadro patológico es necesario este terreno más la presencia de cepas productoras de toxinas.

La adhesión a las células intestinales está favorecida por la movilidad bacteriana y por el quimiotactismo hacia el mucus intestinal. La cubierta de superficie le confiere una resistencia a la fagocitosis. Produce una serie de enzimas como hialuronidasa, condroitín sulfatasa, gelatinasa y colagenasa que contribuyen a las lesiones tisulares.

La toxicidad resulta de la acción de las toxinas A (con acción de enterotoxina) y de la toxina B, citotóxica y de potencia 1000 veces mayor, y de otros factores no detectados en todas las cepas que son una enterotoxina proteica, una proteasa de elevado PM que altera el potencial eléctrico de las células intestinales y una ADP ribosiltransferasa, de importancia incierta.

La síntesis de las toxinas A y B se encuentra codificada en el cromosoma en un locus de patogenicidad. Están formadas cada una por una cadena única con una fuerte homología entre sí. Poseen tres dominios: el N terminal presenta la actividad tóxica, el C terminal es el responsable de la fijación a los receptores celulares y en el medio de ambos, existe una región implicada en la internalización de la toxina. Según su capacidad de elaborar una o ambas toxinas las cepas se clasifican como A+/B+ o A−/B+. Las cepas A−/B−, denominadas clásicamente no toxigénicas, designadas NoA-NoB, podrían corresponder con la producción de otros componentes de virulencia, aún no aclarados completamente.

Las toxinas se liberan en el citoplasma celular produciendo la degradación del citoesqueleto, con degeneración del epitelio y alteración de la permeabilidad intestinal. Sucede un aflujo masivo de neutrófilos con la formación de microabscesos, y liberación de citoquinas desencadenando un importante cuadro de inflamación tisular. El cuadro suele remitir al suspender la terapia antibiótica y mantener la homeostasis del individuo.

C. spiriforme

Se denomina así por la forma característica que presenta cuando desarrolla en agar sangre como un bacilo helicoidal, grampositivo. En las preparaciones de contenido intestinal aparece como un bacilo curvo con espora terminal. En agar sangre forma colonias grises y circulares, no hemolíticas.

Se encuentra en el ambiente y en el intestino de conejos y roedores de laboratorio, donde puede causar patologías al alterar el equilibrio microbiano luego de la administración de quimioterápicos o por fallas de higiene o alimentación. Causa enteritis necrótica.

Produce una toxina necrótica y letal, que es neutralizada con anticuerpos antitoxina *iota* de *C. perfringens*. Es una toxina binaria con actividad sobre las fibras de actina, a las que destruye. Se puede detectar por su efecto sobre cultivos celulares.

La prevención y el tratamiento residen en el manejo sanitario y la administración de penicilina o metronidazol.

C. colinun

Se encuentra en el intestino de aves silvestres y domésticas. Produce un cuadro similar al causado por otras especies de clostridios, de enteritis asociada a antibioticoterapia en las aves. El diagnóstico se realiza por el cultivo y la identificación del agente a partir de muestras de mucosa intestinal de animales afectados.

BIBLIOGRAFIA

Braun V, von Eichel-Streiber C. Virulence-associated mobile elements in Bacilli and Clostridia, en Pathogenicity Islands and other mobile elements, ed. Kaper and Hacker, American Society for Microbiology. 1999; cap 13, p. 233-263.

Comisión Científica de Enfermedades producidas por Bacterias Anaerobias. Metodología Diagnóstica de las Enfermedades producidas por Bacterias del Género *Clostridium*. Serie técnica N°1. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico, 2° edición, ISSN 1514- 8378. 1999.

Euzéby JP. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature. 2004. http//:www.bacterio.cict.fr

Finegold S, Song Y, Liu C. Taxonomy: general comments and update on Taxonomy of Clostridia and anaerobic cocci. Anaerobe. 2002; 8 (5): 283- 286.

Glenn Songer J. Clostridial diseases of small ruminants. Vet Res. 1998; 29: 219-232.

Marvaud J, Raffestin S, Gibert M, Popoff M. Regulation of the toxinogenesis in *C. botulinum* and *C. tetani*. Biology of the cell. 2000; 92: 455-457.

Popoff M. Clostridial toxins. Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine. John Wiley and Sons, Inc, 2002; p. 855-860.

Poxton I, McCoubrey J, Blan G. The pathogenicity of *C. difficile*. Clin Mirobiol Infect. 2001; 7: 421-427.

Quinn P, Carter M, Markey B, Carter G. Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe Publishing, London, England, 1994; p. 191-208.

Rood J, Mc Clane B, Glen Songer J, Titball R The Clostridia: molecular biology and pathogenesis. Academic Press, California, USA. 1997.

Capítulo 53

CHLAMYDIA

In memoriam † Roberto Caffarena,
Herbert Trenchi, Francisco Capano

INTRODUCCION

Esta afección fue descrita por primera vez en Europa durante el siglo XIX como una neumonía en seres humanos contraída a partir del contacto con aves psitácidas importadas desde América del Sur. De allí parte su denominación: *fiebre de los loros* o *psitacosis*.

No obstante, para 1941 se había comprobado su presencia y posibilidades de contagio en 129 tipos de aves no sólo psitácidas por lo que se sugirió la utilización del término *ornitosis*, de alcance más general. Actualmente, haciendo referencia a su agente causal *Chlamydophila psittaci*, se la denomina *clamidiosis*.

Las antiguas cepas de *Chlamydia psittaci* de los mamíferos provenientes de abortos, felinos y cobayos han sido denominadas como tres nuevas especies quedando entonces como *Chlamydophila abortus*, *C. felis*, y *C. caviae*, agregando ahora *C. pecorum* y *C. pneumoniae*, mientras que la de origen aviar como *Chlamydophila psittaci*. En Chlamydia han permanecido los géneros: *Chlamydia muridarum*, *C. suis* y *C. trachomatis* (fig. 53-1).

Desde el punto de vista económico es de gran importancia en veterinaria ya que es un factor limitante del comercio de aves de adorno, ocasionando problemas a quienes tienen por entretenimiento la cría de palomas y fundamentalmente repercute tanto en la salud pública como en especies de producción industrial.

Es un problema serio en áreas de producción de pavos y patos donde ocasiona elevadas mortalidades con anorexia, diarrea y finalmente caquexia. Las especies que afectan a bovinos se presentan con abortos; en ovinos y bovinos como cuadros neumónicos y poliartritis siendo un factor de pérdidas económicas importantes en algunas áreas donde se realizan esas producciones.

EPIDEMIOLOGIA

Las afecciones causadas por *Chlamydophila psittaci* tienen difusión mundial. No obstante, por la amplia gama de sus manifestaciones y presentaciones, creemos importante desarrollar el tema separándolo por especies.

Si bien se conoce en el hombre desde el siglo pasado, su incidencia y modo de presentación ha cambiado. En sus comienzos era una enfermedad que se presentaba en humanos en contacto directo con psitácidos mantenidos como animales de compañía.

Tal es el caso del primer brote europeo originado en aves importadas desde la República Argentina. Posteriormente, en 1929 se desata otra epidemia con más de 100 casos en Córdoba, desplazándose luego a Europa donde se diagnostican más de 800 casos con un total de 143 fallecimientos.

A partir de ese momento un mayor cuidado en el tráfico de aves, así como la posterior aparición de los antibióticos, parecen limitar la afección, la que reaparece como una enfermedad profesional entre obreros relacionados a la cría o faena de pavos y patos en los Estados Unidos, la región central de Europa y recientemente Australia.

La enfermedad adquiere mayor importancia en los extremos de la vida: niños y mayores de 50 años. No obstante, con un diagnóstico acertado y en base a un tratamiento correcto, la mortalidad puede aproximarse al 1%.

En aves de vida libre la transmisión natural se produce principalmente por vía aerógena y en segundo término por vía digestiva. Tanto aquellas que padecen la enfermedad clínicamente, como las que presentan la forma latente, eliminan clamidias con sus secreciones nasales y sus heces. La infección tanto en aves como en mamíferos, incluyendo al hombre, tiene su punto de partida al tomar contacto con materiales contaminados o en la inhalación del polvillo resultante.

La difusión se hace más factible en aquellas aves que por costumbre cohabitan en estrecho contacto. Tal es el caso de la cotorra común (*Miopsitta monachus*) que vive con otros ejemplares en grandes nidos comunales, o el caso de las palomas, que se desplazan en bandadas.

Los hábitos de alimentación también cobran importancia. En las palomas la transmisión a sus pichones es directa, ya que éstos toman el alimento del pico y buche de sus padres. En los animales mantenidos en cautiverio el contagio se ve facilitado si se encuentran hacinados o en lugares mal ventilados.

Una tercera vía de transmisión es la cutánea. El arañazo o picotazo del ave a sus congéneres u otro animal puede ser la puerta de entrada del microorganismo.

En las aves de explotación industrial cabe destacar el caso de los patos en los que, además de las vías ya mencionadas, debemos agregar la difusión transovárica.

En los rumiantes la ingestión de material contaminado es la vía más importante de transmisión. La introducción de animales infectados es la principal fuente de infección, siendo rara la transmisión a distancia de un rebaño afectado a otro ubicado en la vecindad.

La enfermedad suele manifestarse luego de varios meses desde el momento de su introducción, variando en función de la edad de los animales y el estado de gestación de las hembras.

Se discute si la vía venérea puede ser determinante; también se han descrito casos en los que algunos ácaros e insectos estarían involucrados en dicha difusión.

CLASIFICACION

Su ubicación taxonómica fue muy discutida en el pasado. Hoy en día se reconoce que es una bacteria, aunque de vida intracelular obligada (Moulder 1964); se la identificó en un principio con el bacilo de Nocard (1833), hoy conocido como *Salmonella typhimurium* y posteriormente con los virus (Bedson 1932).

Dado que *Chlamydophila psittaci* presenta características que la asemejan a las bacterias, a los virus e incluso a las rickettsias, ha sido incluida en diversos grupos de microorganismos: Chlamydozoon, Miyagawanella, Ehrlichia, Rickettsioformis, Grupo PLT (psitacosis, linfogranuloma venéreo, tracoma).

Chlamydophila psittaci

Actualmente el agente causal de la clamidiosis o psitacosis de origen aviar es la *Chlamydophila psittaci*. La antigua *Chlamydia psittaci* mamífera de aborto, felina y de cobayo han sido denominadas como tres nuevas especies: *C. abortus*, *C. felis* y *C. caviae*.

C. psittaci afecta aves con infecciones que van desde inaparentes a graves, agudas o crónicas. La mayoría de los órganos pueden verse afectados, así como la conjuntiva, el aparato respiratorio y el tracto gastrointestinal. También puede transmitirse verticalmente a través del huevo. Las cepas de *C. psittaci* son similares en virulencia, crecen rápidamente en cultivo celulares, tienen genes 16S-rRNA que difieren en <0,8%, y pertenecen a ocho serovares conocidas. Debe considerarse que todos son fácilmente transmisibles a los humanos.

C. psittaci serovar A es endémica entre las aves psitácidas y ha causado zoonosis esporádicas. La serovar B es endémica entre las palomas, se ha aislado de los pavos y también se ha identificado como la causa de aborto en ganado lechero. Las serovares C y D son enfermedades ocupaciones de obreros de mataderos y para personas en contacto con pájaros. Los aislamientos de la serovar E (conocido como Cal-10, MP o MN) se ha obtenido de una variedad de hospedadores aviares alrededor del mundo y, aunque estaban asociados con el brote humano de 1920–1930 un reservorio específico para la serovar E no ha sido identificado. Varias cepas de *C. psittaci* tienen un plásmido extracromosómico. Además, muchas cepas de *C. psittaci* son susceptibles a bacteriófagos.

Chlamydophila pneumoniae

La propuesta para establecer dos géneros en la familia Chlamydiaceae hizo necesario el traslado de las especies *C. pneumoniae* a la especie *Chlamydophila pneumoniae*. Se pensaba anteriormente que *C. pneumoniae* era un patógeno específico de humanos, pero se sabe ahora que infecta caballos, koalas y otros animales. *C. pneumoniae* tiene un genoma de aproximadamente 1,2 megabases. En humanos es principalmente un patógeno del tracto respiratorio y causa bronquitis aguda o crónica y neumonía. También ha sido asociado con enfermedad pulmonar obstructiva, aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer y otras patologías respiratorias agudas y crónicas. Se han identificado *C. pneumoniae* que pertenecen al biovar del koala en toda la población de koalas libres en Australia. Se aísla normalmente del globo ocular y sitios urogenitales, donde no parecen ser altamente patogénicos. El biovar equino de *C. pneumoniae* incluye sólo la cepa N16 que se aisló del tracto respiratorio de un caballo; esta cepa tiene un plásmido mientras otras *C. pneumoniae* no lo poseen. La inoculación de caballos con N16 produce primariamente infecciones asintomáticas.

Chlamydophila pecorum

Las especies de *Chlamydia pecorum* han sido renombradas como *Chlamydophila pecorum*. Las cepas de *C. pecorum* generalmente son no invasivas en el modelo de virulencia en ratón y son serológica y patogénicamente diversas, sólo ha sido aislado de mamíferos: ganado, ovejas y cabras (rumiantes), koalas (marsupiales) y cerdo. Se ha asociado esta bacteria con aborto, conjuntivitis, encefalomielitis, enteritis, neumonía y poliartritis.

Chlamydophila felis

Chlamydophila felis incluye los aislamientos felinos que previamente pertenecían a *Chlamydia psittaci*. *C. felis* es endémica entre los gatos domésticos mundialmente, causando principalmente conjuntivitis, rinitis y problemas respiratorios. Puede recuperarse del estómago y el tracto reproductor. La infección de humanos con

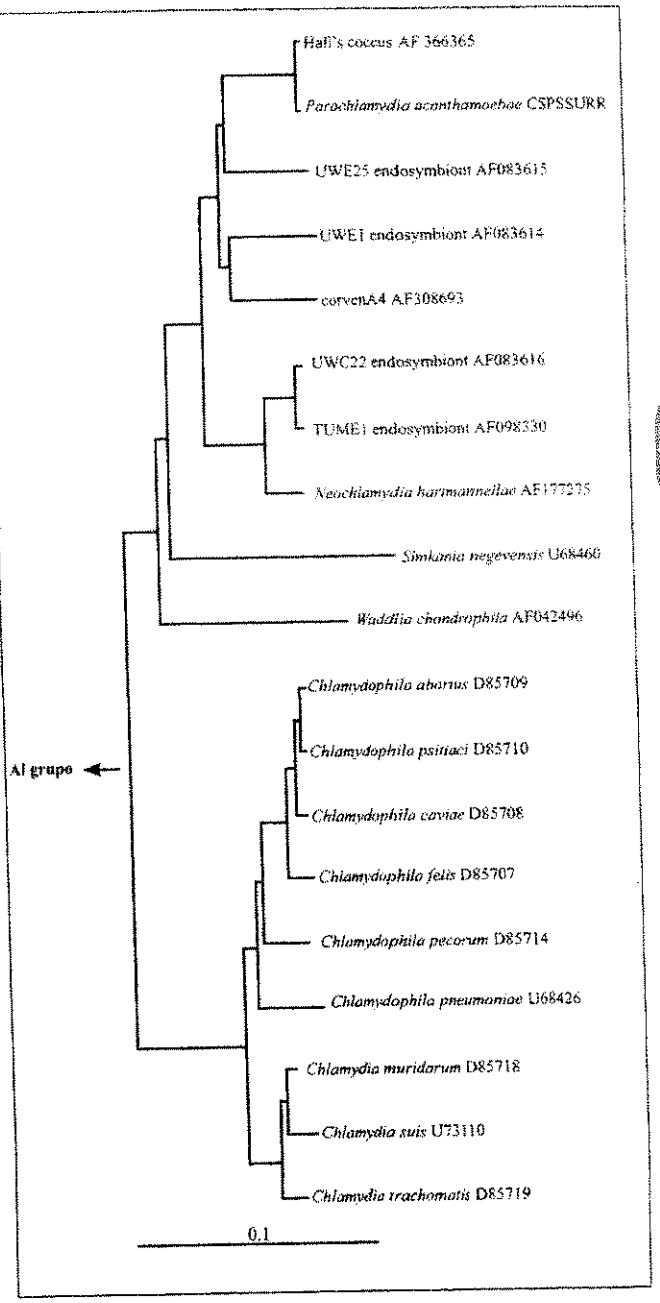


Figura 53-1. Arbol filogenético de unión de la secuencia del gen de rRNA 16s de Chlamydiales, incluyendo Chlamydiaceae, Parachlamydiaceae y Simkaniaceae, comparado con *Legionella pneumophila* (M 59157) como grupo externo. La barra representa la distancia evolutiva estimada. Cada valor se deriva de 100 muestras. (Tomado de: Gilbert Greub, Didier Raoult: Parachlamydiaceae: Patógeno Emergente Potencial. Emerging Infectious Diseases 2002; 8, 6: 625-630).

C. felis también ha sido informada. Las cepas FP Pring y FP Cello tienen un plásmido extracromosómico, considerando que la cepa FP Baker no lo tiene. La cepa FP Cello produce enfermedad letal en ratones, mientras que el FP Baker no. Una cepa FP Baker atenuada se usa como una vacuna viva para los gatos.

Chlamydophila caviae

Chlamydophila caviae incluye las conjuntivitis de inclusión de cobayos que pertenecían a *Chlamydia psittaci*. Pueden recuperarse *C. caviae* de conjuntiva de cobayos que padecen inflamación y se-

creción ocular. Hay cinco aislamientos de *C. caviae* conocidos y la secuencia del gen *ompA* (*omp1*) de estos aislamientos es casi idéntica. La cepa GPIC contiene un plásmido extracromosómico pCpGP1. *C. caviae* infecta el epitelio mucoso principalmente y no es invasiva. El sitio natural de infección de *C. caviae* es la conjuntiva, pero es posible infectar el tracto genital de cobayos y obtener una enfermedad que es muy similar a la infección humana por *Chlamydia trachomatis*. *C. caviae* es notablemente específica para los cobayos.

Chlamydophila abortus

Chlamydophila abortus se conocía como *Chlamydia psittaci*. Las cepas de *C. abortus* son endémicas entre rumiantes y colonizan eficazmente la placenta. Tienen un serotipo distintivo y casi 100% de conservación ribosomal y secuencia del gen *ompA*. *C. abortus* es la cepa de referencia para determinar si una nueva cepa pertenece a Chlamydiaceae (16S - o 23S-rRNA deben ser > 90% idéntico a los genes de *C. abortus*). No se ha identificado un plásmido extracromosómico en ninguna cepa de *C. abortus*. Este microorganismo está principalmente asociado con casos de aborto y neonatos débiles. El aborto esporádico zoonótico debido a *C. abortus* ha sido confirmado por análisis genético de aislamientos de mujeres que trabajan con ovejas. El aislamiento típico se ha obtenido de casos de aborto en oveja, ganado y cabras mundialmente (cepas B577, EBA, OSP, S26/3 y A22).

MORFOLOGIA Y CARACTERISTICAS GENERALES

La morfología en las clamidias es variable, dependiendo del ciclo evolutivo. Esto implica poder observar dos formas de presentación del microorganismo netamente diferentes.

El cuerpo elemental, forma adaptada a la supervivencia extracelular, infectante y metabólicamente inactiva, se caracteriza por presentar un tamaño de aproximadamente 0,3 µm, pared celular rígida con subunidades dispuestas en forma hexagonal resistente a la sonicación y a la tripsina, contenido de RNA y DNA en una proporción 1:1 y ser tóxico para los ratones.

El cuerpo reticulado o inicial propio de la multiplicación intracelular no infeccioso y metabólicamente activo presenta un tamaño que oscila entre 0,5 y 1 µm, pared celular frágil sin subunidades en la cubierta, sensible a la sonicación, factible de ser lisado por la tripsina y permeable a las macromoléculas, contenido de RNA y DNA igual a 3:1 y no siendo tóxico para los ratones.

La lisozima no tiene efecto sobre las paredes celulares de las clamidias. Al parecer éstas carecen de ácido N-acetil murámico.

Las clamidias son desde el punto de vista antigénico muy complejas. Poseen una lipoglicoproteína específica de género común a todas ellas que contiene un ácido polisacárido antigénicamente determinante (2 ceto-3 desoxiotanoico) termoestable, estable frente al fenol al 0,5%, soluble en éter y lauril sulfato de sodio y resistente a distintas enzimas (tripsina, quimiotripsina y papaína).

Este complejo antigénico puede ser separado en varias fracciones por cromatografía e intercambio iónico y otros antígenos proteicos por PAGE.

Dentro de los componentes proteicos, resalta por su importancia como determinante antigénico de grupo, el correspondiente a la membrana proteica externa mayor de estos microorganismos.

Las toxinas de las clamidias se pueden demostrar por inoculación intravenosa en ratones con cultivos frescos recién cosechados de saco vitelino de huevo embrionado, relacionándose con componentes de la pared celular siendo neutralizadas por antisueros específicos.

RESPUESTA INMUNE

Las clamidias son pobres desde el punto de vista antigénico. Para entender los problemas de la inmunidad en infecciones clamidiales, entre otros factores se deben considerar los siguientes: a) la naturaleza de organismos (recordar que son parásitos intracelulares obligatorios); b) la relación hospedador-parásito. Se destaca que es más común la infección latente que la presentación directa de la enfermedad con el característico cortejo sintomatológico; y c) la edad de los animales.

Se consideran como de mayor susceptibilidad las fajas etarias extremas en el humano y fundamentalmente en jóvenes en las diversas especies de animales domésticos.

En el hombre, los anticuerpos contra clamidias pueden estar presentes durante largos períodos pero su significado en la resistencia a la enfermedad no ha sido todavía dilucidado.

Existe evidencia bibliográfica que demuestra un aumento en la resistencia a pesar de ser relativa. Puede aparecer en varias especies animales como consecuencia de una exposición natural frente al agente. Los mecanismos inmunitarios que operan en estas circunstancias no son bien conocidos.

En efecto, no se puede decir que altos títulos fijadores de complemento o seroneutralizantes indiquen una eliminación de clamidias en dichos animales; estos agentes etiológicos se han aislado comúnmente en animales con altos títulos de anticuerpos.

La inmunidad que sigue a un brote de clamidiosis en aves es difícil de evaluar debido a que la resistencia específica e inespecífica aumenta con la edad. Las aves que han eliminado completamente los microorganismos o han sido tratadas con clortetraciclina, presentan una resistencia mayor al desafío que aquellas que mantienen una infección latente.

En el curso temprano de la infección por clamidias vivas en pavos, conejos y bovinos se producen anticuerpos lábiles a 65 °C que corresponden a los denominados 19 S. En estados más tardíos de la infección (4-15 semanas), estas especies sólo producen anticuerpos termoestables a 65 °C (anticuerpos 7 S).

En bovinos, como consecuencia de una inoculación intramuscular o subcutánea, aparece una leve respuesta de anticuerpos. Esta es transitoria y las muestras de suero extraídas antes del término de la gestación pueden dar niveles bajos o no detectables de anticuerpos. La longitud del período de seronegatividad antes del aborto depende fundamentalmente del intervalo entre la inoculación y el término de la gestación. Sin embargo, la expulsión de placenta y fetos infectados, ya sea muertos o vivos, estimula un nuevo aumento marcado del título de anticuerpos, cuyos niveles máximos se alcanzan alrededor de los 21 días posparto.

El título de inmunidad pasiva en ovinos presente en cualquier tiempo determinado, dependerá del título inicial en el calostro y de la cantidad del mismo ingerido.

Poco después de ingerir calostro con anticuerpos, los corderos presentaban niveles detectables de anticuerpos en suero. En algunas muestras de suero de corderos que no habían tomado calostro era de 1:20 y al día siguiente después de que el cordero había mamado, el título aumentaba 1:1280 (prueba de fijación de complemento).

La transferencia de anticuerpos en el calostro es probablemente el modo más importante de adquisición de anticuerpos.

Se piensa que la inmunidad pasiva adquirida evitará las posibles infecciones prenatales o neonatales contraídas en corderos en majadas infectadas en forma enzoótica.

Los anticuerpos encontrados en calostro suministrado a terneros no previenen la multiplicación de las clamidias a nivel del tracto intestinal, y una cepa altamente virulenta induce una infec-

n sistémica después de una inoculación por vía oral en terneros
e habían ingerido calostro con anticuerpos anticlamidias.

En la patogénesis del aborto por clamidias, una clamidemia
corta como de 15 minutos es suficiente para establecer in-
ción placentaria. Este corto período de clamidemia necesario
ra establecer una infección placentaria explicaría las dificul-
les encontradas en la inmunización para prevenir los abortos
animales.

El significado, función, interrelación y comienzo de la forma-
ón de anticuerpos detectados por diferentes métodos serológi-
s deben ser investigados en forma conjunta con el papel de
mponentes celulares de la defensa del hospedero.

El balance óptimo entre el hospedador y el parásito, visto
neralmente en animales adultos, puede depender en forma
gnificativa como consecuencia de la reducción del grado de
sceptibilidad debido a la edad más que a la inmunidad ad-
uirida.

ATOGENESIS

Casi todas las especies de aves, la mayor parte de los ma-
níferos de interés industrial y muchos animales silvestres son
ospederos naturales de *C. psittaci*.

Las infecciones latentes en aves frecuentemente se trans-
forman en formas clínicas aparentes como resultado del haci-
namiento, condiciones poco higiénicas, infecciones bacterianas
sobreagregadas o de salida, infecciones por protozoarios, trans-
porte o prácticas de mal manejo.

Algunas cepas mamíferas pueden afectar al humano (aunque
hay pocos casos documentados) pero algunas cepas aviares alta-
mente infecciosas producen la llamada psitacosis.

Una vez ingresados por las diferentes vías, los microorganis-
mos fagocitados no recubiertos por las opsoninas escapan a la
acción enzimática de lisozimas-fagosomas y no son eliminados,
pudiendo en efecto multiplicarse dentro del macrófago.

Las linfoquinas producidas por los linfocitos activados causan
una microbiostasis de las clamidias en macrófagos activados.
Este fenómeno va desapareciendo entre 24 y 41 horas si no se
proporcionan nuevamente linfoquinas frescas.

Algunos investigadores demostraron que la *C. psittaci*
deprime la transformación de los linfocitos. En el mecanismo
intervendría un componente termoestable de la envoltura de
los cuerpos elementales tanto viables como no viables; este
componente no será inactivado por anticuerpos seroneutrali-
zantes. En estos estudios no pudo demostrarse la presencia de
linfocitos T supresores.

La respuesta de los linfocitos vuelve a su normalidad después
de 4 semanas.

Con relación a la patogenia en terneros, los mismos excretan
microorganismos en las heces entre 1 y 4 días posinfección, sien-
do la excreción intermitente. Las clamidias tienden a localizarse
en las partes bajas del intestino delgado, con diseminación de la
mucosa a la lámina propia en la región del yeyuno-íleon.

Las cepas de baja virulencia no son encontradas más allá de
los ganglios linfáticos mesentéricos, mientras que las altamente
virulentas pueden detectadarse en hígado, bazo, pulmón, riñón,
orina, sangre y líquido sinovial.

La patogenia de la neumonía clamidial en bovinos y ovinos
debe ser vista en relación con la infección intestinal muy común
en la forma inaparente de ambas especies. Algunos autores
reportan el aislamiento simultáneo de microorganismos de los
tractos respiratorio e intestinal en bovinos con neumonía. Estos
microorganismos aislados del intestino de bovinos y ovinos cau-
saron neumonía después de ser inoculados por vía intratraqueal.
La virulencia, en general, está aumentada cuando se realizan
pasajes seriados entre animales en estrecho contacto (inhalación
de polvo con partículas que contienen clamidias expulsadas como
consecuencia de la tos).

Generalmente en condiciones naturales, se sospecha que la
relación primaria de infección por clamidias puede estar complica-
da por infecciones secundarias.

El agente infeccioso puede llegar a los órganos blanco,
placenta y feto, durante episodios de clamidemia. La infección
más rápida de fetos ovinos fue detectada dentro de 3 a 5 días
posinoculación en ovejas y a los 6 días en fetos bovinos. Los
primeros órganos afectados fueron el hígado y el bazo.

La progresión de la infección intrauterina indica que el feto
se infecta por vía hematógena, por entrada de los microorganis-
mos en la circulación fetal. Estudios experimentales en ovejas,
demuestran que la placenta tiene que tener un cierto grado de
desarrollo para que la infección por clamidias se establezca y
pueda llevar al aborto. Se sabe que la placentitis es inducida por la
infección por clamidias y esta lesión probablemente sea la causa
del aborto. Los fetos abortados ya están muertos con lesiones casi
no detectables o lesiones graves o pronunciadas.

El cuadro espontáneo de poliartritis puede ser reproducido
experimentalmente inoculando terneros o corderos por vía oral,
subcutánea, intramuscular, endovenosa o intraarticular. En estu-
dios experimentales después de 3 días de la inoculación intraar-
ticular, dicha articulación estaba seriamente inflamada con alto
número de clamidias. En otros trabajos se destaca que después de
3 días de la inoculación en corderos por las vías intramuscular o
endovenosa, se aislaron clamidias de varias articulaciones a pesar
de que las lesiones producidas fueron mínimas.

Cuando el afectado es el SNC, el agente microbiano ejerce
una lesión primaria en los vasos sanguíneos en todo el organismo.
El cerebro es sólo uno de los órganos blanco, pero las lesiones
cerebrales conducen a una sintomatología nerviosa que domina el
cuadro clínico. Los factores que llevan a producir lesiones graves
en el cerebro no se conocen muy bien, pero puede ser posible que
existan fenómenos de sensibilización e hiperreacción.

A pesar de que las clamidias producen enfermedades importan-
tes y a veces casos fatales en el hombre y los animales, este
estado de relación parásito-hospedador es una excepción más
que la regla. Es más común una relación bien balanceada entre
ambos con persistencia del agente causal sin dañar al hospedador
(infección latente).

Estos agentes son excretados por hospederos infectados en
forma latente y pueden transmitirse a nuevos seres vivos bajo
condiciones apropiadas. Es posible que estos microorganismos
puedan existir en forma latente bajo un estado no infeccioso o
con una bajísima infecciosidad. Este fenómeno de latencia fue
confirmado en todas las especies en forma natural.

El desarrollo del ciclo infeccioso puede estar detenido por
causas de deficiencias nutricionales de las células hospedadoras
y la multiplicación puede completarse cuando los nutrientes
faltantes son suministrados.

En animales con infecciones latentes generalmente es posi-
ble aislar formas infecciosas de clamidias, particularmente del
tracto intestinal. Hoy en día no se sabe a ciencia cierta cómo las
afecciones por clamidias persisten en animales bajo formas no
infecciosas (cuerpos reticulados). El mecanismo de defensa del
organismo es probablemente más eficiente en eliminar las formas
no infecciosas que las infecciosas.

ASPECTOS CLINICOS

Aves de vida libre o usadas como mascotas

La enfermedad se manifiesta en forma similar en todas ellas, psitácidos o no. Se pueden observar tres formas de presentación: sobreaguda, aguda y crónica.

En el primer caso, el ave muere sin presentar signos premonitorios. En el cuadro agudo se pueden distinguir signos generales, al igual que en otras enfermedades septicémicas, como: somnolencia, anoxia, plumaje erizado, escalofríos, debilidad general. A éstos pueden sumársele signos digestivos (diarrea), respiratorios (corrimiento nasal, tos, estertores crepitantes) y oculares (conjuntivitis uni o bilateral con abundante flujo lagrimal y fotofobia).

La forma crónica determina un progresivo desmejoramiento del estado general y pérdida de peso. Es de destacar el bajo porcentaje de mortandad, 2,5%. En el caso de criadores o tenedores de estas aves, suele no llamar la atención, lo que permite una mayor difusión del microorganismo.

En los pavos el período prepatente varía con la potencialidad patógena de la cepa. Las toxigénicas se manifiestan al cabo de 5-10 días, las menos agresivas pueden demorar 2-8 semanas o ponerse de manifiesto en órganos de aves faenadas, aparentemente sanas.

Los síntomas varían ampliamente en importancia e intensidad, lo más característico que puede citarse es la anorexia, animales débiles que rehúsan moverse, marcha en balanceo y respiración agitada cuando caen. Si sobrevive lo suficiente, el animal llega a la caquexia. Se observan heces gelatinosas de color amarillo-verdosas, que a veces se vuelven líquidas y teñidas de sangre, y la diarrea se acompaña por plumas pegadas en la zona de la cloaca.

En algunos casos se percibe moco seco en narinas, ojos hundidos con costras a su alrededor. Las reproductoras muestran baja de postura, que en el caso de cepas toxigénicas puede llegar a cero.

En los patos muchos casos pasan desapercibidos. Clínicamente se caracteriza por un porcentaje alto de conjuntivitis o queratoconjuntivitis. Puede apreciarse en el 25% de las aves. Las plumas alrededor de los ojos aparecen empastadas por las secreciones y van acompañadas de descargas nasales serosas o purulentas.

Los animales se muestran débiles, rehúsan alimentarse y su marcha se vuelve vacilante con caídas laterales. Se observa una diarrea profusa, alcanzando la mortalidad hasta un 30%. Las aves sobrevivientes se presentan emaciadas con importante atrofia muscular.

Formas clínicas en rumiantes

Existen diferentes factores que influyen en las formas clínicas de la enfermedad (en especial en bovinos y ovinos) como ser la edad del animal, la virulencia de la cepa, la transferencia de anticuerpos en el calostro, el estrés, las prácticas de manejo, etc.

- *Infección ocular.* Se manifiesta por conjuntivitis o queratoconjuntivitis generalmente de tipo catarral a menos que existan infecciones secundarias.
- *Infección respiratoria.* Está caracterizada principalmente por hipertermia, disnea, secreción nasal mucopurulenta y finalmente neumonía, muchas veces asociada a microorganismos de salida como *Pasteurella multocida* y *Mannheimia (Pasteurella) hemolytica.*
- *Poliartritis.* Es una afección grave tanto en corderos como en terneros. Se caracteriza por articulaciones calientes, dolor a la palpación y claudicación importante. El aumento del líquido sinovial es manifiesto, tiene un color amarillo-grisáceo y puede contener folículos de fibrina.
- *Infección intestinal.* Las infecciones intestinales parecen desempeñar un papel primario en otras expresiones clínicas en las clamidiosis. La diarrea es el signo más notorio, pero puede pasar de una manifestación transitoria (2 días) hasta una diarrea acuosa grave que lleva a la muerte de los animales afectados.
- *Encefalitis.* En el bovino causa la encefalitis bovina esporádica manifestada por depresión, ataxia, torneo, decúbito, parálisis y muerte.
- *Infecciones del aparato genital del macho y de la hembra.* En esta última: aborto epizoótico bovino y aborto enzoótico ovino, e infertilidad y nacimiento de crías débiles; mientras que en el macho: epididimitis, orquitis y vesiculitis.

Equinos

Las clamidias han sido implicadas en casos de queratoconjuntivitis, abortos, afecciones respiratorias y poliartritis. A pesar de que se aisló el agente etiológico de potrillos con bronconeumonía, no se ha podido reproducir experimentalmente dicha enfermedad. Esta especie no parece ser tan susceptible como otras, aunque se piensa que en los casos estudiados no hubo rigurosidad en la aplicación de los métodos diagnósticos.

Suinos

Se discute en la actualidad su papel como agente patógeno primario. En la bibliografía publicada en varios países se documentan patologías similares a la poliserositis y su aislamiento desde el contenido intestinal. Científicos hindúes han aislado el germen y demostrado histopatológicamente cuerpos elementales en uretra y próstata.

Caninos

Los primeros casos estuvieron relacionados con problemas en un criadero de aves de adorno y personas a su cuidado con diagnóstico clínico, radiológico y detección de anticuerpos por fijación de complemento. Los mencionados caninos presentaron tos seca y espasmódica. Se ha descrito en esta especie otra signología a saber: queratitis, conjuntivitis, síndrome encefálico y diferentes formas clínicas semejantes a la enfermedad de Carré (moquillo o distemper canino).

Felinos

Son muy frecuentes los casos de conjuntivitis mucoide o secreción mucopurulenta en felinos de diversas edades. Se han observado cuadros de pérdida de peso, hipertermia, presencia de estornudos, tos persistente, descarga nasoocular y casos mortales como consecuencia de neumonía. Asimismo se han descrito casos de portadores asintomáticos con recidivas y recaídas como resultado de causas estresantes. Se emplearon vacunas preparadas en embrión de pollo recomendadas en situaciones de alto riesgo.

Roedores, pilíferos y animales de zoológico

En diversas ocasiones se ha aislado clamidias de ratones de laboratorio y de vida silvestre tanto en roedores sanos como enfermos por neumonitis.

En relación a los cobayos, se ha demostrado la presencia de conjuntivitis, pudiendo llegar a producirse una queratitis panosa en animales de menos de 8 semanas.

También se describieron en conejos casos de uveítis, aborto, ataxia y neumonía. El papel de la persistencia intraocular de los microorganismos se considera como factor importante para explicar la infección latente en otras especies animales.

Por otra parte, se logró aislar clamidias de vísceras de cadáveres de liebres y de la rata almizclera en Canadá.

Se incrimina del mismo modo a infecciones clamidiales en especies como el león marino, focas, diferentes especies de zarigüeyas (parálisis y mioclonías) y koalas (conjuntivitis).

La presentación clínica en humanos varía ampliamente de acuerdo a la gravedad del caso. Luego de un período de incubación de duración no estricta, que va desde 1 a 3 semanas, la afección puede ser muy similar en sus características a la de la gripe, mientras que los casos graves son cuadros respiratorios pronunciados.

La temperatura corporal puede subir rápidamente o en forma lenta y persistente. Esto va acompañado de mialgias, anorexia, escalofríos, sudoración, diarrea o constipación y dolor de garganta. A nivel nervioso el cuadro más frecuente es el de intensa cefalea, pudiendo verse además desde depresión hasta excitación con delirio.

La lesión característica en el pulmón corresponde a un cuadro de neumonía difusa. La tos, como síntoma, es de importancia variable. En algunas oportunidades es seca sin expectoración en el comienzo; luego, si aparece, es de tipo mucoide. El cuadro radiográfico pone en evidencia desde infiltraciones difusas a focos de consolidación uni o bilateral en la base de los pulmones. Puede evolucionar transformándose en una bronconeumonía. En casos graves se observa hepato y esplenomegalia.

El examen hematológico rutinario no revela hechos que puedan orientar el diagnóstico. El resultado puede ser desde normal a presentar una leucopenia con eosinopenia en los estados primarios de la enfermedad, que luego, con el avance de las lesiones, pasa a una leucocitosis.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

El diagnóstico de clamidiosis sigue los pasos del esquema general aplicado a cualquier enfermedad infecciosa: a) datos epidemiológicos; b) datos clínicos; c) datos patológicos y d) pruebas de laboratorio (confirmación).

En lo relativo a los datos clínicos y patológicos, debido a la sintomatología de presentación proteiforme y a la detección de lesiones poco llamativas en la necropsia, se destaca la importancia del envío de muestras con la finalidad de demostrar en forma directa o indirecta que estos animales padecen o presentaron esta noxa.

Remisión de la muestra

En el siguiente cuadro se describen en forma sucinta los materiales que deben ser remitidos al laboratorio de diagnóstico. Es menester destacar la importancia de adoptar medidas precautorias de bioseguridad durante el transcurso del examen clínico del animal y realización de la necropsia de los animales sospechosos de estar afectados de clamidiosis (grado 2-3 de nivel de bioseguridad, CDC, Georgia, EE.UU.).

Animal vivo
- Hisopados (aberturas naturales)
- Sangre (muestras pareadas)
- Heces
- Orina
- Saliva

Cadáver
- Aves
  - Organos varios: bazo, hígado, riñón, pulmón.
  - Exudados serofibrinosos (sacos aéreos, peritoneo)
- Mamíferos
  - Organos varios (idem aves)
  - SNC, médula espinal
  - Placenta, cotiledones, feto
  - Linfonódulos
  - Articulaciones
  - Exudados (serosas)
  - Hisopados nasal, ocular y rectal
  - Epididimo-Vesículas seminales

Las coloraciones tienen por finalidad detectar la presencia, tamaño, forma, estructura y apetencia tintorial de los cuerpos elementales principalmente (corpúsculos LCL).

Coloración	**Visualización (CE)**
Giemsa	Púrpura
Castañeda	Azul
Giménez	Rojo
Macciavello	Rojo

También puede utilizarse la microscopia de contraste de fase, electrónica; la inoculación en animales de laboratorio (ratón, cobayo, paloma, hámster) por diferentes vías. La inoculación en embrión de pollo - HA; inoculación en cultivos celulares: cultivos primarios (FEP), líneas celulares (Mc Coy, Hela, L 929); inmunofluorescencia directa; fijación de complemento y pruebas bioquímicas e inmunotipos.

La detección de anticuerpos específicos (Ac) se realiza por fijación de complemento (directa, indirecta, conjugación), inmunofluorescencia indirecta, inmunodifusión en gel de agar, aglutinación en tubo capilar, inhibición de la hemaglutinación, hemaglutinación pasiva, seroneutralización (embrión de pollo, cultivos celulares), ELISA, prueba de protección de toxina (ratón), prueba de reducción de placas (cultivos celulares) y prueba alérgica (barbillas de aves).

En la práctica la mayoría de los diagnósticos son establecidos usando microinmunofluorescencia (MIF) para buscar anticuerpos de *C. psittaci* en sueros pareados. La MIF es más sensible y específica que las pruebas de fijación de complemento usadas; aunque poseen reactividad cruzada con otras clamidias, como *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* y *C. felis*. La PCR puede usarse para distinguir la infección por *C. psittaci* con otras especies de clamidias. Deben obtenerse muestras de suero en la fase aguda lo más pronto posible después del comienzo de los síntomas y en la fase convaleciente 2 semanas después de la primera muestra. Debido a que el tratamiento antibiótico puede tardar o disminuir la respuesta de anticuerpos, una tercera muestra de suero podría ayudar a confirmar el diagnóstico. Todos los sueros deben probarse simultáneamente en el mismo laboratorio. El agente infeccioso también puede aislarse del esputo del paciente, fluido pleural o sangre durante la enfermedad aguda y antes del tratamiento con agentes antimicrobianos; sin embargo, el cultivo de *C. psittaci* es realizado por pocos laboratorios debido a la dificultad técnica y de seguridad.

TRATAMIENTO

Como tratamiento de elección en todas las especies se aconsejan las tetraciclinas, variando la vía y dosis de acuerdo al tipo de animal. Existe la posibilidad de que si el tratamiento no es adecuado en concentración, vía o tiempo de duración queden animales portadores.

PROFILAXIS

Se ha experimentado con bacterinas inactivadas por formol con el agregado de adyuvante oleoso, en particular en los pavos. El éxito ha sido relativo ya que al ser un mal antígeno deben inyectarse dosis repetidas. Como una complicación de su uso debemos agregar que no consigue eliminar los estados crónicos ni los portadores lo que obliga a una difícil convivencia con el agente.

Actualización del capítulo: Néstor Oscar Stanchi.

BIBLIOGRAFIA

Ando S, Suwa T, Takashima I, Hashimoto N. Kinetic Studies no the Appearance of antigens of *Chlamydia psittacci* During its Development Cycle. J of Vet Med Sci 1991; 53 (4) :669-697.

Caffarena RM, Trenchi H, Salvo MA, Baltar J, Capano F, Baraibar M. *Chlamydia psittaci* en Medicina Veterinaria y su Importancia en Salud Pública. Therios 21993; 2 (109) :230-243.

Caffarena RM, Trenchi H, Salvo MA, Baltar J, Capano F, Mattos J, Baraibar M. *Chlamydia psittaci* en Medicina Veterinaria y su Importancia en Salud Pública. Therios 1993; 22 (110): 306-320.

Calnek BW. Diseases of Poultry 9th edition Iowa State University Press, Ames Iowa, U.S.A. 1991.

Hinton DG, Shipley A, Galuin JN, Harkin JT, Brunton RA. Chlamydiosis in Workers at a Duck Farm and Processing Plant Australia. Vet J. 1993; 70 (5):174-176.

IDTSE Fs, Chlamydia and Chlamydial Disease of Cattle: A Review of the Literature. Vet 1984; 543-550.

Gilbert Greub, Didier Raoult: Parachlamydiaceae: Patógeno Emergente Potencial. Emerging Infectious Diseases 2002; 8 (6): 625-630.

National Association of State Public Health Veterinarians. Compendium of Measures to Control *Chlamydophila psittaci* (formerly *Chlamydia psittaci*) infection among humans (Psittacosis) and Pet Birds, 2004. Recuperado de: www.avma.org noviembre 2004.

Seijo AC, Carnigoi BE. Psitacosis: Un Problema de Salud Pública y de Agresión a la Fauna. Rev Argentina de Microbiologa 1994; 105 Abril-Mayo.

Storz J. Chlamydia and Chlamydia-Induced Diseases. Charles T. Thomas. Springfield, Illinois, U.S.A. 1971.

Capítulo 54

RICKETTSIAS

Alfredo C. Seijo

INTRODUCCION

Las rickettsiosis constituyen un complejo y variado conjunto de enfermedades zoonóticas distribuidas ampliamente por todo el mundo, involucrando diversas especies de reservorios vertebrados y vectores (artrópodos) y condiciones ambientales para el mantenimiento y la emergencia de las mismas. El espectro clínico varía desde fiebre indiferenciada, fiebre con exantema (papuloso, purpúrico o vesiculoso) hasta cuadros sistémicos graves.

ETIOLOGIA

Las rickettsias son bacterias adaptadas a vivir en forma intracelular estricta. A diferencia de otros patógenos intracelulares, poseen un complejo enzimático que les permite mantener un metabolismo independiente y producción propia de energía. Tampoco realizan su ciclo intracelular dentro de una vacuola. Estas y otras características relacionadas con la secuencia genómica, han conducido a la clasificación actual, que separa a organismos como *Coxiella* o *Bartonella*, antes considerados dentro de la tribu Rickettsiaceae; a la cual se le acepta, por el momento, un solo género (*Rickettsia*), con tres grupos: "Grupo Tífico", "Grupo de las Fiebres Manchadas" y "Grupo del Tifus Tsutsugamuschi o Scrub Tifus" (tifus de los matorrales), este último de clasificación incierta. Sólo el grupo de las Fiebres Manchadas tiene reconocidas más de 20 especies, de distribución mundial. Una clasificación simplificada se observa en la tabla 54-1.

Las bacterias son pequeños bacilos o cocobacilos gramnegativos, que sólo pueden cultivarse en líneas celulares o recuperarse por inoculación en animales de laboratorio. En forma indirecta, se reconocen en muestras de tejidos por inmunofluorescencia, técnicas histoquímicas o reacción en cadena de la polimerasa. Las coloraciones como Giménez y otras, se han abandonado por su baja sensibilidad.

Las rickettsias inducen la fagocitosis celular, pero luego salen del fagosoma para localizarse libremente en el citoplasma y en el caso del grupo de las fiebres manchadas, ocasionalmente en el núcleo. La replicación dentro de las células endoteliales del hospedador conduce a la vasculitis, sustrato patogénico y hallazgo anatomopatológico común a todas las enfermedades por rickettsias.

El lipopolisacárido induce serorreactividad cruzada entre los grupos y con bacterias de los géneros *Proteus, Legionella* y otros.

EPIDEMIOLOGIA Y ECOLOGIA

Las rickettsiosis son el típico grupo de enfermedades transmitidas por vectores, con una amplia gama de reservorios animales. El tifus exantemático transmitido por piojos era considerado la única enfermedad del grupo con circulación humana exclusiva, pero en los últimos años se encontró un reservorio animal del grupo de las ardillas, que la convierte también en zoonosis. En casos puntuales se ha comprobado en alguna de estas enfermedades transmisión por aerosoles y por vía parenteral.

Las garrapatas duras (familia Ixodidae) son responsables de la transmisión de la mayoría de estas enfermedades. Pulgas como *Xenopsylla cheopis* son vectores del tifus murino (*R. typhi*), piojos del cuerpo (*Pediculus humanus corporis*) del tifus exantemático (*R. prowazekii*), y diversos ácaros e incluso garrapatas "blandas" (*Argasidae)* de otras rickettsiosis. Pueden existir además de vectores específicos, otros de carácter secundario.

Las garrapatas y otros artrópodos vectores se infectan al alimentarse con sangre de los hospedadores (diversas especies de vertebrados, siendo los más importantes mamíferos). En algunos casos (garrapatas) puede mantenerse la infección en forma vertical (transovárica). El ciclo se perpetúa cuando la garrapata inocula los microorganismos (presentes en sus glándulas salivales infectadas) en el proceso de alimentación. Los estadios intermedios, larvas y ninfas, pueden actuar como vectores y en estos casos es difícil reconocer en el humano la puerta de inoculación. Las garrapatas pueden permanecer en el medio ambiente en condiciones adversas, por períodos prolongados, sin alimentación, hasta que encuentran al hospedero adecuado.

Tabla 54-1. Clasificación y características de las principales rickettsiosis

Enfermedad	Especie	Reservorio	Vector	Distribución
Grupo tífico				
Tifus exantemático	*R. prowazekii*	Hombre, ardilla	Piojo corporal	Africa, Asia, América
Enfermedad de Brill -Zinsser	*R. prowazekii*	Hombre (recidiva)	Ninguno	Mundial inmigrantes
Tifus endémico	*R. typhi*	*Rattus* spp	Pulga	Mundial
Tifus (?)	*R. felis*	Felinos	Pulga de gato	EE.UU. y otros (?)
Fiebres manchadas de				
Montañas Rocosas	*R. rickettsii*	Roedores, perros	Garrapatas	América
Del Mediterráneo	*R. conorii*	Perros, roedores	Garrapatas	Mundial (?)
Rickettsialpox	*R. akari, africae*	Roedores	Acaros Ixodes	EE.UU., Africa, Asia

La complejidad de los ciclos biológicos de las rickettsiosis depende entonces de: 1) la distribución geográfica de los hospedadores y vectores, 2) la especificidad hospedador/vector (por ej., la garrapata habitual del perro en nuestro medio, *Rhipicephalus sanguineus*, excepcionalmente se alimenta de sangre de otro hospedador incluido el hombre), 3) la existencia de varios hospedadores y/o de vectores secundarios, 4) condiciones de los ecosistemas que faciliten la supervivencia de los vectores y las posibilidades de difusión, y 5) en el caso de la enfermedad humana, la posibilidad de interponerse en el ciclo biológico. Esta circunstancia siempre es un "accidente epidemiológico", ya que el hombre es un mal hospedador para mantener ciclos naturales.

La distribución de las enfermedades rickettsiales es mundial, algunas con una característica delimitación geográfica por el tipo de reservorios y vectores involucrados. En algunas regiones deben considerarse enfermedades emergentes, mostrando en su aparición y difusión una relación estrecha con alteraciones del medio ambiente. Los viajeros a áreas que tienen rickettsiosis endémicas pueden manifestar síntomas no siempre reconocibles, si no se indaga el antecedente del viaje (enfermedad importada).

En las Américas, la mal denominada fiebre de las Montañas Rocosas (*R. rickettsii*) tiene una distribución amplia que abarca Canadá, EE.UU., la región de América Central hasta Brasil, Colombia y recientemente datos que sugieren transmisión autóctona en el Noroeste argentino. Además se conoce la circulación de otras rickettsias del grupo "fiebres manchadas". En EE.UU. la denominada rickettsial-pox o rickettsiosis varioliforme (por producir exantema vesicular) es causada por *R. akari*. En ese mismo país se ha reconocido una nueva rickettsia (*R. felis*), cuyo hospedador es el gato y el vector probable la pulga del felino. Se desconoce, por falta de estudios, su circulación en otras regiones. La fiebre botonosa o fiebre del Mediterráneo (*R. conorii*), descrita en países del sur de Europa y norte de Africa, fue recientemente comunicada en forma de brote epidémico en Uruguay.

Dentro del grupo tífico, el tifus exantemático permanece endémico en las regiones más pobres del mundo (Etiopía) y en forma esporádica en otras zonas de Africa y Asia, pero se han registrado casos aislados en los EE.UU. relacionados con su posibilidad zoonótica y la aparición en emigrantes centroeuropeos de una forma tardía (varios años) de recidiva, ante una situación de inmunodepresión: enfermedad de Brill-Zinsser. El tifus endémico o murino (por estar ligado a reservorios del género *Rattus*) es causado por *R. typhi* (antes *mooseri*). Es probable que su distribución sea universal y que no se lo diagnostique por la frecuencia de cuadros oligosintomáticos. Se conoce su circulación en las Américas, pero deben profundizarse estudios en nuestro país, para conocer la real situación epidemiológica. En las primeras décadas de este siglo fueron estudiados casos esporádicos y brotes epidémicos de tifus exantemático y endémico pero luego se discontinuaron.

En Argentina, en la década de 1990, se han confirmado casos clínicos producidos por *R. rickettsii* en la provincia de Jujuy, y recuperado material genómico de la misma especie en garrapatas *Amblyomma cajenennse*. Utilizando antígeno de *R. conorii* se encontró una seroprevalencia del 7% en población del Noroeste argentino y del 4% en habitantes de Buenos Aires. En 1994 una encuesta serológica en Jujuy arrojaba para *R. rickettsii* 4% y para *Ehrlichia chaffeensis** 14%. En el Noreste argentino las tasas de seroprevalencia fueron del 5,7% para *R. rickettsii* y del 2% para *R. prowazekii*. Como enfermedad importada se han estudiado casos de rickettsiosis varioliforme en el Hospital FJ Muñiz de Buenos Aires.

En el último decenio se han descrito nuevas especies de rickettsias, reconocido los reservorios y vectores y la patogenicidad de las mismas, por lo que se abre un interesante campo de estudio, aún no valorado.

ANATOMIA PATOLOGICA

La lesión típica es una vasculitis con proliferación de la bacteria dentro de las células endoteliales, tanto en la zona de inoculación como en las localizaciones parenquimatosas, que se producen por diseminación hematógena. El vaso afectado (capilar, arteriola o vena) es rodeado por un infiltrado de células plasmáticas, histiocitos y polimorfonucleares. En los endotelios se produce adherencia de plaquetas y se forman trombos en la microcirculación. La vasculitis por proliferación bacteriana, explica tanto las manifestaciones sistémicas como el fenómeno de escape vascular, que conduce a la extravasación plasmática, mecanismo donde además intervienen mediadores inmunológicos. No se han demostrado toxinas.

MANIFESTACIONES CLINICAS

Los tres grupos rickettsiales se han clasificado por sus características inmunogénicas, pero existe una superposición de los síntomas clínicos, por lo cual se describirán en conjunto, con las particularidades que puedan presentar cada una de las especies de rickettsias. La infección sin enfermedad asociada o cuadros clínicos oligosintomáticos, es difícil de diagnosticar, en la medida que no existan antecedentes epidemiológicos orientadores (mordedura de garrapata, permanencia en zona endémica, etc.).

Un cuadro clínico de inicio, común a la mayoría de las rickettsiosis, incluye hipertermia, mialgias, cefaleas, dolor abdominal, náuseas, vómitos y diarrea, luego de una semana (promedio) de la inoculación. Sólo será posible, aunque no constante, observar una escara de inoculación característica, cuando la mordedura se produjo por una garrapata adulta, como es el caso de las fiebres manchadas (*R. rickettsii, R. conorii* y otras). La mordedura de garrapata produce una pápula pruriginosa que evoluciona a úlcera, la cual es recubierta por una escara de color oscuro (negro), que remeda la úlcera carbunclosa. La vasculitis local producida por las rickettsias y la probable acción enzimática de la secreción salival de la garrapata, son las causas de esta lesión inicial. Por el contrario, en el grupo tifus (*R. prowazekii* y *R. typhi*) no hay escara ya que la inoculación se produce por las heces de los piojos y de las pulgas depositadas sobre el sitio de alimentación. El grupo tifus de los matorrales reconoce escara de inoculación por un ácaro.

Entre el quinto y séptimo día de iniciado el cuadro, se produce una erupción en la mayoría de los pacientes. En la infección por *R. rickettsii* es maculopapular y petequial, aparece en las palmas y plantas y evoluciona en forma centrípeta. En la fiebre botonosa (*R. conorii*), predominan las maculopápulas. El síndrome purpúrico, por el contrario, se origina en axilas y tronco y respeta palmas y plantas o tiene mayor distribución en tronco en los casos de tifus exantemático, endémico y de los matorrales. Un caso especial lo constituye la rickettsiosis con exantema vesicular (*R. akari* y *R.*

* El género *Ehrlichia* ha sido separado de *Rickettsia*. Son microorganismos intracelulares de reciente conocimiento en patología humana. *E. chaffeensis* es una zoonosis cuyo principal reservorio serían los cánidos, y los vectores, garrapatas de los géneros *Amblyomma, Dermacentor* y otros. El cuadro clínico es muy similar al descrito para las rickettsiosis con afección sistémica. Existen indicios de su circulación en la Argentina (Jujuy).

africae). Hemos tenido oportunidad de estudiar turistas provenientes de Sudáfrica, que presentaban un exantema de comienzo maculopapular, transformado en vesicular dentro de las 48 horas, distribuido en tronco, cuero cabelludo y extremidades, incluyendo palmas y plantas y acompañado por un enantema también vesicular. El cuadro clínico es difícil de diferenciar de la varicela. La presencia de la escara de inoculación fue un elemento muy valioso en el diagnóstico. La enfermedad es autolimitada, sin repercusión sistémica.

Los tifus exantemático y endémico, las fiebres manchadas de las Rocosas y la botonosa o del Mediterráneo y la fiebre de los matorrales presentan además compromiso multisistémico de variada gravedad. Son frecuentes las manifestaciones neurológicas: meningitis a líquido claro, signos neurológicos focales y estupor y confusión (síntomas que eran conocidos como síndrome tífico: debidos a fiebre tifoidea, psitacosis, rickettsiosis, etc.). Existe una disfunción hepática de tipo "hígado séptico", insuficiencia renal ya sea de origen prerrenal hasta por necrosis tubular aguda, miocarditis, neumonía alveolointersticial diseminada, y signos de hipovolemia por fenómeno de escape capilar, similar a lo que acontece en enfermedades por hantavirus, arenavirus y virus dengue. Como en todas las enfermedades por vasculitis, la plaquetopenia es frecuente y su magnitud indice de gravedad.

Una secuencia clínica de hipertermia, cefaleas, mialgias, síntomas abdominales (en ausencia de afección de vía aérea superior), seguida de una erupción maculopapular y petequial con plaquetopenia y signos clínicos y de laboratorio de agresión pluriparenquimatosa son de sospecha de enfermedad rickettsial.

Los diagnósticos diferenciales incluyen: leptospirosis, meningococemia, fiebre tifoidea, secundarismo luético, mononucleosis, neumonías atípicas, erliquiosis, enfermedad por hantavirus (tanto fiebre hemorrágica con síndrome renal como síndrome pulmonar), dengue y fiebre amarilla, fiebre hemorrágica por arenavirus, enfermedades exantemáticas como sarampión, septicemias, y entre las no infecciosas: vasculitis como la púrpura de Schöenlein-Henoch, la púrpura trombótica trombocitopénica y la púrpura debida a colagenopatías, plaquetopenias inducidas por fármacos, púrpura trombocitopénica idiopática y otros.

Las fiebres manchadas en Argentina

De acuerdo a la experiencia recogida hasta el momento se han diagnosticado casos de fiebre manchada por *R. rickettsii* (o una rickettsia con similitud genómica) en las provincias de Salta (departamento Hanta) y Jujuy. La distribución anual coincide con los períodos de máxima actividad de las garrapatas: primavera y verano, con la posibilidad de agrupamientos de casos en grupos familiares o personas expuestas a la misma fuente. En 2004 se confirmaron casos en Bolivia, Brasil notifica alrededor de 1000 casos anuales y en Uruguay se han estudiado casos de fiebre botonosa.

Los casos corresponden a pacientes sin antecedentes previos de salud que inician la enfermedad con fiebre, mialgias, cefaleas, dolor abdominal. Esta fase prodrómica dura de 3 a 5 días y característicamente no existen referencias a manifestaciones catarrales de la vía aérea superior. Algunos pacientes manifiestan intensas cefaleas, fotofobia y rigidez de nuca. El estudio del líquido cefalorraquídeo (LCR) puede ser normal o presentar características de "meningitis aséptica". No se produce escara de inoculación. La fase de estado se anuncia por la aparición de petequias, púrpura o hematomas. La erupción puede estar precedida por un exantema maculopapular que se transforma en purpúrico, con distribución centrífuga. Hemos observado hematomas distales en los pulpejos de los dedos en forma bilateral y simétrica. En ese momento la enfermedad se confunde con la meningococemia. En la evolución pueden observarse edemas generalizados, extravasación de plasma en pulmón, ictericia, insuficiencia renal y muerte por falla multiorgánica. La hiponatremia es frecuente. El hemograma y la eritrosedimentación pueden ser no característicos, pero es constante la trombocitopenia. El tratamiento precoz con doxiciclina o cloranfenicol revierte rápidamente el cuadro. El diagnóstico con la meningococemia es clínico: ausencia en esta última de la fase prodrómica con curso evolutivo muy grave y rápido una vez instalada la púrpura. Si existe compromiso meningeo el LCR es purulento con hipoglucorraquia, aumento de las proteínas y pleocitorraquia debida a neutrófilos. De cualquier forma, ante la duda se realiza tratamiento empírico para ambas entidades, administrando penicilina más doxiciclina o cloranfenicol. Hasta el momento la letalidad es del 50%.

Los casos reconocidos corresponden a una púrpura febril precedida de fase prodrómica con o sin síntomas de agresión a otros órganos. Es probable que se produzcan formas inaparentes o casos muy graves de falla multiorgánica sin púrpura o manifestaciones hemorrágicas.

Esta enfermedad constituye uno de los próximos desafíos para la salud pública de nuestro país

DIAGNOSTICO

Hasta hace unas décadas se utilizaba la reacción de Weil-Felix para el diagnóstico de los tifus exantemático y endémico. La prueba (aglutinación) se basa en la utilización de antígenos de *Proteus* OX19 y OX2, que tienen reactividad cruzada con las rickettsias. Es de baja especificidad y sensibilidad. Actualmente se utiliza la inmunofluorescencia indirecta con antígenos específicos de las especies más importantes. El inmunodiagnóstico es tardío, ya que implica demostrar seroconversión y requiere una valoración precisa por la serorreactividad interespecies, con otros géneros microbianos y en presencia de enfermedades no infecciosas. Como el aislamiento requiere laboratorios de alta seguridad y cierta complejidad (cultivo celular), se han estandarizado técnicas rápidas para demostrar el agente en material biópsico, especialmente en raspados de las lesiones dérmicas: inmunofluorescencia directa, técnicas histoquímicas y reacción en cadena de la polimerasa.

TRATAMIENTO

Se utiliza la doxiciclina en dosis inicial de 200 mg cada 12 horas, y luego 100 mg 2 veces en el día, por un total de 7 a 10 días según el cuadro clínico. Son alternativas: otras tetraciclinas (en general no disponibles), el cloranfenicol, la rifampicina y las nuevas quinolonas. No se utilizan macrólidos. Los aminoglucósidos, betalactámicos y cotrimoxazol no son de utilidad.

PREVENCION Y PROFILAXIS

De acuerdo a la ecología de cada enfermedad. En el grupo tífico se relaciona con las condiciones de higiene personal, eliminación de roedores, desinsectización. En las fiebres manchadas evitar el contacto con garrapatas utilizando ropas adecuadas, situación difícil de cumplir en áreas calurosas cuando se realizan trabajos rurales. Con excepción de una vacuna para tifus exantemático, en el resto de las rickettsiosis no se utiliza inmunoprevención.

BIBLIOGRAFIA

Cernigoi B, Seijo A, Deodato B, Curcio D, Espinosa B. Seroprevalencia de Anticuerpos Anti-*Rickettsia* en Dos Poblaciones de Argentina. 2° Congreso Argentino de Zoonosis y 1° Argentino y Latinoamericano de Enfermedades Emergentes. AAZ. Bs As, abril 1998. Libro de Resúmenes: A-21 (pag. 43).

Guglielmone AA, Mangold AJ, Viñabal AE. Ticks (Ixodidae) parasiting humans in four provinces of north-westerns. Ann Trop Med Parasitol. 1991; 85:539-42.

Raoult D, Roux B. Rickettsiosis as Paradigms of New or Emerging Infectious Diseases. Clin Microb Rev. 1997; 10 (4): 694-719.

Ripoll CM, Remondegui CE, Ordóñez G y col. Evidence of rickettsial spotted fever and ehrlichial infections in a subtropical territory of Jujuy, Argentina. Am J Trop Med Hig. 1999; 61(2):350-4.

Terisotto S, Raoult D, Stein A. Seroprevalencia de rickettsiosis en el noreste argentino 2° Congreso Argentino de Zoonosis y 1° Argentino y Latinoamericano de Enfermedades Emergentes. AAZ. Bs As, abril 1998. Libro de Resúmenes: A-17 (pag. 39).

Vigna L, Curcio D, Cernigoi B, Deodato B, Espinosa M, Seijo A. Rickettsiosis importada: a propósito de tres casos. 2° Congreso Argentino de Zoonosis y 1° Argentino y Latinoamericano de Enfermedades Emergentes. AAZ. Bs As, abril 1998. Libro de Resúmenes: A-24(pag. 46).

Capítulo 55

COXIELLA

Alfredo C. Seijo

ETIOLOGIA

Coxiella burnetii (única especie del género *Coxiella)*, considerada hasta hace poco tiempo como perteneciente a la familia Rickettsiaceae, es ahora incluida dentro del grupo de las gamma protobacterias con mayor afinidad por homología genética a bacterias como *Legionella*. Posee un ciclo de vida intracelular, que se inicia cuando ingresa a las células por un mecanismo pasivo de membrana (fagosoma). El proceso de replicación intracelular implica la formación de un fagolisosoma, donde realiza su ciclo, en un medio cuyo pH oscila entre 3 y 4, y con enzimas líticas que impedirían la sobrevida de otro patógeno. Esta característica, sumada a su alta resistencia en diversas condiciones en el medio exterior, explica algunas de las particularidades de la epidemiología de la fiebre Q.

Presenta dos formas de crecimiento, indistinguibles morfológicamente, pero con distinta composición del lipopolisacárido de la pared bacteriana. La fase I (virulenta) se relaciona con su estado natural y se la recupera de materiales infectados; por el contrario, la fase II es avirulenta y adaptada a sucesivos pasajes por cultivos celulares o embrión de pollo. *C. burnetii* realiza, además de la replicación por fisión binaria, una forma de replicación esporógena, con restricción del soma bacteriano, que le permite la supervivencia en condiciones muy adversas.

Posee tres plásmidos, asociados a la virulencia y a la capacidad de producir determinadas lesiones histopatológicas. Hay identificadas, hasta el momento, seis cepas, de las cuales cinco son patógenas para el hombre o los animales. El microorganismo muestra un patrón de alta patogenicidad (una sola unidad es capaz de producir enfermedad), pero con una virulencia en general baja, de allí que predominen las infecciones subclínicas. Eliminada al medio exterior sobrevive en condiciones adversas por tiempos prolongados: varios meses en carne congelada, en heces de garrapatas y materiales biológicos desecados; semanas en leche no pasteurizada o sus derivados; resistiendo condiciones fisicoquímicas inusuales para una bacteria.

EPIDEMIOLOGIA

No es una enfermedad vectorial como se sospechaba originalmente, cuando se la asoció a garrapatas u otros insectos, hecho habitual en el caso de las rickettsiosis. La forma de transmisión se opera a través de aerosoles. Es un patógeno ubicuo, que se ha recuperado de varias especies de mamíferos, aves, peces y ácaros, incluidas las garrapatas. En la infección humana interesan principalmente los animales domésticos y el ganado de cría. Como zoonosis urbana tiene su principal reservorio en las gatas preñadas que eliminan la bacteria por la placenta. La cría puede nacer infectada en forma asintomática y ser fuente de infección para el hombre. Al igual que en el ganado ovino, caprino y bovino, que son los más importantes como productores de brotes epidémicos humanos, es improbable que se manifieste clínicamente o que produzca alteraciones en la preñez o en las crías.

Los microorganismos eliminados a través de distintas secreciones y excreciones animales se vehiculizan en forma de aerosoles, alcanzando de esta manera la vía aérea, donde, luego de una primera fase de replicación en los linfáticos regionales se disemina por vía linfohemática. La vía aérea está implicada en los casos de ingesta de alimentos contaminados.

La enfermedad ha sido descrita en todo el mundo. En América la mayoría de los países han tenido registro de casos clínicos o evidencias de infección en los animales. Uruguay es uno de los países americanos que, tradicionalmente, comunica brotes epidémicos, relacionados con profesiones de riesgo como veterinarios, empleados de frigoríficos o peones rurales. En la Argentina, los primeros casos humanos registrados en la literatura médica datan de la década de 1960, pero su estudio no ha merecido la importancia debida, motivo por el cual se la considera, erróneamente, como "exótica". Un estudio de seroprevalencia realizado en distintas poblaciones de la Argentina, mostró una serorreactividad alta (tabla 55-1). El mismo grupo de estudio ha comunicado casos clínicos autóctonos (neumonías y hepatitis) en pacientes residentes en el Area Metropolitana Buenos Aires.

La importación de animales de áreas endémicas constituye un riesgo para la salud pública, como aconteció en 1997 en la provincia de Entre Ríos (tabla 55-2). Cabras lecheras importadas del Uruguay fueron la causa de un brote humano de fiebre Q. Los animales no manifestaron enfermedad al ingreso, ni se observó posteriormente abortos o morbimortalidad en la cría. El estado sanitario del establecimiento era óptimo, con los controles sanitarios adecuados, lo que demuestra el carácter solapado con el cual puede presentarse la enfermedad.

La transmisión de fiebre Q a partir de pariciones programadas de cabras puede constituir un riesgo profesional en el futuro, debido al aumento de los tambos caprinos, especialmente en regiones no tradicionales para este tipo de ganado como es la pampa húmeda.

En el brote estudiado en Entre Ríos hubo una clara relación de la enfermedad humana con las pariciones. Es probable que uno de los pacientes haya sido infectado por los aerosoles provenientes de las placentas estando alejado del lugar, lo cual habla de la dispersión del microorganismo por efecto de corrientes aéreas.

Recientemente (2003) se produjo un brote de fiebre Q en fuerzas de la Gendarmería Nacional destinadas en el exterior (Ex-Yugoslavia) también por contacto alejado con un rebaño de cabras.

MANIFESTACIONES CLINICAS

Pueden distinguirse formas clínicas agudas o crónicas. El rango de manifestaciones agudas es variable: formas inaparentes (infección sin enfermedad), síndrome febril inespecífico, neumonía atípica con o sin agresión hepática, hepatitis y cuadros de afectación neurológica o hematológica. Existe un correlato entre el tipo de plásmido y la evolución de la enfermedad. Así el plás-

Tabla 55-1. Estudio de seroprevalencia para fiebre Q en distintas poblaciones de la Argentina (1992-94. Zoonosis, Hospital FJ Muñiz).

Población estudiada	N° de muestras	Positivos (%)
Personal de frigorífico	104	19,1
Trabajadores rurales de Bs. As.	71	16,5
Trabajadores rurales del NOA	167	26,8
Personal del Zoológico de Bs. As.	44	36
Neumonías atípicas	125	13,6

mido Q_pH1 se asocia a enfermedad aguda (neumonía, hepatitis) y el Q_pRS a enfermedad crónica como la endocarditis.

La neumonía comienza con hipertermia, cefaleas (que son muy características), sudoración, mialgias y artralgias. Los primeros días puede confundirse con una "virosis respiratoria", sin embargo no se registran síntomas de coriza. La sintomatología respiratoria consiste en tos, con o sin expectoración, dolor torácico inspiratorio, muy rara vez esputo hemoptoico o disnea. En sujetos con patología pulmonar previa o inmunodepresión, la neumonía puede adquirir carácter grave. La radiografía de tórax puede mostrar infiltrados pulmonares alveolointersticiales uni o bilaterales y rara vez derrame pleural. Los diagnósticos diferenciales incluyen brucelosis, leptospirosis, psitacosis, neumonía atípica por *Chlamydia pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae*, neumonías virales y todo el espectro de las neumonías extrahospitalarias. En la mayoría de los casos existen datos de agresión hepática como ictericia o sólo alteración de los parámetros bioquímicos en la forma de colestasis intrahepática. La evolución es en general satisfactoria, aun sin tratamiento. La administración de doxiciclina, macrólidos o quinolonas produce mejoría de los síntomas generales y respiratorios, y son especialmente útiles en las formas graves o en inmunodeprimidos.

La agresión hepática puede dominar el cuadro clínico y ser la única manifestación de enfermedad. Presenta tres modalidades: un patrón histológico y bioquímico similar a las hepatitis virales, con las que debe realizarse el diagnóstico diferencial; una elevación moderada de las transaminasas con discreta o nula elevación de la bilirrubina directa (colestasis intrahepática del tipo "hígado de sepsis") en general acompañando la neumonía; o la formación de granulomas con una histopatología característica ("granuloma en rosquilla"), en cuyo caso es diagnóstico diferencial con otras causas de granulomatosis hepática: brucelosis, tuberculosis, citomegalovirus, linfomas, etc.

La endocarditis subaguda cursa con esplenomegalia y escasa "sintomatología infecciosa". Se debe sospechar frente a una endocarditis con hemocultivos negativos, generalmente en sujetos con prótesis valvular o patología endocárdica previa. El diagnóstico de esta forma clínica ofrece dificultades y se apoya, como en los cuadros anteriores, en la serología. La respuesta humoral, en la endocarditis, se caracteriza por anticuerpos antifase I. El tratamiento es prolongado, como mínimo 2 años, combinando doxiciclina con cotrimoxazol o rifampicina o quinolonas. El control del mismo reside en evaluar en forma periódica la función cardíaca, los títulos de anticuerpos y los indicadores inespecíficos de inflamación. Puede ser necesario el recambio valvular. No hay registros de endocarditis debida a *C. burnetii* en Argentina, probablemente por falta de su estudio.

Otras manifestaciones atribuidas a la fiebre Q incluyen: alteraciones neurológicas como "meningitis aséptica", polineuritis, diversas secuelas posmeningitis; alteraciones hematológicas como anemia hemolítica, trombocitopenia, síndrome mononucleótico, etc.; osteomielitis y una posible pero no demostrada asociación con la enfermedad de Kawasaki.

DIAGNOSTICO

Los intentos de aislamiento se ven dificultados por la necesidad de contar con laboratorios de alta seguridad biológica. El diagnóstico se apoya en la demostración de anticuerpos, en general contra antígenos de fase II. La demostración de seroconversión

Tabla 55-2. Brote de fiebre Q en un tambo de cabras de Gualeguaychú, Entre Ríos (1997. Zoonosis, Htal. FJ Muñiz)

Paciente N°/sexo/edad	Datos clínicos	Epidemiología	Diagnóstico*
1. M 45	Neumonía, hepatitis	Veterinario (RP)	Positivo
2. M 44	Neumonía	Dueño (RP)	Positivo
3. M 11	Neumonía	Hijo veterinario. (RP)	Positivo
4. M 26	Neumonía	Peón (RP)	Positivo
5. M 35	Neumonía	Peón (RP)	Positivo
6. M 27	Síndrome febril	Peón (RP)	Positivo
7. F 19	Asintomático	Manufactura (no RP)	Negativo
8. F 15	Asintomático	Manufactura (no RP)	Negativo
9. M 14	Asintomático	Hijo dueño (RP)	Negativo
10. M 30	Neumonía	Ocasional (RP)	No estudiado
11. M 32	Neumonía	Ocasional (RP)	No estudiado

M: masculino; F: femenino, RP: relacionado con las pariciones.
*Inmunofluorescencia indirecta con antígeno en fase II. Conversión serológica.

es necesaria, dado que pueden encontrarse anticuerpos residuales por infección pasada (incluso de clase IgM), o inespecíficos, por reactividad cruzada con otros patógenos como *Legionella* spp El empleo de técnicas de biología molecular podrá, en un futuro próximo, solucionar algunos aspectos del diagnóstico. Como prueba serológica más específica, se utiliza la inmunofluorescencia indirecta, ya que la clásica fijación de complemento puede mostrar reactividad inespecífica, debido a que el lipopolisacárido que utiliza es común a otros microorganismos.

TRATAMIENTO

En las formas agudas se administra doxiciclina a razón de 200 mg/día. Como alternativa se puede utilizar rifampicina o una quinolona. La endocarditis requiere un tratamiento prolongado y con antibióticos combinados, como ya se señaló.

PROFILAXIS

Existe una vacuna de uso humano y otra animal, ambas efectivas, pero no disponibles en la Argentina. La vacuna humana es precedida de un test cutáneo para comprobar inmunidad previa. Las medidas de prevención incluyen protección para aerosoles (barbijos, máscaras con filtros tipo HEPA, protectores oculares) en aquellos lugares donde puede haber alta concentración de microorganismos como recintos de parición, tambos, corrales, etc. En los establecimientos de cría intensiva (tambos caprinos) debe asegurarse una correcta eliminación de placentas y loquios y mantener medidas estrictas de bioseguridad en el momento de las pariciones programadas.

BIBLIOGRAFIA

Raoult D, Etienne J, Massip P, et al. Q fever endocarditis in the south of France. J Infect Dis. 1987; 155: 570-3.

Reimer LG. Q fever. Clin Microb Rev. 1993; 6(3): 193-8.

Seijo A, Cernigoi B. Relevamiento Serológico en Población de Riesgo de Infección por *Coxiella burnetii* en la República Argentina. Presentado en el 1er Congreso Interamericano de Infectología y II Simposio Internacional de Infectología Pediátrica. Córdoba, Mayo de 1994.

Seijo A, Cernigoi B. Serorreactividad Cruzada entre *Coxiella burnetii* y *Legionella* sp. Presentado en el 1er Congreso Argentino y 1er Congreso Latinoamericano de Zoonosis (AAZ). Buenos Aires, Agosto de 1995.

Seijo A, Di Sandro , Cernigoi B y col. Seroprevalencia para Anticuerpos anti-*Coxiella burnetii* en Veterinarios de la Ciudad de Rio Cuarto. Presentado en el 1er Congreso Argentino y 1er Congreso Latinoamericano de Zoonosis (AAZ). Buenos Aires, Agosto de 1995.

Seijo A, Ganem J, Cernigoi B: Forma Respiratoria Grave de la Fiebre Q, a propósito de un caso. Presentado en las IV Jornadas de la Asociación Argentina de Zoonosis (AAZ) y I Jornadas de Zoonosis Bacterianas y Parasitarias de la Plata. 3 al 5 de Noviembre de 1994.

Seijo A, González R, Cernigoi B y col. Distrés Respiratorio del Adulto por *Coxiella burnetii*. Presentado en el VII Congreso Argentino de Microbiología (AAM). Buenos Aires, Mayo de 1995.

Seijo A, Rodríguez Riamondo M, Curcio D, Cerigoi B. Primer caso de Hepatitis por *Coxiella burnetii* (fiebre Q) comunicado en Argentina. Revista Argentina de Infectología. 2000, 13 (1): 3-5.

Somma Moreira RE, Caffarena MR, Perez G, Somma Saldias S, Monteiro M. Fiebre Q en Uruguay. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1987; 29: 168-73.

Stein A, Raoult D. Detection of *C. burnetii* by amplification using polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1992; 30: 2462-6.

NOCARDIA

Eleatrice María de las Mercedes Gatti

INTRODUCCION

Es un actinomiceto aerobio, telúrico, que se encuentra ampliamente distribuido en ecosistemas acuáticos y terrestres de todo el mundo. Produce infecciones localizadas o diseminadas en el hombre y los animales. Los cuadros más frecuentes son mastitis en bovinos, ocasionalmente queratitis, procesos pulmonares de evolución aguda o crónica en caninos, lesiones granulomatosas crónicas en caninos, felinos, aves y peces, resultando raras las infecciones en equinos, ovinos y porcinos. *Nocardia asteroides* es el agente causal más frecuente, pero también hay casos producidos por *N. brasiliensis* y *N. otitidiscaviarum* (anteriormente *N. caviae*). Los alimentos pueden contaminarse con esta bacteria por lo que los cultivos gástricos no resultan muestras apropiadas para aislamiento del agente en individuos afectados.

EPIDEMIOLOGIA

Las infecciones por este agente tienen distribución universal, sin la limitación geográfica que pueden sugerir los nombres de sus especies. No resulta frecuente el contagio entre humano y animal o de los animales en forma directa al hombre, ocurriendo en tal caso pasaje de animal a animal mediante vectores mecánicos. Puede aislarse de las vías respiratorias en individuos asintomáticos resultando esta vía la puerta de entrada más frecuente por inhalación de polvo contaminado. Se ha aislado *N. asteroides* en lesiones granulomatosas en carne bovina para consumo; *N. asteroides* y *N. brasiliensis* en mastitis clínica y subclínica provocando pérdidas económicas con el consecuente riesgo para la salud pública, ya que eliminada la bacteria por la leche, por su termotolerancia, puede resistir los procedimientos de pasteurización usualmente empleados (pasteurización lenta 65 °C en 30 min - pasteurización rápida 75 °C en 20 seg).

La caída de la inmunidad mediada por células y de la capacidad fagocitaria y lítica de los neutrófilos por alguna enfermedad como infecciones virales (moquillo canino, etc.), neoplasias, tratamiento con corticoides, etc. predisponen a la aparición de nocardiosis sintomática. Las formas linfangíticas comprometen piel, mucosas y submucosas; se presentan a consecuencia de mordeduras, inoculación cutánea con espinas o restos vegetales.

CLASIFICACION

Los actinomicetos aerobios de importancia clínica pueden clasificarse según sus características en grupo nocardiforme: Gen. *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Oerskovia*; grupo de los estreptomicetos: Gen. *Streptomyces*; grupo de los maduromycetos: Gen. *Actinomadura*; grupo de los termomonos pora: Gen. *Nocardipsis*; grupo de los esporangios loculados: *Dermatophylus*.

El género *Nocardia* pertenece a la familia Nocardiaceae, del orden Actinomycetales, del phylum Schizomycota. Son bacterias aerobias, grampositivas, acidorresistentes (su pared celular posee un ácido micólico parecido a las micobacterias), presentan formas micelíales filamentosas que se fragmentan en elementos cocoides o bacilares.

MORFOLOGIA Y BIOLOGIA

Es una bacteria aerobia obligada, filamentosa y ramificada, inmóvil, no esporulada, no capsulada, que produce un micelio que se fragmenta en formas cocoides o bacilares, con citología procariota. A diferencia de los hongos verdaderos que poseen citología eucariota, estas bacterias presentan un diámetro estrecho de 0,5 a 1,2 µm. Son grampositivas, aunque pueden teñirse en forma arrosariada y variable. Presentan acidorresistencia "parcial" utilizándose disolvente acuoso acidificado para la decoloración (según la técnica de Kinyoun modificada, decoloración con ácido inorgánico en baja concentración: ácido sulfúrico al 1%/ácido clorhídrico al 3%) a diferencia de *Mycobacterium* "intensamente ácido-alcohol resistente" donde se utiliza disolvente orgánico acidificado (alcohol/ácido clorhídrico) y *Streptomyces* que no presenta esta característica tintorial.

Desarrollan a 37 °C como temperatura óptima, en diversos medios de cultivo ordinarios, tales como agar sangre libre de antibióticos donde no son hemolíticas, agar infusión cerebro- corazón, agar glucosa/dextrosa de Sabouraud (estreptomicina, penicilina y cloranfenicol resultan inhibidores), agar caldo glicerinado al 5%, medio de Lowenstein-Jensen, etc. Puede aislarse de muestras colonizadas utilizando Thayer Martin modificado; todas las nocardias aprovechan la parafina como única fuente de carbono por lo que desarrollan en papeles o varillas parafinadas (en caldo Czapeck sin sacarosa) resultando un medio selectivo.

El tiempo de incubación es 4 a 6 semanas, las colonias se hacen visibles entre los 4 y 10 días. Son pequeñas, duras, adherentes, secas, yesosas, irregulares, confluentes, de superficie pulverulenta, muestran la gama de naranja-amarillo-coral. Los cultivos desprenden un característico olor a ozono (olor a tierra recién removida/olor penetrante a sótano mohoso). En los medios líquidos producen películas plegadas, presentándose microscópicamente como filamentos finos, y ramificados que se segmentan, de 1 µm diámetro y aspecto granuloso.

Las especies de *Nocardia* y de otros actinomicetos pueden identificarse presuntivamente en un laboratorio de rutina mediante las pruebas de catalasa, reducción de nitratos y urea (en general positivas en todas las *Nocardia*) así como hemólisis, fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa, y producción de H_2S a partir del TSI (negativa en todas las especies de *Nocardia*).

Para tipificar especies resultan útiles las pruebas de licuefacción de la gelatina, hidrólisis de la leche, así como la inoculación de placas de agar caseína, agar xantina y agar tirosina, que se incuban hasta 2 semanas a 30 °C observándose aclaramiento del medio alrededor de las colonias en caso de hidrólisis (prueba positiva) de alguno de los sustratos mencionados.

Cuando se requiere una tipificación definitiva en protocolos de investigación o taxonomía, se recurre a pruebas quimiotaxonómicas como el estudio de la composición lipídica de la pared celular mediante la técnica de cromatografía en capa fina. La pared celular de todos los actinomicetos contiene glucosamina, ácido

murámico, ácido glutámico y alanina; *Nocardia* tiene una pared celular tipo IV donde se agregan los siguientes componentes: ácido mesodiaminopimético (DAP), arabinosa y galactosa.

DIAGNOSTICO

Para el estudio microbiológico, las muestras deben remitirse en recipientes estériles (frasco colector, tubo, etc.) considerando volúmenes adecuados para examen directo y cultivo. En el transporte debe evitarse la desecación del material, utilizando la conservación a 4 °C ante alguna demora, dado que la proliferación más rápida de otros microorganismos presentes en muestras normalmente colonizadas imposibilita el aislamiento de nocardias. Las muestras respiratorias deben ser frescas al igual que las de raspado de úlceras, biopsias, pus y exudados, etc. El material no contaminado como lo es el líquido pleural, sangre, líquido cefalorraquídeo, y punción-aspiración de abscesos cerrados, tiene gran valor diagnóstico ya que puede aislarse nocardia con facilidad. Especialmente en el material es muy importante la valoración macroscópica de la muestra para categorizar la presencia de gránulos así como su tamaño, forma, consistencia y color. El examen microscópico de las muestras puede hacerse mediante cortes histopatológicos coloreados con metenamina-plata de Grocott, no resultando útil hematoxilina-eosina o más sencillamente mediante preparados teñidos con la técnica de Kinyoun modificada o Gram-Kopeloff.

Para cultivos se utilizan medios sin antibióticos a 37 °C como temperatura ideal de incubación. Las temperaturas superiores a 43-45 °C (para *N. asteroides*, *N. otitidiscaviae*) así como la técnica de cultivo con varilla parafinada resultan recursos selectivos en casos de muestras contaminadas por otras bacterias.

TRATAMIENTO

Las sulfonamidas (sulfadiacinas, sulfisoxazol) o la combinación timetoprima-sulfametoxazol son los fármacos de elección. En ensayos clínicos ha dado buenos resultados el empleo de amikacina en la fase inicial del tratamiento, así como también la minociclina. En las manifestaciones cutáneas abscedadas, el drenaje de las lesiones y el desbridamiento quirúrgico resultan paliativos. No hay tratamiento apropiado para las mastitis nocárdicas.

PROFILAXIS

Antes de la administración antibiótica, dada la frecuencia de cepas resistentes a los quimioterápicos, deben realizarse pruebas de susceptibilidad.

BIBLIOGRAFIA

Beneke ES, Rogers AL. Medical mycology manual. Burgess Publishing Company, Minneapolis. Estados Unidos, 1970.

Felice GA. Nocardiosis. In: Sarosi G, Davies St. Fungal Diseases of the lung. pp. 231-250, Grune & Straton Inc. Orlando, U.S.A., 1986.

King JM. Hepatic nocardiosis. Veterinary medicine 87 (3): 186. 1992.

Kurup PV, Randhawa HS, Lupta NP. Nocardiosis. A review. Mycopathology 1970; 40: 194-219.

Lerner PH. Nocardia species. In: Mandell GL, Douglas G,Bennett J. Principles and practice of Infections Diseases. Third Edition, pp. 1926-1932. Churchill Levingstone, New York, 1989.

Orchard VA. Norcadial infections of animals in New Zeland, 1976-78. New Zealand Vet J 1979, 27: 159-160.

Organización Panamericana de la Salud. Asociación de VIH y tuberculosis: guía técnica. Bol Of Sanit Panam. 1993; 115 (4): 356-369.

Osiyemi TI, Okewole PA, Dawlil B, Alli-balogun RAO. Nocardiosis in a Friesian cow. Bull Anim Hlth Prod Afr. 1983, 3.3, 23-24.

Oyeklinle MA, Ojo MO. Bovine cutaneous nocardiosis in western Nigeria - the aerobic bacterial flora of its lesion. Bull Anim Hlth Prod Afr. 1988, 36: 320-323.

Pellerin JL, Bodin G, Raiel Balhaa G, Lefort T. La Nocardiose mammaire bovine. Revue Med Vet 1987, 138 (11): 913-925.

Rubinstein P, Negroni R. Nocardiosis. En: Rubinstein P, Negroni R. Micosis broncopulmonares del adulto y del niño. 2° edición. pp. 381-392, Editorial Beta, Buenos Aires 1981.

PARTE III
VIROLOGIA

Capítulo 57

ADENOVIRUS

Irene Lager

INTRODUCCION

Los adenovirus (ADV) causan con frecuencia infecciones del aparato respiratorio superior (resfríos) y también otros tipos de infecciones como gastroenteritis, conjuntivitis, cistitis y sarpullidos, dependiendo del serotipo. Los síntomas de la enfermedad respiratoria causados por la infección de ADV pueden pasar del síndrome de resfriado común a una neumonía, tos perruna y bronquitis. Los pacientes con sistemas inmunes comprometidos son especialmente susceptibles a complicaciones graves de la infección por ADV. La enfermedad respiratoria aguda (ERA), primero reconocida entre reclutas militares durante la Segunda Guerra Mundial, puede ser causada por infección con ADV durante condiciones de estrés y hacinamiento.

Los ADV fueron aislados por primera vez en 1953 por investigadores que trataban de establecer líneas celulares de adenoides extraídas de niños y de soldados con fiebre.

En 1962, algunos ADV demostraron capacidad de inducir tumores en roedores, esto causó temor pero esta propiedad parece estar relacionada a infecciones abortivas y nunca se vio en humanos.

Sus características más importantes son:

- Mundialmente distribuidos, infectando aves, mamíferos (incluyendo al hombre), anfibios y reptiles.
- Pueden producir infección latente en tejidos linfoideos capaces de reactivarse.
- Algunos tipos tienen potencial oncogénico.

Cuando se investigó el genoma y la expresión genómica de los ADV se desarrollaron numerosas técnicas que luego fueron usadas con otros virus, es decir que este virus es un importante modelo para entender muchos otros.

EPIDEMIOLOGIA

Los ADV son de distribución mundial. Con pocas excepciones, los serotipos humanos no son patógenos para los animales y los ADV animales son sólo patógenos para la especie de origen.

Hay por lo menos 49 serotipos de ADV humanos que fueron clasificados en subgrupos de acuerdo a varias características, incluida su capacidad oncogénica en ratón lactante.

Aunque las características epidemiológicas de los ADV varían según el tipo, todos son transmitidos mediante el contacto directo, la transmisión fecal-oral, y ocasionalmente mediante transmisión por agua. Algunos tipos son capaces de establecer infecciones persistentes y asintomáticas en las amígdalas, adenoides e intestinos de hospedadores infectados, y el virus puede ser eliminado durante meses o años. Se ha podido demostrar que algunos ADV (como los serotipos 1, 2, 5 y 6 humanos) son endémicos en partes del mundo donde han sido estudiados, y la infección es adquirida en la niñez. Otros tipos causan infección esporádica o brotes ocasionales; por ejemplo, la queratoconjuntivitis epidémica se asocia con los ADV de serotipos 8, 19 y 37. Epidemias de enfermedad febril con conjuntivitis son asociadas con la transmisión por agua de algunos tipos de ADV, a menudo centradas alrededor de piscinas inadecuadamente clorinadas y pequeños lagos. Los ADV entéricos 40 y 41 causan gastroenteritis, por lo usual en niños. Para algunos serotipos de ADV, el espectro clínico de enfermedad asociada con infección varía dependiendo del sitio; por ejemplo, la infección con ADV 7 adquirida por vía de inhalación se vincula con enfermedad grave del tracto respiratorio bajo, mientras que la transmisión oral del mismo virus típicamente causa enfermedad leve, o no causa noxa alguna. Los brotes de enfermedad respiratoria asociada al ADV son más frecuentes al final del invierno, en la primavera y al principio del verano; sin embargo, las infecciones por ADV pueden ocurrir en cualquier temporada del año.

Los ADV más importantes en medicina veterinaria son los ADV caninos 1 y 2 que causan hepatitis y laringotraqueítis respectivamente. En equinos se han identificado dos serotipos que normalmente no producen enfermedad primaria. Una neumonía fatal y progresiva que afectó a yeguas de raza Arabe fue atribuida a un ADV equino.

La mayoría de los ADV aviares causan infecciones intestinales no patogénicas pero pueden contaminar vacunas obtenidas de huevos. El ADV aviar 127 que replica en el oviducto causa el síndrome "caída de postura", hoy controlado con vacunación.

En la Argentina existen informes de la implicancia de ADV humanos en cuadros respiratorios y entéricos, especialmente en niños. La Sociedad de Pediatría considera que es el segundo agente etiológico de las gripes luego del virus respiratorio sincicial. En cuanto a los ADV de interés veterinario, tanto el ADV canino-1 como el ADV aviar causante del síndrome de caída de postura, si bien presentes en nuestro país, son controlados con vacunación.

Relevamientos serológicos han puesto en evidencia la circulación de ADV bovinos en nuestro país pero en general sin correlación con cuadros patológicos.

CLASIFICACION

Familia: Adenoviridae.

Géneros:

Aviadenovirus: Adenovirus aviares A, B, C, D y E.

Mastadenovirus: Adenovirus bovino A, B y C, adenovirus canino, adenovirus equino A y B, adenovirus humanos A, B, C, D, E y F, adenovirus murinos, ovinos, porcinos A, B y C y de los simios.

Atadenovirus: adenovirus bovinos D y E, adenovirus del pato, adenovirus de serpientes y adenovirus ovino D.

Siadenovirus: adenovirus del sapo, pavo y no clasificados.

MORFOLOGIA

Estos virus tienen una construcción simple y consisten en una cápside, fibras, un core y proteínas asociadas. Los ADV son icosadeltaedros regulares no envueltos con un diámetro de

80-110 nm. Los 252 capsómeros que constituyen la cápside se dividen en 240 hexones y 12 pentones ubicados en los vértices de los cuales se proyecta una o dos fibras. El core está formado por DNA bicatenario de 35000 a 45000 pares de bases. El DNA tiene la particularidad de poseer un polipéptido terminal de 55 k. En el core también hay cuatro proteínas virales adicionales. Los hexones contienen determinantes antigénicos compartidos por todos los miembros de la familia y otros, específicos de tipo, responsables de las reacciones de neutralización (figs. 57-1 y 57-2).

Los adenovirus generalmente son estables y resistentes a agentes químicos o físicos, de allí su resistencia a las secreciones gástricas; en condiciones de pH adversas también pueden sobrevivir por tiempo prolongado fuera del cuerpo.

RESPUESTA INMUNE

El aumento en el título de anticuerpos comienza alrededor de 1 semana luego de la infección. Los anticuerpos neutralizantes pueden persistir por una década o más en títulos detectables. Aparentemente la infección con otros serotipos puede actuar como "*booster*" para mantener esta respuesta. Estudios de vigilancia epidemiológica sostienen que sólo un 75% de los aislamientos se acompañan con una respuesta de anticuerpos. Esta cifra suele ser menor cuando se trata de niños pequeños.

PATOGENESIS

Las células epiteliales son las primeras en ser infectadas in vivo. El hecho de que los ADV son capaces de infectar la mayoría de los órganos hace que puedan producir distintos tipos de infecciones. Los ADV pueden infectar y replicar en varios sitios del tracto respiratorio, así como en el ojo, tracto gastrointestinal y la vejiga urinaria. A veces pueden causar enfermedad del sistema nervioso central (SNC). Las infecciones en general son autolimitadas y las características dependen del hospedador y del serotipo involucrado. Hay una afinidad diferencial de las fibras de los distintos serotipos por los receptores de la membrana celular.

El ciclo replicativo, que puede dividirse en dos fases temprana y tardía, dura de 32 a 36 horas y ha sido profundamente estudiado. La adsorción del virus a receptores de membrana celulares es a través de las fibras. El virus transportado en vesículas endocíticas donde su cápside se modifica por disminución del pH llega al

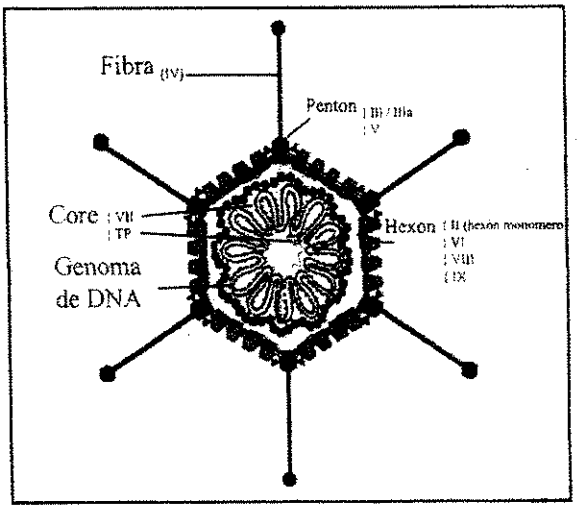


Figura 57-1. Estructura de un adenovirus.

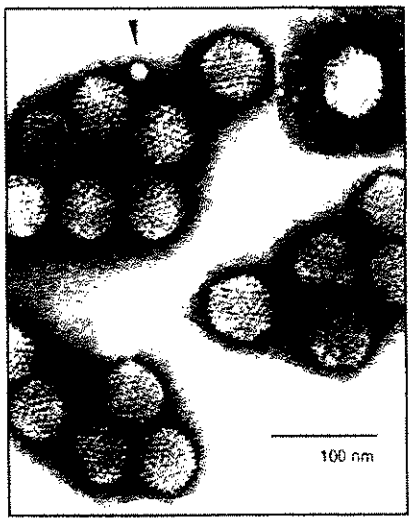


Figura 57-2. Microfotografía electrónica de un adenovirus humano. (Cortesía de C. Büchen-Osmond.)

núcleo por los microtúbulos. Allí se realiza la transcripción temprana del DNA con la síntesis de RNA virales, luego comienza la replicación del DNA viral que reduce la síntesis del DNA celular a un 90%. La transcripción de los mRNA tardíos comienza inmediatamente después en el citoplasma y codifican para la mayoría de las proteínas estructurales del virión o sus precursores. Los polipéptidos estructurales sintetizados son transportados al núcleo donde se inician los procesos de ensamble y maduración.

ASPECTOS CLINICOS

Muchas de las infecciones producidas por ADV son subclínicas y sólo resultan en la producción de anticuerpos.

Los síntomas de la enfermedad respiratoria causados por la infección de ADV pueden pasar del síndrome de resfriado común a una neumonía, tos perruna y bronquitis. Los pacientes con sistemas inmunes comprometidos son especialmente susceptibles a complicaciones graves de la infección por ADV. El ADV canino-1 causante de la hepatitis infecciosa canina o la enfermedad de Rubarth afecta a perros y zorros salvajes o de criaderos; a estos últimos puede producirles encefalitis. Los gatos y animales de laboratorio no son susceptibles. El ADV canino-2 causa necrosis del tracto respiratorio y se caracteriza por fiebre, depresión leve, descargas nasales y oculares y en ocasiones opacidad de la córnea. Los animales presentan una tos seca y persistente con algunos síntomas de neumonía pero no hepatitis. Las lesiones pulmonares pueden verse complicadas con la proliferación de bacterias secundarias. En bovinos, en general, produce infecciones asintomáticas pero se lo ha involucrado en casos de neumoenteritis, conjuntivitis y poliartritis o síndrome del ternero débil.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

La detección de antígenos por inmunofluorescencia, pruebas de reacción en cadena de la polimerasa, el aislamiento viral en cultivos celulares y serología pueden utilizarse para identificar infecciones por ADV. El serotipo del adenovirus puede establecerse mediante inhibición-hemaglutinación y/o neutralización con antisueros específicos a los tipos. Dado que el ADV puede ser excretado por largos períodos, la presencia del virus no necesariamente significa que está asociado con la enfermedad.

La muestra a remitir al laboratorio conviene que sea tomada en los primeros días de la infección y puede consistir en aspirados nasofaríngeos o hisopados nasales, conjuntivales o anales. Estas muestras deben ser colocadas en medio de transporte que puede ser un medio de cultivo celular con antibióticos. Las muestras deben enviarse refrigeradas y no congeladas.

TRATAMIENTO

La mayoría de las infecciones son leves y no requieren tratamiento alguno, o solamente tratamiento sintomático. Debido a que no hay tratamiento específico para el virus, las enfermedades graves por ADV pueden ser manejadas sólo tratando los signos y las complicaciones de la infección.

PROFILAXIS

Se han desarrollado vacunas contra los ADV humanos de serotipos 4 y 7, pero estuvieron disponibles sólo para prevenir ERA entre reclutas militares. La atención estricta y las buenas prácticas de control de las infecciones es efectiva para detener los brotes nosocomiales de enfermedad asociada al ADV, tal como la queratoconjuntivitis epidémica. El mantenimiento de niveles adecuados de cloración es necesario para prevenir los brotes de conjuntivitis por ADV asociados con piscinas.

BIBLIOGRAFIA

Basualdo JA, Coto CE, de Torres RA. Microbiología Biomédica, Editorial Atlante, Buenos Aires (Argentina), 1996, p. 649-654.

Carballal G, Videla C, Misirlian A, Requeijo PV, Aguilar M. Adenovirus type 7 associated with severe and fatal acute lower respiratory infections in Argentine children. BMC Pediatr. 2002; 2 (1): 6.

Fenner F, Bachmann PA, Gibbs EP, Murphy FA, Sttudert MJ, White DO. Virología Veterinaria, Editorial Acribia S.A. Zaragoza (España) 1992, p. 339-347.

Horwitz MS. Fields Virology, Adenoviruses. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven (USA); 1995, p. 2149-71.

Kajon AE, Mistchenko AS, Videla C, Hortal M, Wadell G, Avendano LF. Molecular epidemiology of adenovirus acute lower respiratory infections of children in the south cone of South America (1991-1994). J Med Virol. 1996 Feb; 48 (2): 151-6.

Lager I, Sadir A, Schudel A. Enfermedades respiratorias virales de los bovinos. IDA, 1983, Enero, 53-67.

Peter G. Red Book: Report of the Committee on Infectious Diseases. American Academy of Pediatrics. Adenovirus Infections. ed. 1997, 24th ed. Elk Grove Village, IL (USA), 1997: 131.

Capítulo 58

HERPESVIRUS

Cecilia Mónica Galosi

CARACTERISTICAS DE LA FAMILIA VIRAL

La familia Herpesviridae está constituida por un grupo de virus muy difundido en el reino animal, todos ellos morfológicamente similares y la mayoría capaces de inducir infecciones latentes, es decir que pueden reactivar luego de meses o años de producida la infección primaria. La reactivación es generalmente intermitente y se encuentra asociada a condiciones de estrés e inmunodepresión.

Las propiedades de la partícula viral están determinadas por: a) DNA lineal de doble cadena capaz de codificar entre 30-35 proteínas estructurales y más de 70 proteínas en la célula infectada. Se presenta enrollado alrededor de una estructura proteica toroidal central; b) cápside icosaédrica, simetría cúbica constituida por 162 capsómeros; c) capa amorfa fibrosa y asimétrica, denominada tegumento, rodeando la nucleocápside, compuesta de lipo y glicoproteínas y proteínas con actividad enzimática; d) envoltura externa, lipoproteica, trilaminar, que presenta proyecciones glicoproteicas hacia el exterior (espículas o peplómeros); e) virión de diámetro total entre 150-250 nm debido a la pleomorficidad de la envoltura; f) tamaño de genoma variable entre 124 y 235 pares de kilobases (kbp); g) composición de bases de 32 a 75 G+C moles%; h) relativa inestabilidad a la temperatura ambiente y pH menor de 3 y mayor de 9; i) rápida inactivación por los solventes orgánicos (fig. 58-1).

Los herpesvirus se clasifican de acuerdo a sus propiedades biológicas en tres subfamilias: *Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gamaherpesvirinae* que incluyen sus respectivos géneros. Esta clasificación está basada en el tropismo celular, crecimiento en cultivos celulares, tipo de efecto citopático y sitio de latencia. En general se demostró que estas propiedades se correlacionan con sus propiedades moleculares, sin embargo se encontraron excepciones que han hecho que muchos herpesvirus hayan sido actualmente reclasificados (tabla 58-1).

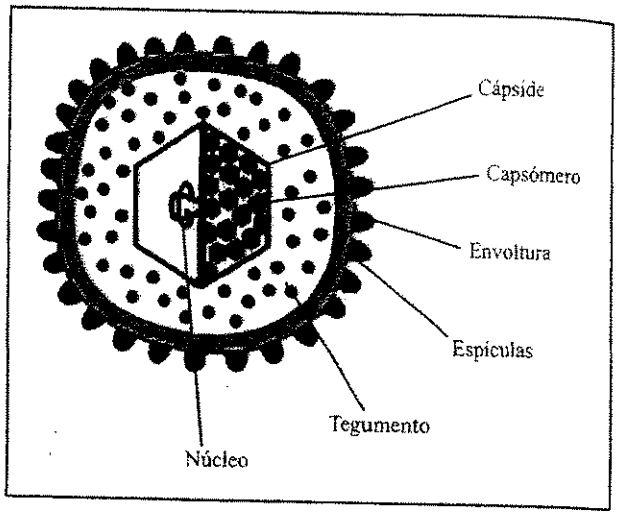


Figura 58-1. Representación esquemática de un herpesvirus.

REPLICACION VIRAL

El ciclo de multiplicación de los herpesvirus es común a todos los integrantes de la familia encontrándose variaciones en el tiempo de cada ciclo de replicación, de acuerdo a la subfamilia a la que pertenezcan y pudiendo variar por ello de 18 a 70 horas posinfección. La replicación viral se cumple según las siguientes etapas:

a) Adsorción en receptores específicos de la membrana de la célula huésped con intervención de las glicoproteínas virales.

b) Penetración, por fagocitosis o más frecuentemente por fusión de la membrana plasmática con la envoltura viral.

c) Decapsidación con liberación del DNA viral en el núcleo celular.
Esta secuencia de eventos se sucede gracias a la acción de todos los componentes del virión que protegen y facilitan la entrada del DNA viral y frenan la síntesis de macromoléculas de la célula hospedadora.

d) Transcripción del DNA viral por la acción de la RNA polimerasa II de la célula. Se producen tres clases de mRNA de manera secuencial y en "cascada" y estos se traducen a la biosíntesis de tres tipos de proteínas. Las primeras y las segundas proteínas formadas ("α y β") actúan como reguladoras y desencadenan la biosíntesis del tercer tipo de proteínas (γ) que son estructurales y forman las cápsides.

e) Replicación del DNA en el núcleo celular, semiconservadora con intervención de polimerasas específicas codificadas por el virus.

f) Armado del DNA dentro de las cápsides preformadas.

g) Maduración, al asociarse las cápsides con áreas alteradas de la zona interna de la membrana nuclear de la célula huésped. Salida del núcleo por brotación a través de la membrana nuclear de donde adquiere envoltura.

h) Liberación de los viriones al medio extracelular por exocitosis (descarga de virus desde la célula) o por citólisis (destrucción celular).

PATOGENESIS

Los herpesvirus se caracterizan por penetrar a través de la piel o las mucosas, principalmente del tracto respiratorio superior, orofacial o genital. Pueden diseminarse por sangre (viremia) interviniendo para ello las células blancas y son capaces de producir infecciones localizadas o generalizadas así como también, en algunos casos, pasan la barrera placentaria y llegan al feto.

Luego de la primoinfección los herpesvirus establecen infecciones latentes, las que generalmente se cumplen en las neuronas ganglionares del área anatómica correspondiente a la puerta de entrada

Tabla 58-1. Familia Herpesviridae: clasificación de acuerdo a sus propiedades biológicas

Subfamilia	Propiedades	Géneros	Nombre común de algunos patógenos
Alfaherpesvirinae	-Amplio rango de hospedadores naturales -Ciclo reproductivo breve -Desarrollo rápido en cultivos celulares -Efecto citopático lítico -Latencia en ganglios neurales sensoriales	Simplexvirus	-Herpes simplex 1 y 2* -Herpesvirus bovino 2 (virus de la mamilitis infecciosa)
		Varicelavirus	-Herpesvirus humano 3 (virus de la varicela-zoster)* -Herpesvirus equino 1 y 4 (aborto-rinoneumonitis) -Herpesvirus bovino 1 y 5 (rinotraqueítis infecciosa-encefalitis) -Herpesvirus suino 1 (seudorrabia porcina) -Herpesvirus canino 1 -Herpesvirus felino 1 -Virus de la enfermedad de Marek**
Betaherpesvirinae	-Rango de huésped restringido -Ciclo reproductivo prolongado -Desarrollo lento en cultivos celulares -Latencia en riñones, glándulas salivales y endotelios vasculares	Citomegalovirus	-Herpesvirus humano 5 (citomegalovirus)*
		Muromegalovirus	-Citomegalovirus de la rata y el ratón
		Roseolovirus	-Herpesvirus humano 6 y 7*
Gamaherpesvirinae	-Limitado rango de hospedadores naturales -Replican todos en células linfoblásticas -Algunos producen lisis en determinadas células epiteliales -Latencia en tejido linfático	Linfocriptovirus*	-Herpes humano 4 (virus Epstein Barr)*
			-Herpesvirus equino 2 y 5
		Rhadinovirus	-Herpesvirus saimiri

* Importantes patógenos humanos. ** Actualmente reclasificado por sus propiedades genómicas.

del virus. En este sitio el virus se encuentra inaccesible al sistema inmune. Por diversos motivos, generalmente inmunodepresión, el virus en estado latente puede reactivar, salir de su sitio de latencia y producir nuevas manifestaciones clínicas o subclínicas.

RESPUESTA INMUNE

En las infecciones herpéticas se encuentran comprometidos factores inespecíficos y específicos de la respuesta inmune. La respuesta inespecífica está mediada por neutrófilos polimorfonucleares, macrófagos, interferón y complemento que pueden limitar la unión del virus a las células. La respuesta específica puede estar mediada por linfocitos T o B e incluye aquélla que previene la infección (humoral) y la que actúa en la recuperación de la misma (celular y humoral). La respuesta inmune es de corta duración y los anticuerpos humorales se encuentran dirigidos principalmente contra las glicoproteínas de la envoltura viral.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

El diagnóstico de las infecciones herpéticas se realiza por aislamiento viral, técnicas serológicas que permiten la detección de anticuerpos y técnicas complementarias.

El aislamiento viral se hace a partir de muestras representativas de acuerdo a la sintomatología observada: trozos de órganos de animales infectados y muertos, líquidos vesiculares, hisopados nasofaríngeos, sangre con anticoagulante, etc. Las muestras se extraen en forma estéril y deben llegar refrigeradas al laboratorio de diagnóstico dentro de las primeras 24 horas de la toma, de lo contrario deben ser congeladas preferiblemente a −70 °C o, en su defecto, a −20°C hasta su remisión. Una vez procesadas, las muestras deben ser inoculadas sobre cultivos primarios de la especie homóloga o líneas celulares específicas. La aparición de efecto citopático característico, la observación de cuerpos de inclusión intranucleares o sincicios luego de la tinción con hematoxilina y eosina y la inmunofluorescencia producida con sueros específicos constituyen un diagnóstico positivo.

El diagnóstico serológico se basa principalmente en la determinación de anticuerpos neutralizantes contra las glicoproteínas de la partícula viral; sin embargo debe ponerse especial cuidado al interpretar los resultados debido a que los anticuerpos que pueden estar detectándose pueden provenir de la respuesta del organismo hacia la reactivación del virus latente. Es por eso que para la mayoría de las infecciones herpéticas la detección de anticuerpos no siempre confirma una infección aguda. Es necesario practicar una buena anamnesis y utilizar otras técnicas accesorias como los estudios histopatológicos, la detección de

antígenos virales o la reacción en cadena de la polimerasa para complementar el diagnóstico.

HERPESVIRUS DE IMPORTANCIA EN MEDICINA VETERINARIA

HERPESVIRUS EQUINO 1 Y 4 (EHV-1 Y 4) (RINONEUMONITIS-ABORTO)

El EHV-1 y EHV-4 son la mayor causa de pérdidas económicas en el mundo, ya sea en la producción equina por su potencial abortigénico o bien por la disminución de rendimiento de los equinos deportivos por afecciones respiratorias.

La infección por EHV-1 puede manifestarse de cuatro formas clínicas: enfermedad respiratoria (rinoneumonitis), abortos, enfermedad neonatal y síndrome neurológico, mientras que el EHV-4 produce rinoneumonitis y en menor proporción abortos.

Ambos virus penetran por la mucosa respiratoria, replican en el epitelio de la nasofaringe, tráquea y bronquios y luego pasan a los ganglios regionales donde cumplen su ciclo de latencia. El cuadro respiratorio (rinoneumonitis) caracterizado por rinofaringitis y traqueobronquitis puede llegar a comprometer al pulmón por la acción de infecciones bacterianas secundarias. El EHV-1 tiene además la propiedad de diseminarse por vía sanguínea (viremia) a los 4-5 días de la infección por lo que puede encontrarse también en endotelios vasculares y leucocitos circulantes. De esta manera el virus escapa a la acción de los anticuerpos y en caso de hembras preñadas puede pasar la barrera placentaria y llegar al feto produciendo el aborto. El aborto sucede a partir de los 15 días y hasta 3 meses posinfección, generalmente en el último tercio de la gestación y sin signos premonitorios. En caso de no abortar, el potrillo puede nacer vivo y morir dentro de las primeras 24-48 horas luego de un cuadro de depresión acompañado o no de signos respiratorios. La sintomatología nerviosa puede presentarse si el virus llega al sistema nervioso central, y la gravedad de los signos varía de acuerdo a la extensión y localización de las lesiones neuronales. Durante el período agudo de la enfermedad (10-12 días) el virus se elimina por exudados nasales, saliva y heces siendo además abundante en fetos abortados y tejidos fetales.

Solamente los miembros de la familia Equidae son hospedadores naturales mientras que experimentalmente la infección ha sido reproducida en hámsters, ratones y huevos embrionados. El EHV-1 y el 4 producen infecciones clínicas y subclínicas en equinos de establecimientos de cría y centros deportivos; como todos los herpesvirus, establecen infecciones latentes y la reactivación seguida de liberación del virus asegura la transmisión silenciosa del mismo entre la población. La rinoneumonitis es común en potrillos al destete o cuando ingresan a los centros hípicos, mientras que la forma subclínica se presenta a diferentes edades debido a sucesivas reinfecciones o reactivaciones. La mortalidad es baja y la morbilidad puede llegar al 90%. Los abortos se encuentran generalmente relacionados con situaciones de estrés de las madres que producen reactivación del virus latente. La forma nerviosa suele estar precedida de enfermedad respiratoria.

La respuesta inmune a una infección por EHV-1 y 4 es de corta duración y similar a la de otras especies infectadas por herpesvirus, e incluye una respuesta inespecífica y específica, humoral y celular. Los anticuerpos neutralizantes producidos contra las glicoproteínas de la envoltura viral persisten durante 3-4 meses y debido a ello los animales pueden ser asintomáticamente reinfectados. La inmunidad contra el aborto es un poco más duradera pero impredecible. Los anticuerpos no pasan la barrera placentaria, sin embargo a través del calostro las crías adquieren inmunidad pasiva la que persiste durante 4-6 meses. En las infecciones producidas por EHV-1 el virus escapa a la neutralización de los anticuerpos por lo que se considera que desempeña un papel muy importante en la inmunidad mediada por células.

La distribución del virus es mundial y en Argentina se considera que aproximadamente el 60% de los animales son seropositivos. El virus ha sido aislado en varias oportunidades a partir de animales con sintomatología respiratoria y de fetos abortados. No existe tratamiento específico y para la prevención y control en el mundo existen vacunas a virus atenuado y vacunas inactivadas. En Argentina sólo está permitido el uso de vacunas inactivadas que se aplican principalmente a potrillos recién destetados y a hembras gestantes. La particularidad del fenómeno de latencia y reactivación viral hace que el manejo de los animales y la prevención y minimización de las oportunidades de estrés sea definitorio para el éxito de los planes de vacunación.

El diagnóstico se realiza por aislamiento viral a partir de hisopados nasofaríngeos y tejidos fetales procesados e inoculados sobre cultivos celulares primarios de origen equino o líneas celulares específicas.

HERPESVIRUS BOVINO 1 Y 5 (BHV-1 Y 5) (RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA-ENCEFALITIS)

El BHV-1 es el agente causal de la rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV), balanopostitis (IPB) y abortos, mientras que el BHV-5 es el principal causante de sintomatología nerviosa (encefalitis). La IBR causa grandes pérdidas económicas debido a que produce depresión general, descenso de la producción láctea, pérdida de peso y abortos, en tanto que la encefalitis es generalmente mortal en terneros hasta los 18 meses de edad.

Las manifestaciones clínicas respiratorias en el bovino aparecen luego de un período de incubación de 3-6 días y consisten en conjuntivitis, presencia de exudado nasal seromucoso y traqueítis, aunque también pueden presentarse bronquitis y neumonía asociada a infecciones bacterianas secundarias. La IPV se caracteriza por la aparición de pústulas sobre la vulva edematizada e hiperémica acompañada de descarga vaginal mucopurulenta. En la IPB se observa hiperemia de la mucosa genital acompañada en casos graves de pústulas que pueden llegar a ulcerarse. La presencia de enfermedad respiratoria y genital combinadas es muy rara. Los abortos suceden entre el 4° y 7° mes de gestación, comienzan al observarse síntomas respiratorios en los animales y pueden continuar aproximadamente 3 meses más. Los signos neurológicos varían de acuerdo a la gravedad de las lesiones, siendo generalmente fatales. Los episodios nerviosos se asocian a BHV-5, sin embargo se ha determinado que el BHV-1 también produce esta sintomatología. El bovino es el huésped natural aunque este virus también fue aislado de cabras con síntomas respiratorios y de cerdos con lesiones genitales. Los hospedadores experimentales son el hurón y el conejo.

Una vez que ingresan al organismo y se multiplican, tanto el BHV-1 como el BHV-5 se desplazan a través de las prolongaciones nerviosas hacia los ganglios trigémino y sacro, principalmente, donde cumplen su ciclo de latencia. Por estímulos naturales o artificiales (tratamientos inmunosupresores) el virus puede reactivarse aunque generalmente no se presentan signos clínicos.

El virus se halla distribuido en Argentina con índices de prevalencia que varían entre el 33 y 63% según la región. La respuesta inmune inducida por la infección es similar a la de todos los herpesvirus. El control en el mundo se realiza por vacunas inactivadas, atenuadas y producidas por ingeniería genética. En Argentina sólo se permite el uso de vacunas inactivadas que son formuladas en distintas presentaciones: vacunas bivalentes (combinada con el virus de la diarrea viral bovina) y polivalentes (combinadas con el virus de la diarrea viral bovina, parainfluenza 3, *Moraxella*, *Pasteurella* u otros). Estos inmunógenos estimulan una respuesta que, con los esquemas convencionales de vacunación utilizados, se considera efectiva pero de corto y bajo desarrollo inmunitario.

El diagnóstico de la infección se realiza por aislamiento viral sobre cultivos primarios de origen bovino y células de línea MDBK y por seroneutralización que determina anticuerpos contra las glicoproteínas de la envoltura viral. Existen otras técnicas modernas de diagnóstico como el ELISA y técnicas de amplificación de DNA (PCR).

HERPESVIRUS SUINO 1 (SHV-1) (SEUDORRABIA, ENFERMEDAD DE AUJESZKY)

El SHV-1 es el agente productor de la seudorrabia porcina. La puerta de entrada del virus es el aparato respiratorio, luego replica en las células de la mucosa orofaríngea y accede a las células del bulbo olfatorio donde sucede una segunda replicación. A través de los nervios trigémino y glosofaríngeo llega a la médula y protuberancia y desde allí se disemina rápidamente. El período de incubación oscila entre 3-6 días y la infección se manifiesta de diferentes maneras según se trate de individuos adultos o jóvenes. Produce abortos en cerdas preñadas, viremia en los recién nacidos, encefalitis en los lechones y enfermedad respiratoria en cerdos jóvenes y adultos. La mortalidad es alta en lechones y sólo del 2% en adultos con síntomas respiratorios. El hospedador natural es el cerdo, sin embargo otras especies como bovinos, caprinos, ovinos, caninos y felinos, como también especies salvajes (rata, ratón, zorro) pueden afectarse.

La secuela más importante posinfección es la infertilidad temporaria o crónica, en especial si los fetos son retenidos en el útero. La respuesta inmune se asemeja a la de todos los herpesvirus e intervienen factores inespecíficos y específicos. En Argentina la infección se detectó por primera vez en 1978 y a partir de 1996 el SENASA elaboró un plan de control y erradicación por eliminación de los animales seropositivos sin vacunación. Posteriormente, en 1998 autorizó el uso voluntario de vacunas producidas por la técnica de DNA recombinante ("deleteadas") gE (-) e inactivadas. En este caso, es necesario el uso de la prueba de ELISA diferencial ya que permite distinguir animales vacunados de aquellos infectados naturalmente. Si se detectan anticuerpos contra gE (glicoproteína ausente en la vacuna autorizada) significa que el animal se ha infectado en forma natural. El diagnóstico se realiza por aislamiento e identificación del agente viral, detección de antígenos virales en tejidos, por amplificación del DNA viral y por detección de anticuerpos circulantes por neutralización, ELISA, etc.

HERPESVIRUS CANINO 1 (CHV-1)

El CHV-1 produce una enfermedad contagiosa que afecta casi con exclusividad a los cánidos y se caracteriza clínicamente por presentar diferentes signos que van desde una enfermedad septicémica y fatal en cachorros menores de 3-4 semanas de edad, hasta un cuadro de tipo respiratorio y genital en perros adultos.

El contagio se produce por vía respiratoria y si ocurre en la primera semana de vida la tasa de mortalidad es muy elevada debido a que los cachorros no regulan la temperatura corporal y por lo tanto se encuentran en inferioridad de condiciones para enfrentarse al agente infeccioso. Se producen muertes súbitas entre las primeras 24-48 horas de vida, los cachorros se manifiestan deprimidos, letárgicos, dejan de mamar, presentan dolor abdominal y pueden observarse convulsiones antes de la muerte. La manifestación respiratoria forma parte del complejo "tos de las perreras" y la forma genital se caracteriza por la aparición de lesiones vesiculosas focales en epitelio de vagina, pene y prepucio. Los animales que sobreviven a la infección quedan como portadores asintomáticos de por vida. Las hembras que paren camadas infectadas desarrollan inmunidad para el siguiente celo y salvo raras excepciones las camadas posteriores son normales.

El diagnóstico se basa en la anamnesis y signos clínicos y por el aislamiento viral e identificación sobre células de origen canino (cultivos primarios o línea celular MDCK), a partir de muestras de órganos de cachorros muertos, hisopados nasales de adultos con síntomas respiratorios y/o lesiones genitales. La determinación de anticuerpos neutralizantes es considerada de referencia para esta virosis aunque en algunos países se utiliza también la técnica de ELISA.

En Argentina se observaron casos de sintomatología compatible con esta virosis, sin embargo no se ha descrito aún el aislamiento y caracterización genómica del virus.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de La Plata y a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires por abrirme sus puertas y permitirme formarme como docente e investigador.

BIBLIOGRAFIA

Allen GP, Bryans JT. Molecular epizootiology, pathogenesis and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infection. Prog. Vet. Microbiol. Immunol. 1986; 2: 78-148.

Ben Porat T, Kaplan AS. Molecular biology of Pseudorabies virus. En: Roizman B. The herpesviruses Vol III, Plenum Press, New York (USA), 1985; 105-173.

Berría MI. Familia Herpetoviridae. En: Carballal G, Oubiña JR. Virología Médica (3ra edición), El Ateneo, Buenos Aires (Argentina), 1998; p. 327-338.

Gentry GA, Randall CC. The physical and chemical properties of the Herpesviruses. En: Kaplan AS. The Herpesviruses, Academic Press, New York (USA), 1973; p. 45-93.

Ginsberg HS, Herpesvirus. En: Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS. Tratado de Microbiología (4ta edición), Masson SA, Barcelona (España), 1996; p. 889-904.

Pierson P, Moraillón A, Rémond M. L´ herpèsvirose en élevage canin: aspects cliniques et diagnostic. Recueil de Médicine Vétérinaire. 1998, 174: 87-93.

Roizman B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, Lopez C, Minson AC & Studdert MJ. The family herpeviridae: an update. Arch Virol. 1992; 123: 425-449.

Tikoo SK, Campos M, Babiuk LA. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control. Advances in Virus Research. 1995; 45: 191-223.

Capítulo 59

PAPILOMAVIRUS

Jorge Moreno-López

INTRODUCCION

De acuerdo a un Nuevo Reporte del Comité Internacional de Taxonomía de los Virus, ICTV (aún no publicado) se ha propuesto que los virus papiloma humanos y animales sean clasificados dentro de la familia Papillomaviridae, que comprende 15 géneros designados con las letras "A" hasta la "O". Cada género tiene un prototipo de la especie con varias especies dentro del género. Esta nueva clasificación se dará a conocer en el Octavo Reporte de ICTV que se puede observar ya en la página WEB.

Debido a la inmensa diversidad de virus papiloma la clasificación propuesta se ha basado en el análisis del gen L1 de 103 cepas virales diferentes. Este gen refleja muy bien el genoma completo de la familia, y sus características han sido utilizadas durante los últimos 15 años para la identificación de nuevos virus papilomas. La clasificación concuerda con la existencia de tres niveles taxonómicos: cepas/aislamientos, especies y géneros, y se ignora la existencia de subfamilias. Sin embargo, la información sobre las propiedades biológicas y patogénicas de la mayoría de los virus papilomas, es todavía incompleta.

Hasta hace poco la literatura sobre virus papiloma describía, en su mayor parte, experimentos de transmisión, ultraestructura viral, composición química y descripción patológica de las lesiones ocasionadas por el virus. La primera información de que ciertos tipos de virus papiloma pueden inducir la formación de carcinomas, fue el hito inicial dentro de este interesante campo de la investigación. A fines de la década de 1970, las técnicas de clonado molecular permitieron una investigación más sistemática para estudiar este virus, siempre limitada, ya que no existen cultivos celulares permisivos para su replicación in vitro.

Los virus papiloma inducen tumores en la piel y mucosas y de aquí su nombre, del latín *papilla* y del sufijo griego *oma* que significa tumor. Informes sobre la existencia de verrugas o papilomas, se remontan a la antigüedad. Ya en el siglo IX un súbdito del Califa de Bagdad informó la existencia de verrugas en caballos. Los virus ocasionan papilomas o fibropapilomas y han sido asociados con un sinnúmero de lesiones hiperplásicas y neoplásicas en una gran variedad de vertebrados. En humanos, el virus suele inducir lesiones en forma de papilomas y algunos de ellos, especialmente los del tracto genital y de la piel, pueden progresar a carcinomas. En las especies animales, al igual que en los humanos, la mayoría de los virus papiloma son especie-específicos, tienen predilección por lugares anatómicos e inducen tumores benignos. En rumiantes, los virus papilomas comunes inducen fibromas o fibropapilomas que en varias especies pueden progresar también a carcinomas.

ESTRUCTURA

Las partículas virales son de aproximadamente 55 nm de diámetro, con simetría icosaédrica con 72 capsómeros y contienen solamente DNA y proteína. La molécula única de DNA es de doble cadena y tiene un peso molecular de 5 x 10^6 k, que corresponde aproximadamente a 8000 pares de bases. Los miembros de la familia Papillomaviridae tienen 9-10 segmentos de lectura abierta (*Open Reading Frames*, ORF), denominados E1-E8 y L1-L2 (*Early and Late*). E1, E2, L1 y L2 son bien conservados pero con algunas diferencias (presencia o ausencia de pequeños ORF). Las proteínas codificadas por los genes tempranos (E) con la posible excepción de E4, representan polipéptidos no estructurales relacionados con la transcripción, replicación de DNA y transformación. Aquellas codificadas por los genes tardíos (L) representan las proteínas estructurales.

Es muy característica la similitud que existe en la organización molecular de los diferentes virus papiloma. Las moléculas de DNA se presentan principalmente en dos formas: una con ambas cadenas covalentemente unidas que dan una forma rígida y "trenzada", y otra con un corte único en una de las cadenas dando la forma de un círculo abierto. Una rotura en las dos cadenas dará por consiguiente una forma lineal. La cantidad de partículas virales que pueden aislarse de biopsias (en humanos) es insuficiente para el análisis de sus proteínas. Sin embargo, se ha determinado la presencia de proteínas estructurales mayores con pesos moleculares de 53-59 k (proteína de cápside) y de 70 k.

REPLICACION VIRAL

La replicación del virus papiloma está íntimamente relacionada con el crecimiento y la diferenciación celular en el estrato escamoso y epitelio mucoso: desde su infección primaria en las capas basales hasta su salida hacia la superficie epidérmica o de las membranas mucosas. Inicialmente, se infectan las células basales del estrato germinativo en división activa y se cree que las partículas virales se mantienen en un estado proviral, posiblemente latente a lo largo de la diferenciación celular. Las partículas virales se adhieren a receptores celulares, penetran por endocitosis y son transportadas al núcleo en donde exponen su DNA. Durante una infección productiva, la transcripción del genoma viral se divide en un estadio temprano y en otro tardío. La mitad del genoma que contiene genes tempranos se transcribe formando un mRNA que dirige la síntesis de enzimas importantes para la replicación viral. La otra mitad del genoma que contiene genes tardíos dirige la síntesis de las proteínas virales estructurales y después que se ha iniciado la síntesis de DNA. Estas moléculas sirven de "patrones" para amplificar la producción de proteínas estructurales. Para aumentar la capacidad codificante del genoma viral se utilizan varias estrategias translacionales. La replicación del DNA se inicia en un origen único de replicación y en forma bidireccional (para más detalles véase Vet. Virology, 1999).

Las partículas virales se ensamblan en el núcleo y son excretadas luego de la muerte de las células y muy a menudo como consecuencia del remplazo de éstas en el epitelio. Una célula infectada puede producir 10.000-100.000 partículas virales. El

DNA del virus papiloma permanece episomal y muy raramente se lo encuentra integrado en el genoma celular. Los genes expresados codifican proteínas relacionadas con la replicación y regulación de la transcripción viral, así como proteínas que afectan directamente la transformación celular.

PATOGENESIS

La infección productiva de las células epiteliales, da como resultado una hiperplasia en el estrato espinoso (acantosis), aumento en su tamaño y en el número de desmosomas y tonofibrillas, mientras otras demuestran cambios degenerativos con pérdida de tonofibrillas, desprendimiento de desmosomas, atipia nuclear focal y vacuolización citoplasmática. Hacia las capas superiores del epitelio los cambios son más pronunciados. En la capa granular, la degeneración nuclear es evidente con marginación y condensación de la cromatina. En el núcleo de células degeneradas de la capa queratinizada se observan al microscopio electrónico partículas virales en orden cristalizado. Como contraste, los fibromas inducidos por el virus fibroma del ciervo, por ejemplo, demuestran una proliferación fibroblástica con células organizadas en forma de pétalos irregulares. En el epitelio superior se observa acantosis moderada. En los fibropapilomas se advierte una combinación de los efectos arriba mencionados.

La infección natural por lo general se limita a la piel o a las membranas mucosas, dependiendo del tropismo del virus. En los papilomas escamosos los virus pueden detectarse utilizando métodos inmunológicos o microscopia electrónica. Como contraste, cuando los papilomas se han transformado en carcinomas, se pierde la integridad estructural del virus. En forma similar, los tumores inducidos en un hospedador no natural así como en líneas celulares establecidas a partir de esos tumores, no se observan partículas virales. Este fenómeno debe estar relacionado con el proceso de diferenciación de las células epiteliales, ya que a las partículas virales se las encuentra siempre en las células maduras del epitelio queratinizado exterior de los papilomas.

DIAGNOSTICO

El diagnóstico clínico en general es fácil, pero para una eventual diferenciación, como en el caso del sarcoide del caballo, se puede tomar una biopsia para estudios histopatológicos.

RESPUESTA INMUNE

Los mecanismos de la respuesta inmune no se han elucidado satisfactoriamente. En general podemos decir que la enfermedad es más común en el animal joven. Las verrugas o tumoraciones persisten por períodos variables para después, desaparecer espontáneamente. El animal infectado es refractario a una reinfección con el mismo tipo de virus. Los terneros desarrollan anticuerpos dentro de 1 semana después de la infección y persisten unas 8 semanas para luego no detectarse después de 16 semanas.

CONTROL

El efecto de la vacunación contra el virus papiloma es de difícil evaluación ya que la enfermedad se autolimita y su duración varía individualmente. La inmunidad celular juega un papel importante en la eliminación de las verrugas y en ciertos casos, algunos factores tumorales inducidos por el virus podrían suprimir la inmunidad en animales susceptibles.

ENFERMEDADES DE MAYOR IMPORTANCIA EN VETERINARIA

En la tabla 59-1 se mencionan las enfermedades de mayor importancia en medicina veterinaria.

VIRUS PAPILOMA DEL BOVINO

Esta enfermedad es sin duda la más importante en animales y se observa más a menudo en bovinos que en otras especies. Los animales se infectan a cualquier edad, pero con una incidencia mayor en terneros y animales de aproximadamente 1 año. En bovinos se han descrito seis tipos de virus papiloma; los tipos 1 y 2 también se presentan en caballos (sarcoide), siendo el tipo 3 de localización cutánea, el 4 de localización intestinal (puede convertirse en maligno) y los tipos 5-6 se ubican especialmente en las ubres.

SINTOMATOLOGIA Y PATOLOGIA

Los diferentes tipos de virus papiloma se asocian con distintas lesiones (tabla 59-1). Estas pueden variar desde pequeños nódulos firmes hasta largas tumoraciones en forma de coliflores. Pueden ser de varios colores, desde grises hasta negros, y lisas o rugosas al tacto. Como los papilomas grandes son objetos de contusiones, sangran fácilmente. Los fibropapilomas son comunes en las ubres y pezones así como en la cabeza, cuello y hombros. También pueden presentarse en vagina, vulva, pene y ano.

Los virus papiloma tipo 1 y 2 son los papilomas cutáneos más comunes y tanto el virus como su DNA tienen capacidad de transformar células in vitro. En contraste, los virus papiloma bovinos tipos 3, 4, 5 y 6 inducen lesiones epiteliales y cutáneas sin proliferación fibroblástica. Las lesiones causadas por el tipo 3 tienden a persistir y son generalmente planas con una base ancha, en contraste con las más comunes que son a menudo pedunculadas. En Escocia y el Norte de Inglaterra los papilomas ocasionados por el virus tipo 4 aparecen en el tracto digestivo y en la vejiga urinaria y pueden progresar a carcinomas. La ingestión de helecho, *Pteridium aquilinum* (un agente carcinógeno e inmunosupresivo), es un factor importante en la transición de

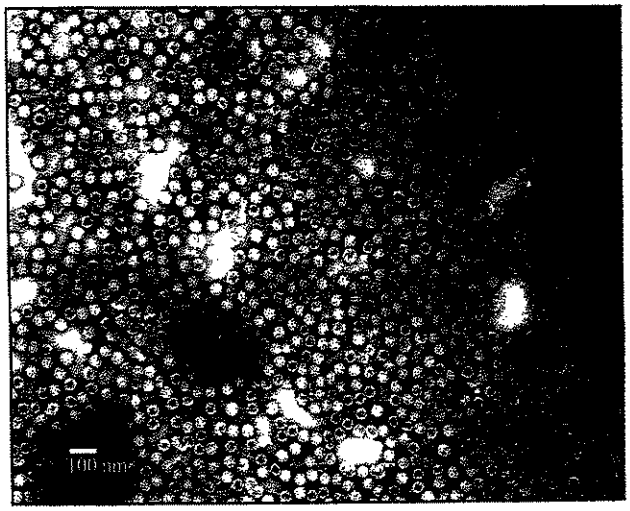


Figura 59-1. Fotografía electrónica del virus papiloma del bovino, BPV. (Gentileza J. Moreno-López).

Tabla 59-1. Caracterización de algunos virus papilomas en animales (modificado de Papillomavirus Infections in animals, JP Sundberg 1987)

Hospedador/virus	Género	Lesiones	Lugar anatómico	Carcinomas	Referencias
Bovinos					
BPV-1	"C"	Fibropapiloma	Cutáneo	No	Lancaster y Olson 1978
BPV-2	"C"	Fibropapiloma	Cutáneo	No	Lancaster y Olson 1978
BPV-3	"L"	Papiloma	Cutáneo	No	Pfister y col. 1979
BPV-4	"L"	Papiloma	Tracto digestivo	Sí	Campo y col. 1980
BPV-5	"D"	Fibropapiloma	Pezones (cutáneo)	No	Campo y col. 1981
BPV-6	"L"	Papiloma	Pezones (cutáneo)	No	Jarret y col. 1984b
Ciervos					
Papiloma del Alce Europeo	"C"	Fibropapiloma	Cutáneo	No	Moreno-López y col. 1981
Fibroma del ciervo "cola blanca"	"C"	Fibroma	Cutáneo	No	Lancaster & Sundberg 1982, Groff 1983
Fibroma del ciervo "Mule"	"C"	Fibroma	Cutáneo	No	Lancaster & Sundberg 1982 Groff 1983
Papiloma del ciervo "rojo"	"C"		Cutáneo	No	Favre y col. Comunicación personal
Papiloma del ciervo "rojo"	"C"	Fibropapiloma	Cutáneo	No	Moar 1983; Moar y Jarret 1985
Papiloma del reno	"C"	Fibropapiloma	Cutáneo	No	Moreno-López y col. 1983
Caballos					
Papiloma cutáneo equino	"E"	Papiloma	Cutáneo	No	O'Banion y col. 1983
Papiloma venéreo equino	"E"	Papiloma	Pene, vulva	Sí	O'Banion y col. 1983
Conejos					
Papiloma cutáneo del conejo "cola blanca"	"K"	Papiloma	Cutáneo	Sí	Murphy, 1981, Wats 1983, Giri 1985
Papiloma oral del conejo doméstico	"K"	Papiloma	Lengua	No	O'Banion y col. 1986
Perros					
Papiloma oral canino	"I"	Papiloma	Lengua, gíngiva	Sí	Pfister y Meszaros 1980
Roedores					
Papiloma de *Mastomys natalensis*	"H"	Queratoacantoma/papiloma	Cutáneo	Sí?	Muller y Gissmann 1978
Aves					
Papiloma de los pinzones	"G"	Papiloma	Cutáneo	No	Moreno-López y col. 1984
Papiloma de la cotorra gris de Africa	"G"	Papiloma	Cutáneo	No	O'Banion y col. 1986

papilomas benignos a carcinomas invasivos del tracto digestivo (tipo 4) y de la vejiga (tipo 2). Este último es conocido como causa de la llamada hematuria endémica crónica.

PATOGENESIS E INMUNOLOGIA

Los papilomas se desarrollan después de la introducción del virus en abrasiones de la piel. La infección de las células epiteliales establece una hiperplasia con la subsecuente degeneración e hiperqueratinización. Estos cambios suelen producirse 4-6 semanas después de la exposición al virus. En general, los fibropapilomas persisten 4-6 meses antes de una regresión espontánea. Las verrugas múltiples generalmente desaparecen en forma simultánea. Se han descrito tres estadios en el desarrollo de las tumoraciones: 1) formación de placas ligeramente elevadas y que se inician a las 4 semanas después de la infección, 2) estadio caracterizado citopatológicamente por replicación viral y agregación de cristales de virus en las lesiones iniciándose alrededor de las 8 semanas después de la infección y 3) estadio caracterizado por formación fibrosa, bases pedunculadas y superficies lisas, lobuladas o fungiformes, que se inician alrededor de 12 semanas después de la exposición al virus. El nivel de anticuerpos neu-

tratizantes parece estar correlacionado con la regresión de las lesiones y con la protección contra la reinfección.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

El diagnóstico de laboratorio no es práctico ya que las lesiones son características. Las partículas virales pueden ser observadas en el microscopio electrónico. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e hibridación del ácido nucleico pueden emplearse para detectar el DNA del virus; sin embargo, estos son métodos de poca utilidad.

EPIDEMIOLOGIA, PREVENCION Y CONTROL

El virus se transmite entre los animales mediante arreos contaminados, equipos marcadores de orejas y artículos contaminados con el virus. La transmisión sexual es posible. La enfermedad es más común en animales estabulados. La prevención y el tratamiento de la papilomatosis es de difícil evaluación ya que la enfermedad se autolimita y su duración es variable. Se ha utilizado interferón bovino alfa y otros tratamientos también de difícil evaluación. La inoculación con homogeneizados de verrugas autólogas tratadas con formalina es de eficacia dudosa. Se han aplicado sin mayor éxito, vacunas con proteínas de cápside producidas con tecnología de DNA recombinante. Sin embargo, dichas vacunas deberían contener proteínas de múltiples tipos de virus, pues no existe protección cruzada entre ellos.

PAPILOMATOSIS EQUINA Y SARCOIDES

Tiene como etiología el virus papiloma tipos 1 y 2 equino pero también hay indicios de que el virus papiloma bovino puede ser la causa de la tumoración sarcoide de los caballos. Los sarcoides son tumores de la piel que histológicamente tienen la apariencia de fibrosarcomas, no metastatizan, son localmente invasivos y pueden retornar después del tratamiento quirúrgico. Se ha detectado DNA del virus papiloma bovino en animales experimentales con infección natural. Los caballos son susceptibles a la infección experimental con virus papiloma bovino tipos 1 y 2 y los tumores son similares a los sarcoides. Las lesiones son principalmente de tipo cutáneo y son tumoraciones pequeñas, elevadas y queratinizadas, con predilección alrededor de los labios y la nariz. Generalmente desaparecen dentro de 1 a 9 meses. Se han descrito también papilomas genitales. La infección natural ocurre cuando los caballos han sido estabulados en cobertizos en donde antes había bovinos. La inmunidad en animales infectados persiste de por vida. El virus papiloma bovino puede transformar in vitro células fibroblásticas derivadas del caballo.

PAPILOMATOSIS CANINA

La alteración es de tipo oral; se observa en los labios y se contaminan la mucosa bucal, lengua, paladar y faringe. Las lesiones pueden ser extensas requiriendo atención quirúrgica veterinaria o pueden desaparecer espontáneamente.

Además de los virus aquí descritos y que constan en la tabla adjunta, puede mencionarse la existencia de papilomas o fibropapilomas en una gran variedad de animales tanto domésticos como salvajes. Entre ellos tenemos: papilomatosis en ovinos, cabras, cerdos, hámsters, gatos, osos, elefantes, rinocerontes, armadillos, reptiles, delfines, peces y hasta en moluscos.

Finalmente, debemos destacar que en humanos se han descrito alrededor de 100 tipos diferentes de virus papiloma, siendo de predilección la manifestación cutánea o mucosa. Algunos de los virus papiloma participan en la transformación maligna tal como sucede con el cáncer del cérvix y otros de transmisión sexual.

BIBLIOGRAFIA

Herbert Pfister. Biology and Biochemistry of Papillomaviruses. Rev Physiol Biochem Pharmacol. 1984; 99: 111-181.

Kahrs RF. In: Viral Diseases of Cattle. The Iowa State University Press, Ames, IOWA. 1981

Sundberg JP. Papillomavirus Infections in animals. 1987

The Viruses. Serie Editors: Heinz Freaenkel-Conrat and Robert R. Wagner. In: The Papovaviridae. The Papillomaviruses. Volume 2. Editors: Norman P. Salzman and Peter M. Howley. Plenum Press. 1987

Veterinary Virology. Edited by Frederick A. Murphy, E.Paul J. Gibbs, Marian C. Horzinek., J. Studdert. Third Edition. Academic Press. 1999.

Veterinary Viruses. Edited by P.H. Russell and N. Edington. The Burlington Press (Cambridge) Ltd., Foxton, Cambridge. 1995.

Virus Infection of Vertebrates. Volume 1. Series Editor: Marian C. Horzinek. Edited by A.D.M.E. Osterhaus. Elsevier Sciences. Amsterdam, The Netherlands. 1994

Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses. In: Seventh Report Of The International Committee on Taxonomy Of Viruses. Edited By M.H.V. van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop. Academic Press, 1998.

Capítulo 60

POXVIRUS

Sergio Adrián Samus,
Marcela Sara Testa

INTRODUCCION

Los virus pertenecientes a esta familia infectan células tanto de vertebrados como invertebrados. El prefijo *pox* proviene de la palabra *pock* que significa *pústula*.

Características generales

Acido nucleico:	DNA de doble cadena
Cápside:	tubular
Simetría:	compleja (forma de ladrillo)
Envoltura:	posee
Diámetro:	300 a 450 nm
Peso molecular del DNA:	130 a 240 x 10^6

La familia Poxviridae incluye a los virus más grandes que incluso se encuentran en el límite de la observación con el microscopio óptico. Su estructura está formada por un core que contiene el ácido nucleico y proteínas, envuelto por dos elementos llamados cuerpos laterales y finalmente rodeado por la envoltura de naturaleza lipoproteica de origen netamente viral. Los viriones de los poxvirus contienen más de 30 proteínas estructurales y enzimas incluyendo una RNA polimerasa del DNA dependiente. Los poxvirus son sensibles al cloroformo, pero son resistentes a la temperatura a diferencia de otros virus con envoltura.

CLASIFICACION

La familia Poxviridae se divide en dos subfamilias:

- Chordopoxvirinae con los géneros
  - *Orthopoxvirus*
  - *Parapoxvirus*
  - *Avipoxvirus*
  - *Capripoxvirus*
  - *Leporipoxvirus*
  - *Suipoxvirus*
  - *Molluscipoxvirus*
  - *Yatapoxvirus*
- Entomopoxvirinae con los géneros
  - *Entomopoxvirus A*
  - *Entomopoxvirus B*
  - *Entomopoxvirus C*

Los representantes de la subfamilia Chordopoxvirinae afectan a vertebrados, mientras que la subfamilia Entomopoxvirinae afecta a artrópodos.

REPLICACION VIRAL

A pesar de poseer DNA, la replicación y biosíntesis de los poxvirus ocurre en el citoplasma celular. En una primera etapa el virus se adsorbe a la célula mediante la interacción entre receptores de la membrana celular y antirreceptores virales, tras lo cual se desencadena un mecanismo similar a la fagocitosis que internaliza el virus.

Una vez que el virión se encuentra en el citoplasma se produce el proceso de denudación, que se divide en dos etapas: en la primera se degrada la membrana fosfolipídica y la proteína externa de la partícula viral, exponiendo la nucleoproteína; todo este proceso es llevado a cabo por enzimas celulares que no dependen del DNA ni de la infección viral. En este momento la RNA polimerasa viral transcribe parte del genoma produciendo RNA mensajeros (transcripción temprana) que traducen en proteínas de acción enzimática, que a su vez inician la segunda etapa de denudación, degradando la nucleoproteína y liberando el DNA; además se sintetizan DNA polimerasa y timidinaquinasa que inician la replicación del DNA.

La segunda fase (transcripción tardía) genera los RNA mensajeros de las proteínas tardías. Estas son básicamente las proteínas estructurales que permitirán el ensamblaje de los nuevos viriones con el DNA.

Finalmente la liberación del virus al exterior de la célula ocurre por un proceso inverso a la fagocitosis; aun así hasta un 90% del material viral quedará atrapado en las estructuras celulares.

PATOGENESIS

La penetración del virus en el organismo puede ocurrir por *las vías respiratorias superiores con replicación en la mucosa* y ganglios regionales tanto en la viruela humana como en la mixomatosis atípica, o bien por picaduras de insectos como en la viruela porcina, la mixomatosis, la difteroviruela del canario, o por contacto con heridas cutáneas boca-hocico como en el ectima contagioso.

La diseminación en la corriente sanguínea (viremia) implica síntomas generales, fiebre, dolores, postración, tanto en la viruela humana como en la mixomatosis pero aparentemente no en la viruela del cerdo. También se produce la diseminación en piel con desarrollo de máculas, pápulas y pústulas como en la viruela humana, mixomatosis o ectima, o la diseminación en vías respiratorias como en la difteroviruela del canario o en conjuntiva como en la mixomatosis.

RESPUESTA INMUNE

En el caso de la vacunación en la viruela humana, los anticuerpos fijadores de complemento aparecen en el 50% de los sujetos entre los 7 a 10 días posvacunación y la inmunidad dura entre 3 y 7 años. Lo mismo ocurre con anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación o neutralizantes. En el caso de la viruela porcina los animales recuperados de la infección son inmunes de por vida pero son serológicamente negativos en muchos casos, de lo que se deduce la importancia de la inmunidad mediada por células.

En la mixomatosis los pocos animales recuperados adquieren inmunidad duradera pero en realidad la vacunación protege sólidamente cuando se utilizan vacunas de tipo homólogo, mientras que las vacunas heterólogas (virus de fibroma de Shope) no generan protección duradera. Las vacunas homólogas se aplican por vía subcutánea o intradérmica, siendo esta última más efectiva.

DIAGNOSTICO

En el caso de la viruela humana, cuando existía la enfermedad, se diagnosticaba por las lesiones típicas. En la actualidad, cuando se quiere definir un cuadro sospechoso se recurre a la observación de muestras con microscopia electrónica, inmunofluorescencia, precipitación en gel de agar o aislamiento viral en membrana corioalantoidea de embrión de pollo. El método de elección para la diferenciación de poxvirus es la caracterización del DNA mediante la digestión con endonucleasas de restricción y la posterior separación de los fragmentos obtenidos en corridas electroforéticas.

En la mixomatosis se recurre primero al diagnóstico clínico, ya que sus lesiones son típicas, mientras que el diagnóstico de laboratorio se basa en la inoculación experimental en conejos jóvenes no inmunizados por vía subcutánea en la zona dorsolumbar o intradermopalpebral. El aislamiento viral es factible en células de cultivo primario de riñón de gazapo lactante o células de línea RK13 y la detección antigénica por inmunofluorescencia.

En la viruela porcina el diagnóstico clínico suele ser suficiente pero si se desea confirmar se puede realizar inmunofluorescencia, microscopia electrónica o aislamiento viral en cultivos celulares primarios de células renales de cerdo. En el ectima contagioso, además del diagnóstico clínico, se puede aislar el virus en células de cultivo. La fijación de complemento y la inmunodifusión fueron usadas tanto para diagnóstico serológico como para la identificación antigénica.

En medicina veterinaria varios son los géneros que tienen importancia:

El género *Orthopoxvirus*, representado por el virus vacunal, virus de laboratorio originado posiblemente en el virus cowpox o en el de la viruela humana, permitió inmunizar a millones de personas con lo que se erradicó la enfermedad. Además del cowpox pertenecen a este género el pox del caballo, el virus de la ectromelia del ratón, poxvirus del conejo, camello, búfalo y mono. Todos presentan reactividad serológica cruzada, se transmiten por contacto, causan cuadros febriles con exantema en piel y poseen hemaglutinina. Se aíslan en cultivos de células epiteliales donde muestran efecto citopatogénico y cuerpos de inclusión intracitoplásmicos. También se pueden multiplicar en embriones de pollo.

El género *Avipoxvirus*, cuyos integrantes afectan a las aves, es muy resistente a los factores ambientales; la transmisión es por contacto o por insectos picadores. El poxvirus de la gallina, de la paloma, del gorrión, de la codorniz, del canario, etc., presentan actividad serológica cruzada, dan cuerpos de inclusión pero no tienen hemaglutinina, se multiplican in vitro en cultivos celulares y en embriones de pollo, pato, etc.

El poxvirus del canario, o canaripox, tiene especial importancia como causante de la difteroviruela del canario en sus dos presentaciones: la forma cutánea con pústulas en párpados, patas y zonas desnudas del cuerpo y la forma diftérica con inflamación de las vías respiratorias y asfixia. La enfermedad, como otras causadas por avipoxvirus, es transmitida por insectos picadores, especialmente mosquitos. Existen vacunas a virus vivo atenuado para esta enfermedad que se aplican por punción en la membrana del ala, y a los 8 días posaplicación se observa la formación del "pock" en el lugar de la punción, que demuestra la replicación del virus en las células epiteliales. Por otra parte, el canaripoxvirus se utiliza como vector para la elaboración de vacunas contra otras enfermedades mediante tecnología recombinante.

El género *Leporipoxvirus* también es de gran importancia en medicina veterinaria ya que incluye al virus del mixoma del conejo, productor de la mixomatosis y el virus del fibroma de Shope; si bien este último no es patógeno para el conejo europeo, se lo utilizó para la inmunización cruzada contra la mixomatosis. Hoy se dispone en el mercado de vacunas homólogas a virus vivo atenuado frente a esta enfermedad devastadora. Dentro de este género también se encuentran el virus del fibroma de la ardilla y el fibroma de la liebre. Estos virus son transmitidos por artrópodos picadores, no tienen hemaglutinina y presentan antigenicidad cruzada dentro del género. Los signos visibles en la mixomatosis consisten en tumoraciones edematosas en labios, hocico, párpados, base de las orejas, ano y genitales, estado febril intenso, dificultad respiratoria y agonía prolongada. El virus puede permanecer por largos períodos en lesiones de piel.

El género *Suipoxvirus* incluye al virus de la viruela del cerdo, transmitido principalmente por la picadura del piojo *Haematopinus suis*. La enfermedad presenta un cuadro febril intenso, pérdida de peso y formación de pústulas en todo el cuerpo. La actividad viral deja en las células cuerpos de inclusión intracitoplásmicos y vacuolización nuclear que ayudan al diagnóstico.

El género *Parapoxvirus*, incluye el virus del ectima contagioso ovino, entre otros. Son virus que no producen hemaglutinina, pero sí dejan cuerpos de inclusión intracitoplásmicos. Las lesiones primarias son pápulas, luego pústulas y finalmente úlceras y costras en labios y boca de los corderos y en menor grado en las ubres de los adultos sin inmunidad. Se desarrollaron vacunas a virus vivo que se aplican por escarificación. El virus tiene la capacidad de permanecer por largo tiempo en costras y restos de materia orgánica.

En el hombre, el virus de la viruela acompañó a la humanidad a lo largo de los siglos, quizá el primer antecedente lo vemos en la momia de Ramsés V que muestra la erupción en el rostro, hasta la definitiva erradicación mediante el uso de vacunación. En octubre de 1977 en Somalia se presentó el último caso reportado, luego se destruyó todo el material que podría contener virus en laboratorios y hospitales. Hoy se lo considera una posible amenaza del bioterrorismo.

BIBLIOGRAFIA

Gramenzi F, Rossi GA. Sviluppo e Caratteristiche del virus del Difiero-Vaiolo Avviare Inoculato nella Cavità Corion-alantiodea di Embrione di Pollo Vet Ital. 1967; 18 37-56.

Huraux JM, Nicolas JC, Agut H. Virologie Ed Flamarion Medicine-Ciences. 1985

Johnson BJ, Castro AE. Canary pox causing High mortality in an aviary. JAVMA 1986; 189: 1345-1347.

Mohanty SB, Dutta SK. Virologia Veterinaria Ed. Interamericana. 1981.

Pagés-Manté A. Vacunaciones en cunicultura. Revisión de la investigación en Mixomatosis y Enfermedad Vírica Hemorrágica. Cunicultura. 2004; 168: 85-91.

Picavet DP, Lebas F, Gilabert Y, Brignol E. Immunisation du Lapereau contre la Myxomatose a l'aide d'un Vaccin Homologue Revue Med Vet 1989; 140 823-827.

Rao TV, Brandyopadhyay SK. A Comprehensive Review of Goat Pox and Sheep Pox and their Diagnosis. Animal Health Research Reviews 2000; 1 127-136.

Rosell JM. Enfermedades del conejo. Ediciones Mundi-Prensa. 2000.

Rosenthal SR, Merchlinsky M, Kleppinger C, Goldenthal K. Developing New Smallpox Vaccines. Emergin Infetious Diseases 2001; 7: 920-926.

Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ. Enfermedades del Cerdo 8ª edición. Inter-Médica 2000.

www.ncbi.nlm.nih.gov

www.stanford.edu

www.atcc.org

Capítulo 61

CIRCOVIRUS

Celina Buscaglia

CARACTERISTICAS DE LA FAMILIA

La familia Circoviridae, una nueva familia de virus encontrados en mamíferos y aves, muy relacionados con un grupo de virus de las plantas conocido como Nanovirus, ha sido designada así sobre la base de la configuración circular del genoma. Tiene dos géneros: *Gyrovirus* y *Circovirus*. El virus de la anemia infecciosa de los pollos (VAIP) es el único miembro del género *Gyrovirus*, mientras que el *Circovirus* porcino y el de la enfermedad del pico y plumas de los psitácidos son hasta el momento los únicos miembros del género *Circovirus*.

En este capítulo se describe al VAIP como ejemplo de la familia.

Virus de la anemia infecciosa de los pollos (VAIP)

MORFOLOGIA, COMPOSICION QUIMICA Y DNA VIRAL

Los viriones de VAIP consisten en partículas icosaédricas no envueltas con un diámetro promedio de 25-26,5 nm. El VAIP tiene una densidad de flotación de 1,33-1,34 g/ml en CsCl y es muy estable: resiste tratamientos con solventes orgánicos como el éter y cloroformo y sobrevive a temperaturas de 70 °C durante 1 hora. El VAIP es susceptible a desinfectantes como el hipoclorito al 5% (2 horas a 37 °C), yodóforos, formalina y fenol al 50% durante 5 minutos. El genoma del VAIP consiste en una cadena de DNA simple, circular, unida covalentemente y con polaridad negativa, de un tamaño aproximado de 23 kb.

Se observan comúnmente dos tipos de partículas, de acuerdo a la simetría rotativa de la cápside viral: las tipo I, donde las subunidades (capsómeros) forman una superficie de aspecto de red, y las tipo II que se caracterizan por poseer protrusiones en la superficie. Las tres proteínas virales VP1, VP2 y VP3 pueden asociarse con cuerpos apoptóticos que se muestran como estructuras electrónicas densas. La proteína no estructural de 30-40 VP2, probablemente esté actuando durante el ensamblaje del virión, así la VP1 se dobla de manera correcta. Esta proteína viral VP1 de 50 k es la única proteína detectada en partículas virales altamente purificadas y resulta probable que sea la principal proteína de la cápside. La tercera proteína viral VP3 se asocia con el núcleo en células infectadas pero no con partículas virales altamente purificadas.

REPLICACION VIRAL

Se describirá en base a estudios realizados in vitro en células MSB-1. Estas son células tumorales derivadas de neoplasias producidas por el virus de la enfermedad de Marek y fueron las primeras células donde se replicó el VAIP. Los viriones probablemente ingresan a la célula por adsorción y penetración convencional. Ocho horas posinfección pueden demostrarse bajos niveles de RNA de transcripción, alcanzando niveles máximos a las 48 horas. La proteína viral VP3 puede detectarse ya a las 6 horas posinfección, la VP2 está presente a las 12 horas posinfección, mientras que la proteína de la cápside VP1 no se detecta hasta 30 horas después. La replicación del DNA probablemente ocurra por el modelo "círculo rodante". El sitio de iniciación para la replicación de DNA no ha sido aún identificado. El VAIP produce cuerpos de inclusión intranucleares en forma de "rosquilla".

La replicación de VAIP en las aves ocurre primariamente en los hemocitoblastos de la medula ósea y en las células T precursoras en la corteza del timo. La replicación viral también ha sido demostrada en otros órganos, donde es frecuente aunque no siempre asociada con linfocitos. La replicación del virus resulta en muerte celular por apoptosis causada por VP3 (también llamada apoptina).

PATOGENESIS

Los eventos básicos durante la patogénesis de la infección con el VAIP fueron dilucidados por estudios secuenciales histopatológicos, ultraestructurales y de inmunohistoquímica. Los hemocitoblastos en la médula ósea y linfoblastos en la corteza del timo son los primeramente involucrados en la infección citolítica temprana a los 6-8 días posinoculación, llevando a una rápida depleción de estas células por apoptosis. Además, se han observado en la medula ósea proeritroblastos agrandados, células hematopoyéticas en degeneración y macrófagos con ingestas de células hematopoyéticas degeneradas. En contraste con el timo, antes de los 10-12 días posinoculación no se detectan depleción de células linfoides y necrosis ocasional en la bolsa de Fabricio, bazo y focos linfoides de otros tejidos. La repoblación del timo con linfocitos y de la médula ósea con proeritroblastos y promieloblastos y la actividad hematopoyética recuperada desde los 16 días a partir de la inoculación, parecen coincidir con el comienzo de la aparición de anticuerpos. Estos eventos resultan en un restablecimiento completo entre los 32-36 días. Estudios inmunohistoquímicos demostraron que el VAIP se replica en linfoblastos de la corteza del timo y un número elevado de linfocitos tímicos corticales devienen positivos al virus a los 4-6 días posinfección. También se han detectado antígenos de VAIP en hemocitotoblastos y células reticulares de la médula ósea y en linfocitos maduros del bazo. En el timo y la médula ósea, las células infectadas son más abundantes a los 6-7 días posinfección y pueden ser detectadas hasta 10-12 días o aun más tarde. Antígenos virales han sido encontrados también en tejidos linfoides de muchos otros órganos. Estas células infectadas no pueden detectarse por más de 22 días después de la infección al día de edad, aunque el virus puede persistir en los tejidos hasta 28 días y en el contenido rectal hasta 49 días o más.

RESPUESTA INMUNE

La respuesta de anticuerpos es la mayor arma de protección inmunitaria frente al VAIP, pero no se detectan anticuerpos neutralizantes hasta después de 3 semanas posinoculación de aves

susceptibles de 1 día de vida. Yuasa y col. comunicaron que el incremento en la producción de anticuerpos coincide con una disminución de la concentración viral en los tejidos de las aves.

La seroconversión en reproductores infectados en forma horizontal puede detectarse tan pronto como a las 8-9 semanas de edad y la mayoría de los planteles tienen anticuerpos contra VAIP a las 18-24 semanas. Los anticuerpos maternos proveen protección contra el VAIP en los pollitos siempre y cuando éstos no estén inmunológicamente comprometidos por otros factores. La aparición de brotes de anemia infecciosa en el campo se correlaciona con la ausencia de anticuerpos anti-VAIP en los lotes de los padres respectivos.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

El virus puede ser aislado de la mayoría de los tejidos con un título viral máximo a los 7 días posinfección. Se prefiere el hígado o los linfocitos del bazo como fuentes para el aislamiento del virus. Para ello se inoculan pollitos SPF (libres de patógenos específicos) de 1 día de edad, y 14 a 21 días posinoculación se debe hacer un hematócrito que debe ser inferior a 27% (diagnóstico presuntivo). La confirmación puede hacerse por PCR o técnicas inmunohistoquímicas. También pueden inocularse células MSB-1 y observar un efecto citopático, pero se prefiere la inoculación de pollitos susceptibles.

ENFERMEDAD DE MAYOR IMPORTANCIA EN VETERINARIA

El VAIP fue aislado por primera vez en 1979 en Japón por Yuasa y col. cuando investigaban un accidente ocurrido en el campo donde se encontraban implicados el virus de reticuloendoteliosis y una vacuna de enfermedad de Marek contaminada. Posteriormente Yuasa demostró que el virus no crece en monocapas de cultivos celulares convencionales, pero que es citopatogénico en cultivos de ciertas líneas celulares linfoblásticas de ave. Esto nos permite evaluar la presencia de anticuerpos contra anemia infecciosa de los pollos (AIP) mediante uso de tests de inmunofluorescencia indirecta.

Se cuenta con evidencia virológica y serológica abundante para decir que AIP está presente en la mayoría de los países productores de aves del mundo. Ha sido aislado en Japón, numerosos países europeos, Israel, EE.UU., Canadá, Australia, Brasil y Argentina.

La AIP también se denomina ala azul, síndrome hemorrágico, síndrome de la anemia y dermatitis. Se caracteriza por anemia aplásica, depleción linfoidea en todos los tejidos linfo y hemopoyéticos, hemorragias subcutáneas e intramusculares y un incremento en la mortalidad. La inmunosupresión inducida por el virus puede resultar en depleción de la inmunidad vacunal, por ello se la considera, entre otras cosas, como una de las principales causas de los inexplicables brotes de enfermedad de Marek a campo de aves vacunadas. Al ser una enfermedad inmunosupresora, consecuentemente, la anemia infecciosa se complica con infecciones secundarias producidas por virus, bacterias u hongos como por ejemplo hepatitis vírica a cuerpos de inclusión, dermatitis gangrenosa o aspergilosis. La AIP desempeña un papel muy importante en la etiología de las enfermedades multifactoriales que están asociadas con la anemia aplásica, síndrome hemorrágico, dermatitis gangrenosa, y signos aparentes de inmunosupresión. La mortalidad en lotes de parrilleros afectados oscila entre el 10 y 20%, pero puede ser de hasta el 60%.

El pollo es el único hospedador natural y experimental del virus de la anemia. Todas las edades son susceptibles a la infección, pero la susceptibilidad decrece rápidamente en aves inmunológicamente intactas durante las primeras 2-4 semanas de vida. Estas aves son aquellas que no han sido timectomizadas ni bursectomizadas, o que no han tenido otra infección concomitante que dañe el sistema inmunológico no comprometido. La transmisión vertical es la más importante y puede ocurrir durante 3 a 6 semanas. Una vez que los planteles reproductores han seroconvertido, la progenie está protegida y la transmisión a través del huevo aparentemente ya no se produce. La sintomatología que se observa en pollos inoculados experimentalmente se manifiesta a los 10 días posinoculación. Las aves afectadas se encuentran decaídas, sufren retardos en el crecimiento, reducción temporal de la ganancia de peso, anorexia, inmunosupresión y anemia. Los valores del hematócrito son inferiores al 27% y pueden reducirse hasta llegar al 6%. La atrofia del timo se observa en forma más consistente, pero la atrofia de la médula ósea es la lesión más característica. Las aves que sobreviven 20 a 28 días posinoculación se recobran completamente de la anemia, aunque pueden producirse infecciones bacterianas secundarias en la piel.

Debe prestarse atención en los procedimientos de manejo e higiene para prevenir la inmunosupresión provocada por factores ambientales o enfermedades infecciosas y evitar de esta forma la exposición temprana al virus. Aunque la erradicación de la anemia sería virtualmente imposible en el campo, es fundamental en los planteles SPF para producir vacunas seguras y disponer de aves susceptibles para diagnóstico y experimentación.

PROFILAXIS Y TRATAMIENTO

Las estrategias vacunales se basan en la prevención de la trasmisión vertical inmunizando los reproductores entre las 13-15 semanas de edad, lo que reduce la incidencia de anemia en pollitos. Se encuentran disponibles comercialmente vacunas vivas que nunca deben suministrarse después de 3-4 semanas antes de la primera recolección de huevos para incubar, para evitar el peligro de que los virus vacunales se transmitan a través del huevo. Las vacunas se pueden suministrar en el agua de bebida o por inyección en presencia de adyuvantes. No hay disponibles tratamientos específicos para pollitos afectados por el VAIP, a no ser el uso de antibióticos de amplio espectro para controlar infecciones bacterianas usualmente asociadas con la AIP.

BIBLIOGRAFIA

Buscaglia C. ¿Qué es la Anemia Infecciosa de los Pollos? CAPIA Informa. La revista de la Cámara Argentina De Productores Avícolas. No. 136. Diciembre 1990. p. 10-11.

Buscaglia C, Crosetti CF, Nervi P. Identification of chicken infectious anaemia, isolation of the virus and reproduction of the disease in Argentina. Avian Pathology 1994; 23: 297-304.

Buscaglia C, Thoya Y. Serologic survey for Antibody Against Chicken Infectious Anemia Virus in Argentina. Proceedings of the 46th Western Poultry Disease Conference, 1-4 de marzo de 1997. Sacramento, California, EE.UU. p. 32-33

Calnek BW, Lucio-Martinez B, Cardona CJ, Harris RW, Schat KA, Buscaglia C. Comparative susceptibility of Marek's disease cell lines to chicken infectious anemia virus. Avian Diseases 2000; 44:114-24.

Schat KA. Circovirus Infections. 11th Edition Diseases of Poultry, Editorial Board for the American Association of Avian Pathologists. Iowa State Press (EE.UU.), 2003; p.181-202.

Yuasa N, Taniguchi T, Yoshida I. Isolation and some characteristics of an agent inducing anemia in chicks. Avian Diseases 1979; 23: 366-385.

Yuasa N, Taniguchi T, Imada T, Hihara H. Distribution of chicken anemia agent (CAA) and detection of neutralizing antibody in chicks experimentally inoculated with CAA. Natl. Inst. Animal Health Q (Japan) 1983 23:78-81

Capítulo 62

ASFARVIRUS

José Manuel Sánchez-Vizcaíno

CARACTERISTICAS DE LA FAMILIA VIRAL

La familia Asfarviridae y género *Asfivirus* está formada únicamente por el agente etiológico causante de la peste porcina africana (PPA). Es un virus DNA con envoltura, de gran tamaño y de simetría icosaédrica. Posee características morfológicas similares a los *Iridovirus* y la organización del genoma viral es semejante a los *Poxvirus*.

La partícula viral, de 200 nm de diámetro, está compuesta por tres envolturas concéntricas, con una envoltura externa adicional de forma hexagonal que adquiere al salir por gemación a través de la membrana de la célula infectada (fig. 62-1, tabla 62-1). En el interior de la partícula se encuentra el DNA viral de doble cadena de 170-190 kb de tamaño, dependiendo del aislado viral, similar al virus de la vacuna (virus vaccinia), con los extremos unidos covalentemente y repeticiones terminales invertidas.

Estudios de variabilidad demuestran que el DNA viral está constituido por una región central más conservada (con una región que exhibe cierta variabilidad) de aproximadamente 125 kb y dos regiones variables situadas en los extremos de la molécula, donde se localiza la mayor diversidad. Se han identificado hasta 34 proteínas estructurales y más de 100 proteínas de infección en macrófagos infectados por el virus, de las cuales al menos 50 son inmunogénicas e inducen anticuerpos en la infección natural.

Las partículas virales son termolábiles y sensibles a solventes lipídicos, pero muy resistentes a un amplio rango de pH (tabla 62-2).



Figura 62-1. Asfarvirus. Se observa una partícula viral de forma hexagonal.

REPLICACION VIRAL

El virus infecta naturalmente a células del sistema inmune, los monocitos-macrófagos, produciendo un fenómeno característico de hemoadsorción antes de la destrucción de la célula infectada (fig. 62-2). También se ha observado replicación viral en células endoteliales, hepatocitos, células epiteliales tubulares renales y neutrófilos. No se ha descrito la infección de linfocitos T o B.

Tabla 62-1. Características de la partícula y del genoma viral

Características de la partícula viral	**Características del genoma viral**
• Tamaño medio de 200 nm	**Masa molar:** 100,1 g mol^{-1}
• Núcleo electrodenso de 80 nm	**Densidad en CsCl:** 1,7 g cm^3
• Al menos tres envolturas y una adicional en el virus extracelular	**Coeficiente de sedimentación:** 60 s
	Longitud: 58 nm

Tabla 62-2. Características principales del virus de la peste porcina africana (VPPA)

Algunas características fisicoquímicas del VPPA

- Se inactiva a pH < 4 y > 11, aunque dependiendo del medio en que se encuentre, la inactivación puede necesitar horas o incluso días.
- Se inactiva por calor a 56 °C durante 60-70 min y 60 °C durante 20 min.

Inactivantes/Desinfectantes:

- Hidróxido sódico al 2% durante 30 min.
- Hipoclorito (cloro al 2-3%) durante 30 min.
- Formalina (3/1000) durante 30 min.
- Compuestos fenólicos.
- Compuestos de yodo.

Igualmente replica de forma natural en garrapatas del género *Ornithodorus moubata* y *O. erraticus*.

El VPPA se ha podido adaptar en distintas líneas celulares estables sobre las que produce efecto citopático. Entre ellas, fundamentalmente se utilizan, tanto para estudios de investigación como para la producción de reactivos, las líneas de riñón de mono MS (monkey stable) y Vero. La entrada del virus en la célula tiene lugar por un mecanismo de endocitosis mediada por receptor.

PATOGENESIS

El cerdo es la única especie doméstica que se infecta naturalmente por el VPPA. Los jabalíes europeos y americanos son también susceptibles a la infección, con síntomas clínicos y mortalidad similar a la observada en cerdos domésticos. Por el contrario, los suidos africanos presentan usualmente infecciones de tipo subclínico e inaparente, actuando como reservorios de la enfermedad.

La transmisión de la enfermedad se realiza fundamentalmente por contacto directo de un animal enfermo o portador a un animal sano, o también a través de restos de alimentos elaborados con carne fresca contaminada, procedente de países endémicos afectados, que se utilizan para la alimentación del ganado. Los productos comerciales curados (jamón, lomo, etc.) o los tratados por calor no presentan virus activo.

La entrada del VPPA en el cerdo normalmente ocurre por vía oronasal, aunque son también posibles otras rutas como la cutánea (por escarificación o picadura de garrapatas), intramuscular, subcutánea e intravenosa. El período de incubación varía en un rango de 3 a 21 días, dependiendo del aislado, dosis de inoculación y ruta de exposición. La replicación primaria tiene lugar en los monocitos y macrófagos de los ganglios linfáticos más próximos al lugar de entrada del virus. Los monocitos y macrófagos de las tonsilas y de los ganglios linfáticos mandibulares son los primeros en afectarse si la infección es oral. Desde estos lugares, los virus se diseminan por vía sanguínea, asociados a las membranas de los hematíes, y/o por vía linfática.

La viremia comienza generalmente desde los 2-3 a 8 días posinfección y, debido a la ausencia de anticuerpos neutralizantes, persiste durante mucho tiempo, incluso meses. A medida que el VPPA alcanza diferentes órganos, por ejemplo ganglios linfáticos, médula ósea, bazo, riñón, pulmón e hígado, se produce la segunda replicación.

Las principales células diana del virus de la PPA son las células pertenecientes al sistema mononuclear fagocítico (SMF) que sufren un efecto citopático. Una de las consecuencias del efecto citopático inducido por el virus es la hemoadsorción (adsorción de hematíes de cerdo alrededor de los macrófagos infectados por el virus), y al que se ha responsabilizado del transporte pasivo de los virus por los eritrocitos. También se ha observado replicación viral en células endoteliales, hepatocitos, células epiteliales tubulares renales y neutrófilos.

RESPUESTA INMUNE

El papel que juegan los distintos mecanismos inmunológicos de base humoral y celular durante la infección por el VPPA no es del todo bien conocido. Se han descrito distintos mecanismos efectores celulares y humorales durante la infección del VPPA, pero todavía no se conoce cuál es su implicación en la protección frente a la infección.



Figura 62-2. Asfarvirus. Hemoadsorción de monocitos-macrófagos.

Desde el punto de vista inmunológico, la PPA se caracteriza por una linfopenia, debido a la apoptosis*, fundamentalmente de los linfocitos T localizados en las zonas T-dependientes de los órganos linfoides, aunque no se ha podido demostrar replicación viral ni en linfocitos T ni B.

La respuesta tanto humoral como de base celular no parece estar afectada, aunque los mecanismos de protección frente a cepas homólogas virulentas siguen sin estar suficientemente aclarados. Anticuerpos neutralizantes, en el concepto clásico, no han sido identificados por lo que la diferenciación de cepas o distintos serotipos por los métodos serológicos no es posible. Por otra parte, se han identificado linfocitos CD 8 procedentes de animales infectados, capaces de destruir macrófagos infectados de PPA, lo que sugiere que la inmunidad celular tampoco está afectada. No obstante, el papel que los anticuerpos o la respuesta celular pueda jugar en los mecanismos de protección frente al virus de la PPA no es del todo bien conocido. El virus de la PPA induce prolongadas viremias, probablemente como consecuencia de la falta de anticuerpos neutralizantes efectivos. Una de las razones por las que el virus escapa a la respuesta inmune puede ser que el genoma viral codifica varias proteínas que interfieren con la respuesta inmune, lo que explicaría la persistencia viral en los animales domésticos aparentemente recuperados y en los cerdos salvajes africanos.

La infección por VPPA origina una respuesta de anticuerpos específicos de gran magnitud, que es fácilmente detectable por las técnicas de diagnóstico laboratorial a partir del día 7 posinfección. Los anticuerpos específicos perduran durante mucho tiempo, incluso años, y están implicados en un retraso en la aparición de síntomas clínicos y una reducción de los niveles de viremia. Sin embargo, estos anticuerpos no poseen capacidad de neutralización total del virus de la PPA.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Debido a la gran variedad de síntomas y lesiones diferentes que se pueden producir en la infección por el virus de la PPA y a la similitud con otras enfermedades hemorrágicas del cerdo, el diagnóstico de laboratorio es esencial en la PPA. En la actualidad se dispone de numerosos métodos para llevar a cabo tanto el diagnóstico virológico como serológico. En la figura 62-3 se representan esquemáticamente los métodos empleados para el diagnóstico de la PPA.

* Fenómeno de muerte celular programada.

Diagnóstico virológico

Las técnicas más utilizadas para la detección del virus son la hemoadsorción, la inmunofluorescencia directa y la PCR.

Hemoadsorción

El aislamiento del virus de la PPA se realiza en cultivos primarios de macrófagos porcinos. El VPPA es capaz de infectar y replicarse de forma natural en cultivos de leucocitos de sangre periférica de cerdo, donde además de producir un efecto citopático en los macrófagos infectados, previamente a la lisis celular origina un efecto característico de hemoadsorción. La imagen al microscopio se presenta en forma de mórula o corona (roseta) de eritrocitos alrededor de los leucocitos.

La técnica de hemoadsorción sigue siendo hoy día el método más sensible y específico para identificar el VPPA, ya que ninguno de los restantes virus porcinos produce este efecto; no obstante, su utilización es laboriosa y carece de la rapidez de otros métodos de diagnóstico, ya que requiere de al menos 5-10 días para la obtención de los resultados. Es la técnica de referencia frente a otros métodos de diagnóstico más rápidos, aunque es importante recordar que existen algunas cepas de VPPA no hemoadsorbentes. En estos casos deben realizarse análisis adicionales del sedimento celular, mediante PCR o inmunofluorescencia directa, para confirmar la presencia del virus.

Inmunofluorescencia directa

Está basada en la detección de antígenos virales sobre cortes o improntas de tejidos, mediante reacción con un conjugado fluorescente antivirus PPA. Es un método muy sencillo, rápido y sensible, pudiendo también aplicarse sobre cultivos celulares infectados con macerados de órganos o tejidos de cerdos sospechosos. Las imágenes que se observan al microscopio son la presencia en las células infectadas de inclusiones citoplasmáticas de fluorescencia intensa. Cuando la infección es avanzada, la fluorescencia específica puede presentar un aspecto granular.

Técnica de PCR (polymerase chain reaction)

Es una técnica muy sensible y específica, en la cual se evidencia la presencia del virus mediante amplificación del DNA viral presente en la muestra. La técnica de PCR emplea *primers* dirigidos a una zona altamente conservada del genoma, permitiendo detectar el amplio abanico de aislados de VPPA conocidos, incluyendo cepas hemoadsorbentes y no hemoadsorbentes. Actualmente es utilizada en los Laboratorios de Referencia para el diagnóstico virológico y de confirmación de esta enfermedad. Puede ser empleada tanto en muestras de tejidos como de suero de animales con síntomas clínicos, luego de una prolongada viremia. Por esta técnica el virus puede ser detectado en sangre a partir del segundo día de la infección durante semanas.

También han sido adaptadas técnicas como el ELISA sandwich o el inmunodot, pero son menos utilizadas ya que si bien muestran una sensibilidad muy elevada en las fases tempranas de la infección, esta sensibilidad disminuye drásticamente a partir de los 9-10 días posinfección.

Diagnóstico serológico

Dado que no existe ninguna vacuna disponible frente al VPPA, la presencia de anticuerpos específicos frente al virus es indicativa de la enfermedad. En la actualidad las técnicas más utilizadas para la detección de anticuerpos de PPA son: la inmunofluorescencia indirecta (IFI), el ELISA indirecto y el inmunobloting (IB).

Inmunofluorescencia indirecta

Es una técnica rápida, que presenta una buena sensibilidad y especificidad, donde los anticuerpos específicos presentes en suero o exudados se hacen reaccionar sobre un tapiz celular infectado con el virus. La reacción es visualizada gracias a la adición de proteína A marcada o de un segundo anticuerpo anti-IgG de cerdo marcado con fluoresceína. En el caso de las muestras positivas sobre el tapiz celular se localizan fluorescencias en determinados puntos cercanos al núcleo que serán los centros replicativos del virus.

ELISA

Es la metodología utilizada para llevar a cabo estudios epizootiológicos y de control a gran escala. La técnica ELISA que se emplea actualmente utiliza un antígeno soluble que contiene la mayoría de las proteínas del virus. Este método posee una gran sensibilidad y especificidad, es sencillo, rápido y económico. Recientemente se han desarrollado nuevos ELISA con reactivos no infecciosos, que emplean como antígenos virales las proteínas recombinantes p32, p54 y pp62, de sensibilidad y especificidad superior al actual cuando se analizan sueros mal conservados.

Inmunobloting

Es una técnica inmunoenzimática que utiliza como soporte antigénico filtros de nitrocelulosa, con proteínas virales previamente transferidas, sobre las cuales se hace reaccionar el suero sospechoso, realizando la detección de anticuerpos específicos con proteína A-peroxidasa. La técnica de IB permite determinar la reactividad de los anticuerpos presentes en el suero frente a distintas proteínas inducidas específicamente por el virus de la PPA. Esta característica, junto con su alta sensibilidad y objetividad, la convierten en la técnica idónea para el diagnóstico serológico de confirmación de la PPA.

En la figura 62-3 se resumen las pautas para el diagnóstico de la PPA.

Remisión de muestras para el diagnóstico

Para el diagnóstico de PPA deben remitirse muestras de tejidos de bazo, riñón y ganglios linfáticos, así como sangre tomada en fases febriles, con anticoagulante (EDTA). Para las pruebas serológicas, enviar suero de los animales sospechosos.

Asimismo es importante adjuntar una ficha de la historia clínica que debe colocarse en el exterior de la caja de envío de muestras en un sobre cerrado.

IMPORTANTE. Al tratarse de una enfermedad exótica y de alto riesgo sanitario las muestras deben ser enviadas en contenedores y con las medidas de bioseguridad adecuadas.

ENFERMEDAD DE MAYOR IMPORTANCIA EN VETERINARIA

La PPA está clasificada en la lista A de la Oficina Internacional de Epizootias, es decir, se la considera como una enfermedad de gran poder de difusión y especial gravedad con consecuencias socioeconómicas y sanitarias graves para los países afectados.

Aspectos clínicos de la enfermedad

Los aspectos clínicos asociados a la PPA pueden ser muy variados, ya que dependen de la virulencia del aislado viral,

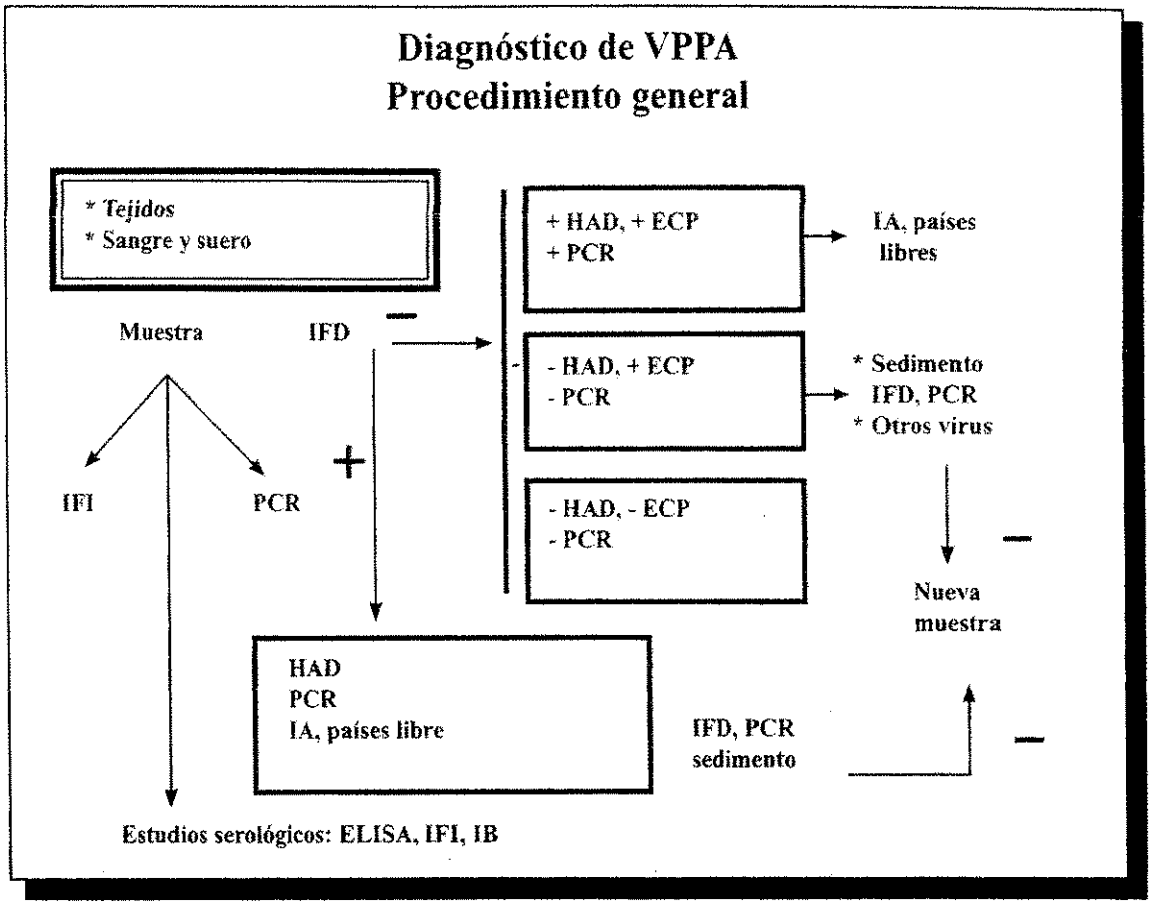


Figura 62-3. Diagnóstico de VPPA. Procedimiento general. IFI: inmunofluorescencia indirecta, IFD: inmunofluorescencia directa, IA: inoculación de animales, ECP: efecto citopático, PCR: reacción en cadena de la polimerasa, HAD: hemoadsorción, IB: inmunoblot, ELISA: prueba de inmunoabsorción ligada a enzimas.

dosis y ruta de infección, la raza y la condición física del cerdo. Las cepas africanas del VPPA generalmente inducen enfermedad hiperaguda o aguda, mientras que los aislados europeos pueden inducir cuadros agudos-subagudos, crónicos o inaparentes. Los cerdos domésticos europeos y los jabalíes son muy susceptibles y muestran un amplio rango de síntomas clínicos desde agudo y subagudo a crónico. Los cerdos salvajes africanos son muy resistentes a la infección y generalmente no presentan lesiones. Las formas agudas, de mortalidad muy elevada, cursan con alteraciones de carácter congestivo-hemorrágico y trastornos funcionales digestivos y respiratorios.

Distribución geográfica

En la actualidad la PPA está presente en numerosos países subsaharianos del continente africano, en la mayoría de los cuales la enfermedad es endémica, lo que representa un grave problema para los países libres de PPA que mantienen relaciones comerciales, turísticas o de vecindad. En Europa, fue erradicada de la península ibérica en 1995, tras la aplicación de un programa de erradicación basado principalmente en la detección de todos los animales positivos y portadores, mediante un estudio serológico masivo con la técnica ELISA, la eliminación de todas las explotaciones positivas y la incorporación de medidas de bioseguridad y control de movimiento de los animales. En Cerdeña, Italia, la enfermedad sigue presente, fundamentalmente, debido a los sistemas de producción extensivos y a las condiciones geográficas que dificultan enormemente la separación de los animales domésticos de los salvajes o asilvestrados. En noviembre de 1999 se produjo un nuevo brote en el Alentejo, sur de Portugal, cuyo origen no ha sido todavía aclarado y que parece estar ligado a infecciones de tipo crónico retroalimentadas por la presencia de garrapatas infectadas y la producción porcina extensiva.

En el continente americano la enfermedad ha estado presente en Brasil (1978), Cuba (1971, 1980), Haití (1979), y República Dominicana (1978) de donde fue erradicada con éxito. Argentina nunca estuvo afectada por la PPA

Profilaxis y tratamiento

No existe ningún tratamiento efectivo ni una vacuna segura para esta enfermedad. Los ensayos con vacunas inactivadas no han demostrado eficacia frente a virus virulentos y los ensayos con vacunas atenuadas protegen a algunos animales frente a los virus homólogos, pero no frente a virus heterólogos. Tampoco se ha conseguido protección con proteínas virales ni con virus delecionados hasta la fecha. Por todo ello, la lucha contra la PPA se basa en medidas preventivas. La prevención en las áreas libres se basa en la aplicación del "análisis de riesgo" conforme a la metodología científica aprobada por la OIE. En el caso de la PPA, consiste en la prohibición de las importaciones de animales vivos, semen o embriones y carnes frescas procedentes de animales de áreas afectadas. En caso de infección, la principal medida es la detección rápida de la enfermedad y la aplicación de estrictas medidas de bioseguridad y sacrificio de los animales afectados y sospechosos.

OTRAS ENFERMEDADES DE IMPORTANCIA PRODUCIDAS POR ASFARVIRUS EN ANIMALES DOMESTICOS

Como indicábamos al principio de este capítulo, el virus que produce la peste porcina africana es el único miembro de esta familia viral.

AGRADECIMIENTOS

Las fotos, gráficos y tablas han sido reproducidos de nuestro trabajo de peste porcina africana publicado en la web: *www.sanidadanimal.info* (véase Bibliografía).

BIBLIOGRAFIA

Arias M, Sánchez C, Carrasco M, González MA, Sánchez-Vizcaíno JM. Peste porcina africana. Curso digital sobre enfermedades infecciosas porcinas, Ed. JM. Sánchez-Vizcaíno, 2002; *http://www.sanidadanimal.info*.

Arias M, Sánchez-Vizcaíno JM. African Swine Fever in Trends in Emerging Viral Infections of Swine, Ed A. Morilla, K. Jin and J. Zimmerman. Iowa State University Press, Iowa, (USA), 2002; p 119-124.

Blasco R, Agüero M, Almendral JM, and Viñuela E., Variable and constant region in African swine fever virus DNA. Virology 1989; (168): 330-338.

Gómez-Villamandos J.C, Hervás J, Méndez A, Carrasco L, Martín de las Mulas J, Villeda C.J, Wilkinson P.J, Sierra M.A. Experimental African swine fever: apoptosis of lymphocytes and virus replication in other cells. J Gen Virol, 1995; (76): 2399-2405.

Mebus C, House C, Ruiz F, Pineda JM, Tapiador J, Pire J, Bergada J, Yedlontshning R, Sahu S, Becerra V, Sánchez-Vizcaíno JM. Survival of Foot and mouth disease, African swine fever and Hog cholera virus in Spanish serrano cured hams and Iberian cured hams, shoulder and loin. Food Microbiology 1993; (10):133-143.

Office International des Epizooties (OIE). African swine fever. Manual of Standards for diagnostic test and vaccines, 2000.

Sánchez-Vizcaíno JM. African Swine Fever Diagnosis. Martinus Nijhoff Publishing. Boston, 1986; p. 63-71.

Sánchez-Vizcaíno J.M. African swine fever. In Diseases of Swine, 8th Edition,. Ed. A.D. Leman, B.E. Straw, W.L. Mengeling, S. Dallaire and DJ. Taylor. Iowa State University Press, Ames (Iowa, USA). 1999; p. 93-102

Yanez RJ, Rodriguez JM, Nogal ML, Yuste L, Enriquez C, Rodriguez JF, Viñuela E. Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus. Virology 1995; (208): 249-278.

Capítulo 63

PARVOVIRUS

Sergio Adrián Samus,
Marcela Sara Testa

INTRODUCCION

Los miembros de la familia Parvoviridae infectan células tanto de vertebrados como invertebrados. El prefijo *parvo* proviene del latín y significa *pequeño*.

Características generales

Acido nucleico DNA de cadena simple y lineal.

Cápside:	icosaédrica con 32 capsómeros
Simetría:	cúbica
Envoltura:	no posee
Diámetro:	18 a 26 nm
Densidad (CsCl):	1,38-1,46 g/ ml
Peso molecular del DNA:	1,5-2,2 x 10^6 (5000 nucleótidos)

La familia Parvoviridae incluye a los virus más pequeños. La falta de envoltura los hace resistentes a los solventes como el éter y cloroformo, su cápside es estable lo que les da resistencia a la temperatura (60 °C) y a pH de 3-9. Son extremadamente resistentes en el medioambiente.

CLASIFICACION

La familia Parvoviridae se divide en dos subfamilias:

- Parvovirinae con los géneros:
  - *Parvovirus*
  - *Erythrovirus*
  - *Dependovirus* (adenoasociados)
  - Virus de la enfermedad aleutiana del visón
  - Parvovirus bovino
- Densovirinae con los géneros:
  - *Densovirus*
  - *Iteravirus*
  - *Brevisensovirus*
  - *Pefudensovirus*

Los representantes de la subfamilia Parvovirinae afectan a vertebrados, principalmente mamíferos y aves, siendo la especie tipo el virus diminuto del ratón *(Mice minute virus, MMV)*, mientras que la subfamilia Densovirinae afecta a artrópodos. En medicina veterinaria tienen especial importancia representantes del género *Parvovirus*.

REPLICACION VIRAL

Su pequeño genoma (apenas 5000 nucleótidos) le genera algunas limitaciones en la replicación, tal es así que sólo pueden replicar en células en plena división (células en fase S), o como en el caso de los adenoasociados (*Dependovirus*) que requieren la presencia de un adenovirus para completar su ciclo de replicación. El DNA es de cadena simple y lineal y presenta una secuencia terminal repetida de 120 a 300 nucleótidos. El extremo 5' es invertido con respecto al 3' generando lo que se denomina secuencia palindrómica.

El genoma es de polaridad negativa en la mayoría de los miembros de esta familia aunque los *Dependovirus* pueden tener DNA de cadenas complementarias (positiva y negativa) pero contenidos en diferentes partículas. Para la transcripción el DNA monocatenario se tiene que convertir en bicatenario para recién transcribirse en mRNA utilizando una transcriptasa celular.

Tanto los procesos replicativos como madurativos ocurren en el núcleo de la célula hospedadora donde dejan cuerpos de inclusión que desplazan la cromatina.

VIRUS DE IMPORTANCIA VETERINARIA

Parvovirus canino

Este agente es causante de gastroenteritis y miocarditis letales en cachorros, con presentación subclínica en adultos. Los cuadros clínicos típicos en cachorros menores de 6 meses muestran letargo, vómitos, deshidratación, diarrea hemorrágica y de olor pútrido, hipotermia y muerte como consecuencia del estado de shock. El cuadro hematológico revela una leucopenia grave.

El parvovirus canino está emparentado con el virus de la panleucopenia felina. Tal es así que se desarrollaron vacunas homólogas atenuadas e inactivadas y también heterólogas con el virus felino para la prevención de la enfermedad. El virus replica en el núcleo de las células del epitelio intestinal y aparato inmunocompetente y endotelios, siempre en células en división activa e, in vitro, en células de líneas caninas y felinas. En éstas a las 12 a 24 horas posinfección se puede apreciar una gran concentración viral en el núcleo celular, detectable por inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa. El virus produce cuerpos de inclusión intranucleares y se libera de la célula provocando un efecto citopático lítico.

Este virus hemaglutina glóbulos rojos de cerdo, lo que permite implementar la técnica de inhibición de la hemaglutinación para rastreos serológicos. El diagnóstico de laboratorio se basa en la detección de antígenos virales por inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa, histopatología y microscopia electrónica en muestras de materia fecal clarificadas y concentradas. La hemaglutinación de glóbulos rojos a partir de muestras de materia fecal es una técnica rápida para el diagnóstico pero está sujeta a muchos factores de error. El diagnóstico serológico se efectúa por inhibición de la hemaglutinación o ELISA.

Parvovirus porcino

La enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en el mundo. Causa un síndrome de infertilidad en la cerda que se caracteriza principalmente por producir momificación de los fetos, reabsorción

embrionaria y eventualmente aborto; afecta por lo general a cerdas primíparas que se infectan durante la gestación. Si el virus alcanza los embriones por vía transplacentaria antes del día 30 de la gestación se producirá la reabsorción embrionaria, mientras que si la infección fetal se produce entre el día 30 y 70 de la gestación tendrá lugar la muerte y momificación fetal; si la infección ocurre luego de los 70 días los fetos responderán con anticuerpos.

Normalmente los fetos van infectándose en forma progresiva dentro del útero, deteniendo su desarrollo y muriendo luego, mientras que los últimos afectados pueden sobrevivir. Es por eso que es muy común observar en los partos de cerdas primíparas, varios fetos momificados de distintos tamaños y algunos lechones vivos. El virus replica en los tejidos del embrión o el feto, siempre en células en división activa, pero no se ven signos clínicos de la enfermedad en la cerda. In vitro puede aislarse en células de línea de origen porcino o en cultivos primarios de células de cerdo, donde inicialmente produce un redondeamiento celular, luego picnosis y lisis, generando cuerpos de inclusión. Mediante técnicas de inmunofluorescencia se puede detectar antígeno viral en el núcleo celular tanto en cultivos celulares como en muestras de fetos. Este virus hemaglutina glóbulos rojos de cobayo, propiedad que se utiliza para el diagnóstico.

RESPUESTA INMUNE

La infección estimula el desarrollo de anticuerpos neutralizantes e inhibidores de la hemaglutinación, con títulos muy altos y duraderos, que se utilizan para diagnóstico serológico. Las cerdas transfieren a los lactantes dichos anticuerpos mediante el calostro protegiéndolos de la infección. La inmunidad pasiva permanece en las cerdas jóvenes durante períodos prolongados interfiriendo con las vacunaciones. Las vacunas utilizadas para inmunizar a las cerdas son inactivadas y se debe vacunar a las primíparas antes del primer servicio y aplicar refuerzos antes de cada nueva gestación.

Todos los aislamientos parecen ser antigénicamente idénticos no habiendo diferenciación de serotipos.

Parvovirus de la panleucopenia felina

Enfermedad de alta mortalidad, muy contagiosa y de manifestación súbita. El cuadro clínico se manifiesta con depresión, hipertermia, anorexia, vómitos y diarrea, progresando a hipotermia y muerte. Es característico el cuadro hemático por la leucopenia. El virus replica en células del aparato inmunocompetente, ganglios, médula ósea, timo y también en epitelio intestinal y la infección en el feto afecta además al cerebelo generando a los pocos días de nacer trastornos nerviosos en los gatitos.

El virus puede aislarse en células de riñón felino a partir de muestras de bazo u otros órganos afectados. Este virus, además, hemaglutina glóbulos rojos de cerdo. Para la prevención se dispone de vacunas vivas atenuadas y vacunas inactivadas. El virus es muy resistente en el medio ambiente y puede permanecer por períodos prolongados.

Otros parvovirus que podemos señalar son el de la hepatitis del ganso, el virus Kilham de la rata, el virus diminuto del ratón, el parvovirus del pollo, el de la enteritis del visón, etc. Con importancia en medicina humana dentro del género *Erytrovirus*, encontramos el virus B19 causante de la enfermedad eruptiva en niños y crisis aplásicas en anemia hemolítica.

Los dependovirus o adenoasociados coinfectan las células con adenovirus y se sirven de parte de sus mecanismos de replicación para poder cumplir su ciclo, pero hasta el presente no se les ha asignado importancia desde el punto de vista patológico.

BIBLIOGRAFIA

Bachman PA, Hoggan MD, Melnick JL, Pereira HG, Vago C. Parvoviridae. Intervirology 1975; 5 :83-92.

Huraix JM, Nicolas JC, Agut H. Virologie Ed. Flamarion Medicine-Sciences 1985

Johnson RH. Serologic Procedures for the Study of Feline Panleukopenia JAVMA 1971; 158: 876-884.

Mohanthy SB, Dutta SK. Virología Veterinaria. Ed. Interamericana 1981.

Paradiso PR, Rhode SL, Singer II. Canine Parvovirus: a Biochemical and Ultrastructural Characterization. L Gen Virol 1982; 62: 113-125.

Shahrabadi MS, Lynch J, Cho HJ, Marusyk RG. Studies en the Multiplication of a Porcine Parvovirus Veterinary Microbiology 7:117-125 1982

Straw BE,D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ. Enfermedades del cerdo. Ed Inter-Médica. 2000.

Capítulo 64

REOVIRUS

Miguel Víctor Píscopo

INTRODUCCION

La familia Reoviridae se divide en 9 géneros, de los cuales 4 afectan a seres humanos y animales: *Orthoreovirus*, *Rotavirus*, *Coltivirus* y *Orbivirus*.

Los *Rotavirus* son uno de los principales productores de diarreas neonatales en el hombre y otros mamíferos.

La familia de los *Reovirus*, incluye a distintas cepas que afectan a los animales, las plantas, los insectos y los seres humanos. En 1959, Sabin logró aislar un *Reovirus* de un cuadro respiratorio y digestivo de poca patogenicidad, producido en seres humanos. Kawamura establece dos subdivisiones de los *Reovirus* de interés médico: de origen mamífero y aviar.

En los mamíferos, los *Rotavirus* asociados a otros agentes y diversos factores ambientales producen diarrea en terneros, corderos, cabritos, lechones y potros. En 1969, en Estados Unidos, se aisló por primera vez el *Rotavirus* del grupo A bovino, como agente causal de un brote de diarrea en terneros.

Los reovirus aviares producen un cuadro característico llamado artritis vírica o tenosinovitis vírica (TV). En 1954, Fahey y Crawley aíslan un reovirus de pollos que padecían un cuadro respiratorio crónico, el cual inoculado en animales susceptibles producía una enfermedad respiratoria moderada, necrosis hepática e inflamación de tendones y membranas sinoviales. En 1957, Olson aisló un agente productor de sinovitis que no era bacteriano. El mismo fue identificado en 1972 por Walker como un reovirus. En 1967, Dalton y Henry acuñan el término de tenosinovitis para definir a las alteraciones causadas por los reovirus en los tendones de las aves. En la Argentina, en 1978, Menéndez y col. realizan el primer aislamiento y descripción de la TV.

Además de causar la TV, los reovirus han sido relacionados con otras afecciones de las aves, tales como empaste de cloaca, miocarditis e hidropericardio. En los últimos 20 años se los ha señalado como responsables de producir el síndrome de malabsorción (SMA) que afecta sobre todo a pollos de carne. Estos animales presentan un cuadro digestivo-diarreico muy parecido al que los reovirus producen en otras especies, incluido el hombre.

CARACTERISTICAS DEL VIRUS

Dentro de la familia Reoviridae, el género *Orthoreovirus* es el que afecta a las aves produciendo distintos cuadros clínicos. Existen diferentes serotipos que pueden identificarse por métodos serológicos o de acuerdo a su patogenicidad relativa para pollos. Diferentes trabajos publicados reconocen entre 4 y 11 serotipos, con distintos grados de relación serológica cruzada. Parece que entre los reovirus aviares existen subtipos antigénicos más que diferentes serotipos.

El tamaño de los reovirus es de 75 nm, carecen de envoltura, poseen un genoma de RNA segmentado de doble cadena, integrada por 10 a 12 segmentos discontinuos y nueve proteínas estructurales, además de poseer varias enzimas. Los viriones poseen dos cápsides concéntricas icosaédricas. Su composición es de 15% de RNA y 85% de proteínas. Son estables al calor, resisten 10 horas a 60 °C, 51 semanas a 22 °C y 3 años a 4 °C, toleran rangos de pH de 3 a 9. Se inactivan con solventes como el etanol al 70% y el yodo orgánico al 0,5%.

REPLICACION VIRAL

Las partículas virales se adhieren a glicoproteínas sialiladas específicas sobre la superficie celular. La proteína responsable de la adhesión de los reovirus a las células es la hemaglutinina viral. Luego de adherirse, el virus penetra dentro de vesículas endoplásmicas las que se fusionan con los lisosomas, los cuales posteriormente degradan la cápside, liberando partículas subvirales al citoplasma celular. Estas partículas subvirales son capaces de transcribir sus segmentos del genoma en mRNA mediante una replicasa viral que se encarga de sintetizar cadenas de sentido negativo para formar los segmentos de doble cadena.

Los reovirus producen cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en las células infectadas.

PATOGENESIS

Las propiedades patógenas de los reovirus se determinan principalmente por la proteína de la cápside del virión. La hemaglutinina σ1 viral es la que se adhiere al receptor celular y marca la afinidad por las diferentes células y tejidos blanco. También desencadena la respuesta humoral y celular del hospedador.

El sitio primario de la infección es el aparato gastrointestinal y está establecido por la proteína μ1 c, allí se produce la replicación del virus y su inmediata diseminación sistémica. Además regula la respuesta inmunitaria a la hemaglutinina σ1.

La virulencia de los reovirus está determinada por la interacción entre múltiples genes virales, celulares y productos génicos.

RESPUESTA INMUNE

Los reovirus poseen antígenos específicos que producen anticuerpos (Ac) precipitantes y neutralizantes. Los Ac neutralizantes aparecen a los 7 a 10 días posinoculación (PI) y los Ac precipitantes 2 semanas PI.

La acción protectora de los Ac es discutida con frecuencia, ya que las aves pueden enfermar en presencia de altos niveles de Ac. En oposición a lo dicho, la presencia de niveles altos de Ac maternos protegen al pollito de 1 día de vida contra el agente viral en forma natural o experimental. La efectividad de esta respuesta antígeno (Ag) Ac tiene explicación correlacionando varios factores, cepa viral, coincidencia de los Ac protectores, títulos de Ac, edad del huésped, etc.

En las aves se han descrito varios serotipos de reovirus, pero se ha observado que la cepa 1133 otorga inmunidad cruzada con

la mayoría de las cepas del virus, tanto de TV como de SMA. En los mamíferos, los Ac contra rotavirus son detectados tanto en individuos jóvenes como en adultos; esto ocurre debido a que las reinfecciones subclínicas se producen aun en presencia de Ac circulantes y por múltiples serotipos de virus. Los Ac maternos protegen durante unas 3 semanas contra la aparición de signología clínica, un 30% de animales nacidos normales pueden eliminar el virus, sin mostrar síntomas debido a una alta presencia de Ac maternos en el calostro.

METODOS DIAGNOSTICOS

El diagnóstico de los reovirus aviares puede realizarse con facilidad: el virus se puede aislar inoculando material sospechoso en saco vitelino (SV) de huevos embrionados (de 5 a 7 días) y en membrana corioalantoidea (MCA) (9 a 11 días). Para el aislamiento se prefiere el SV, en donde se observa la muerte del embrión entre los 3 a 5 días PI. También se pueden utilizar cultivos celulares, como cultivos primarios de fibroblastos, de riñón, o de hígado de embrión de pollo.

Los cultivos de células infectados con reovirus muestran la formación de sincicios 24 a 48 horas después de ser inoculados, seguidos por degeneración de la monocapa de tejido, en la que se observan orificios visibles. En las células infectadas se observan cuerpos de inclusión en su citoplasma.

En las vainas tendinosas de las aves afectadas es posible poner en evidencia el Ag viral por intermedio de Ac fluorescentes. Los métodos serológicos que se utilizan para la detección de Ac son la prueba de precipitación en gel de agar, la inmunofluorescencia indirecta (IFA), o la virus neutralización en placa (VN).

La prueba de ELISA es la más utilizada para todas las especies; en las aves se usa el Ag 1133 de reovirus, en los bovinos los serotipos antigénicos de rotavirus A más frecuentes son los G1, G6, G10 y P1, P5 y P11, y en los equinos y porcinos el serotipo G3.

TENOSINOVITIS VIRICA

La TV produce en pollos y pavos un cuadro característico que afecta principalmente al aparato locomotor. Suele presentarse en aves jóvenes en la etapa de crecimiento; la sintomatología clínica consiste en renguera uni o bilateral, lo que dificulta el movimiento de las aves hacia comederos y bebederos. En aves de 6 a 8 semanas de vida se observa una inflamación de las articulaciones de las patas, en especial en ejemplares más pesados.

Cuando los animales adultos en producción se infectan, el signo clínico más importante es la diarrea, la que se manifiesta durante 4 a 6 semanas. Durante este período se produce la transmisión vertical del virus. Los pollitos nacidos de padres infectados pueden presentar diversos cuadros como diarrea y empaste de cloaca, afecciones respiratorias, trastornos locomotores, etc.

TRANSMISION

La transmisión horizontal es la forma más frecuente de propagación de la enfermedad, aunque existen diferencias entre las distintas cepas, ya que algunas tienen más capacidad de difusión horizontal que otras. El virus se elimina por lo menos durante 10 días PI, tanto por vía digestiva, como respiratoria.

Las aves jóvenes presentan mayor susceptibilidad a la infección por vía respiratoria. El virus permanece por períodos prolongados en las tonsilas cecales y la articulación del tarso, transformando a los animales como potenciales portadores crónicos de la enfermedad.

Los reovirus también se transmiten por vía vertical. Se ha observado que a los 17 días PI, un 1,7% de los pollitos nacidos son portadores del virus.

PERIODO DE INCUBACION

El período de incubación depende de la cepa viral, de la edad del hospedador y de la vía de exposición.

En pollitos de 1 día de vida sin anticuerpos maternos, la enfermedad se propaga rápidamente de acuerdo a la vía de inoculación. En pollos de 2 semanas, la incubación varía de 1 día cuando es inoculado en la almohadilla plantar hasta 11 días cuando se administra por vía intravenosa o intramuscular.

Con el aumento de la edad, las aves y otros animales incrementan la resistencia natural a los reovirus. En la reproducción experimental de la enfermedad, son difíciles de observar los signos clínicos y las lesiones típicas halladas a campo. En estos casos se advierte una respuesta serológica y es posible aislar el reovirus de todos los órganos, por lo menos hasta 20 días PI.

SIGNOS CLINICOS

Los signos clínicos más importantes son las claudicaciones y rengueras, se observan pollos postrados, por lo general con pobre crecimiento, básicamente debido a la dificultad para alcanzar la comida y bebida. A medida que la enfermedad avanza, la renguera se hace más pronunciada y muchas aves pierden por completo la posibilidad de mover la articulación del tarso. En los animales que manifiestan estos signos, se puede apreciar aumento de tamaño en los flexores digitales y extensores metatarsianos. En casos extremos se puede observar la ruptura del tendón de los gastrocnemios.

Lesiones macroscópicas

La lesión observada en pollos que presentan renguera es principalmente hinchazón en la zona de los flexores digitales y extensores del metatarso; esta lesión se aprecia claramente palpando la zona por arriba de la articulación del tarso. El cojinete plantar y el tarso propiamente dicho, se ven afectados en menor medida que los flexores. Si se realiza un corte en la lesión del tarso, drena un exudado transparente a veces sanguinolento, que en caso de contaminarse pasa a ser purulento. En los tendones podemos apreciar edema de las vainas tarsianas y metatarsianas. En las membranas sinoviales, sobre todo encima del tarso, se aprecian hemorragias petequiales con cierta frecuencia. A medida que la enfermedad progresa, la lesión se hace crónica y las vainas pierden elasticidad fusionándose la capa parietal y visceral favoreciendo la ruptura de los tendones. En los cartílagos articulares, sobre todo del tibiotarso, se forman erosiones puntiformes.

Lesiones microscópicas

Las principales lesiones se ubican en las vainas tendinosas, donde en la etapa aguda se nota edema e infiltración de heterófilos. Cuando la lesión progresa se observa hipertrofia e hiperplasia de las células de las vainas sinoviales, con abundante infiltración de linfocitos, macrófagos y heterófilos. Esta lesión

provoca el engrosamiento de las capas visceral y parietal de las vainas tendinosas. Pasados 15 a 20 días, la lesión se hace crónica y las membranas sinoviales desarrollan prolongaciones vellosas, se incrementa la cantidad de tejido conjuntivo y la infiltración y proliferación de células reticulares, linfocitos, macrófagos y células plasmáticas. La fibrosis puede provocar la anquilosis e inmovilidad de las articulaciones.

SINDROME DE MALABSORCION EN POLLOS

El SMA describe un cuadro complejo adjudicado a múltiples causas, una de ellas corresponde a la acción de diferentes cepas de reovirus aviarios. En esta enfermedad los signos clínicos se hacen evidentes a partir de la segunda semana de vida, donde se puede apreciar crecimiento desparejo del lote, falta de pigmentación en piel y plumas, remeras desordenadas, signo por el que algunos autores denominan al cuadro "pollos helicópteros". Además se observan trastornos locomotores y diarrea.

Las lesiones macroscópicas más frecuentemente encontradas son la hipertrofia del proventrículo y una enteritis catarral con restos de alimento mal digerido. En el proventrículo se puede observar atrofia de las glándulas, focos hemorrágicos o necrosis en la mucosa. El páncreas, en muchos casos, se presenta atrófico con pérdida de coloración y aumento de consistencia al tacto. En algunas experiencias se observó atrofia de la bolsa de Fabricio, necrosis hepática y tendinitis del gastrocnemio. Los trastornos locomotores asociados a este cuadro se deben a lesiones de osteoporosis. Esta se aprecia fácilmente al realizar la necropsia de aquellas aves con renguera y mal emplume. La lesión localizada en la articulación coxofemoral muestra desprendimiento del cartílago articular del extremo proximal del fémur, que también puede presentar una fractura por osteonecrosis.

Las lesiones microscópicas halladas no definen el diagnóstico, pero aportan datos complementarios de interés. Se observa proventriculitis con necrosis focal, miocarditis, atrofia de la bolsa de Fabricio, enteritis catarral, pancreatitis y atrofia de las vellosidades intestinales con infiltración linfocitaria. En la placa de crecimiento del cartílago articular de la cabeza del fémur se observan fracturas longitudinales y transversas

ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR LOS REOVIRUS EN OTRAS ESPECIES

Diarrea neonatal de los terneros

La diarrea neonatal de los terneros (DNT) es producida por el rotavirus grupo A. Es una afección que suele manifestarse con signos clínicos a partir de las 12 horas del nacimiento, hasta aproximadamente el mes de vida. Se caracteriza por una diarrea acuosa y profusa, deshidratación progresiva y acidosis que pueden llevar a la muerte.

Esta enfermedad se presenta bajo ciertas condiciones previas. La acción conjunta del agente infeccioso, un estado de salud deficiente del hospedador, ausencia de inmunidad pasiva y malas prácticas de manejo, favorecen la presencia de la DNT.

En Argentina afecta a animales de establecimientos de cría y tambos, provocando importantes pérdidas, con tasas de mortalidad que pueden llegar al 20%.

En estas diarreas los virus actúan como factor predisponente de infecciones bacterianas secundarias. La lesión que producen es la atrofia y necrosis de las células intestinales, lo que impide la correcta digestión de la leche; a su vez modifica el medio intestinal, favoreciendo la aparición de diarreas. El diagnóstico se puede realizar por la observación de las partículas virales a través de la microscopía electrónica o por la prueba de ELISA.

Enteritis viral en cerdos

Dentro de la familia Reoviridae el rotavirus porcino es uno de los agentes productores de diarrea en esta especie. Los grupos reconocidos son los A, B y C, siendo los del tipo A los más comunes. Asimismo, se pueden identificar varios serotipos, siendo el más frecuente el G3. La diarrea es la enfermedad más corriente y de mayor impacto económico en la producción porcina, siendo los virus responsables de aproximadamente al 30% de los cuadros de diarrea en lechones entre las 3 y 6 semanas de edad. En las últimas décadas, las infecciones virales entéricas han adquirido gran importancia en el mundo y Argentina no es la excepción, predominando el serotipo G3 en los aislamientos.

Lengua azul

El género *Orbivirus* es el responsable de producir la lengua azul (LA); ésta es una enfermedad infecciosa, que afecta a ovinos, caprinos, bovinos y a algunos rumiantes silvestres. Es transmitida por picaduras de insectos artrópodos hematófagos del género *Culicoides* (jejenes).

Los signos clínicos comienzan con el aumento de la temperatura que puede llegar entre 40,6 y 41,7 °C. Produce inflamación catarral de las mucosas respiratorias y digestivas. En los miembros inferiores hay degeneración muscular e inflamación de las bandas coronarias y láminas de las pezuñas. En las hembras preñadas produce placentitis, abortos y malformaciones congénitas. En los machos causa infertilidad temporal, con pérdida del estado general.

En la República Argentina se ha hallado serología positiva en animales de la región Noroeste del país.

BIBLIOGRAFIA

Calnek BW. Enfermedades de las Aves. Editorial Manual Moderno. Deleg. Cuauhtémoc. 06100. Méjico DC. 1995. p. 785-795 ISBN 0-8138-0429-9

Heggen-Peay CL, Cheema MA, Ali Ra, Schatt KA, Qureshi MA. Interactions of poult enteritis and mortality syndrome-associated reo with variuos cell types *in vitro*. Poul. Sci. 2002; 81 (11): 1661-1667.

Menéndez NA, Schudel AA, Gonzalez ET, Echeverrigaray ME, Panettieri G, Brandetti E, Perfumo C. Actas y Sumarios de la World's Poultry Science Association. 1978. Vol III. p. 337-346.

Thomson RG. Thomson's Special Veterinary Pathology 3ed. M.D Donald Mc Gavin, William. W. Carlton, and James. F. Zachary 2001. ISBN 0-323-00560-8 (h.c)

Van Loom AA, Kosman W, van Zuilekom HI, van Riet S, Frenken M, Schijn EJ. The contribution of humoral immunity to control of avian reoviral infection in chickens after vaccination with live reovirus vaccine (strain 2177) at an early age. Avian Pathol. 2003; 32 (1): 15-23.

TOGAVIRUS

María Gabriela Echeverría

CARACTERISTICAS DE LA FAMILIA VIRAL

La familia Togaviridae comprende dos géneros: los *Alphavirus*, transmitidos sólo por picaduras de vectores artrópodos o arbovirus, que comprenden los virus de las encefalomielitis del Este, del Oeste y Venezuela, y los productores de artralgias humanas Chikungunya, O'nyong-nyong, Mayaro, Ross River, Sindbis y Selva de Semliki entre otros, y los *Rubivirus* (no arbovirus) cuya especie tipo es el virus de la rubéola humana.

Las partículas virales son esféricas, de un diámetro aproximado de 70-80 nm (fig. 65-1). La cápside de simetría icosaédrica contiene 240 copias de proteína C, mide aproximadamente 40 nm de diámetro y posee espículas externas organizadas en 80 trímeros compuestos por dos glicoproteínas de transmembrana (E1 y E2) y un polipéptido perisférico (E3). La bicapa lipídica característica de los virus envueltos deriva de la membrana plasmática de la célula hospedadora y está fuertemente unida a la cápside. Cada espícula está constituida por tres pares de E1-E2 y se proyecta aproximadamente 80 nm por sobre la envoltura. La distribución de los tres pares de proteínas E1-E2 delimita una cavidad en el medio de la espícula entre la bicapa lipídica y la parte superior de la misma. Además, las espículas se conectan unas a otras muy juntas, casi formando una capa proteica continua alrededor del virión, que dan a la partícula el aspecto de un virus no envuelto. El genoma está compuesto por RNA de cadena simple no segmentado y de polaridad positiva formado por aproximadamente 11700 nucleótidos (49S) que codifica para 4 proteínas no estructurales (NSP1 a 4) y entre 4 a 5 estructurales (C o proteína de la nucleocápside, E1 y E2, en alguna especies E3) o proteínas de la espícula y 6K, una proteína pequeña de transmembrana. En el extremo 5' posee un Cap y en el 3' una región poliA. Las proteínas C, E1, E2 y E3 son las responsables de la especificidad viral. Las proteínas E son las responsables de la adsorción y penetración viral en el ciclo infectivo.

Debido a la composición lipoproteica de la envoltura, los togavirus son sensibles a solventes orgánicos y detergentes. Los viriones son estables a 4 °C pero las partículas pierden infectividad tanto a 56 °C como a pH ácidos. La densidad de flotación en sucrosa de los togavirus oscila entre 1,18-1,22 g/cm^3, mientras que el coeficiente de sedimentación es de aproximadamente 280S.

En este capítulo haremos referencia principalmente a los *Alphavirus* debido a que las encefalomielitis equinas son zoonosis.

REPLICACION VIRAL

La replicación se realiza en el citosol de las células infectadas. El ciclo de infección comienza con la adsorción de los viriones mediante las glicoproteínas E a receptores celulares, situación que depende de condiciones iónicas particulares. Después de la unión a los receptores, el virus ingresa por la ruta celular constitutiva de endocitosis mediada por receptor: el virus se trasloca a regiones de la membrana cubiertas con clatrina que permiten la invaginación y la formación de vesículas, que vacían su contenido en los endosomas. En éstos, la disminución del pH provoca un cambio conformacional irreversible en las proteínas E1-E2 debilitando la unión entre ellas. Subsecuentemente, el virus fusiona su membrana con la del endosoma, y la nucleocápside se libera al citoplasma y comienza la replicación viral luego de la digestión de las proteínas de la nucleocápside. Casi las dos terceras partes del mRNA viral son parcialmente traducidas en las proteínas no estructurales (NSP1 a 4): comenzando desde el extremo 5' se produce una poliproteína que es clivada en las 4 proteínas no estructurales mediante una autoproteasa viral. A su vez, los componentes de este complejo de proteínas no estructurales transcriben el RNA viral para formar la cadena negativa, comenzando cerca del extremo 3' poliadenilado (fig. 65-2). Esta cadena negativa servirá de molde para la transcripción de un mRNA subgenómico de polaridad positiva, de un tamaño 3 veces menor que el RNA genómico (4,1 kilobases, 26S), el que será traducido a otra poliproteína que luego se cliva en el citosol en las proteínas estructurales virales y de una cadena completa de RNA positivo. Luego, las proteínas E1 y E2 son clivadas, transportadas al retículo endoplásmico, glicosiladas y procesadas a través del aparato de Golgi y, subsecuentemente, migran a la membrana celular; prosigue el ensamblaje al formarse la cápside por asociación de proteínas y la encapsidación del RNA genómico. Finalmente, las nucleocápsides se alinean a las regiones de la membrana plasmática que contienen los heterodímeros E1-E2 y se liberan por gemación.

In vitro replican en células primarias o de líneas diversas que incluyen mosquitos, aves, peces, reptiles y mamíferos, producen un extenso efecto citolítico en líneas celulares derivadas de vertebrados y un efecto poco evidente caracterizado por persistencia viral en aquellas derivadas de invertebrados. In vivo se utilizan ratón lactante, pollitos bebé o huevos embrionados. Este rango de hospedadores refleja el mantenimiento de los *Alphavirus* en la naturaleza por alternar ciclos de replicación en mosquitos y vertebrados.

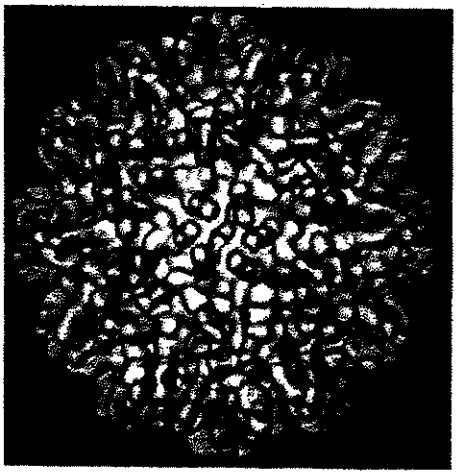


Figura 65-1. Togavirus: esquema de la partícula viral.

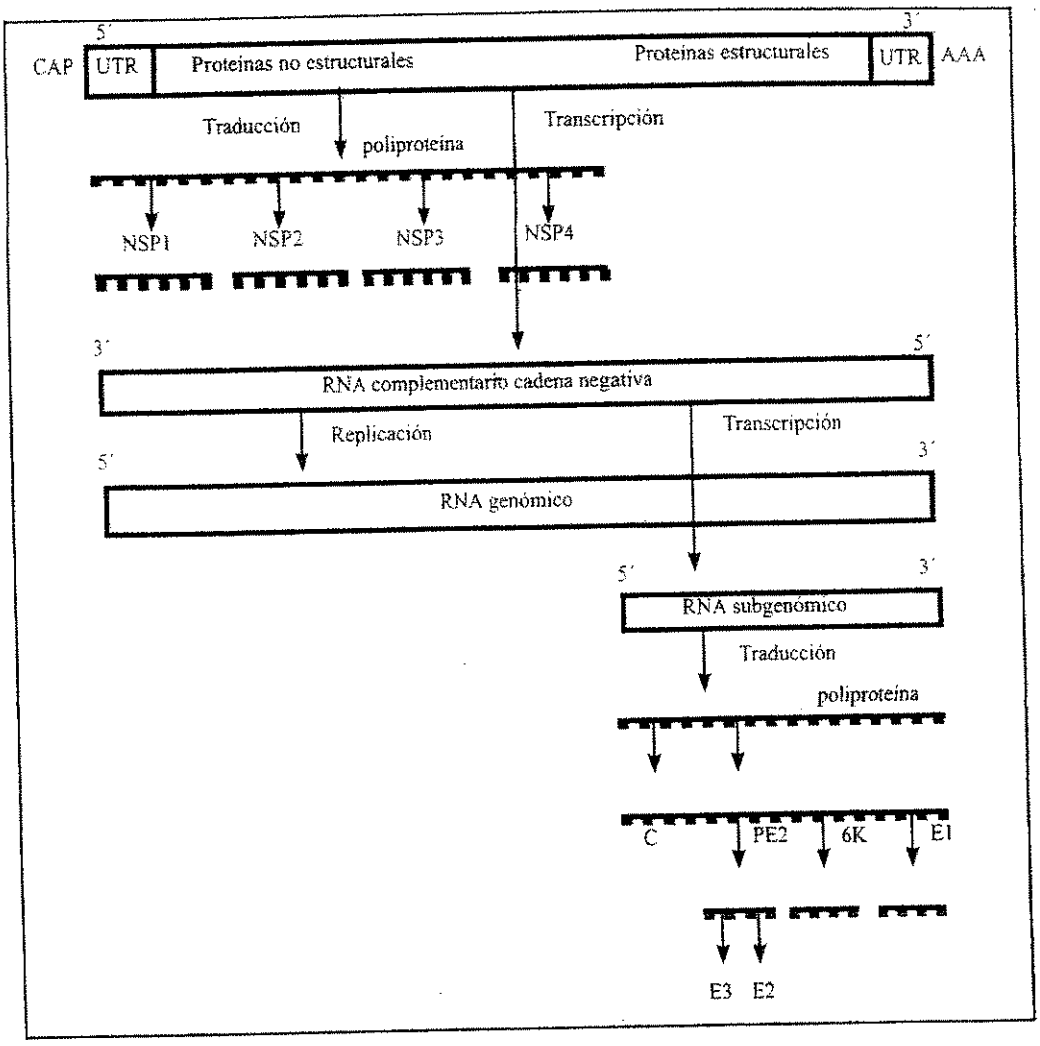


Figura 65-2. Esquema del ciclo replicativo de los *Togavirus*.

PATOGENESIS

El modo primario de transmisión de los *Alphavirus* a las aves y mamíferos es a través de la picadura de mosquitos. Los mosquitos, a su vez, se infectan de un hospedador virémico y entre 4 a 10 días después el virus se localiza en las glándulas salivales y permanece persistentemente infectado. Posteriormente a la picadura, el virus se introduce en los capilares y replica en el endotelio vascular y en los monocitos, para luego diseminarse por vía sanguínea y replicar en músculos, articulaciones, piel o cerebro.

RESPUESTA INMUNE

Existe respuesta de tipo humoral y celular. La IgM específica se detecta por técnicas de ELISA o virus neutralización (VN) muy temprano y los anticuerpos neutralizantes y hemaglutinantes de tipo IgG aparecen entre los 10 y 14 días posinfección y duran meses. Los linfocitos T citotóxicos intervinientes secretan perforinas para aumentar la permeabilidad de las células infectadas lo que conlleva a la muerte de las mismas. También intervienen en las lisis de las células infectadas las células de tipo NK.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

El diagnóstico presuntivo puede realizarse en base a los signos clínicos neurológicos coincidiendo con épocas calurosas. Las técnicas serológicas recomendadas son la seroprotección en ratones o huevos embrionados o la virus neutralización en cultivos celulares, la inhibición de la hemaglutinación, la inmunofluorescencia y la neutralización de placa. La confirmación serológica requiere del incremento o disminución de 4 diluciones del título de anticuerpos en muestras pareadas tomadas preferentemente con 15 días de diferencia. Para el aislamiento viral se recomienda utilizar tejidos del sistema nervioso central o plasma de animales con pico febril, los cuales deben ser obtenidos en forma estéril y ser enviados refrigerados si van a recibirse dentro de las 48 horas de extraídos. Se pueden inocular por vía intracerebral ratones adultos y lactantes, pollitos bebé y cobayos, o en cavidad alantoidea o saco vitelino de embriones de pollo. En cualquiera de ellos produce la muerte. Las muestras procesadas se inoculan también sobre monocapas de cultivos primarios de embriones de pollo o pato o de riñón de hámster o en células de línea como Vero, BHK-21, RK13 o HeLa. Las líneas celulares de mosquito también pueden utilizarse pero en ellas no se produce ECP marcado. Además, puede usarse la hemoadsorción para determinar células infectadas. Para el relevamiento de mosquitos se puede emplear ELISA de captura o PCR, al igual que para confirmar la sospecha o aislamiento positivo. Debido a la importancia de las encefalomielitis como zoonosis, el diagnóstico de laboratorio se realiza únicamente en laboratorios con cabina de seguridad 3 y con personal inmunizado.

ENCEFALOMIELITIS EQUINA

La enfermedad está producida por tres virus antigénicamente distintos: los virus Oeste, Este y Venezuela. Los virus de la encefalomielitis del Este, Oeste y Venezuela formaron parte del grupo A de la clasificación original de los arbovirus. Los tres pueden diferenciarse y subtipificarse a su vez por la reactividad en distintas pruebas de inhibición de la hemaglutinación (HI), virus neutralización (VN) y anticuerpos monoclonales, asi como también mediante secuenciación. Sin embargo, a modo de facilitar la comprensión es que se describen como un complejo que se diferencia principalmente por su localización geográfica. Son enfermedades de presentación estacional de climas templados o tropicales, que es principalmente cuando se brindan las condiciones ideales para la replicación viral y la población de mosquitos es elevada. El ciclo endémico (enzoótico) de las encefalomielitis involucra la replicación en vectores (mosquitos) y reservorios como aves (Este y Oeste) y mamíferos roedores (Venezuela). En períodos epidémicos (epizoóticos) pueden infectarse los hospedadores naturales equino y humano.

Encefalomielitis del Este

Se distribuye en la costa este de América, desde Canadá hasta Sudamérica. Puede producir encefalitis en hombre, equino, paloma y faisán. Muchas otras aves son susceptibles a la infección que permanece en forma asintomática a pesar de la viremia prolongada. Se han descrito otros mamíferos que actúan de reservorios como roedores y marsupiales y aves migratorias. El ciclo primario está mantenido principalmente en pantanos donde habitan los vectores y las aves silvestres que actúan como reservorio. Las epizootias pueden ocurrir aproximadamente cada 5 o 10 años, coincidiendo con temporadas de lluvias. La mayoría de las infecciones en el hombre son subclínicas o producen sólo un leve aumento de la temperatura. Aun siendo el más virulento de los *Alphavirus*, en pocos casos pueden producirse síntomas de encefalitis en el hombre y el 20% de éstos puede ser mortal. Sin embargo, la mortalidad en equinos es de aproximadamente 90%. Dentro de los virus Este, existen también dos variables antigénicas diferenciables por pruebas de HI que tienen una distribución geográfica particular, tipo norteamericano (más patogénicas) y tipo sudamericano.

Encefalomielitis del Oeste

Es la infección más frecuente en centro y oeste de EE.UU., y la de predominio en Argentina. También puede producir encefalitis en el hombre y equino aunque en menor frecuencia respecto a los virus Este, y con una mortalidad en equinos de hasta el 50%. Existe evidencia serológica de que la infección natural puede producirse además en pollos, faisanes, roedores y conejos. Existen tres variantes distribuidas en Sudamérica que tienen reducida patogenicidad con respecto a las que actúan en América del Norte.

Encefalomielitis de Venezuela

Se distribuye en toda América desde EE.UU. hasta Perú y Brasil y las epizootias ocurren cada 10 años aproximadamente. También infecta al hombre y al equino pero las cepas enzoóticas provocan sólo en estos últimos una infección de tipo asintomática que inmuniza y protege ante la infección de cepas epizoóticas y no producen un alto porcentaje de encefalitis. También están involucrados roedores y aves como reservorios. El ciclo selvático que involucra a mosquitos y roedores no causa enfermedad clínica en equinos. Sin embargo estimulan la producción de anticuerpos y pueden proveer inmunidad cruzada protectora ante una infección subsecuente con virus epizoótico. La incidencia de encefalitis en humanos infectados es de hasta el 5%, con una mortalidad menor de 1%. En equinos, la mortalidad puede alcanzar hasta el 80%. Los virus Venezuela poseen 6 subtipos principales que varían en su patogenicidad para equinos debido principalmente a diferencias antigénicas. Además, varían de acuerdo al tamaño de las placas líticas en células Vero y a su capacidad hemaglutinante a pH de 6 o 6.5.

La enfermedad puede ser clínica o subclínica, dependiendo de la sensibilidad del hospedador, dosis infectante, vía de infección, competencia y eficacia del vector y serotipo viral. El período de incubación es de 3-12 días y se presenta clínicamente por fiebre, disfagia, anorexia, trastornos neurológicos como excitación, hiperestesia, movimientos en círculos, depresión, parálisis de labios y miembros. La respuesta febril durante la viremia es de menor magnitud con Oeste y de magnitud mediana en Este y Venezuela. La muerte puede ocurrir entre 12 horas y 10 días posinfección. En la observación histopatológica aparece degeneración neuronal, meningoencefalitis con destrucción neuronal, neuronofagia, gliosis con infiltración de linfocitos y neutrófilos e inflamación en el endotelio vascular. Todas las áreas del cerebro están afectadas en distintos grados. En el hombre, se acompaña de fiebre, dolor occipital y retroorbital, anorexia, mialgia y artralgia. En pocos casos se presentan síntomas nerviosos (fotofobia, rigidez de nuca, convulsiones y parálisis). El hombre puede infectarse con los virus Este, Oeste y Venezuela selvático y enzoótico.

La prevención de los *Alphavirus* debe acompañarse principalmente de la expulsión de los vectores mediante campañas masivas de eliminación por insecticidas o larvicidas químicos.

En Argentina la vacunación es anual, preferentemente en primavera. La vacuna es inactivada con formalina y producida en cultivos celulares y bivalente (Oeste y Este). Venezuela es a virus activo y en Argentina está prohibida.

Algunos *Alphavirus* productores de artralgias en el hombre, fiebre y eritema y que están relacionados serológicamente con las encefalomielitis del Este, Oeste y Venezuela, y que tienen distinta distribución geográfica son los siguientes: Chikungunya (Africa y Asia), O'nyong-nyong (Africa), Mayaro (América del Sur y Central), Ross River (Australia), Sindbis (Europa-Africa y Asia-Australia) y Selva de Semliki (Africa-Asia). También involucran animales salvajes, pájaros, primates y mosquitos.

BIBLIOGRAFIA

Griffin D. Equine encephalitis viruses. In. Encyclopedia of Virology: 416-423. Webster R and Granoff A Academic Press, 1994

Helenius A. Alphavirus and flavivirus glycoproteins: structures and functions. Cell 1995; 81: 651-653.

Kielian M. Membrane fusion and alphavirus life cycle. Adv In virus Res. 1995; 45: 113-151.

OIE Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals. Chapters 2.5.3 y 2.1.12. 2003

Peters C, Dalrymple J. In Virology Second Edition Fields B, Knipe D Raven Press, New York 1990. Alphaviruses p. 713-761.

Schesinger M. Sindbis and Semliki forest virus. En: Encyclopedia of Virology 1330-1333. Webster R and Granoff A Academic Press, 1994

Togaviridae ICTV (International Commitee on Taxonomy of Viruses) 2002. *www.ictvdb.iacr.ac.uk*

Capítulo 66

RHABDOVIRUS

Carlos F. Amasino

CARACTERISTICAS DE LA FAMILIA VIRAL

La familia Rhabdoviridae comprende virus con forma alargada *(Rhabdos*= bastón), con ambos extremos redondeados o un extremo redondeado y el otro recto (forma de bala). El ácido nucleico es RNA de cadena simple y polaridad negativa dispuesto en hélice, rodeado de subunidades proteicas que siguen la disposición del RNA, al cual están estrechamente unidas formando en conjunto una nucleocápside helicoidal (simetría helicoidal). Son envueltos por una doble membrana de composición lipoglucoproteica, con espículas que le dan a su superficie aspecto de panal de abejas. Miden 180 nm de largo x 70-80 de ancho. Los viriones replican en el citoplasma celular y salen de las células por gemación. Esta familia incluye virus patógenos de animales de sangre caliente, peces y vegetales.

La familia Rhabdoviridae comprende los siguientes géneros de importancia en medicina veterinaria:

Lyssavirus: comprende los siguientes serotipos (ST): virus de la rabia (ST 1), virus Lagos-bat (ST 2), virus Mokola (ST 3), virus Duvenhage (ST 4), virus EBL 1 (European Bat Lyssavirus 1) (ST 5), virus EBL 2 (European Bat Lyssavirus 2) (ST 6), virus ABL (Australian Bat Lyssavirus) (ST 7).

Vesiculovirus: virus de la estomatitis vesicular.

Ephemerovirus: virus de la fiebre efímera bovina.

Novirhabdovirus: virus de la necrosis hematopoyética de las truchas y otros patógenos de los peces.

Resumen de integrantes del género *Lyssavirus*

Serotipo 1, virus de la rabia: es el agente causal de la rabia en los animales de sangre caliente y en el hombre. Se ha aislado de los animales terrestres de todo el mundo y de los murciélagos hematófagos y no hematófagos del continente americano.

Serotipos 2 al 6: son virus productores de encefalitis en animales y en el hombre, que comparten con el virus rábico solamente el antígeno N (de escasa capacidad protectora). No tienen la importancia epidemiológica del virus de la rabia, pero se ha incrementado su estudio por la aparición de casos humanos portados por murciélagos en Europa, Africa y Australia.

VIRUS DE LA RABIA

Estructura

El virus de la rabia tiene forma de bala (alargado, con un extremo redondeado y otro recto). Posee una nucleocápside helicoidal, en la parte interna de la cual está el RNA, rodeado por afuera por la principal proteína de la nucleocápside que se denominan N (nucleoproteína). Entre las vueltas de la espira existe otra proteína, la NS (no estructural, ex-M1) y además se encuentra la proteína L o RNA polimerasa que necesita este virus para replicarse en el citoplasma celular por ser un virus de polaridad negativa.

La envoltura no cubre completamente el extremo recto del virión. Esta doble membrana contiene lípidos que representan cerca del 24% de la envoltura; incluyen colesterol, fosfolípidos y ácidos grasos como palmítico, esteárico y oleico. Las proteínas localizadas en la envoltura son la proteína M (de matriz, ex-M2) y la proteína G (glucoproteína) esta última situada en las espículas que están insertadas en la superficie de la envoltura.

Para ser infeccioso el virión debe estar completo, por lo que cualquier elemento que degrade la envoltura (jabones, detergentes, éter, cloroformo, acetona, cetrimida, los desinfectantes yodóforos y los amonios cuaternarios) evita la infecciosidad.

El virus de la rabia resiste el pH entre 5 y 10 a 4 °C. Es termolábil, inactivándose en 4 horas a 40 °C y en 35 seg a 60 °C. Se mantiene bien en frío: varios días a 0 a 4 °C y por años congelado a –70 u –80 °C. También lo inactivan la luz ultravioleta, la β-propiolactona y la bietileneimina.

REPLICACION VIRAL

La forma habitual más efectiva de multiplicar el virus de la rabia es la inoculación intracerebral del mismo a animales, ya que este virus se multiplica muy bien en las células nerviosas. Dentro del organismo animal, también se puede replicar, en mucho menor grado, en células musculares estriadas y células de las glándulas salivales. En el laboratorio el virus de la rabia se puede multiplicar en embrión de pollo y en células de cultivo in vitro, pero en general esta multiplicación sólo es importante si las cepas están adaptadas previamente, por lo cual esto se usa mucho para producción de virus para vacunas, pero no es tan adecuado para diagnóstico, ya que una cepa de calle no está adaptada y puede no crecer bien. La excepción la constituyen los cultivos de células de neuroblastoma de ratón, células tumorales de origen nervioso, donde el virus rábico se multiplica muy bien y han desplazado para usos diagnósticos a los clones más sensibles de células BHK. Las células habitualmente usadas para cepas adaptadas son las BHK, NIL, Vero, FEP, MRC5, etc.

El virus se adosa a los receptores celulares. Esto se considera debido a la proteína G. No se ha identificado aún un receptor celular característico para este virus. En las células musculares se piensa que es el receptor de acetilcolina. En las neuronas y células fibroblásticas es más complejo e incluye oligosacáridos y lipoproteínas así como gangliósidos y ácido siálico. Una vez fijado a las células, el virión penetra por endocitosis, la membrana viral se fusiona con la de la membrana lisosomal y la nucleocápside se libera en el citoplasma, donde se multiplicará. Comienza a trabajar la proteína L o RNA polimerasa viral que luego de inducir una cadena positiva, sintetizará las cadenas de RNA viral. Este proceso, en un virus de calle, se hace en acúmulos en determinadas zonas del citoplasma de las neuronas que contienen diversos componentes intermedios del virus así como viriones completos aún no envueltos, que son los cuerpos

de inclusión intracitoplasmáticos o corpúsculos de Negri. Estos son acidófilos, de forma elipsoidal y de tamaño variable entre 1 y 10 µm. En cambio, un virus adaptado o fijo, se multiplica más rápidamente en todo el citoplasma y habitualmente no forma estos corpúsculos de Negri o éstos son pequeñísimos.

La adsorción y entrada del virus en las células de cultivo es rápida, comprobándose ya a los 15 minutos posinfección. A las 8 horas posinoculación se detecta fluorescencia en las células infectadas, la cual aumenta y persiste otras 8 horas, comenzando entonces un segundo ciclo de replicación. El virus de la rabia replica en el citoplasma celular y sale de las células por gemación, liberándose al medio. Los viriones "hijos" aparecen en el líquido de cultivo a partir de las 12 horas posinoculación. Algunas cepas replican en asociación a una matriz citoplasmática intracelular, pero en otras sólo se puede apreciar la gemación a través de la membrana celular.

Las células infectadas pueden mantenerse un cierto tiempo sin evidenciar alteraciones citopáticas, aunque luego de varios ciclos replicativos se alteran y mueren.

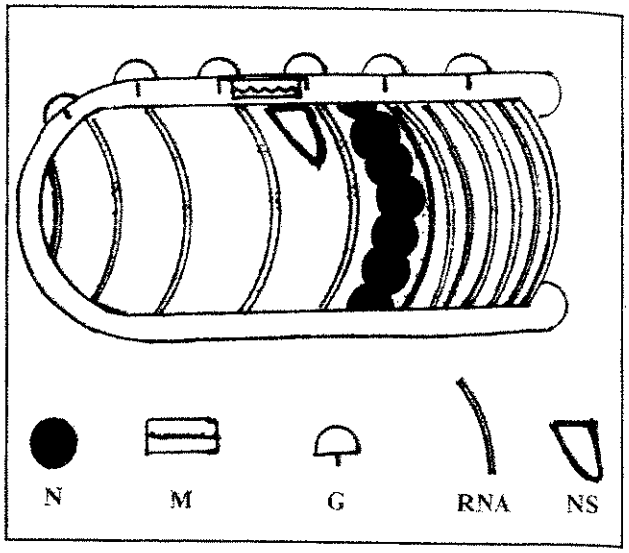


Figura 66-1. Estructura y constitución del virus de la rabia.

PATOGENESIS

La mordedura coloca el virus presente en la saliva del animal eliminador en el tejido celular subcutáneo y en los músculos. Este permanece un lapso variable en el lugar de entrada, pudiendo multiplicarse en las células musculares estriadas. Luego, siguiendo el trayecto de los nervios periféricos que inervan la región, avanza en forma centrípeta hacia el sistema nervioso central. Su velocidad máxima es de 3 mm por hora. Estas dos circunstancias condicionan que las mordeduras ocurridas en zonas del cuerpo muy inervadas y muy próximas al encéfalo sean más peligrosas y ocasionen enfermedad en un período más corto que las producidas en zonas menos inervadas y más alejadas del encéfalo. El virus alcanza las neuronas, se introduce en el citoplasma y comienza a replicarse. Desde el sistema nervioso central se produce luego una diseminación centrífuga. Al tiempo que el virus alcanza el sistema nervioso, llega también a las glándulas salivales, multiplicándose en las células secretoras de las mismas y apareciendo en la saliva, lo cual habitualmente se produce algunos días antes de que la infección neuronal se traduzca en sintomatología. Las sucesivas progenies de virus infectan las células vecinas por contigüidad. Se produce también la infección de estructuras del ojo. El virus aparece en forma intermitente en las lágrimas y se lo encuentra en improntas de córnea. El tiempo que el virus tarda en llegar a las neuronas, que son las células en las cuales su acción se traduce en sintomatología, justifica la duración del período de incubación y la posibilidad de crear protección inmunológica por vacunas o anticuerpos pasivos antes de que el virus llegue al sistema nervioso central (SNC). La diseminación hematógena o linfática no tiene importancia en la enfermedad natural.

El virus rábico no es lítico, pero su multiplicación altera las neuronas y produce disturbios en su actividad, con los clásicos fenómenos excitativos y alteraciones nerviosas características de la enfermedad. Luego de algunos ciclos de replicación, las células nerviosas mueren ocasionando la parálisis de la zona o función que comandaba.

RESPUESTA INMUNE

Los *Lyssavirus* tienen en común el antígeno N o nucleoproteína de la nucleocápside. El virus de la rabia difiere de los otros *Lyssavirus* por el antígeno G (glucoproteína) de la envoltura.

La glucoproteína o antígeno G, induce la producción de anticuerpos neutralizantes, capaces de evitar la infección por el virus rábico. Actúa como blanco para las células T "helper" y para las células T citotóxicas. Los determinantes antigénicos que integran la proteína G son reconocidos por las células B y T específicas del virus rábico. El virus de la rabia, cuando se inocula inactivado, induce anticuerpos neutralizantes contra el antígeno G o glucoproteína de envoltura. Estos anticuerpos, si son preexistentes, evitan la infección por el virus patógeno y, si se logra formarlos luego de la mordedura infectante antes de que el virus ingrese a las neuronas del SNC (tratamiento vacunal posexposición), evitan la presentación de la enfermedad.

La nucleoproteína o antígeno N, compartido por los integrantes del género *Lyssavirus*, induce anticuerpos precipitantes y detectables por inmunofluorescencia que revisten importancia diagnóstica. Recientemente se ha comprobado que la nucleoproteína puede proporcionar secundariamente una cierta inmunidad protectora de menor importancia contra el virus de la rabia y los *Lyssavirus* relacionados. El virus, al igual que muchas de las vacunas antirrábicas, es un buen inductor de la formación de interferón. Recientes estudios han comprobado que en los casos progresivos y fatales de rabia, se produce una inhibición de la respuesta celular global, lo que impide al organismo destruir las células infectadas.

Los anticuerpos neutralizantes luego de la vacunación lo hacen a los 6-7 días (IgM) y a los 13-14 días aparecen las IgG que alcanzan su máximo título, con los esquemas de tratamiento usuales, alrededor de los 30 días posadministración. Como consecuencia de la inmunización se produce además una respuesta citotóxica mediada por células T, existiendo una relación directa entre esta respuesta y la protección. Las células citotóxicas destruirían a las células infectadas y los anticuerpos neutralizarían el virus liberado.

Las proteínas antigénicas principales (G y N) del virus rábico han podido ser expresadas en una importante variedad de sistemas procarióticos y eucarióticos por manipulación genética, lo que es importante para el desarrollo de vacunas. Se han preparado además conjugados con anticuerpos monoclonales marcados con sustancias fluorescentes contra las proteínas G y N del virus de la rabia. Los anticuerpos monoclonales muestran patrones específicos de reactividad, los cuales han sido usados para caracterizar y clasificar al virus rábico y a los virus relacionados en grupos correspondientes

a determinantes antigénicos. Se han establecido diferentes paneles de anticuerpos monoclonales que permiten la diferenciación de los aislamientos de virus rábico de especies terrestres y murciélagos, lo que permite caracterizar a las mismas y encuadrar su origen (cepas de caninos, de murciélagos insectívoros, de murciélagos hematófagos, cepas vacunales, etc.). Esta posibilidad de establecer el seguimiento de las cepas en la naturaleza se emplea en los estudios epidemiológicos del virus de la rabia.

La expresión de las proteínas rábicas, especialmente la G, en otros soportes como virus *pox-vaccinia* se usa actualmente en la vacunación oral de zorros y mapaches. Ambas proteínas G y N se han expresado en baculovirus recombinantes, lo cual puede servir para hacer vacunas de menor costo.

Variantes antigénicas del virus de la rabia

Dentro del ST 1 se pueden hallar diferencias antigénicas (variantes antigénicas), utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra la nucleocápside del virus o distintas variantes génicas, obtenidas por secuenciación de los genes luego de amplificarlos con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las variantes antigénicas del virus de la rabia son 11 y cada una de ellas es predominante en algunas especies determinadas, aunque puede ocasionar rabia en otras especies. Las variantes antigénicas de mayor importancia en Argentina son la 1 (habitual en el perro, en la rabia urbana), la 3 (habitual de los murciélagos hematófagos, en la rabia paresiante o desmodina) y la 4 (habitual de los murciélagos insectívoros).

VIRUS DE CALLE Y VIRUS FIJO

Virus de calle. Así se denomina al virus rábico causante de los casos clínicos naturales de rabia. Son las cepas patógenas naturales, virus "de campo" o "salvajes". Las características del virus de calle son las siguientes:

- Es patógeno por vía periférica: inyectado en forma subcutánea o intramuscular o inoculado por una mordedura alcanza el SNC y provoca encefalitis rábica mortal.
- Provoca la aparición de cuerpos de inclusión de Negri en las neuronas infectadas.
- Si se lo inocula por vía intracerebral (IC) a ratones adultos, los mata entre los 7 y 21 días.

Virus fijo. Es un virus logrado por Pasteur en el laboratorio mediante pasajes intracerebrales del virus de calle en conejos. Al pasar el virus de calle por vía intracerebral, el período necesario para producir la muerte se acortaba, haciéndose cada vez más cercano a los 7 días. Si los pasajes se continuaban, este período no se acortaba más, sino que permanecía fijo en 7 días, por lo cual Pasteur lo denominó "virus fijo". Paralelamente, el virus fijo perdió la capacidad de ser patógeno por vía periférica, no alcanzando el SNC, lo que es muy importante para su uso en vacunas, ya que no enferma pero conserva sus propiedades inmunizantes.

Son características del virus fijo:

- Es prácticamente apatógeno por vía periférica.
- No produce cuerpos de inclusión de Negri en las neuronas.
- Inoculado por vía IC a ratones adultos los mata en 7 días (a los lactantes en 5).

DIAGNOSTICO VIROLOGICO

- Diagnóstico *postmortem*. Se realiza para determinar rabia luego de la muerte del afectado. Es muy empleado sobre las muestras de encéfalo de animales muertos con síntomas compatibles con esta enfermedad, o cuando antes de la muerte han causado exposición por mordeduras a humanos.
- Diagnóstico *intra vitam*. Se efectúa para comprobar rabia en un paciente vivo con sintomatología y anamnesis que hagan sospechar la enfermedad.

Muestras

- Para el diagnóstico *postmortem* la muestra de elección es el encéfalo, del cual se tomarán porciones de ambos cuernos de Ammon, corteza cerebral (de ambos lados), cerebelo y bulbo raquídeo. Se investigará en estas muestras la presencia del virus rábico y sus antígenos. También pueden procesarse glándulas salivales, ganglios nerviosos, ojos y anexos, piel y folículos pilosos y otros.
- Para el diagnóstico *intra vitam*, se tomarán improntas corneales, biopsias de piel y folículos pilosos del cuello, muestras de saliva e hisopado faríngeo para investigar la presencia del virus y sus antígenos, y muestras periódicas de sangre para determinar la aparición o aumento del título de anticuerpos antirrábicos en suero sanguíneo (conversión serológica) ya que los anticuerpos aparecen y aumentan en forma apreciable en la fase final de la sintomatología.

Toma y transporte de la muestra

La muestra de encéfalo se toma durante la necropsia y se transporta refrigerada (3 a 5 °C). La muestra de saliva puede tomarse con una jeringa estéril sin aguja o con un catéter en el extremo, o se emplea un hisopo para recoger muestras de zona bucal y faríngea. Este tipo de muestra debe tomarse inmovilizando al paciente y utilizando guantes, barbijo y anteojos ya que la saliva es poten-

Tabla 66-1. Características del virus de la rabia en Argentina

Variante antigénica	Hospedador habitual	Importancia en Argentina	Presentación en Argentina
Variante antigénica 1	Perro-mangosta	Perro-gato-hombre, otros	Rabia urbana
Variante antigénica 3	Murciélago-vampiro *Desmodus rotundus*	Bovino-equino-hombre	Rabia paresiante
Variante antigénica 4	Murciélago *Tadarida brasiliensis*	Murciélago insectívoro, gato	Murciélagos insectívoros

cialmente muy infecciosa y puede ser proyectada hacia la cara del operador. Para tomar las improntas de córnea se debe realizar una instilación previa de un anestésico local de uso oftálmico. La muestra de sangre debe tomarse inmediatamente después del ingreso del paciente sospechoso y permitirá conocer si tiene o no anticuerpos antirrábicos en el suero sanguíneo. Una segunda muestra se tomará por lo menos 5 a 7 días después y en caso de presentar anticuerpos (si la primera no los tenía) o de presentar un título más alto que la primera muestra, confirma la presencia de rabia. Los anticuerpos pueden investigarse también en líquido cefalorraquídeo (LCR). Las muestras de suero, LCR y saliva se colocan en tubos estériles y se transportan congelados a –20 °C o refrigerados. El envío se acompañará de un protocolo detallado del caso.

Procesamiento

Investigación de corpúsculos de Negri

Porciones pequeñas de ambos cuernos de Ammon, corteza cerebral, cerebelo y bulbo raquídeo se presionan para confeccionar improntas, las que se tiñen con colorante de Sellers. La presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos, elipsoidales, de color violáceo rojizo, con finas granulaciones más azuladas, de bordes lisos y de 1 a 10 µm de tamaño (cuerpos de inclusión de Negri) confirma el diagnóstico, ya que su hallazgo es sinónimo de rabia. La ausencia de los mismos no permite excluirla.

Inmunofluorescencia

Improntas del encéfalo problema se fijan en acetona fría a –20 °C durante 4 horas y se cubren luego con un conjugado antirrábico (gammaglobulinas antirrábicas unidas a una sustancia fluorescente). Una IF positiva confirma rabia con seguridad, pero si es negativa, aunque el margen de duda sea muy escaso, no permite descartarla y se debe hacer la prueba de inoculación intracerebral a ratones.

Prueba de inoculación intracerebral a ratones

Se suspenden porciones de cuerno de Ammon, cerebro, cerebelo y bulbo del encéfalo problema en una concentración del 20% en un diluyente constituido por agua destilada con 2% de suero normal equino inactivado como estabilizante y antibióticos, se homogeneizan y se inoculan por vía intracerebral. El virus de la rabia, si está presente, matará a los ratones por esta vía entre los 7 y 21 días con síntomas encefalíticos. Si la inoculación resulta positiva y confirmada, el diagnóstico es rabia. Si resulta negativa y la IF del material original era negativa, no se trata de rabia.

Aislamiento de virus en células de neuroblastoma de ratón

Se realiza una prueba de inmunofluorescencia a los 4 días sobre la monocapa inoculada con la muestra para comprobar si está presente el virus rábico, en cuyo caso habrá fluorescencia en el pocillo al mirar la placa con un microscopio de fluorescencia.

Para determinar anticuerpos se utilizan las pruebas de seroneutralización en ratones, de inhibición de foco fluorescente sobre cultivos celulares, de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) utilizando como antígeno la glucoproteína, y las técnicas de inmunofluorescencia indirecta.

SINTOMATOLOGIA

La rabia, hidrofobia o lyssa, es una enfermedad infecciosa mortal del SNC transmitida habitualmente por la mordedura de animales, en los cuales cursa en forma furiosa o paralítica, luego de un período de incubación de 10 a 365 días (30-60 es lo más frecuente). En el hombre las manifestaciones encefalíticas están acompañadas por espasmos faríngeos dolorosos al intentar beber, de donde deriva el nombre de hidrofobia (horror al agua).

En la rabia furiosa de los caninos, los afectados manifiestan cambio de las actitudes normales, ansiedad, tendencia a deambular, notable agresividad con ataques a otros animales, personas y aun objetos inanimados, disfagia, sialorrea, midriasis, incoordinación progresiva con marchas laterales, caídas y finalmente parálisis y muerte por paro respiratorio en aproximadamente 5 a 7 días. También se presenta una forma muda o paralítica en la cual hay midriasis, estrabismo divergente, anisocoria, disfagia grave con parálisis faríngea e incapacidad para tragar, mandíbula péndula y sialorrea filante, parálisis con decúbito ventral y muerte en 3 a 5 días.

En la rabia paresiante bovina se observará parálisis progresiva del tren posterior, decúbito ventral y muerte. La rabia en los murciélagos se caracteriza por pérdida de la capacidad de volar, aparición durante el día y permanencia inmóvil en el suelo o sobre objetos. En la fauna silvestre, la aparición diurna, la pérdida del temor al hombre o los perros, o el estado de parálisis que permite capturarlos con facilidad es importante en las zonas enzoóticas.

EPIDEMIOLOGIA

En la actualidad, las grandes áreas sin rabia son el continente Antártico, Australia, los territorios insulares como Nueva Zelanda, Japón, Hawaii, Gran Bretaña, Irlanda, Jamaica y Barbados, y algunos territorios continentales como los países Escandinavos, Bulgaria, España, Portugal y Uruguay. La rabia urbana es importante en Latinoamérica, existiendo en Bolivia, Brasil, México, Nicaragua, Paraguay, Perú y Venezuela. También aparece en ciudades de Africa y Asia. La rabia desmodina está localizada desde el tercio norte de Argentina hasta el norte de México. Casos humanos de rabia por vampiros se han comprobado en Trinidad, Guyana, México, Bolivia, Brasil, Perú y Argentina.

La rabia silvestre está muy difundida en el mundo y las especies transmisoras varían según el país. Los transmisores involucrados son zorros, zorrinos, mapaches, chacales, mangostas, lobos. La rabia transmitida por murciélagos no hematófagos está bastante extendida (toda América registra aislamientos) y periódicamente se registran exposiciones y casos en animales y humanos. Su verdadera magnitud es objeto de importantes estudios en la actualidad.

En la República Argentina, la rabia urbana que involucraba a perros y gatos fue de gran importancia en la provincia de Buenos Aires (el gran foco de rabia urbana que tuvo el país: 4759 casos en animales y 13 en humanos en el año 1976), Santa Fe, Tucumán, Santiago del Estero, Salta y Jujuy. Merced a las medidas de control, este tipo de rabia llegó a la erradicación en 1984 en Buenos Aires y entre 1990-98 en las provincias del Norte del país. Las provincias que volvieron a presentar casuística fueron Salta y recientemente Jujuy con casi un centenar de casos durante 2003, ya que estas provincias reciben importación de casos de países limítrofes. El tercio medio y sur del territorio nacional se han mantenido libres de este tipo de rabia.

La rabia desmodina tiene importancia en Misiones, Corrientes, Formosa, Chaco, Salta y Jujuy, en el ganado bovino y equino, pero con respecto al hombre es mínima. La rabia silvestre no es un problema actual en Argentina debido a la escasa densidad por kilómetro cuadrado de los animales transmisores. La rabia en murciélagos no hematófagos está siendo objeto de estudio cada

Tabla 66-2. Interpretación de las pruebas de corpúsculos de Negri, IF e inoculación

Corpúsculos de Negri (+)	=	rabia
IF (+)	=	rabia
Inoculación IC a ratones (+)	=	rabia
Corpúsculos de Negri (–)	=	no se puede descartar rabia
IF (–)	=	no se puede descartar rabia
Inoculación IC (–) si la IF original fue (–)	=	no es rabia

vez más creciente, dado que es la que queda y se evidencia en las zonas que se liberan de la rabia canina. Se la ha detectado también en zonas del sur del país (Río Negro) que nunca registraron rabia con anterioridad. Esporádicamente, este tipo de rabia aparece en animales terrestres que se infectan de los murciélagos.

Desde el punto de vista epidemiológico se consideran tres tipos de rabia.

Rabia urbana o ciudadana

Es la que ocurre en las ciudades. En ella los principales transmisores son los perros, y en menor porcentaje los gatos. El hombre está muy expuesto a ella por convivencia.

Rabia silvestre, salvaje o selvática

Es la que ocurre en las zonas rurales, selvas, bosques, estepas, etc., y en la cual los transmisores son los zorros, zorrinos, mapaches, lobos, mangostas, chacales, etc. La exposición humana es mucho menor que en la rabia urbana. La rabia en murciélagos no hematófagos se puede estudiar dentro de la silvestre.

Rabia desmodina, paresiante o autóctona sudamericana

Los transmisores son murciélagos hematófagos (vampiros) fundamentalmente el *Desmodus rotundus* que, por alimentarse de sangre, muerden principalmente al ganado bovino, en menor grado al equino y más raramente al hombre.

MORTALIDAD

Los brotes en animales pueden tener una mortalidad importante en ejemplares no vacunados. La letalidad es destacable, dado que la enfermedad clínica es invariablemente mortal.

FUENTE DE INFECCION

Son los animales infectados que eliminan el virus rábico por la saliva y lo transmiten por mordeduras desde algunos días antes de presentar síntomas (hasta 10 días) y durante los días en que se manifiestan clínicamente enfermos (3 a 7 días aproximadamente). Una mordedura ocasionada por un animal aún clínicamente sano puede resultar infectante si este animal estaba dentro de los 10 días previos a la iniciación de su sintomatología rábica y, por supuesto, también si la mordedura se produce cuando el animal está clínicamente rabioso. Otras formas comprobadas de infección son excepcionales, como la inhalación de aerosoles ricos en virus rábico que penetran por vía aerógena y la infección por trasplante de córnea. Este virus es incapaz de atravesar la piel intacta (aunque sí puede atravesar las mucosas).

PROFILAXIS

Múltiples medidas coadyuvan a prevenir la rabia; dentro de las más utilizadas cabe citar:

- Vacunación de animales domésticos involucrados en la transmisión.
- Vacunación de animales silvestres.
- Control de animales transmisores (identificación, tenencia responsable, control de la reproducción, etc).
- Control de transmisores en los brotes (vampiros, zorros, etc).
- A nivel humano se debe considerar la inmunización en profesiones habitualmente expuestas a la rabia: veterinarios, personal de perreras, productores de vacunas y laboratoristas de diagnóstico.
- Control veterinario de animales que hayan provocado mordeduras.
- Consulta médica antirrábica ante la exposición por mordeduras y tratamiento antirrábico de los afectados.

La importancia económica de la rabia está relacionada a los gastos de las campañas de vacunación, pérdidas de horas de trabajo de las personas que se someten a los tratamientos por exposición a mordeduras, costos de las vacunas, mantenimiento de servicios antirrábicos de atención y diagnóstico y gastos en control de animales. En el caso de la rabia bovina, las pérdidas por muerte durante los brotes son importantes, así como los gastos de prevención.

TRATAMIENTO

El tratamiento antirrábico posexposición consiste en llegar a producir inmunidad efectiva antes de que el virus alcance el SNC, porque si llega a colonizar en el mismo se producirá la encefalitis rábica mortal. Los esquemas de tratamientos antirrábicos están basados en recomendaciones de Comités de Expertos convocados por la Organización Mundial de la Salud y son aprobados y regulados por los entes de salud nacionales y provinciales.

Las acciones ante una exposición por mordeduras son las siguientes:

- Limpieza de la herida empleando agua y jabón, agua y detergente o solución de cetrimida a los efectos de reducir la cantidad de virus rábico presente en la herida.
- Aplicación al individuo mordido de un esquema de tratamiento específico posexposición (con vacunas, las cuales se acompañarán de inmunoglobulinas específicas si correspondiere).

Cuando ya hay sintomatología rábica el desenlace es mortal, tanto en animales como en personas.

GENERO *VESICULOVIRUS:* VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR

El virus es de estructura similar al de la rabia. Existen tipos diferentes: el tipo Indiana (al que pertenecen los virus aislados en Argentina en 1963 de caballos) y el tipo New Jersey, más virulento.

El Cocal (aislado de caballos, vacas y cerdos) se puede considerar un tercer tipo ya que presenta diferencias con el Indiana, donde se lo incluía originalmente. Se multiplica en una amplia gama de cultivos celulares, embrión de pollo y por inoculación intracerebral en ratones, produciendo la muerte de los ratones por esta vía.

Este virus es el agente causal de la estomatitis vesicular una enfermedad en general benigna caracterizada por la aparición de vesículas en la cavidad bucal, bordes ungueales de las extremidades y mamas, en los equinos, bovinos y cerdos. Se transmite por contacto, con puerta de entrada digestiva y respiratoria; además puede infectar y transmitirse por artrópodos. Reviste importancia en el diagnóstico diferencial con la fiebre aftosa.

GENERO *EPHEMEROVIRUS:* VIRUS DE LA FIEBRE EFIMERA BOVINA O ENFERMEDAD DE LOS TRES DIAS

Este rhabdovirus puede presentar forma de bala o de cono. Se multiplica en células BHK 21, MS y Vero. Produce una enfermedad de los bovinos febril, aguda, con rigidez y claudicaciones, secreción nasal y ocular, inflamación de los párpados y dificultad deglutoria, de corta duración y generalmente con recuperación espontánea. Ocurre en Africa, países de Oriente y hubo brotes en Australia. No se presenta en Argentina.

GENERO *NOVIRHABDOVIRUS*: RHABDOVIRUS DE LOS PECES

Responden a las características generales de la familia. Se multiplican en cultivos de células de peces y a temperaturas entre 12 y 22 °C. Tienen importancia en el hemisferio norte, en peces de aguas frías. Los más importantes son el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (truchas y salmones), el de la septicemia hemorrágica viral (truchas y salmones) y el de la viremia primaveral de la carpa (carpas).

BIBLIOGRAFIA

Amasino CF, Avolio J, Fava F, Fernandez R, Pereira D. Rabia en murciélagos insectívoros: Nuevos diagnósticos efectuados en el Laboratorio Central de Salud Pública de la Prov. de Buenos Aires. Veterinaria Argentina. 1986, III (28): 735-739.

Amasino CF, González OE, Urrutia MI, Fuentes LS. Caracterización de las exposiciones por mordeduras de animales en el partido de La Plata y alrededores. Analecta Veterinaria. 1998, 18 (1/2): 21-28.

Amasino CF, Gury Domen F, De Gaetano J, Mena Segura C, Cerviño J, Amelio H. Exposición humana a rabia por un murciélago insectivoro de la localidad de Villa Mercedes (San Luis-Argentina). Veterinaria Argentina. 2002, XIX (189): 661-666.

Amasino CF, Garbi CJ, Amasino ME. La rabia urbana en la provincia de Buenos Aires, Argentina: Origen-Evolución-Actualidad. Analecta Vet. 2002, 22 (1): 17-31.

Amasino CF, Gury Domen F, de Gaetano J, Mena Segura C, Palazzolo A. Rabia debida a virus de murciélago en un gato de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Rev sci tech Off int Epiz. 2003, 22 (3): 1021-1027.

Cliquet F, Aubert M, Sagne L. Development of a fluorescent-antibody virus neutralization test (Favn Test) for the quantitation of rabies neutralizing antibody. Journal of Immunological Methods. 1998, 212 (1): 79-87.

Kaplan MM, Koprowski H. La Rabia. Técnicas de Laboratorio. 3°. Ed. Organización Mundial de la Salud. Ginebra. Suiza. 1976.

Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory technics in rabies, Fourth edition. World Health Organization. Geneva. 1996.

Nadindavis SA. Polymerase-chain-reaction protocols for rabies virus discrimination. Jour of Virol Methods. 1998; 75 (1): 1-8.

Organización Mundial de la Salud. 1992. Comité de Expertos de la OMS sobre Rabia. Octavo informe. Ginebra. Suiza.

Capítulo 67

ORTOMIXOVIRUS

Marcelo Ricardo Pecoraro

CARACTERISTICAS DE LA FAMILIA VIRAL

La familia Orthomixoviridae, del griego *ortícos* (derecho) y *mixo* (moco), ha sido recientemente dividida en cinco géneros: *Influenza A, B, C, Thogotovirus* e *Isavirus*. Los virus de *Influenza A, B, C* son los causantes de la gripe. Hasta los primeros años de la década de 1930 no existía aún una demostración definitiva sobre la etiología de las graves pandemias y epidemias, ni conocimiento sobre los mecanismos de reaparición periódica de las mismas, como tampoco estudios de la respuesta inmunológica. Fue en los Estados Unidos que Richard Shope, en 1931, aisló por primera vez el virus de la influenza porcina tipo A. En 1940 se aisló e identificó un nuevo agente, el que presentó marcadas diferencias antigénicas con los precedentes, denominándoselo virus influenza tipo B y en el año 1949 se identificó el tipo C, con lo que se completó el grupo de estos organismos conocidos hasta el presente. A partir de estos hallazgos, los progresos técnicos y el interés de los investigadores permitió el análisis detallado de estos agentes. Representantes del género *Thogoto* son transmitidos por picaduras de garrapatas infectando humanos y ganado en Asia, Africa y Europa con consecuencias patogénicas poco conocidas. Los *Isavirus* causan anemia grave, leucopenia, ascitis, necrosis hemorrágica y petequias en salmones criados en Noruega y otros lugares de cría del Atlántico Norte.

Los virus de la influenza tienen un genoma de RNA de polaridad negativa y dividido en 8 segmentos lo que facilita la recombinación viral y los fenómenos de reactivación (fig. 67-1). Un detalle de los polipéptidos codificados por cada uno de los segmentos se presenta en la tabla 67-1. La replicación es nuclear. Los representantes de cada género comparten características similares. Los viriones tienen simetría helicoidal y son envueltos por una cubierta lipídica proveniente de la célula huésped, lo que los hace susceptibles a detergentes y a casi todos los desinfectantes. Son esféricos pero también pueden observarse formas filamentosas al microscopio electrónico. Los esféricos son de 50-120 nm de diámetro, los filamentosos pueden medir 20 nm de diámetro y unos 200-300 nm de largo. En la envoltura poseen distintas proyecciones con forma de espícula (cerca de 500 que sobresalen unos 10-14 nm) uniformemente extendidas en toda la superficie.

Los estudios sobre la estructura y función de estos virus han logrado identificar tres componentes estructurales antigénicos del virión, cuya identidad química y funcional es característica. Uno de ellos se localiza en íntima relación con el ácido nucleico y se denomina nucleoproteína (NP), es específica de tipo viral, es decir que constituye la base inmunológica de la división de los tres grandes grupos de virus de la influenza. Las NP son de diverso tamaño y su arreglo dentro del virión es incierto. La nucleocápside está incluida dentro de la membrana lipoproteica. En la envoltura externa del virión se hallan los otros dos componentes estructurales en forma de espícula que pueden identificarse por métodos serológicos: la hemaglutinina (HA) es la glicoproteína principal, la cual es altamente inmunogénica, y está intercalada irregularmente con la neuraminidasa (NA). La relación entre HA/NA es de 4-5 a 1. La NA tiene actividad enzimática. Los antígenos de superficie son específicos de cepa o subtipo viral y, a su vez, son los que experimentan en forma independiente variaciones genéticas. Es así que se describen dos tipos fundamentales de cambios genéticos: a) **"Drift o deriva antigénica"** (modificaciones menores del genoma que ocurren muy gradualmente en los miembros de un mismo subtipo) y b) **"Shift antigénico"** (cambios mayores del genoma por recombinación de alta frecuencia o intercambio completo de segmentos). Estos, por lo general, son de aparición brusca y caracterizan a las cepas pandémicas.

Los virus de la influenza tipo A provocan infecciones naturales en humanos, cerdos, equinos, aves, mamíferos acuáticos y primates. El tipo C también infecta a cerdos, pero el tipo B, hasta el presente, sólo ha sido comprobado en humanos.

REPLICACION VIRAL

La expresión y replicación del virus de la influenza ha sido ampliamente detallada por Krug y col. (fig. 67-2). Según estos autores, una partícula de virus de la influenza se une a la célula por interacción entre la HA viral y una molécula de ácido siálico de una glicoproteína receptora en la superficie de la célula. A continuación el virión es endocitado y encerrado en una vesícula endocítica. El bajo pH de la misma produce un cambio conformacional en la molécula de HA que facilita la fusión de las membranas viral y de la vesícula endocítica, permitiéndole al virión liberar su contenido en el citoplasma celular. La NC migra al núcleo y la polimerasa que lleva asociada comienza la transcripción primaria del RNA mensajero viral. Estos transcriptos son usados para la traducción de proteínas virales tempranas NP y NS1.

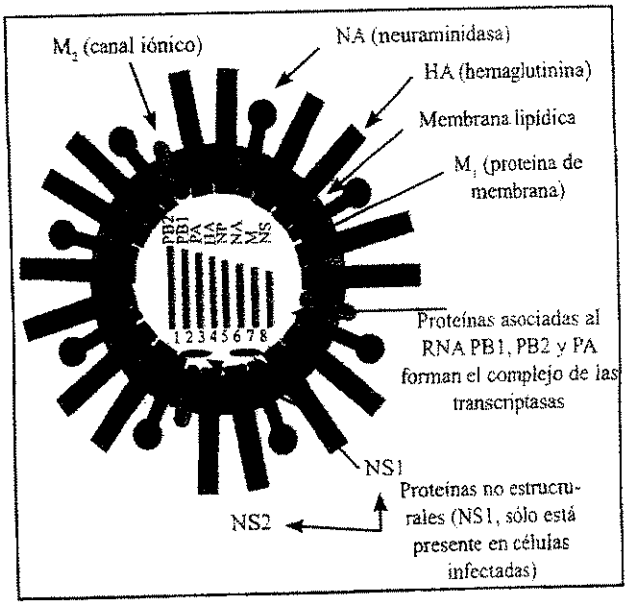


Figura 67-1. Esquema de un ortomixovirus.

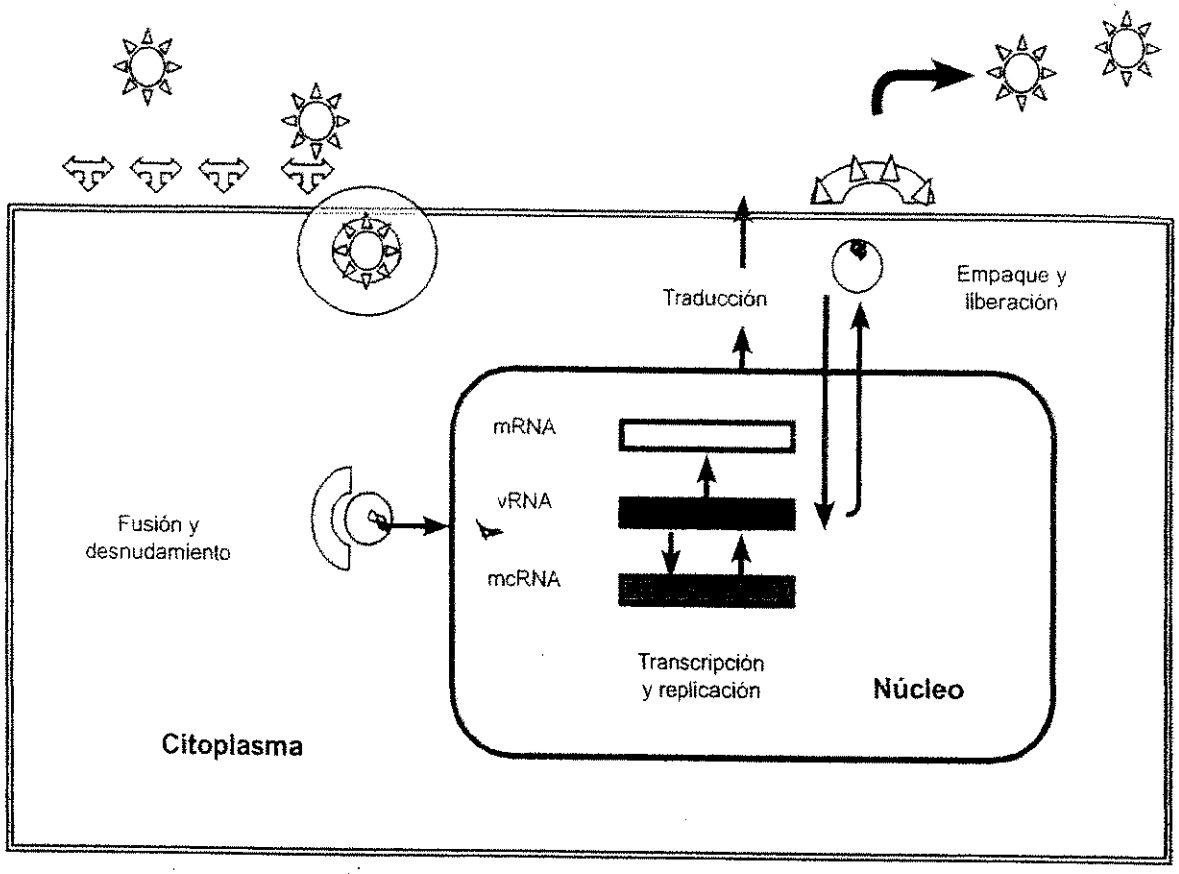


Figura 67-2. Esquema del ciclo replicativo del virus de la influenza.

La traducción de RNA mensajero celular es bloqueada. El acúmulo de NP produce un cambio en el genoma celular infectado disparando la síntesis de RNA viral. Este es encapsidado por la NP en el núcleo y funciona como molde para la transcripción secundaria de RNA mensajero. Tardíamente, los principales productos de la traducción son las proteínas M1, HA y NA. Estas dos últimas son procesadas y transportadas a la superficie donde se integran a la membrana celular. El ensamble de las nuevas partículas es en el citoplasma. La NC es "encerrada" por una cubierta de M1 y brota fuera de la célula usando la membrana celular como parte de su envoltura junto con las glicoproteínas de superficie. La actividad de la NA produce la liberación de los viriones de la célula hospedadora.

En este capítulo describiremos la patogénesis, diagnóstico y prevención de los ortomixovirus tomando como modelo al virus de la influenza equina por su importancia en veterinaria.

Influenza equina

Los virus de la influenza equina (IE) pertenecen al tipo A y dentro de ellos se describen dos subtipos, el 1 y el 2. El primer subtipo fue aislado en 1956 en Checoslovaquia, durante una epizootia que abarcó Europa del Este y Suecia. El virus fue denominado A/equi/1/Praga/56 (H7N7). El segundo subtipo fue aislado en Miami en febrero de 1963 y se lo denominó A/equi/2/Miami/63 (H3N8). Ambos fueron posteriormente aislados en Argentina en 1976 y 1985 respectivamente. El subtipo 1 ha dejado de circular en la población de equinos del mundo mientras que el subtipo 2 y sus variantes siguen siendo causales de enfermedad hasta nuestros días.

La IE es una enfermedad infectocontagiosa que afecta las vías respiratorias inferiores de los equinos, presentándose en brotes epizoóticos de mediana o gran intensidad con un breve período de incubación de 1 a 3 días. La enfermedad es de alta morbilidad (95 a 98%) y baja mortalidad. Los animales son susceptibles, cualquiera sea su edad o raza. La sintomatología clínica es de aparición súbita, principalmente rinitis serosa al principio y seromucosa que paulatinamente se hace mucopurulenta por complicaciones bacterianas secundarias. Además se aprecia aumento de la temperatura (39-41 °C), decaimiento y tos seca. Las mucosas están congestivas, pudiendo detectarse faringitis y laringitis. La enfermedad se propaga con rapidez debido a la tos violenta y frecuente, pasando el virus de un caballo a otro a través de aerosol. Otras complicaciones ocasionales son neumonía, bronconeumonía y pleuresía. La destrucción de la mucosa respiratoria posibilita las infecciones bacterianas secundarias. Los animales se recuperan aproximadamente en 10 días pudiéndose mantener cierta tos residual.

PATOGENESIS

La infección por el virus de la influenza es adquirida por un mecanismo que involucra la transferencia de secreciones respiratorias que contienen partículas virales de un individuo infectado a otro susceptible. Gran cantidad de virus está presente en las secreciones del individuo infectado y disponible para ser diseminado a través de pequeñas gotitas (< de 10 µm) por medio de estornudos y tos. Además, la naturaleza explosiva e inicio simultáneo de la enfermedad en distintos individuos sugiere que

Tabla 67-1. Polipéptidos codificados por cada uno de los 8 segmentos de RNA de virus influenza

Segmento	Tamaño (nucleótidos)	Polipéptido (s)	Función
1	2341	PB2	*Transcriptasa*: se une al Cap 1 en 5´del mRNA celular. Migra al núcleo.
2	2341	PB1	*Transcriptasa*: elongación del RNA viral naciente y también actúa en la síntesis de vRNA. Tiene localización nuclear
3	2233	PA	*Transcriptasa* y probable actividad de proteasa y timidinainasa. Tiene localización nuclear.
4	1778	HA	*Hemaglutinina*: glicoproteína de envoltura. Mayor antígeno y responsable de la unión del virión al receptor celular, previo clivaje de HA0 en HA1 y HA2.
5	1565	NP	*Nucleoproteína*: se une al RNA, es parte del complejo de transcriptasas y actúa en el transporte entre citoplasma y núcleo del vRNA.
6	1413	NA	*Neuraminidasa*: glicoproteína de envoltura y segundo mayor antígeno. Actúa en la liberación del virus por medio del clivaje de la terminal de ácido siálico de la glicoproteína receptora.
7	1027	M1	*Proteína de matriz*: mayor componente del virión
		M2	*Proteína integral de membrana-canal iónico*
8	890	NS1	*No estructural*: con localización nuclear, efecto sobre el transporte celular de RNA, splicing y traducción.
		NS2	No estructural: con localización nuclear-citoplásmica, parece modular la síntesis de NS1.

uno solo infectado es capaz de transmitir virus a un gran número de individuos susceptibles.

Una vez que el virus es depositado en el epitelio del tracto respiratorio, puede adherirse y penetrar en el mismo. Dentro de las células comienza la replicación viral. La liberación de nuevas partículas virales se extiende por varias horas y lleva a la muerte de las células infectadas. Los individuos que sufren una infección aguda presentan inflamación de la laringe, tráquea y bronquios, con congestión mucosa y edema. Los hallazgos histológicos son de vacuolización de las células del epitelio columnar con pérdidas de células y descamación que se extiende hasta la capa basal. En casos más graves puede observarse traquebronquitis ulcerosa, hemorragia extensa, membranas hialinas e infiltración de células polimorfonucleares. La recuperación está asociada con una regeneración rápida de la capa de células epiteliales. La infección bacteriana es una consecuencia común de la neumonía viral.

RESPUESTA INMUNE

La infección por el virus de la influenza determina el desarrollo de anticuerpos contra las glicoproteínas de la envoltura HA y NA así como para la proteína estructural M1. Algunos individuos pueden desarrollar también anticuerpos contra M y proteína NP. Las inmunoglobulinas IgA, IgM e IgG contra la HA aparecen simultáneamente luego de 2 semanas de la infección. La respuesta de anticuerpos es más rápida en la reinfección. Los anticuerpos contra la HA se pueden medir por las pruebsa de inhibición de la hemaglutinación (IHA), de ELISA y de virus neutralización (VN) aunque la IHA es el estudio más utilizado por lo económica y simple de implementar.

Los anticuerpos contra la HA protegen frente a la enfermedad e infección con virus homólogo. Aunque la correlación no es exactamente directa, títulos de IHA de 1:40 o mayores, o títulos de VN de 1:8 se asocian con protección contra la infección.

DIAGNOSTICO

Se puede establecer un diagnóstico clínico en base a la diseminación rápida característica y la tos seca frecuente, que sirve de diagnóstico diferencial con la arteritis viral y la rinoneumonitis equina. Suele presentarse como pequeños brotes hasta epizootias que se extienden por todo el país y a veces a países vecinos.

El diagnóstico de laboratorio se basa en el aislamiento viral a partir de las secreciones respiratorias durante la fase aguda de la enfermedad. Las muestras son inoculadas en huevos embrionados o células de línea MDCK. Para el diagnóstico rápido se usa la inmunofluorescencia directa, el ELISA y la reacción en cadena de la polimerasa. Las pruebas serológicas como la IHA que comparan sueros de la fase aguda y convaleciente, denominados muestras pareadas

obtenidas con un intervalo de 15 o 20 días entre sí, confirman el diagnóstico de infección cuando existe como mínimo una diferencia de cuatro diluciones entre la primera y la segunda muestra. Los virus de IE hemaglutinan glóbulos rojos de paloma y pollo.

PREVENCION DE LA ENFERMEDAD

La prevención y el control de esta enfermedad en el mundo se realiza por medio de la inmunización con vacunas inactivadas, las que previenen la gripe en proporción considerable (reducción de la frecuencia de hasta el 70%). En Argentina las vacunas están compuestas por virus inactivados del subtipo 1 y 2 y se realizan 4 vacunaciones anuales.

BIBLIOGRAFIA

Berrios Patricio E, Zeledón María O. Influenza Equina en Chile (1963-1992). Avances en Ciencias Veterinarias 7 (1): 9-26. 1992.

Fain Binda JC. Epidemiología de la Influenza Humana y Animal. UNR Editora. 2001

Horimoto T, Kawaoka Y. Pandemic Threat posed by avian Influenza A virus. Clinical Microbiological Reviews. 2001; 14 (1): 129-149.

Mandell, Douglas and Bennet's, Principle and practice of infectious diseases. Ed. Mandell, Bennet's and Dolin. Ed. Churchill, Livingstone, Philadelphia, Pennsylvania, 5° Ed. vol 2, 2000.

Mandel. Principios y prácticas de las enfermedades infecciosas. Capítulo 153, p. 1823-1841. 2000.

Mohanty/Dutta. Virología Veterinaria. Ed Interamericana, p. 188-191. 1983

Palese P, García-Sastre A. Influenza viruses: Molecular biology. Encyclopedia of virology. Ed. by Robert Webster & Alan Granoff. Academic Press; 1994. vol. 2 p. 715-722.

Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and Ecology of Influenza A virus. Microbiological Reviews. 1992; 56,1 :152-179.

Webster RG. Influenza viruses: general features. Encyclopedia of virology. Ed. by Robert Webster & Alan Granoff. Academic Press; 1994, vol. 2 p. 709-715.

Yewdell JW, Bennink JR, Graeme Laver W. Influenza viruses: Structure of antigens. Encyclopedia of virology. Ed. by Robert Webster & Alan Granoff. Academic Press; 1994, vol. 2 p. 722-727.

Capítulo 68

PARAMIXOVIRUS

Jorge Moreno-López

CLASIFICACION

De acuerdo al Séptimo Reporte del Comité Internacional de Taxonomía de los Virus, ICTV, la familia Paramyxoviridae ha sido clasificada dentro del Orden Mononegavirales debido a que los miembros de esa familia poseen en común una sola cadena de RNA (mono) con polaridad negativa (nega), y de ahí el nombre del Orden que incluye además las familias Rabdoviridae, Filoviridae y Bornaviridae con prototipos, el virus de la rabia, el virus Ebola y el virus Borna respectivamente. La familia Paramyxoviridae se subdivide a su vez en dos subfamilias: Paramyxovirinae y Pneumovirinae. La subfamilia Paramyxovirinae se subdivide en tres géneros: *Respirovirus*, *Morbillivirus* y *Rubulavirus* y la subfamilia Pneumovirinae, en dos géneros: *Pneumovirus* y *Metapneumovirus*. Debemos, sin embargo, aclarar que está ya en proceso una nueva clasificación que alterará en algo ésta, y particularmente al virus de Newcastle que en lugar del género *Rubulavirus*, será incluido dentro de un nuevo género. Esta nueva clasificación se dará a conocer en el Octavo Informe de ICTV que ya puede observarse en su página WEB.

ESTRUCTURA

Los virus de la familia Paramyxoviridae tienen una morfología pleomórfica, desde esféricos, alargados y hasta filamentosos con un tamaño que varía entre 150-300 nm. Los virus tienen una matriz lipídica que protege a la nucleocápside y que deriva directamente de la membrana plasmática celular. Contienen 2-3 glicoproteínas transmembrana (peplómeros) de 8-20 nm de longitud con 7-10 nm de espacio entre ellas, dependiendo del género. La nucleocápside viral consiste de una cadena única de RNA con proteínas asociadas, de simetría helicoidal de 13-18 nm de diámetro y una longitud de hasta 1000 nm dependiendo también del género. Las partículas virales contienen una única molécula de RNA de cadena simple de polaridad negativa y su tamaño varía de 15.222 a 15.882 nucleótidos.

Los miembros de la familia Paramyxoviridae codifican 8-12 proteínas, que varían de acuerdo a las diferentes subfamilias y a sus respectivos géneros. En general las proteínas son: la nucleocápside (NP), la fosfoproteína (F), la proteína polimerasa mayor (L), la proteína rica en cisteína (V), la proteína de membrana o matriz (M), la proteína de fusión (F), la hemaglutinina/neuraminidasa (HN) y la proteína hidrofóbica pequeña (SH). Las partículas virales están compuestas por 20-25% de lípidos y 6% de carbohidratos. Mientras los *Respirovirus* tienen la enzima neuraminidasa junto con la molécula de hemaglutinina (HN), los *Pneumovirus* y *Morbillivirus* tienen hemaglutinina pero no neuraminidasa.

REPLICACION VIRAL

Debido a la variedad de virus pertenecientes a la familia Paramyxoviridae, la replicación de las partículas virales, siendo compleja, presenta diferentes características, y para los detalles, debería consultarse el Informe de ICTV. Aquí se darán a conocer los aspectos generales de la replicación viral. La mayoría de los miembros de la familia Paramixoviridae se cultivan generalmente en varios tipos de células y, en particular en células homólogas como en el caso de *Morbillivirus* y *Pneumovirus*, aunque el cultivo aquí es algo tedioso y requiere adaptación. Todos ellos pueden cultivarse también en huevos embrionados. Las partículas virales se replican en el citoplasma y por lo general la replicación es lítica. La formación de sincicios es una característica particular, al igual que la formación de cuerpos de inclusión acidófilos en el citoplasma, a excepción de miembros del género *Morbillivirus* que producen cuerpos de inclusión acidófilos intranucleares. El fenómeno de hemoadsorción lo presentan los virus parainfluenza de los géneros *Respirovirus*, *Rubulavirus* y algunos *Morbillivirus* pero no los miembros del género *Pneumovirus*.

Los virus se adhieren a receptores celulares (sialoglicoproteína o glicolípidos) mediante la proteína HN. La proteína F media la fusión de la membrana viral con la membrana plasmática en un pH fisiológico. Las nucleocápsides libres e intactas con sus tres proteínas asociadas (N, P y L) son necesarias para la transcripción de la polimerasa viral RNA dependiente (transcriptasa). El genoma completo, de polaridad positiva, se sintetiza y sirve como "patrón" para la replicación de un genoma de RNA de polaridad negativa. El control de este proceso tiene lugar a nivel de la transcripción.

Mientras una mayoría de genes codifican una sola proteína, el genoma de la proteína P de la subfamilia Paramyxovirinae codifica otras proteínas distintas (P/V/C), y en algunos casos también D, involucrando la inserción extra de uno o dos nucleótidos G en su mRNA mediante un proceso denominado "edición". Este proceso resulta en la producción de proteínas con secuencias de aminoácidos diferentes.

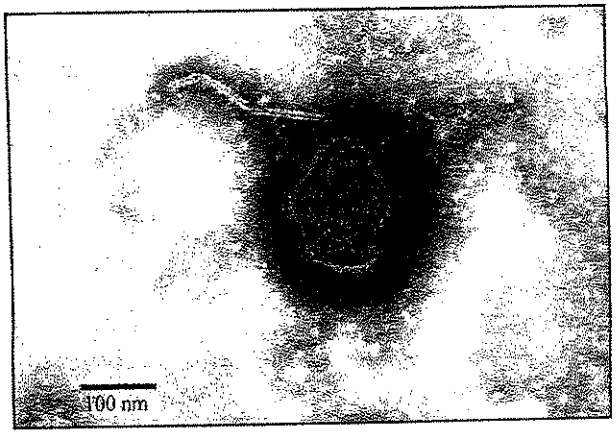


Figura 68-1. Fotografía electrónica de una partícula viral semidestruida donde se puede observar el RNA del virus. La fotografía corresponde al *Rubula* virus porcino PoRV-LPM miembro de la familia Paramyxoviridae. (Foto J. Moreno-López.)

La maduración de los viriones involucra: 1) la incorporación de glicoproteínas virales en la membrana plasmática del hospedador, 2) la asociación de la proteína matriz (M) y de otra proteína no glicosilada con la membrana modificada del hospedador, 3) el alineamiento de la nucleocápside con la proteína M y 4) la formación y liberación por gemación (*budding*) de los viriones maduros.

PATOGENESIS

La patogénesis de los miembros de la familia Paramyxoviridae es compleja no pudiéndose generalizar y por lo mismo se dará a conocer con más detalles cuando se describan las características de los virus de importancia en medicina veterinaria. Los virus de esta familia penetran las mucosas con ayuda de la enzima neuraminidasa NANA (ácido N-acetil neuramínico) y se replican en las células epiteliales y en macrófagos alveolares. A menudo ocurren infecciones con nuevos virus dando como resultado una eventual activación de infecciones persistentes. La prevalencia general de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación (HI), sugiere que la mayoría de los miembros de esta familia están extensamente distribuidos en la población animal y como en el caso de PIV-3 pueden ser de distribución ubicua. En una infección no complicada, la enfermedad es generalmente leve, asintomática y de difícil diagnóstico. La enfermedad puede ser grave especialmente cuando se complica con infecciones secundarias con otros agentes, sobre todo bacterias.

RESPUESTA INMUNE

Las características generales de la respuesta inmune se tratarán al describir los virus de importancia en medicina veterinaria.

PERSISTENCIA VIRAL

Un fenómeno particular y característico de la familia Paramyxoviridae es la persistencia viral. Por lo general, animales experimentalmente infectados por ejemplo con PIV-3, dejan de excretar virus después de 8-10 días de haber estado expuestos al mismo. Sin embargo, esto no implica que el virus haya sido eliminado del animal. Una infección no citolítica de los macrófagos alveolares en el pulmón de terneros infectados, indica que dichas células pueden producir y liberar virus incompletos cuando el animal se expone a bajas temperaturas. Este mecanismo puede explicar la ubicuidad del virus PIV-3 en la población bovina. En igual forma, tenemos casos de persistencia viral en enfermedades tales como el distemper canino o moquillo de los perros.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Cuando la presencia de signos y lesiones no es suficientemente clara para un diagnóstico clínico, la enfermedad se diagnostica mediante procedimientos de laboratorio, como aislamiento del virus a partir de secreciones nasales y en la necropsia a partir del pulmón, así como con ayuda de la inmunofluorescencia (IF), hemaglutinación (HA), inhibición de la hemaglutinación (HI), virus neutralización (VN) y ELISA. En muchos casos es necesario realizar un diagnóstico serológico basado en muestras pareadas para determinar una infección activa. La seroconversión de animales negativos a positivos o un incremento significativo de títulos HI (por lo menos 4 veces más alto) es una indicación de infección.

ENFERMEDADES DE MAYOR IMPORTANCIA EN VETERINARIA

Los virus de la familia Paramyxoviridae de mayor importancia en medicina veterinaria son varios y aquí mencionaremos aquellos que pertenecen a diferentes subfamilias y por ende diferentes géneros. El virus de la parainfluenza-3 (PIV-3) del género *Respirovirus*, el virus respiratorio sincitial bovino (VRSB) del género *Pneumovirus*, el virus de la peste bovina (Rinderpest) y la peste de rumiantes menores (PPR) del género *Morbillivirus*. Estos dos últimos, aunque no tienen significancia en el Continente Americano, son de mucha importancia en Africa y Asia con posibles repercusiones para otros Continentes, por ejemplo Europa. En aves, la enfermedad de Newcastle (NDV) del género *Rubulavirus* (avulavirus o aviparavirus) y en perros, el distemper canino (moquillo de los perros) del género *Morbillivirus* son enfermedades de importancia. Dentro de los animales de laboratorio el virus Sendai del género *Respirovirus* es endémico en la mayoría de las colonias de ratones. Finalmente, no olvidemos que nuevos virus emergentes nos hacen recapacitar sobre la importancia de esta familia. Al final de este capítulo mencionaremos otros virus y la importancia que tienen como agentes zoonóticos.

A continuación describiremos las características generales de los virus que acabamos de mencionar.

PARAINFLUENZA-3 (PIV-3) GENERO *RESPIROVIRUS*

El virus participa en el conocido "complejo respiratorio" de los bovinos juntamente con otros virus y bacterias, abriendo las puertas para infecciones respiratorias secundarias. La enfermedad se ha detectado en el 80-90% de la población animal y tiene una distribución prácticamente mundial.

EPIZOOTIOLOGIA

Se aisló por primera vez en los EE.UU. a partir de la secreción nasal de un bovino afectado por la llamada "fiebre de embarque" que tiene además como etiología otros agentes infecciosos tales como adenovirus, virus respiratorio sincicial, virus de la enfermedad de las mucosas, etc. Este complejo predispone a infecciones bacterianas secundarias con *Pasteurella haemolytica* y *P. multocida* así como otras bacterias, micoplasmas, etc. El estrés al que el animal está sometido como consecuencia de los largos transportes y aglomeración en los lotes de engorde, en donde generalmente se introducen animales de variadas procedencias y condiciones epizootiológicas, predispone al complejo respiratorio. La enfermedad es común durante los meses de invierno. La infección ocurre por inhalación de aerosoles, contacto con equipos agrícolas, etc. En condiciones naturales el período de incubación varía de 3 a 10 días dependiendo de los factores ambientales, presencia de estrés, alimentación, virulencia y dosis del virus. La morbilidad es del 25 al 50% y la mortalidad varía según las complicaciones con otros microorganismos.

SINTOMATOLOGIA Y LESIONES PATOLOGICAS

La sintomatología puede ser inaparente, pero por lo general los animales presentan tos, fiebre, secreciones nasales, respiración por

la boca, estertor respiratorio y ptialismo espumante. Patológicamente se observa rinitis moderada, bronquitis y neumonía fibrinosa. Histológicamente el pulmón presenta bronquiolitis, alveolitis, macrófagos en los alvéolos e inclusiones citoplasmáticas en los epitelios nasal y bronquial. Se observa además hiperplasia, metaplasia, necrosis e infiltración celular. El virus puede cultivarse en la mayoría de las células de bovinos, equinos y cerdos y se observan cuerpos de inclusión y células gigantes. El aislamiento del virus juntamente con un diagnóstico de laboratorio con pruebas convencionales tales como HA, HI y VN confirman la sospecha de la infección.

INMUNIDAD

El animal desarrolla inmunidad local (IgA) y también celular y presenta anticuerpos neutralizantes en el suero. En general, como consecuencia de una vacunación o exposición natural, la inmunidad es más parcial que completa. Debido a la alta prevalencia de anticuerpos en los animales adultos, los terneros recién nacidos reciben inmunidad pasiva una vez que han ingerido el calostro.

PREVENCION Y CONTROL

Como medidas de profilaxis y control es muy importante disminuir el estrés y el aglomeramiento de animales en los acopios de engorde o durante el transporte. La buena ventilación y desinfección de los establos es también de mucha importancia. Existen vacunas a virus inactivados o atenuados o vacunas polivalentes o múltiples con virus y bacterias y principalmente rinotraqueítis bovina infecciosa (IBR), adenovirus, diarrea viral bovina (BVD) y *Pasteurella haemolitica*. Los antibióticos, aunque deben restringirse a lo máximo, se utilizan para controlar las infecciones secundarias. Las vacunas a virus vivos atenuados confieren inmunidad protectora de IgA nasal, sin embargo no son 100% confiables.

VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL BOVINO (BRSV), GENERO *PNEUMOVIRUS*

EPIZOOTIOLOGIA

El virus se aisló inicialmente en EE.UU., Europa, Australia y Japón. Actualmente se considera como un agente etiológico muy importante de infecciones respiratorias graves en el mundo, no sólo en animales jóvenes, sino también en niños de temprana edad. La enfermedad aparece anualmente en la misma finca y los bovinos de 3 a 9 meses de edad son los más susceptibles.

PATOGENESIS

El virus se aísla a partir de secreciones nasales, traqueales y bronquiales a los 4 a 15 días después de la infección primaria. Se sospecha que a pesar de la presencia de anticuerpos circulantes, los animales pueden enfermar. Los anticuerpos locales protegen al animal y sus niveles se consideran como signos indicativos de protección.

SINTOMATOLOGIA CLINICA

Los signos se presentan de 2 a 8 días después de la infección con dos episodios típicos y distintos; primero un 80% de los terneros de 3-9 y 15 meses de edad enferman súbitamente con tos, conjuntivitis, lagrimación, secreción nasal, y 40 °C de fiebre. Unos 2 a 3 días más tarde, cuando la enfermedad parece haber sido superada, se inicia el segundo episodio que consiste en enfisema pulmonar, tos seca, pérdida de peso, y respiración superficial rápida de hasta 100 veces por minuto. Los animales dejan de comer, presentan poca o ninguna descarga nasal y la mortalidad alcanza hasta el 20% dentro de pocas horas. Los daños graves no son solamente ocasionados por el virus sino también por complicaciones bacterianas o reacciones de hipersensibilidad, lo que indica también un mecanismo autoinmune.

PATOLOGIA-HISTOPATOLOGIA

Las lesiones en las vías respiratorias se asemejan a las ocasionadas por BVD o por PIV-3 y son muy comunes la bronconeumonía, el edema, el enfisema, la infiltración mononuclear y la neumonía intersticial. En el lumen alveolar se observan células multinucleadas. En cultivos celulares se advierte la formación de sincicios e inclusiones citoplasmáticas eosinofílicas.

RESPUESTA INMUNE

Los anticuerpos maternos no protegen eficientemente a los terneros. El carácter enzoótico de la enfermedad indica que debe haber portadores. Los terneros se protegen gracias a los anticuerpos locales en las vías respiratorias. Los anticuerpos neutralizantes aparecen 7 días después de la infección y permanecen hasta 3 meses más tarde.

DIAGNOSTICO

El diagnóstico clínico preciso es difícil. Serológicamente puede hacerse por inmunofluorescencia en cortes de tejidos o en células de las secreciones nasales. Las muestras para aislamiento del virus tienen que estar bien conservadas y mantenidas en frío durante el transporte. El aislamiento del virus es laborioso y la presencia del efecto citopático en células cultivadas puede demorar muchos días. Lo típico es la presencia de sincicios. Para el diagnóstico se utilizan las pruebas de IF, ELISA y PCR.

CONTROL Y PROFILAXIS

Para el control, el manejo de los animales es importante. Se debe restringir el ingreso de animales de origen desconocido. Los resultados de la vacunación con varios tipos de vacunas no son consistentes, no previenen la infección pero sí reducen su gravedad. Las infecciones bacterianas secundarias son factores importantes para determinar el grado de infección y del problema.

PESTE BOVINA (RINDERPEST), GENERO *MORBILLIVIRUS*

Se la conoce también como "la plaga del ganado". Para la mayoría de los países ésta es una enfermedad exótica de declaración obligatoria e inmediata a las autoridades sanitarias correspondientes. La enfermedad afecta al ganado bovino en particular, pero también a ovinos, cabras y rumiantes salvajes. Una enfermedad similar pero distinta (véase más adelante) es la peste de pequeños rumiantes (PPR), que afecta a ovinos, cabras y tiene como etiología un virus similar. La enfermedad es también exótica para Europa, América y hasta hace poco era enzoótica en varios países de Asia

y Africa; sin embargo, gracias al apoyo de la Unión Europea dentro de un programa de erradicación, se ha logrado actualmente controlarla y, hasta cierto punto, erradicarla de esas regiones. En países africanos, la guerra y la inestabilidad política constituyen aún un problema grave para el control de la enfermedad.

EPIZOOTIOLOGIA

El virus afecta de manera particular a bovinos, ovinos y cabras y se ha aislado de animales salvajes en Africa y también de insectos en donde el virus sobrevive pero no se multiplica. La mortalidad en regiones enzoóticas llega al 30% y en animales exóticos hasta el 80 al 90%. Las razas europeas u otras que no han sido expuestas al virus son muy susceptibles presentando una mortalidad del 90 al 100%. Las razas bovinas en regiones enzoóticas son muy resistentes, pero pueden ser portadoras de la enfermedad.

PATOGENESIS

El virus se replica en las tonsilas y ganglios linfáticos locales y pasa a la sangre vía células mononucleares. Se multiplica en el sistema respiratorio y en el canal digestivo y se aísla a partir de secreciones y heces. La viremia se observa 1a 2 días antes de la aparición de los síntomas. Los anticuerpos pueden demostrarse 4 a 5 días después de la fiebre. Existen sospechas de la presencia de animales portadores del virus o de infecciones latentes que pueden reactivarse.

SIGNOS

En hatos susceptibles, la enfermedad se presenta inicialmente en forma explosiva y muchos animales enferman simultáneamente. La sintomatología se caracteriza por fiebre alta (40-43 °C) llegando a un período subnormal antes de la muerte. El animal presenta estomatitis, congestión de la mucosa bucal, erosiones en las vías respiratorias, sialorrea abundante, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta y fétida con tenesmo, coma y muerte aproximadamente a las 2 semanas después de la infección. En casos agudos la enfermedad desencadena la muerte entre los 2 a 6 días. Las erosiones en las mucosas pueden ser una indicación de peste bovina y aparecen 2 a 3 días después de la fiebre y la salivación. Se observa también inflamación y necrosis en los intestinos.

PATOLOGIA E HISTOPATOLOGIA

Se pueden observar úlceras en todo el tracto digestivo. Las mucosas del abomaso e intestino están muy congestionadas con petequias y áreas hemorrágicas con presencia de exudado y fluido fétido formando seudomembranas. El tracto respiratorio anterior está muy enrojecido y también con petequias, hay neumonía, deshidratación y emaciación. El tejido linfoide presenta cambios degenerativos, sincicios e inclusiones citoplasmáticas y pueden haber inclusiones intranucleares.

RESPUESTA INMUNE

La enfermedad ofrece inmunidad de por vida con presencia de IgM e IgG. Los animales naturalmente infectados o vacunados desarrollan anticuerpos secretorios concentrándose en el calostro. Las madres inmunes transmiten anticuerpos con el calostro a sus crías quedando ellas inmunes. El virus de la peste bovina ocasiona inmunosupresión y destrucción de los linfocitos T y B.

DIAGNOSTICO

El diagnóstico se realiza mediante pruebas de ELISA y VN. Para el diagnóstico diferencial hay que considerar la diarrea viral bovina, fiebre catarral maligna, fiebre aftosa y rinotraqueítis infecciosa bovina. Es una enfermedad de declaración inmediata y obligatoria a las autoridades del país. El virus de la peste bovina y el de PPR comparten antígenos comunes y su diagnóstico diferencial es necesario.

PROFILAXIS Y CONTROL

Hay que tener mucho cuidado con la importación de carne. Las vacunas vivas atenuadas dan inmunidad de por vida y son baratas para su producción. El mayor problema es mantener la "cadena fría". Durante los últimos años se han desarrollado vacunas termorresistentes que mantienen su potencia durante 15 días a 40 °C.

PESTE DE RUMIANTES MENORES (PPR), GENERO *MORBILLIVIRUS*

Es una enfermedad también exótica para la mayoría de los países y muy contagiosa. La patología puede presentar síntomas subclínicos con mortalidad en cabras hasta del 90%. En su inicio se creyó que era una cepa que se adaptó a cabras y ovinos pero se ha determinado que es un virus que tiene homología con el de la peste bovina. Por lo mismo se ha utilizado la vacuna de la peste bovina para controlar la peste de los rumiantes menores y viceversa. La vacunación da una protección de aproximadamente 1 año.

ENFERMEDAD DE NEWCASTLE (NDV)

Pertenece al género *Rubulavirus* pero en la reciente clasificación se está considerando la creación de un nuevo género *Avulavirus* o *Aviparavirus* para NDV.

Esta enfermedad tiene una distribución mundial y además de afectar a gallinas y pollos, puede involucrar a pavos, patos, gansos, faisanes, perdices, codornices, cuervos, palomas y otros tipos de aves. En el humano se sospecha que NDV ocasiona conjuntivitis.

EPIZOOTIOLOGIA

La enfermedad producida por el virus de Newcastle, también conocido como paramixovirus aviar tipo 1, es altamente contagiosa y ocasiona grandes pérdidas económicas. Después de la inhalación, el virus se replica en el epitelio del tracto respiratorio superior. La enfermedad se presenta en tres formas diferentes: lentogénica, mesogénica con 25% de mortalidad y velogénica con 100% de mortalidad y dentro de un período de 3 a 4 días. La virulencia, al parecer, depende de la forma cómo la proteína F se degrada. Las cepas velogénicas ocasionan signos nerviosos.

PATOGENESIS

El virus se replica en las células objeto de la infección primaria para después pasar al torrente sanguíneo diseminándose luego a las vísceras, en donde se multiplican para pasar de nuevo al sistema circulatorio y, en algunos casos, al sistema nervioso central. El virus infecta las vías respiratorias y el tracto intestinal. Después de 24 a 38 horas se detectan virus en todos los órganos. Ciertas cepas infectan solamente el tracto intestinal y el virus se

excreta con las heces. El virus se disemina con los alimentos, vehículos, agua, carne contaminada, sangre, personas y naturalmente los veterinarios. La enfermedad se transmite principalmente por aerosoles y por contacto directo con excreciones. Contribuyen a la diseminación de la enfermedad el agua, la lluvia que puede acarrear material contaminado, ropa, botas, alimentos, vehículos de transporte, visitantes, aves migratorias y animales depredadores que pueden servir como transportadores mecánicos.

SIGNOS

Pueden haber muertes repentinas sin signos clínicos. El animal presenta anorexia, fiebre (43 °C), problemas respiratorios, conjuntivitis, hemorragias y diarrea. La disminución en la producción de huevos retorna a su nivel normal por lo menos 4 a 8 semanas después que las aves se han recuperado de la enfermedad. Los signos del sistema nervioso se caracterizan por paresia, ataxia y tortícolis.

PATOLOGIA E HISTOPATOLOGIA

Cepas virulentas ocasionan hemorragias y lesiones ya sean en el aparato respiratorio como en el tracto intestinal. Los diferentes órganos presentan hiperemia, edema y hemorragias. En el sistema nervioso central hay infiltración linfocitaria, degeneración neuronal e hipertrofia de las células endoteliales. Hay desaparición del tejido linfoide, hiperplasia del retículo y plasmorragia del bazo. En la tráquea hay congestión, edema e infiltración de linfocitos y fagocitos. En los pulmones hay hiperplasia e hipertrofia de las células de las paredes alveolares.

DIAGNOSTICO

La presencia de signos respiratorios, digestivos, nerviosos y opacidad de la córnea es válida para el diagnóstico clínico que debe confirmarse con el aislamiento del virus en muestras a partir de la tráquea, heces, intestino, cerebro y también con ayuda de serología: HI, ELISA, VN, etc. Es muy importante determinar la virulencia del virus mediante el índice de patogenicidad. De esta forma se puede determinar si la cepa es de un virus lentogénico, mesogénico o velogénico. Los títulos de HI se correlacionan con la protección.

RESPUESTA INMUNE

La inmunidad se desarrolla a los 4 a 6 días después de la infección y permanece hasta 2 años más. La inmunidad local se transmite a los pollos vía huevo y se mantiene hasta 3 a 4 semanas después del nacimiento. La inmunidad materna y la edad del animal son de mucha importancia pero pueden interferir con la vacunación. Se detectan anticuerpos secretorios en los exudados nasales, de la tráquea y de los intestinos. Las aves infectadas con un virus lentogénico (utilizado para la producción de vacunas vivas) desarrollan una inmunidad celular y anticuerpos HI. El virus de Newcastle puede transmitirse entre fincas o entre países debido a que el agente puede sobrevivir por varios meses en la carcasa, en los huevos y en materiales disecados.

PREVENCION Y CONTROL

En las áreas y países libres de la enfermedad, se establecen medidas estrictas de erradicación basadas en el sacrificio de los animales afectados. En los países en los que ya se ha establecido la enfermedad, el control se hace en base a la vacunación. Es una enfermedad que debe denunciarse inmediatamente a las autoridades sanitarias del país. Antes de entrar en la granja, el personal debe cambiar sus ropas y botas. Se debe evitar la introducción de objetos que pudieran estar contaminados. Se debe desechar apropiadamente todo material que haya sido contaminado y proceder a una limpieza y desinfección muy minuciosa de los locales. En pollos sacrificados se mantiene la infecciosidad del virus en la médula ósea y músculos durante 6 meses a -20 °C, por 4 meses a temperatura ambiente en huevos de gallinas infectadas, y más de 1 año a temperaturas de 4 °C. Las aves que han sobrevivido excretan el virus durante más de 4 semanas. El virus de la vacuna se excreta 15 días después de la vacunación.

MOQUILLO CANINO (DISTEMPER CANINO), GENERO *MORBILLIVIRUS*

La enfermedad tiene una distribución mundial y fue muy común en los perros antes de que se introdujeran sistemas de vacunación. Afecta principalmente a perros jóvenes así como a lobos, zorros, chacales, tejones, coyotes, visones, entre otros.

EPIZOOTIOLOGIA

La enfermedad es muy infecciosa y de alta mortalidad, con un promedio de 20% dependiendo de la edad, raza e inmunidad calostral. Se la conoce desde 1760 y Edward Jenner (pionero en la investigación sobre la viruela) la describió ya en 1809. La infección ocurre mediante inhalación de partículas virales que se excretan 5 días después de la infección y antes de la aparición de los síntomas. Los animales jóvenes son más susceptibles, especialmente a la edad de 4-6 meses. La infección es común en perros de la ciudad y en los llamados kennels o colonias de perros.

PATOGENESIS

Es una enfermedad aguda que se caracteriza por descarga nasal y ocular, serosa y más tarde mucopurulenta, seguida de bronconeumonía. La infección en el sistema nervioso central produce encefalitis. En ciertos animales se puede observar persistencia viral en el cerebro, como se ve en la encefalitis de perros viejos y que puede aparecer muchos años después de la infección primaria. La enfermedad puede compararse con SSPE (panencefalitis subaguda esclerosante en humanos) como consecuencia de una infección con el virus del sarampión.

SIGNOS

Es una enfermedad que presenta una curva difásica de la temperatura, conjuntivitis purulenta a veces complicada con queratitis ulcerativa, infiltración linfocitaria, bronquitis, neumonía catarral y gastroenteritis grave. Durante unos 2 días se observa fiebre de más de 40 °C para mantenerse después normal. Posteriormente, descarga lagrimal purulenta y nuevamente fiebre. Hay anorexia, vómitos, neumonía, diarrea fétida y a veces con pintas de sangre. Los animales pierden peso y pueden presentar signos nerviosos. Después de unos 2 días se presenta un segundo aumento de la temperatura, anorexia, tos, conjuntivitis, laringitis, bronquitis, tonsilitis y muerte. La mortalidad es del 30-80%. El virus puede pasar la barrera de la placenta infectando al feto y ocasionando la

muerte, o pueden nacer cachorros enfermos con típicos síntomas de moquillo. Las infecciones secundarias principalmente bacterianas complican el cuadro de la infección. Otra complicación tardía es la hiperqueratosis en el cojinete plantar de las extremidades y en el hocico y se lo conoce también como enfermedad del cojinete plantar duro ("hard-pad disease"). Los anticuerpos contra moquillo han sido observados en perros con artritis reumatoidea.

INMUNIDAD

Los anticuerpos maternos se transfieren exclusivamente con el calostro y por lo usual previenen la infección en cachorros de 8 a 12 semanas de edad. Los perros recuperados de una infección natural quedan inmunes de por vida. La inmunidad por vacunación en animales adultos puede durar varios años y en ocasiones los perros viejos que fueron vacunados cuando jóvenes, son susceptibles y enferman.

DIAGNOSTICO

Los síntomas clínicos son patognomónicos y la confirmación del laboratorio se hace mediante métodos inmunohistológicos. En animales vivos son útiles las improntas de secreciones nasales o de conjuntiva o leucocitos para observar en las células cuerpos de inclusión. El diagnóstico diferencial se hace con hepatitis canina, parvovirus, leptospirosis, toxoplasmosis, rabia. El diagnóstico se basa también en el aislamiento del virus en cultivos celulares durante la fase aguda de la enfermedad.

CONTROL Y PROFILAXIS

Se lleva a cabo mediante inmunización a las 8 semanas y luego con una dosis de refuerzo de 12 a 16 semanas. Se utilizan vacunas a virus vivo modificado para inducir inmunidad contra las proteínas F y H que se consideran protectoras. Se recomienda una vacunación anual y la aplicación de sueros hiperinmunes y antibióticos (uso restringido) para evitar complicaciones secundarias.

VIRUS DE LA RINOTRAQUEITIS DE LOS PAVOS, GENERO *METAPNEUMOVIRUS*

El virus se aisló por primera vez en 1978 en Africa del Sur y tiene una distribución mundial; ocasiona infecciones graves de las vías respiratorias en los pavos. La morbilidad puede alcanzar el 100%. Se lo conoce también como el síndrome de la baja producción de huevos o síndrome de la cabeza hinchada. Las aves tienen problemas respiratorios con mortalidad de hasta un 90%. El virus de la rinotraqueitis de los pavos es de difícil aislamiento. Para el diagnóstico se utiliza, entre otras, la prueba de ELISA.

OTRAS ENFERMEDADES DE IMPORTANCIA PRODUCIDAS POR VIRUS DE LA FAMILIA PARAMYXOVIRIDAE

EL VIRUS SENDAI EN RATONES

Este virus afecta endémicamente a la mayoría de las colonias de ratones y ocasiona serios problemas en animales de laboratorio. Suele transmitirse por aerosoles y contacto indirecto. La enfermedad está asociada con signos del aparato respiratorio superior y puede resultar en una enfermedad crónica con serios problemas para la reproducción de esos animales. Asimismo puede interferir con estudios de carcinogénesis a largo plazo alterando la formación de tumores en el pulmón y causando alveolitis crónica. Esta particularidad puede estar asociada con la persistencia de proteínas virales en ausencia de virus infeccioso en las células alveolares. En algunas colonias de ratones, la enfermedad es de tipo subclínico debido a la presencia de inmunidad materna. El diagnóstico serológico es confiable, particularmente la inmunofluorescencia. El aislamiento del virus se realiza a nivel del pulmón. El control de la enfermedad se basa especialmente en mantener las colonias de ratones aisladas evitando la introducción de animales que podrían ser portadores. Las colonias de animales enfermos deben sacrificarse en su totalidad y restaurarlas con animales libres de patógenos específicos (SPF) o animales gnotobióticos libres del virus Sendai. Se puede controlar la enfermedad utilizando vacunas inactivadas.

EPIDEMIAS DE *MORBILLIVIRUS* EN FOCAS, DELFINES Y BALLENAS

Hasta 1987 se desconocían prácticamente infecciones epidémicas de esta naturaleza en este tipo de animales. Desde entonces, se han informado por lo menos tres epidemias en delfines y dos en focas. Clínica y patológicamente así como epidemiológicamente, estas enfermedades se asemejan a infecciones ocasionadas por miembros del género *Morbillivirus* en mamíferos terrestres. Se ha especulado que contaminantes del medio ambiente predisponen la aparición de esas infecciones.

La primera epidemia de *Morbillivirus* en 1988 causó la muerte a más de 20.000 focas en Europa. La infección se extendió a lo largo de las costas de Dinamarca, Suecia, Países Bajos, Noruega, Alemania e Inglaterra. Durante 1987-88 se informó también la muerte de miles de focas en el Lago Baikal en Rusia. El virus que afectó a las focas europeas fue un nuevo *Morbillivirus* que se denominó *Phocine Distemper Virus* (PDV). Otros estudios han determinado que el virus que afectó a las focas en el lago Baikal, fue también muy similar al del moquillo canino.

En Irlanda, en 1988, se detectó un *Morbillivirus* en ballenas y más tarde el mismo virus en ballenas procedentes de Inglaterra, Escocia y Holanda. Se constató que éste es diferente del virus PDV de las focas. Durante 1990-92 se observó un brote de una infección con *Morbillivirus* en delfines en el mar Mediterráneo. Este virus junto con el de las ballenas se diferencian de otros *Morbillivirus*. El virus de las ballenas al parecer es más cercano al virus de la peste bovina, peste de rumiantes menores y sarampión que al virus del moquillo. Infecciones similares se detectaron en la costa oriental de los EE.UU. con un último brote en 1993-94 en delfines en el Golfo de México.

PARAMIXOVIRUS EMERGENTES *RUBULAVIRUS* PORCINO, PoRV-LPMV

Su nombre (LPMV) es el acrónimo de una Ciudad y Estado en México (La Piedad y Michoacán, respectivamente) en donde la enfermedad fue diagnosticada por primera vez en 1981. El virus fue aislado y caracterizado por Moreno-López en 1986, a partir

de una muestra de cerebro de un lechón que murió con encefalitis. El virus ha sido clasificado dentro del género *Rubulavirus*, PoRV-LPMV. Las secuencias del genoma viral de aproximadamente 15.069 nucleótidos, indican su similitud con otros *Rubulavirus*. Mediante alineamiento del genoma con otros paramixovirus, se ha determinado que el virus LPMV tiene una homología de un 40-45% con los virus de las paperas (Mumps virus, MuV) y con el de los simios (SV5). La enfermedad se caracteriza por encefalomielitis y neumonía en cerdos jóvenes así como por desórdenes reproductivos en cerdos adultos, con opacidad ocasional de la córnea en animales de cualquier edad. Este virus no ha sido aún aislado en otros países. En unidades comerciales de reproductores, los brotes de PoRV-LPMV comienzan en los establos de nacimiento en donde el virus ocasiona gran mortalidad en los lechones como resultado de una meningoencefalitis no supurativa. Los lechones afectados, después de un periodo corto de excitabilidad, se postran, presentan pupilas dilatadas, ceguera, nistagmos, conjuntivitis y, en ocasiones, opacidad de la córnea. La morbilidad es de 20-60% y la mortalidad varía entre 80-90%. Aparte de la opacidad de la córnea, la mayoría de los animales adultos aparecen clínicamente normales. Sin embargo, se informan frecuentes abortos y mortinatos o fetos momificados. En verracos se pueden observar trastornos reproductivos y ocasionalmente orquioepididimitis y disminución de la calidad del semen.

HENDRAVIRUS, MENANGLEVIRUS, NIPAHVIRUS, TIOMANVIRUS

Desde 1994 tres nuevos miembros de la familia Paramyxoviridae han cambiado de hospedador, pasando del animal reservorio a un animal doméstico (cerdos, caballos) y de ellos al humano. Estos virus han ocasionado infecciones respiratorias y neurológicas y en muchas oportunidades la muerte en humanos. Los virus de mayor importancia son Hendravirus y Nipahvirus; en la nueva nomenclatura se sugiere el nombre de HENIPA, como nuevo género.

HENDRAVIRUS

En Australia este virus ha ocasionado desde 1994 la muerte de 17 caballos y 2 personas. En 1999 causó la muerte de un caballo. Este virus no está cercanamente relacionado con Menanglevirus pero si con Nipahvirus. Investigaciones serológicas indicaron que los virus arriba mencionados tienen a un murciélago fructífero del género *Pteropus* como hospedador común.

NIPAHVIRUS

Se detectó por primera vez en septiembre de 1998 en Malasia y Singapur y ocasionó enfermedades respiratorias en cerdos; luego se transmitió al ser humano ocasionando más de 100 casos de encefalitis fatales (265 casos desde septiembre de 1998 hasta abril de 1999). Más de 1 millón de cerdos fueron sacrificados para controlar la enfermedad. Se han informado enfermedades experimentales en cerdos y gatos.

MENANGLEVIRUS

Fue aislado en 1997 cuando se observó un aumento en el número de abortos en una finca de cerdos cerca de Sydney, Australia. El virus fue aislado a partir de lechones nacidos con defectos congénitos o muertos y la enfermedad se confirmó en otras dos fincas de la región en donde este virus ocasionó síntomas parecidos a la influenza por lo menos en dos cuidadores de cerdos infectados. Este virus junto con el LPMV son miembros del género *Rubulavirus*.

TIOMANVIRUS

Es un nuevo virus aislado de murciélagos fructíferos del género *Pteropus* en Malasia y relacionado con *Menanglevirus* pero diferente de éste. Otro virus denominado Mapuera fue también aislado de murciélagos fructíferos en Brasil.

BIBLIOGRAFIA

Kahrs RF. In: Viral Diseases of Cattle. The Iowa State University Press. Ames, IOWA. 1981

Trends in Emerging Viral Infections of Swine. Editors: Antonio Morilla, Kyoung-Jin Yoon and Jeffrey J. Zimmerman. Iowa State Press. 2002

Veterinary Viruses. Edited by PH Russell, N Edington. The Burlington Press (Cambridge) Ltd., Foxton, Cabridge. 1995.

Veterinary Virology. Edited by FA Murphy, E Paul J Gibbs, MC Horzinek, J Studdert. Third Edition. Acad Press. 1999.

Virus Infection of Vertebrates. Volume 1. Series Editor: Marian. C. Horzinek. Edited by Dinter- Morein. Elsevier Sciences. Amsterdam, The Netherlands. 1992

Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses. In: Seventh Report Of The International Committee on Taxonomy Of Viruses. Ed. By MHV van Regenmortel CM Fauquet DHL. Bishop, Academic Press 1998.

PICORNAVIRUS

Ester Teresa González

CARACTERISTICAS DE LA FAMILIA

Son virus de gran interés en clínica humana y veterinaria, constituyendo una de las familias virales más estudiadas y mejor conocidas.

Los picornavirus (PV) son virus pequeños (*pico*: pequeño) y los miembros de esta familia son responsables de enfermedades muy serias. Como ejemplo en humanos el virus polio, es el agente responsable de la poliomielitis; mientras que en animales el virus de la fiebre aftosa afecta a biungulados y tiene reconocido impacto económico.

CLASIFICACION

La familia Picornaviridae incluye nueve géneros:

- *Enterovirus*: además de importantes virus que afectan a humanos (poliovirus, coxsackie grupo A y B, echovirus) existen miembros de este género que afectan a bovinos, porcinos y monos.
- *Rinovirus*: incluye muchos serotipos y afecta a humanos (105 serotipos) y bovinos (3 serotipos).
- *Hepatovirus*: agente causal de la hepatitis A en humanos (1 serotipo).

  Virus de encefalomielitis aviar (1 serotipo).
- *Cardiovirus*: afecta a ratones (encefalomielitis murina de Theiler) y humanos (encefalomielitis humana de Vilynisk).
- *Aftovirus*: agente de la fiebre aftosa (7 serotipos).
- *Parechovirus*: virus parecho. Afecta a humanos y anteriormente pertenecía al género *Enterovirus*.
- *Erbovirus*: agente causal de la rinitis equina tipo B.
- *Kobuvirus*: virus aichi. Afecta a humanos (1 serotipo). Kobuvirus bovino (1 serotipo).
- *Teschovirus*: teschovirus porcino, anteriormente enterovirus porcino (10 serotipos).

ESTRUCTURA

El virus tiene un diámetro de 18-30 nm. Posee simetría icosaédrica (fig. 69-1A), con genoma compuesto por una sola molécula de RNA, de sentido positivo (+) y compuesto por 7,2 a 8,5 kilobases.

No posee envoltura , por lo tanto es resistente al éter, alcohol y cloroformo. La radiación iónica, el fenol y el formaldehído lo inactivan rápidamente.

El RNA genómico es infeccioso, $1,10^6$ veces menos infeccioso que la partícula intacta, aunque la infectividad se incrementa si el RNA se introduce a la célula por transfección. Existe una región de 600-1200 bases en el extremo 5' que no se traduce y que es importante en la virulencia y en la encapsidación viral. En el extremo 3' existe un segmento más corto (50-100 bases) que es importante en la síntesis de la cadena de RNA (-). El resto del genoma codifica para una sola poliproteína de 2100-2400 aminoácidos (fig. 69-3)

Ambos extremos del genoma están modificados. La terminación 5' lleva unida una pequeña proteína VPg (alrededor de 25 aminoácidos) y el extremo 3' una secuencia de ácido poliadenílico (Poly A).

La cápside viral está compuesta por 60 protómeros ordenados en estructura icosaédrica. Cada protómero está formado por 4 polipéptidos los cuales derivan del clivaje de una proteína de mayor peso molecular (fig. 69-3).

VP1, VP2 y VP3 son proteínas externas, mientras que VP4 es interna y relacionada con el ácido nucleico.

En la superficie viral existen zonas más prominentes (activadoras de la respuesta inmune) y zonas deprimidas o "cañones" (zonas de interacción con el receptor) (fig. 69-1B).

Todos los géneros de PV tienen idéntica morfología pero se diferencian aplicando estudios moleculares, antigénicos, clínicos y epidemiológicos.

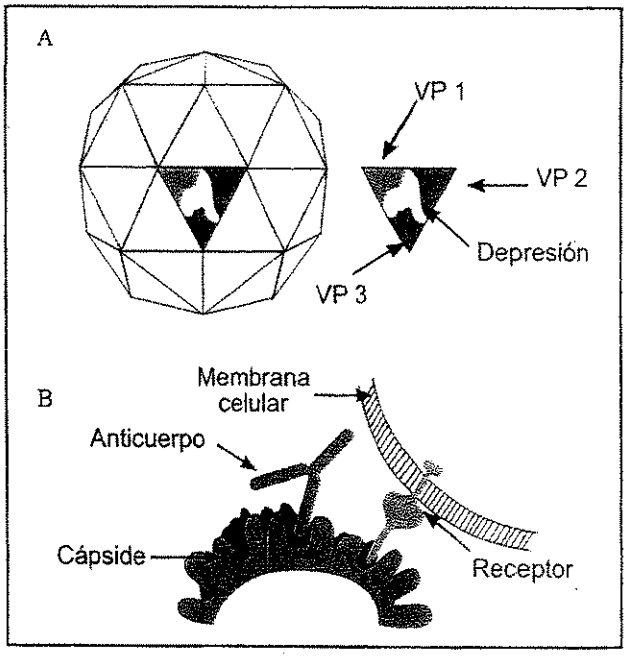


Figura 69-1. Estructura de los picornavirus. A, Ubicación de los polipéptidos VP 1, 2, 3 y 4. VP 4 está ubicado hacia adentro y se asocia con el RNA viral. B, Interacción entre la cápside viral, el receptor celular y el anticuerpo.

REPLICACION VIRAL

El ciclo de replicación de los PV es corto, generalmente no mayor a 8 horas, influyendo variables como pH, temperatura y tipo de células infectadas. La estructura antigénica de la cápside viral permite que se una a componentes específicos de la membrana celular denominados receptores (fig 69-1B). Estos receptores son moléculas que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y cuyo dominio aminoterminal interactúa con el virus en un sector denominado cañón, desencadenando su desestabilización y dando lugar a su desnudamiento (pérdida de la cápside), liberándose el RNA en el citoplasma celular. Diferentes virus usan distintos receptores y éstos pueden variar para un virus de un mismo género.

La replicación tiene lugar en el citoplasma (fig. 69-2) y aunque el efecto citopático más frecuente es la lisis celular, algunos PV pueden causar infecciones no líticas y dar persistencia viral.

La síntesis de proteínas celulares declina rápidamente después de la infección viral, debido a la interferencia con mRNA de la célula hospedadora.

El virus codifica la síntesis de una RNA-polimerasa la cual determina la síntesis de RNA (-). Estas cadenas RNA (-) sirven de molde para la síntesis de múltiples cadenas de RNA (+). Algunas de ellas actúan como mRNA y se traducirán a proteínas y otras constituirán el genoma de la progenie viral.

La mayoría de los PV producen cambios característicos en las células infectadas. En la primera hora se observa marginación de la cromatina celular y a las 2-3 horas aparecen vesículas en el citoplasma que se asocian a cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática y redondeamiento celular. El efecto citopático sería mediado, por lo menos en parte, por la acción de la enzimas lisosómicas.

PATOGENESIS

Los virus de la familia Picornaviridae causan una extraordinaria variedad de enfermedades. Los síndromes asociados con estos agentes incluyen infecciones asintomáticas, síndrome de meningitis aséptica, resfrío, enfermedad febril con "rash", conjuntivitis, herpangina, lesiones en el corazón, hepatitis, etc.

RESPUESTA INMUNE

El tipo de respuesta inmune (mediada por anticuerpos o por células) puede ser variable de acuerdo al virus considerado. El algunos casos (*Aftovirus*) la respuesta de anticuerpos es la más importante y cumple un papel fundamental en la prevención (inmunidad vacunal), aunque por su corta duración (a diferencia de la inmunidad natural) deja vulnerable al hospedador frente a sucesivas exposiciones.

Se han descrito sitios antigénicos reconocidos por anticuerpos neutralizantes, uno de ellos es una secuencia lineal localizada entre los residuos 130 y 160 de VP1.

En otros géneros (*Rinovirus* y *Erbovirus*) la inmunidad importante es la humoral temprana (IgA, IgM) que junto con los interferones (defensas inespecíficas) son importantes impidiendo la replicación del virus en el epitelio de las vías aéreas superiores.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Aislamiento viral

Las muestras provendrán de los órganos blanco donde el virus se replique y en el período agudo de la enfermedad. En el caso de *enterovirus* el material será heces ya que el virus se elimina generalmente en alto título. En el caso de *Rinovirus* se deberá contar con hisopados nasales y para aislar *Aftovirus* se tomará preferentemente material de las aftas presentes en la región bucal (lengua, paladar, encías) y/o podal. Las muestras se procesarán adecuadamente para su posterior inoculación en cultivos celulares susceptibles.

De acuerdo al virus considerado, se elegirán las pruebas serológicas aplicables para el diagnóstico: virus neutralización, inmunodifusión, ELISA (inmunoabsorción ligada a enzimas), Western blot. En ellas se deberá contar con muestras de suero

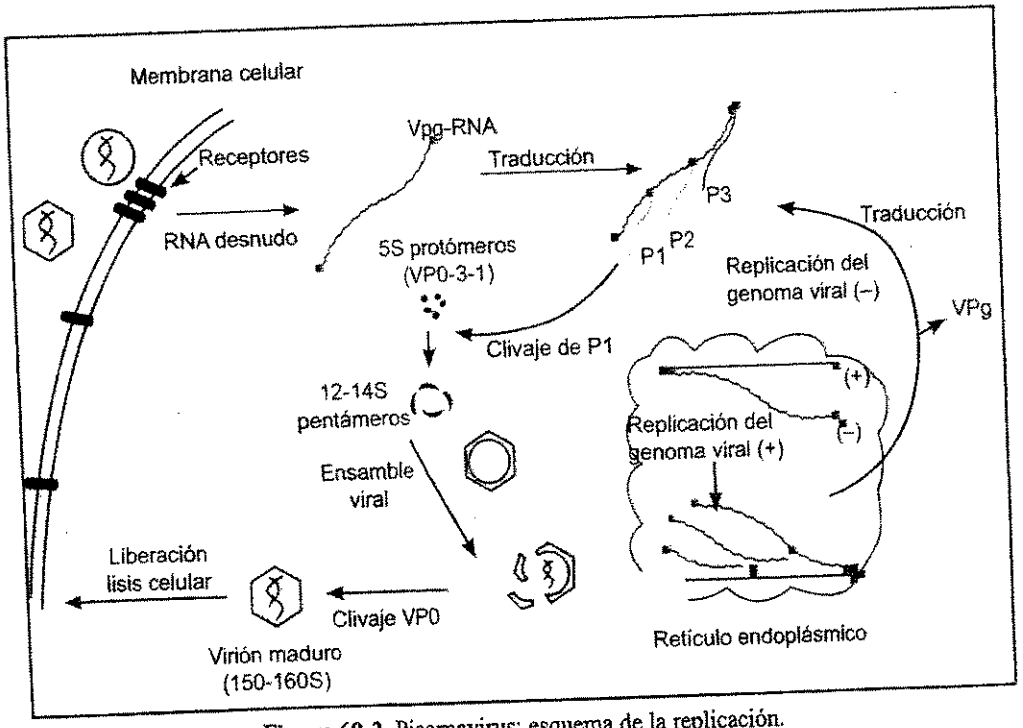


Figura 69-2. Picornavirus: esquema de la replicación.

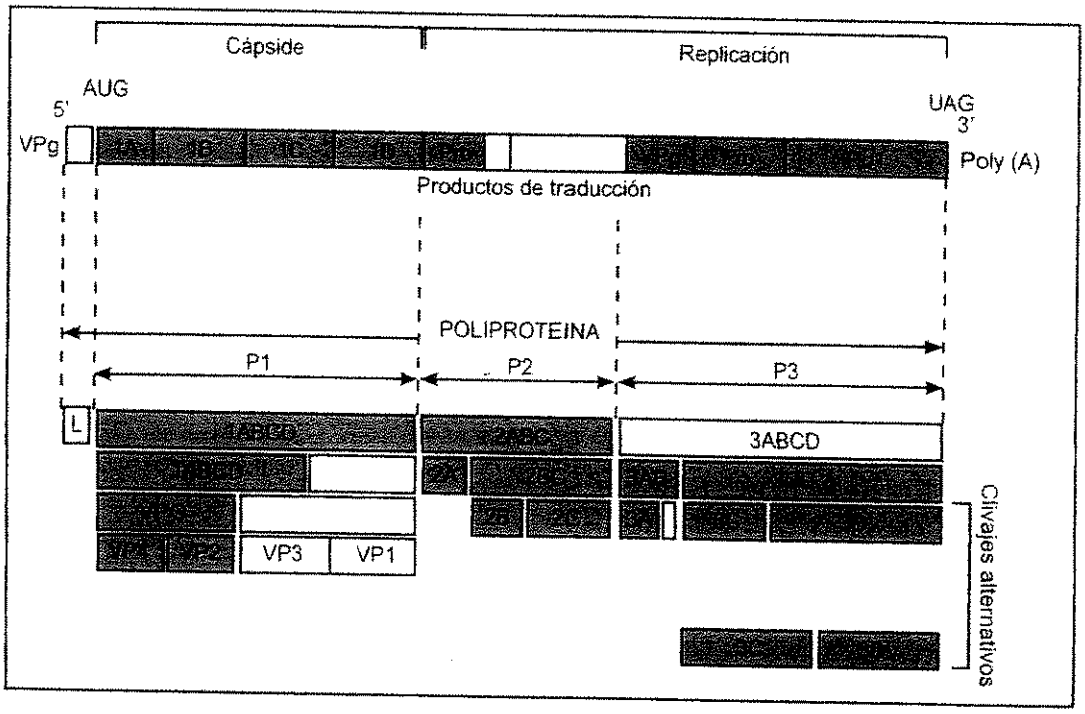


Figura 69-3. Productos proteicos sintetizados a partir del genoma viral.

provenientes de la etapa aguda y convalecientes y ambas muestras deberán analizarse en paralelo (seroconversión). El análisis de una sola muestra de suero puede llevar a un diagnóstico errado.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es en muchos casos una técnica rápida, sensible y específica (por ej., para *Enterovirus*). Como prueba directa, su resultado positivo indica la presencia del virus en la muestra analizada.

El estudio de los genomas virales determinando el grado de homología en la secuenciación de bases, ha permitido reclasificar varios PV o incorporar nuevos agentes virales dentro de algún género de la familia.

El desarrollo de anticuerpos monoclonales y su aplicación en pruebas diagnósticas, aumenta la especificidad de las reacciones (por ej., ELISA) y también constituye una herramienta valiosa para la caracterización de cepas virales.

ALGUNOS PICORNAVIRUS DE INTERES VETERINARIO

RINOVIRUS

Los *Rinovirus* (RV) infectan las vías aéreas superiores con una sintomatología comúnmente denominada resfrío. Están ampliamente distribuidos en la población humana donde se han identificado 105 serotipos. También están presentes en bovinos (3 serotipos).

Los RV replican a pH 6-8. Luego de una replicación inicial en el epitelio nasal, el pH ácido del estómago los destruye. La temperatura óptima para su replicación es 33 °C, característica de las vías aéreas superiores. La sintomatología es consecuencia del daño al epitelio ciliado y predispone a infecciones secundarias por bacterias.

La infección con RV estimula la producción de IgA, IgG e IgM tipo específica en el 90% de los animales afectados. Estos anticuerpos son detectables durante 2 a 3 semanas en el suero y las secreciones nasales. La mayoría de las inmunoglobulinas presentes en las secreciones nasales son IgA y constituyen la barrera más eficiente para evitar reinfecciones o al menos aminorar los síntomas. Otros mecanismos como la defensa inespecífica ejercida por los interferones, pueden estar involucrados en la recuperación. No se conoce el papel que desempeña la inmunidad celular. Los animales con infección a RV usualmente presentan abundante descarga nasal, con mucosa nasal pálida y edematosa.

ENTEROVIRUS

Se han descrito algunas enfermedades producidas por *Enterovirus* (EV) en animales, entre ellas: la polioencefalomielitis del cerdo (enfermedad de Teschen), enfermedad vesicular del cerdo (EVC), la encefalomielitis aviar (EA), actualmente clasificado en el género *Hepatovirus* y enterovirus bovinos (EVB).

Los EV son clasificados por su especie de origen y categorizados en serotipos.

Muchos EV animales están distribuidos mundialmente y pueden ser endémicos en ciertas zonas.

Se multiplican en un amplio rango de pH (3-10). Luego de una replicación inicial en orofaringe, los EV resisten el pH bajo del estómago, replicándose preferentemente en la mucosa del intestino delgado. La temperatura óptima de replicación es 37 °C.

Se transmiten de animal a animal por vía oral-fecal y se diseminan en el cuerpo por el torrente sanguíneo.

Con respecto a la susceptibilidad del hospedador, la mayoría de los EV infectan sólo a la especie de la cual han sido aislados o a especies estrechamente relacionadas. Una excepción a ello es el virus de la EVC, que es antigénicamente muy similar al virus Coxsackie B5 de humanos y capaz de producir sintomatología característica en personas expuestas (aquellos que trabajan en laboratorios con el virus de la EVC).

La mayoría de los EV producen infecciones subclínicas e inaparentes y sólo los EV porcinos y aviares causan enfermedad y tienen importancia económica.

La mayoría de los EV animales cultivados en células producen efecto citopatogénico con alteraciones evidentes. Los EV

porcinos han sido divididos en tres grupos, cada uno de los cuales produce distinto efecto citopático en líneas celulares de cerdo.

Ciertas cepas de EV porcinos son neurotrópicas produciendo polioencefalomielitis (enfermedad de Teschen), generalmente fatal. Otras cepas, como la 2, 3 y 5 han sido aisladas de casos menos graves. Hasta el presente se han secuenciado pocos EV animales y el genoma de los mejor estudiados (EVB y EVC) muestra una estructura similar a la de los enterovirus humanos, lo cual indicaría un ancestro común.

Los EV bovinos poseen reducida cantidad de VP0 (proteína precursora) la cual no es clivada a VP2 y VP4. Por otra parte, en observaciones en microscopio electrónico, se comprobó que una gran proporción de los viriones están constituidos por partículas vacías, sin RNA. El RNA desnudo de EV bovinos es infeccioso cuando se transfecta a células de cultivos celulares susceptibles porque el RNA cadena positiva se comporta de hecho como RNA mensajero.

Los EV bovinos, con 3 serotipos, no son patógenos para su hospedador natural. Es endémico y se aisla comúnmente de las heces.

El virus de la enfermedad de Teschen (encefalomielitis del cerdo), caracterizado por desórdenes del sistema nervioso central, está restringido a ciertas zonas de Africa y Europa central, mientras que el serotipo 1, menos virulento, tiene una distribución global. La enfermedad fue descrita por primera vez en 1929 y durante 1940 y 1950 produjo importantes pérdidas en países europeos y se diseminó a otros continentes. Actualmente no se detectan casos clínicos, aunque las evidencias serológicas indican que las presentes variantes virales no son patogénicas. Los serotipos pueden diferenciarse usando técnicas como virus neutralización, fijación del complemento o fluorescencia indirecta.

La enfermedad vesicular del cerdo (EVC) es una patología contagiosa, indistinguible en el campo de la fiebre aftosa, la estomatitis vesicular y el exantema vesicular del cerdo. Es una enfermedad relativamente nueva ya que fue observada inicialmente en 1966 en Italia y desde entonces se han señalado casos en Europa, Hong Kong y Japón. Africa, América y Australia están libres de esta enfermedad.

Los animales de las piaras se infectan por contacto con cerdos que diseminan el virus en sus excreciones, particularmente en las heces. Debido a la viremia, todos los tejidos contienen el virus y pueden ser fuente de infección.

El virus es muy estable en una variedad de condiciones ambientales durante muchos meses.

Los cerdos y el hombre son las únicas especies que pueden infectarse naturalmente.

El síntoma clínico característico es la cojera y las vesículas aparecen en las bandas coronarias y espacios interdigitales de uno o más miembros. Las vesículas se rompen dejando lesiones ulcerosas que se extienden al tarso y metatarso. También pueden presentarse vesículas y úlceras en el morro, el epitelio lingual y los pezones.

La EVC es en general una enfermedad poco importante y los animales se recobran, con un alto título de anticuerpos que previene posteriores reinfecciones.

No existen signos clínicos que ayuden a diferenciar la ECV de la fiebre aftosa, la estomatitis vesicular o el exantema vesicular del cerdo. Toda presencia de lesión vesicular deberá informarse y hacer el correspondiente diagnóstico de laboratorio. Las pruebas aplicables son: virus neutralización, fijación del complemento, ELISA, crecimiento diferencial en cultivos celulares y medición de parámetros físicos y bioquímicos. Las más útiles son la prueba de fijación del complemento y/o ELISA que permiten un diagnóstico diferencial en corto tiempo.

La encefalomielitis aviar fue identificada en 1932 y desde entonces se ha detectado en muchos países.

Generalmente afecta a las aves entre la primera y tercera semana de edad y a las adultas durante el período de postura.

Los síntomas incluyen caminar vacilante, incoordinación y hasta parálisis parcial o total. A medida que aumenta la incoordinación muscular, las aves tienden a sentarse sobre los tarsos, empeorando hasta no poder caminar. Al manipularlas se pueden sentir los temblores rápidos del cuerpo.

Se transmite principalmente por medio de los huevos de aves infectadas, aunque no se descarta la posibilidad de propagación directa o por medio de las heces. Las reproductoras vacunadas después de las 10 semanas de edad transmiten la inmunidad a la progenie a través del huevo.

El virus de la hepatitis del pato se aisló por primera vez en 1949 y se ha esparcido a países de Europa, Asia, Africa del Norte y América. En muchas zonas se desconoce la real prevalencia debido a la naturaleza subclínica de la infección.

AFTOVIRUS

Es el agente causal de la fiebre aftosa. Es una enfermedad altamente contagiosa, febril y aguda, producida por un virus ectodermotropo. El período de incubación varía entre 1 a 11 días.

Se caracteriza por un proceso febril inicial (40-41 °C), seguido de erupción vesiculosa (aftas) sobre las mucosas y la piel, de manera particular en regiones delgadas y desprovistas de pelo, localizándose principalmente sobre la boca, los rodetes coronarios y las mamas.

Afecta a todas las especies de pezuña hendida (biungulados), domésticos y salvajes, sobre todo los bovinos, pero también los porcinos, ovinos y caprinos, búfalos, cebúes.

Entre los animales salvajes susceptibles podemos mencionar: ciervo, antílope, jabalí, llama, alpaca, vicuña, etc. El caballo y los carnívoros son refractarios. Excepcionalmente transmisible al hombre, no representa más que una zoonosis menor.

La infección natural se produce en forma directa o indirecta. La primera por contacto o cohabitación de animales sanos o enfermos. La segunda por contaminación de objetos animados o inanimados con material eliminado por el animal enfermo: saliva, heces, leche, orina, semen, etc.

La aparición de la sintomatología es rápida (1-2 días posinfección) dependiendo de la cepa viral y el nivel de exposición.

En animales jóvenes puede presentarse una forma cardíaca, aguda y fatal. En ella el corazón se presenta dilatado, fláccido y friable.

El virus de la FA incluye siete serotipos: A, O, C, Sat1, Sat2, Sat3, Asia1. Cada uno de ellos tiene un número variable de subtipos. La emergencia de nuevos subtipos conlleva a una constante vigilancia epidemiológica para prevenir brotes y la necesaria reformulación de vacunas.

Desde la demostración en el año 1996 de la existencia de un antígeno asociado a la infección (antígeno VIA), se comenzó a utilizar una prueba de inmunodifusión en agar para demostrar la presencia de anticuerpos anti-VIA, lo que permitió identificar animales infectados en poblaciones sometidas a vacunaciones sistemáticas. El antígeno VIA está constituido por proteínas que se sintetizan durante la replicación viral, pero que no constituyen parte del virus (proteínas no estructurales).

A partir de 1987 fue implementado un programa continental de erradicación de la fiebre aftosa basado en la resolución de la Reunión Interamericana a Nivel Ministerial de Salud Animal. Los objetivos incluían la prevención de la enfermedad en áreas libres y la erradicación en regiones endémicas. Una gran limitación se relaciona con la capacidad del virus de la fiebre aftosa de establecer una infección persistente en ciertos hospedadores tales como los bovinos, sin importar que los animales hayan sido o no vacunados. La vacunación protege contra la enfermedad pero no necesariamente contra la posibilidad de infección y el establecimiento de un cuadro persistente. El monitoreo de la actividad viral para detectar potenciales nichos virales se torna un importante instrumento para la prevención y el control en regiones con campañas avanzadas de erradicación. Tal evaluación se tornó particularmente relevante a partir de la nueva visión de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) en lo que se refiere al reconocimiento de condición libre de infección de una región.

En este sentido, en 1998, en el centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTO-SA) OPS/OMS, se iniciaron investigaciones para el desarrollo de métodos diagnósticos para evaluar la actividad viral subclínica del VFA en poblaciones animales, sometidas o no a vacunación.

El abordaje diagnóstico desarrollado para la detección de anticuerpos contra proteínas no capsidales (PNC) que, en principio, son inducidas solamente durante la infección y no por la vacunación, tenía la ventaja adicional de que las PNC son altamente conservadas para todos los serotipos.

Basándose en estudios previos, se identificó el antígeno más adecuado para una única prueba de ELISA indirecta denominado 3ABC. Esta prueba, de alta sensibilidad, fue usada luego como estudio inicial para "screening", seguida por otra prueba confirmatoria de alta especificidad, prueba inmunoenzimática de electrotransferencia (EITB), que usa 5 antígenos no capsidales obtenidos por recombinación (3A, 3B, 2C, 3D y 3ABC).

Aplicando ambos métodos los resultados indicaron que tanto el ELISA 3ABC como el EITB tienen 100% de sensibilidad, tanto para la detección de infección aguda como para la subclínica, aun en etapas tardías de la infección persistente.

Bajo las condiciones establecidas, se obtuvo 99,2% de especificidad para el I-ELISA 3ABC. El uso de la prueba confirmatoria de EITB aumentó la especificidad al 100%, reforzando la importancia del uso de esta última como prueba confirmatoria, particularmente en regiones con baja prevalencia de la enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

Andeweg AC, Bestebroer TM, Huybregh M. Improved detection of rhinovirus in clinical samples by using a newly developed nested reverse transcription-PCR assay. J Clin Microbiol. 1999; 37 (3): 524-530.

Auerbach J, Prager D, Neuhaus S, Loss U, Witte KH. Grouping of porcine enteroviruses by indirect immunofluorescence and description of new serotypes. J Vet Med (B). 1994; 41: 277-282.

Craig ME, Robertson P, Howard NJ, Silink M, Rawlinson WD. Diagnosis on enterovirus infection by Genus-Specific PCR and Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. J Clin Microbiol. 2003; 41: 841-844.

Grubman MJ, Baxt B. Foot and Mouth Disease. Clin Microbiol Rev. 2004; 17 (2): 465-493.

Hyypia T, Hovi T, Knowles NJ, Stanway G. Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. J Gen Virol. 1997; 78:1-11.

Locher F, Suryanarayana VV, Tratschin JD. Rapid detection and characterization of foot and mouth disease virus by restriction and nucleotide sequence analysis of PCR products. J Clin Microbiol.1995; 33:440-444.

Minor P. Picornaviruses. Microbiology and Microbial infections. Virology B, Mahy and L. Colliers eds. Arnold, London, 9ª ed., Vol.1, 1998: 485-510.

Rueckert RR. Picornaviridae: the virus and their replication. In BN Fields, DM Knipe, P M-Howley, RM Chanock, JL Melnick, TP Monath, B Roizman and SE Straus (ed). Virology, 3rd ed. 1996. Lippincott-Raven, Philadelphia: 609-654.

Smith TJ, Baker T. Picornaviruses: epitopes, canyons and pockets. Adv V Res. 1999; 52: 1-23.

Zell R,Stelzner A. Application of genome sequence information to the classification of bovine enteroviruses: the importance of 5´and 3´non-traslated regions. Virus Res. 1997; 51:213-229.

Capítulo 70

ARTERIVIRUS

María Gabriela Echeverría

CARACTERISTICAS DE LA FAMILIA VIRAL

La familia Arteriviridae está formada por un único género, *Arterivirus*, cuya especie tipo es el virus de la arteritis equina (EAV). Pertenecen a esta familia, además, el virus de la deshidrogenasa láctica del ratón (LDV), el del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) y el de la fiebre hemorrágica de los simios (SHFV). Las infecciones naturales producidas por los *Arterivirus* se restringen a una sola especie hospedadora.

Las partículas virales poseen envoltura y tienen un diámetro aproximado de 40-60 nm. El ácido nucleico es RNA de cadena simple y polaridad positiva y de un tamaño entre 12,7 a 15,1 kilobases, suficiente para codificar las proteínas no estructurales (involucradas en la replicación) y las estructurales. La cápside es de simetría icosaédrica, mide cerca de 30-35 nm de diámetro y está formada por una única proteína (N, o proteína de la nucleocápside), que constituye entre un 20-40% del total de proteínas del virión. Esta proteína es altamente inmunogénica en EAV y PRRSV. En la envoltura se encuentra un número variable de proteínas. La proteína estructural M (no glicosilada) es la más conservada entre los miembros de esta familia. Las demás proteínas estructurales, mayores o menores, pueden estar glicosiladas (G o GP) y reciben distintos nombres de acuerdo al virus del que se trate: G_L, G_S GP_3 y GP_4 y E en EAV, mientras que en PRRSV se denominan GP_5, GP_2, GP_3 y GP_4 y E.

Debido a la composición lipoproteica de la envoltura, los arterivirus son sensibles a solventes lipídicos (éter y cloroformo) y detergentes no iónicos (desoxicolato o nonidet). La estabilidad de los viriones está influenciada por la temperatura y el pH; son rápidamente inactivados a pH 3 mientras que permanecen infecciosos a pH entre 6 y 7,5. A temperatura ambiente, los viriones son estables por 24 horas, mientras que a temperaturas superiores se inactivan rápidamente. Es conveniente, por lo tanto, conservar los virus a temperaturas entre –20 y –70 °C por períodos prolongados. La densidad de flotación en sucrosa de los arterivirus oscila entre 1,13-1,17 g/cm³ mientras que el coeficiente de sedimentación varía entre 214 y 230 S.

En este capítulo haremos referencia a algunos aspectos de EAV y PRRSV.

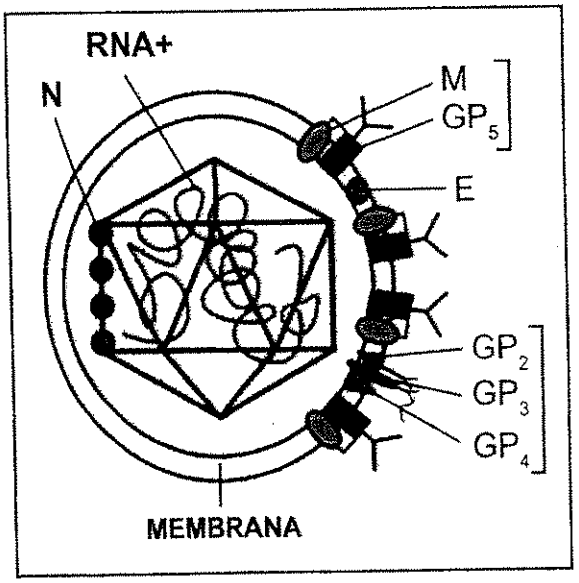


Figura 70-1. Representación esquemática de PRRSV y localización de las proteínas estructurales. (Gentileza Dr. Eric Snijder, Leiden University Medical Center, The Netherlands.)

REPLICACION VIRAL

Los arterivirus replican primariamente en el área perinuclear de las células blanco, que son los macrófagos. Sin embargo, el PRRSV replica además en espermátides y espermatocitos de cerdos infectados. La adsorción, primera etapa de la replicación, se realiza mediante la interacción de algunas glicoproteínas virales y receptores celulares específicos en la membrana de la célula blanco. Continúa la endocitosis y la formación del endosoma, etapa en donde interviene la clatrina, proteína que recubre ciertas vesículas que actúan como transportadoras. Posteriormente se produce la liberación del genoma en el citoplasma.

La estrategia de replicación se asemeja a la de la familia Coronaviridae, siendo esa la razón por la que se clasifican dentro del orden de los Nidovirales. El genoma de los arterivirus es policistrónico y contiene al menos 8 marcos abiertos de lectura (ORF). Básicamente consiste en un mecanismo de transcripción discontinua: el ciclo de replicación comienza con la expresión del gen de la replicasa (RNA polimerasa RNA dependiente) a través del RNA genómico viral. Consecutivamente, se transcriben una serie de RNA mensajeros subgenómicos (mRNA) que se traducen luego en las proteínas estructurales. Estos mRNA se ordenan como un conjunto anidado de tamaño progresivamente decreciente. Los arterivirus son ensamblados y posteriormente liberados por exocitosis a través del retículo endoplásmico liso y/o aparato de Golgi, donde adquieren la envoltura.

Los arterivirus tienen una especificidad bastante restringida en cultivos celulares. Los cultivos primarios de macrófagos y algunas líneas celulares como CL2621 o MARC-145 son los elegidos para la replicación in vitro de PRRSV y SHFV; sin embargo, EAV replica tanto en cultivos primarios de macrófagos y riñón como en líneas celulares de hámster (BHK-21), conejo (RK-13) y mono (Vero). El efecto citopático que producen en estos cultivos se caracteriza por redondeamiento y desprendimiento celular

PATOGENESIS

La puerta de entrada de los arterivirus es respiratoria o venérea y su diseminación se produce principalmente a través de las células

blancas sanguíneas. EAV y PRRSV replican inicialmente en macrófagos alveolares pulmonares, luego ocurre una segunda replicación en nódulos linfáticos regionales y más tarde se diseminan a través de los macrófagos sanguíneos (viremia) infectando células de distintos órganos y sistemas. En el caso de EAV se infectan posteriormente células endoteliales de todos los componentes del sistema circulatorio y músculo liso de arterias, miometrio, epitelio tubular renal, adrenal y, en menor medida, parénquima hepático, células de las criptas intestinales y epitelio bronquial.

La infección por estos arterivirus puede causar abortos, dificultades respiratorias o bien ser asintomáticas y producir un estado de portador persistente. Ambos pueden causar desde infección subclínica (sólo detectada por seroconversión) hasta una gran variedad de signos como dificultad respiratoria, fiebre y necrosis de las pequeñas arterias, y la gravedad del cuadro varía de acuerdo a la cepa viral, la edad y la condición general del animal. Asimismo, pueden causar abortos y persistir en el semen de machos infectados, lo cual hace a la transmisión sexual una ruta secundaria muy importante de infección.

RESPUESTA INMUNE

Puede ocurrir infección persistente durante 2 a 3 meses en cerdos infectados con PRRSV o de por vida en equinos infectados con EAV. Los anticuerpos se detectan en las primeras semanas posinfección (PI); los producidos contra EAV son altamente neutralizantes y persisten por años, mientras que los producidos por PRRSV son de limitado nivel protector y persisten durante 1 a 2 meses PI. La aparición de anticuerpos neutralizantes (AcN) en suero coincide con la recuperación clínica y la restricción de la excreción del virus. Las proteínas N y G_L de EAV son las más reactivas antigénicamente.

Los AcN son detectables de 2 a 4 semanas PI y alcanzan su pico entre 2 y 4 meses. La mayoría de los AcN producidos en la infección por PRRSV son específicos para las proteínas estructurales N, M y GP_5. Los anticuerpos del tipo IgM alcanzan su pico de producción a los 14-21 días PI y pueden detectarse mediante IF en la primera semana PI. Sin embargo, es más frecuente realizar la detección de anticuerpos del tipo IgG cuyo pico se alcanza a las 3 a 4 semanas PI y su duración es de hasta 9 semanas. Aunque la respuesta inmune celular contra arterivirus no ha sido estudiada aún en detalle, experiencias preliminares indican que aumentan los linfocitos citotóxicos. La respuesta de linfocitos T en cerdos infectados con PRRSV puede detectarse a las 4 semanas PI y disminuye a las 11 semanas aproximadamente.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

En el laboratorio pueden aplicarse distintas técnicas serológicas, de aislamiento viral y complementarias. Como técnicas serológicas pueden emplearse para ambas virosis inmunofluorescencia indirecta (IFI), inmunoperoxidasa (IP), ELISA y virus neutralización (VN). Para la determinación de antígenos virales, además se emplea la hibridación in situ. El aislamiento viral, sin embargo, sigue siendo el método confirmatorio de elección.

El manejo de las muestras, tanto en la elección, recolección, como en el envío al laboratorio es un punto crítico. Las mismas deben extraerse en forma estéril de los órganos correspondientes y en el momento adecuado, de acuerdo a los signos clínicos presentes en el animal: hisopados nasales o faríngeos, trozos de órganos, fetos y sus membranas, sangre con anticoagulante, semen, etc. y es conveniente enviarlas refrigeradas inmediatamente al laboratorio o conservarlas no más de 48 horas a –20 °C.

Para el aislamiento viral, las muestras se procesan en forma rutinaria en el laboratorio de virología y se inoculan sobre monocapas de células susceptibles para cada caso. Como método complementario se utiliza la técnica de amplificación selectiva de fragmentos (PCR), que está indicada para muestras que han resultado tóxicas para su uso en cultivos celulares o que no han sido conservadas convenientemente.

ARTERITIS VIRAL EQUINA

La arteritis viral equina (EAV) es una enfermedad ampliamente difundida en todo el mundo que afecta solamente a los miembros de la familia Equidae. Su nombre deriva de las necrosis observadas en cortes histológicos en las arterias de pequeño y mediano calibre.

En la mayoría de los casos, las infecciones producidas por EAV son subclínicas y sólo son detectadas por seroconversión o estudios retrospectivos. Sin embargo, entre un 15-20% de las infecciones se manifiestan clínicamente ya sea con una sintomatología respiratoria o produciendo abortos. Durante la viremia, el virus está presente en todos los tejidos con excepción del cerebro.

Los signos clínicos, cuando están presentes, comienzan 3 a 14 días luego de la exposición y persisten de 5 a 9 días. En la enfermedad aguda los signos más frecuentes son fiebre, anorexia, edema palpebral, conjuntivitis, inflamación catarral de las mucosas del tracto respiratorio y edema abdominal y de los miembros. En general los animales se recobran sin complicaciones posteriores, sin embargo las mayores pérdidas se producen por abortos. En más del 50% de las yeguas, los mismos pueden ocurrir entre el tercer y décimo mes de gestación, sin mostrar signos clínicos previos como resultado del edema endometrial que produce compresión de vasos y disminución del flujo sanguíneo hacia el feto así como necrosis del miometrio que conduce al desprendimiento de la placenta y muerte fetal. En caso de infección natural el aborto es menos frecuente que en la infección experimental y coincide con la fase convaleciente de la infección (3 a 10 meses de gestación). Los fetos son expulsados parcialmente autolisados o bien con hemorragias en serosas y edemas. El virus puede ser aislado desde la placenta y los fluidos del feto, que diseminan la enfermedad a otros animales susceptibles.

Una de las características más importantes de la enfermedad es que entre un 30-60% de los padrillos infectados pueden transformarse en portadores crónicos y de esta manera diseminar el virus mediante el servicio natural o la inseminación artificial (vía venérea). El virus infecta el aparato genital de los machos ya que replica en vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales, es mantenido en ampollas deferentes y se elimina constantemente por el líquido seminal. La persistencia viral depende de la testosterona y de esta manera los machos transmiten el virus por períodos variables, factor en el que reside la importancia de conocer el estado serológico del padrillo.

Por estas razones el Servicio Nacional de Sanidad Animal y Calidad Agroalimentaria (SENASA, Argentina) requiere la certificación de todos los padrillos antes de entrar a servicio o de las muestras de semen que serán utilizadas para la inseminación.

EAV posee 7 proteínas estructurales, entre las que se destacan la N (rodea al RNA), y la M y GL (o GP5) localizadas en la envoltura. Si bien existe un solo serotipo de EAV y todas las cepas son neutralizadas por un anticuerpo policlonal contra la cepa de referencia Bucyrus, existen cepas distribuidas en el mundo que difieren en su patogenicidad y su potencial abortigénico.

Los potrillos nacidos de madres positivas adquieren anticuerpos a través del calostro. Las hembras infectadas postservicio

por machos portadores, no presentan problemas de fertilidad posteriores y no se transforman en portadoras crónicas.

Durante la fase aguda de la enfermedad el contagio se produce por vía respiratoria o venérea, ya sea por secreciones genitales de la yegua, orina, heces o por el semen. Durante la fase crónica el contagio ocurre solamente por vía venérea. Entre el 80 a 100% de las yeguas servidas por padrillos portadores pueden infectarse. Existe muy poca transmisión por fomites o personal. Debido a que el virus es viable en semen fresco y congelado, 85 a 100% de las hembras seronegativas seroconvierten y, si desarrollan enfermedad respiratoria, la transmiten a otros susceptibles. Si las hembras se infectan por vía respiratoria durante la gestación avanzada, el virus puede pasar al feto y éstos pueden nacer débiles o normales, o manifestar enfermedad respiratoria grave poco después de nacer, que puede ser letal.

Como otras enfermedades virales presentan un cuadro similar, es imprescindible la confirmación del laboratorio. El diagnóstico se realiza, en casos de enfermedad respiratoria, remitiendo al laboratorio hisopados nasales, nasofaríngeos y conjuntivales y sangre con anticoagulante para aislamiento viral después de la aparición de los síntomas.

Para determinar seroconversión se utilizan dos muestras de suero tomadas en la fase aguda y convaleciente de la enfermedad y se emplea la técnica de VN. En casos de abortos, el virus puede ser aislado de placentas y tejidos fetales.

Para comprobar el estado de portador-transmisor de un padrillo seropositivo (infección persistente), primero se realiza la detección de anticuerpos por VN, si es positivo (título mayor de 1:4) se puede intentar el aislamiento viral a partir del semen o realizar una prueba de servicio. Esta consiste en servir a dos yeguas seronegativas y comprobar si existe seroconversión en el período entre el servicio y los 30 días posteriores al mismo (*test mating*). La extracción de semen se realiza con vagina artificial y se conserva a 4 °C en las primeras 24 horas de extracción o a –20 por 2 días. Conviene enviar al laboratorio dos muestras consecutivas del mismo día separadas por algunas horas, o del día siguiente.

Además, el virus puede identificarse por inmunofluorescencia (IF) o inmunohistoquímica (IHQ) en cortes de tejidos como hígado, pulmón, bazo, ganglios linfáticos y riñón, que también pueden utilizarse como muestras para aislamiento viral.

En Argentina se detectaron anticuerpos contra EAV en 1982 y el virus se aisló por primera vez en 2001, sin detectarse aún sintomatología atribuible a esta virosis. Según datos obtenidos del muestreo serológico del período 2001-2002, sobre 1774 muestras de suero sanguíneo de padrillos inscriptos para servicio, 14 fueron positivos. Once pertenecían a animales vacunados en origen e importados a nuestro país en los últimos años; los tres restantes se encuentran actualmente en dos establecimientos bajo la supervisión y control de SENASA. En países Europeos el porcentaje de infección es muy variable (entre 6 a 90%). Hubo epizootias recientes en Alemania (1992 y 1995), Reino Unido (1993), Holanda (1994), España (1992) y Francia (1995).

En Argentina no se vacuna contra esta enfermedad. Existen en el mundo dos tipos de vacunas comerciales: a virus vivo modificado (MLV) que se utiliza en EE.UU. y a virus inactivado (Japón). Si bien las primeras protegen de la infección clínica y otorgan mayor duración de la inmunidad, no previenen la reinfección. De acuerdo a estudios realizados por investigadores japoneses, las vacunas inactivadas previenen a los machos de transformarse en portadores crónicos y a las hembras preñadas del aborto. Hoy en día se discuten y comparan las ventajas y desventajas de ambos tipos. Como desventaja de ambas es que no permiten la discriminación entre animales vacunados de infectados naturalmente.

Las consecuencias económicas directas atribuibles a esta virosis se deben a abortos o muerte perinatal, cierre de mercados por infección persistente de animales en pie o semen, y disminución del valor comercial del portador persistente.

SINDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO (PRRSV)

Esta enfermedad fue descrita inicialmente en EE.UU. en 1987 ("Mystery disease") y se ha convertido en una enfermedad endémica de gran importancia debido a las pérdidas económicas que produce. Tiene una distribución mundial aunque Argentina se mantiene libre. Los aislamientos virales de EE.UU. y Europa son genética e inmunológicamente distintos, debido principalmente a la variabilidad de la proteína estructural GP_5.

Se caracteriza por producir problemas reproductivos o respiratorios. PRRSV puede ser subclínica o causar infertilidad y aborto en cualquier etapa de la gestación, mientras que la forma respiratoria puede afectar animales de cualquier edad y sexo, con signos clínicos variables. En las hembras puede presentarse anorexia, fiebre, neumonía, agalactia, coloración azulada de orejas y vulva, edema subcutáneo, retardo en el ciclo estral e incluso muerte en adultos inmunológicamente maduros. La infección en cerdas gestantes durante el tercer trimestre se caracteriza por el aborto a término o eliminación de fetos momificados o parcialmente autolizados. Los lechones infectados por vía intrauterina o inmediatamente al nacer presentan disnea, taquipnea, edema periocular, conjuntivitis, coloración azulada de orejas, fiebre e inapetencia. En machos la infección es casi inaparente: puede apreciarse depresión, anorexia, fiebre, tos y estornudos. En neonatos la mortalidad puede alcanzar 100%. En adultos este porcentaje es muy variable, ya que la gravedad de la neumonía aumenta con infecciones virales y bacterianas secundarias, como *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, virus de influenza suina, coronavirus respiratorio, etc. En estos casos sólo pueden aparecer fiebre e inapetencia como únicos signos, siendo la seroconversión el único indicador de infección.

El contacto directo a través de secreciones nasofaríngeas, orina o heces es la principal ruta de infección. Es muy importante el papel del cerdo en la transmisión a través del semen y menos significativa la vía aerógena. Recientemente se ha demostrado la diseminación viral a través de distintas especies de patos (como vectores). La diseminación también se facilita por la condición de los animales estabulados, de las características de los criaderos y la asociación con otros patógenos secundarios que interactúan.

Un diagnóstico presuntivo puede efectuarse sobre la base de la performance de la piara, los signos clínicos y las lesiones. Para el diagnóstico confirmatorio es muy importante la selección de la muestra. La técnica de elección para la determinación de anticuerpos es ELISA. Debido a los resultados falsos negativos y falsos positivos obtenidos, se aconseja que la interpretación de los resultados serológicos se realice en conjunto con los datos de anamnesis y diagnóstico clínico. Una técnica de diagnóstico utilizada en algunos países es el ensayo biológico en cerdos ("*swine bioassay*") que consiste en inyectar 15 ml de semen sospechoso por vía intraperitoneal a lechones negativos de 4 a 8 semanas. Si el semen tiene virus, se detecta seroconversión del lechón en las 5 semanas siguientes.

En el caso de importaciones, puede realizarse una cuarentena en la que se extraen 3 muestras de semen en diferentes periodos debido a que puede existir intermitencia en la eliminación y se realiza PCR.

Al igual que EAV, existen vacunas comerciales a virus vivo modificado o a virus inactivado, que poseen ventajas y desventajas similares.

BIBLIOGRAFIA

Echeverría MG, Pecoraro MR, Galosi CM, Etcheverrigaray ME, Nosetto EO. The first isolation of equine arteritis virus in Argentina Rev sci tech Off int Epiz. 2003; 22(3): 1029-1033.

Glaser AL, Chirnside, ED, Horzinek MCV, de Vries. AAF, Equine arteritis virus. Theriogenology 1997; 47: 1275-1292

Goldberg TL, Weigel RM, Hahn EC, Scherba G. Associations between genetics, farm characteristics and clinical disease in field outbreaks of PRRSV. Prev Vet Med. 2000; 43: 293-302.

González RJ, De La Sota M, Barrandeguy M, Trono K, Ayerbe M, Tarantelli M, La Torre J, Iglesias, ME, Galosi CM, Echeverría MG. Relevamiento serológico de Arteritis Viral Equina en padrillos registrados en Argentina. VIII Congreso de la Asoc. Mundial de Vet. Equina, 194-195, Bs. As 15-17 de octubre de 2003.

Hennings JC, Nelson EA, Benfield DA, Detecting PRRSV in boar semen. Swine Health and Prod. 1996; 4(1): 37-39.

Hennings JC, Nelson EA, Hines, RJ, Nelson JK, Swenson SL, Zimmerman JJ, Chase CC, Yaeger MJ, Benfield DA. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. J Vet Diag Invest. 1995; 7: 456-464.

Nosetto, EO, Etcheverrigaray ME, Oliva GA, González ET, Samus SA. Arteritis viral equina: detección de anticuerpos en equinos de la República Argentina- Zentralbl Veterinarmed B; 1984, 31: 526-529.

Rossow KD. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. Vet Pathol. 1998; 35: 1-20.

Snijder EJ, Meulenberg JJM. The molecular biology of Arteriviruses. J Gen Virol. 1998; 79: 961-979.

Capítulo 71

CORONAVIRUS

Shankar P. Mondal, Carol Cardona

INTRODUCCION

La familia Coronaviridae es un grupo grande y diverso de virus envueltos, RNA no segmentado, de cadena positiva que se replican por un único mecanismo, que resulta en una alta frecuencia de recombinación. Los coronavirus fueron primero informados en la literatura a principios de la década de 1930 y aunque ellos fueron nombrados como virus individuales, no se agruparon como coronavirus en ese momento. Los coronavirus se reconocieron como un grupo de virus distinto en la década de 1960, después del descubrimiento de varios virus diferentes, con una característica morfológica de aspecto de corona en preparaciones de microscopia electrónica teñidas negativamente. La familia Coronaviridae, con un género *Coronavirus*, fue reconocida por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) en 1975. En 1992 fue agregado el género *Torovirus* que comparte una organización genómica y una estrategia de replicación con el género *Coronavirus*. La familia Coronaviridae junto con la Arteriviridae (con un solo género *Arterivirus*), fueron clasificadas en el orden Nidovirales en 1996. Los virus de este orden comparten la particularidad de sintetizar un juego anidado de mRNA subgenómicos múltiples. La familia Roniviridae (con un solo género *Okavirus*) ha sido incluida también en el orden Nidovirales. A pesar de las diferencias considerables en complejidad genética y arquitectura del virión, los coronavirus, torovirus, arterivirus y ronivirus tienen similares organizaciones genómicas.

Los coronavirus son los agentes etiológicos de enfermedades respiratorias y entéricas en humanos y animales domésticos. La mayoría de los coronavirus infecta sólo a una especie hospedadora naturalmente o a un número limitado de especies estrechamente relacionadas. El virus de la bronquitis infecciosa aviar (IBV), miembro prototipo de la familia Coronaviridae, fue el primer coronavirus en ser aislado de aves domésticas. El IBV aviar causa principalmente enfermedad respiratoria leve, aunque algunas cepas son nefropatogénicas y pueden causar hasta un 30% de mortalidad en pollos jóvenes. Varios otros coronavirus también son patógenos veterinarios importantes: el virus de la gastroenteritis trasmisible porcina (TGEV) causa una enfermedad devastadora en cerdos recién nacidos, con una mortalidad que se acerca a menudo al 100%. El coronavirus bovino (BCoV), el coronavirus del pavo (TCoV), el coronavirus felino (FCoV) y el coronavirus canino (CCoV), son causas importantes de enteritis en sus respectivos hospedadores. El virus de la hepatitis murina (MHV) es responsable de una muy conocida enfermedad hepática y neurológica que se ha estudiado durante muchos años. Las personas padecen la infección del coronavirus humano (HCoV) como el HCoV-OC43 y HCoV-229E, ambos son causas etiológicas del resfrío común y del síndrome respiratorio agudo y pronunciado por coronavirus (SARS-CoV) que provoca a menudo una enfermedad respiratoria fatal.

El torovirus equino (EqTV; anteriormente llamado virus de Berna), fue el primer torovirus identificado y se aisló de un caballo con diarrea en 1972. El nombre de torovirus fue derivado de la morfología tubular encorvada de la estructura de la nucleocápside viral. Los torovirus infectan las células epiteliales que revisten el intestino delgado y grueso. En el bovino (BoTV, originalmente llamado virus de Breda), en el porcino (PoTV) y en el humano (HuTV) son causa de gastroenteritis aunque BoTV también puede infectar esporádicamente el sistema respiratorio. En contraste, EqTV no ha sido asociado con ningún signo clínico de enfermedad.

CLASIFICACION

Los Coronaviridae tienen varias propiedades únicas: un genoma RNA no segmentado en sentido positivo, de un tamaño de 27-32 kb (coronavirus) o 20-25 kb (torovirus), una envoltura viral con proyecciones prominentes en la superficie 4 y una proteína de la membrana íntegra; un juego de 4 o más mRNA subgenómicos coterminales al 3' y un gen de replicasa compuesto de dos marcos de lectura abiertos solapados (ORF). Las mayores diferencias que distinguen los coronavirus de los torovirus son sus tamaños (60 y 18 k, respectivamente), la forma helicoidal de sus proteínas de la nucleocápside (extendido y tubular, respectivamente), y la ausencia de una secuencia líder en el extremo 5' de mRNA del torovirus. Los torovirus fueron propuestos originalmente como una nueva familia separada de Coronaviridae. Sin embargo, ahora se piensa definir los géneros coronavirus y torovirus como dos subfamilias dentro de los Coronaviridae o dos familias dentro de Nidovirales, de manera que los tres grupos de coronavirus se reúnan en tres géneros dentro de los Coronaviridae.

Los miembros de los géneros *Coronavirus* y *Torovirus* son clasificados en base a las propiedades antigénicas, la organización y secuencia de las proteínas no estructurales y sus hospedadores. Así, los *Coronavirus* son divididos en tres grupos distintos: dos de coronavirus mamíferos (grupos 1 y 2) y un tercer grupo de coronavirus aviario (grupo 3) (tabla 71-1).

MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA

Los coronavirus son virus esféricos a pleomórficos, sensibles al éter y envueltos, con diámetros que van de 60 a 220 nm. La envoltura lipoproteica se forma durante la brotación del virus de las membranas intracelulares. Las grandes proyecciones de superficie del coronavirus le dan una apariencia de corona, de allí el nombre de coronavirus (1A). Dentro del virión, el RNA genómico está contenido dentro de una nucleocápside helicoidal. Los coronavirus y torovirus tienen una morfología y una composición del virión similar pero son distinguibles de varias maneras. Los torovirus tienen sólo 120 a 140 nm de diámetro y son de forma de disco, de riñón o de bacilo.

Todos los coronavirus contienen cuatro proteínas estructurales principales (fig. 71-1B). 1) La glicoproteína de la espícula (S, pep) es el componente extremo que le da al virión su apariencia semejante a una corona, y es responsable de la adsorción del

Tabla 71-1. Especies de la familia Coronaviridae

Género	Especies	
Coronavirus	Grupo 1	Virus de la gastroenteritis transmisible porcina (TGEV) Coronavirus canino (CCoV) Coronavirus felino (FCoV) Virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV) Coronavirus humano 229E (HCV-229E) Virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV)
	Grupo 2	Virus de la hepatitis murina (MHV) Coronavirus bovino (BCoV) Coronavirus humano OC43 (HCV-OC43) Virus hemaglutinante de la encefalomielitis porcina (HEV) Coronavirus de la rata (RtCoV) Coronavirus equino (ECoV) Síndrome respiratorio pronunciado y agudo por coronavirus (SARS-CoV)
	Grupo 3	Virus de la bronquitis infecciosa aviar (IBV) Coronavirus del pavo (TCoV) Coronavirus del faisán (PCoV)
Torovirus		Torovirus equino (EqTV) Torovirus bovino (BoTV) Torovirus porcino (PoTV) Torovirus humano (HuTV)

virus a la célula. 2) La proteína estructural es la glicoproteína de membrana integral o matriz (M) que atraviesa la capa bilaminar lipídica 3 veces. 3) La tercera es una proteína pequeña del envelope (E) que juega un papel esencial en el ensamble del virión y está presente en cantidades mucho más pequeñas. 4) La cuarta proteína, nucleocápside (N), es una fosfoproteína que actúa con el RNA genómico viral y mantiene la base estructural de la nucleocápside helicoidal. Las proporciones de proteínas de S/E/M/N para los viriones de TGEV se han estimado en 20:1:300:100, respectivamente. La nucleocápside helicoidal de por lo menos dos coronavirus (TGEV y MHV) está contenida dentro de una estructura esférica o icosaédrica, la que está compuesta de glicoproteína M y proteína N. Además, los viriones de algunos coronavirus del grupo 2 (MHV, BCoV) y el coronavirus del pavo (TCoV) (grupo 3) tienen una glicoproteína hemaglutinina esterasa (HE) unida a la superficie del virión.

ORGANIZACION DEL GENOMA

Los coronavirus contienen una cadena simple de sentido positivo de RNA no segmentado de 27 a 32 kb en longitud, con un cap en el extremo 5'. El RNA genómico del coronavirus también puede funcionar como mRNA y es infeccioso. El RNA comienza con una secuencia líder de 65 a 98 nucleótidos que también está presente en los extremos 5' de todos los mRNA subgenómico (sg), seguida por una región sin traducir de 200 a 400 nucleótidos (UTR). En contraste, los RNA de los torovirus carecen de esta secuencia líder (fig. 71-2). En el extremo 3' del genoma de RNA hay otra UTR de 200 a 500 nucleótidos, seguido por una cola de poly(A) de longitud inconstante. Las secuencias de 3' - y 5'- UTR son importantes para la replicación y transcripción del RNA. Además, una secuencia intergénica común (IG) o una secuencia de regulación de transcripción

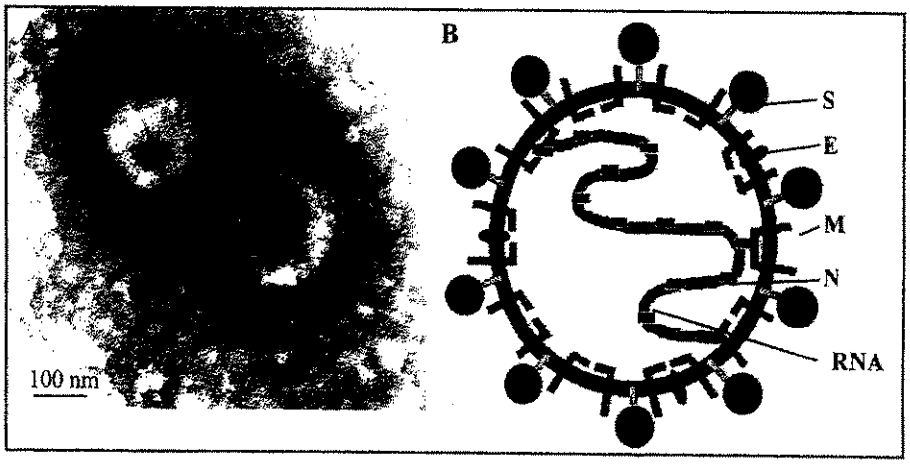


Figura 71-1. Morfología y estructura del coronavirus, *A*, Preparación de tinción negativa del virus de la bronquitis infecciosa aviar (IBV). *B*, Diagrama esquemático que muestra la estructura de las proteínas estructurales: espícula (S), envelope (E), membrana (M) y nucleocápside (N) y el genoma RNA del IBV. (*A* Cortesía de P. Woolcock.)

(TRS) de aproximadamente 7 bases se encuentran en el extremo 5' de cada gen la cual es esencial para la formación de los mRNA del sg. La secuencia restante incluye 7 a 10 ORF, 4 o 5 de los cuales codifican proteínas estructurales. Casi dos tercios del genoma entero de RNA desde el extremo 5' está ocupado por el gen de la replicasa que comprende dos ORF solapados (1a y 1b) traducido en un precursor de la poliproteína. El orden de los genes que codifican la replicasa (Rep) y las proteínas estructurales principales presentes en todos los coronavirus es 5'-Rep-(HE)-S-E-M-N-3' y en todos los torovirus es 5'-Rep-S-M-HE-N-3' (fig. 71-2). La organización de la cantidad de genes de las proteínas no estructurales que se intercalan entre los genes estructurales, varía entre cepas de coronavirus.

PROPIEDADES BIOLOGICAS Y FISICOQUIMICAS

Los coronavirus tienen una masa molecular estimada de 400 x 10^6, una densidad de flotación en sacarosa de 1,15 a 1,19 g/cm^3 y en CsCl de 1,23 a 1,24 g/cm^3. Los coronavirus son sensibles al calor, solventes lipídicos, detergentes no iónicos, formaldehído, agentes oxidantes e irradiación ultravioleta. Se ha observado una disminución de más de 10 veces de la infectividad viral con ciertas cepas en cultivo de tejidos, después de incubar por 24 horas a 37 °C. La mayoría de los coronavirus que infectan el tracto gastrointestinal son estables a pH 3,0. Los torovirus tienen una densidad de flotación de 1,16 a 1,17 g/cm^3 en sacarosa y son estables entre el pH 2,5 y 9,7 pero son rápidamente inactivados por el calor, los solventes orgánicos y la radiación.

Los coronavirus infectan aves y muchos mamíferos, incluso los humanos. El tracto respiratorio, los órganos gastrointestinales y los tejidos neurológicos son los más infectados. Las células epiteliales son los blancos principales de los coronavirus. Son habituales la transmisión respiratoria, fecal-oral y mecánica. Para el establecimiento de la infección viral, se requiere una unión específica entre el virus y un receptor celular debido a que los coronavirus tienen rangos de hospedador muy específicos. Raramente ocurren infecciones cruzadas de especie por coronavirus. Algunos pueden causar infecciones persistentes, pero no están totalmente bien entendidos los mecanismos moleculares de persistencia.

Los torovirus infectan varias especies animales, incluso los humanos. Estos virus también infectan las células epiteliales que revisten el tracto gastrointestinal. Como los coronavirus, las infecciones crónicas de los torovirus pueden ocurrir, pero el mecanismo de persistencia no es conocido. La infección cruzada de especies entre torovirus no se ha establecido, aunque estos virus están serológicamente interrelacionados.

REPLICACION VIRAL

El ciclo de replicación de los coronavirus ha sido estudiado extensamente y muchos aspectos son bien conocidos. Por el contrario, no se sabe demasiado sobre el mecanismo de replicación de los torovirus, aunque se piensa que existen grandes semejanzas. Los eventos replicativos de los coronavirus pueden subdividirse en: adsorción, penetración y desnudamiento de la cápside.

Adsorción, penetración y desnudamiento

El ciclo de replicación comienza con la unión específica del virión a la membrana plasmática de células susceptibles; esto se debe a la unión de la proteína S al receptor glicoproteico de la superficie celular. Se han identificado muchos de los receptores celulares para coronavirus, como por ejemplo la aminopeptidasa N (APN) que es receptor de los coronavirus del grupo 1 (TGEV, HCo 229E, CCoV y FIPV). La aminopeptidasa felina puede servir de receptor para coronavirus del grupo 1 (felino, canino, porcino y humano), mientras que este receptor puede ser utilizado por el IBV (grupo 3) in vitro. Este receptor APN está ampliamente distribuido en muchos tipos celulares como los epitelios respiratorios y entéricos y células neuronales y gliales. Un domino de la proteína S del TGEV y FIPV fue reconocido por la APN porcina. El receptor de MHV es la glicoproteína murina biliar que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Este receptor se expresa principalmente en los tejidos hepático y gastrointestinal y en macrófagos y linfocitos B, en concordancia con la especificidad viral. Un dominio de la proteína S del MHV ha demostrado ejercer influencia sobre el tropismo de este virus. Los coronavirus que contienen la glicoproteína HE también pueden unirse a un receptor celular común, como lo es el ácido siálico, el que actuaría como receptor secundario.

Una vez que el virus se une al receptor, penetra en la célula, etapa que involucra la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática o endosomal. MHV, BCoV y IBV presentan un pH neutro o ligeramente alcalino para la inducción de la fusión célula a célula. Estos virus penetran probablemente por fusión virus-célula en la membrana plasmática. MHV también puede penetrar las células a través de la vía endosomal. El dominio de transmembrana de la proteína S parece inducir cambios conformacionales luego de la unión virus-receptor celular. El mecanismo por el cual el virus pierde su cápside y de esta manera libera el RNA genómico al citoplasma celular, todavía no se conoce claramente. Parecería que existen factores celulares indispensables tanto para la penetración como para el desnudamiento de la cápside.

Transcripción del mRNA viral

El RNA viral liberado en el citoplasma de la célula infectada se utiliza para sintetizar la RNA polimerasa RNA dependiente. Esta enzima es la responsable de la síntesis de la cadena negativa de RNA utilizando como molde el RNA viral y de la transcripción subsecuente de mRNA virales a partir de RNA negativo. El término transcripción se usa tanto para describir la síntesis de mRNA subgenómico como la de RNA genómico utilizado para la traducción, mientras que el término replicación se usa para describir la síntesis de RNA genómico destinado a ser "empacado" en nuevos viriones. Los coronavirus sintetizan múltiples mRNA subgenómicos, cada uno es traducido a una o más proteínas. Existe un mRNA subgenómico para la expresión de cada gen viral excepto para el gen 1 (replicasa) que está expresado desde el genoma viral. Dependiendo de la cepa o aislamiento de coronavirus, se sintetizan 5 a 7 mRNA subgenómicos en las células infectadas. Estos mRNA virales se representan con números (1 a 7), en orden decreciente de tamaño (el mRNA 7 es el más pequeño). Algunos tienen denominaciones con guiones, como el mRNA 2-1 del MHV, debido a que fueron descubiertos con posterioridad a la denominación del *set* original de mRNA.

Existen numerosos modelos para explicar cómo se sintetizan los mRNA subgenómicos. Uno es la *transcripción discontinua con cebador líder* que ocurre durante la síntesis de RNA de sentido positivo; el RNA genómico se transcribe primero en una cadena completa de RNA de polaridad negativa. Luego, la secuencia líder transcribe desde esa cadena de RNA negativa, se disocia de ella posiblemente con la polimerasa y se une a cualquier secuencia intergénica común (IG) de la cadena molde de RNA negativo.

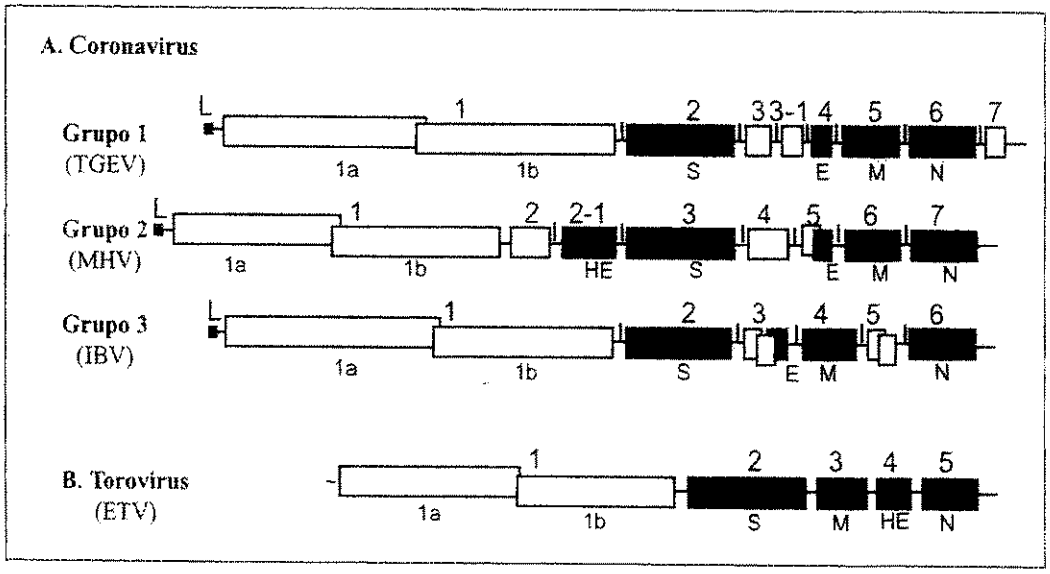


Figura 71-2. Organización genómica del prototipo de Coronaviridae. *A*, Estructura genética del virus de la gastroenteritis transmisible porcina (grupo 1), virus de la hepatitis murina (MHV, grupo 2), y la bronquitis infecciosa aviar (grupo 3). *B*, Estructura genética del torovirus equino. Las *cajas negras* representan marcos de lecturas abiertos (ORF) que codifican proteínas estructurales y *las cajas blancas* codifican proteínas no estructurales. Las *líneas verticales* representan secuencias intergénicas. Los *números* representan genes dentro del genoma, y las *letras* (excepto la L) representan proteínas transcriptas de los correspondientes genes. L = secuencia líder; 1a y 1b = genes de replicasa de poliproteína 1a y 1b; S = gen de la espícula glicoproteína; E = gen proteico de envoltura; M = gen de la proteína de membrana; N = gen de proteína nucleocápside; HE = gen de proteína de hemaglutinina-esterasa.

En este modelo, la secuencia líder actúa como cebador y las secuencias IG o de regulación de la transcripción (TRS) como promotores de la transcripción del RNA. Un modelo alternativo es la *transcripción discontinua* que ocurre durante la síntesis de RNA de polaridad negativa desde el molde genómico de RNA. La polimerasa en este modelo se detiene en una secuencia IR o TRS y luego salta hacia el extremo 3' de la secuencia líder en el RNA genómico molde, generando una cadena de RNA negativo subgenómico con una secuencia líder antisentido en el extremo 3'. La cadena RNA negativa subgenómica luego sirve de molde para la síntesis de mRNA. Un *tercer modelo probable* para BCoV, TGEV, e IBV se basa en que los mRNA subgenómicos son incorporados en los viriones junto con el RNA genómico; luego que los virus penetran a la célula, los mRNA subgenómicos son usados directamente como moldes para la síntesis de RNA subgenómicos de polaridad negativa, los que a su vez sirven como moldes para la síntesis de mRNA subgenómicos adicionales. Hasta ahora, no existe evidencia experimental que confirme cualquiera de estos modelos para la síntesis de los mRNA subgenómicos.

El genoma de los torovirus contiene secuencias IG ricas en AU, pero no existe evidencia de la existencia de una secuencia líder común a los mRNA como fue encontrada en los coronavirus. Las consecuencias de esta diferencia entre torovirus y coronavirus es limitada, ya que la unión directa de la polimerasa a varios promotores de torovirus sobre el molde de polaridad negativa podría remplazar sencillamente al mecanismo de cebador líder durante la transcripción.

Replicación del RNA genómico

El RNA genómico de los coronavirus en las células infectadas consiste en dos poblaciones: productos del gen 1 que codifica para el mRNA (un 5%) y el genoma RNA completo que formará parte de los viriones (95%). La producción de RNA genómico probablemente necesite la síntesis ininterrumpida utilizando como molde un RNA de sentido negativo. Por consecuencia, el mecanismo de la replicación del RNA genómico difiere de la transcripción del mRNA subgenómico. Algunos de los RNA genómicos del MHV pueden ser sintetizados mediante transcripción discontinua. El concepto clásico del mecanismo de replicación del RNA ha sido demostrado utilizando RNA defectivo interferente obtenido, a su vez, de clones de cDNA. El uso de estos productos permite la determinación de señales en cis de la replicación de RNA. La replicación del RNA defectivo interferente de MHV requiere del alargamiento de secuencias en ambos extremos 3' y 5' del RNA genómico y una señal interna de replicación.

Traducción de proteínas virales

Todos los mRNA de los coronavirus, a excepción de los más pequeños, son estructuralmente policistrónicos, ya que contienen múltiples marcos abiertos de lectura (*open reading frame*: ORF). La mayoría de los ORF localizados en 5' del mRNA son traducidos por un mecanismo de rastreo ribosomal dependiente del CAP, por lo tanto la mayoría de estos mRNA son funcionalmente monocistrónicos. Mediante este mecanismo, la mayoría de la proteínas estructurales como S, M, N y HE son traducidas de mRNA en forma individual. Las otras proteínas virales son traducidas por otros mecanismos distintos. El mRNA1 de todos los coronavirus contiene 2 grandes ORF (genes 1a y 1b) que están solapados en un extremo y que son traducidos a una poliproteína (1a/b) por un mecanismo de cambio de marco de lectura ribosomal. En muchos otros mRNA, el segundo o tercer ORF es traducido más eficientemente. Estos ORF son precedidos por secuencias internas de entrada al ribosoma que les permite desviarse al ORF siguiente y traducir el ORF precedente por el mecanismo de traducción dependiente del CAP. El ORF siguiente también es traducido, pero su eficiencia de traducción y su significado funcional no esta claro aún. Otros mRNA contienen 2 ORF solapados, los cuales son traducidos por mecanismos desconocidos.

Poliproteína replicasa

La poliproteína 1a/b es presumiblemente la primera y única proteína viral sintetizada desde el genoma viral. Los productos de esta poliproteína son necesarios para la síntesis de RNA viral. El producto primario (700 a 800 k) es procesado postraduccionalmente en múltiples proteínas por sus propias proteasas como: la proteasa semejante a papaína (PLP) y la proteasa semejante a 3C (3CLP). Esta poliproteína replicasa todavía no ha sido completamente caracterizada en las células infectadas por coronavirus. Algunas de estas proteínas se asocian con estructuras membranosas en el citoplasma de las células infectadas, y la síntesis de RNA ocurre cerca de esos sitios.

Proteína S

Esta proteína se inserta en el RER y es glicosilada (N-glicosilación) en forma cotraduccional; luego en forma de trímero pasa a través del aparato de Golgi. Las proteínas S de IBV, MHV y BcoV son clivadas en forma postraduccional por una proteasa celular en S1 y S2. Estos sitios de clivaje en el caso de IBV y MHV, son adyacentes a residuos básicos. Otros coronavirus como el felino, TGEV y CcoV no sufren clivaje de la proteína S y en ellos no se han encontrado residuos básicos. La mayoría de las proteínas S se acumulan en el Golgi y participan del ensamblaje viral, aunque parte de ella se localiza en la membrana plasmática donde es responsable de la fusión célula-célula.

Proteína M

Esta proteína es sintetizada e insertada en las membranas del retículo endoplásmico por una secuencia de señal interna. Esta proteína es altamente hidrofóbica y da vuelta en la membrana 3 veces. En IBV y TGEV, el dominio aminoterminal de esta proteína que se localiza en el lado interno del RE, se glicosila en forma cotraduccional (N-glicosilación), mientras que en el mismo dominio en MHV, por el contrario, el proceso es de O-glicosilación y en forma postraduccional en el Golgi. La proteína M madura se acumula en el Golgi, pero no es transportada hacia la membrana plasmática.

Proteína N

Esta proteína es traducida en ribosomas libres y sus residuos de serina son rápidamente fosforilados. Esta proteína tiene un papel muy importante en la etapa temprana de la infección; una de las funciones es distribuir el complejo de ribonucleoproteína viral hacia el compartimiento adecuado para iniciar la replicación viral. Parte de esta proteína puede localizarse en el nucléolo, donde interfiere en la síntesis de proteínas celulares.

Proteína E

La acilación de esta proteína en MHV es la única modificación postraduccional conocida en proteína E de coronavirus. Esta proteína está expresada aparentemente en altos niveles en las células infectadas muy cerca del sitio de ensamblaje viral. El extremo carboxilo terminal de la proteína E de IBV se une específicamente al Golgi.

Proteína HE

Esta proteína es glicosilada en el RER en forma cotraduccional (N-glicosilación) y forma dímeros unidos por puentes disulfuro; luego es transportada a la membrana plasmática y al Golgi, donde se incorpora a la envoltura de las partículas virales brotantes.

Ensamble y liberación de viriones

La primera etapa en el ensamble viral es la unión de la proteína N al RNA viral para formar nucleocápsides helicoidales. El empaquetamiento eficiente del RNA genómico en viriones MHV requiere de una señal específica que consiste en un alargamiento de la secuencia del gen 1b en la región 3', de 20 kb desde el extremo 5' del genoma. Todos los mRNA de MHV se asocian con la proteína N para formar el complejo RNP (ribonucleoproteína), sin embargo, sólo el mRNA-1 es eficientemente empaquetado en partículas virales. El coronavirus bovino, TGEV e IBV también tienen pequeñas cantidades de todos los mRNA subgenómicos que no contienen señales de empaquetamiento (PS). Una vez formadas las nucleocápsides, interactúan con la proteína M en la membrana celular preferentemente, aunque también en RER o Golgi. Esta interacción puede dirigir la formación de una capa interna esférica rodeando la nucleocápside y al mismo tiempo permite que la nucleocápside se empaquete en las partículas virales brotantes. La proteína M de MHV puede interactuar específicamente con los RNA transcriptos que contienen las secuencias de empaquetamiento cortas en ausencia de proteína N. La formación de las partículas no puede ocurrir sin la proteína E. La expresión de la proteína E en MHV e IBV es suficiente para la formación de partículas. Los virus brotantes son detectados en primera instancia en el RER y Golgi, donde ancla la proteína M. La gemación de los coronavirus no puede ocurrir en la membrana plasmática porque la proteína M nunca está localizada allí. La proteína S no es esencial para la formación de partículas. Luego de la gemación, las partículas pueden sufrir cambios posteriores en el Golgi, lo que resulta en partículas maduras con material más electrodenso y compacto que se liberan en las vesículas secretorias. Los viriones, con posterioridad, se acumulan en grandes vesículas, las que eventualmente se funden con la membrana plasmática permitiendo su salida al espacio extracelular.

PATOGENESIS

Las infecciones por coronavirus causan más comúnmente enfermedades de uno de los siguientes tres tipos: respiratorio, gastrointestinal o neurológico. Los coronavirus también pueden multiplicarse en el tejido mamario de animales en lactación, oviducto, hígado o riñones que producen grados variables de enfermedad clínica. Las células epiteliales son los blancos principales de la infección por coronavirus y aunque la morbilidad normalmente es muy alta, la mortalidad puede variar de 0 a 100% dependiendo de la cepa de coronavirus y del hospedador. El período de incubación para infecciones por coronavirus es corto, normalmente de 24 a 36 horas.

Las cepas respiratorias del coronavirus replican principalmente en el tracto respiratorio superior y producen lesiones características en la tráquea. El virus, inicialmente, replica en el tracto respiratorio superior y se disemina luego al tracto respiratorio inferior y órganos no respiratorios. La forma respiratoria de la infección por BCoV produce neumonía, hemorragia y edema del tabique interlobular de los pulmones con infiltración de células mononucleares inflamatorias y espesamiento del tabique alveolar. En el caso de la bronquitis infecciosa (IBV), la tráquea, el pulmón y los sacos aéreos pueden verse involucrados en los pollos infectados.

Las cepas gastrointestinales del coronavirus se replican en el epitelio intestinal produciendo descamación y desprendimiento de las células infectadas. La diseminación viral es rápida y puede ocurrir dentro de las 4 a 5 horas posinfección como es el caso de TGEV en el cerdo. Las cargas virales más altas se encuentran en el segmento distal de la vellosidad en el yeyuno e íleon. La destrucción de enterocitos maduros que recubren la vellosidad intestinal lleva a la atrofia y fusión de la vellosidad afectada. La diarrea es una consecuencia de la malabsorción intestinal y la maldigestión y, en

casos graves, deshidratación, acidosis, shock y muerte. Los terneros desarrollan diarrea dentro de las 24 a 30 horas de la infección con BCoV y el virus puede hallarse en el epitelio del intestino delgado y las criptas del colon de terneros sintomáticos.

La forma neurológica de la infección por coronavirus se describe mejor en la cepa de JHM de MHV que causa desmielinización de la sustancia blanca del cerebro y del cordón espinal. Datos experimentales sugieren que la habilidad del hospedador de eliminar el MHV es un paso clave en el desarrollo de la desmielinización. La persistencia del virus es un sello de infección en casi todos los roedores que sobreviven a la infección aguda y desarrollan la forma neurológica de la enfermedad. La desmielinización puede ser el resultado de la lisis viral directa del oligodendrocito infectado o como consecuencia de la respuesta inmune. En las fases tempranas, pueden detectarse antígenos virales en la sustancia blanca aunque se observan pocos cambios histológicos. En etapas tempranas, una gran infiltración de linfocitos y macrófagos puede detectarse en áreas de desmielinización. En las fases más tardías las placas de desmielinización se demarcan bien. El infiltrado celular se resuelve en algunos animales y la remielinizacion puede ocurrir.

Los virus neurotrópicos también pueden replicarse, principalmente en el epitelio del intestino delgado o epitelio respiratorio, como en el caso del virus de la encefalomielitis hemaglutinante porcina (HEV). Después de la infección aguda, el virus se disemina de los nervios periféricos al sistema nervioso central, donde la infección produce signos clínicos.

Los torovirus infectan principalmente el tracto gastrointestinal aunque la forma respiratoria de la infección también puede ocurrir. El torovirus bovino (BoTV) causa gastroenteritis en terneros y posiblemente neumonía en el ganado más viejo. Las células epiteliales que cubren el intestino delgado y grueso son el principal blanco del torovirus.

RESPUESTA INMUNE

Por lo general, se especula que con una fuerte inmunidad mediada por células y una inmunorrespuesta local buena, la replicación del virus estará limitada y los signos clínicos estarán ausentes o limitados en el hospedador. Una respuesta inmune moderada puede producir el desarrollo de un proceso de enfermedad lenta y dar lugar a una infección crónica o persistente. Por supuesto, los virus más virulentos pueden causar una significativa enfermedad a pesar de la buena inmunidad del hospedador.

Las cuatro proteínas estructurales de los coronavirus (S, M, N, y HE, cuando está presente) son inductoras de una fuerte respuesta inmune humoral. La protección contra las infecciones por coronavirus, sin embargo, es proporcionada principalmente por la proteína S. La porción globular de la proteína S contiene muchos sitios antigénicos blancos de anticuerpos y también de linfocitos T citotóxicos. Se ha demostrado que las proteínas S y HE (cuando está presente) son los antígenos predominantemente involucrados en la neutralización viral. Asimismo, la proteína N induce una respuesta inmune celular protectora. La inducción más eficaz de anticuerpos virus neutralizantes se ha logrado con una combinación de proteínas S y N. Se ha demostrado que el antisuero contra la proteína de envoltura reduce la infectividad del virus en presencia de complemento y tanto de la proteína M amino y carboxiterminal generan una fuerte respuesta inmune. Se ha comprobado que el antisuero específico MGHV neutraliza la infectividad del virus en presencia de complemento. Mientras que los anticuerpos neutralizantes contra las proteínas estructurales de coronavirus pueden prevenir los signos clínicos de enfermedad si hubo una infección previa, la respuesta de las células T citotóxicas son importantes en la eliminación viral.

La proteína S de los torovirus induce anticuerpos virus neutralizantes, mientras que el papel de otras proteínas no ha sido establecido.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

El diagnóstico de infección por coronavirus está basado en el hallazgo de los signos clínicos característicos o lesiones patológicas, detección de seroconversión contra el agente, aislamiento del virus y/o el descubrimiento de antígenos virales o RNA. La serología rutinaria comprende: virus neutralización (VN), inhibición de la hemaglutinación (HI), o el uso de ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA). El ELISA, la inmunofluorescencia y la prueba de inmunodifusión permiten identificar anticuerpos que se unen a antígenos grupales así como serotipos específicos.

Para el aislamiento viral, la recolección de la muestra depende de la historia clínica de la enfermedad. Se recolectan hisopos de los órganos afectados durante la fase aguda de la infección. La tráquea y los tejidos pulmonares son la opción de muestras para las formas respiratorias de la enfermedad. Los coronavirus entéricos se identifican a partir de muestras fecales o del tejido intestinal. Otros tejidos usados son hígado, riñón, cerebro y cordón espinal para MHV; ganglios linfáticos cecales, riñón y oviducto para IBV. Normalmente se propagan en cultivos de tejido o explante traqueal, aunque el coronavirus aviar (IBV, TCoV) también puede propagarse en huevos embrionados. La presencia de virus puede confirmarse en cultivo de células o tejidos por captura antigénica por ELISA, tinción con anticuerpos fluorescentes, inmunohistoquímica, análisis de ácidos nucleicos o microscopia electrónica (ME). Sin embargo, la patogenicidad del agente sólo se puede determinar inoculando animales susceptibles con material original o material de cultivo de primopasaje en donde si el agente es patogénico, producirá signos típicos. La transcripción reversa de la polimerasa (RT-PCR) se ha aplicado directamente a las muestras de los animales infectados o al cultivo viral. La mayoría de las pruebas que se diseñan para RT-PCR de coronavirus son para amplificar el gen de la proteína S.

ENFERMEDADES DE IMPORTANCIA VETERINARIA

Virus de la bronquitis infecciosa aviar (IBV)

IMPACTO CLINICO

El virus de la bronquitis infecciosa (IBV) normalmente infecta el tracto respiratorio de pollos, pero también puede infectar el aparato intestinal, riñones y oviducto. Los signos clínicos respiratorios característicos son tos, estornudos, rales traqueales y descarga nasal. Los pollos infectados con cepas nefropatogénicas de IBV pueden mostrar signos de depresión, plumas rizadas y húmedas. La producción de huevos y su calidad se ven disminuidas en pollas infectadas. El empolle de los huevos de aves de cría está reducido y pueden producirse cáscaras de huevos suaves, deformadas y de aspecto áspero. La caída en la producción de huevos puede ser una consecuencia de infecciones del oviducto.

Las lesiones de la bronquitis infecciosa incluyen exudado seroso, catarral o caseoso en la tráquea, vías nasales y senos. Se han

observado los sacos aéreos con exudado caseoso, que se extiende hacia la tráquea inferior o bronquios y también áreas pequeñas de neumonía alrededor de los grandes bronquios. Microscópicamente, la mucosa traqueal suele estar edematosa, con una pérdida de cilias e infiltraciones de heterófilos y linfocitos en la lámina propia. La regeneración del epitelio después de la infección empieza con hiperplasia seguido por una infiltración masiva de la lámina propia por las células linfoides y la formación de centros germinales.

La infección con cepas nefropatogénicas provoca palidez e hinchazón de riñones, con túbulos renales y uretrales a menudo distendidos con uratos. A nivel microscópico, las lesiones renales son principalmente de una nefritis intersticial. En el estado agudo el virus causa degeneración, vacuolización y descamación del epitelio tubular e infiltración masiva de heterófilos en el intersticio.

IMPACTO ECONOMICO

Las pérdidas económicas principales de IBV en los productores de aves comerciales están causadas por la ineficiencia de la producción. La bronquitis infecciosa causa pobre ganancia de peso e infecciones mixtas con patógenos bacterianos oportunistas que pueden producir aerosaculitis que conlleva al sacrificio de las aves afectadas. En pollas ponedoras, las principales pérdidas se deben a una caída del 50% en la producción de huevos debido a la disminución de la calidad e irregularidades de la cáscara. La mortalidad causada por cepas nefropatogénicas o proventriculares de IBV puede alcanzar el 25% para el primer caso y 80% para el último.

RANGO DE HOSPEDADOR

La bronquitis infecciosa ocurre naturalmente en pollos de todos los grupos de edad. Se considera que los faisanes son un segundo hospedador natural de IBV.

EPIDEMIOLOGIA

El virus se disemina rápidamente tanto por aerosoles como por transmisión fecal-oral. No se conoce la ocurrencia de transmisión vertical de IBV. Las aves infectadas probablemente son fuentes de virus y el movimiento de aves vivas es considerado una fuente probable de infección. En aves susceptibles en contacto con otras infectadas, el virus es altamente infeccioso y pueden desarrollar signos respiratorios dentro de las 36 horas. Durante la fase aguda, las aves tosen y el virus es eliminado en el ambiente. El excremento y el alimento contaminado con materia fecal, los equipos de riego y la basura también son fuentes de virus.

La evidencia experimental sugiere que la persistencia de IBV y la reexcreción pueden ser una fuente potencial de virus para las bandadas no infectadas. Se piensa que el virus persiste en el riñón y los ganglios linfáticos cecales de aves infectadas durante hasta 6 meses. Este tipo de transmisión puede ocurrir en granjas con grupos de edades múltiples. En estos casos es necesario el uso de inmunización para prevenir pérdidas de la producción.

El virus está distribuido mundialmente y un país particular o una región normalmente tiene su propio serotipo único de IBV y también comparten serotipos comunes con otras regiones.

DIAGNOSTICO

El diagnóstico de esta enfermedad debe incluir la identificación del serotipo dada la existencia de serotipos múltiples que reaccionan en forma cruzada entre sí. La selección y uso de la vacuna apropiada son extremadamente dependientes de la determinación exacta del serotipo. La VN y la HI en general se consideran pruebas tipo específicas, aunque hay reacciones cruzadas entre los serotipos, sobre todo al usar la prueba de HI. Los ELISA de IBV disponibles comercialmente son pruebas grupo específicas, aunque para diferenciar los serotipos de IBV los anticuerpos monoclonales (MAb) tipo específicos pueden usarse en la captura del antígeno por ELISA.

PREVENCION Y CONTROL

Las buenas prácticas de manejo son las llaves para el control de la IBV. El aislamiento estricto y repoblación con pollos BB de 1 día de alta calidad, en una granja totalmente limpia y desinfectada, son muy importantes. También pueden controlarse las infecciones con inmunización, aunque la vacunación nunca puede ser un sustituto de un buen manejo. Las vacunas vivas modificadas y las vacunas inactivadas se usan en programas de inmunización de granjas comerciales. Las vacunas vivas modificadas se emplean en pollos parrilleros y para la vacunación inicial de pollos de cría y gallinas ponedoras. Las vacunas inactivadas en aceite-emulsión se usan principalmente en cría y gallinas ponedoras. Se seleccionan cepas de la vacuna que representan el espectro antigénico de los aislamientos en un país particular o en una región. El serotipo de vacuna Massachusetts (M41, H120) se usa ampliamente alrededor del mundo porque el aislamiento inicial de muchos países ha sido de ese serotipo. Las vacunas vivas pueden ser administradas individualmente por instilación de una gota en el ojo o vía intranasal, pero la vacunación en masa requiere el uso de spray, aerosol o incorporación al agua de bebida. Las vacunas inactivadas requieren la inyección de las aves individualmente.

Virus de la gastroenteritis transmisible porcina (TGEV)

IMPACTO CLINICO

El virus de la gastroenteritis transmisible porcina (TGEV) es básicamente un enteropatógeno, aunque el coronavirus respiratorio porcino (PRCoV; una mutante por deleción del TGEV) también puede replicarse en el tracto respiratorio. Infecta cerdos de hasta 3 semanas de edad que desarrollan vómitos, diarrea acuosa y deshidratación ocasionando la muerte dentro de 2 a 5 días. La mortalidad en cerdos jóvenes puede acercarse al 100%. En contraste, los cerdos adultos desarrollan diarrea que normalmente dura sólo 2 a 4 días y experimentan una mortalidad de menos del 5%. Durante la infección con cepas de TGEV virulentas, las concentraciones virales más altas se encuentran, principalmente, en el tracto intestinal en la porción distal de las vellosidades del yeyuno y el íleon. El virus se replica en las células de las vellosidades en cerdos recién nacidos y en el tejido mamario de cerdas en lactación así como en los riñones y pulmones. Las lesiones principales en lechones se confinan al intestino y estómago. La pared intestinal está normalmente delgada y translúcida y el intestino está distendido con ingesta de fluido. En el estómago puede haber engrosamiento de los vasos y necrosis del epitelio profundo en criptas de la mucosa. Los cambios histológicos importantes incluyen destrucción del epitelio columnar que tapiza la vellosidad intestinal que produce atrofia de la misma.

IMPACTO ECONOMICO

Las pérdidas principales son el resultado de la alta tasa de mortalidad en lechones recién nacidos, de menos de 10 días de vida. Los brotes de TGEV en las piaras pueden ser económicamente devastadores.

RANGO HOSPEDADOR

La infección con TGEV normalmente se limita al cerdo, pero el virus se ha recuperado de materia fecal de gatos experimentalmente infectados, perros, zorros y estorninos. La infección natural también se ha descrito en mofetas (zorrinos), comadrejas y humanos.

EPIDEMIOLOGIA

Los brotes normalmente siguen a la introducción de nuevos cerdos en una piara. Los visitantes, vehículos de transporte y aves también pueden transmitir el virus a las nuevas locaciones. El modo primario de transmisión es fecal-oral. Los cerdos en engorde y cerdas en lactación son responsables de la transmisión de TGEV a los animales jóvenes. La transferencia intrauterina no se ha observado. El virus puede diseminarse en una piara en unos 2 o 3 días. El virus es poco resistente, lo que puede considerarse para que la ocurrencia más frecuente de la enfermedad sea durante el invierno y la primavera. El virus puede sobrevivir congelado y los restos de la carne de cerdo pueden proporcionar una fuente de infección. Los brotes finalizan dentro de 3 a 5 semanas con la pérdida de cerdos susceptibles jóvenes y el desarrollo de inmunidad de la piara. La enfermedad por lo general no se repite durante 3 a 6 años.

DIAGNOSTICO

Los antígenos de virus de la gastroenteritis transmisible pueden ser detectados específicamente por inmunofluorescencia usando anticuerpos monoclonales específicos de tipo, grupo e interespecies. La hemaglutinación reversa pasiva, basada en la aglutinación de eritrocitos cubiertos con anticuerpos TGEV-específicos, es un método muy sensible, simple y rápido. El radioinmunoensayo competitivo y el ELISA con anticuerpos monoclonales específico de tipo y grupo, y la hibridación basada en el gen S han usado sondas de DNA gen-basado para diferenciar TGEV de PRCoV.

PREVENCION Y CONTROL

Las cerdas recuperadas pueden proteger su descendencia por la transferencia pasiva de inmunidad. Durante la infección, los anticuerpos protectores (IgA) se secretan en el lumen del intestino delgado y también en la glándula mamaria de la cerda preñada. Estos anticuerpos séricos están presentes en la leche calostral durante los primeros 3 días después del nacimiento de los lechones. A continuación la IgA secretoria se sintetiza directamente en la glándula mamaria. Los anticuerpos mamarios pueden ser inducidos inmunizando cerdas 2 semanas antes de la parición. Se han usado tres tipos de virus para desarrollar inmunidad lactogénica: a) TGEV virulento, b) TGEV atenuado, y c) coronavirus TGEV relacionado (PRCoV, FIPV, y CCoV). La vacuna de TGEV virulenta es la más protectora para la cerda y los cerdos mamones, sin embargo esta vacuna también puede causar brotes de enfermedad. Las vacunas de TGEV atenuadas tienen eficacia limitada y la vacunación con coronavirus heterólogos proporcionan protección parcial sólo contra el desafío de TGEV.

Coronavirus bovino (BCoV)

IMPACTO CLINICO

El coronavirus bovino (BCoV) habitualmente es enteropatogénico, aunque también puede infectar el tracto respiratorio. Las cepas enteropatogénicas (EBCoV) son responsables tanto de la diarrea neonatal en terneros recién nacidos (1 a 3 semanas de edad) y de la disentería del invierno en ganado adulto. Los signos clínicos en terneros recién nacidos incluyen anorexia y diarrea amarilla que persisten durante 4 a 5 días. En el ganado adulto, los signos incluyen diarrea sanguinolenta explosiva acompañada por disminución de la producción de leche, depresión y anorexia. El virus puede detectarse en el epitelio del intestino delgado y las criptas del colon. También infecta los nódulos linfáticos mesentéricos adyacentes. La destrucción de enterocitos maduros que tapizan la vellosidad intestinal conduce a la atrofia y fusión de las vellosidades afectadas. La diarrea resulta como consecuencia de la maldigestión y malabsorción intestinal y provoca deshidratación grave, shock y a veces la muerte.

Las cepas respiratorias (RBCoV) causan neumonía en terneros (6 a 9 meses de edad) caracterizada por fiebre, descarga nasal y dificultad respiratoria. Las lesiones incluyen hemorragia y edema de los tabiques interlobulares pulmonares, neumonía intersticial con infiltración de células inflamatorias mononucleares y espesamiento del tabique alveolar.

RANGO DE HOSPEDADORES

En la naturaleza, se han descrito sólo infecciones de coronavirus en el ganado bovino. Sin embargo, el virus se ha propagado experimentalmente en ratones lactantes, ratas y hámsters.

EPIDEMIOLOGIA

La transmisión del EBCoV normalmente tiene lugar a través de la ruta fecal-oral por ingestión de virus de materiales contaminados. El coronavirus bovino respiratorio es eliminado en las secreciones nasales de animales infectados y también puede ser diseminado por aerosol. La enfermedad es de distribución mundial.

DIAGNOSTICO

Los virus o los antígenos virales pueden detectarse en heces o secciones intestinales mediante aislamiento, microscopia electrónica, inmunofluorescencia e inmunohistoquímica. Los hisopados nasales son la muestra preferida para el diagnóstico de la forma respiratoria aguda de la enfermedad.

PREVENCION Y CONTROL

La infección viral es controlada mejor por buenas prácticas de manejo, como el movimiento supervisado de animales infectados en los operaciones intensivas bovinas. Es difícil de controlar la

síntomas más pronunciados ocurren dentro de los 2 días con diarrea, deshidratación, debilidad y depresión. Las células epiteliales que tapizan el intestino delgado y el grueso están infectadas, con progresión de la infección de las áreas del yeyuno medio a través del íleon y el colon. Dentro del intestino delgado, se infectan las células del tercio superior de la cripta y las placas de Peyer, incluso las células M. Puesto que el BoETV infecta células de la cripta y del epitelio de las vellosidades, la restauración de la estructura normal y la función del tracto intestinal puede ser más lenta que lo que ocurre con otras infecciones, como los rotavirus e infecciones de BCoV que afectan sólo el epitelio de las vellosidades.

El torovirus respiratorio bovino (BoRTV) causa neumonía en terneros de 6 a 9 semanas de edad. Los aislamientos respiratorios son los únicos torovirus bovinos que se han adaptado a la propagación en cultivo celular.

EPIDEMIOLOGIA

Los terneros pueden infectarse por vía oral o respiratoria. Existe escasa información sobre cómo se disemina el virus entre los rebaños. La evidencia de infección de BoTV ha sido obtenida en los países donde se han realizado pruebas serológicas.

DIAGNOSTICO

El diagnóstico de infección de BoTV requiere la detección de antígenos virales o RNA viral por ELISA, inmunofluorescencia, microscopia inmunoelectrónica, o RT-PCR en muestras fecales o respiratorias. La serología puede ser realizada por VN o ELISA para determinar la presencia del virus en un rebaño.

PREVENCION Y CONTROL

Las infecciones se pueden controlar mediante buenas prácticas de manejo, como el movimiento restringido de animales infectados. La presencia de anticuerpos maternales en terneros no previene la infección, pero puede modificar el resultado de la enfermedad limitando la aparición de signos clínicos.

Traducción: Nestor Oscar Stanchi, María Gabriela Echeverría

BIBLIOGRAFIA

Balasuriya UBR, Stott JL. Corovaviridae and Arteriviridae. In Veterinary Microbiology. Hirsh DC, MacLachlan NJ, Walker RL. Blackwell Publishing, Ames, IA. 2nd. 2004. p. 383-397.

Cavanagh D. The coronavirus surface glycoprotein. In The Coronaviridae. Sidell SG. Plenum Press, New York. 1995. p. 73-113.

Cavanagh D, Naqi S. Infectious bronchitis. In Diseases of Poultry. Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE. Iowa State Press, Ames, IA. 11th. 2003. p. 101-119.

Enjuanes L, Brian D, Cavanagh D, Holmes K, Lai MMC, Laude H, Masters P, Rottier PJM, Sidell SG, Spaan WJM, Taguchi F, Talbot P. Family: Coronaviridae. In Classification and nomenclature of viruses. Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB. Academic Press, San Diego. 2000. p. 835-849.

Enjuanes L, Spaan WJM, Snijder E, Cavanagh D. Order: Nidovirales. In Classification and nomenclature of viruses. Regenmortel MHVv, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB. Academic Press, San Diego. 2000. p. 827-834.

Lai MMC, Cavanagh D. The molecular biology of coronaviruses. In Advances in virus research. Maramorosch, K., Murphy, F. A. and Shatkin, A. Academic Press, New York. 1997. p. 1-100.

Lai MMC, Holmes K. Coronaviridae. In Fields virology. Knipe DM, Howley PM. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA. 2001. p. 1163-1185.

Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats, and horses, W. B. Saunders Ltd., Philadelphia, PA. 9th. 2000. 1880 pp.

munizar hembras preñadas y proteger a los cachorros frente a la enfermedad. Sin embargo, su uso está en duda ya que todavía se cuestiona si la inmunidad local juega un papel significativo en la protección a nivel de la mucosa intestinal.

Coronavirus del pavo (TCoV)

IMPACTO CLINICO

El coronavirus del pavo (TCoV) causa una enfermedad aguda y muy contagiosa en los pavos. Los signos clínicos incluyen depresión, temperatura corporal subnormal, anorexia, inapetencia, pérdida de peso y diarrea. Las lesiones están confinadas al tracto gastrointestinal, con hemorragias petequiales en las superficies serosas. El aumento de gas y fluido dilata el intestino delgado y el ciego. Los músculos del pecho normalmente se deshidratan. Las lesiones microscópicas incluyen la destrucción de enterocitos que tapizan la vellosidad intestinal y llevan a la atrofia vellosa y a la infiltración celular mononuclear de la lámina propia. Los pavos responden a la infección de TCoV con respuesta inmune humoral y celular, 2 a 3 semanas después del inicio de la infección.

IMPACTO ECONOMICO

El coronavirus del pavo es de importancia económica mayor en la industria del pavo. En la cría de ponedoras, hay una caída rápida en la producción de huevos y éstos se observan con apariencia de cáscaras blanquecinas. La morbilidad normalmente es muy alta (hasta un 100%), pero la mortalidad varía con la edad de la aves y las condiciones ambientales.

RANGO DE HOSPEDADOR

La infección por coronavirus de los pavos se confina a ejemplares de todas las edades.

EPIDEMIOLOGIA

El coronavirus del pavo normalmente es transmitido por la vía fecal-oral. El virus puede introducirse en las aves nuevas a través del traslado de excremento en equipo contaminado, y posiblemente por los pájaros de vida libre. El virus es estable aun en el invierno, donde sobrevive en materia fecal y secreciones.

DIAGNOSTICO

El diagnóstico puede realizarse por investigación del antígeno viral en tejidos intestinales mediante inmunohistoquímica o bien aislamiento. Las infecciones también pueden ser diagnosticadas por VN o inmunofluorescencia indirecta en muestras de suero agudas y convalecientes. El virus se puede aislar inoculando huevos embrionados de pavo y su presencia puede ser confirmada por fluorescencia o amplificación de RT-PCR del gen espicular.

PREVENCION Y CONTROL

Las vacunas de coronavirus del pavo no están actualmente disponibles, pero la prevención de la enfermedad es posible. La enfermedad se ha eliminado en algunas áreas afectadas por premisas de despoblación y desinfección. Alternativamente, la exposición de las aves a las 5 a 6 semanas de edad a las aves portadoras recuperadas con el propósito de inducir inmunidad protectora ha tenido éxito y se ha recomendado en las aves que tienen problemas después que otras medidas de control han fallado.

Hepatitis viral murina (MHV)

IMPACTO CLINICO

La hepatitis viral murina (MHV) es una enfermedad muy contagiosa especialmente problemática en colonias de ratones. Hay muchas cepas diferentes de MHV, cada una con un tropismo de tejido característico. La cepa enterotrópica A59 causa diarrea grave en ratones lactantes, con casi 100% de mortalidad. Los ratones adultos desarrollan ictericia y pierden peso cuando se infectan. Microscópicamente, las lesiones se manifiestan en vellosidades intestinales ciegas con formación de extensos sincicios. Los ratones infectados de todas las edades desarrollan hepatitis agudas con áreas focales de necrosis e infiltración celular.

La cepas neurotrópicas (JHM) se levantan después de muchos pasajes a través de los cerebros de ratones susceptibles. Esta cepa es muy virulenta y causa parálisis debido a desmielinización. El virus persiste en la sustancia blanca del cordón espinal y cerebro.

La hepatitis viral murina es el coronavirus más estudiado debido a la disponibilidad de su hospedador natural en el laboratorio. Se usa como modelo de enfermedad desmielinizante crónica de humanos como la esclerosis múltiple.

EPIDEMIOLOGIA

El virus de la hepatitis murina causa brotes en colonias de ratones en todo el mundo. La gravedad de la manifestación clínica depende de las cepas virales, la ruta de infección, la cepa del hospedador, la edad y estado inmune del mismo. Los ratones persistentemente infectados pueden ser portadores que pueden transmitir el virus a los ratones susceptibles introducidos en la colonia.

DIAGNOSTICO

La detección de las infecciones de MHV se realiza por serología (VN o ELISA). Pueden detectarse virus o antígenos virales en tejidos gastrointestinales o nerviosos por ME, inmunohistoquímica o pruebas de IFA.

PREVENCION Y CONTROL

Los brotes se controlan a través del uso estricto de medidas de cuarentena para evitar el ciclo de transmisión del virus del portador a los ratones susceptibles.

Torovirus bovino (BoTV)

IMPACTO CLINICO

El torovirus bovino (BoTV) se limita a infecciones del aparato gastrointestinal, aunque el aparato respiratorio puede estar involucrado esporádicamente. Los terneros de 1 a 3 días de edad infectados con torovirus entérico bovino (BoETV) típicamente desarrollan una diarrea acuosa que persiste durante 4 a 5 días. Los

síntomas más pronunciados ocurren dentro de los 2 días con diarrea, deshidratación, debilidad y depresión. Las células epiteliales que tapizan el intestino delgado y el grueso están infectadas, con progresión de la infección de las áreas del yeyuno medio a través del íleon y el colon. Dentro del intestino delgado, se infectan las células del tercio superior de la cripta y las placas de Peyer, incluso las células M. Puesto que el BoETV infecta células de la cripta y del epitelio de las vellosidades, la restauración de la estructura normal y la función del tracto intestinal puede ser más lenta que lo que ocurre con otras infecciones, como los rotavirus e infecciones de BCoV que afectan sólo el epitelio de las vellosidades.

El torovirus respiratorio bovino (BoRTV) causa neumonía en terneros de 6 a 9 semanas de edad. Los aislamientos respiratorios son los únicos torovirus bovinos que se han adaptado a la propagación en cultivo celular.

EPIDEMIOLOGIA

Los terneros pueden infectarse por vía oral o respiratoria. Existe escasa información sobre cómo se disemina el virus entre los rebaños. La evidencia de infección de BoTV ha sido obtenida en los países donde se han realizado pruebas serológicas.

DIAGNOSTICO

El diagnóstico de infección de BoTV requiere la detección de antígenos virales o RNA viral por ELISA, inmunofluorescencia, microscopia inmunoelectrónica, o RT-PCR en muestras fecales o respiratorias. La serología puede ser realizada por VN o ELISA para determinar la presencia del virus en un rebaño.

PREVENCION Y CONTROL

Las infecciones se pueden controlar mediante buenas prácticas de manejo, como el movimiento restringido de animales infectados. La presencia de anticuerpos maternales en terneros no previene la infección, pero puede modificar el resultado de la enfermedad limitando la aparición de signos clínicos.

Traducción: Nestor Oscar Stanchi, María Gabriela Echeverría

BIBLIOGRAFIA

Balasuriya UBR, Stott JL. Corovaviridae and Arteriviridae. In Veterinary Microbiology. Hirsh DC, MacLachlan NJ, Walker RL. Blackwell Publishing, Ames, IA. 2nd. 2004. p. 383-397.

Cavanagh D. The coronavirus surface glycoprotein. In The Coronaviridae. Sidell SG. Plenum Press, New York. 1995. p. 73-113.

Cavanagh D, Naqi S. Infectious bronchitis. In Diseases of Poultry. Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE. Iowa State Press, Ames, IA. 11th. 2003. p. 101-119.

Enjuanes L, Brian D, Cavanagh D, Holmes K, Lai MMC, Laude H, Masters P, Rottier PJM, Sidell SG, Spaan WJM, Taguchi F, Talbot P. Family: Coronaviridae. In Classification and nomenclature of viruses. Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB. Academic Press, San Diego. 2000. p. 835-849.

Enjuanes L, Spaan WJM, Snijder E, Cavanagh D. Order: Nidovirales. In Classification and nomenclature of viruses. Regenmortel MHVv, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB. Academic Press, San Diego. 2000. p. 827-834.

Lai MMC, Cavanagh D. The molecular biology of coronaviruses. In Advances in virus research. Maramorosch, K., Murphy, F. A. and Shatkin, A. Academic Press, New York. 1997. p. 1-100.

Lai MMC, Holmes K. Coronaviridae. In Fields virology. Knipe DM, Howley PM. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA. 2001. p. 1163-1185.

Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats, and horses, W. B. Saunders Ltd., Philadelphia, PA. 9th. 2000. 1880 pp.

Capítulo 72

BIRNAVIRUS

Miguel A. Herrero Loyola, Miguel Angel Petruccelli

CARACTERISTICAS DE LA FAMILIA VIRAL

La familia Birnaviridae posee tres géneros: *Acquavirnavirus*, *Entomobirnavirus* y *Avibirnavirus*. El prototipo es el virus de la necrosis pancreática infecciosa de los peces (NPI) y se incluyen en esta familia el virus *Tellina* de los moluscos bivalvos, el virus *Drosophila X* de la mosca de la fruta y el más conocido de todos el virus de la enfermedad infecciosa bursal (EIB) de los pollos.

El genoma de los virus agrupados en esta familia está constituido por dos segmentos de RNA de cadena doble, de donde proviene la denominación *Birnavirus*, con una longitud de 5880-6400 nucleótidos. El virión contiene 9,7% de ácido nucleico, no posee envoltura, es de simetría icosaédrica y posee un diámetro que varía entre 55-65 nm. La nucleocápside está formada por 92 capsómeros en cuya superficie no se encuentran proyecciones.

Los viriones tienen una densidad de flotación en CsCl de 1,33 g cm^{-3} y un coeficiente de sedimentación de 435 S_{20w}. El virus posee cuatro proteínas, designadas como VP1, VP2, VP3 y VP4, cuyos pesos moleculares aproximados son de 90, 41, 32 y 28 k respectivamente. Las VP2 y VP3 son las principales, representando el 51% y el 40% de las proteínas, en tanto la VP1 y la VP4 constituyen el 3% y el 6% respectivamente. Tanto en la VP2 como en la VP3 se encuentran epitopes neutralizantes. In vitro los viriones son estables a pH ácido (3 a 7) y alcalino (7 a 9). No son sensibles al calor (60 °C, 1 hora) ni a la acción del éter. El virus es bastante resistente a algunos desinfectantes como complejos de yodo, amonio cuaternario y derivados fenólicos. Es rápidamente inactivado por exposición al cloro, yodo e irradiación ultravioleta.

REPLICACION VIRAL

Los diferentes pasos que involucran la replicación viral aún no han sido delineados. Esta no comprende ninguna fase nuclear.

In vivo el virus se fija rápidamente a distintas células, por ejemplo, 75 minutos después de la inoculación, se puede encontrar en las células renales de embrión de pollo; estos tiempos pueden variar hasta las 48 horas dependiendo del sustrato celular. Por otra parte, el sitio receptor de reconocimiento celular en el virus es desconocido. El virus de la EIB se puede propagar muy bien en cultivos celulares de embrión de pollo, sin embargo las cepas muy virulentas son difíciles de aislar en estos sustratos. El virus se replica eficientemente en membrana corioalantoidea (MCA) de embriones de pollo.

PATOGENESIS

El antígeno viral puede ser detectado rápidamente en macrófagos y células linfoideas de pollos inoculados por vía oral con el virus de la EIB. Cinco horas posinoculación se lo encuentra en el hígado, de allí, a través del torrente sanguíneo se distribuye en todo el organismo, pero fundamentalmente en la bolsa de Fabricio (BF), órgano blanco de este virus. La importancia de esta enfermedad radica en que el virus tiene una especial afinidad por los linfocitos B inmaduros, principalmente los de la BF, aunque también afecta otros órganos linfoideos tales como timo, bazo, glándula de Harder y tonsilas cecales, produciendo en todos ellos necrosis linfoidea. Las lesiones de la BF son permanentes, mientras que en los órganos linfoideos secundarios son transitorias y pueden recuperar su estructura normal. La enfermedad produce una inmunodepresión grave, quedando los animales incapacitados para generar inmunidad humoral.

Estudios experimentales han demostrado que pollos bursectomizados o tratados con ciclofosfamida y desafiados con el virus de la EIB, no desarrollaban enfermedad, mientras que el 100% de los controles no bursectomizados o sin tratamiento moría.

RESPUESTA INMUNE

Mac Ferran y col. fueron los primeros en comunicar diferencias antigénicas entre los distintos aislamientos del virus de la EIB de origen europeo, hecho evidenciado por la presencia de dos serotipos a los que designaron 1 y 2. Los virus de ambos serotipos de la EIB comparten antígenos de grupo; éstos se pueden detectar por pruebas de inmunofluorescencia y ELISA, siendo los antígenos comunes para ambos serotipos las proteínas VP2 y VP3.

Se informó de una relación antigénica de sólo el 30% entre varias cepas del serotipo 1. Se han aislado cepas variantes del serotipo 1, sin embargo, las vacunas preparadas con cepas del serotipo 1 no protegen contra las variantes, ya que éstas últimas son antigénicamente diferentes de las cepas estándares del serotipo 1.

La relación antigénica entre dos cepas del serotipo 2 fue del 33%; asimismo la inmunización con las cepas del serotipo 2 no protegen contra las del serotipo 1.

Los anticuerpos contra la EIB aparecen rápidamente; a los 3 días posinoculación se pueden detectar por pruebas de virus neutralización (VN). La exposición al virus de campo o a una vacuna, estimula la producción de anticuerpos, los que pueden ser detectados por pruebas de VN, precipitación en gel de agar (AGP) o ELISA. Los animales adultos son refractarios a la enfermedad pero producen anticuerpos cuando son vacunados. Esta inmunidad es transmitida en forma pasiva a través de la yema a los pollitos, los cuales, dependiendo de los títulos de anticuerpos de las reproductoras, podrán estar protegidos contra la enfermedad durante las primeras 3 semanas de vida.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Para el aislamiento virológico los órganos de preferencia son la BF o el bazo, los que deben ser remitidos al laboratorio, refrigerados o congelados. Los triturados de estos órganos se inoculan

por MCA de huevos embrionados de pollo o en fibroblastos de embrión de pollo, pavo o pato. También se lo puede multiplicar en cultivos celulares (Vero, BGM-70 y RK-13). Los embriones inoculados generalmente mueren entre los 3 y 5 días posinoculación, presentando hemorragias en la piel, articulaciones de las patas y cabeza. Para el aislamiento del virus de campo se prefiere como primer sustrato al embrión de pollo, para luego transferirlo a cultivos celulares. Una vez multiplicado el virus, debe realizarse la prueba de VN utilizando sueros patrones para su identificación. La inmunofluorescencia directa realizada sobre tejidos infectados o de cultivos celulares, resulta un método eficaz para el diagnóstico. En animales sin vacunar, la inmunoserología (VN, ELISA, AGP) resulta una herramienta confiable para detectar anticuerpos; su presencia indicaría el pasaje de una cepa viral.

ENFERMEDAD INFECCIOSA BURSAL

La EIB, también llamada enfermedad de Gumboro, afecta a las gallinas, pavos y patos. Fue descrita en 1962 por Cosgrove y en la Argentina, en el año 1977, por Panettieri y col. Esta enfermedad constituye un problema constante y de difícil resolución para las explotaciones avícolas en nuestro país y en el mundo.

El período de mayor susceptibilidad en los pollos se encuentra entre la tercera y sexta semana de vida, momento en el cual los animales muestran signos clínicos. Las infecciones subclínicas se producen en animales de menos de 3 semanas, sin embargo, tanto en los casos clínicos como subclínicos, desarrollan una grave inmunodepresión.

La EIB es sumamente contagiosa, agravada por la persistencia del virus en el ambiente y en las camas de los galpones donde ha pasado la enfermedad, debido a la resistencia al calor y a los desinfectantes. El período de incubación es muy corto y los signos clínicos se manifiestan a los 2 o 3 días posinfección.

La forma clínica de la enfermedad ocurre en pollos con un rápido aumento de la mortalidad. Los signos clínicos predominantes comienzan con una tendencia de algunos animales a picarse la zona de la cloaca debido a la inflamación de la BF, también se produce una diarrea blanca y acuosa que mancha las plumas de la cloaca, acompañados por anorexia, depresión, plumas erizadas, temblores, postración y finalmente la muerte.

Las aves afectadas tienen mala conversión alimenticia, falta de desarrollo y fuertes reacciones a las vacunas a virus vivos. Las complicaciones bacterianas producen mortandades de importancia o decomisos en el procesado de faena. Los virus variantes son responsables de presentaciones subclínicas y ocasionan inmunodepresión grave.

La morbilidad y la mortalidad dependen de la susceptibilidad de los animales; los lotes totalmente susceptibles tienen un índice de morbilidad cercano al 100% y la mortalidad varía entre el 20-30%. Las principales lesiones se observan en la BF, la cual está agrandada, edematosa e hiperémica y se observa un trasudado gelatinoso amarillento que cubre la superficie serosa. Cinco días después de la infección disminuye de tamaño para transformarse rápidamente en un órgano atrófico. También se observan hemorragias en músculos pectorales y de los muslos, los riñones están agrandados y uratosos, con aumento de la mucosidad intestinal y algunas hemorragias.

Microscópicamente, en la BF se produce necrosis de los linfocitos; una vez que éstos desaparecen, son remplazados por vesículas quísticas y un proceso de epitelización y fibrosis. Las lesiones son permanentes e irreversibles, mientras que en los órganos linfoideos secundarios, las mismas son temporales.

La enfermedad se previene con la aplicación de vacunas vivas o inactivadas. Las vacunas vivas se clasifican, según el tipo de virus, en suaves, intermedias o calientes, de acuerdo a la patogenicidad del mismo. Las cepas utilizadas en la primovacunación son las intermedias, dicha elección radica en la capacidad que tienen para producir óptimos niveles de anticuerpos y lesiones leves en la BF. Para las vacunas inactivadas se utiliza indistintamente cualquier tipo de virus.

El conocimiento de los niveles de anticuerpos transmitidos a la descendencia es de suma importancia para establecer el momento exacto en el que los pollitos pasan a ser susceptibles y de esta manera implementar un plan de vacunación adecuado. Esta inmunidad puede interferir con la estimulación de una respuesta inmunitaria activa. Las vacunas inactivadas y vivas, provenientes de cepas variantes, protegen a animales desafiados tanto contra cepas variantes como estándares; en cambio, las vacunas inactivadas de cepas estándares no protegen contra las variantes.

Por tratarse de una enfermedad viral la misma no tiene tratamiento efectivo.

NECROSIS PANCREATICA INFECCIOSA

La necrosis pancreática infecciosa (NPI) es una de las primeras enfermedades de peces descritas. A través de métodos serológicos, bioquímicos y genéticos se pueden diferenciar clases y subclases del birnavirus productor de la enfermedad. Los más comúnmente encontrados son los VR-299 (tipo1), Ab (tipo 2) y el Sp (tipo 3). El tipo 1 fue aislado en los Estados Unidos de Norteamérica y los otros dos en Europa. Afecta no sólo a salmónidos sino a una variedad muy diversa de peces.

El síntoma más importante de la enfermedad es la alta mortalidad en alevines durante los dos primeros meses después de que comienzan a comer; también puede afectar a peces de criaderos. El modo más común de transmisión de la enfermedad es a través de los huevos infectados de reproductores sin signología clínica, siendo la transmisión horizontal también muy importante.

Esta enfermedad suele ser un problema difícil de resolver, pues los peces silvestres pueden contaminar las cañerías de los criaderos con sus excretas, y las aves acuáticas y los mamíferos que ingieren peces contaminados, pueden eliminar virus con su materia fecal. El estrés es un factor desencadenante de la enfermedad. La mortalidad comienza a los 3 días posinfección, pudiendo llegar hasta el 70% que generalmente cesa entre 10 y 20 días después de aparecidos los síntomas. En casos crónicos la mortalidad es más baja (20%), los peces que superan la enfermedad pueden tener un mal desarrollo y no adquirir el peso deseado.

Los signos clínicos de los alevines afectados se caracterizan por desplazamientos lentos, nadando de costado o con movimientos lentos en espiral, hundiéndose a menudo hacia el fondo. Pueden tener una coloración más oscura y el vientre distendido. En la necropsia, se observa un moco blanquecino en el intestino, así como también pequeñas hemorragias frecuentes en el estómago, páncreas y en la porción anterior del intestino. El diagnóstico se realiza por los signos clínicos, estudios histopatológicos, por el aislamiento del virus del intestino o de las secreciones sexuales o materia fecal de los portadores. Por lo general, la identificación del virus se confirma por medio de pruebas de VN y ELISA.

No existe tratamiento y con frecuencia se aconseja sacrificar a todos los animales afectados. Como método de prevención de la

enfermedad se indica la desinfección de los huevos a su llegada al criadero, así como también de las instalaciones de cría y de los afluentes de agua.

BIBLIOGRAFIA

Calnek BW. Enfermedades de las Aves. Primera edición en español. Ed. El Manual Moderno. México DF. 1995; p. 797-816.

Hirai KS, Shimakura E, Kawamoto F, Taguchi ST, Kim CN, Chang Iratani I. Immunodepressive effect of infectious bursal disease virus in chickens. Avian Dis. 1974; 18: 50-57.

Jackwood DJ, Saif YM, Hughes JH. Nucleic acid and structural proteins of infectious bursal disease virus isolates belonging two serotypes I and II. Avian Dis. 1984; p. 990-1006.

Mc Ferran JB, Mc Nulty MS, Mc Killop ER, Conner TS, Mc Cracken RM, Collins DS, Allan GM. Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and duck: Demonstration of a second serotype. Avian Pathol. 1980; 9 :395-404.

Petruccelli MA. Determinación de anticuerpos maternales contra la Enfermedad Infecciosa Bursal (Enfermedad de Gumboro). Estudio comparativo mediante tres pruebas serológicas. Tesis. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. 1996.

Roberts RJ, Shepherd CJ. Enfermedades de la trucha y el salmón, Ed. Acribia. Zaragoza (España). 1980 p. 109-110.

Capítulo 73

CALICIVIRUS

María Gabriela Echeverría

CARACTERISTICAS DE LA FAMILIA VIRAL

De acuerdo al último informe del Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV), la familia Caliciviridae comprende cuatro géneros, dos patógenos animales (*Lagovirus* y *Vesivirus*) y dos que causan, principalmente gastroenteritis en el hombre (*Norovirus* y *Sapovirus*). En este capítulo haremos referencia a los dos primeros:

- *Lagovirus*: su nombre deriva de la familia susceptible, los lagomorfos; incluyen el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV) y el virus del síndrome de la liebre parda europea (EBHSV)
- *Vesivirus*: incluyen varias enfermedades que afectan a distintas especies como exantema vesicular del cerdo (VEVS), de donde recibe su nombre el género, calicivirus felino (FCV), virus lobo marino de San Miguel (SMSLV), calicivirus canino y aquellos productores de enteritis como calicivirus bovino y porcino.

El nombre de esta familia deriva de la forma de copa o cáliz que presentan las depresiones de la cápside icosaédrica observadas al microscopio electrónico con tinción negativa. Algunos calicivirus presentan una morfología de "estrella de David" debido a la orientación de sus ejes de simetría (fig. 73-1).

Los calicivirus causan un amplio espectro de enfermedades diferentes, incluyendo enfermedad respiratoria (FCV), lesiones vesiculares (FCV y VESV), hepatitis necrótica (RHDV), abortos (SMSLV) y diarrea (*Norovirus* y *Sapovirus* entre otros). Los viriones no poseen envoltura, lo que los hace estables al éter al 20% a 4 °C durante 24 horas, al cloroformo y a la tripsina; son muy resistentes a pH extremo y al calor (60 °C 30 min, 50° C 1 hora). Las partículas tienen un tamaño aproximado de 30-40 nm de diámetro y una densidad de flotación en cloruro de cesio que oscila entre 1,36 a 1,41 g/cm^3.

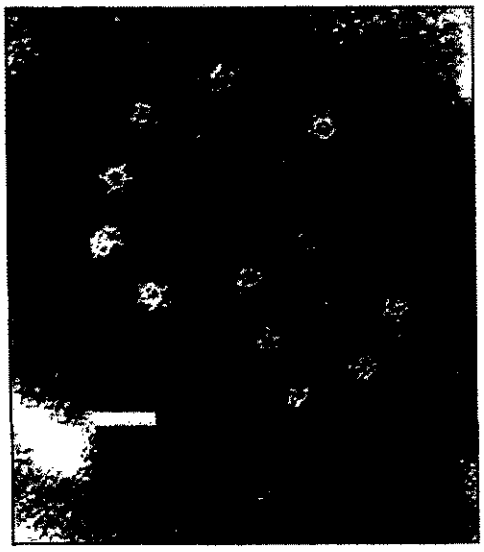


Figura 73-1. Calicivurs en materia fecal. Se observa la forma de "estrella de David" exhibida por las partículas individuales. Barra = 50 nm, tinción negativa. Microscopia electrónica de transmisión. (Foto: FP Williams, EE.UU. EPA con permiso.)

Son virus que poseen RNA de cadena simple y sentido positivo, de un tamaño aproximado de 7,5-7,9 kb. Este tipo de genoma y la presencia de poli A en el extremo 3' los asemeja a las familias Picornaviridae, Poxviridae y Coronaviridae. A diferencia de éstas, una característica importante de la familia Caliciviridae es la ausencia de CAP en el extremo 5' del RNA viral y la presencia en ese mismo extremo de una pequeña proteína unida en forma covalente al RNA. Esta proteína se denomina VPg (o proteína del virión unida al genoma), tiene un peso aproximado de 12-14 k y está descrita como esencial para la infectividad del RNA viral. Además se han descrito una proteína mayor de la cápside (estructural) denominada VP60 o VP1 de 60-70 k, y otra menor designada como VP10. El RNA viral comprende 2 o 3 marcos abiertos de lectura (ORF) según el género del que se trate (fig. 73-2). Las proteínas no estructurales son producidas por proteólisis de un precursor (poliproteína) codificada por el ORF1 cerca del extremo 5'. Esa poliproteína de aproximadamente 200 k se fracciona en las proteínas no estructurales como cisteína proteasa y RNA polimerasa, entre otras. La proteína mayor de la cápside se traduce desde el mRNA subgenómico que es homólogo al extremo 3' del RNA genómico. Algunos autores describen una VP2, proteína estructural menor codificada por el ORF3.

REPLICACION VIRAL

Uno de los modelos más estudiado en esta familia es el FCV. La replicación se realiza en el citoplasma y sigue el modelo clásico de adsorción, penetración, desnudamiento de la cápside, replicación del genoma, expresión de las proteínas y ensamblado viral.

Si bien los mecanismos de entrada a la célula y desnudamiento de la cápside permanecen aún no muy claros para la mayoría de los virus no envueltos, se especula que el virus interactúa con las células susceptibles (adsorción a receptores celulares) y luego penetra a la célula; a continuación las nucleocápsides alcanzan el citoplasma a través de la vía endocítica, que por disminución de pH permite la liberación del genoma al citoplasma.

Durante la replicación viral se produce un conjunto anidado de transcriptos coterminales al extremo 3' del RNA genómico, y el más abundante el es de 2,4 kb, que puede ser detectado a las 2 horas posinfección. Este transcripto codifica para la proteína mayor de la cápside y es coterminal con el extremo 3' del genoma. Este mRNA subgenómico está presente en exceso en comparación con el RNA genómico, de manera que en forma simultánea co-

existen dos RNA poliadenilados, el RNA genómico de polaridad positiva y el RNA subgenómico de 2,3-2,5 kb.

Solamente los miembros del género *Vesivirus* pueden replicar en líneas celulares. Tanto FCV como VESV crecen fácil y rápidamente en líneas celulares derivadas de felino o porcino, respectivamente, o en células Vero (VESV). Entre 5-8 horas posinfección, se puede evidenciar un claro efecto citopático (ECP) caracterizado por redondeamiento celular en células CRFK infectadas con FCV.

En la tabla 73-1 se citan algunas características producidas in vivo e in vitro por calicivirus veterinarios

PATOGENESIS

La patogénesis de los distintos géneros de esta familia es compleja y no se puede generalizar. Por esa razón se dará a conocer al describir las características fundamentales de las enfermedades producidas por estos virus.

RESPUESTA INMUNE

Las características generales de esta respuesta se tratarán al describir los virus de mayor importancia en veterinaria. Como en toda infección viral, se induce la formación de anticuerpos y linfocitos T citotóxicos.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

El aislamiento en cultivos celulares sólo puede realizarse en los miembros del género *Vesivirus*, en líneas celulares CRFK para FCV o PK15 o Vero para VESV. Para aquellos no cultivables, se han descrito técnicas de inmunohistoquímica, microscopia electrónica, PCR o hemaglutinación. La detección de anticuerpos puede realizarse por técnicas de ELISA e inhibición de la hemaglutinación.

Exantema vesicular suino

Se cree que su origen fue la alimentación de cerdos con carcasas de lobos marinos afectados en las costas de California. Actualmente está erradicada en todo el mundo. El período de incubación es de 12-48 horas y posteriormente los animales presentan fiebre, anorexia y aparecen vesículas primarias en los epitelios de trompa, narices y lengua de hasta 3 cm de diámetro. Estas vesículas llenas de fluido rico en virus se rompen fácilmente, provocando úlceras dolorosas y la formación de seudomembranas con posterioridad. Las vesículas secundarias aparecen 24 horas más tarde en la zona de pies, espacio interdigital y banda coronaria y en glándula mamaria, que luego pueden contaminarse con bacterias en forma secundaria. Una vez establecida en el rebaño, la transmisión se produce en forma horizontal de cerdo a cerdo por ruptura de vesículas (contacto directo) o a través de fomites. Debido a que los signos presentes son prácticamente indistinguibles de la aftosa, la estomatitis vesicular y la enfermedad vesicular del cerdo, es muy importante realizar el diagnóstico diferencial en el laboratorio, ya que a campo es muy difícil de llevar a cabo.

En nuestro país es una enfermedad exótica, sin embargo se tiene muy en cuenta cuando se trata de realizar un diagnóstico diferencial con otras enfermedades vesiculares, sobre todo considerando la localización de las vesículas.

Se recomienda el sacrificio de los animales infectados y una correcta vigilancia para impedir la reemergencia.

Calicivirus felino

Afecta únicamente a los miembros de la familia Felidae y está distribuida en todo el mundo y en todas las razas. Junto con el herpes felino 1 son responsables del 90% de la enfermedad respiratoria superior felina. El período de incubación es más prolongado (7 días) y puede ser de aparición subclínica, aguda o crónica. La forma aguda afecta en general a gatitos de hasta 6 meses de edad, muy susceptibles debido a la pérdida de anticuerpos maternos. Se caracteriza por signos respiratorios superiores, rinitis y traqueítis, neumonía, ulceración en lengua, cavidad oral y morro, frecuentemente conjuntivitis y en ocasiones artritis, acompañados de fiebre, anorexia y depresión. La mortalidad en gatitos es de hasta un 30%.

Una gran proporción de gatos enfermos se transforman en portadores y diseminadores. La forma crónica afecta a individuos adultos que mantienen el virus en los criaderos ya que lo eliminan en forma permanente (portadores asintomáticos persistentemente infectados).

La transmisión es por contacto directo de animales enfermos a susceptibles a través de las secreciones nasales, orales y con-

Tabla 19-1. Algunas características in vivo e in vitro de calicivirus veterinarios

Género	Denominación	Cultivo	Características clínicas y epidemiológicas	Vacuna
Vesivirus	Exantema vesicular suino (VESV)	Sí	Enfermedad vesicular semejante a fiebre aftosa. Exótica.	No
Vesivirus	Calicivirus felino (FCV)	Sí	Enfermedad respiratoria grave, neumonía	Sí
Lagovirus	Enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV). Síndrome de la liebre parda europea (EBHSV).	No	Enfermedad epidémica fatal con hemorragias hepáticas en conejos y liebre europea. No existe protección cruzada. Exótica.	Sí

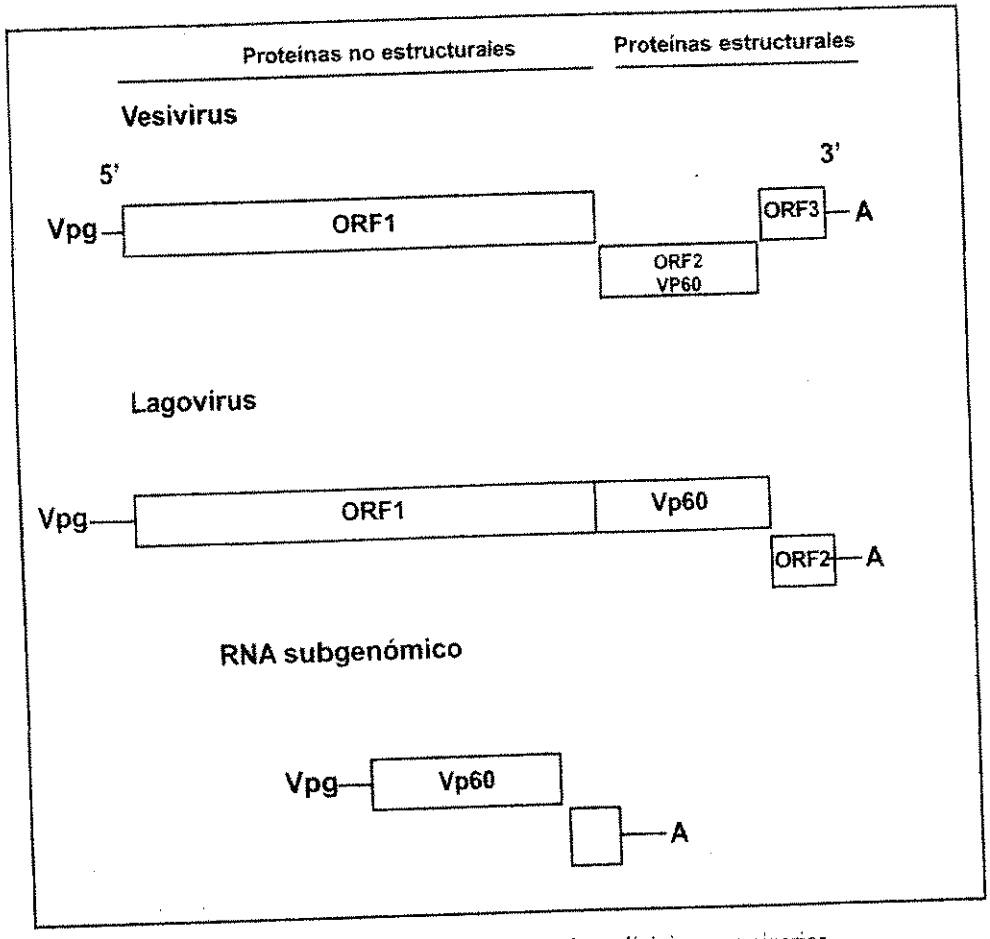


Figura 73-2. Organización genómica de los calicivirus veterinarios.

juntivales ricas en virus. También es importante considerar que la transmisión indirecta es probable debido a que el FCV es bastante resistente a la mayoría de los desinfectantes y puede sobrevivir fuera de su hospedador entre 8 y 10 días, y estar presente en las camas y utensilios del animal. La diseminación viral a través de secreciones puede prolongarse por lo menos 2 semanas posinfección. Como consecuencia de esto es una enfermedad casi endémica de los criaderos de gatos, donde se favorece su diseminación por superpoblación, poca ventilación, condiciones sanitarias y alimenticias inadecuadas, y situaciones de estrés (temperaturas extremas o la introducción de nuevos animales).

El diagnóstico presuntivo se realiza de acuerdo a la signología clínica, conjuntamente con factores anteriormente descritos. El diagnóstico definitivo mediante aislamiento viral a partir de secreciones o la inmunofluorescencia no se realiza de rutina. El diagnóstico serológico no diferencia animales vacunados de infectados en forma natural.

Por lo general se utilizan vacunas a virus inactivado o atenuado combinadas con el virus de la panleucopenia, que reducen la incidencia de la enfermedad clínica, pero no eliminan el estado de portador crónico del animal naturalmente infectado. Se recomiendan 2 vacunaciones comenzando a las 8-10 semanas de vida con un intervalo de 4 semanas. También se aconseja una revacunación anual.

Enfermedad hemorrágica del conejo

Fue reconocida por primera vez en conejos de China en 1984. Su presencia ha sido descrita en China, Europa, Africa, Corea, Nueva Zelanda y México. El curso de esta enfermedad es abrupto, ya que en pocos días elimina poblaciones enteras, pero sólo afecta a conejos mayores de 3 meses. El síndrome de la liebre parda europea (EBHSV) fue reconocido en Dinamarca en 1982, infecta liebres y es un virus muy similar al RHDV relacionado antigénicamente.

El período de incubación es de 24-48 horas. Luego de un aumento de temperatura (viremia), llega al hígado (órgano primario de replicación) y se produce la necrosis hemorrágica en hígado y pulmón por coagulación intravascular diseminada mediada por complejos inmunes. También se presentan hemorragias en tráquea, timo e infartos en riñón y bazo. Existe una forma hiperaguda en donde los animales mueren súbitamente luego de un período de 6-24 horas de depresión y fiebre que generalmente ocurre en poblaciones susceptibles en un área libre de la enfermedad. Tanto en la forma aguda (prevalente en áreas epidémicas) y subaguda hay descargas serosanguinolentas nasales y signos clínicos nerviosos como excitación, incoordinación, opistótonos y pedaleo. La temperatura puede alcanzar los 41 °C. La mortalidad alcanza el 90%. Los animales presentan hepatomegalia y hepatitis necrótica. Produce además apoptosis de hepatocitos y de macrófagos de pulmón, hígado, bazo, ganglios linfáticos y células tubulares del riñón al igual que en EBHSV.

Existe transmisión fecal-oral, a través de fomites y por las carcasas de conejos infectados (contacto directo e indirecto). De acuerdo a investigaciones recientes, la RHDV se ha afianzado en poblaciones de conejos salvajes de Europa Occidental, Australia y Nueva Zelanda que ponen de manifiesto un mismo patrón epidemiológico para estas zonas. Parecería que las epizootias más

devastadoras se registran en jóvenes subadultos que han perdido los anticuerpos maternos.

El diagnóstico presuntivo se puede llevar a cabo en la clínica ante la aparición de muerte súbita, asociada a la presentación previa de letargo y fiebre. Es un virus que aún no ha podido ser cultivado, y tampoco existe un animal de laboratorio susceptible a la infección a excepción del conejo. Uno de los métodos directos de identificación del agente consiste en concentrar homogenados de hígados y observarlos al microscopio electrónico. Una de las propiedades de estos virus es aglutinar glóbulos rojos del grupo 0 humanos o de cobayos, por lo tanto se puede detectar su actividad hemaglutinante o aplicar técnicas de detección de ácidos nucleicos (RT-PCR). Los anticuerpos pueden detectarse por inhibición de la hemaglutinación o ELISA.

Existen algunas vacunas pero como medida preventiva se recomienda un buen manejo de colonias cerradas y la esterilización del alimento tipo *pellet*. La vacunación se realiza en zonas endémicas, generalmente con vacunas inactivadas preparadas de extractos de hígados. Los anticuerpos aparecen a los 5-10 días de la vacunación y se recomienda la revacunación cada 6 meses.

Un gran problema a tener en cuenta es que el virus sobrevive en carne congelada y hasta 9 meses a 4 °C. De allí la necesidad de realizar buenos controles en la importación de carcasas.

BIBLIOGRAFIA

Bishop R. Enteric viruses. In Encyclopedy of Virology, 373.378. Webster R and Granoff A. Academic Press, 1994

Caliciviridae. International Commitee on taxonomy of viruses. ICTV, 2002. *www.ictvdb.iacr.ac.uk.*

Clarke IN, Lambden PR The molecular biology of caliciviruses. J Gen Virol. 1997; 78: 291-301.

Kreutz L, Seal BS. The pathway of feline calicivirus entry. Virus Research 35: 63-70, 1995.

OIE Manual of Standards Diagnostic test and vaccines. Part 2 Section 2.8 Chapter 2.8.3. Rabbit Hemorrhagic disease. 2000.

Seal BS, Neill JD, Ridpath JF. Predicted stem-loop structures and variation in nucleotide sequence of 3' noncoding regions among animal calicivirus genomes. Virus genes 8, 3: 243-247, 1994

Sosnovtsev SV, Prikhod'ko EA, Belliot G, Cohen JI, Green KY. Feline calicivirus replication induces apoptosis in cultured cells. Virus Research 2003; 94 (1): 1-10.

Studdert M. Vesicular exantema. In Encyclopedia of Virology, 1544-1547.

Thiel HJ, König M. Caliciviruses: an overview. Vet Microbiol. 69: 55-62, 1999.

Thumfart JO, Meyers G. Feline calicivirus: recovery of wild-type and recombinant viruses after transfection of CRNA or cDNA constructs. J virol. 2002; 76 (12): 6398-6407

Webster R and Granoff A. Academic Press, 1994.

Capítulo 74

FLAVIVIRUS

Alejandro Rafael Valera

CARACTERISTICAS DE LA FAMILIA VIRAL

La familia Flaviviridae (*Flavus* = del latín, amarillo) está integrada por virus que infectan artrópodos y vertebrados. El genoma es RNA de cadena simple y polaridad positiva (9000 a 12500 nucleótidos), rodeado por una nucleocápside proteica de 25-30 nm de diámetro y simetría poliédrica. Las partículas virales son envueltas y con pequeñas proyecciones pleomórficas o esféricas, con un diámetro entre 40-60 nm. En esta envoltura se encuentra una glicoproteína que es la responsable de la generación de anticuerpos neutralizantes. Se replican en el citoplasma, madurando en vesículas citoplasmáticas que se liberan por lisis. Producen cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos.

Propiedades fisicoquímicas

Debido a la presencia de lipoproteínas en su envoltura, el virus se inactiva rápidamente tanto con solventes orgánicos, como cloroformo y éter, como con detergentes (Nonidet P-40, desoxicolato y saponina). También es sensible a la acción de radiaciones ultravioletas y a pH extremos de 3 y 11. La infectividad se destruye fácilmente sometiendo al virus a temperaturas de 60 °C durante un mínimo de 10 minutos. Presenta una densidad de 1,1 y 1,23 g/cm^3 en sacarosa y un coeficiente de sedimentación de entre 140 y 200 *S*.

CLASIFICACION

Género *Flavivirus*:	Fiebre amarilla (hombre). Dengue (hombre). Louping ill (ovino).
Género *Pestivirus*:	Virus de la peste porcina clásica (porcino/PPC). Diarrea viral bovina (VDVB)-Enfermedad de las mucosas (bovino/ EM). Enfermedad de la frontera (*border disease*) (ovino/EF).
Género *Hepacivirus*:	Hepatitis C (hombre).

Dentro de la familia Flaviviridae el género *Pestivirus* es el que comprende un grupo de patógenos animales económicamente muy importante, causantes de las enfermedades de mayor impacto en la industria ganadera mundial. Es por ello que se adoptará este género como modelo descriptivo.

REPLICACION VIRAL

El genero *Pestivirus* presenta un especial tropismo por células mitóticamente activas como linfocitos, fagocitos mononucleares y células epiteliales. La replicación comienza con la adhesión y penetración en la célula hospedadora. El receptor específico de la célula es una glicoproteína de superficie, mediante la cual el virus ingresa por endocitosis. Luego se produce el desnudamiento de la nucleocápside y la liberación del genoma en el citosol. El RNA viral es traducido en el ribosoma a una poliproteína, que es clivada por enzimas de origen viral en polipéptidos que constituyen las proteínas estructurales y no estructurales. El ensamblaje tiene lugar tanto en el aparato de Golgi como en el retículo endoplásmico donde los viriones adquieren su envoltura lipídica. Cada célula infectada libera entre 100 a 1000 viriones que alcanzan el medio extracelular mediante exocitosis; al cabo de 3 horas posinfección (p.i.) pueden detectarse polipéptidos víricos en las células infectadas alcanzando un máximo a las 12 a 14 horas p.i.

PATOGENESIS

Los *Pestivirus* infectan naturalmente sólo a los ungulados del Orden *Artiodáctila* como los porcinos, bovinos, ovinos, caprinos, alpacas, llamas, camellos, búfalos de agua y rumiantes silvestres. Estas consideraciones deben tomarse en cuenta a la hora de implementar un programa de control.

El virus de la VDVB-EM posee una alta variabilidad. Puede clasificarse en dos genotipos. El genotipo 1 incluye virus que causan formas agudas a leves, infecciones persistentes y EM, y el genotipo 2 incluye a virus de casos agudos hemorrágicosy graves.

Además existen dos tipos de cepas virales según su comportamiento frente a los cultivos celulares: "cepas citopáticas" (CP) y "cepas no citopáticas" (NCP): mientras las primeras producen vacuolización citoplasmática y muerte celular dentro de 24 a 48 horas de inoculación, las cepas no citopáticas provocan redondeamiento y desprendimiento de células después de 1 semana de ser inoculado. Ambas cepas están presentes en el genotipo 1 mientras que la cepa no citopática actúa en el genotipo 2.

Los *Pestivirus* penetran por ingestión, inhalación, piel o semen y se replican en amígdalas (infección oral o nasal) o en los ganglios linfáticos regionales (vagina, piel). Tras una primera fase de replicación, el virus pasa a la sangre produciendo viremia (12 a 20 horas p.i. hasta varias semanas). Tras esta fase, el virus se localiza en los órganos blanco (bazo, ganglios, riñón, pulmón, médula ósea) donde se producen nuevas replicaciones víricas y las lesiones características. Son capaces de atravesar la placenta y de infectar al feto. La placenta de los rumiantes y cerdos no permite el pasaje de anticuerpos entre la madre y el feto. El momento de la gestación en el que ocurre la infección intrauterina determinará el futuro del feto. Esta infección intrauterina puede conducir al aborto, muerte perinatal, malformaciones fetales y el desarrollo de animales en apariencia sanos. Estos últimos pueden ser infectados al final de la preñez y desarrollar una respuesta inmune efectiva contra el virus infectante. Es de particular importancia la capacidad de algunas variantes del virus (no citopáticas) de establecer una infección persistente en los fetos que aún no son inmunocompetentes. Estos animales adquieren una inmunotolerancia al virus y son virémicos

persistentes por el resto de sus días (persistentemente infectado o PI). En los rumiantes las infecciones persistentes pueden permanecer inaparentes clínicamente, mientras que los cerdos infectados persistentemente enferman y mueren luego de algunos meses de nacidos. Los animales persistentemente infectados son eliminadores de virus y son los de mayor importancia en la epidemiología de las enfermedades producidas por *Pestivirus*.

La infección posnatal en los rumiantes con VDVB y EF son consideradas inocuas. Una excepción es el síndrome hemorrágico en bovinos producido por VDVB-2. La infección en cerdos con el virus de la PPC es considerada como una enfermedad aguda y en ocasiones con altos índices de mortandad.

En la PPC, la eliminación del virus en animales infectados puede comenzar a partir del segundo día p.i. por saliva, secreciones oculares, nasales y aire. Después de unos días, el virus se puede eliminar también por orina, heces y semen. Es importante destacar la transmisión de madres portadoras inaparentes a sus lechones o a otros animales adultos susceptibles.

RESPUESTA INMUNE

El virus de la PPC se encuentra estrechamente relacionado, tanto antigénica como genéticamente, con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) y el de la enfermedad de la frontera (EF). Estos dos virus son primariamente patógenos para los rumiantes, aunque el VDVB puede también infectar el ganado porcino causando, en algunas ocasiones, infecciones con cuadro clínico y lesiones similares a la PPC.

El VDVB provoca una infección autolimitada y transitoria en terneros normales que suele dar lugar a una fase de inmunodepresión. La respuesta inmune es dirigida contra todas las proteínas estructurales o no estructurales del virus. El VDVB induce ambos tipos de respuesta, tanto de células B como de células T. El virus parece ser capaz de multiplicarse en todas las subpoblaciones de linfocitos y células del aparato inmune. La respuesta inmune mediada por las inmunoglobulinas resulta un importante mediador frente a la infección viral.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Debido al amplio tipo y gravedad de las lesiones inespecíficas, en ocasiones sólo evidenciadas por microscopia, el diagnóstico se basa en el aislamiento del virus o la detección del antígeno viral específico y de anticuerpos séricos, los que podrán ser detectados a partir de los 10 días p.i. El objetivo principal del diagnóstico es la detección y remoción de ganado afectado. Estudios epidemiológicos han permitido desarrollar diferentes métodos serológicos para la detección de rebaños con infección activa. El análisis serológico de una muestra de sangre tomada al azar de terneros de 6 a 12 meses de edad permite distinguir rebaños con infección activa, con un alto grado de seguridad. Se pueden cometer errores de clasificación cuando los rebaños poseen animales PI muy jóvenes, o si se toma la muestra de animales menores de 6 meses de edad, los cuales tendrán anticuerpos calostrales. Estos problemas se solucionan repitiendo el examen unos meses después.

Muestras a remitir al laboratorio

Con el fin de poder realizar un diagnóstico adecuado es muy importante que la elección de la muestra sea apropiada así como que llegue en buen estado al laboratorio.

Las muestras a enviar son: sangre con y sin anticoagulante en muestreo pareado, tonsilas, ganglio mesentérico y faríngeo, pulmón, bazo, íleon distal, riñón y materia fecal.

Las muestras deben llegar a su destino de la forma más rápida y segura posible y en ningún caso deben mantenerse a temperatura ambiente por largo tiempo.

Una vez recogidas del animal objeto de estudio, deben ser identificadas de forma inequívoca y estable (etiquetas adhesivas) y mantenidas a 4 °C. Se debe utilizar un frasco para cada animal y siempre deben quedar cerrados herméticamente.

Si el análisis se va a efectuar en menos de 72 horas, no es necesario congelar las muestras y siempre es mejor mantenerlas a 4 °C. Si el análisis se va a realizar después de las 72 horas, es mejor congelarlas a -40 °C y transportarlas en congelación.

Detección del virus o componentes virales

Una vez identificados los rebaños con infección activa, se debe evaluar individualmente a los animales para detectar a los afectados.

Aislamiento viral

El aislamiento viral es el método de referencia, es 100% específico y altamente sensible. Sin embargo, resulta costoso para ser usado en el diagnóstico de animales en un programa de control y erradicación. El cultivo celular se ha optimizado, donde células cultivadas en placas con múltiples pocillos son inoculadas con 10 a 50 µl de muestras problema e incubadas; la presencia de biotipos no citopáticos se detecta con el empleo de anticuerpos anti-VDVB marcados con peroxidasa o fluorocromos.

La replicación del virus de PPC en las diferentes líneas celulares no produce efecto citopático, con la excepción de un muy reducido número de cepas citopatogénicas, por lo que para su detección deben ser utilizados anticuerpos anti-PPC conjugados.

Detección de antígenos mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

La prueba de ELISA utiliza anticuerpos monoclonales o policlonales para "capturar "antígenos del virus en muestras de sangre. Comparado con el aislamiento viral, es un método rápido y económico, por lo tanto es el de preferencia para la detección a gran escala.

Virus neutralización (VN)

Las pruebas de ELISA y VN son las más comúnmente usadas para la detección de anticuerpos. Para realizar un diagnóstico adecuado se debe efectuar la prueba con muestras pareadas de suero, de intervalo no menor de 3 a 4 semanas entre ellas. Un título mayor a dos diluciones entre la primera y la segunda será considerado como respuesta de una fase aguda de la enfermedad.

Detección de antígenos mediante inmunohistoquímica (IHQ)

Es el método diagnóstico más conveniente para la detección del VDVB en fetos. La presencia del antígeno del VDVB en queratinocitos de la epidermis y células epiteliales de folículos pilosos de bovinos PI clínicamente normales, ha originado el desarrollo de la técnica inmunohistoquímica en biopsias de piel para el diagnóstico de estos animales.

Detección del ácido nucleico viral

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método rápido, sensible, que detecta diversos virus y permite investigar

un gran número de muestras en corto tiempo. Su sensibilidad permite detectar el virus en distintos tipos de muestras.

ENFERMEDADES DE MAYOR IMPORTANCIA EN VETERINARIA

Diarrea viral bovina (VDVB)- Enfermedad de las mucosas (EM)

La característica de este virus es su variabilidad genética y antigénica, debido a la falta de una exonucleasa eficiente para corregir las bases mal incorporadas durante la replicación. El VDVB usa esta estrategia para sobrevivir, originando cepas mutantes que "escapan" a la respuesta inmunológica del hospedador. El cruce de especies crea otra oportunidad para la diversificación, ya sea por adaptación al nuevo hospedador o por evolución divergente. Sin embargo, el VDVB aislado de cerdos y ovejas tienen características biológicas y antigénicas similares a los aislados del bovino.

La cepa no citopática es el biotipo predominante en la naturaleza aislado de la mayoría de las formas clínicas y el único capaz de originar infección persistente. La cepa citopática se aísla únicamente de animales con enfermedad de las mucosas y se origina por cambio a nivel del RNA a partir del biotipo no citopático: (inserción de fragmentos de RNA celular o duplicación y reordenamiento del RNA viral).

EPIDEMIOLOGIA

Esta enfermedad tiene una distribución mundial y la infección tiende a ser endémica en la mayoría de las poblaciones bovinas.

En los diferentes países la prevalencia alcanza niveles de 0,5 a 2% de bovinos PI y 60 a 80% de bovinos seropositivos. La situación en Argentina es similar al resto del mundo, variando en las distintas regiones del país entre el 25 y 90% de prevalencia serológica, dependiendo de la geografía y el tipo de explotación ganadera.

La principal fuente de infección y reservorio del virus en la naturaleza son los bovinos PI. Ellos eliminan en forma continua durante toda su vida grandes cantidades del virus en secreción nasal, saliva, orina, materia fecal, lágrimas, semen y leche. Los animales con infección aguda también son fuente de infección, ya que diseminan el virus en cantidades más bajas y por cortos períodos.

La transmisión puede ser vertical u horizontal, por contacto directo o indirecto.

Transmisión vertical

La infección transplacentaria ocurre en hembras susceptibles infectadas durante la preñez. Si el feto es infectado por biotipos NCP antes de adquirir competencia inmunológica (antes del día 125 de gestación, aproximadamente) desarrollará una infección persistente. Pese a la elevada tasa de mortalidad de los animales PI en su primer año de vida (más de 50%), muchos alcanzan la madurez sexual y se reproducen. Hembras PI siempre dan terneros PI. La transmisión vertical también ocurre luego de la transferencia embrionaria si el receptor es PI, o la vaca donante es PI.

Transmisión horizontal

El contacto directo con animales PI, especialmente contacto nariz-nariz, es el modo más eficiente de transmisión en condiciones naturales. El contacto directo con animales que cursan una infección aguda también puede transmitir el virus. Se ha demostrado experimentalmente la transmisión por vía aérea a corta distancia entre bovinos PI.

MANIFESTACIONES CLINICAS

El VDVB es responsable de originar un amplio rango de manifestaciones clínicas y lesiones como resultado de la interacción de factores tales como: cepa y biotipo viral, edad y estado inmune del hospedador, respuesta inmune inducida, factores estresantes y otros patógenos concurrentes.

Diarrea viral bovina aguda. Es una infección posnatal aguda, de gravedad variable, en bovinos seronegativos e inmunocompetentes.

Infección subclínica. La mayoría de las infecciones son subclínicas o de carácter moderado, con fiebre, descarga oculonasal, leucopenia transitoria, elevada morbilidad y baja mortalidad. Se desarrollan anticuerpos neutralizantes 14 a 28 días posinfección y consecuentemente la protección contra reinfecciones por cepas homólogas del virus es de por vida.

Complejo diarrea neonatal bovina. Cuando fracasa la transferencia pasiva de anticuerpos, el virus participa en el complejo diarrea neonatal de los terneros.

Infección aguda pronunciada. Inicialmente se prestaba poco interés a las infecciones agudas, dada su baja mortalidad. Sin embargo, cada vez son más frecuentes los informes de infección aguda pronunciada de elevada morbilidad y mortalidad, asociada con virus de alta patogenicidad, caracterizada por fiebre elevada, signos respiratorios, diarrea, tormenta de abortos, caída en la producción de leche y muerte súbita.

Síndrome hemorrágico. Producido por el virus del genotipo 2 del VDVB. Se caracteriza por mucosas anémicas con hemorragias petequiales y equimóticas, hipertermia, hemorragia en múltiples sistemas orgánicos, diarrea sanguinolenta, epistaxis, anemia, leucopenia, trombocitopenia y muerte. Esta signología se atribuye a trombocitopenia y alteración de la función plaquetaria.
El VDVB ocasiona leucopenia y altera las funciones de los leucocitos, aumentando la patogenicidad de microorganismos coinfectantes. Tiene una fuerte afinidad por el tejido linforreticular, ocasionando necrosis y atrofia de dicho tejido.

Enfermedades respiratorias. El VDVB origina inmunodepresión sistémica y pulmonar, aumentando la patogenicidad de los restantes agentes respiratorios.

Trastornos reproductivos. El mayor impacto económico de la infección con el VDVB es el ocasionado por los trastornos reproductivos.
El VDVB durante la preñez se divide en cuatro períodos en base a las manifestaciones clínicas de la infección durante intervalos de tiempo específicos:

Etapa embrionaria (0-45 días): la infección de hembras susceptibles próximas al momento del apareamiento ocasiona muerte embrionaria y repetición de servicio hasta que desarrollen respuesta inmune. El virus no tiene efecto sobre el crecimiento y desarrollo de los embriones hasta el día 8-9, momento en que pierden la zona pelúcida y se vuelven susceptibles.

Día 45 a 125 de gestación: este culmina cuando el feto adquiere competencia inmunológica al VDVB. La infec-

ción con biotipos no citopáticos resulta principalmente en el nacimiento de animales PI e inmunotolerantes.

Día 125 a 175 de gestación: comienza la inmunocompetencia fetal y el estado de organogénesis; se pueden producir abortos y se pueden observar distintos tipos y grados de malformaciones.

175 días de gestación en adelante: las infecciones en este período resultan en el nacimiento de terneros seropositivos normales o débiles mientras que los abortos son ocasionales.

Infección persistente. Se define a un animal como persistentemente infectado a aquél en el que es posible aislar el virus de la sangre o los tejidos en dos ocasiones sucesivas con un intervalo no menor a 2 semanas. Estos animales son virémicos durante toda su vida y no producen anticuerpos contra la cepa que les originó inmunotolerancia.

Enfermedad de las mucosas. Esta condición sólo ocurre en animales PI que sufren sobreinfección con biotipos citopáticos homólogos. En esta forma se aíslan ambos biotipos, que son antigénicamente similares. El biotipo citopático surge de mutaciones del biotipo no citopático, aunque no se descartan fuentes externas. Es una forma esporádica, fatal, de curso agudo, y se caracteriza por una leucopenia grave, diarrea profusa, erosiones y ulceraciones en el sistema digestivo.

CONTROL Y PREVENCION

La erradicación de la diarrea viral bovina a nivel de rebaño es posible y, manteniendo el rebaño cerrado, mejora sustancialmente su salud y productividad. Las estrategias de erradicación dependen de la seroprevalencia, el uso de vacunas, la densidad poblacional y las prácticas de manejo.

Erradicación sin vacunación. En regiones donde la seroprevalencia y la densidad poblacional son bajas y no se emplean vacunas, la erradicación se basa en: 1) identificación de los rebaños con infección activa; 2) eliminación de animales PI del rebaño, y 3) medidas de bioseguridad o mantener rebaños cerrados para evitar la infección de hatos libres.

Erradicación con vacunación. En poblaciones bovinas con alta prevalencia de la enfermedad, donde no es posible mantener un rebaño cerrado o con estrictas medidas de bioseguridad, las estrategias de control deben incluir: 1) identificación de rebaños con infección activa; 2) eliminación de animales PI, y 3) programa de vacunación en vacas y vaquillonas. La vacunación por sí sola no elimina el virus del rebaño y su finalidad es proveer protección contra infecciones transplacentarias que den origen a terneros PI.

Vacunas

Una complicación para el desarrollo de las vacunas contra el VDVB es la diversidad antigénica. La tendencia es identificar la mayor cantidad de variantes antigénicas e incluirlas en la vacuna.

Vacuna a virus vivo modificado

La vacuna a virus vivo modificado contra VDVB está asociada a una gran variedad de efectos adversos, tales como la inducción de la enfermedad de las mucosas (EM), infección fetal e inmunosupresión.

Las vacunas a virus vivo modificado (MLV) usualmente contiene un solo biotipo de VDVB citopatogénico.

Vacuna inactivada

Las ventajas del uso de este tipo de vacunas es que resultan más seguras que las MLV; sin embargo, las desventajas de este tipo de vacuna inactivada se relacionan con la necesidad de usar 2 dosis de vacuna y esto, a su vez, retrasa el tiempo necesario para que se establezca una inmunidad protectora. Al mismo tiempo, la duración de la inmunidad inducida es corta.

En la Argentina este es el único tipo de vacuna autorizado por el organismo de control sanitario.

Peste porcina clásica

La peste porcina clásica (PPC) es una de las principales enfermedades víricas que afecta al ganado porcino, tanto doméstico como salvaje. Se caracteriza por lesiones de carácter hemorrágico y de curso generalmente fatal en las formas agudas.

PATOGENESIS

El único hospedador susceptible al virus de la PPC es el cerdo, tanto doméstico como silvestre, aunque el virus es capaz de replicarse en otras especies como rumiantes domésticos, venados y animales de experimentación, provocando una reacción febril, prácticamente asintomática. Entre ellas, el conejo es la más importante, ya que dio lugar a la obtención de las clásicas cepas vacunales atenuadas, utilizadas en Europa en la década de 1970 e inicios de 1980 para el control y erradicación de la enfermedad.

La importancia económica del VPPC es que se mantiene infeccioso en la carne cruda por largos períodos de tiempo que van desde los 27 días en el tocino a los 1500 días en la carne congelada. En los productos curados, el tiempo de inactivación del VPPC va de los 140 a los 250 días para el jamón.

CUADRO CLINICO

La PPC puede cursar con una enorme variedad de manifestaciones clínicas y anatomopatológicas dependiendo de la virulencia de la cepa, del estado inmunitario y de la edad del animal. Las lesiones características descritas para esta enfermedad se presentan solamente con cepas de alta virulencia en animales no inmunizados, y con más facilidad en lechones que en adultos. Pueden existir animales portadores asintomáticos de gran importancia en la eliminación del virus.

Forma clínica aguda

Se caracteriza por una alta morbilidad y la muerte de los animales de entre 10 y 20 días de edad. La mortalidad posterior dependerá de la virulencia de la cepa y del estado inmunitario del animal (vacunados o no) pudiendo variar entre un 30 a un 100%. Las primeras fases de la enfermedad se caracterizan por fiebre alta (42 °C), disminución del apetito y abatimiento general, leucopenia y trombocitopenia. Este cuadro inicial es seguido de temblores y hacinamiento, descargas conjuntivales e hiperemia cutánea que afecta, fundamentalmente, a orejas y bajo vientre. El animal, si camina, presenta un modo de andar ondulante con cruzamiento de las patas posteriores. La necropsia mostrará principalmente lesiones cianóticas y eritematosas en piel, úlceras en amígdalas, congestión hemorrágica y aumento de tamaño y congestión hemorrágica de ganglios linfáticos, infartos en la zona marginal del bazo y hemorragias de tamaño variable en la corteza renal, pudiendo aparecer también en la mucosa de la vejiga urinaria.

Forma subaguda

Se caracteriza por una situación clínica y anatomopatológica similar a la descrita anteriormente, pero con menor gravedad. En esta forma clínica, la mortalidad no suele superar el 30%.

Forma crónica

Se caracteriza por el hecho de que los animales sobreviven más de 30 días después de la infección, pudiendo degenerar en animales portadores. Se caracteriza por períodos intermitentes de fiebre con viremia, retrasos en el crecimiento, tos y diarreas intermitentes.

Forma transplacentaria y congénita persistente

Al igual que en otros *Pestivirus*, el VPPC también atraviesa fácilmente la placenta pudiendo producir lesiones transplacentarias sin que aparezca otro tipo de signos en el animal. Estas formas son características de infecciones por cepas de baja virulencia en animales gestantes o por cepas de alta o moderada virulencia en gestantes vacunadas. Los efectos que el VPPC produce sobre el feto varían según el tiempo de gestación en que fue infectado, la virulencia de la cepa y el estado inmunitario. En general, se puede observar muerte del embrión o feto, malformaciones fetales, lechones nacidos muertos o infección congénita persistente.

De todas estas formas, la infección congénita persistente es una de las más graves, pues no sólo representa un enorme trastorno económico sino sanitario, al aparecer animales eliminadores de virus de forma permanente y lechones de bajo crecimiento que también eliminan el virus.

DIAGNOSTICO

Como en otras enfermedades infecciosas, el diagnóstico de laboratorio en la PPC se puede establecer por la detección de virus o antígeno viral, aislamiento viral, inmunofluorescencia directa y ELISA de captura, detección de ácido nucleico, PCR y ELISA diferencial.

INMUNIZACION FRENTE AL VPPC

En la actualidad, las más utilizadas son las vacunas vivas atenuadas, conocidas como cepa "China" y cepa "Thiverval".

Cepa "China". Es una cepa lapinizada, denominada también como cepa "Suvac", "C" y "K". Su origen es desconocido y según varios autores podría tener cerca de 480 pasajes en conejo.

Cepa "Thiverval". Es una cepa de origen francés proveniente de una clonación viral sobre la línea celular PK 15.

Con ambas cepas se confiere inmunidad contra el VPPC de forma rápida, pudiendo los cerdos sobrevivir a una infección experimental incluso a los 5 días p.i. Recientemente, se ha desarrollado una vacuna de subunidades formada exclusivamente por la proteína gp 55 (E2) que induce inmunidad y protección contra el VPPC y permite, de este modo, diferenciar animales vacunados de infectados naturalmente.

Argentina es un país libre de peste porcina clásica (Resolución de abril de 2005) estando prohibida la vacunación.

Virus del Nilo Occidental

El virus del Nilo Occidental (*West Nile Virus*, WNV) pertenece a la familia Flaviviridae estando muy relacionado con el virus de la encefalitis de San Luis. Desde su aparición en Uganda en 1937, se ha diseminado por el mundo y, en los últimos años, ha emergido tanto en Europa como en Norteamérica (1999). El WNV resulta un peligro potencial para la salud pública y animal, ya que pueden infectarse muchas especies. El agente principal de la diseminación de la enfermedad es el mosquito, que lo transmite entre las aves y a los humanos, caballos y otros mamíferos. La mayoría de los mosquitos transmisores suelen ser del género *Culex*, que posee hábitos nocturnos, por lo que en zonas endémicas es aconsejable la prevención con repelentes. Los brotes de este virus suelen estar relacionados con las zonas de climas templados y húmedas, al final del verano o inicio del otoño coincidiendo con la llegada de aves migratorias y mosquitos ornitofílicos (*C. pipiens*).

Las aves suelen ser un factor de multiplicación muy importante por la viremia de alto título que suelen alcanzar, a pesar de no superar los 5 días.

La manifestación más importante de esta enfermedad es una encefalitis con resultados fatales, tanto en humanos como equinos, y mortandad de aves silvestres y domésticas. Los humanos se infectan por la picadura del mosquito y el virus no se transmite de persona a persona, ni por la manipulación de aves afectadas. Las manifestaciones en humanos son variadas, desde una fiebre leve, cefaleas o dolor muscular, y pueden estar acompañados por erupciones cutáneas. Las infecciones más graves pueden presentar fiebre alta, desorientación, coma, temblor muscular, convulsiones, parálisis y encefalitis que llevan en ocasiones a la muerte del paciente. En equinos, los signos clínicos pueden ser variados, desde muy leves a ninguno. Los más frecuentes suelen ser debilidad, ataxia, depresión, fiebre, temblores musculares y falta de apetito. En menor medida, algunos equinos manifiestan una debilidad muscular progresiva, llegando a la parálisis de los miembros locomotores, que culmina en la muerte luego de 3 a 9 días.

Actualmente, en Estados Unidos, existe una vacuna para equinos que requiere la aplicación de dos dosis con un intervalo de 3 a 6 semanas y un refuerzo anual. Los pacientes humanos son tratados de acuerdo a la sintomatología que presenten.

BIBLIOGRAFIA

Dubovi EJ. Impact of bovine viral diarrhea virus on reproductive performance in cattle. Food Anim Pract. 1994; 10: 503-514.

Howard CJ. Immunological responses to bovine virus diarrhea virus infections. Rev Sci Tech Off Int Epiz. 1990; 9 (1): 95-103.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/virus descripcion-00.026 Flaviviridae.

http://www.rlc.fao.org/prior/segalim/animal/ppc/peste_porcina/index.htm.

Jones LR. Estudios Evolutivos y moleculares en el género Pestivirus. Trabajo de tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Naturales, UNLP Facultad de Ciencias Naturales y Museo. 2002.

Kobrak A, Weber EL. Bovine diarrhea Virus: an update. Rev Arg Microbiol. 1997; 29: 47-61.

Komar N. West Nile Viral encephalitis. Rev Sci Tech Off Int Epiz; 2000, 19 (1): 166-176

Lértora WJ. Diarrea Viral Bovina: actualización. Rev Vet. 2003; 14 (1): 45-51.

Moenning V, Liees B. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. Food Anim Pract. 1995; 11: 477-487.

Nettleton PF, Entrican G. Ruminant Pestiviruses. Br Vet J. 1995; 151: 615-642.

Odeon AC, Leunda MR, Fernández Sainz IJ, Perez SE, Späth EJA. Serological survey of bovine pathogenesis the southeast of Buenos Aires Province, Argentina. 2000. World Buiatrics Congress. 10805.162,94 Punta del Este uruguay

OIE [http://www.oie.int/eng/maladies/fiches/A_A130.HTM]

RETROVIRUS

Ester Teresa González

INTRODUCCION

Los retrovirus (RV) comprenden una gran familia de virus con amplia distribución en la naturaleza. Se han encontrado en la mayoría de los vertebrados y hasta en invertebrados. Presentan una amplia variedad de interacciones entre el virus y el hospedador; desde infecciones completamente benignas, pasando por infecciones moderadas y llegando a virosis de fatales consecuencias como algunas inmunodeficiencias y enfermedades tumorales.

La propiedad más característica de este grupo de virus es la retrotranscripción, descubierta por Baltimore en 1970. Este proceso consiste en la síntesis de una molécula de DNA utilizando como patrón el RNA viral mediante la actividad de una enzima aportada por el virus denominada transcriptasa reversa.

Los RV más estudiados han sido los aviarios (virus sarcoma/leucosis aviaria, VSA/VLA) y los correspondientes virus murinos (VSM/VLM). Otros grupos bien estudiados son los RV humanos (virus de la inmunodeficiencia humana, VIH), equinos (virus de la anemia infecciosa equina, VAIE), felinos (virus de la inmunodeficiencia felina, VIF), bovinos (virus de la leucosis bovina y de la inmunodeficiencia bovina, VLB/VIB) y de primates (virus de la inmunodeficiencia en simios, VIS).

A pesar de diversas interacciones posibles con el hospedador, todos los aislamientos de RV son muy similares en la estructura del virión, organización genómica y modo de replicación.

CLASIFICACION

Históricamente los virus de esta familia han sido divididos en tipos en base a su morfología según las imágenes de tinción negativa obtenidas por microscopia electrónica:

Tipo A: partículas inmaduras carentes de envoltura e intracelulares.
Tipo B: partículas con envoltura, extracelulares, con core condensado y excéntrico. Envoltura con espículas prominentes.
Tipo C: son partículas de core central y con espículas apenas visibles en su envoltura.
Tipo D: partículas ligeramente más grandes y con espículas poco prominentes.

La familia Retroviridae comprende 7 géneros:

1. *Alpharetrovirus*
   Especie tipo: virus de la leucosis aviar (*avian leucosis virus*, ALV)
2. *Betaretrovirus*
   Especie tipo: virus del tumor mamario del ratón (*mouse mammary tumor virus*, MMTV))
3. *Gamaretrovirus*
   Especie tipo: virus de la leucemia murina (*murine leukemia virus*, MLV)
4. *Deltaretrovirus*
   Especie tipo: virus de la leucemia bovina (*bovine leukemia virus*, BLV).
5. *Epsilonretrovirus* (afectan a peces).
   Especie tipo: virus de la hiperplasia epidérmica en peces (*walleye epidermal hyperplasia virus*, WEHV).
6. *Lentivirus*
   Especie tipo: virus de la inmunodeficiencia humana (*human immunodeficiency virus*, HIV)
7. Espumavirus
   Especie tipo: virus espumoso de los monos (*simian foamy virus*, SFV)

ESTRUCTURA VIRAL

El virus, cuyo diámetro es de 80-100 nm, posee una nucleocápside icosaédrica, con envoltura, de la cual sobresalen proyecciones o espículas distribuidas uniformemente (fig. 75-1).

En los viriones el ácido nucleico representa el 2%, las proteínas el 60%, los lípidos el 35% y los carbohidratos el 3%.

El genoma es RNA, diploide, con una longitud de 7-10 kb y de sentido positivo. En el extremo 5′ se halla un "casquete" (Cap) y en el extremo 3′ tiene un poly-A.

Lo que distingue a los retrovirus de otros virus es la transcripción de su RNA en DNA doble cadena, que luego se une covalentemente al genoma del hospedador y se denomina "provirus". Desde que el DNA viral integrado (provirus) se convierte en un componente estable del cromosoma celular, se replica junto al DNA celular, determinando la síntesis de la progenie viral, utilizando la maquinaria metabólica celular.

El orden de los genes que codifican las proteínas estructurales es invariablemente: GAG-POL-ENV. En cada extremo del virus inte-

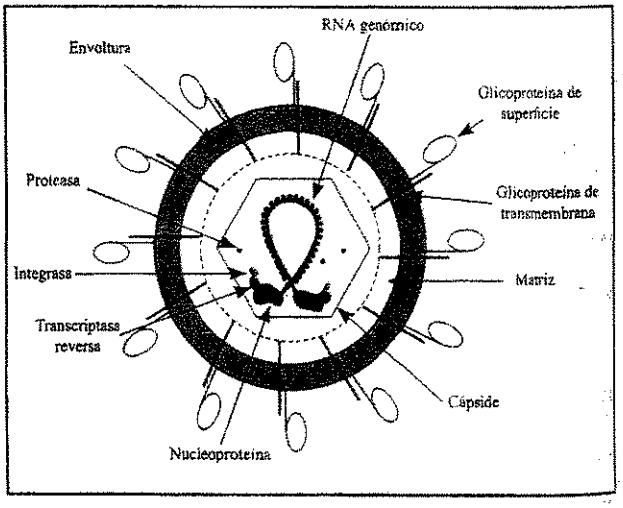


Figura 75-1. Estructura de los retrovirus.

grado (provirus) existen secuencias repetitivas conocidas como LTR (*long terminal repeat*). Estos extremos no codifican proteínas pero se encargan del inicio de la transcripción y cumplen una función regulatoria relacionada con el control de la expresión viral (fig. 75-2).

Mientras la multiplicación de muchos retrovirus sólo requiere de los genes mencionados (ALV, MLV), otros grupos de virus (lentivirus y espumavirus) codifican proteínas adicionales que juegan otros roles en la replicación, modificando la expresión de los genes virales y celulares. Estas proteínas se clasifican bajo la denominación de transactivadoras.

La superficie del virus está conformada por dos subunidades glicoproteicas de importante valor antigénico, cuya síntesis está codificada por el gen *env* (una glicoproteína de superficie y otra de transmembrana).

La nucleocápside o "core" incluye varias proteínas codificadas por el gen *gag*, entre ellas una proteasa, esencial para el clivaje de las proteínas durante la replicación y también dos proteínas que cumplen una función importante en la replicación y que son codificadas por el gen *pol*: 1) transcriptasa reversa, cuya actividad enzimática permite la transcripción del RNA viral de cadena simple a DNA doble cadena y 2) una integrasa, necesaria para unir covalentemente el DNA sintetizado al DNA cromosómico. Este segmento integrado se denomina "provirus" y actúa de molde para la síntesis de una nueva progenie viral.

REPLICACION

El ciclo de replicación retroviral y el proceso de infección, empiezan cuando el virus se une a receptores específicos de la célula hospedadora a través de la glicoproteína codificada por el gen *env* (fig. 75-3). La especificidad de esta interacción determina el tropismo y la patogénesis del virus, resultando luego en la fusión de la envoltura viral con la membrana celular. Los constituyentes del núcleo viral (nucleocápside) penetran en el citoplasma. En él, el RNA retroviral es transcripto a DNA y luego de sintetizarse el DNA complementario, esta doble cadena de DNA es transportada al núcleo, donde se incorpora al genoma de la célula hospedadora en forma estable (provirus). Una vez integrado dentro de los cromosomas de la célula hospedadora, la producción de RNA viral ocurre mediante el aparato transcripcional celular. Las proteínas codificadas por los genes *gag*, *pol* y *env* son sintetizadas a partir de la maquinaria de la célula hospedadora. El ensamble del RNA y las proteínas virales tiene lugar en el citoplasma celular. Finalmente y en un proceso conocido como gemación, la partícula viral abandona la célula rodeada de membrana plasmática de la célula hospedadora. El gen *env* contiene la información responsable de las proteínas de la envoltura del virus.

PATOGENESIS

Los RV pueden inducir una amplia gama de enfermedades malignas en los animales, incluyendo leucemia y linfomas en felinos, bovinos, aves y ratón silvestre.

Algunos son endógenos, es decir que son transmitidos de padres a hijos (virus de Gross y el de tumor de mama del ratón, MMTV) pero la mayoría son exógenos, de transmisión horizontal.

Los RV tumorales están asociados con la transformación celular, lo cual implica alteración en la morfología y replicación celular, cambios metabólicos y aberraciones cromosómicas. Esta capacidad transformante se relaciona en muchos casos con la presencia de "oncogenes". Estos "oncogenes" constituyen originalmente un segmento de la estructura genómica de las células en forma de "protooncogen". Los protooncogenes desempeñan funciones fisiológicas, algunas no definidas aún y otras asociadas al crecimiento celular. La interacción con los retrovirus puede activarlos, llevando a la sobreexpresión, mutación o deleción, induciendo de esta forma la transformación celular. Es por recombinación, transducción u otro mecanismo, que el retrovirus, al incorporarse en el genoma celular merced a la transcriptasa reversa, es capaz de incorporar el oncogen e iniciar su expresión como parte de la replicación viral. Ello ocurre en el genoma del virus de Rous y en otros virus aviares y de mamíferos que inducen leucemias/sarcomas.

En cambio, no se pudo encontrar un "oncogen" en el genoma del virus de la leucosis bovina (BLV, *bovine leukemia virus*) ni en el virus de la leucemia humana a células T (HTLV, *human T leukemia virus*) que inducen leucemias en el bovino y el hombre, respectivamente.

Los lentivirus, o retrovirus lentos, causan una serie de desórdenes en los animales. Son virosis de progreso lento e incluyen varias enfermedades neurológicas, musculoesqueléticas, hematológicas y respiratorias en mamíferos ungulados. Se caracterizan por su largo período de incubación y prolongada fase sistémica.

Los espumavirus, o virus espumosos, pueden inducir la formación de sincicios (células polinucleadas), dando lugar a infecciones persistentes en seres humanos, primates, bovinos, felinos y hámster. Sin embargo, la persistencia de la infección por espumavirus no está asociada a consecuencias patológicas evidentes.

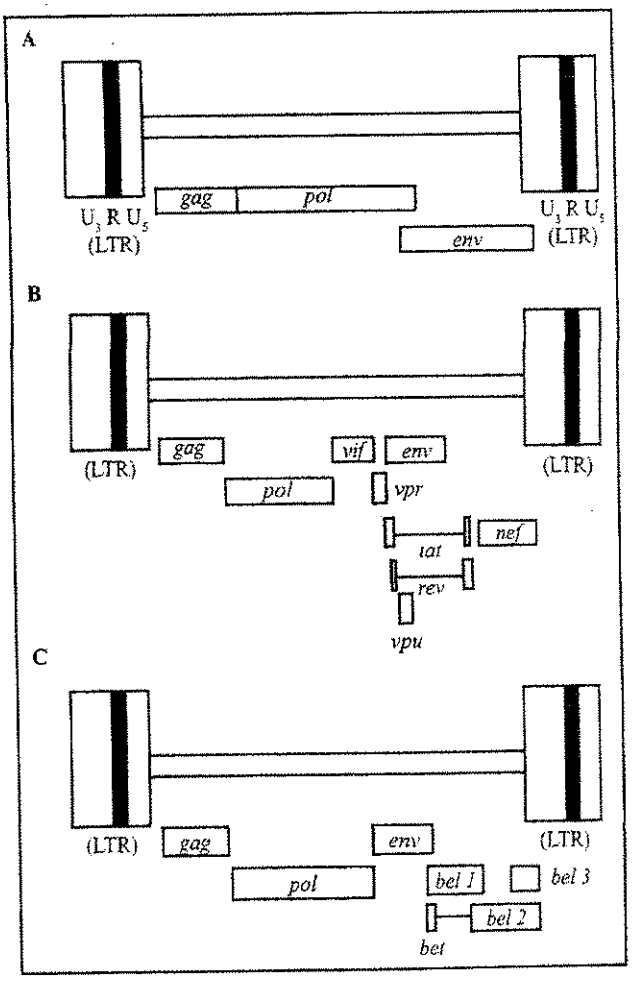


Figura 75-2. Genomas de retrovirus: a) genoma simple (leucemia murina), b) y c) genoma complejo (lentivirus y espumavirus). (Adaptado de Coffin JM, The retroviridae, 1992.)

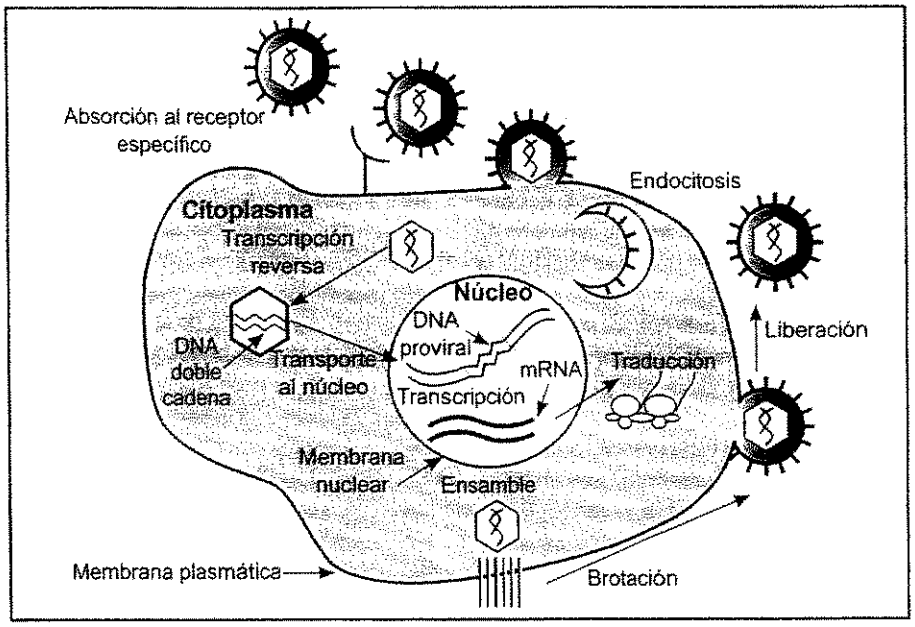


Figura 75-3. Retrovirus: esquema del ciclo replicativo en su célula hospedadora.

INMUNIDAD

Una característica común a muchos virus de esta familia, es que ni la respuesta celular ni la humoral son capaces de eliminar el agente patógeno de su hospedador natural.

En infecciones con lentivirus (inmunodeficiencias) se han propuesto diversos mecanismos en las estrategias de la defensa inmune del hospedador. La compleja patogénesis de estas virosis está influenciada en diverso grado por la respuesta inmune citotóxica (linfocitos citotóxicos contra proteínas codificadas por los genes *gag, pol* y *env*), como también por la mediada por anticuerpos, complemento, efecto citopático directo, una presentación antigénica defectuosa y por los fenómenos de apoptosis.

El virus de la artritis-encefalitis caprina (CAEV) produce anticuerpos contra todas las proteínas de la envoltura, pero estos anticuerpos neutralizan pobremente la capacidad infectante del virus, resultando en una débil protección frente al desafío con virus homólogo. Al contrario, tal desafío determinaría una patología aún más grave.

El virus de la leucemia bovina (BLV), un oncovirus exógeno, estimula la respuesta de anticuerpos para glicoproteínas de la envoltura y proteínas de la cápside, los cuales no impiden la diseminación de la infección a nuevas células del hospedador. También se ha demostrado la producción de anticuerpos citotóxicos dependientes de complemento.

ALGUNOS RETROVIRUS DE INTERES VETERINARIO

Virus de la leucosis aviar (VLA)

Comprende un conjunto de virus que fueron los primeros retrovirus estudiados, entre los cuales se puede mencionar el virus de sarcoma de Rous aislado en 1911. Todos los VLA están estrechamente relacionados entre sí y comparten considerable identidad genética y antigénica.

Se pueden clasificar en:

Virus endógenos: son virus defectuosos que carecen de genoma completo. Para su replicación requieren de virus que les proporcionen las secuencias genéticas de las que carecen. Integrados al genoma celular, no producen partículas virales completas ni virus infeccioso. No inducen problemas clínicos. Afectan a los pollos y por sus características antigénicas, morfológicas y la especie a la que afectan, se clasifican en el grupo E.

Virus exógenos: son generalmente infecciosos. Pueden inducir transformación oncogénica y producir alta mortalidad. Son vehiculizados en secreciones, excreciones y fluidos naturales (albúmina, sangre, saliva, heces, etc.). Afectan a aves productoras de huevos comerciales (grupo A y B), causando una elevada mortalidad.

Los grupos A y B, aun una misma cepa de virus, son capaces de inducir diversos tipos de tumores y presentaciones clínicas, dependiendo de las características genéticas de las aves infectadas, la edad, la cepa, la dosis, la vía de infección y el estado inmunológico.

Otro grupo (J) es aislado en pollos de carne y reproductores.

La transmisión de los virus de la leucosis aviar puede ser

A) *Vertical*
Genética: integrados al genoma de las células germinales.
Congénita: mediante la contaminación de la albúmina de huevo dentro del oviducto.

B) *Horizontal*: después del nacimiento por contacto directo o manipulación de las aves (corte de la cresta, vacunaciones, etc.). Es la forma de propagación más eficiente y rápida.

El diagnóstico de laboratorio puede realizarse mediante el aislamiento del virus en cultivo de fibroblasto de embrión de pollo. Este método permite diferenciar virus endógeno de exógeno ya que el primero no se replica.

El aislamiento se puede complementar a través de análisis serológicos como fijación del complemento (FC), virus neutralización (VN), ELISA, métodos de detección directa del provirus: PCR y también por estudios histopatológicos (diagnóstico diferencial entre leucosis linfoide y leucosis mieloide).

Virus de la anemia infecciosa equina (VAIE)

La anemia infecciosa equina (AIE) es una virosis distribuida en el mundo entero y que afecta solamente a la familia Equidae. Su prevalencia es mayor en zona cálidas con elevada presencia de insectos.

Luego de la exposición al VAIE, el curso de la enfermedad puede ser variable: aguda, crónica o inaparente.

El estado agudo se asocia a la exposición inicial al virus; los signos clínicos, incluyendo pirexia y hemorragia, son consecuencia de la rápida replicación del virus en los macrófagos y su destrucción directa o mediada por la respuesta inmune.

En la forma crónica, los episodios de pirexia, anemia, edema, pérdida de peso y depresión son intercalados con períodos de quiescencia. Cada episodio clínico se asocia a un incremento del título viral en sangre. Con el transcurrir del tiempo va declinando la frecuencia y gravedad de los episodios clínicos.

En la tercera forma de presentación, infección inaparente, los equinos son portadores de virus infeccioso de por vida.

La AIE difiere de otras enfermedades producidas por lentivirus en que los cambios patológicos no son progresivos, sino de naturaleza cíclica. Las lesiones degenerativas, asociadas a la replicación viral, se observan en caballos que mueren en la fase aguda, mientras que los cambios linfoproliferativos son patognomónicos de la fase crónica.

Una característica de los lentivirus y que se refleja también en el VAIE, es la variabilidad genética, definida como una población viral con genomas estrechamente relacionados, denominadas quasiespecies. Esto se reflejaría en regiones conservadas y variables de las proteínas codificadas por el gen *env*.

La existencia de quasiespecies estaría asociada a los ciclos recurrentes de la enfermedad en la forma crónica.

Como otro representante de los lentivirus, el VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), las células blanco primarias son los macrófagos/linfocitos y las variantes genéticas y antigénicas aparecen durante la infección persistente.

Estudios epidemiológicos sugieren que los equinos infectados constituyen el único reservorio para el VAIE.

La transmisión del VAIE implica la transferencia de sangre infecciosa, realizada por el hombre (agujas hipodérmicas contaminadas con sangre) o por insectos que lo transmiten en forma mecánica.

Como método diagnóstico se usa la prueba de doble inmunodifusión en agar (test de Coggins), un método sencillo y práctico que se utiliza en todo el mundo. El antígeno para esta prueba está constituido por la proteína P26 (PM: 26.000), codificada por el gen *gag*. Es la proteína mayor del core y representa alrededor del 30% de la masa proteica viral.

Virus de la leucosis bovina (VLB)

La leucosis enzoótica bovina es una enfermedad altamente contagiosa producida por un retrovirus exógeno emparentado con virus que producen leucemias en humanos y monos (HTLV-I, HTLV-II , STLV-1).

Es una enfermedad crónica y de evolución lenta. Sólo una pequeña proporción de bovinos infectados (2-5%) desarrollan el tumor, permaneciendo la mayoría asintomáticos. Una proporción de ellos (30-70%) y asociados a factores genéticos, pueden desarrollar una forma de enfermedad denominada linfocitosis persistente (LP), que se caracteriza por un incremento en el porcentaje de linfocitos circulantes.

El virus permanece integrado en el genoma de linfocitos B, pero también en otras células, tales como linfocitos T o células de la estirpe monocito/macrófago. La infección podría determinar una modificación en la síntesis de las citoquinas producidas por los linfocitos "T", como por ejemplo IL-2, lo que originaría la expansión de los linfocitos B o, lo que es lo mismo, la transición al estado de linfocitosis persistente.

Las células portadoras de provirus usualmente no producen partículas virales in vivo, estando reprimida su expresión a nivel transcripcional por un factor soluble del plasma que inhibe la expresión del genoma viral.

Todos los bovinos infectados desarrollan anticuerpos específicos, y antes de la ingesta de calostro y después de los 6 meses de edad, todos los animales no infectados son negativos en las pruebas serológicas.

Una vez establecida la infección, ésta no puede ser eliminada y los animales se mantienen como portadores de por vida.

La repercusión económica de esta enfermedad está asociada al costo de servicios veterinarios, remplazo de bovinos con tumores, reducción en la comercialización de semen y embriones, menor producción y limitación en la comercialización de animales seropositivos.

La sangre total de animales portadores es altamente infecciosa y pequeños volúmenes (1-5 µl) pueden transmitir la enfermedad. Por ello, el uso de agujas, instrumentos o guantes contaminados y los insectos hematófagos pueden transmitir la infección.

Las pruebas serológicas son los procedimientos más prácticos para el diagnóstico de infección. Las pruebas de doble inmunodifusión en agar (ID) y ELISA son ampliamente usadas en planes de control y erradicación. La PCR es un método más sensible y aplicable en casos en los que los análisis serológicos no son concluyentes.

Virus de la inmunodeficiencia felina (VIF)

El virus de la inmunodeficiencia felina es un retrovirus que pertenece al género lentivirus, muy semejante al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La distribución es mundial, variando su prevalencia en función de la localización geográfica, afectando a gatos domésticos y esporádicamente a felinos salvajes.

VIF se replica en linfocitos T (CD4+ y CD8+), linfocitos B, monocitos y macrófagos.

La infección con VIF produce tres tipos principales de alteraciones: enfermedades neoplásicas, síndromes de atrofia de la médula ósea e inmunodeficiencia.

Dentro de las alteraciones neoplásicas, el desarrollo de linfosarcoma digestivo es más frecuente en gatos viejos, siendo la forma tímica la más descrita en ejemplares jóvenes. Sin embargo, el linfosarcoma puede darse en otras muchas localizaciones: renal, ocular, cutánea, etc. También puede presentarse leucemia linfoidea, eritroleucemia y leucemia mielógena.

La atrofia de la médula ósea se manifiesta principalmente en forma de anemia, ya que el virus afecta a los precursores eritroides. Los gatos virémicos pueden sufrir anemia no regenerativa, trombocitopenia y anormalidades leucocitarias como granulocitopenia o linfopenia.

La inmunodeficiencia, causa de la mayoría de las muertes por infección con VIF, se produce porque el virus replica en las células del sistema inmune (disminución en los linfocitos T CD4+) lo que favorece la aparición de infecciones secundarias como estomatitis crónica, rinotraqueítis, neumonía, infecciones crónicas generalizadas, etc.

El VIF se puede aislar de sangre, líquido cefalorraquídeo y saliva. Si bien el contagio se puede producir sólo por contacto, el modo de transmisión más eficaz parecen ser las mordeduras, lo que explica que la infección sea más común en machos de vida libre. Las vías venérea y lactogénica son poco significativas, dada la escasa concentración de virus en semen, moco vaginal y leche. El contagio transplacentario o perinatal es más probable cuando coincide con los niveles más altos de viremia.

Los métodos serológicos para la detección de infección incluyen ELISA y Western blot, debiéndose señalar que la serología negativa no indica necesariamente ausencia de infección ya que algunos gatos demoran años en seroconvertir, o en otros casos la concentración de anticuerpos puede declinar en los estadios finales de la enfermedad.

Los animales virémicos seronegativos juegan un papel importante en la epidemiología de la infección.

Como método de diagnóstico directo se señalan: aislamiento viral (poco práctico como método de rutina) y PCR, siendo esta última un método alternativo para la confirmación de infección en casos de análisis serológicos no concluyentes.

Virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB)

El primer aislamiento de VIB fue realizado en 1972 a partir de un bovino con linfocitosis y linfadenopatía. Es el único representante del género lentivirus que afecta a bovinos y su organización genómica es de las más complejas dentro de los lentivirus que afectan a los no-primates.

VIB ha sido asociado a reducción en la producción lechera, inmunodeficiencia, dermatitis, encefalitis, debilidad crónica y emaciación. Los bovinos inmunocomprometidos por la infección con VIB pueden desarrollar infecciones secundarias cuando se asocian a situaciones de estrés como el parto o condiciones ambientales especiales. En los terneros esta disfunción inmune puede reflejarse en una pobre respuesta a estímulos vacunales.

La infección con VIB ha sido señalada en muchos países del mundo y la prevalencia puede ser variable (4-80%). Con frecuencia, estos animales están infectados dualmente con VLB (virus de la leucosis bovina) aunque hasta el presente no se ha demostrado causalidad entre ambas virosis.

La transmisión ocurre fundamentalmente por sangre, aun por pequeños volúmenes, mediante el uso de jeringas, guantes para palpación rectal, elementos para descuerne contaminados, etc. También se ha señalado que la leche puede ser una vía de transmisión de enfermedad al ternero.

VIB no puede aislarse fácilmente y las pruebas serológicas como inmunofluorescencia y Western blot han sido aplicadas para identificar a bovinos infectados. Los anticuerpos contra la p26 y gp110 son los que permiten la identificación de portadores de VIB, pero en muchos animales estos anticuerpos permanecen en títulos muy bajos o tardan mucho tiempo en alcanzar niveles detectables.

Como prueba directa, la PCR es el método alternativo más sensible para identificar aquellos bovinos que no son reactivos en las pruebas serológicas.

BIBLIOGRAFIA

Campbell RS, Robinson WF. The comparative pathology of the lentiviruses. J Comp Pathol. 1998; 119 (4):333-395.

Cremer KJ, Gruber J, Lawrence K. Animal models of retroviruses-associated malignancies. Vet Path.1998; 29 (6), 572-578.

Domburg R. From the natural evolution to the genetic manipulation of the host range of retroviruses. Biol Chem. 1997; 378 (6): 457-468.

Kim FJ, Battini JL, Manel N, Sitbon M. Emergence of vertebrate retroviruses and envelope capture. Virology. 2004; 5, 318 (1): 183-91.

Maury W. Regulation of equine infectious anemia virus expression. J Biomed Sci. 1998; 5 (1):11-23.

Payne LN. Retroviruses-induced disease in poultry. Poult Sci. 1998; 77 (8):1204-12.

Schiff R, Oliff A. The pathophysiology of murine retrovirus-induced leukemias. Crit Rev Oncol Hematol. 1986; 5 (3): 257-323.

Svoboda J, Geryk J, Elleder D. Heterogeneous pathogenicity of retroviruses: lessons from birds, primates and rodents. Adv Cancer Res. 2003; 87: 59-126.

The retroviridae, ed. Levy JA. (Plenum, New york), 1992.

Wilkinson DA, Mager DL, Leong JAC. in The retroviridae, ed. Levy JA. (Plenum, New York), p. 465-535.1994.

Capítulo 76

DIAGNOSTICO MOLECULAR DE LAS ENFERMEDADES VIRALES

Sándor Belák

INTRODUCCION

La incidencia mundial en años recientes de las enfermedades de la lista A de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), como la fiebre aftosa (1997-2001), la peste porcina clásica en el Caribe y Europa (1996-2002), la extensión de la peste bovina en los llanos de Somalia (2001) o la fiebre del valle de Rift en la Península Arábiga (2000), muestra el enorme impacto social y económico de las enfermedades animales altamente contagiosas transfronterizas. Los costos insumidos deberían ser vistos tanto en términos que demandan los esfuerzos de controlar la enfermedad como de las consecuentes pérdidas de animales. Como ejemplo, el brote de fiebre aftosa que afectó al Reino Unido en 2001 tuvo un costo para el sector público de más de 4,5 billones de euros y para el sector privado, más de 7,5 millones de euros. El problema ético alcanzado bajo la estrategia de erradicación convencional junto con las consecuencias sociales y económicas de enviar al matadero un gran número de animales, deben ser tenidos en cuenta cuando se consideran todos los efectos producidos por los brotes de las enfermedades de la lista A.

Las autoridades sanitarias veterinarias y los institutos de investigación realizan grandes esfuerzos para prevenir y combatir las enfermedades altamente contagiosas transfronterizas en todo el mundo. Los esfuerzos se concentran en la detección temprana de los agentes virales, considerando que el reconocimiento a tiempo de las mismas previene la diseminación de las enfermedades a grandes poblaciones animales en amplias áreas geográficas. Por ello, el desarrollo de nuevas y poderosas metodologías diagnósticas es un tópico básico hoy en la investigación veterinaria así como en el cuidado de la salud animal. La virología molecular ofrece un rango de nuevos métodos, capaces de acelerar y mejorar el diagnóstico de enfermedades infecciosas tanto en el hombre como en los animales. Las nuevas técnicas proveen la posibilidad de diagnósticos muy rápidos, ya que la detección puede completarse en pocas horas.

El diagnóstico de las enfermedades virales se basa en métodos de *detección directa* e *indirecta*. En los primeros se detectan partículas virales o algunos de sus componentes como ácidos nucleicos, proteínas estructurales y no estructurales, enzimas, etc., mientras que los métodos indirectos detectan la presencia de anticuerpos inducidos por la infección viral. Los *métodos directos* más frecuentes son el aislamiento viral (técnica de oro o "*Gold Standard*"), la microscopía electrónica (ME), la inmunofluorescencia (IF) e inmunohistoquímica (reacción peroxidasa-antiperoxidasa o PAP), las pruebas de ELISA para la detección de antígenos, la hibridación incluyendo la hibridación in situ y varios métodos de amplificación de ácidos nucleicos. En este último caso la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la técnica más difundida y popular. Los *métodos indirectos* de detección viral que son comúnmente utilizados son la virus neutralización, la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos y la inhibición de la hemaglutinación (IHA).

Respecto a la *detección directa*, hoy en día contamos con PCR clásicas, en tiempo real, múltiples, in situ e hibridación in situ. Se están desarrollando actualmente PCR robóticas, termocicladores portátiles, amplificación sin necesidad del uso de termocicladores y macro y micro *arrays*. En cuanto a los *métodos indirectos* de detección viral, se están mejorando notablemente los sistemas de ELISA, la PCR para detección de proteínas (*DNA tags*) y los test rápidos (tiras reactivas o "*pen-side-test*" o "*dip-sticks*").

Los métodos moleculares directos están sustituyendo a los métodos clásicos directos. Por ejemplo, la PCR está remplazando ya en algunos laboratorios al aislamiento viral; eso puede deberse a varias razones, principalmente al alto costo de mantenimiento de los laboratorios de cultivo celular y el tiempo que demanda el diagnóstico. Además, otras circunstancias como la inactivación viral durante el transporte, o la presencia de sustancias citotóxicas en las muestras impiden muchas veces arribar al aislamiento viral. Los métodos moleculares como la PCR han permitido el diagnóstico rápido de virus emergentes como Nipah y Hendra. Si bien la amplificación de ácidos nucleicos resulta costosa y engorrosa al principio, con el tiempo se vuelve relativamente económica y es por esa razón que se ha extendido a muchos laboratorios de virología.

La PCR tiene muchas ventajas, entre las que podemos mencionar:

- Permite el diagnóstico rápido (en horas).
- Es de gran especificidad y sensibilidad ya que la cantidad de ácido nucleico viral inicial se multiplica a millones de copias
- Las secuencias obtenidas por PCR pueden ser fácilmente determinadas y comparadas, lo cual abre una gran rama para estudios de filogenia y epizootiología molecular.
- Los costos son decrecientes.
- Permite la introducción de sistemas automatizados.
- Requiere menor entrenamiento y experiencia en comparación al aislamiento viral.
- Permite detectar ácidos nucleicos en muestras no adecuadas para aislamiento viral por ser tóxicas, poseer virus inactivados o ser muestras no aptas para cultivos celulares
- Permite el uso de cebadores (*primers*) generales o universales, lo que ayuda a amplificar secuencias comunes a familias virales.
- La estandarización de la técnica es relativamente sencilla.
- Permite un análisis cuantitativo (PCR en tiempo real –"*Real Time PCR*"), determinándose la carga viral.
- Pueden detectarse un amplio rango de agentes virales, bacterianos y parasitarios simultáneamente mediante el uso de PCR múltiple (Multiplex) en una sola muestra.

En este capítulo se presenta un resumen sobre el diagnóstico molecular de las enfermedades virales a través de distintos méto-

dos de detección directa de virus; en especial se hace referencia a los distintos tipos de PCR que se utilizan hoy como diagnóstico de rutina en las enfermedades virales.

LA PRIMERA GENERACION DE PCR

La primera técnica de PCR diagnóstica fue establecida en 1987/88, inmediatamente después de la invención del principio de la técnica. En las últimas dos décadas los laboratorios de diagnóstico desarrollaron más de 40 técnicas de PCR para el diagnóstico de rutina. La *PCR simple* o *clásica*, fue remplazada por las semianidadas (*heminested*) o anidadas (*nested PCR*) que proveyeron mayor sensibilidad y especificidad. Podemos nombrar como ejemplo PCR anidadas para el diagnóstico de enfermedades de los cerdos. La región a amplificar está denotada entre paréntesis:

a) DNA virus: parvovirus porcino (VP2), adenovirus porcino (proteína del hexón), enfermedad de Aujeszky –ADV– (gB, gE y gD), citomegalovirus porcino (DNA polimerasa)

b) RNA virus: peste porcina clásica (NS3, E2), pestivirus (5' NCR), síndrome respiratorio y reproductivo porcino (ORF1b), enfermedad vesicular del cerdo (3D), gastroenteritis transmisible (ORF7b), virus de la encefalomiocarditis (PP).

La *sensibilidad* y *especificidad* de las PCR anidadas son muy elevadas (se detectan entre 1-10 copias del genoma). Esto significa que el sistema reconoce exclusivamente el genoma del virus blanco pero no da resultado positivo con otros virus heterólogos. Estas técnicas pueden detectar no sólo un genoma viral, sino también un grupo de virus relacionados, probablemente a los miembros de una familia viral. Esto se aplica, por ejemplo, en los pestivirus, que abarcan la peste porcina clásica, la diarrea viral bovina y la enfermedad de la frontera. Puede realizarse una PCR tipo tamizaje para pestivirus en general y luego realizar otra PCR específica para un solo virus en particular y así determinar la identidad.

Considerando sus ventajas en cuanto a velocidad y precisión y su simplicidad práctica, los distintos tipos de PCR abren una nueva era en el diagnóstico virológico. En nuestra experiencia, obtenemos un gran beneficio al utilizarlas en las siguientes situaciones, ya que permite:

- Detectar agentes virales aun en niveles de anticuerpos muy bajos (como en el caso de leucosis bovina, donde muchos animales son dudosos a la infección).
- Discriminar entre infección y presencia de anticuerpos maternales en animales jóvenes.
- Detectar virus aun en materiales no aptos para cultivos celulares (semen, fetos momificados).
- En las etapas finales de distintos programas de erradicación, permite determinar casos individuales (animales latentes y reactores únicos en la enfermedad de Aujeszky).
- Discriminar virus vacunales de virus de campo.
- Determinar las relaciones filogenéticas entre virus y su aplicación en una nueva ciencia como lo es la epizootiología molecular.

Existe un amplio rango de PCR para diagnóstico y filogenia desarrolladas en numerosos laboratorios. En este capítulo, por razones de extensión seleccionamos algunos ejemplos de PCR anidadas en diagnóstico de rutina

PCR ANIDADA PARA LA DETECCION DE ADV- SEUDORRABIA O PRV

En la región Escandinava se han utilizado con éxito para los programas de erradicación, tres sistemas de PCR para amplificar segmentos que codifican para gB, gE o gD. Este programa se basó originalmente en la selección de animales seropositivos utilizando un ELISA dirigido contra los epítopes de la gB. Esta prueba además de detectar verdaderos positivos y verdaderos negativos, muchas veces detectaba los llamados "reactores únicos" (*"single reactors"*, SR). Utilizando PCR para secuencias de gB, gE o gD se pudieron determinar tejidos positivos de esos cerdos SR, con 98 a 100% de homología de secuencias respecto de PRV. Sin embargo, algunos genes de latencia como el transcripto mayor (LLT) no fueron detectados en órganos de estos animales, ni tampoco fue observada transmisión por contacto ni por vía vertical. Estos hechos deben ser resaltados por lo siguiente: 1) no se habían vacunado animales en el país en cuestión; 2) los SR que aparecieron tanto en el sur como en el norte de Escandinavia no tuvieron antecedentes de PRV ni fueron transportados de un lugar a otro, y 3) tampoco fue observada reactivación viral en condiciones naturales ni después de una inmunodepresión inducida. Sobre la base de estos tres hechos, se concluyó que el fenómeno de SR no debería ser considerado un caso típico de latencia por PRV. Parecería que ciertas secuencias genómicas de herpesvirus podrían existir en individuos aparentemente sanos. Según todas estas observaciones, los SR se consideraron animales inocuos y por lo tanto no fueron removidos de las granjas. Así, podemos ver que el diagnóstico molecular previene sacrificios innecesarios de muchos animales. En el aspecto práctico la erradicación rápida y exitosa de esta enfermedad en Escandinavia indica la utilidad de la PCR durante el programa.

DETECCION Y FILOGENIA DE CINCO ALFAHERPESVIRUS RUMIANTES MUY RELACIONADOS

Se han desarrollado sistemas específicos de PCR para la detección y discriminación de 5 alfaherpesvirus muy relacionados que afectan a rumiantes, ellos son: herpesvirus bovino tipos 1 (BHV-1) y 5 (BHV-5), herpesvirus caprino tipo 1 (CapHV-1), herpesvirus de los cérvidos tipo 1 (CerHV-1) y peste ferina herpesvirus 1 (RanHV-1).

Estos 5 virus tan relacionados entre sí por ser miembros de la misma familia, son capaces de establecer infecciones en especies heterólogas, lo que a veces resulta un diagnóstico errado. Por lo tanto, se han desarrollado 5 PCR específicas para distinguir estos virus; se ha puesto un especial énfasis en BHV-1 debido a que es uno de los principales causantes de enfermedad. La PCR para esta virosis ha sido evaluada tanto en muestras clínicas como en animales experimentalmente infectados. Las PCR para estos herpesvirus demostraron ser altamente sensibles y específicas. En el caso de ambos herpes bovinos 1 y 5 detectan entre 1 y 10 fentogramos de DNA viral purificado, o aproximadamente 6 a 60 copias genómicas. Las PCR para detectar los otros 3 herpesvirus (CapHV-1, CerHV-1 y RanHV-1) detectan entre 10 y 50 fentogramos de cada uno de ellos en DNA purificados.

SISTEMAS DE PCR GENERALES

Las PCR nombradas anteriormente fueron diseñadas para la detección altamente específica del virus seleccionado; este fue

uno de los criterios utilizados para su desarrollo. Para mayor información, observar la descripción del término "especificidad analítica" más adelante. Como complemento de estos sistemas altamente específicos se han desarrollado sistemas "generales o universales" con un objetivo totalmente opuesto. Estos sistemas generales se desarrollan para detectar un gran número de virus relacionados, como por ejemplo los miembros del género *Morbillivirus*, pertenecientes a la familia Paramixoviridae. Para obtener un amplio rango de amplificación los cebadores que se seleccionan deben dirigirse hacia regiones muy conservadas del genoma. Estos sistemas de PCR son muy utilizados por los veterinarios de laboratorios de diagnóstico. Sin embargo, se presenta un problema cuando muchos miembros de un género o familia viral causan signos clínicos semejantes. Por ejemplo, los cerdos pueden ser infectados por cualquiera de 3 pestivirus como peste porcina clásica, diarrea viral y enfermedad de la frontera. En estos casos es extremadamente importante detectar e identificar el virus causal lo antes posible, ya que por ejemplo, la peste porcina tiene consecuencias epizootiológicas muy serias, mientras que la presencia de los otros dos pestivirus tiene consecuencias menores. Si existe un sistema de PCR general para el caso de los pestivirus, se podría realizar un tamizaje en toda la piara de manera de demostrar o excluir la presencia de cualquiera de ellos en una única PCR, y por el otro si se detectan animales positivos para pestivirus, realizamos una preselección de muestras. Esta muestras positivas, a su vez, se utilizan para PCR específicas de peste porcina, diarrea viral o enfermedad de la frontera. De manera que la combinación de PCR generales con PCR específicas provee un diagnóstico rápido y efectivo.

Existen varias PCR "generales", por ejemplo es el caso de los pestivirus en donde se amplifica la región 5'NC altamente conservada del genoma de los pestivirus. O PCR "pan-herpes", que permite detectar un amplio rango de herpesvirus, o morbilivirus y retrovirus.

PCR para estudios de filogenia

Permite establecer relaciones genéticas entre varios virus, donde las secuencias blanco son las regiones variables. Estos estudios se han llevado a cabo en grupos de pestivirus utilizando la región 3'NCR, 5'NCR, E2 y NS2 entre otras.

Epizootiología molecular

La PCR de gran poder de resolución permite no sólo determinar las relaciones filogenéticas sino también identificar distintas variantes virales. Estos ensayos son muy importantes durante epizootias, ya que la identificación es muy rápida y exacta y podría realizarse en pocas horas. Permite rastrear la diseminación viral y prevenir la distribución del virus en un área geográfica determinada. Este sistema se denomina *epidemiología molecular*. Se han identificado así variantes del virus de la peste porcina clásica en varios países de Europa Central. Asimismo, se están utilizando para identificar variantes recientes de virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino. En este caso, se determinan las secuencias del ORF5 que representan cepas de campo patogénicas originarias de Polonia y Lituania, que son las presentes en las vacunas europeas a virus vivo. También se han determinado las secuencias del ORF7 que permitieron inferir que las cepas polacas y lituanas son excepcionalmente diferentes a la cepa prototipo europea denominada virus Lelystad. Con estos estudios se logró arribar a la conclusión de que las cepas europeas y americanas provienen de un ancestro común.

DESARROLLO DE PCR EN TIEMPO REAL (*REAL TIME PCR*)

La PCR en tiempo real permite la detección viral más rápido que las convencionales. Se utiliza un solo par de cebadores, con alta sensibilidad, y el riesgo de contaminación se minimiza ya que no se necesita manipulación posterior para la detección de amplicones. Esto se debe a que la mayoría de estos sistemas utilizan compuestos fluorescentes para la detección de productos que pueden ser leídos directamente en el tubo, sin necesidad de abrirlos, a través de un monitor. Los productos no necesitan ser evaluados en geles de agarosa. Además se puede realizar en platos de 96 pocillos, lo cual permite la automatización. Lo mismo ocurre con la manipulación de la muestra y el pipeteo de reactivos, para lo cual en algunos laboratorios se utilizan robots. Por otro lado, posee una ventaja mayor: permite cuantificar el resultado. Así la respuesta diagnóstica no es sólo "Sí o No", sino que puede determinarse la cantidad de ácido nucleico, hecho importante en la determinación de la carga viral en algunas enfermedades. En este sentido, la PCR en tiempo real no sólo es muy importante para diagnóstico sino también para estudios de patogénesis. La estimación cuantitativa es crucial en enfermedades que causan signos en relación con la carga viral animal, como el coronavirus felino o el circovirus porcino tipo 2. La carga viral es también muy importante para estimar los efectos de un determinado tratamiento antiviral, especialmente en virología humana.

Variantes de la PCR en tiempo real en el diagnóstico de rutina

Existen muchos sistemas de PCRTR como Taqman, baliza molecular ("*molecular beacons*"), primers scorpion, sistemas de sondas duales, ligación de oligonucleótidos marcados, entre otros. Los primeros Taqman y "*molecular beacons*" son los más utilizados.

El sistema Taqman se utiliza para detectar coronavirus felino, parvovirus, virus de leucemia felina, virus de la deshidrogenasa láctica, coriomeningitis linfocitaria, influenza equina, coronavirus bovino, virus sincicial respiratorio bovino y rinovirus equino. También se ha desarrollado una PCR en tiempo real "general" para pestivirus.

En el sistema "*molecular beacons*" se ha utilizado el virus de la enfermedad vesicular de cerdo y estomatitis viral, serotipos Indiana y New Jersey. Para diseñar las sondas, en el primer caso se utiliza una región conservada denominada 3D y en el segundo una región denominada L. Cada "*molecular beacon*" se marca con un fluoróforo diferente (FAM, JOE, ROX, DABCYL) permitiendo la detección rápida y simultánea de dos virus distintos en una misma muestra clínica. El diagnóstico clásico no permite identificar ni diferenciar ambos virus, teniendo en cuenta sobre todo que la manifestación clínica de estas enfermedades es muy similar (enfermedades emergentes y reemergentes vesiculares).

Estas pruebas son capaces de detectar 10 copias genómicas virales, lo que indica una gran sensibilidad analítica y permite obtener el resultado en 4 horas. Como en todo sistema de PCR, previo al desarrollo se necesita la optimización de todos los reactivos.

Termocicladores portátiles

Al igual que en otras técnicas diagnósticas, existe la necesidad de simplificar las técnicas de PCR y que puedan utilizarse no sólo en laboratorios equipados sino también en el campo. Sin embargo, existen objeciones al respecto: el diagnóstico de las enfermedades de la lista A de la OIE no es aceptado in situ, sino que debe repetirse o confirmarse en laboratorios oficiales. Se cuestiona, además, la

habilidad del personal, el uso de controles y la contaminación en condiciones de campo, y más aún, en la mayoría de los países el transporte es rápido y efectivo por lo que las muestras pueden enviarse rápida y fácilmente a los laboratorios de referencia. Por cierto, hay grandes ventajas en utilizar equipos portátiles. Muchos autores pudieron determinar la presencia del virus de la fiebre aftosa en el campo en menos de 2 horas; este resultado positivo requirió que previamente se optimizaran todas la condiciones de la reacción así como la validación de la técnica.

PCR MULTIPLE (*PCR MULTIPLEX*)

El principio se basa en el uso de varios cebadores (primers múltiples) que permiten amplificar diversos genes en una sola reacción. Es una idea práctica para los fines diagnósticos, que permite detectar muchas infecciones virales con una misma muestra y en un solo tubo. Tanto la PCR clásica como la PCR en tiempo real pueden realizarse en forma múltiple, partiendo de una sola muestra (hisopado nasal para enfermedad respiratoria/hisopado rectal para síndromes diarreicos). En principio, la PCR en tiempo real es más adecuada para adaptar al formato múltiple, ya que cada sonda individual puede marcarse con un fluoróforo diferente, donde cada uno funciona con indicador fluorescente, emitiendo distinta fluorescencia. La PCR múltiple clásica es un poco más complicada, si consideramos la gran cantidad de oligonucleótidos que intervienen y que deben interactuar en la misma reacción.

PCR múltiple en tiempo real en la detección de fiebre aftosa

Investigadores daneses y suecos desarrollaron recientemente una PCR en tiempo real para la detección simultánea de todos los serotipos de fiebre aftosa, empleando como molde el gen 3D. La prueba fue validada en cuanto a la eficacia para detectar los 7 serotipos conocidos de aftosa, y su límite de detección fue el equivalente a 10 copias genómicas del virus. Esta técnica fue utilizada para detectar aftosa en muestras de bovinos y búfalos africanos. Al comparar los resultados obtenidos con esta técnica versus el cultivo tradicional, se concluyó que la sensibilidad es similar, pero los resultados en la PCR en tiempo real, obviamente se obtienen en pocas horas.

PCR múltiple (doble) en tiempo real para la detección de virus respiratorios bovinos

Dos de los agentes que forman parte del complejo respiratorio del bovino que al parecer son los más patógenos, son el coronavirus bovino (BcoV) y el virus sincicial respiratorio (BRSV). La PCR múltiple en tiempo real se realiza en un solo tubo, disminuyendo el tiempo de procesamiento y la dificultad, amplifica un segmento conservado de BCoV (la proteína hemaglutinina-esterasa –HE– y la proteína de fusión [F] de BRSV) utilizando 4 primers y dos sondas. Empleando el método de sondas Taqman el resultado está disponible en menos de 3 horas, 5 horas menos de lo que demandaría realizar la PCR anidada convencional.

Además del menor tiempo de la reacción, las PCR múltiples en tiempo real tienen como ventajas:

- Se pueden analizar numerosas muestras en una misma reacción.
- Se minimiza el riesgo de contaminación por arrastre por utilizar un tubo cerrado.
- Permite una detección específica y diferenciable de los virus en cuestión.
- En comparación con los métodos convencionales es más rápida, confiable y permite la detección de virosis simultáneas.

La robótica en la extracción de ácidos nucleicos

La velocidad y eficiencia en el diagnóstico se ha incrementado por el uso de robots para extracción de ácidos nucleicos. Existen varios tipos de robots para purificar ácidos nucleicos, uno de ellos, Geno Vision (Quiagen, Noruega), utiliza la separación magnética de las moléculas. Comparando con los métodos manuales convencionales, el robot es más eficiente y preciso; los ácidos nucleicos virales de 48 muestras pueden purificarse en forma simultánea en 2,5 horas. Las preparaciones obtenidas son tan purificadas que permiten ser utilizadas en la PCR sin otro tratamiento posterior.

Diagnóstico automatizado

El uso simultáneo del robot para purificación de ácidos nucleicos en combinación con la PCR en tiempo real, permite un diagnóstico automatizado. Como complemento a esta automatización, se están desarrollando también pipeteadores robóticos.

PCR multi

Muchas veces el desarrollo de una PCR múltiple es complicado, difícil y hasta imposible de construir un sistema para ciertas enfermedades. Para esos casos existe otra alternativa que es la PCR multi. Esta PCR multi no consiste en coamplificar todos los blancos en el mismo tubo o pocillo de la microplaca, porque puede existir competencia entre primers, sino en realizar amplificaciones de varios ácidos nucleicos paso a paso en varias columnas de las microplacas. En sistemas automatizados es bastante simple, práctico y rápido de realizar.

PCR PARA LA DETECCION DE PROTEINAS (*DNA TAGS*)

Es posible amplificar no sólo ácidos nucleicos sino también proteínas aun en pequeñas cantidades. El fundamento es el siguiente: un segmento de DNA (*DNA tag*) puede unirse a un anticuerpo y este complejo se utiliza para detectar un antígeno proteico por amplificación del *DNA tag*.

PRECAUCIONES PARA PREVENIR LOS FALSOS POSITIVOS Y FALSOS NEGATIVOS EN PCR CLASICA

Para asegurar la confiabilidad de la PCR diagnóstica se recomienda incluir controles internos de reacción tanto en la PCR clásica como en la de tiempo real. Una forma práctica es seleccionar un segmento del genoma celular del animal hospedador y coamplificarlo como control interno. De esta manera, obtenemos información acerca de la calidad de la muestra o errores de pipeteo o en las etapas de extracción, y otorga seguridad al diagnóstico.

Validación-Estandarización

Las autoridades nacionales e internacionales requieren de pruebas rigurosas para que las técnicas diagnósticas sean lo más confiables posible. La OIE, la FAO/IAEA, los Institutos de Investigación y compañías comerciales realizan grandes esfuerzos para obtener la estandarización internacional. De acuerdo a estos

requerimientos, la mayoría de los laboratorios de diagnóstico han comenzado a validar y estandarizar las técnicas de PCR para diagnóstico de rutina. Para realizar predicciones acerca del desempeño de una técnica diagnóstica es necesario validarla. Validar es evaluar el método con el propósito de determinar cuán capaz es para un campo particular de uso.

Requerimientos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración (EN ISO/IEC 17025:2000)

Esta norma indica las directrices para los laboratorios acreditados y especifica muchos parámetros importantes como el cuidado del medio ambiente. Una forma simple de comenzar es validar los métodos no estandarizados, luego los métodos desarrollados "in house" (caseros) y posteriormente los métodos de laboratorio que serán utilizados en otros laboratorios. Los parámetros que se estiman pueden ser: grado de detección, exactitud del método, reproducibilidad, repetibilidad, robustez, entre otros.

Principios de validación de la OIE

En 2000 la OIE publicó un estándar de validación para técnicas diagnósticas en el campo de la veterinaria. En el capítulo 1.3 "Principios de validación de técnicas diagnósticas para enfermedades infecciosas", se describe en detalle cómo realizar la validación de una prueba diagnóstica de manera estandarizada. Las cinco etapas mayores de la validación son:

- Estudios de posibilidad (factibilidad)
- Desarrollo de la prueba y estandarización
- Determinar las características de comportamiento de la prueba
- Monitorear validez del comportamiento de la prueba
- Mantener y mejorar el criterio de validación

Cuando una prueba es aceptada como técnica de rutina es muy importante mantener un control de calidad, así como monitorear la repetibilidad y exactitud. La reproducibilidad entre laboratorios (prueba en anillo) se recomienda realizar según la OIE por lo menos 2 veces por año. Como un ejemplo podemos citar que se realiza una prueba entre laboratorios para validar PCR para la detección de peste porcina. Si la prueba se aplica en otra región geográfica, también se debe revalidar en las nuevas condiciones.

Es importante notar que la validación lleva tiempo y dinero. Requiere de controles y un buen número de muestras. Esa es una de las razones por las que la validación en el pasado ha sido considerada poco importante. Nosotros debemos tender a tener la misma calidad que se aplica a las pruebas diagnósticas humanas, es por eso que en estos momentos se están llevando a cabo en laboratorios de diagnóstico veterinario.

Laboratorios de referencia de la OIE para el diagnóstico molecular

La OIE designó al Instituto Nacional Veterinario (SVA) de Uppsala, Suecia, como Laboratorio de referencia de la OIE para la aplicación de métodos de PCR para el diagnóstico de enfermedades virales veterinarias. SVA es el primer laboratorio de referencia de la OIE en el diagnóstico molecular. Este Instituto ha realizado una intensa actividad internacional de validación y estandarización, y también participó en programas de entrenamiento junto con FAO, IAEA y OIE.

En resumen, los ejemplos dados en este trabajo muestran la situación en el desarrollo y la aplicación práctica, así como la estandarización internacional de las técnicas moleculares con especial referencia a PCR en el diagnóstico virológico animal. En el futuro, se mejorarán los métodos diagnósticos, que harán más efectivo el control de múltiples virosis tanto en animales domésticos como salvajes.

Traducción: Dra. María Gabriela Echeverría.

BIBLIOGRAFIA

Belák S, Thorén P. Molecular diagnosis of animal diseases. Expert Review of Mol Diagnostics 2001; 1: 434-444.

Belák S, Thorén P. Validation and quality control of the polymerase chain reaction methods used for diagnosis of infectious disesaes. OIE Manual 2004, Chapter 1.1.4. In press

Hakhverdyan M, Thorén P, Belák S. Real-time PCR assays for the detection of swine vesicular disease virus and vesicular stomatitis virus using molecular beacons. XII International Congress of Virology, IUMS, The World of Microbes, 27th July-1st August, 2002, Paris, p.228.

Hjertner B, Meehan B, McKillen J, McNeilly F, Belák S. Development of and invader squared assay for the detection of African swine fever DNA and comparison to PCR based assays. Journal of Virological Methods, in press.

Paton D, McGoldrick A, Greiser-Wilke I, Parchariyanon S, Song JY, Liou PP, Stadejek T, Lowings P, Björklund H, Belák S. Genetic typing of classical swine fever virus. Vet Microbiol. 2000; 73: 137-157.

Paton DJ, McGoldrick A, Bensaude E, Belák S, Mittelholzer C, Koenen F, Vanderhallen H, Greiser-Wilke, Ischreibner, H, Stadejek T, Hofmann M, Thuer B. Classical swine fever virus: the second ring test to evaluate RT-PCR detection methods. Vet Microbiol. 2000; 77: 71-81.

Rasmussen T, Uttenthal Å, de Stricker K, Belák S, Storgaard T. Development of a novel quantitative real-time PCR assay for the simultaneous detection of all serotypes of foot-and-mouth disease virus. Archives of Virology. 2003; 148: 2005-2021.

Stadejek T, Stankevicius A, Storgaard T, Oleksiewicz MB, Belák S, Drew TW, Pejsak Z. Identification of radically different variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Eastern Europe: Towards a common ancestor for European and American viruses. J Gen Virol. 2002; 83: 1861-1873.

Willis NG. The role of the OIE in international trade. Ann N Y Acad Sci (USA). 2000; 916: 1-5.

PARTE IV
MICOLOGIA

Capítulo 77

HONGOS O EUMYCETOS

Enso Hugo Reinoso, Teresa Rojas Flores,
Susana Beatriz Córdoba, Gabriela Mariel Nuñez

Los hongos son organismos con citología eucariota y por su especial reproducción asexual y sexual, heterotrofismo y características evolutivas (polifiléticos) pertenecen al Reino Fungi (Protistas superiores).

Su cuerpo, denominado micelio o thallo, está formado por una o más células y hasta un número infinito de ellas; no obstante no conforman nunca un tejido verdadero.

Tanto el núcleo y las organelas como el dictiosoma (aparato de Golgi), las mitocondrias y los ribosomas poseen estructuras y funciones similares a las células de animales y vegetales superiores, pero la pared celular y el plasmolema (membrana celular o membrana citoplasmática) de los hongos presentan diferencias significativas.

CELULA DE EUMYCETO: PARED CELULAR

Es el mayor componente celular que distingue a los hongos de otros organismos. Está formada por dos componentes principales: un reticulo más o menos organizado de **microfibrillas** que le confiere rigidez a la célula y una **matriz polimérica** geliforme rica en glucano y glicoproteínas donde están inmersas o embebidas las microfibrillas. Esta intrincada red de componentes le confiere forma a la célula y protección ante cualquier diferencia apreciable de cambios en el medio, como por ejemplo su resistencia a fuertes cambios de presión osmótica en el sustrato (fig. 77-1).

Los polisacáridos fibrilares, quitina, quitosano y complejos quitina-glucano-celulosa, junto a pequeñas cantidades de proteínas y lípidos forman la capa interna y la matriz polimérica geliforme se extiende hacia afuera para dar forma a la capa externa de la pared (tabla 77-1).

Los compuestos químicos de la pared varían según la ubicación taxonómica de los hongos.

La quitina es el polímero β-(1-4) de N-acetilglucosamina y el quitosano es el polímero β-(1-4) de glucosamina. El quitosano está formado por desacetilación enzimática progresiva de quitina.

Los glucanos con uniones β-glucanos son parte de la mayoría de las paredes fúngicas, y las glicoproteínas, especialmente manoproteínas, galactomanoproteínas y xilomanoproteínas, son los constituyentes mayores de la matriz.

Las hidrofobinas son un grupo de proteínas hidrofóbicas estrechamente relacionadas y presumiblemente le dan a la hifa aérea (micelio) una incrementada resistencia a la desecación y capacidad para crecer en el aire.

Así como la pared es el sitio primario de interacción entre la célula fúngica y su ambiente, no es sorprendente que el metabolismo de la pared desempeñe un papel mayor en el establecimiento y desarrollo de las relaciones patogénicas y simbióticas entre los

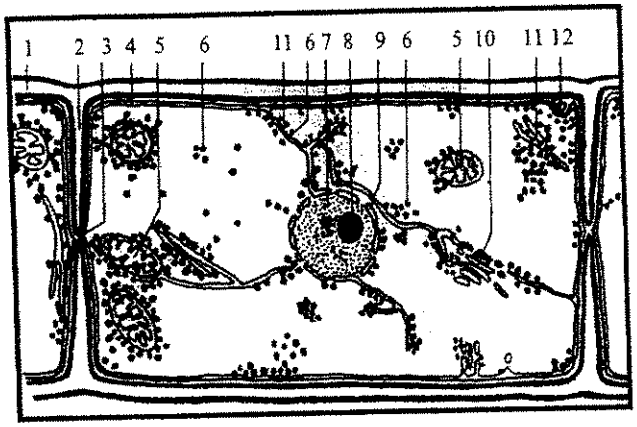


Figura 77-1. Ultraestructura. Célula de una hifa de un Ascomycete, sección longitudinal esquemática. 1: pared celular (pared exterior de la hifa), 2: tabique transversal de la hifa (septo), 3: poro del tabique transversal, 4: plasmolema, 5: mitocondrias, 6: ribosomas, 7: núcleo, 8: nucléolo, 9: membrana nuclear, 10: dictiosoma (aparato de Golgi), 11: retículo endocitoplasmático, 12: lomatosomas.

Tabla 77-1. Mayores polímeros de la pared celular de los hongos según grupo taxonómico

Grupo taxonómico	Polímeros fibrilares	Polímeros geliformes
Basidiomycetes	Quitina	Xilomananoproteínas
	β-(1-3), β-(1-6) Glucano	α-(1-3)-Glucano
Ascomycetes	Quitina	Galactomananoproteínas
	β-(1-3), β-(1-6) Glucano	α-(1-3)-Glucano
Zygomycetes	Quitina	Acido poliglucurónico
	Quitosano	Glucuronomananoproteínas
		Polifosfato

hongos y otros organismos (apareamientos, sustratos, hospederos u otras células) a través del fenómeno de adherencia.

La melanina (color marrón oscuro a negro) es un pigmento que se acumula en distintas capas de las paredes de las hifas vegetativas, esporas y cuerpos fructíferos de numerosos hongos. Esta es una molécula excepcionalmente estable, que le provee resistencia mecánica a las paredes y las protege de una variedad de estrés ambiental, tal como la luz ultravioleta, la radiación solar, la desecación y la lisis enzimática.

La melanina está presente en la pared celular de un grupo especial de hongos dematiáceos o simplemente "hongos negros" (Clase *Deuteromycetes*, Fam *Dematiaceae*).

MEMBRANA CELULAR O PLASMOLEMA (MEMBRANA CITOPLASMATICA)

El plasmolema posee numerosas propiedades y actividades, como la de constituir una clave en la comunicación entre el protoplasma y el medio externo, desarrollando un amplio rango de actividades enzimáticas y un papel decisivo en la recepción y secreción de materiales de la célula e influye sobre su permeabilidad.

La membrana celular contiene en peso aproximadamente un 50% de proteínas y la otra mitad de lípidos. La proteína de membrana más abundante en los hongos es la ATPasa de membrana constituyendo un 5-25%. La composición de los fosfolípidos de la membrana plasmática es similar, en general, a la de otras células eucarióticas. Según algunas determinaciones, el mayor porcentaje de fosfolípidos de la membrana de los hongos corresponde a fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina.

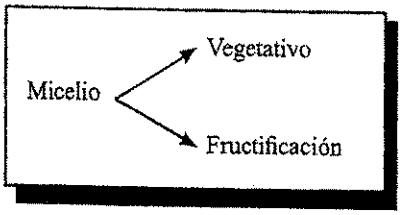
Los esteroles son una clave importante para la integridad de las membranas eucarióticas y en los hongos el ergosterol es un componente esencial de la membrana celular, aumentando la fluidez de la misma; en *Neurospora crassa* el ergosterol está al menos en un 95% del contenido de los esteroles. La membrana también presenta sinuosidades laminares o tubulares, el lomatosoma, que aumenta la superficie de contacto de la célula con los nutrientes.

MICELIO

El micelio o cuerpo de los hongos en general es visible a simple vista, aunque para reconocer sus partes es imprescindible el uso del microscopio óptico. Sus colonias presentan aspectos muy variados, desde algodonoso, lanoso o velloso, hasta cremoso o pastoso en otros, leñoso como algunos fitoparásitos e inclusive carnoso y esponjoso como ciertos hongos de sombrero, que pueden ser comestibles.

De acuerdo con su función se distinguen el **micelio vegetativo** encargado de la nutrición, sostén, resistencia, diseminación, etc. y el **micelio de fructificación** vinculado con la reproducción, o sea la formación de nuevos individuos que mantienen todas las características de la especie.

El micelio vegetativo puede desarrollar con respecto a la superficie del medio de cultivo o sustrato en tres sentidos: aéreo, rampante (adherido finamente al medio) y sumergido.



Microscópicamente el micelio vegetativo puede observarse como simples células aisladas ovoides o esféricas que se multiplican por brotación, escisión (bipartición) o proceso intermedio, éste es el **micelio unicelular.** Cuando está representado típicamente por filamentos con ramas dispuestas en todas direcciones (hifas), se trata del **micelio filamentoso**. Este tipo de micelio puede presentar paredes transversales (tabiques o septos) que a intervalos irregulares dividen las hifas en células, conformando el **micelio filamentoso tabicado**; cuando el protoplasma de las hifas no posee septos se denomina **micelio continuo** o **cenocítico,** en el cual es imposible individualizar células por lo que a un citoplasma que contiene varios núcleos se lo considera como "polienérgidas" (fig. 77-2).

Algunos hongos de micelio unicelular (levaduras) producen a partir de una sola célula y por brotación sucesiva, cadenas lineales o ramificadas semejando hifas verdaderas pero sin los septos característicos, este es el **micelio seudofilamentoso** o **"seudomicelio"**.

Los tabiques transversales del micelio pueden presentarse como **septos regulares** o **irregulares** (seudoseptos). Los septos regulares pueden presentar un poro central sencillo (Clase *Ascomycetes*) o poro central complejo (doliporo, en *Basiomycetes*).

Los *Actinomycetales* son un grupo de bacterias grampositivas constituidas por finos filamentos ramificados que se seccionan (artrosporan) originando formas bacilares y difteroides. La similitud de su morfología con la de los mohos (hongos verdaderos) hace que se estudien algunos géneros como *Streptomyces*, *Nocardia*, *Actinomadura*, etc. dentro del campo de la micología médica.

FORMAS ESPECIALES DEL MICELIO VEGETATIVO

El micelio vegetativo adopta diferente morfología para facilitar determinadas funciones vinculadas a su adaptación al medio y supervivencia (tabla 77-2). Estas formas son:

1. Elementos de propagación (dispersión, proliferación, diseminación, etc.)

Nacen y se multiplican en cualquier punto del thallo; por cierta similitud con las esporas verdaderas se denominan "thallosporos", aunque la tendencia actual es considerarlos como esporos asexuales verdaderos con mecanismos ontogénicos especiales.

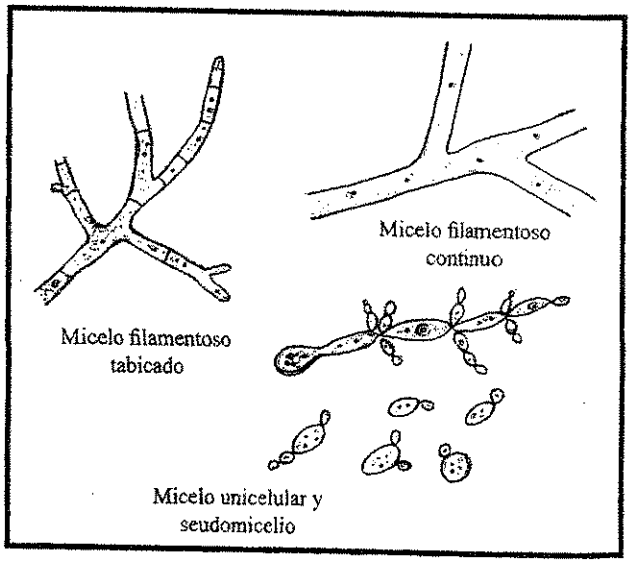


Figura 77-2. Micelio filamentoso tabicado, continuo, unicelar y seudofilamentoso.

A. **Blastosporas-blastoconidios:** células que se multiplican por brotación (gemación) y están presentes, en general, en hongos de micelio unicelular aunque también se producen en los hongos de micelio filamentoso.

B. **Artrosporas exógenas (Artroconidios):** células o artículos que se forman por tabicamiento del micelio filamentoso en dirección transversal y que una vez maduros se desprenden con facilidad.

C. **Artrosporas endógenas o enthosporas (Clamidoartrosporas):** son células semejantes a las artrosporas pero con un rico contenido en nutrientes, que obtienen a partir de células adyacentes de la misma hifa, conservando la pared externa de la misma.

D. **Blastoartrosporas-blastoartroconidios:** son artrosporas que a su vez emiten uno o más brotes.

2. Elementos de reserva y resistencia

A. **Células durables:** se forman en el micelio unicelular, son globosas, más grandes que las células somáticas originales y presentan un citoplasma rico en materiales de reserva.

B. **Clamidospora:** célula de pared gruesa que se forma en el recorrido de una hifa o en la parte apical de la misma, pueden ser por lo tanto terminales o intercalares y su función y contenido citoplasmático es igual al de la célula durable.

C. **Esclerote:** ovillado de hifas que forman estructuras plectenquimatosas. Poseen una zona externa más densa y esclerosada, el seudoparénquima, y una zona interna laxa, donde las hifas permanecen definidas y viables, el prosénquima. Es un elemento multicelular y macroscópico. Cuando conforman cuerpos de tamaño grande se los denomina esclerocios ("cornezuelos del centeno").

D. **Bulbillo:** ovillado de hifas con cierta similitud con el esclerote, pero microscópico.

Tabla 77-2. Formas especiales de micelio vegetativo

Elementos de propagación	Blastosporas-blastoconidios
	Artrosporas exógenas
	Artrosporas endógenas
	Blastoartrosporas-blastoartroconidios
Elementos de reserva y resistencia	Células durables
	Clamidosporas
	Esclerotes
	Bulbillos
Elementos de nutrición	Rizoides
	Haustorios
	Hifas vasculares
	Rizomorfos
Elementos de fijación y sostén	Apresorios
	Fibras o hifas fibrosas
	Cistidios
Hifas agrupadas	Funículos
	Anastomosis

3. Elementos de nutrición

A. **Rizoides:** hifas especiales que penetran en el sustrato alimenticio, donde se ramifican a modo de raicillas desempeñando funciones de absorción de los nutrientes.

B. **Haustorios (Lignituber):** hifas modificadas para favorecer la absorción de nutrientes a partir de su hospedador (hongos parásitos). Presentan formas variadas, a veces son pequeñas en forma de botón y otras grandes con hinchamientos irregulares que ocupan casi todo el interior de la célula parasitada.

C. **Hifas vasculares:** hifas con mayor luz interior, con espesamiento de sus membranas y pérdida de sus tabiques. Tienen funciones comparables a las de los vasos conductores de la savia en las plantas superiores. Se encuentran en los frutos de los *Basidiomycetes* (hongos de sombrero).

D. **Rizomorfos (órgano de migración micelial y transporte de alimentos):** son cuerdas micelianas con características histológicas del esclerote, que crecen por su vértice y tienen actividad de almacenamiento y transporte. Algunos autores describen como rizomorfos, todo tipo de nivel de organización, desde el simple haz de hifas entrelazadas hasta esta estructura compleja, similar a las raíces, como en este caso.

4. Elementos de fijación y de sostén

A. **Apresorios:** hifas finas y ramificadas que fijan el hongo al sustrato y pueden también absorber nutrientes. El ápice de la misma se adhiere a la superficie del medio y/u hospedero a través de hifas dilatadas en sus extremos que liberan una sustancia mucilaginosa para facilitar su contacto. Cuando presentan una estructura característica y se disponen en forma regular y constante se denominan hifopodios y son considerados de importancia para identificar a algunos hongos.

B. **Fibras o hifas fibrosas:** son filamentos engrosados que han perdido su luz interior. Pueden llegar a esclerosarse totalmente y tomar en algunos casos una real consistencia leñosa. Se encuentran como elementos de sostén en los carpóforos de los hongos de sombrero u otros *Basidiomycetes*.

C. **Cistidios:** elementos de sostén ubicados generalmente a nivel de las laminillas en los hongos del grupo anteriormente enunciado.

Existen además, formas especiales como:

5. Hifas agrupadas

A. **Funículos:** son cordones miceliares, con función poco definida, donde las hifas están entrelazadas como los hilos de una soga. Su presencia da origen a colonias funiculosas (aspecto de mechones pequeños).

B. **Anastomosis:** son hifas que se unen entre sí para favorecer el transporte de nutrientes, en otros para lograr una mayor adaptación al parasitismo y también para llevar a cabo algunos mecanismos en la reproducción sexual de los hongos.

CONCEPTOS SOBRE FISIOLOGIA Y METABOLISMO FUNGICO

Los hongos necesitan carbono para su crecimiento, y para ello utilizan fuentes de carbono químicamente complejas; el nitrógeno es metabolizado a partir de sales sencillas como nitratos y amonio o de otras sustancias de origen orgánico. También son importantes los minerales como el fósforo, magnesio, azufre, cobre, hierro, potasio y calcio.

Monosacáridos y otros compuestos pequeños e hidrosolubles que contienen carbono son el alimento más importante y asimilable por los hongos. Independientemente de la gran variedad de sustratos que pueden degradar para su crecimiento, la glucosa es el azúcar más utilizado por éstos y es por lo tanto considerada una fuente de carbono universal; también son ampliamente utilizadas la fructosa y manosa.

En los medios de cultivo para hongos con requerimientos nutricionales desconocidos debe adicionarse glucosa como primera fuente de carbono.

En los hongos, como en todos los organismos heterótrofos, los compuestos carbonados están al servicio de dos funciones esenciales del metabolismo.

En primer lugar, proporcionan el carbono necesario para la síntesis de diferentes compuestos de la célula.

En segundo lugar y no menos importante, intervienen en la oxidación de los compuestos carbonados, que son la única fuente que proporciona cantidades apreciables de energía. Las mitocondrias o condriosomas son portadores de enzimas de la cadena respiratoria, del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa.

Reacciones preliminares en la desintegración de glucosa según Embden-Meyerhof

La acción sobre los diferentes sustratos se realiza a través de enzimas (figs. 77-3 y 77-4). Los hongos poseen exoenzimas y endoenzimas. Las primeras son liberadas al medio y las endoenzimas actúan en el interior de la célula. Muchos hongos segregan enzimas al medio ambiente, ya en estadios tempranos de su desarrollo ontogénico, y degradan de esta manera casi todas las sustancias y asociaciones naturales, incluidas las insolubles y complejas que tienen carbono (véase tabla 77-3). Los productos solubles de esta reducción son absorbidos por los protoplastos donde sigue su transformación según las vías ordinarias del metabolismo, por ejemplo, en el desdoblamiento de las proteínas, intervienen exoenzimas como las proteasas (endopeptidasas) que disuelven las uniones peptídicas, en cualquier lugar de la cadena de los polipéptidos, luego las exopeptidasas (carboxipeptidasas y aminopeptidasas) que afectan sólo a los terminales de la cadena, degradan el ácido carboxílico y grupos aminos, produciendo aminoácidos o pequeños péptidos, que ahora dentro de los ribosomas producirán parte de los metabolitos primarios o componentes celulares de los hongos, como son: la celulosa, quitina, glucógeno, proteínas, ácidos grasos, β-carotenos, y ácido p-aminobenzoico; otras exoenzimas importantes pero que actúan sobre compuestos polisacáridos de alto peso molecular son la amilasa, celulasa y xilanasa.

Por otro lado, el metabolismo secundario, comprende todos los intercambios metabólicos, mediante los cuales los hongos desarrollan sus peculiares y características formas reproductivas y diferenciación metabólica.

El metabolismo secundario está considerado como equivalente fisiológico de la fase de fructificación.

La capacidad de los hongos de invertir el metabolismo primario en secundario hace posible la esporulación y con ello la supervivencia y propagación de las especies.

Son considerados metabolitos secundarios los alcaloides, como la ergotamina, psilosibina y ácido lisérgico. Antibióticos: penicilina, griseofulvina y cefalosporinas. Micotoxinas: gliotoxinas, trichotecenos, aflatoxinas, etc. y hormonas fúngicas como la sirenina, anteridiol y ácidos trispórticos.

En cuanto a requerimientos vitamínicos, muchos hongos no pueden sintetizar suficientes cantidades de ciertas vitaminas, dependiendo para su crecimiento óptimo de las fuentes externas que suministra el medio. El término "factor de crecimiento" significa una sustancia orgánica que en pequeñísimas cantidades es necesaria o estimulante para el crecimiento y su normal fisiología, y que no sirve simplemente como fuente de energía, puesto que funciona fundamentalmente como parte de coenzimas. Son vitaminas importantes la tiamina (B1), puesto que forma parte de

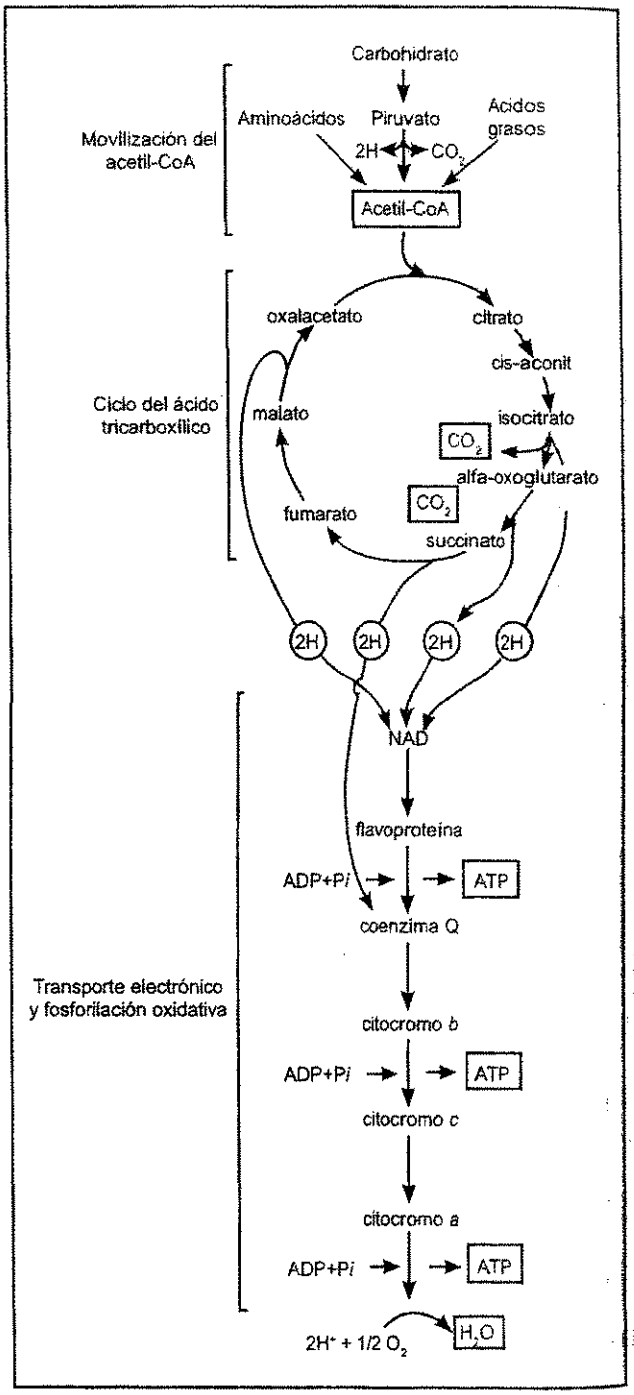


Figura 77-3. Esquema del proceso respiratorio a través del cual los diferentes sustratos son metabolizados por las células.

la coenzima de las enzimas piruvato decarboxilasa, y la biotina (H) que participa en numerosos procesos metabólicos como la carboxilación del ácido pirúvico, la formación de bases púricas y pirimídicas y en la síntesis de otros compuestos.

También debe mencionarse al ácido pantoténico como intermediario en la formación de la coenzima A, al ácido nicotínico en la formación de la nicotinamidadinucleótido (NAD) y los nucleótidos fosfopiridínicos DNA y DNAP, los cuales representan los grupos prostéticos de los sistemas enzimáticos que intervienen en el transporte de electrones.

CRECIMIENTO FUNGICO

Cualquier sistema biológico puede definirse como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos de un organismo; implica por lo tanto división nuclear y la duplicación o replicación de las demás estructuras celulares.

Generalmente el crecimiento determina multiplicación celular excepto en el caso especial de los organismos cenocíticos que sólo involucran un crecimiento en el tamaño del individuo. Por lo tanto, el incremento en masa o en número de células de un inóculo después de un cierto tiempo de incubación en un medio de cultivo adecuado, puede ser utilizado como definición práctica del crecimiento.

En los hongos la definición exacta del crecimiento depende de su morfología y de los métodos y medidas empleados en su determinación. El crecimiento puede ser medido en términos de cambios en el número de células, masa, dimensión lineal, volumen celular, actividad total de cualquier proceso metabólico o en actividad y cantidad de algún constituyente celular.

Factores que pueden iniciar o estimular la esporulación de los hongos

- Un cambio en la concentración de uno o más de los nutrientes. Una reducción de azúcares puede ser efectivo.
- Un cambio en la fuente de carbono. Se sustituye glucosa por la misma cantidad de sacarosa, lactosa, almidón u otra.

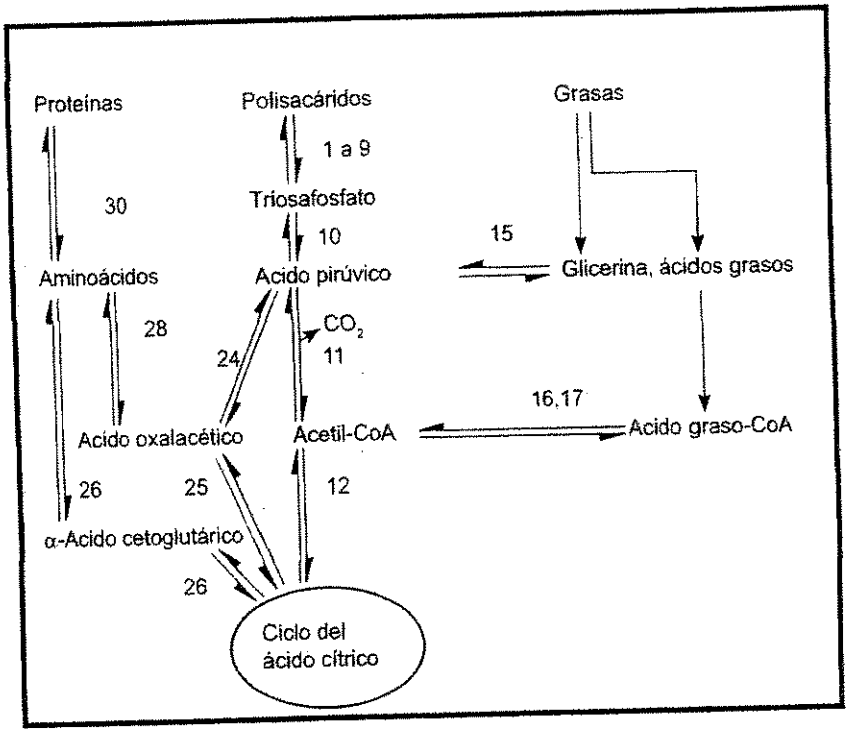


Figura 77-4. Esquema de desintegración de los componentes más importantes de las materias nutritivas.

Tabla 77-3. Algunos compuestos utilizados por los hongos como fuente de carbono

Carbohidrato y compuestos relacionados Adonitol, amilosa, celobiosa, galactosa, glucosa, lactosa, maltosa, sacarosa, sorbitol, trehalosa, xilano, rafinosa y ribosa.
Aminoácidos y compuestos relacionados Alanina, arginina, cisteína, glicina, serina, lisina, triptofano, ornitina, glutamina y ácido glutámico.
Acidos orgánicos y compuestos relacionados Acido acético, a. butírico, a. láctico, a. oleico, a. pirúvico, a. tartárico y tributirina.
Compuestos policíclicos y álcalis Androsterona, colesterol, cortisona, ergosterol, progesterona y tetraciclina.

- Un cambio en la fuente de nitrógeno.
- La adición de cierto microelemento al medio químicamente puro.
- La adición de ciertos productos naturales al medio.
- La adición de compuestos especiales tales como ácido glutárico el cual ha mostrado ser efectivo en algunos casos.
- Un cambio de pH en el medio y en la temperatura de incubación.
- La combinación de dos o más factores anteriormente citados.

ELEMENTOS MINERALES UTILIZADOS POR LOS HONGOS

La composición química de la célula varía ampliamente. Para que los análisis químicos tengan algún significado deben relacionarse con la especie, la edad y el tipo de célula analizada, la composición del medio y los factores ambientales.

No existe dificultad en demostrar que aquellos elementos que se requieren en altas concentraciones son esenciales. Estos son: carbono, nitrógeno, potasio y magnesio. Otros elementos son esenciales para el crecimiento de los hongos, aunque se requieren en bajas concentraciones. Estos, denominados oligoelementos, trazas o menores, incluyen al hierro, cinc, manganeso, cobre, calcio y otros.

Fósforo: es usualmente el elemento no metálico más abundante encontrado en las cenizas de hongos. El fósforo juega un papel importante en el desarrollo de los hongos ya sea como parte integrante de compuestos vitales desde el punto de vista estructural o en compuestos que intervienen en la transferencia de energía y ácidos nucleicos. El micelio joven y las esporas son los que poseen mayor contenido en fósforo.

Azufre: el contenido de azufre es variable. Forma parte entre otros compuestos, de enzimas, proteínas, aminoácidos (cisteína y metionina) y vitaminas (tiamina y biotina).

Potasio: este elemento influye en el metabolismo de los hidratos de carbono y la absorción de fosfatos. El efecto más marcado de la deficiencia de potasio es la acumulación de ácido oxálico.

Magnesio: es un elemento esencial para todos los hongos. Es un activador de numerosas enzimas, por ejemplo fosfato transferasa. El contenido de magnesio en el micelio depende de la edad del cultivo y de la presencia de nitrato.

Hierro: este es un constituyente esencial de varias enzimas incluyendo los citocromos, citocromo oxidasa, catalasa y otras.

Cinc: es un constituyente o activador de enzimas como alcohol dehidrogenasa, citocromo c y la esporulación.

Cobre: varias enzimas lo contienen en su molécula, como la tirosinasa, y también participa en la biosíntesis de las enzimas nitrito e hiponitrito reductasas.

Calcio: produce estímulos en la superficie celular e induce diferentes efectos en el crecimiento, diferenciación y esporulación. Interviene en reacciones específicas químicas, eléctricas o físicas dentro de la célula.

Nitrógeno: para la síntesis continua de nuevo material protoplasmático se necesita un suministro de sustancias nitrogenadas. Los hongos obtienen este elemento a partir de numerosas sustancias. De los estudios realizados in vitro se ha observado que tanto el nitrógeno inorgánico como el orgánico son tomados rápidamente durante el crecimiento activo. La mayoría de los hongos utilizan nitratos. En las levaduras, su asimilación positiva o negativa implica aspectos taxonómicos que ayudan a su clasificación.

El *amonio* penetra en la célula por la difusión pasiva de su molécula no disociada. Las células de levaduras son muy permeables a la molécula de amonio y todas son capaces de crecer en sulfato de amonio. El *nitrito* también es utilizado por los hongos, aunque en concentraciones elevadas en general se comporta como tóxico.

Los *aminoácidos* son utilizados directamente por la mayoría de los hongos, aunque existen variaciones en su empleo de acuerdo a la especie. La *asparagina*, el ácido glutámico y el ácido aspártico en medios de cultivo bien tamponados permiten un buen crecimiento de numerosos hongos, aunque no son igualmente efectivos.

Los *péptidos* son ampliamente utilizados tanto por los mohos como por las levaduras, sin embargo las proteínas no son excelentes fuentes de nitrógeno para la levaduras, dado que éstas liberan escasa cantidad de proteasas al medio y se hace difícil la degradación suficiente de proteínas para su metabolismo.

BIBLIOGRAFIA

Ainsworth CC, Sparrow F, Sussman A. The fungal cell. Vol. I, Academic Press. New York- San Francisco - London. 1963.

Ainsworth CC, Sparrow F, Sussman A. The fungal organism. Vol. II. Academic Press. new York - San Francisco- London. 1973.

Alexopoulus CJ. Introducción a la Micología. Eudeba. 1984.

Carmichael JW, Kendrick WB, Conners II, Sigle L. Genera of *Hyphomytes*. The University of Alberta press. Edmonton. Alberta. Canadá. 1980.

Cochrane BW. Physiology of fungi. New York.: John Wiley & Sons. 1965.

Gauman N, Wyn D. The fungi. Ed. Hafner Publishing Company. New York- London 1952.

Gow N, Gadd A, Geoffrey M. The growing fungus. Chapman & Hall. London. Glasgow. Weinheim. New York. Tokyo. Melbourne. Madra. 1995.

Kurtzman / Fell. The yeast. A taxonomic study. The Netherlands. Elsevier Science Publishers. B.U. Amsterdam. 1998.

Langeron M. Précis de Mycologie. Masson et Cie., éditeurs. 120, Boulevard Saint-Germain, Paris. 1952.

Muller E, Loefler W. Micología. Manual para naturalistas y médicos. Ed. Omega S.A. Barcelona. España. 1976.

Negroni P. Morfología y biología de los hongos. El Ateneo. Buenos Aires. Argentina. 1938.

Verna L, Herrero J. Micología. El Ateneo. Bs. As. 1952.

Capítulo 78

REPRODUCCION DE LOS HONGOS

Enso Hugo Reinoso,
Gabriela Mariel Nuñez, Fernanda Castro

MICELIO DE FRUCTIFICACION

Reproducción asexual

Este tipo de micelio originado a partir del micelio vegetativo, se caracteriza por poseer hifas fértiles, especializadas para la reproducción. Suelen diferenciarse del micelio vegetativo (somático) por su morfología y cambios en su pigmentación.

La **reproducción** es la formación de nuevos individuos, que poseen todas las características propias de la especie.

Los hongos presentan básicamente dos tipo de reproducción, una asexual y otra sexual. La primera es la más importante para la diseminación o multiplicación de las especies. Se repite varias veces al año (en el laboratorio ocurre tantas veces como cuantos nuevos repiques se practiquen en sustratos adecuados -medios de cultivo-) originando infinita cantidad de nuevos individuos a través de la germinación de esporas asexuales. Podría generalizarse diciendo que la reproducción asexual involucra cualquier método de proliferación que origine nuevas células, ya sea por mecanismos somáticos de propagación (brotación, escisión y proceso intermedio), de pequeñas porciones de micelio vegetativo, elementos de resistencia y especialmente a través de esporas producidas por hifas fértiles que se denominan esporóforos.

Las **esporas** son células diferenciadas, sin movimiento propio. Es la unidad de reproducción de los hongos que mantiene las características de la herencia. Presentan un aspecto típico para cada género y/o especie que permite distinguirlas de las células vegetativas del mismo hongo.

Clasificación de las esporas

Existen diversos tipos y se los puede caracterizar según:

A. **Morfología:** en esféricas, ovoides, piriformes, aciculares, helicoidales, oblongas, reniformes, vermiformes (scolescosporas), estrelladas (staurosporas), medialuna (allantosporas), etc. (fig. 78-1A).

B. **Número y disposición de sus células** (divisiones o tabiques): amerosporas, didimosporas, fragmosporas, dictiosporas, etc. (fig. 78-1A).

C. **Anatomía:** en general están compuestas por doble pared, una externa, el exosporio, y una interna, endosporio. La pared puede ser lisa o rugosa.

D. **Pigmentación:** esporas de colores claros (amarillas, verdes, rojas, etc.) que se denominan hialosporas. Esporas de colores oscuros (castaño, café, negro, etc.) llamadas feosporas.
En las feosporas el pigmento melánico se acumula en diferentes capas de sus paredes y le confieren su color característico. Otros pigmentos aromáticos como la esporopollenina le dan excepcional elasticidad, siendo muy resistentes tanto al ataque químico, como físico.

REPRODUCCION ASEXUAL

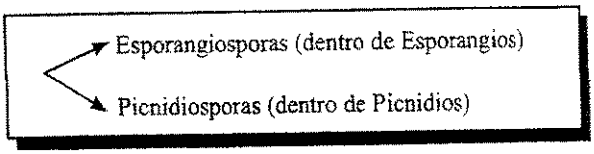
Esporas asexuales externas (conidios)

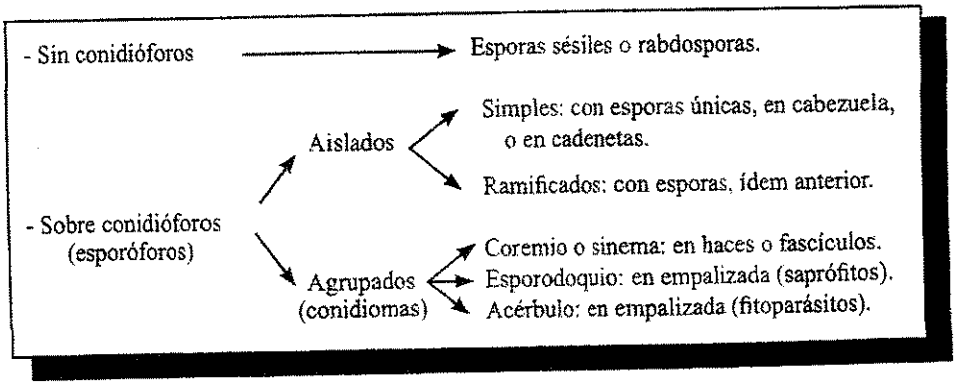
A partir de conidióforos diferenciados y no diferenciados.

Esporas asexuales internas

Estos cuerpos fructíferos se definen como:

1. **Esporangio** (Gr.: *sporos* = semilla, espora + *ageion* = recipiente): estructura a modo de saco cuyo contenido protoplasmático se convierte en gran cantidad de esporas (esporangiosporas). Hongos con micelio filamentoso continuo.
2. **Picnidio** (Gr.: *pyknon* = denso, concentrado + *idion* = sufijo diminutivo): cuerpo fructífero asexual, hueco, pared peridial plectenquimatosa y recubierto interiormente por esporóforos formadores de picnidiosporas.





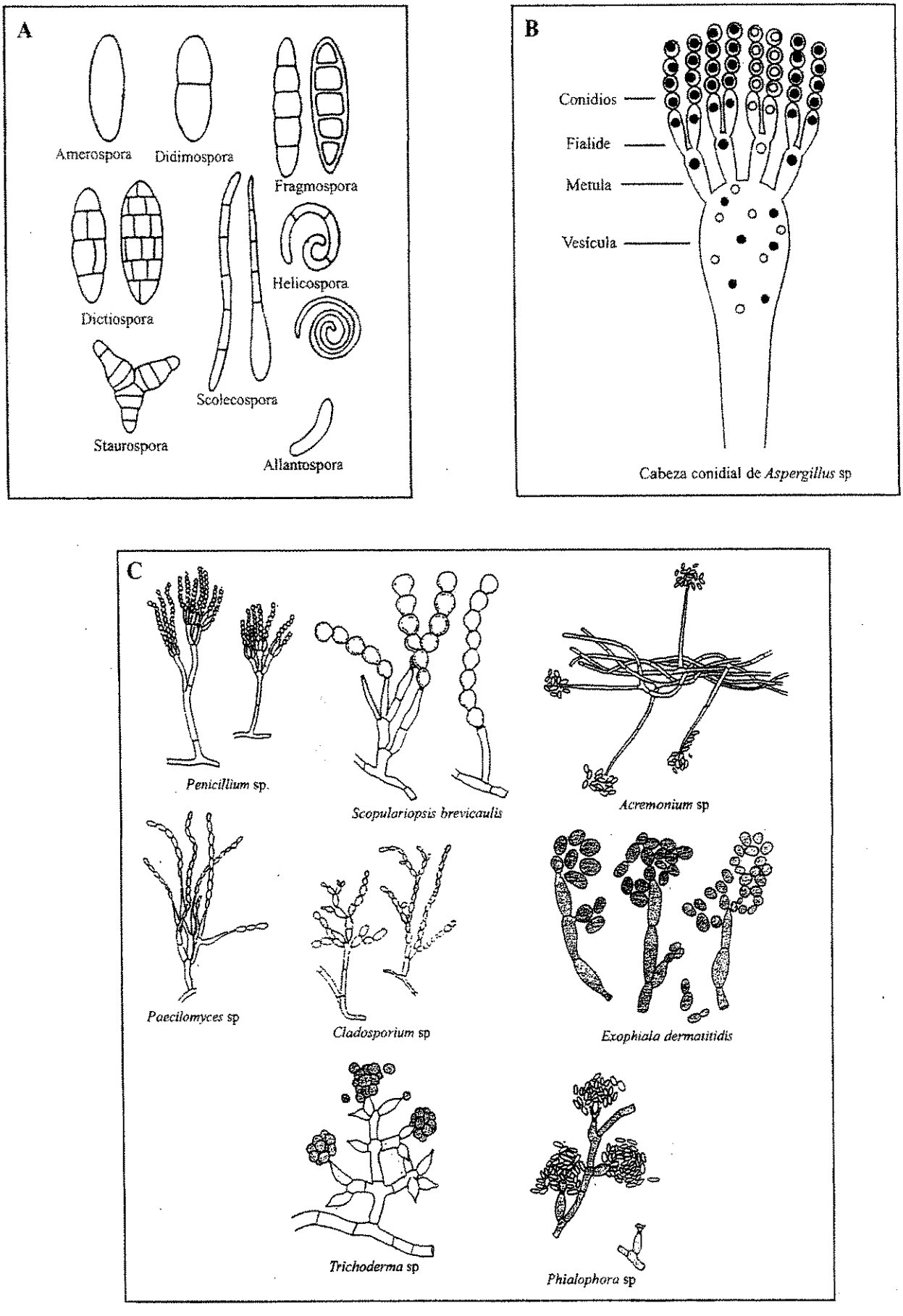


Figura 78-1. *A*, Diferentes tipos de esporas por su forma y tabicación. *B*, Ejemplo de reproducción conidial en la clase-forma *Deuteromycetes*. *C*, Ejemplos de reproducción conidial (asexual) de mohos ambientales.

Estos frutos los producen mohos de micelio filamentoso tabicado de hábitat terrestre.

REPRODUCCION SEXUAL

Esporas sexuales internas y externas

La reproducción sexual de los hongos se realiza como consecuencia de la unión de dos núcleos compatibles (gametas, protoplastos, oidios, etc.). Esta acción se produce en tres etapas fundamentales.

- **PLASMOGAMIA** (Gr.: *plasma* = un objeto moldeado + *gamos* = matrimonio, unión): la fusión de dos protoplastos; reunión en una célula de dos núcleos haploides (**n+n**).
- **CARIOGAMIA** (Gr.: *karyon* = nuez, núcleo + *gamos*): fusión de dos núcleos, originando un núcleo diploide (**2 n**).
- **MEIOSIS** (Gr.: *meiosis* = reducción): dos divisiones nucleares consecutivas, una de las cuales es reduccional. Como resultado de la misma se producen cuatro núcleos haploides (**n**).

Para la unión de dos núcleos compatibles, gametas o células con función de gametas (+) y (-) o (**A**) y (**a**) existen distintos mecanismos de copulación, siendo los más comunes:

a. Copulación gametangial
b. Contacto gametangial
c. Espermatización
d. Somatogamia

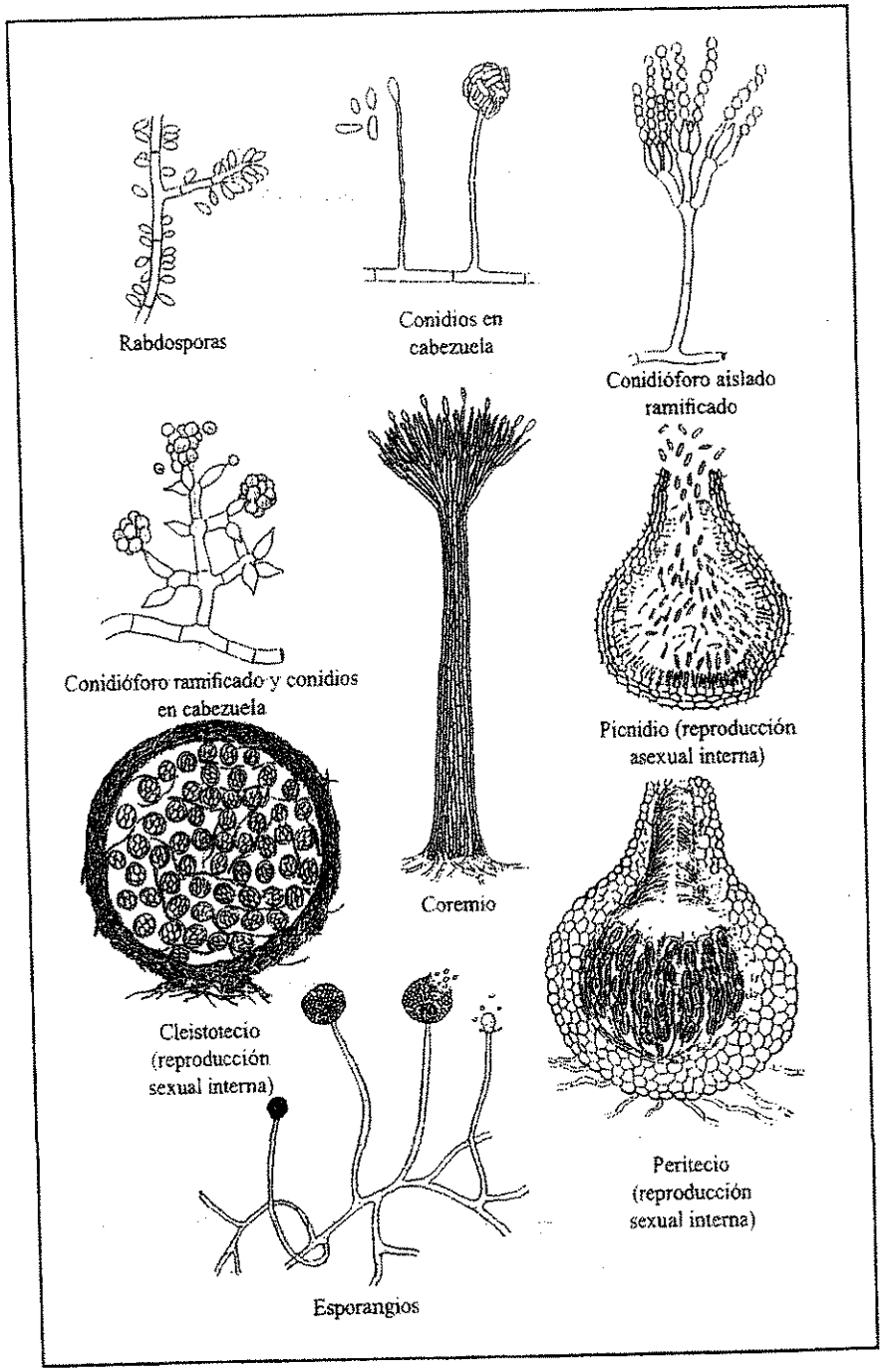


Figura 78-2. Esquema de algunos tipos de fructificación.

Estos mecanismos son posibles si además se tiene en cuenta la sexualidad de los hongos y su compatibilidad sexual, clasificándolos según:

A. Organos sexuales presentes:

1. *Monoicos o hermafroditas*, donde cada thallo lleva los órganos masculinos y femeninos.
2. *Dioicos*, en los cuales algunos thallos llevan sólo órganos masculinos y otros sólo los órganos femeninos.
3. *Sexualmente indiferenciados*, se producen estructuras masculinas o femeninas sexualmente funcionales, pero morfológicamente indistinguibles entre sí.

B. Compatibilidad sexual:

1. *Homotálicos* (+) y (-) en el mismo thallo.
2. *Heterotálicos* (+) y (-) en diferentes thallos.
3. *Homo-heterotálicos* (secundariamente homotálicos) (+) y (-) en un mismo thallo y en thallos diferentes.

FORMACION DE ESPORAS SEXUALES

Los núcleos haploides resultantes de la reducción cromosómica, se rodean a partir del citoplasma de una membrana propia, originando esporas sexuales que pueden ser internas o externas.

Esporas sexuales internas

Ascosporas (Gr.: *ascos* = saco + *sporos* = semilla, espora: espora que resulta de la meiosis y es llevada dentro de un asco.

Las ascosporas varían de tamaño, forma, color y otros caracteres según la especie. La estructura de su pared, su forma, su mecanismo de dispersión, etc., son la base para la clasificación de los Ascomycetes.

Formación de las ascosporas

Eumycetos de micelio unicelular (levaduras): los mecanismos más comunes son somatogamia y partenogénesis. Por fusión de dos células de polaridad distinta (núcleos compatibles), se produce la plasmogamia, luego la cariogamia y posteriormente la meiosis dentro del cigoto, que por maduración posterior se forma el asco, el cual contiene ascosporas cuyo número depende de las divisiones nucleares que se han producido y del desarrollo ulterior de los núcleos. El número corriente de ascosporas es de 4-8 por asco, aunque puede ser mayor. Este grupo de hongos está clasificado dentro de la subclase Hemiascomycetidae (ascos sueltos sin formación de frutos).

Eumycetos de micelio filamentoso tabicado (MFT): producen gametangios uni o multinucleados, morfológicamente distintos; el *anteridio* masculino y el *ascogonio* femenino. Por contacto gametangial los núcleos pasan del anteridio (♂) a ascogonio (♀) a través de un poro formado en el punto de contacto de los gametangios, o a través del *tricogino*, prolongación del ascogonio. Se aparean y luego de la cariogamia y meiosis se rodean de pared propia, quedando constituido el asco libre con las ascosporas en su interior.

En otro caso luego del apareamiento de los núcleos, el ascogonio produce una cantidad de hifas ascógenas con células binucleadas, como resultado de la mitosis conjugada que el par de núcleos sufre sucesivamente, formándose en los extremos de las mismas los ascos con las ascosporas (fig. 78-4). Después de haberse producido la plasmogamia y como respuesta a un estímulo sexual, se activan las hifas somáticas alrededor de los órganos sexuales y se forma un tejido prosenquimático o seudoparenquimatoso que va a constituir el *ascocarpo* (ascos reunidos en frutos) y que, de acuerdo a su forma y constitución, puede ser:

- **Cleistotecio:** ascocarpo completamente cerrado, con ascos esféricos, dispuestos irregularmente en su interior (fig. 78-2).
- **Peritecio**: ascocarpo cerrado por una pared propia y un poro en el extremo que constituye un verdadero ostíolo, a través del cual salen las ascosporas. Los ascos son alargados y están dispuestos sobre un estrato fértil o *capa himeneal*. Entre los ascos existen hifas alargadas, las *parafisis* y cubriendo el interior del ostíolo (orificio natural) las *perifisis*, que colaboran con la salida de ascos y ascosporas al exterior. En ambos casos son hifas estériles (fig. 78-5).
- **Apotecio**: con características semejantes al anterior, pero en la madurez se abre en forma de copa, dejando la capa himeneal y sus ascos expuestos. Este fruto se puede observar fácilmente sobre algunos sustratos en la naturaleza y no en los medios de cultivos artificiales de laboratorio.
- **Ascostroma**: es otro tipo de fruto (Gr.: *askos* = semilla + *stroma* = lecho); es un ascocarpo estromático que lleva los ascos directamente dentro de lóculos dispuestos en distintos niveles en el interior de un estroma o cuerpo. No es fácil de encontrar en medios de cultivo comunes.

Formación de zigosporas

Zigospora (copulación gametangial) (Gr.: *zygos* = yugo + *sporos* = semilla); espora de resistencia que se origina a partir de la fusión de dos gametangios en los Zygomycetes. El micelio de estos hongos es continuo (MFC).

La reproducción sexual se lleva a cabo sólo en el caso en que, con determinadas condiciones externas, se encuentren dos thallos compatibles, es decir, un micelio tipo "+" y otro tipo "–". En la línea de contacto de los micelios se forman ramas laterales particulares, los zigóforos que crecen uno hacia otro hasta que se tocan por sus puntas, se aplanan y allí se produce la plasmogamia, formándose además un septo que separa cada gametangio de su suspensor, las masas citoplasmáticas se mezclan y la célula de fusión se rodea de una pared de varias capas, transformándose en una espora de resistencia llamada zigospora. Durante cierto tiempo, una parte de los núcleos se reúnen por parejas y los núcleos restantes degeneran. Pocas parejas de núcleos, a veces una sola, completan finalmente su fusión (cariogamia) (fig. 78-6).

Formación de oosporas

Oosporas (copulación planogamética heterogámica). En ésta, la reproducción sexual comienza con la estructuración de los *oogonios* (gametangios femeninos), que surgen de ramas laterales cortas de las hifas principales como vesículas esféricas ricas en plasma y núcleos. El plasma se divide en porciones unicelulares esféricas, las oosferas (células ovulares). Bajo cada oogonio, mientras tanto, surge como rama lateral de la misma hifa portadora, un anteridio. Cada anteridio dirigido por sustancias semejantes a las hormonas, encuentra un oogonio y cada uno de los extremos de las ramificaciones del tubo de fecundación emitido por el anteridio alcanza una oosfera, la cual queda fecundada por un núcleo masculino, formándose luego una oospora de doble pared. Esta fructificación es propia de los Oomycetes, hongos de micelio vegetativo diploide y hábitat acuático (no involucrados en la actualidad dentro del Reino Fungi).

Esporas sexuales externas

Basidiosporas: son esporas externas de origen sexual, que se forman sobre órganos denominados *basidios*.

Las basidiosporas germinan en el suelo u otros sustratos originando un *micelio primario*; cuando se encuentran dos de estos micelios primarios de diferente polaridad, se produce la copulación o plasmogamia (por somatogamia), de lo que resultan células binucleadas (dicariocitos) que serán el comienzo de la formación del *micelio secundario*, que se caracteriza microscópicamente por presentar formaciones en gancho o hebilla. Este micelio origina un plecténquima o primordium que va madurando y anatómicamente diferenciándose en un *basidiocarpo* (hongos de sombrero o frutos semejantes de los Basidiomycetes). En cierto momento y por estímulo sexual se interrumpe esta fase y las células distales (apicales) empiezan a diferenciarse; se agrandan, copulan sus núcleos y por meiosis y división cariocinética sincrónica, forman cuatro núcleos. Cada núcleo se rodea de protoplasma, migran a un esterigma, se sitúan en la parte superior externa del basidio rodeándose de membrana propia y constituyen así las *basidiosporas*. Los basidios y sus respectivas basidiosporas constituyen el micelio terciario que se encuentra ubicado en las laminillas de los hongos de sombrero o setas (Agaricales entre otros) (fig. 78-7A-D).

Frutos que contienen esporas sexuales

- Internas
  - Ascos sueltos
  - Cleistotecios
  - Peritecios
  - Apotecios
  - Ascostromas
  - Zigosporas
- Externas
  - Basidios

CLASIFICACION DE LOS HONGOS

Las categorías que se utilizan en la clasificación del Reino Fungi es igual a la del Reino Plantae (Reino Vegetal).

Desde el punto de vista práctico y rutinariamente se identifica a los hongos por sus características macro y micromorfológicas, aunque esto no es suficiente en muchos casos, debiéndose aplicar y combinar un sinnúmero de métodos y técnicas modernas, no siempre al alcance de todos los especialistas. Se suman a las características morfológicas (micelio vegetativo y de fructificación, ontogenia -origen- y tipo de esporas) y fisiológicas comunes (auxanogramas y zimogramas), aspectos bioquímicos y fisiológicos especiales como el estudio de metabolitos secundarios, ultraestructura, tipo de septos, biología molecular, y estudios de DNA genómico o extracromosómico como la ampliación de segmentos de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), uso de la ampliación aleatoria de segmentos de DNA (RAPD) y también composición antigénica (serotipos) de la pared celular en hongos de interés médico.

La taxonomía (sistemática) tiene un doble propósito:

- Asignar a los hongos un nombre de acuerdo con algún sistema internacionalmente aceptado.
- Indicar, tanto como sea posible, las mutuas relaciones de los hongos y también sus relaciones con otros organismos.

Nomenclatura: el nombre de los hongos se establece acorde con las Normas Internacionales de Nomenclatura Botánica. Cada especie de hongo lleva un nombre compuesto o binario, en griego o latín, cuyo primer componente, el género (en letra cursiva y primera con mayúscula) posee rango de sustantivo, mientras que el segundo, la especie (letras cursivas y en minúscula), actúa como adjetivo calificativo, por ejemplo *Schizosaccharomyces octosporus*, es el nombre de una levadura que significa "fisión-hongo-azúcar" y además produce ocho esporas (ascosporas) en su reproducción sexual.

Muchos hongos llevan nombres de micólogos famosos, que en general fueron sus descubridores o los que más trabajaron sobre sus características o propiedades. El nombre asignado a los hongos perfectos (reproducción sexual o teleomorfa) tiene prioridad sobre el o los nombres de la fase sólo asexual (imper-

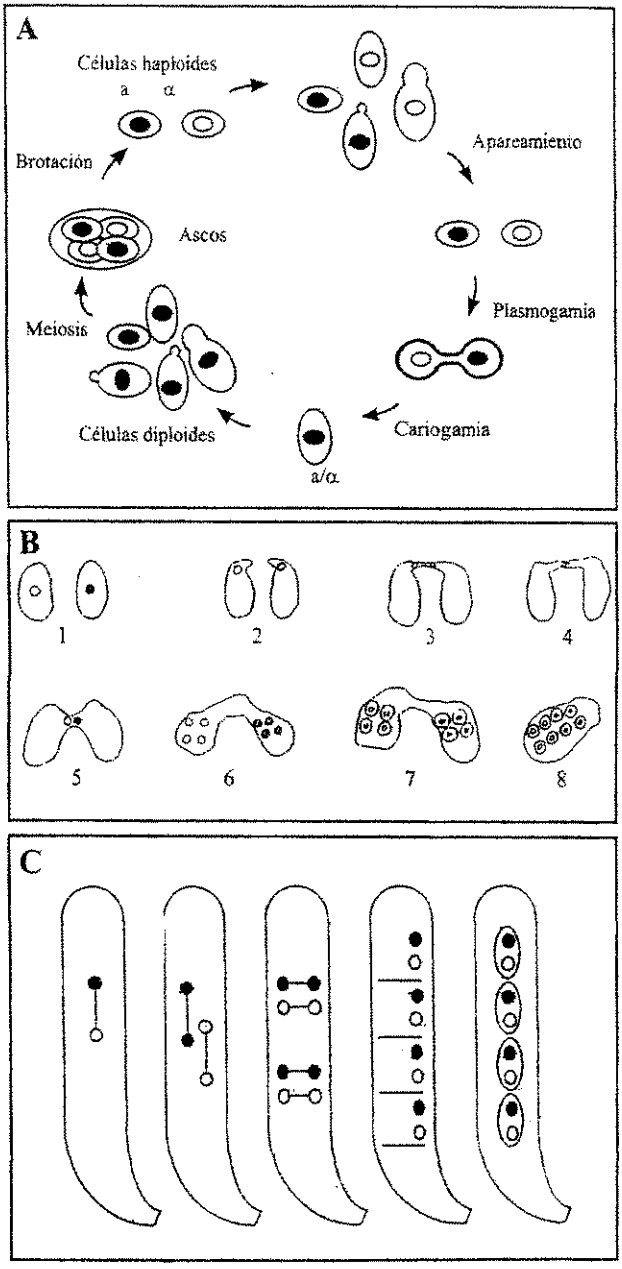


Figura 78-3. *A*, Esporulación sexual en Herniascomycetidae. *B*, Esquema del ciclo evolutivo sexual de *Schizosaccharomyces octosporus*. *C*, Sistema genético en Ascomycetes filamentosos. Desarrollo de ascosporas en *Neurospora tetrasperma*. Los núcleos resultantes provienen de una división meiótica.

fecta), por ejemplo *Filobasidiella neoformans* sobre *Cryptococcus neoformans*, *Pichia anomala* sobre *Candida pelliculosa*, *Arthroderma otae* sobre *Microsporum canis*, *Ajelomyces capsulatus* sobre *Histoplasma capsulatum*, *Emericella nidulans* sobre *Aspergillus nidulans*, entre otros. Estos nombres especiales de las formas perfectas (Ascomycetes y Basiomycetes), llevan a la confusión desde el punto de vista médico, puesto que, al fin y al cabo, las enfermedades micóticas del hombre y los animales siguen denominándose como aspergilosis, histoplasmosis, criptococosis, candidiasis, etc.

En la identificación y clasificación de mohos de micelio filamentoso continuo se siguen parámetros macro y micromorfológicos semejantes a los descritos anteriormente, por supuesto con los nombres de sus estructuras vegetativas y reproductivas características. En levaduras y hongos similares, la metodología es en mayor o menor grado la que se describe en el capítulo de Micosis superficiales, para la identificación de levaduras del género *Candida*.

Clasificación de los mohos según sus características morfológicas

Para la identificación de hongos miceliares, generalmente se utilizan **claves dicotómicas** en base a datos morfológicos y algunos fisiológicos, sujetos al criterio de cada autor.

En este sentido, para la identificación y clasificación de los mohos de micelio filamentoso tabicado, basado en su morfología y mecanismos reproductivos se realizan determinaciones de rutina, como:

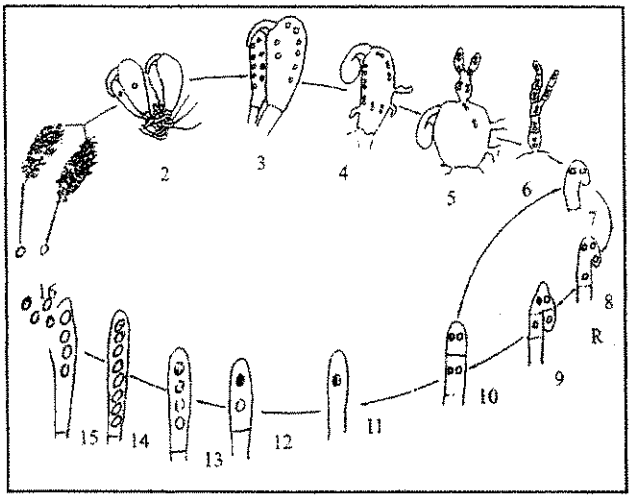


Figura 78-4. Ciclo evolutivo de un Euascomycete, con ascocarpos.

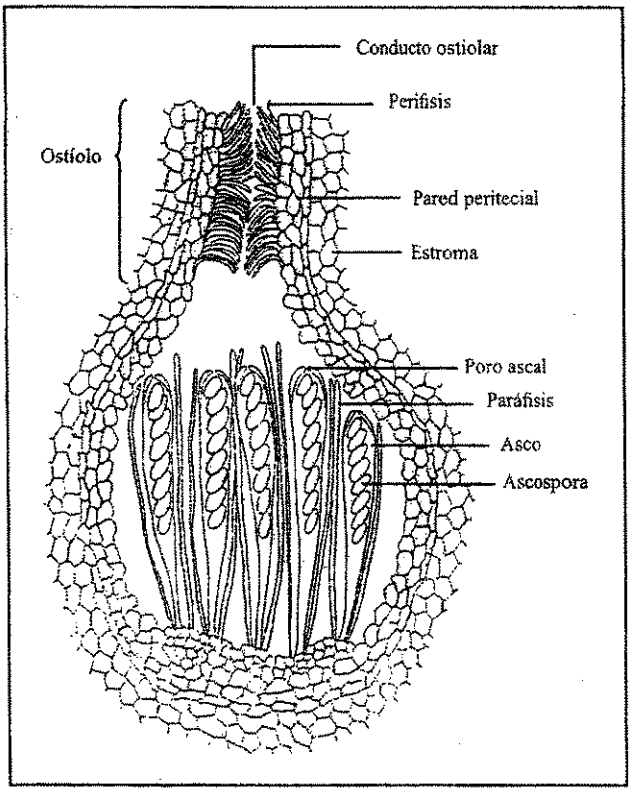


Figura 78-5. Esquema de un peritecio. Ascocarpo formado por hongos de MFT (subclase Euascomycetidae).

Elección del medio de cultivo o sustrato natural, según lo propuesto por el autor.

Temperatura de incubación: 25-28 °C

Caracteres de la colonia	*Velocidad de desarrollo* *Morfología* *Micelio: profundo o superficial.* *Color: anverso y reverso*
Conidioma (Capas fructíferas)	*Forma* *Estructura* *Tamaño*
Conidióforo	*Longitud* *Diámetro* *Pared: grosor, marcas, color.*
Célula conidiógena (Esterigmas-Fialides)	*Forma* *Tamaño* *Color*
Conidias	*Forma* *Tamaño* *Color* *Septos* *Topografía*
Ascocarpos (Ascomas)	*Forma* *Tamaño* *Complejidad morfológica* *Color*
Ascos (Ascas)	*Forma* *Tamaño* *Paredes* *Mecanismo de dispersión de ascosporas*
Ascosporas	*Tamaño* *Topografía* *Septos* *Color*
Esclerotes-esclerocios	*Tamaño* *Forma* *Color*

BIBLIOGRAFIA

Ainsworth CC, Sparrow F, Sussman A. The fungal cell. Vol. I. Academic Press. New York- San Francisco - London. 1963.

Ainsworth CC, Sparrow F, Sussman A. The fungal organism. Vol. II. Academic Press. New York - San Francisco- London. 1973.

Alexopoulus CJ. Introducción a la Micología. Eudeba. 1984

Barnett HI, Hunter BB. Illustrated genera of fungi. 3rd. ed. Minneapolis: Burgess Publishing Co. 1972.

Carmichael JW, Kendrick WB, Conners IL, Sigle L. Genera of Hyphomytes. The University of Alberta Press. Edmonton. Alberta. Canadá. 1980.

Elliot CG. Reproduction in Fungi. Genetical and physiological aspects. Chapman & Hall. London. Glasgow. Weinheim. New York. Tokyo. Melbourne. Madra. 1994

Gaumann-wyn D. The fungi. Ed. Hafner Publishing Company. New York- London 1952.

Kreger Van Rig MJW. The Yeasts. A taxonomic study. The Netherlands. Elsevier Science Publishers. B.V. Amsterdam. 1984.

Muller E, Loefler W. Micologia. Manual para naturalistas y médicos. Ed. Omega S.A. Barcelona. España. 1976.

Negroni P. Morfología y biología de los hongos. El Ateneo. Buenos Aires. Argentina. 1938.

Verna L, Herrero J. Micologia. El Ateneo. Buenos Aires. 1952.

Phaff HJ, Miller MW, Mrak EM. The life of yeasts. 2 ed. Harvard university Press. Cambridge. Massachusetts. 1968.

Capítulo 79

TECNICAS, MATERIALES, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS USADOS EN MICOLOGIA MEDICA

Enso Hugo Reinoso,
Teresa Rojas Flores, Eleatrice María de las Mercedes Gatti

Las técnicas micológicas están especialmente destinadas a demostrar la morfología de los hongos en su aspecto macro y/o micromorfológico (microscópico). Para este fin es necesario contar con algunos materiales como: ansas en anillo, en gancho, espátulas, agujas de disección, portaobjetos, cubreobjetos, líquidos de montar, escala micrométrica graduada, etc.

En general, los preparados se hacen en fresco entre porta y cubreobjetos adicionando una gota de líquido de montar como: Gueguén, Patterson, Lactofenol o inclusive una gota de solución fisiológica.

Los medios de cultivo utilizados para aislamiento y crecimiento de hongos son ampliamente conocidos como agar miel de Sabouraud, agar glucosa de Sabouraud, Czapeck-dox, agar papa glucosado, etc.

Las temperaturas de incubación son de 28 y 37 °C según se trate de cepas con crecimiento monofásico o difásico (incubando a una o ambas temperaturas) o de muestras vinculadas con micosis superficiales o profundas. Los hongos oportunistas y patógenos primitivos productores de micosis profundas crecen a ambas temperaturas. En cambio, los ambientales y los que sólo producen micosis superficiales deben ser incubados a 25-28 °C. Los hongos, a diferencia de las bacterias comunes tienen crecimiento lento, con tiempos de incubación que van de 7 a 60 días, aunque las colonias de levaduras pueden identificarse en menor tiempo.

MATERIALES DE USO RUTINARIO EN MICOLOGIA MEDICA

- *Ansa en anillo*: para trabajar con hongos tipo levaduriformes.
- *Ansa en gancho*: para trabajar con hongos tipo "mohos" (filamentosos).
- *Espátulas*: para cortar el medio de cultivo o sembrar por estría en profundidad.
- Agujas de disección: para ayudar a disgregar o separar el material sobre el portaobjetos y sembrar por punción.
- *Escala micrométrica graduada*: medición de células y otros elementos fúngicos.
- *Tubos de ensayo de borosilicato*: existe un sinnúmero de tamaños, aunque a nuestro criterio el de 170 x 17 mm es el que mejor se adapta al trabajo en micología.
- *Placas de Petri*: el tamaño estándar (110 x 15 mm) de borosilicato o plástico descartable, se utiliza para cuantificar hongos en muestras especiales (orina, LCR, agua, etc.).

Líquidos de montar

Tanto el Gueguén, líquido de Amman, PHOL y Patterson son de gran valor para disgregar materiales en fresco (porta y cubreobjetos), en especial cultivos u otros elementos fácilmente disgregables.

Gueguén: con este líquido se logra muy buen contraste de los elementos fúngicos; se observan tanto micelios como frutos con un tinte azul claro o celeste, vacuolas de lípidos (color rosa) y elementos de reserva como los polisacáridos de alto peso molecular (color caoba-marrón claro).

Líquido de Amman (lactofenol azul de algodón): ablanda y tiñe de celeste azulado diferentes elementos fúngicos.

PHOL: solución del formol (4%), azul de metileno (3%) y glicreol, produce resultados similares al anterior.

Patterson: en concentraciones de 20-40% en calor o sólo lactofenol diluido en frío se usa para observar los hongos por contraste y refringencia ya que el reactivo es incoloro.

Hidróxido de potasio: se usa para ablandar y decolorar materiales queratínicos y/o esclerosados.

TOMA DE MUESTRA PARA DIAGNOSTICO DE MICOSIS SUPERFICIALES

Piel y sus faneras

Se higieniza localmente con agua y jabón y en caso necesario se desengrasa con alcohol isopropílico con la ayuda de gasa o algodón y se toma la muestra con bisturí, lanceta o pinza, especialmente de los bordes de la lesión, los pelos rotos y las uñas distróficas. Se envían al laboratorio en pequeños frascos de vidrio estériles, entre porta y cubreobjetos o en sobres hechos con papel limpio (preferentemente de color blanco).

Mucosas y conducto auditivo

Estas muestras se toman con hisopos estériles que luego deben ser humectados con unas gotas de agua destilada o solución fisiológica estéril para su mejor conservación. Estas muestras deben ser enviadas lo más pronto posible al laboratorio para su procesamiento, caso contrario se deben guardar en un lugar fresco (heladera 5 °C).

Material de exéresis y biopsias en general

Debe ser tomado en las condiciones de asepsia que requiere cualquier examen microbiológico y ser enviado de inmediato al laboratorio. Se lo puede conservar algún tiempo en la heladera con el agregado de 0,5 cc de solución fisiológica estéril.

IMPORTANTE: las muestras deben llegar al laboratorio perfectamente rotuladas y con la correspondiente solicitud de examen (según protocolo impreso) con firma, aclaración del médico y fecha. Estos requisitos deben ser cumplimentados de rutina para la aceptación y procesamiento de las muestras.

Los resultados finales serán informados después de los 30 días de procesada la muestra; esto no significa que permanecerán ocultos en este período los posibles parámetros encontrados, sino por el contrario, una buena relación entre los distintos servicios y el laboratorio de micología médica, permitirá al médico conocer verbalmente y por anticipado la marcha de las investigaciones realizadas por el laboratorista.

El formol no debe utilizarse cuando se requieren estudios microbiológicos.

METODOS DIAGNOSTICOS DE LABORATORIO

Se basan fundamentalmente en:

Observación microscópica directa entre porta y cubreobjetos

Material biológico sobre portaobjetos + (HO)K 10-40% + calor (llama veladora del mechero de Bunsen).

Colocar el cubreobjetos y observar luego de 5-30 minutos (10x o 45x aumentos de objetivos)

Material biológico sobre portaobjetos + Lactofenol + cubreobjetos (en frío). Observar luego de 30 o 60 minutos (10x, 45x aumentos).

Características tintoriales

Todos los eumycetos son grampositivos; no obstante, la tinción de Gram no es de uso rutinario, por el contrario la observación microscópica directa entre porta y cubreobjetos con una gota de (HO)K 10-40% o lactofenol es la técnica más utilizada en el laboratorio de micología médica, para la investigación de hongos de piel y faneras.

Cuando se sospecha candidiasis de mucosas, la tinción de Gram ayuda a identificar microscópicamente a las levaduras y seudohifas.

Cultivos y características culturales

Los materiales de origen biológico se siembran en medios especiales con el agregado de antibióticos.

La gran mayoría de los hongos (mohos y levaduras) crecen en medios apropiados a temperatura ambiente (20 y 30 °C). A esta temperatura desarrollan los agentes de las micosis superficiales (óptimo 28 °C) y también las formas saprófitas de los hongos patógenos primitivos (*Histoplasma capsulatum, Sporothrix schenckii, Paracoccidioides brasiliensis* y otros).

A 37 °C se aíslan los hongos oportunistas y las formas parasitarias de los agentes de micosis profundas mencionados, ya que tienen la particularidad de crecer con distinta morfología a una u otra temperatura (dimorfismo). En los dermatofitos esto no ocurre.

Los medios de cultivo de elección son:

Agar papa glucosado.
Agar Sabouraud + antibiótico
Agar Sabouraud + antibiótico + cicloheximida
Dermatofito Test Medium (DTM)
Lactrimel (Leche, harina, miel)
Medio de arroz

Aislamiento unicelular

Consiste en obtener un cultivo del hongo en estudio a partir de una sola célula o espora, garantizando así la pureza de la cepa.

Se hace una suspensión de células en agua estéril, suficientemente diluida como para encontrar un solo elemento por campo microscópico.

Se disemina 0,1 ml de la suspensión sobre una placa de Petri con una delgada capa de medio de cultivo; puede trabajarse con espátula de Drigalsky o directamente sembrando por oclusión en agar (Pour plate).

Se observa a través del fondo de la caja con objetivos de poco aumento hasta enfocar una célula; se reemplaza la lente del microscopio por un objetivo marcador (punta de diamante) marcando el vidrio en la zona elegida. Luego se toma el trocito de agar que contiene el hongo y se siembra en un tubo o placa de Petri con medio de cultivo.

Si los elementos fúngicos son muy pequeños, se incuba el material unas horas hasta que germine y adquiera un tamaño mayor, luego se continúa en las condiciones indicadas.

MEDICION DE OBJETOS

Existen para este fin dos clases de escalas. Una escala tipo, que consiste en un portaobjetos grabado de la siguiente manera: 1 mm lineal dividido en 100 partes iguales, lo que hace que cada división posea 10 micrómetros de longitud, y otra escala arbitraria grabada en un pequeño disco de vidrio que se coloca en el diafragma del ocular.

Se coloca en la platina el micrómetro objetivo (escala tipo) y se hacen coincidir las líneas de ambas escalas, para determinar así el valor en micrómetros de cada división del micrómetro ocular.

Debe establecerse para cada aumento del ocular el valor correspondiente (10x, 12,5x, 15x). Para medir el objeto en estudio se remplaza el micrómetro objetivo (platina) por el preparado en cuestión y se observa a cuántas divisiones del ocular equivale.

Multiplicando el número de líneas por el valor en micrómetros de cada una, se obtienen las medidas o tamaños de los materiales investigados.

Existen otras escalas para medición de objetos. Por ejemplo, algunas escalas cuadriculadas, donde es posible determinar con mayor facilidad y en el mismo tiempo el largo y ancho de los elementos.

CONTEO TOTAL DE MICROORGANISMOS

Este método se realiza en la cámara de Newbauer y permite expresar el número de células en organismos unicelulares o esporas (hongos filamentosos) que existen en 1 ml de muestra (suspensión) (figs.79-1 y 79-2).

Area de la cámara: 9 mm^2
Profundidad de la cámara: 0,1 mm

Metodología para cargar y montar la cámara

1. Monte la laminilla de vidrio en la cámara para recuento presionándola cuidadosamente para colocarla en su sitio. Cuando la laminilla se ha montado de forma adecuada, entre las dos superficies de vidrio se observan unas bandas de color llamadas "anillos de Newton".
2. Homogeinice la suspensión de células. Por medio de una pipeta Pasteur llene la cámara para recuento. Evite llenarla más allá del área cuadriculada.

IMPORTANTE: si el líquido se derrama en el canal que se encuentra entre las dos cámaras, la operación se deberá repetir: quite y limpie la laminilla de vidrio; limpie también la cámara para recuento y llénela con otra gota.

3. Deje reposar la cámara para recuento sobre la mesa de trabajo durante 3 minutos con el fin de que las células o esporas se asienten.
4. Coloque la cámara en la platina del microscopio. Utilice el objetivo de 10x (con oculares 6x y 10x). Reduzca la cantidad

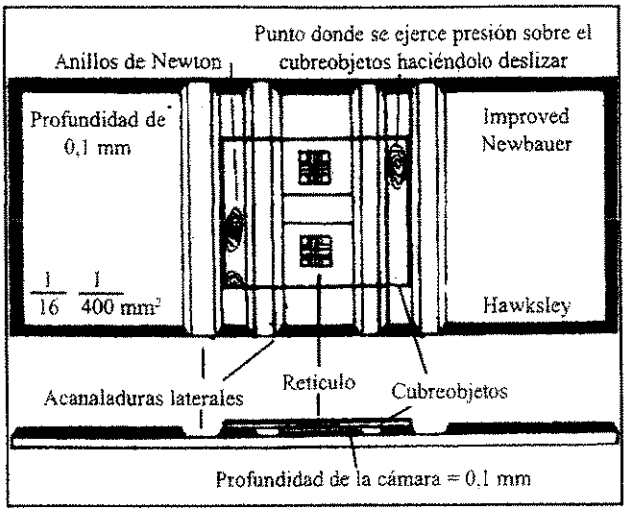


Figura 79-1. Cámara de Newbauer.

de luz que entra en el condensador. Enfoque la cuadrícula de la cámara y las células o esporas que vaya a contar.

Explicación del cálculo

Cada uno de los 4 cuadros en que se cuentan las células tiene un área de 1 mm^2; por lo tanto toda el área contada mide 4 mm. La profundidad de la cámara es de 0,1 mm; en consecuencia, el volumen en que se cuentan las células es de 4 x 0,1 = 0,4 mm^3. De este modo la división entre 4 y la multiplicación por 10 dará el número de células que haya en 1 mm^3 de la suspensión. Si usted ha tenido que realizar una dilución previa al conteo, tendrá que tenerla en cuenta al realizar los cálculos. Por ejemplo: si la misma fue de 1:20 deberá multiplicar por 20 para dar el número de células en 1 mm^3.

Por último, es necesario multiplicar por 10^3 para poder expresar la cantidad de células en 1 cm^3 = 1 ml.

Esto se puede resumir como se indica a continuación:

$$\text{Cel/ml} = \frac{\text{total de células x 10 x 20 (dilución)}}{4} \times 10^3$$

Ejemplo: en los 4 cuadros se cuentan 188 células. Por lo tanto, el número de células/mm^3 de suspensión es:

$$188 \times 10 \times 20 \text{ (factor de dilución)} = \frac{188 \times 50}{4} = 9{,}400$$

Por lo tanto, el

$$\text{número de células/ml} = \frac{188 \times 10 \times 20 \times 10^3}{4}$$

$= 9400 \times 10^3$ que corresponde a **$9{,}4 \times 10^6$ cel/ml**

MICROCULTIVOS

Se realizan cuando es necesario observar la normal disposición del micelio de fructificación o para seguir el crecimiento de esporas o algún elemento en particular.

Existen algunos materiales y métodos como (fig. 79-3):

1. Gota pendiente usando portaobjetos excavados de Koch.
2. Célula de Boettcher que consta de un portaobjetos, un aro de 0,5 cm de altura y un cubreobjetos.
3. Célula de Ranvier, consiste en un vidrio grueso (como un portaobjetos) con una depresión en el centro.
4. Entre porta y cubreobjetos: utilizando un pequeño trozo de medio de cultivo sólido. Este método consiste en preparar una placa con medio de cultivo sólido, luego cortar el agar en pequeños cuadrados que se depositan

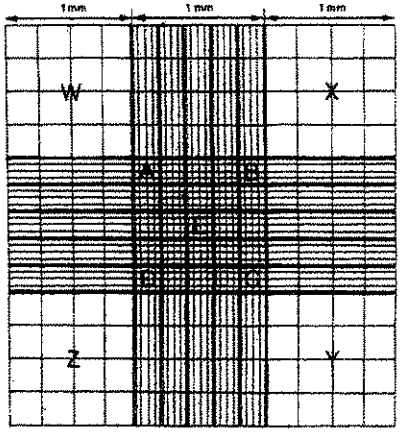


Figura 79-2. Retículo de la cámara de Newbauer.

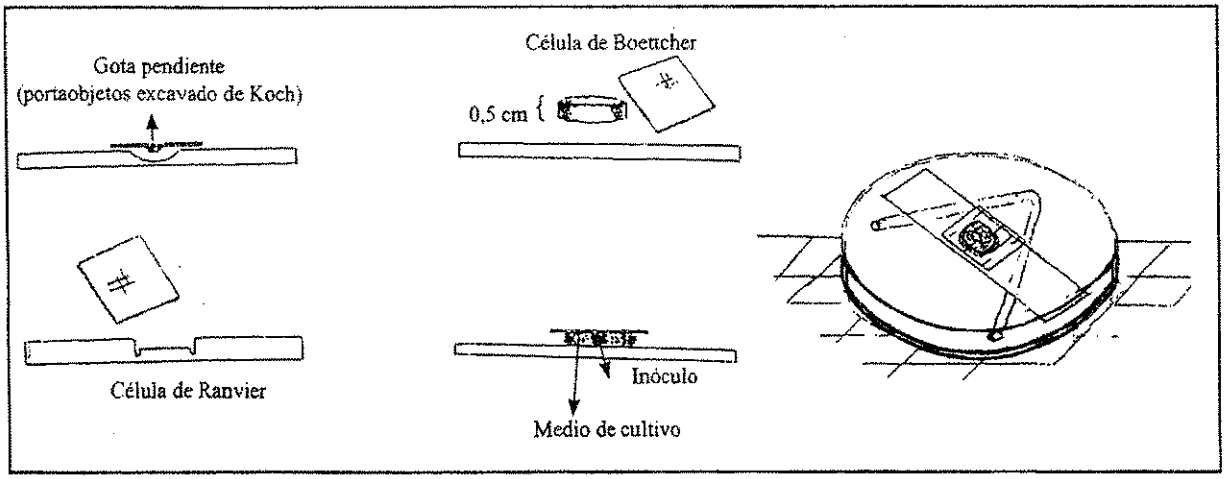


Figura 79-3. Microcultivos.

sobre un portaobjetos estéril (o flameado) por su cara inferior, se inocula luego la cepa en estudio y finalmente se coloca el cubreobjetos estéril y se incuba a 28 °C dentro de un recipiente estéril con glicerina al 20% en agua, para mantener la humedad. Lo más común es preparar una caja de Petri con una pequeña varilla de vidrio en "U" como soporte y un papel secante humedecido en el momento de incubar. Todos los materiales mencionados deben estar esterilizados por autoclave 120 °C, durante 15 a 20 minutos.

Se puede fundir el medio de cultivo y con una pipeta o ansa en anillo se lo coloca sobre portaobjetos cubriendo la parte central del mismo, pero dejando libres sus extremos. Después de solidificado el medio se inocula con la cepa en estudio a partir de cultivos jóvenes (crecimiento activo en medios líquidos o sólidos) sembrando pequeños inóculos sobre la superficie solidificada. Luego se coloca un cubreobjetos estéril y se prosigue como en el método anterior.

BIBLIOGRAFIA

Alexopoulus CJ. Introducción a la Micología. Eudeba. 1984.

Gauman N, Wyn D. The fungi. Ed. Hafner Publishing Company. New York- London 1952.

Golvan YJY, Drouhet E. Técnicas en Parasitología Micología. Ed. Jims. Barcelona, España. 1977.

Heber W, Hauss H., Mycologische Techniken in der ärztlichen Praxis. Copyright Schwerzech-Verlag München. Germany. 1975.

Kreger Van Rig MJW. The Yeasts. A taxonomic study. The Netherlands. Elsevier Science Publishers. B.V. Amsterdam. 1984.

Langeron M. Précis de Mycologie. Masson et Cie., éditeurs. 120, Boulevard Saint-Germain, Paris. 1952.

Negroni P. Morfología y biología de los hongos. El Ateneo. Buenos Aires. Argentina. 1938.

Verna L., Herrero J. Micología. El Ateneo. Bs. As. 1952.

Zapater RC. Atlas de Diagnóstico Micológico. Librería El Ateneo Editorial. 2da edición. Buenos Aires, 1965.

Capítulo 80

MICOSIS SUPERFICIALES

Enso Hugo Reinoso, Susana Beatriz Córdoba, Andrea Giordano, J. Enrique Renner

El término micosis fue empleado por primera vez por Virchow en 1858 para designar a las afecciones del hombre y los animales producidas por *Eumycetos* (hongos).

CLASIFICACION

Las micosis pueden ser superficiales o profundas, según se localicen en la capa córnea de la piel y sus faneras, mucosas y semimucosas o por el contrario, más profundamente en la dermis, tejido celular subcutáneo y diversos órganos del cuerpo humano y animal.

ETIOLOGIA

La mayoría de los agentes etiológicos de las micosis superficiales son queratófilos. Esta propiedad les confiere la jerarquía de parásitos absolutos de piel y faneras del hombre y los animales, aunque también pueden proliferar saprofíticamente sobre detritos queratínicos depositados en el suelo (corrales).

Estos hongos persisten por transmitirse del sujeto enfermo al sano, por contagio directo o indirecto, produciendo lesiones poco inflamatorias, sin riesgo para la vida del paciente, pero contagiosas, originando focos epidémicos en familias, escuelas, asilos, criaderos de animales, majadas, rebaños, etc.

Por el contrario, en las micosis profundas, los hongos en su mayoría invaden los pulmones y secundariamente por diseminación linfática y sanguínea parasitan otros órganos internos, músculos, huesos, articulaciones e inclusive tienen tendencia a manifestarse más superficialmente (piel y mucosas).

Estos hongos actúan como parásitos accidentales, ya que viven en forma saprófita en el suelo, sobre restos vegetales o animales, e infectan a éstos y al hombre (fuente común exterior) mediante la inhalación o inoculación traumática. Este grupo de hongos es de distribución limitada a zonas con características geográficas y climáticas particulares, donde influyen la temperatura, la humedad, el tipo de suelo, etc. denominadas **reservarias,** o **áreas endémicas** cuando se han confirmado casos clínicos.

FUENTES DE INFECCION

Están en relación con la etiopatogenia de las micosis.

Micosis superficiales

Algunas son propias del hombre y otras de los animales, pero otras veces son comunes a éstos (caninos, felinos, vacunos, equinos, etc.) y al hombre y sus agentes mantienen su ciclo vital por contagio interhumano, interanimal, del animal al hombre, del suelo a éstos y, rara vez, del hombre al animal (figs. 80-1 y 80-2).

Causas predisponentes

La edad, el sexo, las condiciones higiénico-ambientales y las alteraciones del estado general (metabólicas, inmunológicas, traumáticas) influyen tanto en las micosis superficiales como en las profundas.

PUERTAS DE ENTRADA

Superficiales (capa córnea)

Se originan por contacto *directo*, animal por animal, hombre por animal, hombre por hombre; o *indirecto*: hombre-suelo por animal, animal-fomites por animal, incluso por picadura de insectos.

Son ejemplo de contagio las microsporias, tricofitias, dermatofilosis, etc.

Subcutáneas

Se producen por inoculación a través de micro o macrotraumas. Por ejemplo: esporotricosis, micetomas, rinosporidiosis, etc.

Profundas

Tienen lugar por inhalación de elementos fúngicos infectantes a partir de una misma fuente de infección exógena. Se infecta primariamente el pulmón y luego se produce la diseminación a otros órganos por vía linfática o hemática (micosis profundas sistémicas). Por ejemplo: histoplasmosis, coccidioidomicosis, criptococosis, etc. Estas también pueden ingresar por traumatismo cutáneo.

CLASIFICACION DE LAS MICOSIS

Las micosis se clasifican según la localización de la afección y la respuesta de la infección generada por el hospedador (tabla 80-1).

Micosis superficiales propiamente dichas

Afectan exclusivamente la capa córnea de la piel o los cabellos, con reacción inflamatoria nula o escasa por parte de los tejidos. Ejemplos: pilonodosis (piedra blanca y piedra negra), pitiriasis.

Micosis superficiales

Afectan la zona queratinizada de la piel y los anexos (pudiendo destruirlos), y originan reacciones inflamatorias en los tejidos del hospedador (inmunidad celular y/o humoral). Ejemplos: dermatofitosis ("tiñas") de piel, pelos y uñas, candidiasis mucocutáneas y ungueales, entre otras.

Micosis subcutáneas

Afectan el tejido celular subcutáneo y/o submucoso, en general están más o menos localizadas, con participación linfática y de otros tejidos (incluso huesos). Ejemplos: rinosporidiosis, entomophthoromicosis, esporotricosis, cromomicosis, micetomas, otras.

Micosis profundas o sistémicas

Afectan a órganos, aparatos y sistemas, en ocasiones en forma extensa, múltiple y diseminada (incluso con manifestaciones cutáneas), originadas por hongos patógenos primitivos y oportunistas. Ejemplos: histoplasmosis, coccidioidomicosis, criptococosis, aspergilosis, candidiasis sistémicas, feohifomicosis sistémicas, entre otras.

enfermo con lesiones mínimas (subclínicas), siendo la fuente más frecuente de infección para el hombre y otros animales.

Pese a la importancia del contagio directo parece ser más significativo el contacto con objetos inanimados como: camas, arneses, cepillos, peines, peladoras u otros elementos; así, algunas células fúngicas pueden permanecer viables durante 5 a 7 años.

La aparición de la enfermedad en los animales expuestos (hospedadores) depende de un grupo de condiciones denominados "factores de receptividad", que incluyen: edad, barrera mecánica, especie animal y raza.

Edad: los animales jóvenes (al igual que los niños) son más susceptibles a la enfermedad y con mayor tendencia a manifestar lesiones clínicas que los adultos. Esta predisposición puede deberse a alteraciones bioquímicas de la piel, crecimiento del pelo y remplazo del mismo y también al estado fisiológico del hospedador. En este caso la edad parece aumentar la capacidad de respuesta inmunológica.

Barrera mecánica: la barrera mecánica de la piel, mucosas intactas, y la actividad fungistática del sebo y el sudor son necesarios para inhibir la invasión micótica.

Especie: los agentes etiológicos poseen afinidad por una u otra especie animal. Esta infección es favorecida por el estado general del paciente, la nutrición, las enfermedades concomitantes y la raza.

La duración de la incubación varía entre 8 y 10 días en el perro y el gato y hasta 4 semanas en el bovino. El curso de la enfermedad es largo con una extensión de las lesiones entre 15 y 20 días. Se mantiene estacionario otros 15 a 20 días culminando el proceso (crecimiento de nuevos pelos) en 2 a 3 meses. Las lesiones supurativas con mayor componente inflamatorio tienen una evolución mucho más corta.

La exudación de las capas epiteliales conjuntamente con las hifas de los hongos forman costras secas características. Las lesiones progresan en forma centrífuga con una mayor actividad

Tabla 80-3. Clasificación de los agentes etiológicos según la fuente de infección

Antropófilos	Geófilos	Zoófilos
Epidermophyton floccosum	*Microsporum gypseum*	*Microsporum canis*
Microsporum audouinii		
Trichophyton rubrum	*Microsporum nanum*	*Trichophyton verrucosum*
Trichophyton mentagrophytes var. *interdigitalis*		
Trichophyton tonsurans	*Microsporum persicolor*	*Trichophyton equinum*
Trichophyton violaceum		
Trichophyton schoenleinii		
		Trichophyton mentagrophytes var. *mentagrophytes*

Tabla 80-4. Localización topográfica de los hongos zoofílicos

Agente etiológico	Localización en el hombre	Hospedador
Microsporum canis	Cuero cabelludo, piel glabra	Perros, monos, gatos, roedores
Microsporum canis var. *distortum*	Cuero cabelludo, piel glabra	Perros, monos, gatos, roedores
Microsporum gallinae	Cuero cabelludo, piel glabra	Aves, perros, monos, gatos
Trichophyton equinum	Cuero cabelludo, piel glabra	Caballos
Trichophyton verrucosum	Barba	Vacas, caballos
T. mentagrophytes var. *mentagrophytes*	Cuero cabelludo, barba	Roedores, monos, perros, ganado, cerdos

Tabla 80-5. Localización topográfica de los hongos geofílicos

Agente etiológico	Localización en el hombre	Hospedador
Microsporum fulvum	Piel glabra, cuero cabelludo	Perros, monos
Microsporum cookei	Piel glabra, cuero cabelludo	Perros, monos
Microsporum nanum	Piel glabra	Cerdos
Microsporum persicolor	Piel glabra	Perros, roedores
Microsporum gypseum	Piel glabra	Perros, monos, gatos, caballos, roedores

en la periferia, conformando entonces una lesión anular alopécica o circinada característica (tiñas).

A estas lesiones pueden asociarse infecciones bacterianas; ciertas especies animales pueden manifestar reacciones alérgicas secundarias (dermatitis alérgicas, "ides").

ASPECTOS CLINICOS

Las dermatofitosis en los pequeños animales no son pruriginosas y no afectan el estado general del paciente. Básicamente pueden observarse dos formas clínicas, una seca y otra supurativa.

Tiñas secas

Son lesiones localizadas alopécicas de algunos centímetros de diámetro y con forma de moneda, como talladas en sacabocados, recubiertas con escamas grises que le otorgan un aspecto pulverulento. Con mayor frecuencia se ubican en las regiones superiores y anteriores del cuerpo. El agente etiológico en perros y gatos es el *Microsporum canis*.

Tiñas supurativas

Los agentes causales más comunes son *Trichophyton mentagrophytes* y *Microsporum gypseum*. Pueden ser localizadas y difusas. En cuanto a la tiña supurativa localizada o "kerion" se caracteriza por una lesión edematosa, sobreelevada, alopécica, de superficie costrosa amarronada, con micropústulas que contienen pus amarillo o rojizo, correspondiente a los folículos pilosos afectados. Las localizaciones más frecuente son dorso de la nariz y pie.

Las tiñas supurativas difusas presentan una región más o menos extensa de foliculitis, que afecta principalmente zonas de pliegues axilares y consecuentemente el dorso del miembro anterior por el roce de mantas y pretal. Por su aspecto deben diferenciarse de las piodermitis bacterianas.

Los grandes animales como el bovino se ven afectados casi exclusivamente por *Trichophyton verrucosum*, muy rara vez por *T. mentagrophytes*. El equino, en cambio, presenta *T. equinum* y también distintas especies de *Microsporum*.

Las lesiones se ven favorecidas por el clima frío y húmedo, la caída de las defensas y la deficiencia de vitamina A.

T. verrucosum tiene gran importancia como zoonosis, sobre todo en el personal de tambos y guacheras. Antiguamente, en el ordeño manual el tambero apoyaba la cabeza en el flanco de la vaca, por lo cual se producían lesiones principalmente en su cara y cuello.

T. verrucosum da lesiones profundas, agrietadas, sangrantes y pruriginosas en el hombre.

Tanto en animales como en el hombre pueden observarse otras formas clínicas, así, los seudomicetomas se manifiestan como nódulos subcutáneos granulomatosos, que evolucionan como una foliculitis furunculosa como resultado de la destrucción de los folículos y la penetración de los hongos en el tejido subcutáneo.

Onicomicosis (onicosis)

Es una dermatofitosis localizada en las uñas tanto en caninos como en felinos; éstas se vuelven secas, deformadas, frágiles y de aspecto apolillado. Los agentes etiológicos responsables son *T. mentagrophytes* y *M. gypseum*.

En los bovinos, la afección es frecuente en animales jóvenes aunque por lo general no existe predilección por raza o edad. A diferencia de otros animales las lesiones (tiñas del ternero) son patognomónicas, presentándose redondeadas, alopécicas de 3 cm o más, con costras de hasta 0,5 cm de espesor blanco-grisáceas y prominentes, características. Las zonas frecuentemente afectadas son cabeza (región periocular, base de los cuernos, hocico, base de los pabellones auriculares), cuello, zona escapular y nacimiento de la cola. Estas lesiones, en general, no son pruriginosas. El agente etiológico de la tiña del ternero es el *T. verrucosum* y rara vez *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*. En los equinos el *T. equinum* origina placas redondeadas con pelo erizado y dolorosas al tacto, y a la semana ocurre la tricorrexis dejando un área alopécica gris y brillante de unos 3 cm de diámetro. El frotamiento de monturas y arneses puede llevar a lesiones más graves y profundas. Las lesiones frecuentemente asientan en tronco y grupa y de ahí se diseminan a cabeza, cuello y extremidades.

La edad y la raza no parecen influir en el curso de la enfermedad. Otros animales como el cerdo (*M. cookei*), ovinos (*T. mentagrophytes*) y caprinos (*T. mentagrophytes*) no están exentos de padecer estas micosis.

En las aves afecta especialmente a las gallinas. La cresta es el sitio de predilección de estos hongos, pudiendo diseminarse a otras regiones corporales. La tiña de las aves, "cresta blanca" o "favus" es producida por *T. gallinae*.

TRATAMIENTO

En general las dermatofitosis de piel tienden a la remisión espontánea entre 1 a 3 meses. El tratamiento en los pequeños animales puede ser sistémico o tópico.

La administración de griseofulvina en forma oral a la dosis de 50 mg/kg/día en el gato y de 50 a 100 mg/kg/día en el perro, por un período de 15 a 30 días como mínimo y hasta de 6 meses en las onicosis, puede ser eficaz, debiendo ser administrada conjuntamente con comidas ricas en grasa. Otros tratamientos sistémicos incluyen el ketoconazol en la dosis de 10 mg/kg/día y también el itraconazol. La limpieza apropiada, el rasurado y el tratamiento tópico (yodados, clorhexidina, pomadas a base de imidazólicos, etc.) están bien indicados.

En los grandes animales, dado los costos por el uso de la vía sistémica se recomienda: baños terapéuticos y agentes tópicos en animales mansos y con lesiones poco extendidas.

En animales a campo por lo general no se usan las topicaciones porque deben repetirse, no cubren todas las lesiones y además son dificultosas de aplicar en casos enzoóticos.

La terapia vía oral es prolongada (por ej., griseofulvina), costosa y requiere que el antifúngico sea distribuido en los comederos.

En nuestra experiencia (JER y EHR) el tratamiento de elección en bovinos y equinos es la inyección (estrictamente endovenosa) de formaldehído al 4% a razón de 1 ml/kg peso vivo, una sola vez. Las lesiones por *Trichophyton* desaparecen a los 21 días y las de *Microsporum* aproximadamente 1 semana antes.

Algunos autores promueven el uso de vacunas en bovinos y vacuna de *Microsporum* muerto como uso profiláctico y terapéutico en gatos, tanto adultos como jóvenes. No obstante, su uso es controvertido.

Existe una nueva droga utilizada en medicina humana, la terbinafina, cuya aplicación en veterinaria se presume que tendrá resultados satisfactorios.

METODOLOGIA PARA EL ESTUDIO DE LAS DERMATOFITOSIS

Pasos a seguir:

1. Diagnóstico clínico presuntivo (sugerido por el médico)
2. Preparación previa del paciente (las indicaciones deberán ser impartidas por el laboratorio de micología).

3. Toma de muestra (de preferencia las deberá tomar un profesional con experiencia adjuntando resumen de historia clínica).
4. Conservación de la muestra (se mantendrán a temperatura ambiente, en recipientes de boca ancha, cerrados, secos, protegidos de la humedad).
5. Remisión de la muestra a micología (deberá realizarse siguiendo las normas de bioseguridad y en el menor tiempo posible a partir del momento de toma de la muestra).
6. Procesamiento de la muestra (diagnóstico de laboratorio). Se realizará según métodos estandarizados: a) observación microscópica, b) siembra de los materiales en medios especiales e incubación a temperaturas predeterminadas.
7. Informe.
8. Tratamiento (lo implementará el profesional idóneo).

Preparación previa del paciente

Se debe lavar la piel afectada con agua potable y jabón común (nuevo) para disminuir la flora asociada contaminante. Deberá estar libre de toda medicación como pomadas, talcos u otros derivados.

Suspender toda medicación antimicótica oral, tópica, talcos y jabones medicinales durante la semana previa a la toma de muestras.

Toma de muestra

Pelos

Se procederá a extraer muestras de pelo por raspado con bisturí estéril a partir del borde interno de la lesión (mayor actividad fúngica). Se recomienda el uso de pinza estéril para tomar aquellos pelos que presenten un deterioro visible.

Escarificación

Las escamas de piel se recolectarán mediante raspado con bisturí o lanceta estéril. Se raspará el borde interno de la lesión, dado que el crecimiento del hongo es centrífugo (de adentro hacia afuera) y la lesión tiende a la curación central (hipersensibilidad retardada).

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DE LAS DERMATOFITOSIS

Se basa fundamentalmente en:

Observación microscópica directa entre porta y cubreobjetos.

- En escamas de piel y uñas se pueden observar filamentos hialinos de 4-5 µm de diámetro, ramificados y tabicados, también artrosporados.
- Los pelos, en cambio, son invadidos en forma diferencial según el agente etiológico. Por fuera (ectothrix) o por debajo de la epidermícula (endothrix).
- En principio el micelio invade los pelos, se multiplican sus hifas y luego se artrosporan, el tamaño de los artrosporos es variable y de acuerdo con sus dimensiones son clasificados como "microides" (<5 µm) o "megasporados" (>5 µm); así, por ejemplo, en el estudio de una tiña en el examen microscópico podemos establecer la presencia de pelos con invasión o parasitismo fúngico tipo "ectothrix megasporado".

Cultivos y características culturales.

- Identificación de las colonias de los cultivos de dermatofitos.

Macromorfología

Se consideran: color de la superficie, reverso, textura, forma, elevación, margen o borde, producción de pigmento con o sin liberación al medio, velocidad de crecimiento, etc.

En general tienen:

* Aspecto que va desde algodonoso, velloso, granular, crateriforme, flocoso, etc.
* Color: blanco, amarillento, beige, grisáceo, rosado, etc., excepto *T. violaceum* (púrpura o violeta). Los dermatofitos nunca pueden confundirse con hongos verdes, azules, rojos o negros, excepto colonias de mohos ambientales blancos.
* Reverso: amarillento, anaranjado, rojizo, púrpura, etc.

Micromorfología

El material disgregado entre porta y cubreobjetos (en fresco) con el agregado de una gota de líquido de montar debe ser observado microscópicamente para establecer su morfología. Su principal característica es la de presentar micelio vegetativo tabicado, hialino y, según la especie, presencia de hifas en raqueta, pectinadas, espiraladas, cuerpos nodulares, candelabros fávicos, clamidosporas y fundamentalmente agrupación, forma y tamaño de los conidios (macro y microaleurias).

Micelio de fructificación

Reproducción asexual (conidial): Microconidios piriformes, esféricos, claviformes, etc. (3-5 µm de tamaño). Macroconidios (aleurias) septados (fragmoconidios), multicelulares, fusiformes, oblongos, elípticos, etc., de 3-28 por 8-190 µm de tamaño.

Reproducción sexual

Ascocarpos con hifas peridiales ornamentales (Fam. *Arthrodermatacea*). Género *Arthroderma* (*Trichophyton* y *Microsporum*).

PRUEBAS FISIOLOGICAS Y SIEMBRA EN SUSTRATOS ESPECIALES

Estos métodos auxiliares son utilizados para evidenciar distintos requerimientos nutricionales de estos mohos, como la asimilación de algunas vitaminas del complejo B (tiamina, ácido nicotínico), inositol, etc.

La producción de ureasa y de pigmentos, la perforación del pelo in vitro y la tolerancia a altas temperaturas, colaboran también con la identificación de especies.

BREVE DESCRIPCION DE LOS AGENTES ETIOLOGICOS DE PRESENTACION MAS FRECUENTE

GENERO *MICROSPORUM*

Descripción

El crecimiento de las colonias varía de rápido a lento, con apariencia algodonosa a glabra, pulverulenta, blanca, amarilla, a veces con tintes salmón, reverso de color crema, rojizo o amarillento. Las macro y microconidias están presentes, solas o en racimos en el final o a un lado de la hifa.

Las macroconidias emergen en grupos en ángulos agudos, 2 a muchas células, paredes delgadas a gruesas, equinuladas a

rugosas, con forma de huso o cigarro, hialinas. Las microconidias son de una célula, lisas y de paredes delgadas, hialinas, ovoides a clavata, solitarias y/o dispuestas a ambos lados del micelio.

Patogenicidad

Afectan pelo y piel de hombre y/o animales. Pueden causar tinea capitis, barbae y corporis.

La pteridina es un metabolito presente en *Microsporum canis*, *M. audouinii*, *M. distortum* y *M. ferrugineum*, que al iluminar con lámpara de Wood produce fluorescencia (+) color amarillo-verdoso.

El ataque al pelo se produce en forma ectothrix con artrosporas redondeadas, pequeñas y desorganizadas (tipo microspórico).

Diagnóstico diferencial

Difiere de las especies de los géneros *Trichophyton* y *Epidermophyton* por tener macroconidias rugosas o equinuladas.

Teleomorfo: Arthroderma (*Ascomycetes, Onygenales: Arthrodermataceae*).

Principales especies patógenas

Microsporum canis, *M. gypseum*, *M. audouinii* y *M. nanum*.

GENERO *TRICHOPHYTON*

Descripción

Colonias glabras o algodonosas, blancas, rosadas, amarillentas o color crema. Reverso marrón, rojo, violeta o amarillo. Las macroconidias tienen dos células o más con forma de cilindro o de cigarro, hialinas de 20-50 x 4-8 µm; las microconidias, cuando están presentes, son terminales o están a lo largo de hifas, la pared generalmente es delgada, lisa, hialina, con una célula, ovoide, piriforme a clavata.

Las microconidias predominan, y pueden agruparse en "*clusters*", o aisladas a lo largo de la hifa. Pueden formarse hifas en raqueta, cuerpos nodulares y clamidosporas.

Teleomorfo: Arthroderma (*Ascomycetes, Onygenales: Arthrodermataceae).*

Patogenicidad

Ataca piel, pelo y uña. El ataque al pelo puede ser endothrix o ectothrix, o ambas neoendothrix.

Diagnóstico diferencial

Trichophyton difiere de *Microsporum* por tener conidias de paredes lisas y de *Epidermophyton* por la producción de microconidias.

Principales especies patógenas

Trichophyton verrucosum, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, *T. equinum* y *T. gallinae*.

Luz de Wood en animales

Sólo se utiliza para diferenciar lesiones producidas por *M. canis* y *M. distortum*, por su fluorescencia verde o verde amarillento a la luz ultravioleta en la oscuridad total (habitación a oscuras).

Pruebas cutáneas y serología

No tienen aplicación práctica en el diagnóstico de las dermatofitosis.

CANDIDIASIS
(candidosis, moniliasis)

INTRODUCCION

Esta micosis oportunista superficial y/o profunda es producida por 15 a 20 especies de *Candida* (tabla 80-6).

Las especies mencionadas son las de mayor importancia médica. Estas levaduras con asimilación NO_3K negativo, están ampliamente distribuidas en la naturaleza, pudiendo vivir también en forma saprótrofa en la piel, mucosas y el tracto digestivo del hombre y los animales. A partir de estas localizaciones pueden producir infección local o sistémica, cuando el hospedador presenta ciertos factores predisponentes locales o generales.

Dentro de los factores locales se consideran, humedad, maceración, uso de detergentes inadecuados, calor e hiperacidez; con respecto a los factores generales se mencionan infecciones intercurrentes, endocrinopatías, deficiencias nutricionales y uso indiscriminado de antibióticos que irritan las mucosas y provocan desequilibrio de los microorganismos normales del hospedador. También la alteración de la inmunidad celular, como consecuencia de la administración crónica de corticoides e inmunosupresores, desempeña un papel importante en la presentación de la enfermedad. En las aves la deficiencia de vitaminas durante la puesta, así como el empleo de antibióticos y altas concentraciones de glucosa en la dieta favorecen el desarrollo de candidiasis.

En los cerdos *C. albicans* y *C. krusei* colonizan el tracto digestivo, coincidiendo con el período de la cría en que se ejerce un cambio de dieta, que produce variación de los microorganismos protectores aunque existen pocos casos documentados. En las vacas lecheras el uso de antibióticos antibacterianos favorece la mastitis candidiósica.

Otras especies de levaduras vinculadas con el medio ambiente (exógenas), aire, suelo, pienso, y alimentos ricos en hidratos de carbono también son fuente de infección. Las infecciones primarias sin predisposición, ni factores que las favorezcan son excepcionales en los animales, existiendo pocos casos documentados.

Asimismo, deben tenerse en cuenta otros factores propios de cada especie de *Candida*.

Patogenicidad

- Virulencia, un término utilizado de rutina en medicina, no sería apropiado para calificar a los hongos.
- Adherencia a células de los tejidos del hospedador.
- Facultad para filamentizar (seudohifas) con extremo apical rico en fosfolipasa.
- Elaboración de enzimas (proteinasas, lipasas, fosfolipasas, etc.) para poder invadir y degradar sustancias tisulares que usa como nutrientes.
- Variabilidad fenotípica.
- Elaboración de toxinas.

ASPECTOS CLINICOS

En los carnívoros la *C. albicans* y *C. parapsilosis* pueden aislarse de la piel en zonas donde la humedad puede persistir y macerar, como son los pliegues y las áreas de unión mucocutánea. La aparición de intertrigo puede ser interdigital, perivulvar, labial, escrotal, inguinal y ungueal.

La piel se encuentra erosionada, eritematosa y húmeda, cubierta de un depósito blanquecino. Otra presentación menos

Tabla 80-6. Ubicación taxonómica de las *Candida*

Clase-forma	Deuteromycetes
Subclase	Blastomycetidae
Orden	Cryptococcales
Familia	Cryptococcaceae
Género	*Candida*
Especie	*Candida albicans*
	C. parapsilosis
	C. tropicalis
	C. glabrata
	C. kefyr
	C. krusei
	C. guilliermondii
	C. lusitaniae

frecuente es similar al "parche caliente" (dermatitis bacteriana). Las otitis externas bacterianas pueden agudizarse en presencia de *Candida* o ser ésta directamente el agente causal primario. También se describen conjuntivitis en perros y gatos.

En las mucosas, preferentemente la bucal, las lesiones consisten en placas gris-blanquecinas que tienden a coalescer. Estas asientan en la mucosa labial, los carrillos y la superficie ventral de la lengua, conformando el típico "muguet", observándose debajo de estas placas una mucosa eritematosa, ulcerada e inflamada. En estos animales la colonización esofágica y gástrica es rara, aunque por desequilibrio de los microorganismos normales por el uso excesivo de antibióticos orales, la *Candida* puede colonizar el intestino y otros órganos. Otras mucosas afectadas son la genital, la urinaria y la nasal.

En los lechones lactantes criados con dieta artificial se presenta un tipo de lesión parecida al "muguet" o algodoncillo. Estos manifiestan disfagia y enflaquecimiento.

En los sementales y yeguas de cría se describe una forma genital, así como también una localización oral con inflamación seudomembranosa de la mucosa.

Los bovinos también presentan estas formas clínicas, pero además la mastitis es una de las lesiones más importantes que se presenta en estos animales, pudiendo afectar entre el 80 y 100% de las hembras tratadas con antibióticos, manifestando la signología 3 a 10 días postratamiento.

DIAGNOSTICO

El diagnóstico de candidiasis de la piel y mucosas se realiza por métodos micológicos rutinarios (observación microscópica y cultivos).

Examen microscópico directo

Es uno de los parámetros más importantes para el diagnóstico presuntivo, haciéndose necesario el examen microscópico directo (en fresco o previa coloración de Gram o Giemsa) del material clínico. A partir de este examen puede obtenerse información valiosa, tal como: cantidad de levaduras presentes, diámetro de las células y número de brotaciones, presencia o ausencia de "seudomicelio", etc.

Los raspados de piel y uñas son examinados entre porta y cubreobjetos, utilizando (OH)K al 40% como clarificante (ablanda el material), permitiendo mayor contraste para la visualización de los elementos micóticos; también pueden usarse (OH)Na al 10 o 20% y lactofenol.

En las muestras de biopsias o autopsias los exámenes histopatológicos son de notable interés cuando se realizan coloraciones de PAS o por el método de Grocott-Gomori.

Aislamiento

Los medios de cultivo para este fin son universalmente conocidos. Uno de ellos es el agar Sabouraud con alguna que otra variante en nutrientes y adicionado de antibióticos antibacterianos como cloranfenicol 0,1 mg/ml o penicilina y estreptomicina (20 U/ml y 40 µg/ml respectivamente).

El uso de cicloheximida (Actidione) retarda y/o inhibe el crecimiento de algunas especies de *Candida* en concentraciones de 0,5 mg/ml siendo recomendable la siembra de algunos medios sin esta droga.

Características morfológicas

Estudio macromorfológico

Se realiza en una colonia gigante, observando su aspecto por el anverso y el reverso, estudiando tamaño, forma, transparencia u opacidad, bordes, elevación sobre la superficie del sustrato, color, producción de pigmentos, etc.

Para este estudio se siembra la cepa por puntura en G.P.E.A. o mosto gelatinado agar, incubando a 25-28 °C durante 7 o 20 días (según la velocidad de crecimiento del microorganismo), en tubos de boca ancha o Erlenmeyer pequeños.

Estudio micromorfológico

Se observa:

1. Forma y dimensiones del micelio vegetativo y de fructificación.
2. Modo de reproducción vegetativa (brotación, escisión, proceso intermedio, etc.).
3. Disposición de las células (aisladas, en racimos, apareadas, en cadenas, etc.).
4. Seudomicelio (filamentización y clamidosporas), la formación de éstos y la filamentización de las levaduras puede observarse bien en medios ricos en polisacáridos, efecto que es favorecido por la adición de Tween 80, el cual reduce la tensión superficial del medio. El azul Trypan es otro componente del medio que permite una óptima observación microscópica. Los medios usados para este fin son: agar harina de maíz-Tween 80-azul Trypan y papa-zanahoria-bilis-agar (P.C.B.).

Técnica

1. Preparar cajas de Petri estériles con 15 a 20 ml de medio de cultivo.
2. Sembrar la levadura en estudio por estrías, en forma de dos o tres líneas paralelas separadas 1 cm entre sí.
3. Cubrir con cubreobjetos estériles para facilitar la microaerofilia (anaerobiosis parcial) y observación posterior.
4. Incubar a temperatura ambiente durante 24-48 horas.
5. Observar el desarrollo micromorfológico.

Reproducción sexual

La formación de ascos se estimula sembrando las levaduras en medios pobres, que contienen por lo general escasas sustancias nutritivas.

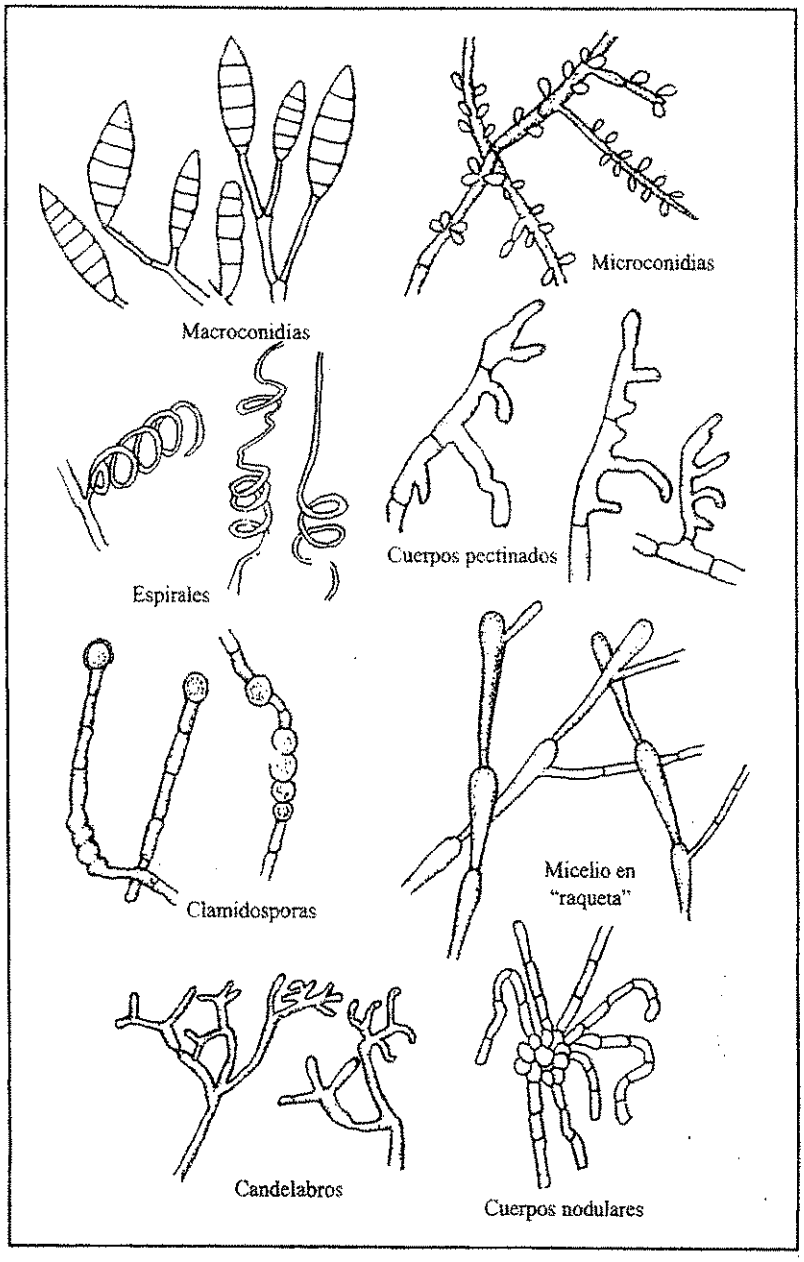


Figura 80-3. Distintos elementos de los dermatofitos.

Los medios utilizados pueden ser: Gorodkowa agar, acetato agar, bloque de yeso, zanahoria, etc.

Algunas especies del género *Candida* presentan forma perfecta o sexuada (teleomorfo), como:

Candida lusitaniae	*Clavispora lusitaniae,*
Candida krusei	*Issatchenkia orientalis*
Candida famata	*Debaryomyces hansenii*
Candida pelliculosa	*Pichia anomala*

Inoculación en animales de laboratorio

El conejo es el animal más sensible a la infección experimental por *Candida albicans* (la rata y el ratón también lo son). Todas las cepas de esta especie, inoculadas por vía endovenosa en la cantidad de 1 ml de suspensión al 1% de cultivos en solución fisiológica, provocan la muerte del animal en 3 a 7 días; el 50% de las cepas de *Candida tropicalis* producen el mismo efecto. Las otras especies de *Candida* no son patógenas en las mismas condiciones de experimentación. En la autopsia aparecen pulmones fuertemente congestivos, riñones hipertrofiados que presentan microabscesos distribuidos en la región cortical.

PRUEBAS ESPECIALES PARA LA IDENTIFICACION DE *CANDIDA ALBICANS*

A) Formación de tubos germinativos o "efecto R.B." (Reynolds & Braude, 1956)

La germinación de tubos de una longitud de 1,5 a 3 veces el diámetro de la célula que le dio origen, se produce después de 2 a 3 horas de incubación a 37 °C en suero y plasma sanguíneo, clara de huevo, etc., siendo un método eficiente en la identificación rápida de *C. albicans*.

Técnica

1. Colocar 0,5 ml de suero estéril en tubos de Khan.
2. Inocular una pequeña cantidad de levaduras con ansa recta o aguja.

3. Incubar a 37 °C y observar microscópicamente una gota de la suspensión cada 30 min, hasta las 3 horas.

B) Filamentización y producción de clamidosporas

La filamentización con formación de blastosporas tipo "mycotorula" y clamidosporas terminales globosas son características de *C. albicans*.

C) Sensibilidad a la cicloheximida

El medio de Sabouraud + Actidione al 0,05% es utilizado para probar la resistencia de especies de *Candida*, haciendo la lectura a las 24-48 horas.

Son resistentes a esta droga: *C. albicans*, *C. guilliermondii* y *C. kefyr*.

Pruebas fisiológicas

Consisten en demostrar la asimilación y fermentación de diferentes hidratos de carbono, asimilación de sales nitrogenadas en particular el NO_3K. Estos métodos conocidos como auxanogramas y zimogramas en general son costosos y se requiere personal entrenado por lo que se realizan en centros especializados en la identificación de levaduras.

Otros métodos de identificación

Existen otras pruebas, como el poder reductor de distintas levaduras sobre cultivos con sales de sulfito de sodio y bismuto (medio de Nickerson, 1953) y otros con indicadores como el tetrazolium (medio de Pagano & Levin, 1958) que dan colonias de diferentes colores de acuerdo a la cepa de *Candida* en estudio. Estos medios con sustratos cromogénicos (CHROMagar) han tomado auge en la actualidad y pueden ser utilizados para demostrar la presencia de las especies patógenas más frecuentes y, especialmente, para demostrar asociaciones de levaduras en un mismo paciente, puesto que las colonias en medios comunes son a veces indistinguibles unas de otras.

DIAGNOSTICO INMUNOSEROLOGICO DE LAS CANDIDIASIS

Estos estudios no tienen valor para el diagnóstico de las candidiasis superficiales de piel y mucosas. En cambio, su práctica se hace imprescindible cuando se sospecha candidiasis en los tejidos profundos.

Las pruebas de aglutinación de látex (AL), inmunodifusión en gel de agar y contrainmunoelectroforesis son valiosas para el diagnóstico de la candidiasis sistémica (uno o varios órganos profundos). La detección de precipitinas en títulos de 1:8 o más o el reconocimiento de cuatro cambios en los títulos de aglutinación, se considera como una evidencia presuntiva de candidiasis sistémica y también puede indicar colonización o candidemia transitoria.

Las pruebas de inmunodifusión (ID), la contrainmunoelectroforesis (CEP) y la aglutinación de partículas de látex (AL) tienen una sensibilidad aproximada del 90% para casos seguros de candidiasis. Las pruebas de CEP e ID son las más específicas.

Cuando se sospecha una candidiasis y las reacciones de ID son negativas con antígeno (Ag) de *C. albicans*, el test deberá ser realizado con Ag de *C. krusei* para descartar una infección por esta especie, ya que todas las especies tienen Ag comunes, menos la *C. krusei*.

El serodiagnóstico de candidiasis por aglutinación y fijación del complemento (FC) no es seguro debido a las respuestas positivas de sujetos sanos o de individuos con candidiasis superficial y sin compromiso sistémico.

Los nuevos procedimientos, basados en la detección de enolasa, anticuerpos antienolasa, el subproducto de 47 kDa de la HSP-90, el d-arabinitol y diversas secuencias genómicas mediante PCR, aunque aparentemente más sensibles y específicos, se encuentran todavía en fase de investigación.

En casos de pacientes inmunodeprimidos y ante la sospecha de candidiasis profunda, la toma de biopsia y las tinciones histopatológicas PAS y Grocott son de un valor incalculable para su confirmación diagnóstica.

Pruebas cutáneas

La intradermorreacción con 0,1 ml de candidina diluida 1/1000, 1/100, etc. positiva luego de 24-48 horas de inoculación, demuestra una respuesta inmunoalérgica conservada en el paciente.

La reacción inmediata a la prueba cutánea (15-20 min) de tipo urticariano (pápula, prurito y eritema) indica reacción mediada por anticuerpos IgE, confirmando en general la presunción clínica de asma o procesos alérgicos secundarios a focos activos, que se manifiestan como vesículas dishidrosiformes, eritematovesiculosas, de tipo urticariano, etc., con localización variable.

TRATAMIENTO

En pequeños animales, tanto para las lesiones cutáneas como para el tracto gastroentérico la droga de elección es la nistatina pudiéndose aplicar tópicamente. Su acción se ve favorecida por el rasurado, lavado y secado de la zona afectada. La nistatina se aplica tanto en piel como en canal auditivo 3 a 4 veces diarias, siendo la vía oral de elección para las localizaciones del tracto digestivo, excepto para las formas cutáneas y sistémicas ya que la droga no se absorbe. Otras medicaciones eficaces para el tratamiento de candidiasis superficiales y/o profundas son los imidazólicos, entre ellos ketoconazol e itraconazol.

El fluconazol (imidazólico trifluorado) y voriconazol (nuevo triazólico de segunda generación) se utilizan con éxito en casos graves o crónicos de infecciones producidas por levaduras.

En los casos de resistencia a las drogas mencionadas puede utilizarse anfotericina B, bajo una estricta vigilancia profesional dado su nefrotoxicidad.

La caspofungina (nueva echinocandina) de reciente aparición en medicina humana es un agente con expectativas muy interesantes.

La corrección de los estados predisponentes (inmunosupresión, diabetes, iatrofarmacogenia, etc.) y el uso de inmunomoduladores resulta beneficioso en el tratamiento de esta micosis oportunista.

En grandes animales se aconsejan lavados con borato de sodio al 2,5% o topicaciones con glicerina yodada al 10% y bicarbonato de sodio en el agua de bebida al 2%.

PITIROSPOROSIS

Bajo este término de describen varias entidades cutáneas y extracutáneas como otitis en caninos, foliculitis e incluso infecciones sistémicas.

La especie vinculada con micosis en animales es *Malassezia pachydermatis* (*Pityrosporum canis*) (tabla 80-7).

Las levaduras de este género se caracterizan por poseer una gruesa pared celular multilaminar; las brotaciones sucesivas dejan una cicatriz prominente en la célula madre.

Es frecuente su aislamiento a partir del conducto auditivo externo y la piel normal de pequeños animales, perros y gatos, aunque también ha sido descrito en cerdos, caballos, elefantes, osos negros, pájaros e inclusive en el hombre.

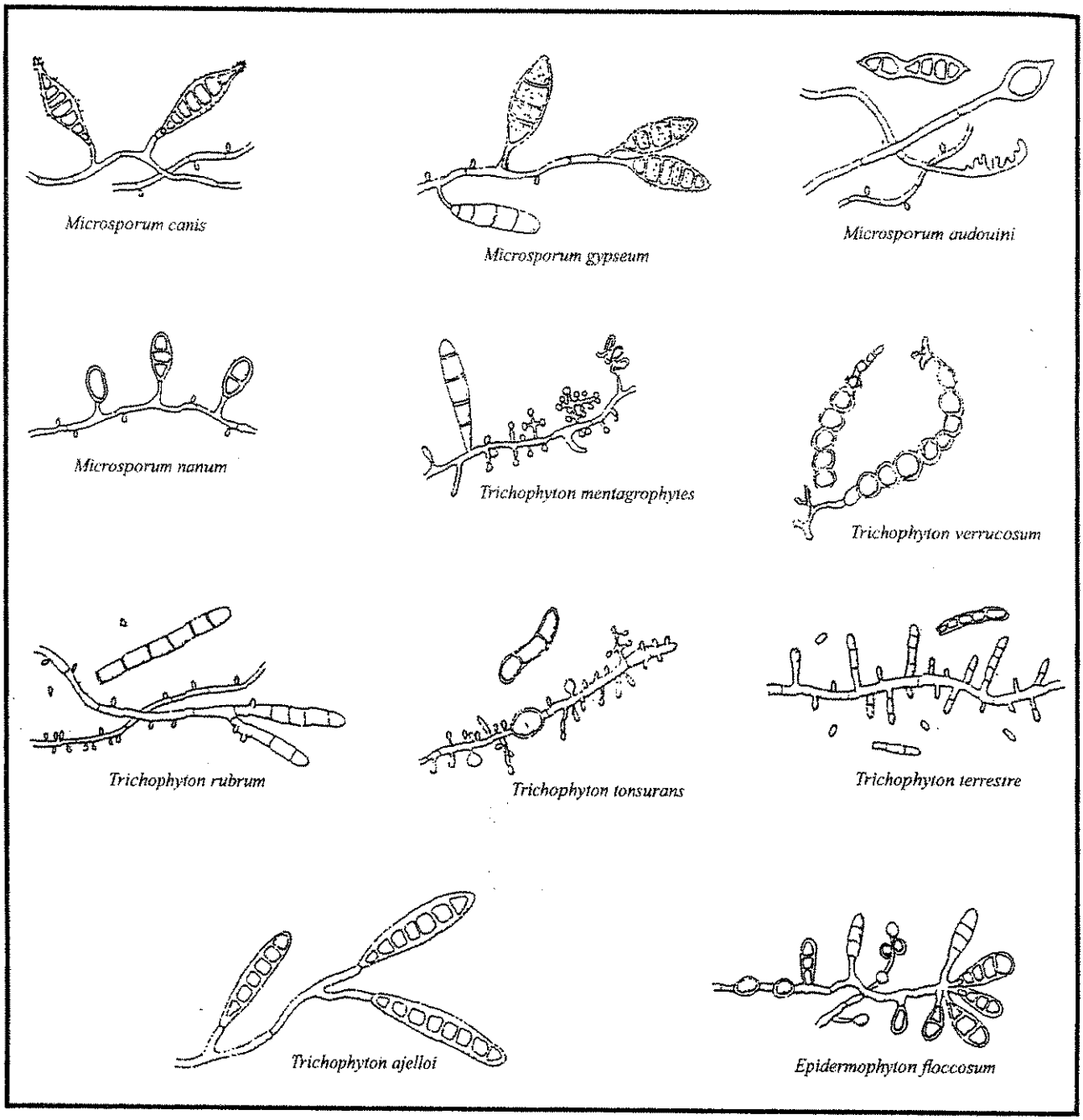


Figura 80-4. Especies de dermatofitos. Esquemas de reproducción conidial.

M. pachydermatis es considerado agente etiológico primario o secundario de otitis micótica externa en caninos; con frecuencia se asocia a *Staphylococcus epidermidis* y *S. aureus*.

Las sacudidas de cabeza, rascado de orejas, secreción ótica color marrón (chocolate) y olor sui-generis con dolor a la manipulación de la oreja, son algunas características que orientan a pensar en esta enfermedad.

También se describe una dermatitis crónica canina, donde la piel abdominal es la más comúnmente afectada. Las lesiones aparecen como un parche eritematoso, ligeramente elevado e intensamente pruriginoso. Las lesiones pueden extenderse formando muchas placas escamosas, irregulares y pigmentadas en su centro, pudiendo llegar a axilas e ingle y, en ciertos casos, a regiones puramente pilosas.

Para el diagnóstico, las muestras tomadas de oído o por raspado de piel, son fijadas por calor seco o alcohol metílico y coloreadas con azul de metileno, Gram o Giemsa. Las muestras se siembran en agar Sabouraud dextrosa con antibióticos y se incuban a 25-37 °C durante 7 a 10 días. Las colonias son de tipo levaduriforme, blanco mate, parduscas y pastosas.

En el tratamiento se pueden usar fármacos antifúngicos en forma de topicaciones. Los derivados imidazólicos como miconazol, econazol, ketoconazol e itraconazol brindan una buena respuesta terapéutica. También pueden usarse la nistatina y los derivados yodados como la iodopovidona. Facilita el tratamiento administrar el ketoconazol o itraconazol oral, en dosis de 20 mg/kg/día para el primero y la mitad de esta dosis para el itraconazol. El fluconazol da resultados satisfactorios en la pitiriasis versicolor de la piel del hombre.

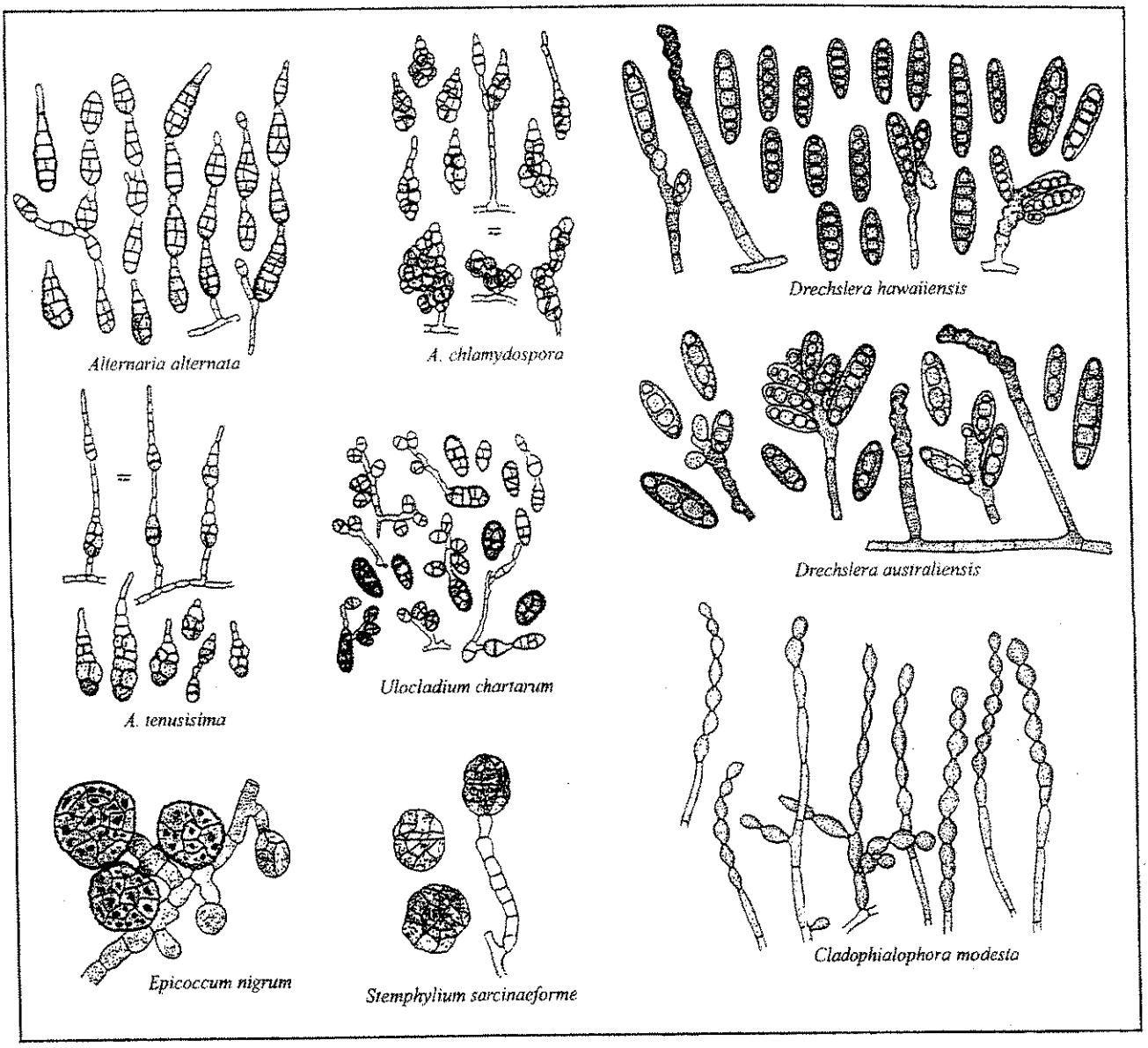


Figura 80-5. Hongos contaminantes de la piel de los animales.

Tabla 80-7. Ubicación taxonómica de *Malassezia*

Clase-forma	Deuteromycetes relacionado con los Basidiomycetes por la estructura de la pared, la resistencia a la lisis de la pared celular por acción de una β-(1,3)-D-Glucanasa.
Subclase	Blastomycetidae
Orden	Cryptococcales
Familia	Cryptococcaceae
Género	*Malassezia*
Especies	*Malassezia furfur* lipofílica asociada a humanos.
	M. sympodialis lipofílica asociada a humanos.
	M. sloffiae lipofílica asociada al hombre y animales.
	M. pachydermatis no lipofílica asociada a animales y al hombre.
	Otras especies.

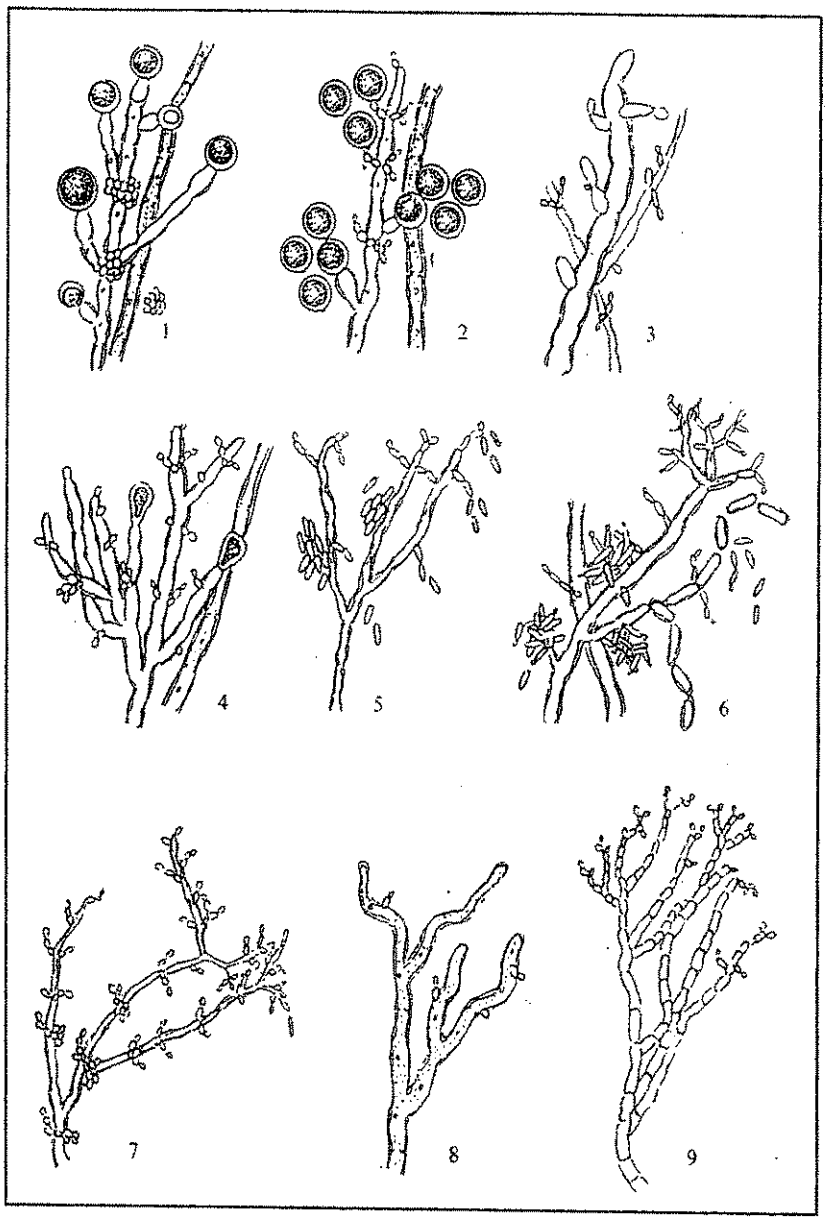


Figura 80-6. Micromorfología de los géneros más frecuentes de *Candida*.

1. *Candida albicans* (clamidosporas terminales globosas, seudomicelio tipo "micotorula" con blastosporas ovoides o globosas).
2. *C. dubliniensis* (clamidosporas dispuestas en racimos -4 a 5 células-, seudomicelio tipo "micotoruloides" con blastosporas ovoides).
3. *C. parapsilosis* (seudomicelio ramificado tipo "micocándida" con células muy grandes, con blastosporas globosas u ovoides).
4. *C. tropicalis* (clamidosporas piriformes pueden observarse, seudomicelio tipo "micotorula" y "micotoruloides", con blastosporas ovoides o semiglobosas).
5. *C. kefyr* (seudomicelio tipo "micocándida", blastosporas alargadas o cilíndricas).
6. *C. krusei* (seudomicelio tipo "micocándida", con células alargadas y delgadas, blastosporas ovoides predominantemente cilíndricas).
7. *C. guilliermondii* (seudomicelio fino y ramificado tipo "micocándida", blastosporas ovoides o cilíndricas).
8. *C. curvata* (seudomicelio largo e incurvado, presentando escasas blastosporas ovoides o en forma de salchicha).
9. *C. rugosa* (seudomicelio ramificado, abundante, presentando seudohifas cortas).

MUESTRA FOTOGRAFICA DE LAS MICOSIS SUPERFICIALES



Foto 1. Tiña microspórica en la piel de un canino (*Microsporum canis*). Observación personal EHR.



Foto 2. Tiña microspórica en el cuero cabelludo de un niño (*Microsporum canis*). Observación personal EHR.



Foto 3. Tiña microspórica en piel glabra del adulto (*Microsporum canis*). Observación personal EHR.



Foto 4. Tiña del bovino (*Trichophyton verrucosum*). Observación personal EHR, JR.



Foto 5. Tiña del hombre de campo ("sicosis de la barba" o "foliculitis agminata" (*Trichophyton verrucosum*). Observación personal EHR.



Foto 6. Tiña del equino (*Trichophyton equinum*). Observación personal EHR.

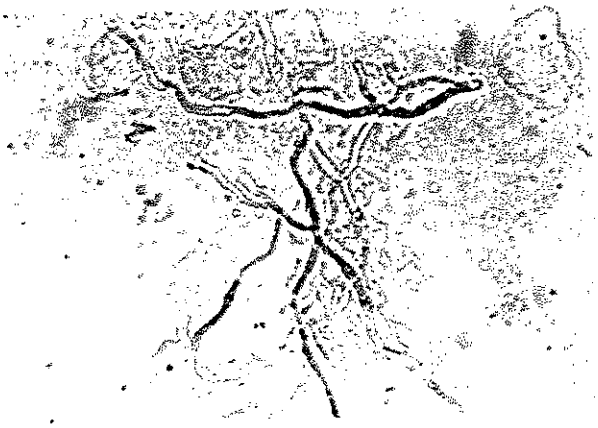


Foto 7. Dermatofitos en piel. Observación microscópica directa previa decoloración con HOK 40% en caliente (hifas hialinas septadas 45x). Observación personal EHR.

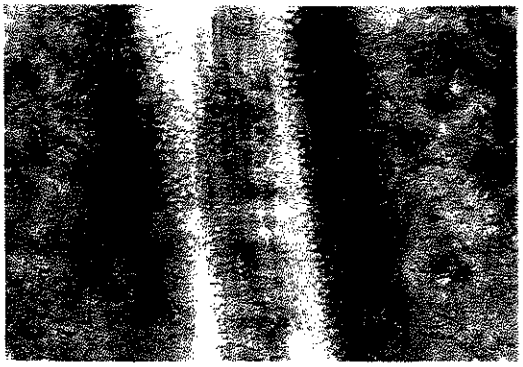


Foto 8. Dermatofitos en pelos. Observación microscópica directa previa decoloración con HOK 40% en caliente (invasión pilosa tipo "microspórica" 45x). Observación personal EHR.



Foto 9. Dermatofitos en pelos. Observación microscópica directa previa decoloración con HOK 40% en caliente (invasión pilosa tipo "endothrix" 45x). Observación personal EHR.

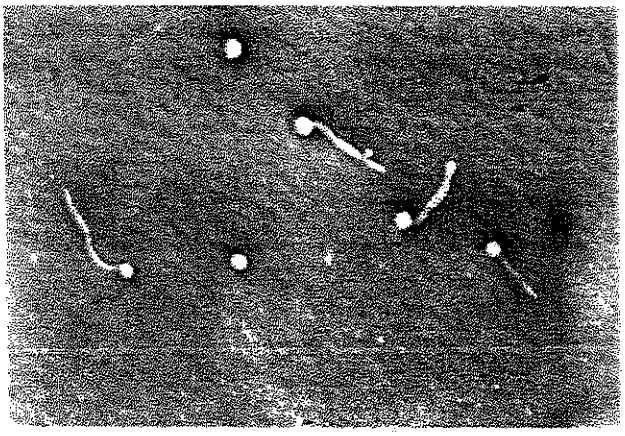


Foto 10. Observación microscópica directa en fresco. Tubos germinativos o "fenómeno R y B" en suero (*Candida albicans* 45x. Incubación 37 °C, 3 horas). Observación personal EHR.



Foto 11. Micromorfología de *M. canis*. Macro y microconidias (aleurias, Gueguén 45x). Observación personal EHR.

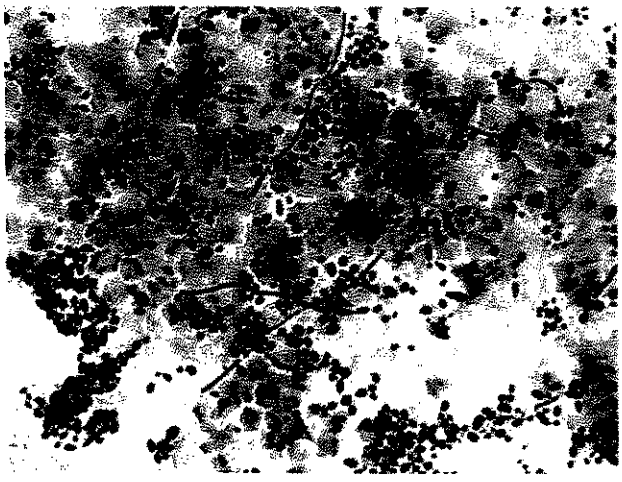


Foto 12. Muestra de mucosa bucal. Observación microscópica directa. Elementos levaduriformes y "seudomicelio" compatibles con *Candida* sp (tinción de Gram 45x). Observación personal EHR.

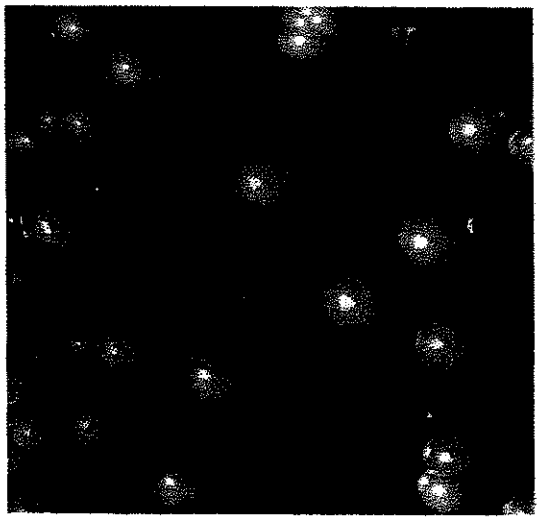


Foto 13. Colonias de levaduras (*Candida* sp) en agar Sabouraud cloranfenicol a 37 °C, 48 horas). Observación personal EHR.

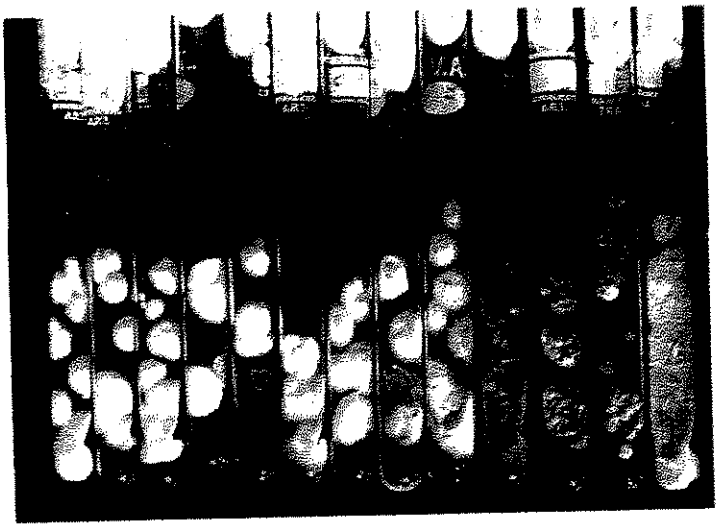


Foto 14. Aspecto macromorfológico de colonias de dermatofitos (diferentes especies en agar Sabouraud cloranfenicol cicloheximida a 28 °C durante 20 días).

BIBLIOGRAFIA

Beneke Everett S, Rogers AL. Medical mycology and human mycoses STAR Publishing Company. P.O. Box 68. Belmont, California, 1996.

De Hoog GS, Guarro J. Atlas of clinical fungi. Edited by Central bureau voor Schimmelcultures/ Universitatt Rovira i Virgili, 2000.

Delacretez J, Grigoriu D, Ducel C. Atlas de Mycologie Médicale. Ed. Hns Huber. Berne, Suisse 1974. 2do tirage. Massonn. Paris. New York, Barcelona. Milan 1976.

Dirksen G, Gründer HD, Stöber M. Innere Medizin und Chirurgie des Rindes. Paul Parey, Alemania (2002)

Gordon RF. Enfermedades de las aves. El Manual Moderno. México D.F. 1980.

Koneman MD, Glenn R, Sara E. Practical laboratory mycology. Ed. Williams and Wilkins Co. Baltimore, London 2da. ed. 1981.

Kurtzman & Fell. The yeast. A taxonomic study. The Netherlands. Elsevier Science Publishers. B.U. Amsterdam. 1998.

Kwon-Chung K, Bennett J. Medical Mycology. Lea & Febiger. Box 3024. 200 Chester Filed Parkway. Malver Pennsylvania 19355-9725. USA (1996).

Moriello KA. Management of dermatophytosis in Consultations in feline internal medicine. W.B Saunders, Philadelphia 1992.

Muller JH, Kirk RWE, Scott DW. Dermatología en pequeños animales. 4ta. edición Inter-Médica. 1991

Negroni P. Dermatomicosis. Diagnóstico y tratamiento Ed. A. López, Buenos Aires 1942.

Zapater RC. Micología Médica. Diagnóstico y tratamiento. Librería El Ateneo, Editorial Buenos Aires, 1981.

PARTE V
ALIMENTOS Y MISCELANEA

Capítulo 81

PRIONES. ENCEFALOPATIAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES

Eduardo Juan Gimeno

INTRODUCCION

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) ("transmissible spongiform encephalopathies - TSE") constituyen un grupo de dolencias degenerativas del sistema nervioso, de curso fatal. La repentina aparición de la encefalopatía espongiforme bovina (BSE) en Inglaterra a mediados de la década de 1980, atrajo de inmediato la atención de los profesionales veterinarios. Debido a las similitudes existentes entre las TSE de los animales y algunas de la enfermedades humanas, fue atentamente observada por neurólogos y neuropatólogos. El compromiso de otras especies que no habían resultado afectadas con anterioridad, comenzó a inquietar paulatinamente a distintos sectores. El tema saltó a la preocupación del gran público a fines de marzo de 1996 con la aparición de una EET desconocida hasta ese momento en hombres y en mujeres jóvenes.

Recientes aportes de la biología molecular referidos a los agentes causales de estas neuropatías, han establecido el concepto de un agente proteico carente de ácidos nucleicos y capaz de inducir su replicación: se presenta la fascinante posibilidad de estar frente a una nueva "forma de vida", distinta de lo que conocíamos hasta ahora.

Las medidas tomadas por distintos gobiernos en contra del comercio de ganado y de productos derivados procedentes de países con BSE, han producido una crisis política y económica de consecuencias gravísimas y de final incierto.

CARACTERISTICAS PRINCIPALES DE LAS EET

Las enfermedades de este grupo tienen características sorprendentes. Entre sus particularidades podríamos mencionar que:

- Las lesiones están limitadas al sistema nervioso central;
- El periodo de incubación es muy prolongado: de meses a décadas;
- El curso clínico es progresivo, evoluciona durante semanas, meses o años;
- Son invariablemente fatales;
- Hay astrocitosis reactiva, pérdida de neuronas y frecuentemente vacuolización de la sustancia gris;
- No hay reacción inflamatoria ni respuesta inmune;
- En el SNC se presenta una proteína anormal de localización intra y extracelular; con características fisicoquímicas de sustancia amiloidea;
- El o los agentes causales exhiben propiedades que los distinguen de virus y viroides.

LISTADO DE LAS EET

La enfermedad paradigmática del grupo es el "scrapie" o prurito lumbar de los ovinos; los primeros registros en Europa se remontan a la época del Imperio Romano. El origen de estas enfermedades puede ser infeccioso, espontáneo o hereditario, según veremos al analizar etiología y patogenia (tabla 81-1).

PATOLOGIA

En ovejas con "scrapie" pueden observarse áreas sin lana, escoriaciones y emaciación. Es casi axiomático en las EET que los cambios histológicos se encuentran sólo en el sistema nervioso central (SNC). Una tríada de cambios microscópicos caracteriza a las EET: degeneración espongiforme de neuronas, gliosis astrocitaria grave y la formación de placas amiloideas. Es conveniente también puntualizar la ausencia de respuesta inflamatoria, de cuerpos de inclusión y de nódulos gliales.

La "**degeneración espongiforme**" del SNC es un cambio neuropatológico predominante en las EET. Consiste en la formación intracelular de vacuolas que dilatan focalmente los procesos neuronales (dendritas y axones), confiriendo a la sustancia gris una apariencia microvacuolar (*status spongiosus*). Otras veces, se forman vacuolas de gran tamaño en el pericarion neuronal: una sola gran vacuola o varias más pequeñas (fig. 81-1B). El *status spongiosus* es el cambio vacuolar predominante en las EET; empero, en el caso particular del "scrapie" en ovinos, se le ha conferido mayor importancia a la vacuolización del pericarion. Existen grandes variaciones en las distintas EET en lo que respecta a vacuolizaciones del SNC. En el caso del "scrapie" natural en ovinos, esas variaciones dependen de la raza afectada y de la cepa del agente. Se han identificado por lo menos 20 cepas del "scrapie", algunas causan vacuolización ostensible, mientras que otras se traducen en necrosis neuronal con muy escasa o nula vacuolización. No debería confirmarse o descartarse un diagnóstico histológico de "scrapie" o de otra EET basándose únicamente en la presencia o ausencia de vacuolas en el SNC.

El cambio espongiforme es considerado prácticamente constante en la BSE a nivel del óbex (fig. 81-1A). Empero, en años recientes, se comenzó a presentar una variante que resulta muy llamativa: un número creciente de cerebros afectados no muestran vacuolas.

La **proliferación astrocitaria** se considera como un cambio reactivo secundario, no específico y consecuencia de la lesión neuronal.

La formación de **placas amiloideas** varía ampliamente en las distintas EET y aun en una misma enfermedad. En la Gerts-mann-Sträussler-Scheinker (GSS) son siempre muy abundantes, especialmente en el cerebelo, se presentan en el 50 a 70% de los casos en el kuru, y solamente en un 5 a 10% de los casos de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD). Son comunes en la enfermedad crónica emaciante (CWD) y pueden aparecer en el "scrapie" experimental; en el "scrapie" natural son de presentación variable: infrecuente según algunos autores, o más o menos constantes según otros. En realidad, el tipo de lesiones depende de la raza de los animales afectados y de la cepa del agente, como ya fue mencionado. Más raras aún parecen ser en el SNC de vacunos afectados por BSE.

Tabla 81-1. EET identificadas en distintas especies y características de transmisibilidad

Hospedador	Enfermedad	Abreviatura	Transmisibilidad	Características
Hombre	Kuru	Kuru	Infección	Canibalismo
"	Creutzfeldt-Jakob	CJD (esporádica)	Mutación somática	Hereditaria o esporádica
"	"	CJD (familiar)	Mutación germinal	Hereditaria
"	"	CJD (iatrogénica)	Infección	Trasplantes, hormonas, etc.
"	"	nvCJD (variante nueva)	Infección con BSE	Alimentos
"	Gertsmann-Sträussler-Scheinker	GSS	Mutación germinal	Hereditaria
"	Insomnio familiar fatal	IFF	Mutación germinal	Hereditaria
"	Insomnio fatal esporádico	IFE	Mutación somática	Esporádica
Ovino y caprino	Prurito lumbar o scrapie	Sc	Infección	Placentas, pastos, etc.
Bovinos	Encefalopatía espongiforme bovina	BSE	Infección con BSE	Harinas animales
Visón	Encefalopatía transmisible	TME	Infección	Alimentos y heridas
Gato doméstico	Encefalopatía espongiforme felina	FSE	Infección con BSE	Alimentos
Ciervos y alces	Enfermedad crónica emaciante	CWD	Infección	No determinadas
Ungulados salvajes (muflón, gacela, eland, etc.)	Encefalopatía espongiforme	USE	Infección	Alimentos con BSE
Felinos salvajes (guepardo, pantera, puma)	Encefalopatía espongiforme felina	FSE	Infección	Alimentos con BSE

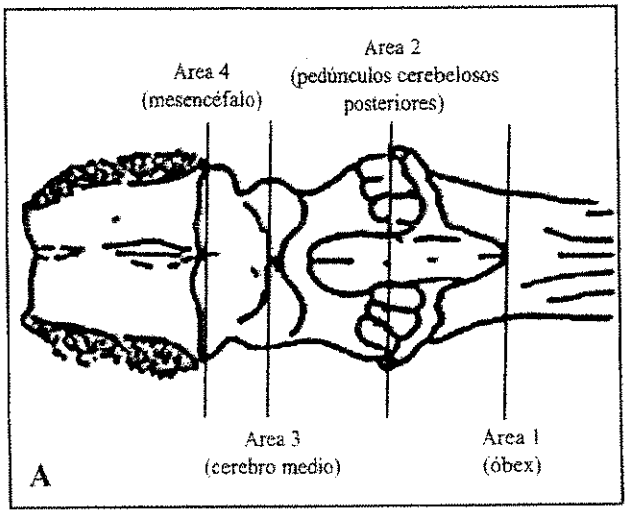
La deposición de amiloide es especialmente marcada en la nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (nvCJD): las placas de sustancia amiloidea son abundantes en cerebro y cerebelo, estando presentes en número menor en ganglios basales, tálamo e hipotálamo. Ese cuadro contrasta netamente con las escasas placas observadas en la CJD tradicional de distintos orígenes (esporádica, iatrogénica, o hereditaria: véase etiología); y es también diferente al cuadro observado en la GSS.

La sustancia amiloidea está constituida por una proteína celular que resulta alterada en las EET y que juega un papel crucial en la patogenia de estas enfermedades. La misma se denomina proteína priónica "scrapie", PrP^{Sc}, y a la isoforma celular se la designa PrP^{c}. Mucho se ha especulado sobre la significación de la PrP^{Sc} tal como veremos al considerar la patogenia de estas afecciones. La detección de sustancia amiloidea se suele realizar por métodos histoquímicos convencionales, especialmente la coloración de rojo Congo, a tal punto que la "congofilia" es una propiedad que es operacional en la definición de "amiloidosis". Las técnicas inmunohistoquímicas permiten la detección de la PrP^{Sc} en muchos casos que resultaban negativos con los métodos histológicos usuales.

ASPECTOS CLINICOS

Las manifestaciones clínicas de los ovinos afectados de "scrapie" podrían agruparse en cinco tipos de disturbios:

1) Metabólicos: los animales muestran anorexia y pérdida de masa muscular; ocasionalmente pueden presentar obesidad.
2) Función motora: los disturbios son poco evidentes al principio, comienzan con hipermetría e incoordinación, progresando a debilidad, ataxia y finalmente postración. Los trastornos locomotores se descubren o exacerban cuando los animales son excitados, y pueden recuperarse en algunos minutos si se los deja en reposo.
3) Sensoriales: prurito intenso sin evidencias de enfermedad cutánea; los animales se rascan contra objetos firmes y se muerden, esto origina pérdida de lana y escoriaciones.
4) De comportamiento: signos de inestabilidad emocional, ansiedad, confusión, estupor e hiperexcitabilidad.



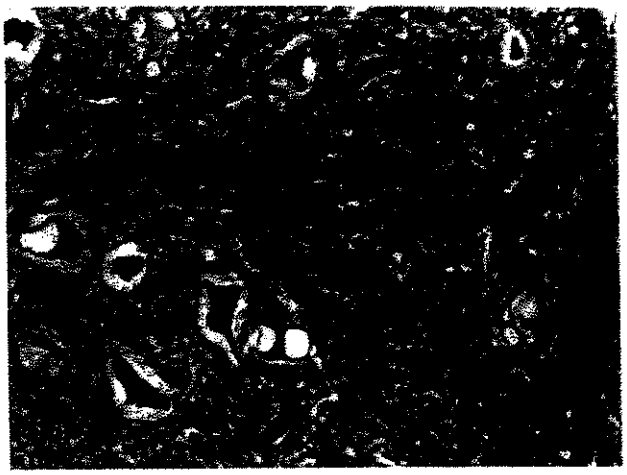


Figura 81-1. *A*, Sitios importantes a examinar en la búsqueda de lesiones de BSE o "scrapie" (Davis y col., 1991). *B*, Vacuolización del pericarion.

5) De control del sistema nervioso autónomo: taquicardia, arritmia cardíaca, distorsión de la motilidad alimentaria e ineficiencia para mantener la homeostasis corporal en condiciones de perturbaciones ambientales moderadas.

El cuadro clínico puede mostrar amplias variaciones que dependen de la cepa del agente y de las razas de ovinos afectadas. En algunas razas predomina el prurito y en otras la incoordinación.

En el caso de la **BSE**, los signos tempranos incluyen cambios repentinos de conducta, especialmente aprensión y/o agresividad. Cabeza baja, con orejas que cambian de posición constantemente y respuesta exagerada frente a sonidos repentinos; algunas veces puede detectarse un fino tremor de la cabeza. Frecuentemente se frotan la cabeza contra las paredes o intentan rascársela con la pata. Generalmente se resisten cuando se intenta inspeccionar la cabeza. Otros signos consisten en cambios notorios en la postura y en los movimientos: incoordinación, miembros posteriores muy separados, dificultades para levantarse por debilidad muscular, anomalías en la marcha, tambaleo del tren posterior. Casi siempre hay una marcada pérdida de peso y disminución abrupta de la producción láctea, aunque esto último no es constante. En la etapa terminal de la enfermedad los animales quedan postrados. El cuadro clínico varía considerablemente de una vaca a otra, y ninguna va a mostrar todos los cambios mencionados anteriormente; el diagnóstico clínico debe ser confirmado por sucesivas reexaminaciones.

En las EET que afectan al humano se presentan varias de las manifestaciones clínicas mencionadas. La **CJD** incluye alteraciones en la personalidad y deterioro de las funciones intelectuales y de la memoria reciente, a lo que se agregan generalmente contracciones bruscas y localizadas de algunos grupos musculares, frecuentemente desencadenadas por estímulos sensoriales. A medida que la afección avanza, aparece demencia progresiva y marcada disfunción motora con un perfil característico en el electroencefalograma (EEG). La enfermedad es, por lo usual, fatal dentro de pocos meses de la presentación (media 4 meses). El curso clínico de la **nvCJD** es muy diferente al de la CJD esporádica; las manifestaciones clínicas comienzan con trastornos de conducta. Más adelante se presenta ataxia y demencia progresiva; la evolución es más larga que en la CJD convencional: 7,5 a 22,5 meses (media: 12).

ETIOLOGIA

La naturaleza infecciosa del "scrapie" se determinó ya hace más de medio siglo, aunque también se ha postulado la responsabilidad de un desorden genético autosómico recesivo en la aparición del mal. Los hallazgos referidos a la CJD del hombre permiten comprender mejor la aparente contradicción de una enfermedad que es al mismo tiempo infecciosa y hereditaria: un 5% de los casos es de origen iatrogénico (inoculación accidental, trasplantes, hormonas, instrumental: véase epidemiología), un 10 a 15% es de naturaleza hereditaria autosómica recesiva y en la mayoría de los casos es esporádica; estas últimas se explican como originadas en mutaciones en el gen que regula la síntesis de la PrP^{C}. No obstante, cualquiera sea el origen de las EET, los tejidos nerviosos de los individuos enfermos son capaces de producir una EET en animales de laboratorio por distintas vías de inoculación.

Durante varios años se consideró que las EET eran causadas por virus lentos no convencionales: lo primero por su largo período de incubación, y lo segundo, por los reiterados fracasos de los intentos de aislar partículas virales. Las fallas en la demostración de una etiología viral se sucedieron a lo largo de los años; en primer lugar por la imposibilidad de detectarlos o aislarlos con los métodos empleados con los virus conocidos, y en segunda instancia, por las inusuales propiedades biológicas que demostraron poseer los agentes de las EET. La discusión está aún lejos de terminar y, si bien son mayoría los investigadores que se inclinan por la hipótesis del prión, algunos siguen postulando la existencia de un virus. Nadie logra explicar, por ejemplo, cómo hacen diferentes cepas de priones que conservan características muy específicas al pasar de un animal a otro si carecen de ácidos nucleicos.

Algunas **características de los agentes de las EET** son sorprendentes; varias de ellas conocidas desde hace décadas: causan un devastador cambio degenerativo del sistema nervioso central en ausencia de respuesta inflamatoria. El sistema inmune permanece intacto pero no reacciona a la infección. Su resistencia es asombrosa y mucho mayor que la observada en otros agentes transmisibles conocidos: resisten por largo tiempo al formaldehído y al procesamiento histológico, al calor, a las radiaciones ionizantes y ultravioletas. Pueden resistir largos períodos a una exposición a calor seco de 160 °C, o de 240 °C por cortos períodos; luego

de permanecer 1 hora a 360 °C, aún conservan escasa capacidad infectante. La infectividad se mantiene prácticamente invariable en material enterrado por un período de 3 años. La resistencia extrema de este tipo de elementos infecciosos plantea dificultades únicas para desinfectar y esterilizar diversos elementos. La lavandina comercial (5,25% de hipoclorito de sodio) diluida al 10%, se considera capaz de destruir a los agentes de las EET. El autoclavado con vapor a 132 °C durante 1 hora también se considera efectivo. No obstante, depende de las cepas, el tipo de material, las características del autoclavado, etc. La inactivación de estos agentes, ya sea en el laboratorio o a nivel industrial, es un tema muy complejo y es abordado en detalle en diversas publicaciones.

La susceptibilidad y resistencia de estos agentes a diversas proteasas, enzimas capaces de degradar proteínas, ha sido motivo de intensos estudios y ha brindado información muy valiosa. El agente extraído de tejidos nerviosos y parcialmente purificado, es extraordinariamente resistente a la digestión en detergentes suaves y a la acción de la proteinasa K, una enzima de amplio rango de actividad y a la cual muy pocas proteínas son resistentes. La resistencia del material infeccioso a las nucleasas, diversas enzimas que degradan ácidos nucleicos, permitió postular que estos agentes carecerían de genoma. Y en efecto, todos los intentos por demostrar DNA o RNA en estos agentes han resultado infructuosos.

COMPOSICION QUIMICA Y NATURALEZA DE LOS AGENTES ETIOLOGICOS

Las propiedades tan particulares de estos agentes infecciosos llevaron a Prusiner a introducir un nuevo término para denominarlos: **prión**. Dicha palabra derivó del inglés: "*pro*teinaceous and *in*fectious". Según Prusiner, "los priones son pequeñas partículas proteináceas e infecciosas que son resistentes a la inactivación por la mayoría de los procedimientos que modifican a los ácidos nucleicos". Esa proteína, es una macromolécula estructural dentro del prión y se la simbolizó con las letras PrP, de "*prion protein*". En la hipótesis del prión, la PrP sería en sí misma el agente infeccioso; esa teoría ha generado mucho escepticismo, no obstante ser el mejor modelo disponible para explicar las características conocidas hasta el momento.

La PrP es en realidad una proteína celular normal que resulta alterada en las EET; la misma ha sido denominada proteína priónica, PrP^{Sc} (de proteína priónica "scrapie"), y a la isoforma normal se la designa PrP^{c} (de proteína priónica celular); las dos tienen un peso molecular de 30-35 k y están constituidas por unos 250 aminoácidos. Si se las somete a la acción de proteasa K, la PrP^{c} es fragmentada completamente; pero no ocurre lo mismo con la PrP^{Sc}, la proteólisis fragmenta sólo un extremo de la molécula, con pérdida de 67 aminoácidos y origina un polipéptido de peso molecular de 27-30 k, conocido como PrP^{27-30}. La capacidad infectante depende de la presencia de la PrP^{27-30}; no se ha logrado separar la infectividad de dicho polipéptido y con la eliminación o destrucción de la proteína anormal la infectividad desaparece. Los anticuerpos desarrollados en contra de PrP^{27-30} producida en el cerebro de ratón o de hámster infectado con "scrapie", reaccionan en forma cruzada con la PrP^{27-30} de otras especies en inmunohistoquímica e inmunobloting.

PATOGENESIS

La biología molecular ha brindado detalles esenciales para comprender los mecanismos celulares que originan las EET. La identidad de la PrP ha sido muy bien determinada y ha brindado un notable soporte a la hipótesis del prion. La PrP^{C} es codificada por un gen celular normal localizado en el cromosoma 20 en el hombre. El **gen PrP** expresa y codifica a esa proteína durante toda la vida en diversas células, incluyendo neuronas y neuroglía. Esos datos demostraron que la producción de PrP^{C} es un fenómeno normal en el cerebro sano. Un hallazgo muy importante fue demostrar que el gen PrP en los animales afectados por "scrapie" tiene la misma secuencia de nucleótidos que en los individuos normales, indicando que, al menos en ese caso, la proteína anormal no es producida por una mutación. La expresión del gen PrP no aumenta durante la enfermedad sugiriendo que el depósito de PrP^{Sc} no depende de un aumento en la síntesis proteica. No se conoce todavía cuál es la función de la PrP^{c}; el gen PrP está distribuido en animales tan separados por la evolución como la mosca de la fruta y el ser humano. Los datos disponibles indican que la PrP^{c} es una proteína de membrana; se ha especulado que podría desempeñar algún papel en la regulación y distribución de los receptores de acetilcolina, un neurotransmisor. Recientes estudios que emplean métodos de ingeniería genética en ratones, han brindado avances espectaculares; los animales a los que se les ha sacado el gen PrP (ratones $Prn\text{-}p^{0/0}$), y por lo tanto no sintetizan PrP^{c}, crecen, se reproducen normalmente y son totalmente resistentes a la inoculación con priones.

Estos hallazgos permitieron explicar varios interrogantes, pero plantearon otros nuevos. La presencia normal de la PrP^{c} permite explicar la falta de respuesta inmune durante la enfermedad, ya que la PrP^{Sc} no es lo suficientemente diferente como para ser reconocida como un antígeno extraño para el hospedador. Las propiedades infecciosas de la PrP^{Sc} podrían explicarse en términos de disrupción del metabolismo preexistente de la PrP^{c}. También permitieron explicar cómo las EET pueden ser espontáneas o hereditarias: mutaciones que ocurren "de novo" en el gen PrP permiten explicar la aparición de casos esporádicos de CJD y defectos hereditarios del mismo gen posibilitan explicar las TSE familiares.

En el caso de las EET de base genética (CJD familiar y GSS) se han descrito mutaciones suficientes para transformar a la PrP^{c} en PrP^{Sc} (fig. 81-2). Por ejemplo, en un estudio sobre GSS se determinó que una mutación simple en el codón 102 del gen PrP determina la sustitución de un aminoácido (prolina por leucina); ese único cambio origina en este caso la síntesis de la isoforma anormal (PrP^{Sc}). Hasta el año 2002 se habían caracterizado 24 mutaciones diferentes en el gen PrP humano relacionadas con la presentación familiar de EET.

Como ya fue mencionado, el gen PrP en los animales afectados por "scrapie" tiene la misma secuencia de nucleótidos que en los individuos normales. Esas evidencias parecen indicar que, en esos casos, la PrP^{c} es sometida a un procesamiento postranslacional que modifica profundamente sus características y la transforma en una isoforma resistente a las proteasas. El o los mecanismos que permiten la transformación de PrP^{c} a PrP^{Sc} es desconocido; una posible explicación se basa en la teoría "del dúo mortal" o "de la proteína sola". Según la misma, la PrP^{Sc} cataliza la conversión de PrP^{c} a PrP^{Sc}; las dos isoformas existirían como monómeros (moléculas aisladas) y dímeros (dos moléculas asociadas) en equilibrio. En los dímeros formados por una PrP^{c} y una PrP^{Sc}, la proteína anormal catalizaría la modificación de la PrP^{c}. El ciclo se repetiría y de esa manera aumentaría exponencialmente la proporción de PrP^{Sc} (fig. 81-3A).

La PrP^{Sc} se formaría en el interior de los lisosomas luego de ser fagocitados por la célula (fig. 81-3B). En los individuos infectados, los lisosomas contendrían tanto a la PrP^{c} como a la PrP^{Sc}; el medio

ácido lisosomal modificaría la estructura terciaria de las proteínas: ello posibilitaría la transformación de PrP^{c} en PrP^{Sc}. La acumulación de esta proteína anómala y resistente a las proteasas determinaría la ruptura de los lisosomas, que liberarían a la PrP^{Sc}. También se escaparían las enzimas lisosomales que serían responsables de la degradación del citoesqueleto y de la degeneración espongiforme de las células. Muerta esa célula, la PrP^{Sc} sería captada por otra neurona y en ella se repetiría el lento pero inexorable proceso de replicación y destrucción de las neuronas.

Se conocen muchos detalles de la patogenia del "scrapie" experimental en ratones y hámsters; los estudios en ovinos confirman esos hechos en casos de enfermedad natural. Si el material infeccioso se inocula por vía intracerebral, afecta directamente al encéfalo y el período de incubación es en general corto. Si la infección se produce por una vía periférica (oral, percutánea, intravenosa o intraperitoneal), el agente se multiplica principalmente en el bazo durante un tiempo prolongado. También lo hace en ganglios linfáticos, tonsilas, intestino, glándulas salivales y timo. Después de la replicación, el agente migra por dentro de los axones de los nervios viscerales autonómicos. La infección del sistema nervioso central se detecta primero en el segmento torácico de la médula espinal; de allí migra en ambas direcciones (craneal y caudal) a una velocidad de 0,5 a 1 mm por día; esa migración es mucho más lenta que lo observado en virus convencionales, como rabia o herpes. Llegando al encéfalo, la diseminación continúa lentamente hacia adelante a partir del bulbo raquídeo.

Las plaquetas expresan PrP^{c} en su membrana y podrían servir como sitio de replicación de la PrP^{Sc} además de participar en la diseminación de la misma por el organismo. En apoyo de esta hipótesis se trae a referencia la circunstancia de que algunas semanas después de la inoculación intracerebral de PrP^{Sc} el material infeccioso puede ser recuperado en el bazo, principal lugar de destrucción de las plaquetas. La BSE ha sido transmitida a ovejas mediante la transfusión de sangre de bovinos infectados.

El patrón de glicosilación de la PrP^{Sc} de distintos orígenes puede ser caracterizado por medio de "western blots" de la proteína luego de ser tratada con proteinasa K. La especificidad conformacional de las distintas "cepas" de priones se conserva cuando los agentes pasan de una especie a otra. El patrón de separación observado en la proteína de bovinos con BSE es idéntico al observado en gatos domésticos con encefalopatía espongiforme felina (FSE), en kudu con encefalopatía espongiforme (USE) y en la nvCJD en humanos. El patrón correspondiente a la CJD tradicional es muy diferente. Esta es una evidencia contundente referida a la relación entre la BSE y la nvCJD.

DIAGNOSTICO

El diagnóstico de las EET plantea múltiples dificultades; en el hombre, las biopsias de cerebro, la electroencefalografía y los métodos de resonancia magnética, brindan posibilidades que no existen en el caso de las EET de los animales domésticos. No obstante, aun en el caso de las EET humanas (CJD, GSS e insomio familiar fatal –FFI–) se plantean dificultades, y muchos casos de CJD han sido diagnosticados como enfermedad de Alzheimer u otros desórdenes neurológicos. En el caso de las EET de los animales, el diagnóstico depende de los signos clínicos y de la confirmación posmortem del cerebro por histopatología. Los estudios histológicos tampoco están libres de inconvenientes; las lesiones de vacuolización suelen estar restringidas a pequeñas

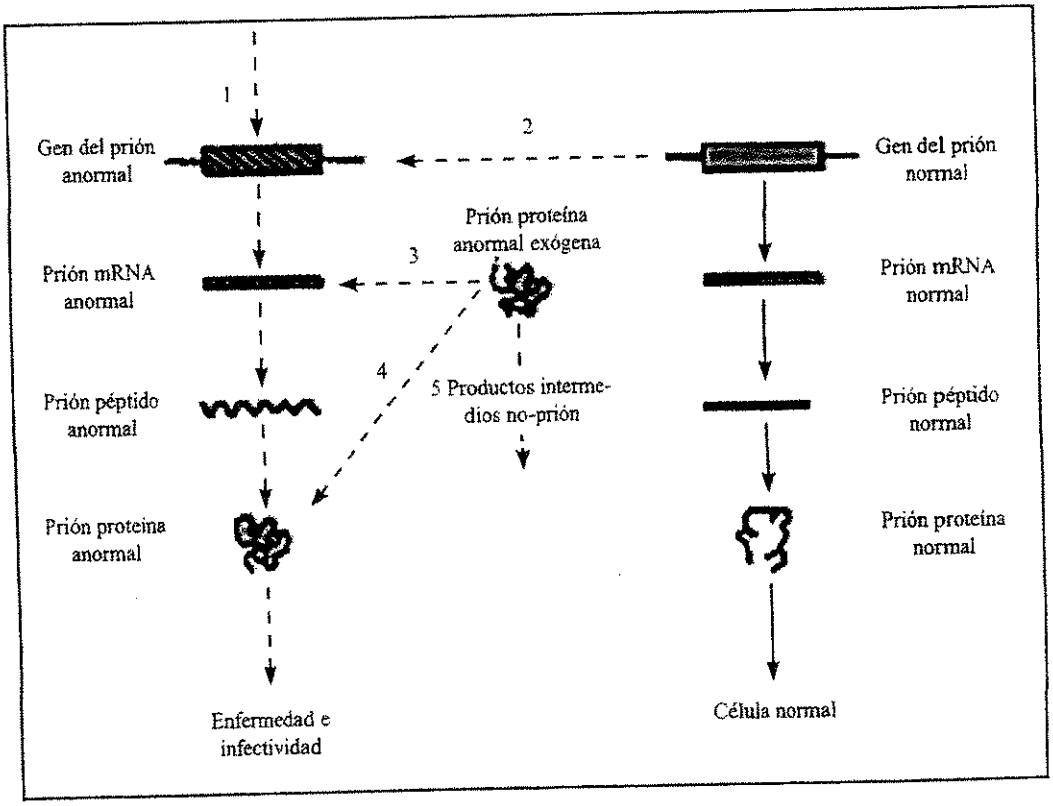


Figura 81-2. Posibles mecanismos para la producción de PrP^{Sc}. 1) Gen anormal hereditario; 2) mutación espontánea del gen; 3) traslación reversa anormal del mARN; 4) autocatálisis de la PrP^{Sc}; 5) PrP^{Sc} que induce su propia producción a través de productos intermedios no-prión. El proceso 1 sería responsable de los casos hereditarios, el 2 de los casos esporádicos y los procesos 3 al 5, de aquellos casos de infección adquirida. Las flechas sólidas indican acontecimientos normales; las flechas discontinuas, acontecimientos patológicos (Harrison y Roberts, 1991).

áreas del encéfalo, cuya distribución variable depende de la cepa del agente, de la especie afectada e incluso de la raza.

El diagnóstico histopatológico debe ser acompañado por otros métodos; entre ellos, la determinación por microscopia electrónica de "fibrillas asociadas al scrapie" (SAF). Este método se basa en el procesamiento de los tejidos con detergentes y con proteasa K: las proteínas de las muestras van a ser fragmentadas, a excepción de la PrP^{27-30}; la misma se dispone en forma de agregados filamentosos fácilmente observables en el microscopio electrónico.

El desarrollo de anticuerpos anti-PrP^{27-30} ha permitido implementar métodos inmunoquímicos e inmunohistoquímicos. Los primeros son realizados en material no fijado; principalmente por "western blotting" luego de la electroforesis en gel de poliacrilamida.

La presencia del agente del "scrapie" en tejidos linfáticos durante el periodo de incubación ha permitido ensayar distintos métodos de detección de la PrP^{sc} en esos tejidos. La determinación inmunohistoquímica en las tonsilas de ovejas durante la incubación del "scrapie" ha sido propuesta como una alternativa.

Tradicionalmente se recurre a la inoculación de material en gran número de ratones, y a observar la aparición de enfermedad nerviosa y lesiones luego de varios meses (entre 3 y 20); ello es muy caro y laborioso. En lo que respecta a la BSE, la infectividad sólo ha sido recuperada a partir de tejidos nerviosos y del íleon; no se lo ha conseguido detectar en otros tejidos por ningún método. En concreto, aún parece lejano el momento en que se pueda contar con un método apropiado para diagnosticar las EET en la etapa preclínica.

EPIDEMIOLOGIA

Tal como ya se mencionó el "scrapie" es endémico en Europa y ha sido diseminado a todos los continentes por el traslado de animales durante el largo período de incubación. Australia, Nueva Zelanda y Sudáfrica aparentemente estarían libres de la enfermedad luego de haber realizado programas de erradicación. El tema es conflictivo y los intereses económicos en juego determinan que, en muchos casos, la ausencia de "scrapie" sea más aparente que real ya que la enfermedad es tan temida que las ovejas sospechosas son sacrificadas y no se diagnostica.

La infección se transmite especialmente de la oveja al cordero en el momento del parto, y con posterioridad en un ambiente contaminado. Si bien las membranas fetales son altamente infecciosas, no se ha demostrado transmisión en el útero ni tampoco la presencia del agente en excreciones y secreciones. No obstante, el "scrapie" ha reaparecido en campos contaminados varios años después de eliminadas las majadas infectadas. Ya comentamos anteriormente la extraordinaria resistencia de estos agentes infecciosos.

La incidencia del "scrapie" es muy difícil de establecer; en Inglaterra y Gales se la estima en 0,5 a 1,1 casos/100 ovejas/año. La incidencia varía según las razas, pero aun en una misma raza hay fluctuaciones notables de un rebaño a otro. En algunos rebaños con varios cientos de ovejas, solamente aparecen uno o dos casos cada año, aunque en otros rebaños hasta la mitad de las ovejas mueren afectadas por la enfermedad antes del final de su vida económica.

El período de incubación del "scrapie" está controlado por un gen. Se ha sugerido que en muchas ovejas el período de incubación puede ser más largo que la duración natural de la vida de las ovejas y que esta sería la razón de su aparente resistencia.

Con respecto a la **CJD**, la epidemiología está mucho menos clara. En el 85% de los casos se trata de una presentación espontánea y esporádica en todo el mundo: afecta 1 o 2 personas por millón y por año; no se sabe si todos esos casos se originan en mutaciones espontáneas o si hay algún otro factor aún desconocido. Se han realizado numerosos estudios tratando de relacionar la CJD con el consumo de productos de origen ovino; los resultados hasta el momento han sido absolutamente negativos. No obstante, el tejido nervioso obtenido de enfermos de CJD es infeccioso cuando se lo inocula a diversas especies. Un 10% reconoce una distribución familiar sugestiva de transmisión hereditaria autosómica dominante, la clonación del gen PrP humano ha permitido caracterizar 24 mutaciones relacionadas con la presentación familiar de CJD. El 5% restante, unos 250 casos hasta el momento, está constituido por transmisión accidental entre seres humanos como consecuencia de procedimientos quirúrgicos o terapéuticos. Entre ellos se incluyen: trasplantes de córnea y de duramadre, electrodos aplicados en el cerebro y operaciones quirúrgicas para remoción de craneofaringiomas. Los casos más resonantes ocurrieron en niños y adolescentes que recibían hormona de crecimiento como tratamiento de la insuficiencia hipofisaria; la hormona era extraída de cadáveres humanos y se supone que alguno de esos individuos se encontraban en la etapa de incubación de la CJD, que puede variar de 1,5 a 30 años. Hace ya varios años que la hormona de crecimiento extraída de cadáveres humanos fue sustituida por una hormona sintética producida por ingeniería genética. Sin embargo, dicha hormona se sigue preparando a partir de cadáveres en algunos países de Europa Oriental y se consigue también en Occidente en el mercado negro. Sus principales consumidores son los atletas, fisicoculturistas, levantadores de pesas y corredores de velocidad y de fondo que la ingieren junto con anabólicos para aumentar su masa muscular.

Tanto la **GSS** como la **FFI** son siempre de carácter hereditario pero pueden ser transmisitidos a roedores experimentalmente.

El "**kuru**", estudiado en una población nativa de Nueva Guinea, despertó la curiosidad y el interés de los científicos. Los trabajos realizados en el terreno llegaron a determinar que el mal se transmitía por prácticas de canibalismo ritual, en el cual se ingería el cerebro de los familiares muertos como señal de respeto y en la creencia que de esa manera se transmitía la sabiduría de una generación a otra. La infección habría comenzado cuando un individuo afectado de CJD espontáneo entró en la "cadena alimenticia". La contaminación se producía por vía oral, conjuntival, mucosa y por pequeñas heridas; la supresión del canibalismo determinó la disminución paulatina y el control del "kuru". En total murieron más de 2500 personas.

En el caso de la **TME**, la infección se produjo, aparentemente, por administración del agente del "scrapie" con tejidos de ovejas infectadas. No obstante, persisten muchas dudas sobre el origen de esta afección. La TME se transmite por vía oral y también horizontalmente por peleas y mordeduras, pero no se ha demostrado transmisión vertical.

La epidemia de **BSE** que comenzó en Inglaterra en 1985 se habría originado en la administración de harinas de carne y de hueso. Otra hipótesis habla de la aparición de un cuadro espontáneo muy poco frecuente, en un proceso similar a la CJD tradicional. Las vísceras de animales afectados por BSE preclínica, fueron incorporadas a dichas harinas inadvertidamente durante varios años; de esa manera, la cepa adaptada a los vacunos fue pasada en forma seriada y repetida entre la población bovina. En julio de 1988 se prohibió en la Gran Bretaña el empleo de harina de carne y de hueso en alimentación animal. Considerando que la incubación de la BSE es de 3 a 8 años, la incidencia de la enfermedad debía comenzar a declinar a fines de 1992, para prácticamente desaparecer en 1996.

El pico de la epidemia llegó a su máximo en 1992, con cerca de 1000 casos denunciados por semana, luego comenzó a decli-

nar según lo previsto. Hasta el momento, alrededor de 200.000 bovinos han resultado afectados por BSE en Gran Bretaña, y la enfermedad se ha hecho presente en otros países. Se han comunicado más de 3200 casos en Europa y unos pocos en territorios alejados de ese continente: Omán, Islas Malvinas, Japón, Canadá y EE.UU. La mayoría de los casos se presentaron en animales importados desde las Islas Británicas.

La biología tenía reservada una sorpresa: la BSE comenzó a presentarse en animales nacidos luego de la prohibición del empleo de harina de carne y de hueso (**animales BAB**: "born after ban"); hasta marzo de 1995 se reportaron 35.000 animales BAB y 17.000 fueron confirmados por histología. Como ya fue mencionado (véase patología), en estos casos se ha encontrado un elevado número de animales afectados y sin las lesiones características. La aparición de los animales BAB, puede significar que no se ha respetado la prohibición y se siguió administrando harina de carne y de hueso, o que se produciría transmisión horizontal o vertical. Distintos estudios no han conseguido demostrar transmisión vertical u horizontal entre bovinos; no obstante, los animales BAB siguen apareciendo.

El impacto económico de la BSE ha sido enorme y es muy difícil de estimar, principalmente porque en los consumidores se ha arraigado la idea de asociar BSE con CJD, aun cuando no existan pruebas científicas definitivas. Los problemas de tipo económico originados por el tema BSE en Gran Bretaña pueden agruparse en tres categorías: caída de la demanda local de carne, caída de la demanda internacional y costos adicionales para la industria frigorífica.

Los aparición de la encefalopatía espongiforme felina (**FSE**) extendió las EET a los animales de compañía; las implicancias epidemiológicas de esa circunstancia las podrá demostrar el tiempo y las investigaciones en marcha. Ciertamente plantea una preocupación adicional: si tenemos en cuenta que la TME se pasaba por mordeduras y peleas, y que el kuru infectaba por erosiones y vía conjuntival, el gato doméstico podría ser un factor de riesgo importante. Hasta el momento, no se han encontrado evidencias que relacionen a la FSE con la nvCJD.

La **nvCJD**, como ya fue dicho, es muy diferente a la forma tradicional de CJD, no sólo en su patología sino también en su sintomatología y edad de presentación. La circunstancia de irrumpir primariamente en Gran Bretaña y de ser una entidad nosológica desconocida hasta ese momento, llevó de inmediato a relacionarla con la BSE. Todos los enfermos de nvCJD tienen el codón 128 en homocigosis (metionina-metionina) en el gen PrP, lo que marca la importancia de la constitución genética en la aparición de esta enfermedad. Hasta el momento se han identificado unos 145 casos, todos mostraron una asombrosa uniformidad, lo que estaría indicando que se trataría de una misma cepa de "prión".

La posible **relación causal entre la BSE y la nvCJD** es motivo de discusiones. En este momento hay consenso entre los científicos para confirmar esa conexión.

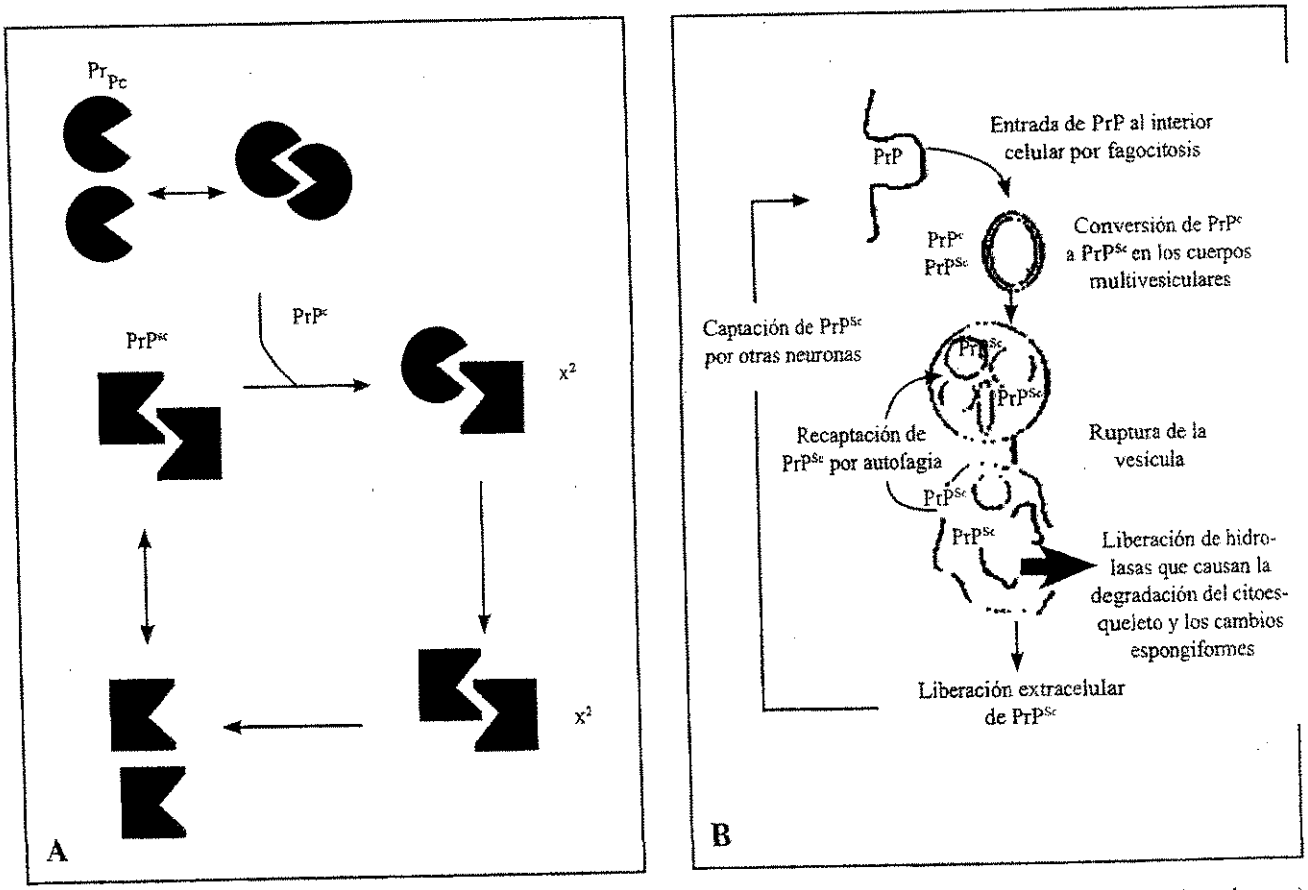


Figura 81-3. *A*, Teoría del dúo mortal o de la proteína sola. Tanto la PrP^c como la PrP^{Sc} existen como moléculas aisladas (monómeros) o como asociaciones de dos moléculas (dímeros), en estado de equilibrio. Cuando el dímero está constituido por una molécula de PrP^c y otra de PrP^{Sc}, la segunda cataliza la conversión de PrP^c en PrP^{Sc}. De acuerdo a esta teoría, PrP^c y PrP^{Sc} difieren en su forma y no en su estructura primaria (Hardy, 1991). *B*, Papel de los lisosomas en la formación de PrP^{Sc}. El medio ácido de estos organoides favorece la conversión de PrP^c en PrP^{Sc}. La sobrecarga origina ruptura del lisosoma y la proteína se libera al citoplasma junto con enzimas hidrolíticas. Como consecuencia, la neurona degenera y muere; la PrP^{Sc} puede ser captada por otra neurona en la que reanuda el ciclo (Mayer, 1992).

Análisis teóricos concluyen que la totalidad de la población del Reino Unido ha estado expuesta al agente de la BSE durante 10 años, de la misma manera que ha estado expuesta al agente del scrapie por más de 200 años. La aparición de la nvCJD estaría indicando la aparición de un agente mucho más virulento para el hombre que las cepas conocidas de scrapie, y con un tiempo de incubación corto a pesar de la barrera interespecies.

El agente de la BSE ha demostrado un comportamiento característico y desconocido hasta el momento en otros agentes de las EET: infecta fácilmente animales de otras especies por vía oral. Todo parece indicar que estamos en presencia de una nueva variante de prión que retiene sus características aun cuando salte entre especies muy diversas; en efecto, el agente aislado de cerebros de vaca, cabra, gato y kudu puede ser inoculado y reinoculado en distintas especies (oveja, cabra, cerdo, ratón) y conserva todas sus características, aun cuando esas especies tienen diferencias en el gen PrP y, por consiguiente, en la PrP^c. Esa característica no se observa en ninguna de las cepas bien caracterizadas de ovino, ratón o hámster.

Por la edad de los afectados (16 a 41 años, media 29), se supone que la exposición a la infección se produjo en la década de 1980, especialmente en la segunda mitad. Los interrogantes que se plantean son múltiples y preocupantes: ¿por qué esta nueva variante de CJD afecta solamente a personas jóvenes?, ¿cuántas resultaron expuestas y por que vía o vías?, ¿cuántos seres humanos estarán incubando la nvCJD?, ¿cuántos llegarán a presentar enfermedad clínica?, ¿desaparecerá la nvCJD?, ¿se detectarán otros "saltos interespecies"?

Reducir el problema a comer o no comer carne de vacuno, como lo hizo en su momento parte de la prensa, es una simplificación rayana con la miopía. Los productos de origen vacuno no están sólo en la carnicería: proteínas o lípidos de origen bovino se emplean en la elaboración de caldos, lácteos, cosméticos, cremas, postres, helados, galletas, salsas, caramelos, medicamentos muy diversos, vacunas, papel para cigarrillos, ropas, adhesivos, calzados, porcelanas, lápiz labial, champú, cremas cosméticas, dentífricos, jabones, etc.

La vía oral, para ser efectiva, probablemente requiere altos títulos de infectividad, los que únicamente se encuentran en cerebro y médula espinal. Los casos publicados de nvCJD deberían haberse producido por consumir cerebro de animales infectados con BSE. Si bien ninguna de esas personas ingirió cerebro de bovino conscientemente, seguramente lo hizo en forma inadvertida: el tejido nervioso licuado se utilizó en la elaboración de diversos alimentos en Gran Bretaña, como hamburguesas y salsas. Esto ocurrió hasta 1989, cuando esa y otras vísceras fueron prohibidas para consumo humano. La vía iatrogénica, mediante algún medicamento contaminado, no debería descartarse, según la opinión de algunos especialistas.

Las autoridades sanitarias en todos los países le están dando absoluta prioridad al tema y tomando todas las medidas preventivas posibles; los países que tienen BSE para erradicarla, y los que no la tienen para evitar que ingrese. Esas medidas se modificarán a medida que la ciencia esté en condiciones de ir respondiendo a los tremendos interrogantes que aún subsisten. La Argentina ha sido uno de los países que primero comprendieron la gravedad del problema y tomaron estrictas medidas de prevención; ello llevó a que sea reconocida oficialmente como país libre de BSE por los organismos internacionales. Las investigaciones continúan, y la humanidad llegará seguramente a comprender y controlar a esta verdadera catástrofe. Mientras tanto, los profesionales relacionados con las ciencias biológicas deberíamos mantenernos muy alertas e informados, pero en calma: el pánico nunca resulta de utilidad y solamente puede contribuir a complicar las cosas.

BIBLIOGRAFIA

Aguzzi A, Polymenidou M. Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. Cell 2004; 116: 313-327.

Davis AJ, Jenny AL, Miller LD. Diagnostic characteristics of bovine spongiform encephalopathy. J Vet Diagn Invest. 1991; 3: 266-271.

Hardy J. Prion dimers: A deadly duo. Trends Neurosci. 1991; 14: 423-424.

Harrison PJ, Roberts GW. Life, Jim. But not as we know it? Transmissible dementias and the prion protein. Brit J Psych. 1991; 158: 457-470.

Kubler E, Oesch B, Raeber AJ. Diagnosis of prion diseases. Brit Med Bull. 2003; 66: 267-279.

Prusiner SD. Scrapie prions. Annu Rev Microbiol. 1989; 43: 345-374.

Willesmith JW. Manual on bovine spongiform encephalopathy. Food and Agriculture Organization Animal Health. United Nations. Rome. http://www.fao.org/DOCREP/003/W8656E/W8656E00.HTM#Public%20health. 1998.

World Health Organization. Bovine spongiform encephalopathy. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs113/en/. 2002.

Capítulo 82

ECOLOGIA MICROBIANA

Alejandro J. Mariñelarena

INTRODUCCION

La ecología estudia las relaciones de los organismos entre sí y con el medio físico que habitan.

Los conceptos básicos de esta disciplina son aplicables a las poblaciones y comunidades de bacterias, aunque su estudio incluye algunas cuestiones adicionales referentes a sus dimensiones y a sus características metabólicas.

Dejando de lado los trabajos de laboratorio específicos sobre ecología bacteriana, en el medio ambiente las poblaciones de bacterias están en estrecha relación funcional con otros grupos de microorganismos como hongos, protozoarios, algas y algunos animales como rotíferos y microcrustáceos, lo que obliga a su estudio en conjunto dentro de la materia denominada ecología microbiana.

Estas formas de vida, todas de reducido tamaño, involucran una gran variedad de aspectos fisiológicos, foto y quimioautótrofos, heterótrofos aerobios y anaerobios, desarrollados a lo largo de todo el proceso de evolución fisicoquímica y biológica que sufrió el planeta desde su formación.

LA EVOLUCION DE LA BIOSFERA

El término biosfera define todo el espacio físico del planeta (atmósfera, corteza y aguas superficiales) ocupado por formas vivientes.

Las evidencias geológicas indican que las primeras formas de vida sobre la Tierra datan de unos 3000 millones de años atrás, cuando las condiciones del planeta eran muy diferentes a las actuales.

En un ambiente netamente reductor, con dominancia de dióxido y monóxido de carbono, metano, hidrógeno, amonio, agua y quizá sulfuros, las primeras células procariotas eran anaerobios obligados, fotótrofos y/o fermentadores, como las actuales bacterias fotosintéticas anoxigénicas, las metanogénicas y las reductoras de sulfatos.

Aproximadamente 1000 millones de años después, aparecen las cianobacterias (algas verde-azuladas o cianofitas) con la fotosíntesis "moderna" de dos sistemas, que utiliza la molécula de agua como fuente de protones y libera oxígeno molecular como subproducto. Recién en esta etapa pudo desarrollarse el mecanismo enzimático oxidativo que permite la respiración aerobia. Sin embargo, la concentración de oxígeno en la atmósfera se mantuvo en un 1% de los valores actuales durante los siguientes 1500 millones de años. Durante ese lapso el excedente de la fotosíntesis se consumió en la oxidación de gases y minerales reducidos en la superficie del planeta y en el proceso respiratorio de los microorganismos heterótrofos. Hace 500-600 millones de años, cuando se generan una corteza terrestre y una atmósfera oxidadas, se produce la explosión evolutiva de plantas y animales superiores. Ambos grupos se desarrollan a partir de adquirir una serie de características que les brindan una gran capacidad de adaptación a las condiciones reinantes.

La agrupación de células especializadas en tejidos y órganos, con capacidad de almacenar agua y reservas; la reproducción sexual con la consecuente diversidad genética, que garantiza la adaptabilidad ante los cambios de condiciones ambientales; las progenies aseguradas por la producción de grandes cantidades de semillas, de huevos o el cuidado de la cría; la capacidad de colonización de nuevos ambientes mediante muy variados métodos de dispersión de las semillas, huevos o la capacidad de locomoción. Para lograr esto, cada grupo se valió de un mecanismo nutricional eficiente y universal; la fotosíntesis de dos fotosistemas en las plantas y el consumo heterotrófico con respiración aerobia en los animales.

Estas características les permitieron colonizar todos los ambientes del globo y superar grandes cataclismos pese a las extinciones masivas de las formas menos adaptadas.

Cabe analizar entonces, cuál es la ventaja adaptativa de las bacterias para que sigan existiendo con su organización simple y muchos de sus procesos metabólicos lentos y poco eficientes.

LA ESTRATEGIA BACTERIANA

Sin dudas, una buena parte del éxito de la célula bacteriana radica en su tamaño, que en promedio es de sólo algunos micrómetros cúbicos.

Una relación superficie-volumen muy alta, le permite a cada unidad de citoplasma un intercambio rápido y eficaz con el medio ambiente a través de la membrana celular. Por esta razón, la célula bacteriana puede prescindir de organelas para funciones metabólicas específicas y mantener un nivel de organización simple.

No posee mitocondrias, disponiendo de sus enzimas respiratorias directamente sobre la membrana celular. La digestión se realiza en forma extracelular por medio de liberación de exoenzimas y la nutrición mediante el ingreso selectivo a través de la membrana plasmática de los componentes disueltos en el medio que la rodea. La falta de organización nuclear hace que los procesos de duplicación de DNA y de síntesis de proteínas se vean notablemente agilizados.

La célula procariota obtiene así capacidades metabólicas sorprendentes, que en condiciones adecuadas le permiten duplicar su biomasa en 30 minutos o menos y superar por muchas veces la actividad biológica de los tejidos animales y vegetales.

Los microorganismos pueden desarrollar poblaciones muy numerosas cuando las condiciones ambientales les ofrecen un recurso energético apropiado, explotándolo rápidamente. Como consecuencia de esta capacidad, la población con los subproductos de su metabolismo, modifica la composición fisicoquímica del medio, autolimitando su crecimiento y favoreciendo la selección posterior de una nueva población que se adapte a las nuevas condiciones.

El comportamiento del mundo físico, en los rangos de tamaño de la célula bacteriana, es muy diferente de la noción empírica que tenemos. Las células bacterianas están expuestas a una serie de fuerzas de atracción y repulsión respecto de las otras partículas y de los materiales disueltos en el ambiente, que contribuyen a que el desarrollo de colonias, poblaciones y comunidades muestre un patrón definido por la tendencia a la aglutinación. Así, sobre

cualquier partícula orgánica o inorgánica, se concentran sustancias nutritivas disueltas y se desarrollan microcolonias que se sirven de ellas. Su metabolismo crea condiciones diferentes a las originales que permiten el desarrollo de nuevos integrantes de la comunidad. En el seno de estas partículas, por agotamiento del oxígeno disuelto, se crean rápidamente condiciones de anaerobiosis y de bajo potencial redox, semejantes a los existentes en la biosfera primitiva. Sin la posibilidad de utilizar las vías aeróbicas de oxidación, aparecen formas anaerobias facultativas u obligadas que por medio de fermentaciones pueden mineralizar los compuestos orgánicos disponibles a sus formas inorgánicas elementales reducidas. Estas difunden en el medio y cuando acceden a condiciones de aerobiosis son oxidadas y quedan a disposición de los productores primarios (plantas) para ingresar nuevamente en el ciclo de la materia.

Estos procesos, que ocurren continuamente en enormes extensiones de los fondos oceánicos y en las profundidades del suelo por aporte de materia orgánica muerta, permiten la continua selección de microorganismos con la capacidad de aprovechar esos compuestos como fuente de energía, que no pueden ser utilizados por las formas de vida superiores. Su reducido tamaño les permite utilizar un recurso disperso como es la materia orgánica soluble o finamente particulada y su diversidad metabólica, y aprovecharlo aun en condiciones altamente reductoras sin necesidad de oxígeno disuelto.

Por medio de la recuperación de esos elementos, que de otra forma quedarían atrapados en sus estructuras orgánicas indefinidamente, los microorganismos realizan un papel fundamental en el mantenimiento de las condiciones de la biosfera.

CONCEPTOS DE ECOLOGIA Y SU APLICACION A LOS MICROORGANISMOS:

HABITAT

La menor división de la biosfera es el hábitat, definido como el espacio físico en el que se puede hallar a un organismo.

Hábitat nicho es el espacio físico en el que se dan las condiciones ambientales para el desarrollo de un organismo. El concepto de hábitat nicho se superpone en algún aspecto con el de nicho ecológico, que se define como un espacio multidimensional delimitado por variables fisicoquímicas y biológicas.

El hábitat nicho nos permite, sin embargo, definir el espacio habitado por los individuos adaptados a las condiciones ambientales existentes en él (autóctonos) y diferenciarlos de los que podemos hallar circunstancialmente pero que no pueden cumplir allí su ciclo de vida (alóctonos).

Si bien se suele dividir el estudio de los microorganismos en microbiota del suelo, del agua y del aire, todas las bacterias viven en un medio acuático. Muchas presentan formas de resistencia que les permiten tolerar épocas de sequía y dispersarse por el ambiente, con la probabilidad de colonizar otros hábitats que presenten las condiciones mínimas para completar las etapas del ciclo.

No se ha demostrado fehacientemente que haya bacterias que cumplan su ciclo vital en la atmósfera, siendo ésta un medio de transporte y dispersión de las formas de resistencia y células viables, arrastradas por las turbulencias de superficie.

En el suelo, las bacterias crecen incluidas en microgotas de agua, adsorbida sobre la superficie de las partículas o en el espacio intersticial entre las mismas. Sus poblaciones son reguladas por la disponibilidad de nutrientes, las condiciones fisicoquímicas del terreno y la relación con los otros componentes de la comunidad.

En los ambientes acuáticos, la distribución cualicuantitativa de la microbiota bacteriana, está fuertemente influenciada por otras comunidades. Los productores primarios (algas) generan un ambiente rico en materia orgánica, mientras que muchos protozoos se alimentan con bacterias.

En los lagos productivos la mayoría de las bacterias crece sobre partículas. En aguas oligotróficas predominan las poblaciones planctónicas libres. Los sedimentos presentan características de oxidorreducción muy diferentes al agua, lo que define la existencia de una microbiota particular.

Al intentar definir las condiciones ambientales de un hábitat en ecología microbiana, se presentan problemas metodológicos.

Generalmente se trata de correlacionar los componentes bióticos del agua o del suelo (microbiota de bacterias, algas, hongos, etc.), con los rangos de temperatura, pH, o salinidad medidos en grandes porciones del ambiente.

Dadas las dimensiones de los organismos en estudio, es necesario incorporar la concepción de microhábitats, cuyas condiciones están muy modificadas por el metabolismo celular y que tienen características muy diferentes del macroambiente que las rodea. En una partícula de materia orgánica, suspendida en la columna de agua de un lago y colonizada por bacterias, se podrán medir en espacios de pocos micrómetros de espesor, importantes gradientes de pH, potencial redox, concentraciones de gases disueltos (O_2 y CO_2) y de nutrientes orgánicos e inorgánicos.

Ello definirá una serie de microhábitats que serán colonizados por muy diferentes grupos de organismos con requerimientos y capacidades metabólicas muy diversas.

Las condiciones ambientales dentro y en la superficie de la partícula tendrán muy poco en común con las que se puedan medir en la masa de agua con sondas de campo o con análisis de laboratorio. En consecuencia, las relaciones que se intenten establecer entre las variables así determinadas y los organismos aislados, pueden llevar a conclusiones erróneas.

POBLACION

Se define como población a un grupo de individuos de una misma especie que convive en un mismo espacio físico (hábitat).

Para el desarrollo de una población es necesaria la colonización del hábitat y la existencia de condiciones ambientales aptas para el desarrollo.

Los microorganismos tienen muchas y muy variadas formas de colonización de ambientes, mediante formas de resistencia o células viables transportadas por turbulencias atmosféricas, escorrentía pluvial o fluvial, y dentro o encima de organismos con posibilidades de traslación en el medio.

El desarrollo de la población una vez colonizado el hábitat, depende de una serie de factores fisicoquímicos y nutricionales del medio.

Algunos se rigen por un rango de tolerancia, fuera de cuyos extremos la variable se convierte en un factor excluyente (pH, temperatura). Cada especie tiene su rango de tolerancia para cada variable, habiendo grupos específicos con niveles de tolerancia extremos.

Para otros parámetros cada microorganismo tiene un requerimiento mínimo, especialmente de factores de nutrición (agua disponible, concentraciones de nutrientes y gases, etc.), por debajo del cual les es inhibido el crecimiento.

La superposición en el ambiente de todos estos rangos de tolerancia y factores mínimos limitantes, selecciona entre todos los organismos que colonizan el hábitat a los susceptibles de desarrollar una población en el mismo.

A su vez, los rangos de tolerancia de un organismo a un factor, son afectados por otros factores. Por ejemplo, la tolerancia al pH puede variar a diferentes temperaturas o el cambio de pH puede hacer que la misma concentración de un compuesto sea tolerada o no.

Los organismos, a su vez, modifican el ambiente con su metabolismo y cambian las condiciones originales en que desarrolló su población, pudiendo llevar algunos de los factores ambientales a un extremo de tolerancia o de concentración mínima limitante.

COMUNIDAD

La comunidad es la suma de las poblaciones que conviven e interactúan en un mismo hábitat. Además de los factores ambientales determinantes de la presencia de cada una de las poblaciones que comparten un hábitat, la estructura de la comunidad está también subordinada a una serie de interacciones entre dichas poblaciones.

Las interacciones entre poblaciones son muy variadas pudiendo ser positivas o negativas para ambas, positiva para una y negativa para la otra, positiva para una y neutra para la otra, etc. Existen relaciones entre poblaciones muy difíciles de catalogar.

Sinergismo

Algunos sustratos sólo pueden ser mineralizados totalmente por un "consorcio" de especies, en el que cada una efectúa un paso metabólico, pero ninguna puede realizar todo el proceso por sí sola.

Sintrofismo

Es una variante de la anterior, en el que una especie efectúa un proceso metabólico y otra utiliza el producto final pero a su vez libera un nutriente esencial para la primera. Estas relaciones se dan habitualmente en los procesos de degradación de moléculas complejas como hidrocarburos cíclicos o pesticidas.

Comensalismo

Es una relación beneficiosa unidireccional en la que una población utiliza los productos del metabolismo de otra que no obtiene beneficio ni perjuicio. Es el caso de muchas poblaciones con metabolismo fermentativo.

Competencia

Es una relación negativa en la que dos poblaciones se disputan un mismo recurso ya sea espacial o nutricional. En condiciones estables, las comunidades que se encuentran en un ambiente son el resultado de esta interacción, presentando solamente poblaciones adaptadas a la utilización de recursos diferentes.

Sin embargo, es frecuente encontrar comunidades con poblaciones que se superponen, compitiendo por un recurso particular. Esta situación se genera por la existencia de otro factor con variación diaria o estacional que hace que en distintos momentos del día o del año, una población domine sobre la otra y viceversa. Variables como el fotoperíodo y la temperatura son ejemplos de alternancia estacional de poblaciones que compiten por un recurso nutricional, mientras que la concentración de oxígeno disuelto, de dióxido de carbono o la luz, pueden explicar variaciones diarias que permitan la coexistencia de poblaciones superpuestas.

Amensalismo o antagonismo

Incluyen las relaciones en las que una población produce sustancias que inhiben el crecimiento de otra que podría utilizar el mismo recurso. Además de los organismos con capacidad para producir moléculas complejas con características de antibióticos, muchos otros casos se incluyen dentro de este concepto como los fermentadores lácticos que inhiben la posterior colonización de la leche fermentada, o los productores de ácidos grasos volátiles de la piel que evitan el desarrollo de bacterias y hongos patógenos oportunistas.

Parasitismo

En esta relación el parásito se beneficia y el hospedador se perjudica. La relación parásito-hospedador suele ser muy específica y tiene muchas formas diferentes. Entre las bacterias, hongos y protozoos se conocen tanto parásitos como hospedadores. Los virus son siempre parásitos y los hay específicos para todos los grupos.

Predación

Es el caso en que un organismo ingiere y digiere a su presa. En microbiología, sin embargo, existen algunos casos en los que es difícil diferenciar entre parasitismo y predación, ya que muchos microbios tienen exotoxinas y exoenzimas que les permiten atacar y digerir la presa sin ingerirla.

Las relaciones depredador-presa generalmente muestran variaciones cuantitativas cíclicas. Estas deben existir para que no se extinga uno de los dos, al igual que en parasitismo y a diferencia de los casos de competencia. Cuando la población presa es numerosa, el depredador se multiplica y ejerce mucha presión de captura hasta reducirla notablemente. En esta nueva condición el rendimiento energético por cada esfuerzo de captura se hace bajo para el depredador y su población disminuye, lo que permite que se recomponga la de la presa. Para obtener este tipo de relación estable la presa desarrolla características físicas (espinas) o de comportamiento (crecimiento en partículas, fototactismo negativo, etc.) que le permitan escapar de la extinción en el hábitat.

SUCESION

Todas estas interrelaciones definen en forma instantánea o estable la comunidad que podemos encontrar en un hábitat determinado.

Los cambios que ocurren en el sistema por variaciones diarias o estacionales, por la actividad de las poblaciones y por su interacción, modifican continuamente las condiciones del medio ambiente transformando cualquier tipo de equilibrio en inestable en un lapso mayor o menor.

Ello da origen al concepto de sucesión que es el cambio comunitario que responde al continuo cambio de las condiciones ambientales. En el mismo hábitat podemos encontrar en momentos sucesivos, distintas poblaciones explotando el mismo recurso, como producto de la adaptación a los cambios fisicoquímicos ocurridos en el ambiente.

Los casos más típicos de sucesión son los remplazos de poblaciones que ocurren durante la colonización de hábitats nuevos, estériles, como los suelos emergidos por actividad volcánica o el tracto digestivo de un neonato.

La colonización de un ambiente mineral comienza con una población o comunidad autotrófica, que puede utilizar algunos elementos esenciales disponibles en el medio y producir materia orgánica fotosintéticamente. Por lo general estos pioneros suelen tener la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. Sobre los exudados y restos de esta comunidad, se desarrolla una microbiota heterotrófica que metaboliza subproductos y que suele tener actividad enzimática como para disolver algunos componentes de la roca original (carbonatos, silicatos). Se genera así un ambiente orgánico con las condiciones adecuadas para permitir la germinación de las primeras plantas superiores. La penetración de las raíces en el suelo

modifica las condiciones a profundidades que no pueden ser colonizadas por autótrofos, permitiendo el desarrollo de poblaciones de bacterias y hongos en el microambiente que rodea las raices. Estos ambientes serán luego colonizados por animales (lombrices e insectos) que aportarán oxigeno a través de sus galeras.

De esta forma se generan los suelos orgánicos o húmicos cuyas diferencias dependerán de la composición química original, tamaño de grano, condiciones climáticas, etc.

El proceso de sucesión termina cuando se encuentra una comunidad estable o clímax, situación que como se mencionó antes, es muy difícil de definir en microbiología ya que involucra una gran variedad de factores climáticos, fisicoquímicos y espaciales.

ECOLOGIA ACUATICA MICROBIANA

Las aguas oceánicas conforman el volumen más importante de la biosfera ($4,5 \times 10^9$ km^3). La mayor parte de estas masas de agua son frías (4 °C), oscuras y muy pobres en elementos nutrientes. Las formas de vida de toda columna de agua, de unos 4 km de profundidad en promedio, se alimentan del carbono orgánico que se produce por fotosíntesis en el estrato iluminado superficial, de unos 30-50 m de profundidad.

Por esta razón las aguas de los océanos y muchas aguas continentales son ambientes muy diluidos, donde los microorganismos viven en estado de limitación de nutrientes y las bacterias y las algas tienen gran capacidad para captar y acumular nutrientes muy difusos.

Las algas unicelulares (fitoplancton) fijan carbono inorgánico y liberan en el agua carbono orgánico disuelto (excreciones) y particulado (biomasa celular). Las cadenas de consumidores se alimentan de esta producción.

Las bacterias hidrolizan la fracción particulada (restos celulares) e incorporan y digieren las moléculas disueltas, formando biomasa bacteriana y reciclando nutrientes elementales que retroalimentan a las poblaciones de algas.

Hasta 1970 las poblaciones de bacterias de los ambientes acuáticos se estudiaban con técnicas culturales que subestimaban notablemente sus números. Por entonces se reconocía el papel de las bacterias como mineralizadores, pero el valor cuantitativo de su biomasa en las cadenas tróficas se consideraba despreciable.

Las técnicas de microscopía de epifluorescencia y de microscopia electrónica permitieron realizar recuentos fehacientes, medir las células y calcular su biomasa. Las técnicas de incorporación de sustratos marcados con radioisótopos permitieron estimar la productividad secundaria bacteriana y la magnitud del flujo de energía que circula por el nivel trófico microbiano.

Una década después, en 1980, se sabía que las aguas naturales no contaminadas (continentales y marinas) contienen una comunidad bacteriana compuesta por 10^5-5×10^6 bacterias/ml, con una biomasa y una productividad semejante y a veces superior a la del fitoplancton.

En ese medio diluido y de concentración heterogénea, la célula bacteriana encuentra ocasionalmente condiciones adecuadas de nutrición (mucha actividad fotosintética o presencia de partículas de materia orgánica) y desarrolla una población numerosa. Al revertirse esa situación y volver al medio planctónico diluido, las células reducen su metabolismo y se dividen sin incrementar su biomasa, de manera que aumenta el número de individuos pero disminuye el tamaño celular promedio y pasan a un estado de latencia. En esa condición mantienen un mínimo de actividad celular (en las membranas y polirribosomas), que les permitirá aprovechar un sustrato cuando se encuentre disponible. Por esta razón, en el bacterioplancton las células presentan diversidad de tamaños y de estado fisiológico, hay algunas activas, algunas en estado de latencia y algunas muertas.

Las células bacterianas tienen una concentración de nutrientes mayor que los sustratos que consumen. Las bacterias en crecimiento, tienen mayor actividad metabólica y son más grandes. Su biomasa tiene mayor proporción de N y P por cada unidad de C (relación C:N 12%), o sea que son más "nutritivas".

Al pasar al estado de latencia, la concentración porcentual de los componentes celulares cambia, llegando su contenido de carbono hasta un 23%. No obstante, como el bacterioplancton muy chico domina en las aguas naturales (pudiendo superar a la biomasa de los productores primarios), constituye un gran reservorio de C y de otros nutrientes.

El ciclo microbiano

Hacia 1983, buscando una explicación a las relaciones de alimentación y control de las poblaciones bacterianas, se comenzó a hablar del ciclo microbiano o "*microbial loop*", consistente en una microrred trófica compuesta por bacterias, protozoos y algas.

La información disponible sugería que todas las aguas naturales no contaminadas (continentales y marinas) contienen una comunidad microbiana compuesta por 10^5-5×10^6 bacterias/ml (de entre 0,2 y 2 µm de largo), 10^3 flagelados/ml (2 a 30 µm), 10^3-10^4 algas/ml (10-100 µm), 10^1-10^2 ciliados/ml (8-100 µm) y 10^7 bacteriófagos/ml (60-120 nm). Esta microcomunidad vive en una masa de agua que contiene una reserva de carbono orgánico disuelto y particulado conformado por la producción primaria, las estructuras y las excreciones de los propios organismos.

Los flagelados y los ciliados chicos se alimentan de bacterias y controlan su número. En el proceso de digestión transforman aproximadamente el 30% de la biomasa bacteriana consumida en biomasa de flagelados, lo que representa una eficiencia muy elevada (10% es un valor típico para el paso de un eslabón trófico a otro). Además excretan muchos nutrientes de N y P que queda disponible para bacterias y productores primarios (algas), siendo responsables del 75% del reciclado (mineralización) de dichos elementos.

Los flagelados y los ciliados pequeños ejercen su presión de predación selectivamente sobre las bacterias más grandes y activas, que tienen mayor valor nutritivo. Los flagelados no remueven toda la producción secundaria bacteriana. Su capacidad de filtración de bacterias es efectiva hasta que los números de bacterias descienden a 5×10^5-10^6 bacterias/ml.

La biomasa de flagelados y ciliados chicos que se produce por consumo de bacterias, se transfiere a niveles tróficos superiores a través de ciliados grandes, otros protozoos, rotíferos y crustáceos.

El estudio de las redes tróficas microbianas puso de manifiesto la importancia del nano y picoplancton (organismos fotosintéticos menores de 5 µm), que en muchos ambientes representa mayor biomasa que el microplancton (fitoplancton de red). La producción primaria del nanoplancton es la que alimenta realmente gran parte de los océanos pobres y lagos oligotróficos del mundo. Además el hallazgo de transferencias de energía horizontales (entre individuos del mismo nivel trófico), numerosos casos de mixotrofía (metabolismo auto y heterotrófico en el mismo individuo) y relaciones simbióticas de protozoos con bacterias anaerobias, planteó la necesidad de revisar algunos conceptos de ecología.

La presencia generalizada de bacteriófagos en muestras de agua también está relacionada con el funcionamiento del ciclo microbiano. Los datos de estudios realizados en ambientes muy

diversos, permiten concluir que en las aguas naturales hay unos 10 virus por cada célula bacteriana (10^7 bacteriófagos/ml).

Entre un 1 y un 3% de las bacterias del agua presentan viriones (o sus cápsides) armados dentro de la célula. Esto significa, teniendo en cuenta la duración del ciclo, que un 20-30% de las bacterias están infectadas y en proceso de ciclo lítico. La *prole promedio* por cada bacteria lisada es de unos 50 virus. No obstante, los virus en el agua pierden rápidamente su capacidad infecciosa y desaparecen si no encuentran una célula blanco. Eso significa que para mantener los números presentes en el medio debe haber una producción importante y constante.

La mayoría de los virus son atenuados y tienen tendencia a incluirse en el DNA y a hacerse lisogénicos. No está claro si las bacterias que presentan síntomas de ciclo lítico (cápsides en su interior), son células que fueron infectadas por virus activos, o si la mayoría de las bacterias son lisogénicas y un porcentaje de la población que continuamente entra en estado lítico. Las bacterias infectadas que llevan un virus en estado lisogénico (en el DNA) están inmunizadas contra ese virus.

El control de las poblaciones de bacterias

Hay dos formas de control de las poblaciones bacterianas. Cuando son consumidas por los flagelados una parte de su biomasa se incorpora a una cadena trófica superior y el resto se recicla. Cuando la bacteria es infectada por un virus que cumple su ciclo lítico, la célula se desintegra y toda su biomasa se recicla como materia orgánica soluble, que junto con los productos de excreción de la comunidad forman el pool de materia orgánica disuelta. Este material es reciclado por las bacterias que vuelven a producir biomasa bacteriana y liberan compuestos inorgánicos de C, N y P que retroalimentan a las algas.

De esta forma el C se recicla por un circuito microbiano de material disuelto-bacterias-lisis (mediado por infección viral) o por otro de material disuelto-bacterias-protozoos-excreción (mediado por predación).

Desde el punto de vista ecológico y de la transferencia de energía dentro del sistema, es muy distinto que la regulación poblacional esté dada por flagelados que por virus. Es probable que tanto las poblaciones del fitoplancton como las de bacterias sean reguladas por predación en condiciones de crecimiento normales y por virosis cuando producen desarrollos demográficos explosivos y escapan a la velocidad de crecimiento de sus predadores. Estas condiciones de superpoblación permiten que los virus específicos puedan encontrar con alta eficiencia a su célula objetivo y controlar su desarrollo.

BIBLIOGRAFIA

Atlas RM, Bartha R. Microbial ecology: Fundamentals and applications. Addison-Wesley Publishing Co. Massachusetts. London. Amsterdam. 1981.

Azam F, Fenchel T, Field FG, Gray JS, Meyer-Reil LA, Thigstad F. The ecological role of water-column microbes in the sea. Mar Ecol Prog Ser. 1983; 10:257-263.

Campbell R. Ecología microbiana. Versión española de la segunda edición inglesa. Ed. Limusa S.A. México. 1987.

Fenchel T, Blackburn TH. Bacteria and mineral cycling. Academic Press. London. 1979.

Madigan MT, Martinko JM, Parker YJ. Brock, Biología de los Microorganismos. 8° Edición Revisada. Prentice Hall Iberia, Madrid. 1999.

Nedwell DB. The input and mineralization of organic carbon in anaerobic aquatic sediments. Adv Microb Ecol. 7: 93-131. 1984.

Soubes M. Microbiología de la digestión anaerobia. En: "Tratamiento Anaerobio". Proc. del III Taller y Seminario Latinoamericano "Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales". Montevideo, Uruguay. 1994.

Suttle CA. Do Viruses Control the Oceans? Natural History 1999; 108(1): 48-51.

Capítulo 83

ECOLOGIA MICROBIANA EN LOS ALIMENTOS

Julio Alberto Copes

El nuevo milenio, en donde la capacidad de adaptación a una forma de vida es indefinidamente veloz, exige como resultado un producto alimenticio de condición superior, el cual va a ser evaluado por la propia industria, agencias de control, organismos de investigación y desarrollo tecnológico y juzgado en su escalón final por el consumidor.

Las actuales demandas del mercado influyen básicamente en la seguridad y la calidad microbiológica de los alimentos. Debido a esto, una de las condiciones básicas que se debe tener en cuenta para comprender la manera en que habitan los microorganismos en los diferentes tipos de alimentos, es entender el funcionamiento de la "ecología microbiana".

El alimento, cualquiera sea su origen, posee características propias que interfieren en la colonización y desarrollo de ciertos tipos de microorganismos. Estas condiciones son las denominadas *intrínsecas*. Estos factores de orígenes físicos y químicos, cubren la mayoría de los factores de composición o de formulación, los que son diseñados por la ingeniería alimentaria.

Otros factores que influyen sobre la evolución de la flora microbiana en un alimento son aquellos considerados como no propios o constitutivos del producto, llamados factores *extrínsecos*.

FACTORES INTRINSECOS

pH

El pH de un alimento es uno de los principales factores que determinan la supervivencia y el crecimiento de los microorganismos durante el procesado, almacenaje y distribución. Los microorganismos se ven afectados por el nivel de iones H^+ libres y además por la concentración de ácido débil no disociado, la cual a su vez depende del pH. Los aniones de algunos ácidos débiles (ácido acético, láctico) son metabolizados dentro de la célula bacteriana, liberando H^+ que acidifican el interior de la célula hasta alcanzar niveles inhibitorios. Otros aniones no son metabolizados y por lo tanto no acidifican el interior de la célula.

El pH se determina comúnmente por medio de pHmetros electrónicos, los cuales obtienen precisiones de aproximadamente + 0,01 unidades de pH dentro del rango de 0-14.

Efecto del pH sobre los microorganismos

Muchos gérmenes pueden crecer dentro de un amplio rango de pH. Es de suponer que estas células dispondrían de métodos para estabilizar su pH interno. Sin embargo, se ha comprobado que el pH interior puede verse considerablemente afectado por el pH del medio exterior.

La expresión de genes que gobiernan el transporte de protones, la degradación de aminoácidos, la adaptación a condiciones ácidas o bases y aun ciertos factores de virulencia pueden ser regulados por el pH externo.

La influencia del pH en la expresión genética, es un área en la cual confluyen muchos proyectos de estudios y se evidencia como de vital importancia en la microbiología moderna de los alimentos. En la especie *Salmonella typhimurium* se han descrito tres mecanismos como: el de respuesta homeostática, tolerancia ácida y proteínas ácidas de choque.

Crecimiento

Los límites de pH para el desarrollo de diferentes microorganismos están comprendidos dentro del rango de valores 1 y 11 (*Thiobacillus thiooxidans* y *Vibrio parahaemolyticus* respectivamente). Gran cantidad de microorganismos crecen en forma óptima en valores de pH neutro, los cuales pueden desarrollarse sin problemas a pH entre 6 y 8.

La tabla 83-1 muestra el comportamiento de diferentes microorganismos en un extenso rango de pH. Es importante tener en cuenta que en los alimentos influyen otros factores tales como:

Factores intrínsecos
Factores de origen fisicoquímico propios del alimento:
pH, Aw, potencial de oxidorreducción, nutrientes,
barreras naturales y compuestos antimicrobianos naturales.

Factores extrínsecos
Condiciones ambientales: temperatura de almacenamiento, humedad relativa y atmósfera ambiental.

Tratamientos tecnológicos a los que fue sometido el producto: modificación de los caracteres físicos o químicos
Naturaleza y características de las especies colonizantes:
velocidad de crecimiento, sinergismos

la presencia de especies competidoras, tensión de oxígeno, temperatura desfavorable, actividad de agua escasa, daños térmicos sufridos durante el procesamiento, etc. que reducen la amplitud del rango de pH al que es posible su crecimiento.

Supervivencia

Cuando la acidez es lo suficientemente importante como para detener el crecimiento bacteriano, el período de tiempo que los microorganismos pueden mantenerse viables puede ser un dato crítico para evaluar su contribución potencial al deterioro o a la toxinfección del alimento, en caso de que las condiciones vuelvan a ser favorables para el crecimiento.

En condiciones desfavorables los microorganismos pueden verse privados de los componentes necesarios para su subsistencia y, por lo tanto, se ven en difíciles condiciones para regular su medio iónico interno y renovar sus componentes celulares. Indudablemente estas situaciones conllevan a la muerte celular. Distinto es el caso, cuando los microorganismos pueden incorporar los nutrientes suficientes para satisfacer el metabolismo basal, lo que evidenciará que su viabilidad se puede prolongar en determinado tiempo.

El pH es una de las propiedades intrínsecas de mayor importancia. Muchos de los ejemplos de pH-microorganismo aquí citados fueron obtenidos en forma experimental en el laboratorio. Las pruebas realizadas para hallar la concentración inhibitoria mínima de una solución ácida (ya sea por el uso de diferentes ácidos: nítrico, láctico, acético, etc.) para detener el crecimiento o producir la muerte de un microorganismo, casi siempre se realizaron con otras propiedades intrínsecas favorables al crecimiento del microorganismo. En los alimentos, el pH no sólo ejerce su interacción con las restantes propiedades intrínsecas, sino que también con las propiedades extrínsecas, modificando potencialmente en mayor grado el desarrollo o sobrevida del microorganismo en el producto.

> **Comentario de consideración:** *Clostridium botulinum*, productor de una toxina letal, no tolera medios demasiado ácidos. El grupo I no desarrolla por debajo de pH 4,6 y para el grupo II el límite de pH es de alrededor de 5, característica que permite aplicar tratamientos térmicos relativamente suaves para las frutas, pimientos y palmitos destinados a conserva. Lo mismo ocurre con los productos cuyo pH se hizo descender deliberadamente, ya sea por la adición de ácidos (escabeches) o por fermentación láctica (pickles, choucroute).

Con relación a este tema es importante tener en cuenta el poder tampón de los alimentos a ser procesados. Los pobres en proteínas poseen menor poder tampón (legumbres) y se dejan acidificar rápidamente. Los que poseen gran cantidad de proteínas poseen mayor poder tampón (carnes, pescado).

Actividad del agua (Aw)

La actividad del agua es probablemente el factor individual más importante como determinante en la alteración microbiana de los alimentos.

El agua representa el constituyente más abundante en muchos de los alimentos en estado natural con excepción de los granos. En presencia de agua se realizan la mayor parte de los procesos bioquímicos-físicos que son necesarios para la vida. Esto nos indica que la presencia de agua "libre o disponible" en diferentes concentraciones, es un punto desencadenante para el desarrollo de gérmenes, los cuales pueden ejercer una acción alteradora en el alimento, o producir algún tipo de sintomatología clínica en el consumidor.

Sujetándose a lo anteriormente dicho, el descenso de la cantidad de agua libre en el alimento limitaría el desarrollo de ciertos microorganismos. Por ejemplo:

* Eliminación del agua por desorción (deshidratación).
* Fijación de agua por adición de NaCl o sacarosa.
* Aislamiento de agua bajo la forma de cristales de hielo.

El uso de diferentes valores de Aw da como resultado varios métodos de preservación de alimentos históricamente usados por el hombre (por ej., salazón).

El agua presente en los tejidos vegetales y animales (que al estado natural o modificado sirven de alimento) puede estar más o menos disponible, de esa manera se distinguen las condiciones de agua libre y agua ligada. La segunda puede estar fuertemente unida, de tal forma que el estado del agua presente en un alimento es tan importante para la estabilidad del mismo como su contenido total.

Definición de la actividad del agua

La Aw de un alimento o solución, se define como la relación entre la presión de vapor del agua del alimento y la del agua pura a la misma temperatura.

La medición de los valores de la Aw es el sistema más fácil para obtener la disponibilidad del agua en diferentes alimentos. A medida que una solución se concentra, la presión de vapor disminuye y la Aw desciende a partir de un valor máximo de 1 para el agua pura.

En la tabla 83-2, se trata de representar someramente el comportamiento de algunas de las especies microbianas alteradoras de alimentos de mayor importancia.

> **Microorganismos halófilos, xerófilos y osmófilos:** en estos grupos se incluyen los microorganismos que crecen en niveles reducidos de Aw.
>
> • **Halófilos:** son aquellos que tienen necesidades de NaCl específicas para su desarrollo. Ejemplos: moderadamente halófilo: *Vibrio costicolus*, concentración de NaCl 0,3 M (0,90 Aw); fuertemente halófilo: *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes*, concentración de NaCl 18 M (0,87 Aw aproximadamente); extremadamente halófilo: *Halobacter halobium*, crece a saturación.
>
> • **Xerófilos:** el término xerófilo se aplica habitualmente a los hongos que pueden crecer a Aw inferiores a 0,85. El más

$$Aw = \frac{Pw \text{ (presión parcial de vapor de agua de una solución o alimento)}}{Pw^{o} \text{ (presión parcial del vapor de agua pura a la misma temperatura)}}$$

Valor de Aw: en un alimento es inferior a 1. De manera que el rango de medición de la actividad del agua en un alimento es de 1 a 0.

Tabla 83-1. Tipos de microorganismos asociados a alimentos con determinados valores de pH

pH y tipo de alimento	Ejemplo	Rango de pH	Microorganismos
Alcalinos: pH >7,0	Clara de huevo	Hasta 9,0	Gramnegativos: *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Proteus*.
Neutros: pH 7,0-6,5	Leche	6,8-7,0	*Lactobacillus*, *Bacillus*, *Micrococcus*, coliformes, *E. coli* O:157H:7, *Listeria monocytogenes*, etc.
	Jamón cocido	6,5	*Pseudomonas*, *Sarcina*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *L. monocytogenes*.
	Carnes ½ res	7,2-5,2	*Moraxella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Salmonella*, *E. coli* O:157H:7, *L. monocytogenes*, etc.
	Pollos	6,7-6,2	*Pseudomonas putrefaciens*, *Proteus*, *Campylobacter*, *Salmonella*.
De baja acidez: pH 6,5-5,3	Carne cruda de vacuno	5,8-5,4	*Coliformes*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Salmonella*, *E. coli* O157H7.
	Panceta (bacon)	5,6	*Micrococcus*, *L. monocytogenes*, levaduras
	Productos vegetales enlatados	6,4-5,4	Bacilos acidificantes no productores de gas
	Carnes empaquetadas	5,4	Enterobacterias, *Lactobacillus*, *Salmonella*, *E.coli* O157H7.
De acidez intermedia: pH 5,3-4,5	Productos enlatados: carnes, salsas, sopas, verduras	5,4-5,0	Anaerobios termófilos, anaerobios putrefactores, *Bacillus*.
	Queso cottage	4,5	Mohos, bacterias oxidativas gramnegativas.
Acido: pH 4,5-3,7	Pepinillos	4,0	*Bacillus nigrificans*, mohos, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*.
	Mayonesa	4,1-3,0	*Saccharomyces*, *Lactobacillus brevis*.
	Frutas, jugos de frutas	4,5-3,5	*E.coli* O157H7, *Lactobacillus*, mohos, levaduras

xerófilo es el *Xeromyces bisporus*. Algunos de los hongos micotóxicos de interés en alimentos son xerófilos.

- **Osmófilos:** las levaduras osmófilas son aquellas que se desarrollan en presencia de altas concentraciones de azúcar sin requerir necesariamente valores bajos de Aw. También pueden crecer en hábitat con altas concentraciones salinas.

Los hongos crecen más lentamente que la mayoría de las bacterias a altas concentraciones de Aw, pero con frecuencia desarrollan a Aw mucho más bajas.

Potencial de oxidorreduccion

Los procesos de oxidación y de reducción se definen en términos de migraciones electrónicas entre compuestos químicos. La oxidación es la pérdida de electrones mientras que la reducción es la ganancia de éstos.

Cuando una sustancia se oxida
(libera electrones)

▼

Simultáneamente, otra sustancia se reduce
(capta electrones)

Este potencial mide la capacidad oxidante o reductora que posee el medio, en este caso, el alimento. Está directamente relacionado, según su valor, con la proliferación de ciertos microorganismos.

Algunas especies desarrollan con mayor facilidad cuando en el medio el oxígeno se encuentra en forma libre (medio oxidante). Otras en cantidad restringida, con el oxígeno que puede estar combinado con otro tipo de gases. Finalmente, algunas especies no desarrollan en presencia de oxígeno (medio reductor). De esta manera, y desde el siglo XIX, se conocen las especies aerobias y anaerobias.

Aerobios estrictos: requieren un medio oxidante. Por lo tanto exigen un potencial redox de +200 mv. Ejemplos: mohos, bacterias gramnegativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, etc).

Anaerobios estrictos: requieren un medio reductor. Algunos crecerán en ausencia de oxígeno molecular. Por lo tanto exigen un potencial redox de –200 mv. Ejemplos: bacterias del género *Clostridium*. En este caso, se debe tener muy en cuenta que hay especies bacterianas que pueden desarrollar en diferentes valores de potencial redox, tales como los denominados anaerobios facultativos, como *Enterobacteriaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Lactobacteriaceae*, etc.

Microaerófilos: requieren potencial redox poco inferiores a 0. Ejemplo: *Campylobacter* sp.

Alimentos con potencial redox + (mayor a 1 mv) poseen mayor cantidad de sustancias oxidantes, las cuales en presencia de diferentes microorganismos aerobios van a ser reducidas.

Tabla 83-2. Relación entre la actividad del agua (Aw) y el desarrollo bacteriano de gérmenes alteradores

Valores de Aw	Gérmenes alteradores inhibidos en el límite inferior de cada intervalo	Ejemplos de alimentos que se sitúan en el correspondiente intervalo de Aw
1,00-0,95	Bacilos gramnegativos (*Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*), levaduras y mohos	Alimentos con el 26 a 40% (en peso) de sacarosa, o 3,5-7% de sal. Ejemplo: salchichas cocidas, carne y pescados frescos.
0,95-0,91	Cocos, *Lactobacillus*, *Bacillus*, mohos y levaduras	Alimentos con 55% de sacarosa, o con el 12% de sal. Queso gouda, o de maduración corta, concentrado de tomate, embutidos cocidos.
0,91-0,87	Cocos, bacterias del Gen. *Torula*, levaduras y mohos.	
0,87-0,80	La mayoría de los mohos *Staphylococcus aureus*	Contenido del 15 al 17% de humedad. Leche condensada azucarada.
0,80-0,75	Algunas bacterias halófilas, mohos xerófilos, levaduras osmófilas	Alimentos con el 26% (a saturación de NaCl). 15-17% de humedad. Mermeladas, pescados salados, frutas secas, extracto de carne.
0,75-0,65	Levaduras osmófilas, mohos xerófilos	10% de humedad. Copos de avena, nueces, cereales.
0,65-0,60	Levaduras osmófilas, mohos xerófilos. Algunos autores consideran la supervivencia por debajo de 0,60 de Aw.	Frutas deshidratadas con 15-20% de humedad. Caramelos blandos, miel, huevo y leche en polvo, chocolate.

Los potenciales de oxidorreducción dependen principalmente de los caracteres bioquímicos de los alimentos que, naturalmente, no son inmutables. Por otra parte, hay que considerar las posibilidades de acceso del aire, supeditado a la presión parcial de oxígeno en la atmósfera que rodea al alimento, la estructura física del mismo y la presencia eventual de un embalaje más o menos impermeable a los gases.

> Alimentos con potencial redox – (menor a 0 mv) poseen gran cantidad de sustancias reductoras, las cuales se oxidan por captar electrones cedidos por sustancias oxidantes. Brindan un medio apropiado a las bacterias anaeróbicas.

Un ejemplo de potencial redox: en el sacrificio de un animal justo después del cuereado, el potencial redox en la superficie de la carne es elevado, +150-200 mv; ésta permanece expuesta en contacto con el aire, cosa que es diferente en el interior de los músculos cuyo valor de potencial redox también es importante (+). A medida que la cantidad de oxígeno disponible desciende y alcanza la rigidez cadavérica, los valores del potencial redox se toman negativos; sumado a esto la proliferación bacteriana hace que el valor de redox sea de aproximadamente –250 mv, lo que constituye un medio muy favorable a los microorganismos anaeróbicos. Por lo expuesto, se extrae una conclusión evidente, que en la carne existen dos especies bien diferenciadas: los aerobios en la parte superficial y los anaerobios en la profunda.

Nutrientes

Los microorganismos deben disponer de diversos factores para su crecimiento: suministro de energía, aporte de nitrógeno, factores de crecimiento, sales, etc. Teniendo en cuenta la calidad de los nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos, se pueden observar notables diferencias entre los distintos grupos de gérmenes. Los mohos son los menos exigentes y, por el contrario, las bacterias grampositivas son las que más nutrientes necesitan.

No todas las especies están dotadas de aparatos enzimáticos para obtener compuestos simples de compuestos sumamente complejos, como por ejemplo deshacer la estructura péptica de los vegetales o amilasas para degradar el almidón. Lo que ocurre es que especies que sí están dotadas para llevar a cabo uno o más procesos enzimáticos, preparan el camino para los gérmenes que no disponen de esa capacidad. Con respecto a esto, hay que tener en cuenta que existen distintas bacterias dentro de un mismo género que están característicamente capacitadas en fermentar diferentes azúcares. Esto es un ejemplo de especificidad por el nutriente.

En el metabolismo, la energía se puede obtener a partir de proteínas, glúcidos o lípidos, que por medio de una fermentación, por ejemplo, llevará a un descenso del pH resultado de la formación de ácidos.

Los factores de crecimiento son aportados por las vitaminas del grupo B y algunos aminoácidos que ciertas especies son incapaces de producir.

Barreras naturales

Las estructuras biológicas tales como la cáscara y las membranas del huevo, la cubierta de las semillas y la cutícula de los órganos vegetales intactos impiden la penetración de los microorganismos que no posean propiedades adaptativas especiales. La edad, el grado de maduración y la integridad de las frutas y vegetales influyen sobre la eficacia de estas barreras mecánicas protectoras.

Por ejemplo, las zanahorias enteras pueden refrigerarse a 0 °C durante meses y sus características organolépticas se mantienen en buen estado; en ensaladas listas para comer, el período de tiempo se restringe a horas. Otro ejemplo son las medias reses donde el tejido muscular está cubierto por fascias que le brindan cierto grado de protección y hacen que la carne refrigerada se mantenga más tiempo en condiciones requeridas para el consumo. Cuando se desposta, la carne queda expuesta a los microorganismos psicrótrofos contaminantes. Esto es aún más notorio en la carne trozada y/o picada.

Compuestos antimicrobianos naturales

Algunos alimentos contienen en forma natural compuestos que ejercen alguna acción antimicrobiana, por ejemplo, la lisozima presente en la clara del huevo, ácido benzoico en algunos tipos de bayas, ácidos grasos, aldehídos, alteraciones químicas producidas en los alimentos tales como el enranciamiento. No obstante, estas sustancias no poseen gran importancia a nivel práctico.

FACTORES EXTRINSECOS

Condiciones ambientales

Temperatura de almacenamiento

Cada especie bacteriana prolifera únicamente entre ciertos límites de temperatura y tiene para su desarrollo una temperatura óptima.

El crecimiento bacteriano en un ambiente favorable grafica una curva como lo indica la figura 83-1. Tras un período de adaptación al medio ambiente o fase de latencia, comienza el crecimiento que se acelera hasta alcanzar una etapa de multiplicación rápida y constante de crecimiento exponencial denominada fase logarítmica de crecimiento. El uso de los nutrientes y la aparición de productos metabólicos tóxicos, frena la velocidad de crecimiento hasta alcanzar un punto de igualdad entre las muertes y las divisiones celulares; esta etapa se denomina fase en meseta o estacionaria. Cuando las muertes empiezan a superar las divisiones en distintas velocidades, se está en la fase de muerte.

Rangos de temperaturas de crecimiento

De los factores extrínsecos, la temperatura, tiene uno de los papeles más importantes en la viabilidad y el desarrollo microbiano. Existen microorganismos que pueden desarrollar en un rango de temperatura muy amplio, desde –8 °C (por ej., psicrófilos) hasta 90 °C (termoplasmas). La temperatura afecta la fase de latencia, la velocidad de crecimiento, el número final de células, las necesidades nutritivas y la composición enzimática de las células. Cualquier temperatura por encima de la máxima de crecimiento de un germen resulta letal y cuanto más elevada sea la temperatura, más rápidamente perderá la viabilidad. Sin embargo, para ciertos microorganismos la exposición a altas temperaturas, no implica que pierdan la viabilidad, este fenómeno está dado por la termorresistencia del germen.

Con respecto a temperaturas inferiores a la mínima de crecimiento, no es tan letal como las temperaturas elevadas. Los efectos letales de las bajas temperaturas dependen de cada germen en particular. Algunos microorganismos permanecen viables por un tiempo indeterminado, todo depende de las características químicas del alimento. La presencia de crioprotectores naturales alarga el período de latencia de los gérmenes, esto es usado en el laboratorio para el mantenimiento de cepas de microorganismos a bajas temperaturas (–20, –80 y –196 °C) adicionando crioprotectores (glicerol o dimetilsulfóxido -DMSO-).

Tabla 83-3. Comportamiento de algunos microorganismos patógenos según los diferentes valores de Aw

Valor de Aw	Microorganismo	Características especiales
> 0,97	*Clostridium perfringens*	Sobrevive a la mala cocción de la carne por las esporas. Retoma la forma vegetativa y no encuentra competidores.
	Salmonella spp - *E. coli* O157H7	Excelente competidor en floras mixtas. Desarrolla en presencia de nutrientes de baja calidad.
	Vibrio parahaemolyticus	No origina cambios organolépticos en pescados y mariscos. Peligro de ingestión crudos.
0,91 a 0,87	*Staphylococcus aureus*	Mal competidor en microorganismos mixtos. Productor de enterotoxinas termolábiles.
	Listeria monocytogenes	Mal competidor en microorganismos mixtos. Gran resistencia en medios desfavorables.

Teniendo en cuenta los rangos de temperatura de crecimiento, pueden distinguirse grupos fisiológicos de bacterias:

- ***Psicrófilos:*** desarrollan a temperaturas de refrigeración (0-10 °C). Los psicrófilos son aquellos que desarrollan a una temperatura óptima de 10-12 °C y una máxima de 15-20 °C. La técnica de aislamiento de psicrófilos indica un chequeo riguroso de la temperatura de incubación, que no debe superar los 10 °C.

- ***Psicrótrofos:*** a los microorganismos capaces de crecer a temperaturas cercanas al 0 °C, pero que no reúnen los requisitos de temperatura óptima y máxima se los conoce como psicrótrofos. El crecimiento es bueno a temperaturas moderadas (25-35 °C). Los psicrótrofos incluyen bacterias grampositivas, gramnegativas, aeróbicas, anaeróbicas, esporuladas, no esporuladas, móviles e inmóviles.

  Alteradores: *Pseudomonas, Citrobacter, Acromobacter, Alcaligenes, Enterococcus, Erwinia, Proteus, Serratia, Lactobacillus*, etc.

  Patógenos: *Listeria monocytogenes*,[1] *Yersinia enterocolitica*,[2] *E. coli* O:157H:7,[3] etc.

- ***Mesófilos:*** La temperatura óptima de desarrollo está en el rango de 30-37 °C. Algunos poseen termorresistencia de hasta 47 °C.

  Alteradores: *Proteus vulgaris, Proteus mirabilis, Serratia, Moraxella, Pseudomonas, Enterococcus, Lactobacillus, Micrococcus, Mohos, Levaduras, etc.*

  Patógenos: *E. coli, Salmonella tiphymurium, Salmonella enteritidis, Campylobacter jejuni, Shigella flexneri, Vibrio cholerae 01, Staphylococcus aureus, Clostridium botulinum, Clostridium perfringens*, etc.

- ***Termófilos:*** Desarrollan a temperaturas óptimas de 55-65 °C. *Clostridium thermosaccharolyticum, Clostridium nigrificans, Bacillus coagulans*, etc.

Humedad relativa

Si un alimento es mantenido en recipientes abiertos o en envases que sean completamente impermeables a la humedad, la presión del vapor de agua del ambiente o la atmósfera que rodea el alimento influye en la Aw de éste, de modo semejante al efecto de la presión de oxígeno sobre el potencial redox.

Microorganismos	Temperatura mínima de desarrollo en °C	Temperatura óptima de desarrollo en °C	Temperatura máxima de desarrollo en °C
Psicrófilos	–2 +5	+10 –12	+15 +18
Psicrótrofos	–2 +5	+25 +35	+30 +35
Mesófilos	+5 +10	+30 +37	+30 +47
Termófilos	+40 +45	+55 +65	+60 +90

[1] Presente en: leche no pasteurizada, quesos de pasta blanda, quesos crema, helados (productos "listos para comer"), carnes, pescados, mariscos. Gran capacidad de sobrevida en heladeras, utensilios, repasadores, tablas de cortar y hojas de cuchillos.
[2] Presente en: carnes de pollo y cerdo, quesos blandos y semiblandos, quesos sin pasteurizar.
[3] Presente en: carne vacuna, leche sin pasteurizar, verduras, jugos de fruta.

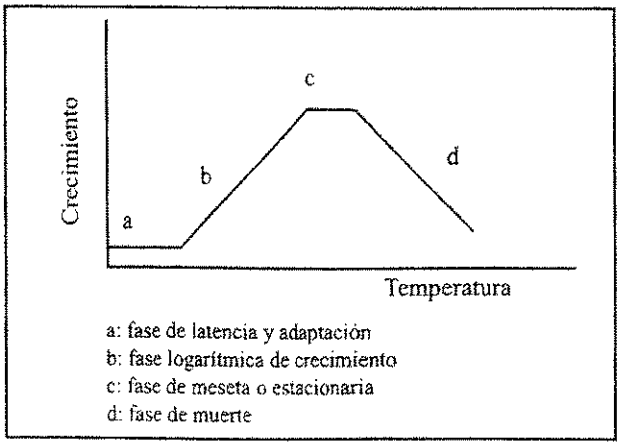


Figura 83-1. Gráfica del crecimiento bacteriano normal.

Los quesos frescos sufren una desecación superficial, lo que dificulta el crecimiento de bacterias en la corteza, aunque con el tiempo llegan a enmohecerse, debido a las menores exigencias en cuanto a la humedad de los mohos.

Los alimentos refrigerados y expuestos a un ambiente templado y húmedo muestran una condensación superficial del vapor de agua. Ello determina un aumento de la Aw, pero además facilita la difusión de las bacterias móviles y arrastra las no móviles (*Proteus* spp y *Pseudomonas* spp respectivamente), todo lo cual favorece la alteración del alimento.

La velocidad del intercambio entre la superficie del alimento y la atmósfera depende de la naturaleza del alimento y del gradiente entre la Aw del alimento y la humedad relativa de la atmósfera (HR). La cantidad de agua intercambiada depende también del tiempo.

Con el grado de humedad existente en las cámaras frigoríficas donde se almacena carne, en la superficie de los tejidos grasos pueden crecer los mohos y algunas levaduras, mientras que en los tejidos magros se desarrollan las bacterias productoras de limosidad (*Pseudomonas* spp).

Aumenta la HR del ambiente ⇒ Aumenta la Aw del alimento (superficial y/o profunda).

Disminuye la HR del ambiente ⇒ Disminuye la Aw del alimento (migración de agua libre).

Atmósfera ambiental

La habilidad del envasado en atmósfera modificada MAP (*modified atmosphere packaging*) de aumentar la vida útil de los alimentos se reconoce desde hace varios años. Los primeros estudios se realizaron en manzanas, disminuyendo la temperatura y el tenor de oxígeno y aumentando el de dióxido de carbono. Después se aplicó el dióxido de carbono para conservar productos cárnicos. En los últimos tiempos la demanda de MAP se ha incrementado en forma vertiginosa. Esto se debe a que este sistema aumenta significativamente la vida útil del producto (de 50 al 400%).

Efecto sobre los microorganismos: en general, los microorganismos aerobios son sensibles al dióxido de carbono y esto, junto con su necesidad de oxígeno, es utilizado en el envasado en atmósfera modificada para controlar el deterioro de los alimentos. Las bacterias gramnegativas son generalmente más sensibles al dióxido de carbono que las grampositivas. El envasado con 80% de dióxido de carbono y 20% de nitrógeno inhibe el crecimiento de enterobacterias y pseudomonas.

Efecto sobre microorganismos patógenos: debido a la supresión parcial o casi total de los microorganismos normales por los gases usados (nitrógeno, dióxido de carbono, oxígeno), los

Tabla 83-4. Conservantes comunes usados en los alimentos

Conservante	Concentración	Usos
Acido propiónico y propionato	0,32%	Antifúngico en pan, tortas y queso suizo
Acido ascórbico y sorbatos	0,2%	Antifúngico en quesos, jaleas, jarabes y tortas
Acido benzoico y benzoatos	0,1%	Antifúngico en margarinas, sidra, condimentos y bebidas suaves
Diacetato de sodio	0,32%	Antifúngico en panes
Acido láctico	Variable	Antimicrobiano en quesos, manteca, yogurt y pickles
Nitrito de sodio	200 ppm	Antibacteriano en carnes (embutidos) y pescados
Cloruro de sodio	Variable	Previene el desarrollo de microorganismos en carnes y pescados
Azúcar	Variable	Previene el desarrollo de microorganismos en jaleas, dulces y jarabes
Ahumado	Desconocido	Previene el desarrollo de microorganismos en carnes y pescados

investigadores han mantenido la idea que ciertos microorganismos tales como *Clostridium botulinum, Listeria monocytogenes, Yersinia enterocolitica, E. coli* O157H7 y el grupo *Aeromonas*, pueden evadir la capacidad bactericida de los gases y desarrollarse produciendo toxinas o una alta dosis infectiva. Debido a esto, hay que recurrir a controles exhaustivos para cada bacteria, en particular en los productos que se van a envasar.

Tratamientos tecnológicos a los que fue sometido el producto

Tratamiento térmico: el tratamiento de los alimentos por el calor constituye el procedimiento más importante utilizado por la tecnología moderna y el más eficaz en lo que se refiere a la inocuidad para el consumidor. La resistencia al calor se cuantificaba, en un principio, en términos de combinaciones tiempo-temperatura letales, sin tener en cuenta que otros factores influyen en la destrucción de los microorganismos por el calor, como lo son el número de células presentes y su estado fisiológico, el pH, la Aw y la composición química del sustrato. Más tarde se introdujo el concepto de valor de reducción decimal (D), que se define como el tiempo en minutos a una temperatura determinada necesario para conseguir en un medio (también determinado) una reducción en los recuentos de unidades formadoras de colonias (UFC) de N_o a 0,1, siendo N_o el número inicial de colonias.

Irradiación: el tratamiento de los alimentos perecederos por radiaciones ionizantes, especialmente por rayos gamma, presenta algunas ventajas fundamentales frente a los tratamientos térmicos.

- No hay pérdida del valor alimenticio del producto.
- El deterioro de los caracteres organolépticos es poco significativo.
- Se puede aplicar a alimentos ya envasados, lo que eliminaría la contaminación postratamiento.

Los inconvenientes más importantes son resistencia de los virus y las enzimas. Se aplica en:

1. Eliminación de *Salmonella* spp y enterobacterias de la carne.
2. Reducción de la carga microbiana excesiva en productos contaminados por la manipulación.
3. Retraso de la alteración por mohos en pan envasado.
4. Aumento de la vida útil de carnes de mamíferos, pollos y pescados.

Cambios en la composición química de los alimentos

Muchas operaciones tecnológicas en distintos alimentos tienen como finalidad cambiar su composición química influyendo así, indirectamente, en los microorganismos. Por ejemplo, cambio de la Aw (salado), pH (agregado de ácido acético o fermentación láctica), adición de conservadores químicos (ácido benzoico o sórbico), ahumado (absorción de productos químicos antimicrobianos del humo, entre ellos fenoles) (tabla 83-4).

Naturaleza y características de las especies colonizantes

Velocidad específica de crecimiento: es una característica implícita de grupos de microorganismos capaces de desarrollar en forma definida en situaciones propicias. Por ejemplo, cuando las condiciones son óptimas para las enterobacterias el desarrollo de éstas es mucho más exuberante que los mohos y los *Lactobacillus*.

En este caso es importante tener en cuenta la curva de crecimiento bacteriano normal, porque en diferentes condiciones, las bacterias pueden modificar el crecimiento en las 4 fases o en alguna de ellas por separado.

Sinergismo: este fenómeno explica cómo grupos diferentes de microorganismos conviven unos a expensas de los otros. Muchas veces, hay microorganismos que no poseen el aparato enzimático para actuar sobre grandes moléculas, pero otros sí lo tienen, entonces éstos favorecen a los primeros cuando desdoblan grandes moléculas.

BIBLIOGRAFIA

ANLIS, Instituto Carlos Malbran. Detección de *Listeria monocytogenes*. Vigilancia de Listeriosis. Pág. 1-20. 1999.

Davies A, Gibbs P. Microbiología de Alimentos Envasados en Atmósfera Modificada. Food Research Association, Leatherhead, Surrey, UK. En Magazine Bellows. Nro. 4. 1996.

Mossel D, Moreno Garcia B. Microbiología de los Alimentos. Editorial Acribia. España. 1985.

International Commission on Microbiological Specifications for Food. Microbiol. Ecology of Foods. V: 1- Factors affecting life and death of microorganisms. IVol. II Food commodities. London. Academic Press 1980.

Stevens D. Síndrome de Shock Streptococico: Espectro de la Enfermedad, y Nuevos Conceptos en el Tratamiento. Revista de Enfermedades Infecciosas Emergentes. Reie. 2. Nro. 1 y 2 . 1998.

Seminario Internacional. Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Su importancia en la Industria y la Salud Pública. Serie de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. Nro. 28.1998.

Capítulo 84

ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETA)

Julio Alberto Copes

Las enfermedades transmitidas por alimentos, comúnmente reconocidas con la abreviatura ETA, son aquellas que se producen por la ingestión de un alimento, el cual actúa como vector de un agente etiológico, que puede producir enfermedad en un consumidor.

La Organización Mundial para la Salud (OMS) define a las ETA como las enfermedades causadas por agentes infecciosos o tóxicos que entran al cuerpo de un consumidor por medio de la comida.

El Centro de Control de Enfermedades de los EE.UU. (CDC) define a un brote de una enfermedad producida por alimentos como un incidente en el cual 2 o más personas sufren enfermedad similar después de ingerir un mismo alimento y que los análisis realizados señalen al alimento como origen de la enfermedad.

Existen numerosos microorganismos que pueden causar ETA en los consumidores. Desde el punto de vista microbiológico, pueden clasificarse en forma general en:

- Bacterias
- Hongos
- Virus
- Priones

Desde hace un tiempo, y con el desarrollo de sistemas relacionados con la inocuidad de los alimentos como son las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control, a estos agentes etiológicos se los denomina "Peligros".

En 1988, la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos (ICSMF) los definió como la contaminación inaceptable, crecimiento o supervivencia de microorganismos en un alimento, de tal modo que puedan afectar la inocuidad o calidad (deterioro), o producir toxinas en el alimento.

Por lo tanto, las bacterias, hongos, virus y priones son considerados peligros biológicos. Estos poseen diferente potencial para causar enfermedades, que de acuerdo a la gravedad presentada se pueden clasificar en grupos:

Alta gravedad (problemas de salud graves e incluso muerte): *Clostridium botulinum, Salmonella tiphy, Vibrio cholerae 01, Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, etc.
Moderada gravedad (patógenos menores, cuyos efectos se pueden revertir con asistencia médica): *Escherichia coli* enteropatógenas, *Salmonella* spp, *Vibrio parahaemolyticus, Listeria monocytogenes*, etc.
Baja gravedad (causa enfermedad cuando los alimentos tienen gran cantidad de patógenos): *Bacillus cereus, Campylobacter jejuni*, toxina de *Staphylococcus aureus*, etc.

PRESENTACION DE LAS ETA

Las ETA se pueden presentar de tres diferentes maneras.

Infecciones causadas por alimentos

Son aquellas que se producen por la ingestión de alimentos que poseen microorganismos patógenos vivos. En este caso los microorganismos penetran en el organismo, llegan al lugar donde pueden realizar la invasión (por ej., intestino delgado) y producen enfermedad. En este caso, el número de microorganismos puede ser muy reducido y depende de las características propias de cada uno.

Intoxicaciones causadas por alimentos

Estas suceden cuando las toxinas producidas por bacterias o mohos están presentes en el alimento ingerido. En este caso, la cantidad de microorganismos que se han desarrollado en el alimento es elevada, superando a 10^5 UFC/g de alimento.

Estas toxinas no producen modificaciones organolépticas y/o sensoriales en el alimento. Pueden perdurar en él cuando los microorganismos productores hayan sido eliminados. En el caso de la toxina estafilocócica (producida por *Staphylococcus aureus*) es importante tener en cuenta que tolera altas temperaturas (termoestable).

Toxiinfecciones causadas por alimentos

Este tipo de enfermedad es producida por el consumo de alimentos que poseen microorganismos patógenos vivos. Cuando llegan a un lugar propicio en el organismo, se observa un crecimiento y posterior producción o liberación de toxinas. Igual que en el caso de la infección producida por alimentos, el número de microorganismos puede ser reducido y queda sujeto a sus características intrínsecas.

En los tres tipos de presentación de las ETA, resalta como un dato excluyente la cantidad de microorganismos necesarios para producir tal enfermedad. Por ello, es importante introducir al lector en un término muy comúnmente usado para estos casos, "dosis infectiva mínima" (DIM), que indica el menor número de microorganismos que causará una infección en un consumidor. De hecho, la DIM puede requerir un alto número de microorganismos para producir enfermedad, y en caso contrario puede necesitar unas pocas células viables.

La DIM de microorganismos necesaria para producir enfermedad está sujeta a dos factores preponderantes:

1) *Propiedades intrínsecas que poseen los microorganismos*

- Supervivencia a los factores intrínsecos y extrínsecos de los alimentos
- Supervivencia a diferentes valores de pH (organismo)
- Capacidad de adhesión a las células intestinales
- Capacidad de sobrevivir al antagonismo ejercido por la microbiota intestinal
- Capacidad de penetración
- Capacidad de producir toxinas
- Tipo de alimento con el que es vehiculizado el microorganismo

2) *Resistencia del hospedador*

- Edad
- Funcionamiento gástrico

- Defensa e integridad de las mucosas
- Capacidad de la microbiota intestinal para impedir colonizaciones de microorganismos patógenos (exclusión competitiva)
- Exposición anterior al patógeno
- Estado nutricional
- Situaciones de estrés
- Inmunodeprimidos

Otro factor predisponente a contraer una ETA es el tipo de alimento que se ingiere. De hecho, los alimentos no son todos iguales, sino que algunos pueden producir un mayor riesgo que otros para el consumidor.

Estos se podrían clasificar en:

1) *Alimentos de alto riesgo*: son los alimentos denominados "listos para comer". Se caracterizan por poseer:

- Alto contenido proteico
- Alto porcentaje de humedad
- No ser ácidos
- Requieren un control estricto de la temperatura de cocción y de conservación.

2) *Alimentos de bajo riesgo*: son aquellos que permanecen estables a temperatura ambiente y no se deterioran fácilmente.

- Este grupo comprende alimentos con bajo contenido acuoso, ácidos, conservados por agregados de azúcar y sal. Entre ellos encontramos: pan, galletitas, cereales, azúcar, sal, harinas, etc.

SINTOMAS GENERALES QUE PRODUCEN LAS ETA EN LOS CONSUMIDORES

La sintomatología es variada y está directamente relacionada con el agente etiológico, la toxina y la cantidad de alimento consumido. Lo más común es observar vómitos y diarreas, también cólicos abdominales, dolor de cabeza, fiebre, síntomas neurológicos, dificultades renales, etc.

Factores contribuyentes

- Preparación de los platos con antelación, por lo menos de varias horas.
- Mantenimiento de los platos elaborados a temperatura ambiente.
- Insuficiente temperatura de mantenimiento en caliente.
- Enfriamiento lento de los platos cocinados.
- Insuficiente temperatura de refrigeración.
- Recalentamiento inapropiado de los alimentos.
- Contaminación cruzada entre productos crudos y alimentos listos para el consumo.
- Contaminación proveniente de equipos y manipuladores infectados.

ETA DE ORIGEN BACTERIANO

Bacterias gramnegativas

Salmonella spp (salmonelosis)

Pertenece a la familia Enterobacteriaceae, y las dos especies son denominadas *Salmonella enterica* (posee 6 subespecies) y *Salmonella bongori*. En base a los antígenos H y O se han descrito más de 2400 serotipos. Es un bacilo no esporulado, móvil con excepción de las *Salmonellas gallinarum* y *pollorum*. Habita en el tracto intestinal del hombre, animales domésticos y salvajes, pájaros y en algunos reptiles. Estos son vectores para la transmisión de la bacteria.

Cuando se ingieren alimentos contaminados con *S. enteritidis*, *S. typhimurium* o *S. dublin*, se observan síntomas clínicos de enfermedad gastroentérica (vómitos, diarreas, dolores abdominales y fiebre elevada), los cuales tardan en aparecer aproximadamente entre 18 y 36 horas. En general, la enfermedad no es grave, y posee una muy baja mortalidad, que depende de la edad y el estado general del consumidor. En otros serotipos como *Salmonella* y *S. paratyphi* A, B y C (productoras de la fiebre tifoidea y paratifoidea), el vector principal es el agua contaminada, siendo el alimento un vector accidental. Poseen una DIM muy baja, y de hecho, 20 células pueden provocar la enfermedad. Todos los serotipos de *Salmonella* mencionados son sensibles a la pasteurización y a la cocción. Los valores de pH límite son 4,5 a 9 (existen algunas excepciones) y desarrollan 5 a 45 °C.

Los alimentos que se ven comprometidos más usualmente en la producción de enfermedad son: carnes rojas y pollo (deficiente cocción), leches y derivados lácteos, mayonesa casera, huevos, chocolates, etc.

Escherichia coli (colibacilosis)

Es un habitante normal del intestino de los animales y humanos. No todas las cepas de *E. coli* son patógenas, de hecho algunas de ellas son muy importantes para la síntesis de vitaminas. Es considerado uno de los indicadores más importantes de contaminación fecal en los alimentos. Como ya se sabe, *E. coli* posee seis tipos o grupos enterovirulentos que causan enfermedades gastroentéricas, hemáticas y renales de distinta complejidad.

Los alimentos que se ven comprometidos más usualmente en la producción de enfermedad son: carnes rojas (hamburguesas) y pollo (deficiente cocción), leches y derivados lácteos (sin pasteurización), aguas contaminadas, verduras y comidas contaminadas postratamiento térmico, etc.

Campylobacter jejuni (campilobacteriosis)

El *C. jejuni* es uno de los agentes etiológicos que causa mayor cantidad de ETA. Produce enteritis o gastroenteritis, generando diarrea acuosa o mucosa que puede contener sangre (generalmente oculta) y leucocitos. Otros síntomas observados son: fiebre, cólico abdominal, náuseas, dolor de cabeza y muscular. El grupo de riesgo son los niños menores a 5 años y las personas que se encuentran inmunosuprimidas. Los alimentos que más comúnmente se encuentran contaminados con *Campylobacter* son: pollo crudo, leche cruda y agua contaminada. Según el CDC, es la causa más común de diarreas en los EE.UU.

Vibrio cholerae 01, *Vibrio* no 01 y *Vibrio parahaemolyticus*

El *Vibrio cholerae* serotipo 01 es el agente etiológico del cólera cuyos síntomas pueden variar desde una diarrea leve y acuosa, y evolucionar hasta diarreas agudas, caracterizadas por la similitud con el "agua de arroz". Se observan cólicos abdominales, náuseas, vómitos, deshidratación y estado de shock; la muerte puede ocurrir por la gran pérdida de agua y electrólitos. La ingesta de agua, pescado y frutos de mar contaminados (crudos), es la principal fuente de infección para los consumidores. Los *Vibrio cholerae* no 01 causan enfermedad menos peligrosa que

Tabla 84-1. Características de las ETA más importantes en salud pública

Salmonelosis:

Gastroenteritis: vómitos, diarreas, dolores abdominales, fiebre elevada. DI (dosis infectiva) alta: 10^6 - 10^6 UFC/g.

Características de la bacteria:

Ampliamente extendida. Cepas de salmonela. Se detecta en el intestino de hombres y animales infectados. Se encuentra: 5-45 °C (mesófila). pH 4,5-9. Aw (actividad de agua) > 0,945. Se destruye por cocción (termosensible).

Alimentos implicados:

Carnes de aves y reses. Carnes poco cocidas. Alimentos elaborados con huevos crudos o poco cocidos (mayonesa, clara batida, tortilla de papas). Platos cocinados contaminados después del tratamiento térmico por manipuladores portadores o utensilios sucios. Vegetales de consumo crudo regados con aguas residuales.

Medidas preventivas:

Cocción de alimentos a temperaturas ≥ 70 °C en el centro del producto.Utilizar huevos pasteurizados en platos a base de huevos crudos o poco cocidos. Mantener los platos cocinados a ≥ 65 °C o ≤ 5 °C. Manipulador sano e higiénico, lavado de manos después de ir al baño o de manipular alimentos crudos.Utensilios y equipos limpios. Impedir la contaminación cruzada. Lavado de vegetales de consumo con agua y unas gotas de lejía (lavandina). Mantener en la nevera los huevos frescos.

Colibacilosis:

Diarreas en niños y adultos. Reviste especial gravedad la cepa. DI alta: 10^6-10^{10} UFC/g

Características de la bacteria:

Hospedador habitual del intestino del hombre y los animales. Cepas de *Escherichia coli*. Se encuentra: 10-45 °C (mesófila). pH 4,5-9. Aw > 0,945. Se destruye por cocción (termosensible).

Alimentos implicados:

Carnes poco cocidas, hamburguesas, salchichas frescas. Platos cocinados contaminados después del tratamiento térmico por manipuladores o utensilios sucios. Aguas no potables. Vegetales de consumo crudo regados con aguas residuales.

Medidas preventivas:

Cocción de alimentos a temperaturas ≥ 70 °C en el centro del producto. Mantener platos cocinados a ≥ 65 °C o ≤ 5 °C. Manipulador sano e higiénico, lavado de manos después de ir al baño o de manipular alimentos crudos. Lavado de vegetales de consumo con agua y unas gotas de lejía (lavandina).Utensilios y equipos limpios.

Estafilococia:

Vómitos, diarreas, espasmos intestinales. La enfermedad está producida por una toxina preformada por la bacteria en el alimento. Para que se forme la toxina: DI >10^5 UFC/g.

Características de la bacteria:

Staphylococcus aureus. Se encuentra en las fosas nasales y garganta de algunas personas sanas.Piel de afectados de procesos infecciosos cutáneos (acné, furúnculos, quemaduras, etc.). Animales portadores de donde pasa a la leche y carnes. Se encuentra: 10-45 °C (mesófila). pH 4,5-9,3. Aw > 0,860. Crece a altas concentraciones de sal y azúcar. Se destruye por cocción (termosensible). La toxina resiste hasta 120 °C de 10 a 40 minutos.

Alimentos implicados:

Carnes frías, fiambres. Quesos frescos. Productos de pastelería rellenos de crema o de nata.

Medidas preventivas:

Manipulador con piel sana o convenientemente protegida.Utilizar mascarilla y guantes o cubiertos durante el emplatado de alimentos. Cocción de alimentos a ≥ 70 °C en el centro del producto. Mantener los platos cocinados a ≥ 65 °C o ≤ 5 °C. Impedir contaminación cruzada.

Botulismo:

Comienza con síntomas gastrointestinales seguidos con trastornos neurológicos (debilidad, laxitud, vértigos, dificultades de deglución, caídas de párpados, alteraciones visuales y fallo respiratorio). La tasa de mortalidad es alta. La toxina es la causa de la enfermedad, preformada por una bacteria en el alimento.

Características de la bacteria:

Clostridium botulinum. Presente en suelos, de donde contamina vegetales y animales. No se destruye en la cocción normal, sino a 121°C. La toxina se inactiva por cocción durante 15 minutos.Se encuentra: 10-50 °C (mesófila). pH > 4,5. Aw > 0,94. Forma endosporas resistentes a medios adversos (calor, congelación, desecación).

Alimentos implicados:

Conservas, principalmente caseras de pH > 4,5: espárragos, guisantes, judías (porotos), carne, pescado, etc., alimentos envasados en vacío.

Medidas preventivas:

No probar ningún producto enlatado con síntomas de alteración. Productos envasados a vacío conservar a ≤ 5 °C y consumir dentro de la fecha.Tratamiento térmico suficiente de conservas de pH ≥ 4,5.

el cólera. Tanto las cepas patógenas como las no patógenas son comunes en ambientes marinos y estuarios de todo el mundo. Los síntomas son muy similares a los producidos por *V. cholerae* 01 y generalmente empiezan entre las 24-48 horas después de la ingesta del microorganismo. El *Vibrio parahaemolyticus* causa diarrea, cólico abdominal, náuseas, vómitos, dolor de cabeza, fiebre y escalofríos, pudiendo requerir la hospitalización del afectado. Los síntomas ocurren a las 24 horas de ingerido el microorganismo. En general, es importante tener en cuenta que la ingestión de pescado (sushi y sashimi) y mariscos crudos o mal cocidos son la fuente principal de contaminación.

Listeria monocytogenes (listeriosis)

Las manifestaciones clínicas de listeriosis son las siguientes: septicemia, meningitis, meningoencefalitis, encefalitis e infección intrauterina o cervical en embarazadas, lo cual puede producir aborto espontáneo. Los síntomas gastrointestinales son: diarrea, náuseas y vómitos. Los alimentos que han sido asociados con brotes de listeriosis son los siguientes: leche cruda, quesos (frescos), helados, verduras crudas, salchichas fermentadas crudas, pollo crudo, carnes crudas o con cocción insuficiente, pescado crudo y ahumado.

Staphylococcus aureus

Los síntomas de intoxicación por *S. aureus* se presentan en forma muy rápida (4 a 6 horas) y se observan vómitos, cólicos abdominales, dolor de cabeza, alteraciones en la presión sanguínea y diarrea. La recuperación tarda entre 2 a 4 días según la gravedad del caso. Cuando este cuadro se presenta en ancianos o niños pequeños puede ser grave y en pocos casos llegar a la muerte. Una de las premisas más importantes con respecto a esta bacteria, es que las contaminaciones en los alimentos se producen por fallas en la higiene personal y manipulación de alimentos. Los alimentos involucrados más frecuentemente en este tipo de intoxicación son: ensaladas con huevos, pollo, papas, pastas, rellenos con crema, rellenos en general, helados, leche cruda y productos lácteos.

Clostridium botulinum

Los síntomas se observan entre las 18 y 36 horas y son los siguientes: fatiga extrema, debilidad y vértigo, visión doble y dificultad en el habla y en la deglución. También es común la dificultad en la respiración, debilidad muscular, distensión abdominal y congestión. Los síntomas gastrointestinales incluyen dolor abdominal y diarrea. La muerte se produce por insuficiencia respiratoria. Los alimentos involucrados en la intoxicación por *C. botulinun* son aquellos que permiten el desarrollo de la bacteria y la producción de toxina. Los siguientes son algunos de los alimentos que pueden brindar un medio anaeróbico reductor: conservas de palmitos, maíz, espárragos, hongos, atún, paté de hígado, espinacas, etc. Es importante tener en cuenta que cuando se realizan conservas caseras, un error en los procedimientos puede desatar una intoxicación.

BIBLIOGRAFIA

Bad Bug Book. Foodborne Pathogenic Microorgnisms and Natural Toxins Handbook. 2006. http://www.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html

FDA/CFSAN. Microbiological methods. 2006. http://www.cfsan.fda.gov/~comm/microbio.html

Food Safety gov. Gateway to government Food Sagety Information. 2006. http://www.foodsafety.gov/

HACCP: Herramienta Esencial para la Inocuidad de Alimentos. INPPAZ. OPS-OMS. 2006.

Jay, J. Microbiología moderna de los alimentos. Editorial Acribia. 1992.

Mossel C, Moreno B, Struijk, C Microbiología de los Alimentos. 2da edición. 2003.

Capítulo 85

CAMPYLOBACTER: ESPECIES ZOONOTICAS

Gabriela Giacoboni, Clara López

INTRODUCCION

Las especies de *Campylobacter* han sido revisadas especialmente en la última década. Tienen una gran diversidad ecológica y las especies zoonóticas más importantes son *C. jejuni* subsp *jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *C. fetus* subsp *fetus* y *C. hyointestinalis*. *C. jejuni*, a la que nos referiremos de aquí en adelante, es el agente etiológico de la campilobacteriosis. En humanos causa una enterocolitis y como secuelas posinfección puede desencadenar el síndrome de Guillain-Barré (desorden desmielinizante que afecta los nervios periféricos), el síndrome de Miller-Fisher (oftalmología y ataxia), bacteriemia, afecciones de la piel, durante la gestación puede producir abortos espontáneos, nacimientos prematuros, sepsis neonatal y artritis. En ovinos y cerdos *C. jejuni* puede causar abortos, mientras que en las mascotas (perros y gatos) no está bien definido el papel que tiene en las diarreas. Si bien muchas especies animales domésticas y silvestres son portadores asintomáticos de *C. jejuni*, numerosos estudios atribuyen al consumo, manipulación o cocción inadecuada de carne de pollo la fuente primaria de infección en el hombre considerándosela una enfermedad transmitida por alimentos (ETA).

EPIDEMIOLOGIA

La ocurrencia de la campilobacteriosis depende de las características del microorganismo, de su modo de transmisión y de la susceptibilidad del hospedador. Los diferentes climas, las densidades poblacionales así como las características etnográficas de los distintos países determinan variaciones en los patrones epidemiológicos de la enfermedad.

En países desarrollados, se considera a *C. jejuni* como uno de los principales agentes bacterianos que causan diarreas en el hombre. En regiones templadas la incidencia es 2 veces mayor en verano que en invierno, presentándose en forma esporádica o como pequeños brotes familiares. La distribución de la tasa de aislamiento según la edad de las personas enfermas tiene forma bimodal, con un pico en los menores de 5 años y otro entre los de 15 y 25 años. No existe una completa explicación para esta presentación, pero se atribuye a la falta de desarrollo inmunitario del hospedador por la baja exposición al agente sumada a los cambios en los hábitos de alimentación.

Los datos de incidencia varían de un país a otro y dependen de la eficiencia de los sistemas de vigilancia y notificación. Estados Unidos cita una tasa de incidencia para el año 2000 de 20,1 casos/100.000 habitantes, mientras que Europa declara 60 a 90 casos por 100.000 para el mismo año.

En países en desarrollo, *Campylobacter* es una de las bacterias más frecuentemente halladas en materia fecal de niños con diarrea. El agente puede encontrarse tanto en pacientes con cuadros diarreicos como en portadores asintomáticos. Estudios efectuados en distintos países mostraron tasas de prevalencia de *Campylobacter* en niños con diarrea que van del 14% (Chile) al 23% (Perú). En niños sanos el porcentaje de aislamiento varía del 4% (Chile) al 9% (Bolivia). La mayor tasa de aislamiento es en menores de 2 años. La enfermedad raramente aparece en adultos, probablemente por la temprana adquisición de inmunidad, debido a una alta exposición al agente. La distribución estacional es menos marcada.

Las características ambientales y socioculturales de los países latinoamericanos, hacen suponer variaciones en las fuentes de infección. La endemicidad del agente parece ser la característica más importante que define el patrón epidemiológico.

Argentina

La información existente sobre campilobacteriosis a nivel nacional es escasa y proviene de investigaciones aisladas. Existe evidencia que la presentación de la enfermedad puede variar en función del área geográfica, del nivel socioeconómico y de los hábitos culturales de la población. Entre los factores de riesgo que contribuyen a la presentación de la enfermedad, se mencionan además de los citados para países desarrollados, aquellos relacionados con la pobreza (saneamiento ambiental deficiente, falta de agua potable y hacinamiento).

Las estimaciones de prevalencias de aislamiento del agente en menores de 5 años con diarrea varían dentro del 2 a 5%. La tasa de incidencia en menores de 5 años pertenecientes a una población con necesidades básicas insatisfechas fue de 0,4‰ niños/mes. Aparentemente no existirían diferencias estacionales, aunque se cita mayor porcentaje de aislamiento durante el invierno.

Las investigaciones realizadas en animales de producción presentan pocos datos epidemiológicos, sin embargo evidencian la presencia de *Campylobacter* en animales sanos. Las tasas de aislamiento señalan 71% en bovinos, 46% en cerdos y 45% en aves. Los perros y los gatos son las especies más utilizadas como animales de compañía en nuestra sociedad. La prevalencia de aislamiento para caninos fue de 17% y para felinos de 16%. Se encontró una mayor tasa de aislamiento en menores de 1 año y en animales vagabundos. No se encontró relación entre el sexo y la tasa de aislamiento, y entre la presencia de síntomas gastroentéricos y la portación del agente. Con respecto a otras especies animales, se estableció la presencia de este agente en aves de vida libre (19%) y en animales en cautiverio (44%), evidenciando su posible papel como reservorios.

Se ha demostrado la presencia de *Campylobacter* sp en aves para consumo luego de la faena, encontrándose porcentajes que varían del 80 hasta casi el 100%. En carne aviar dispuesta para la venta se halló una tasa de aislamiento del 92,8%.

La tasa de aislamiento de *Campylobacter jejuni* obtenida en granjas no industriales (pollos camperos) fue en la etapa de recría del 94%, de terminación del 30% y en pollos faenados del 60%.

En canales de cerdos, las prevalencias de aislamiento citadas son de 6,9 y 44,3%. En carnes rojas las tasas de aislamiento halladas son menores que las encontradas para carnes de aves (0,4 a 30%). Las investigaciones señalan recuentos bacterianos totales en las canales del orden de 100 a 316 bacterias/cm^2,

valores biológicos que no implicarían riesgos si se controlan los pasos siguientes a la faena (refrigeración, transporte, distribución, comercialización).

RESERVORIOS

C. jejuni es un comensal del tracto intestinal de los animales domésticos y salvajes. La exposición a sus excrementos o el consumo de agua contaminada constituyen la principal ruta de infección.

Caninos y felinos: el agente está presente en la materia fecal de animales sanos o con diarrea. En perros y gatos la enfermedad es más frecuente en cachorros. En gatos la presentación de enteritis es muy rara. Se reportan tasas de aislamiento que varían de 22,5 a 45%.

Bovinos: el agente es aislado del tracto intestinal de diferentes categorías de animales, citándose una prevalencia del 22 al 60%, siendo la más alta en animales jóvenes. No se encontró correlación entre el aislamiento de *Campylobacter* y la presencia de diarrea, por lo que se cree que estos agentes son integrantes de los microorganismos normales del intestino. Se señalan casos de mastitis por *Campylobacter jejuni*, con la consiguiente eliminación del germen por leche durante aproximadamente 12 días.

Ovinos y caprinos: en los ovinos los reportes son ocasionales, con una prevalencia del 17,9%. Se citan casos de enteritis, de abortos tardíos o nacimientos de corderos muertos o débiles. En cabras la tasa de aislamiento es del 38,9%, presentándose con mayor frecuencia en animales jóvenes.

Porcinos: en esta especie es más frecuente aislar *C. coli*. Las prevalencias de *Campylobacter* sp publicadas se encuentran alrededor del 70% y disminuyen inversamente con la edad. *Campylobacter jejuni* se aisló de fetos abortados de entre 90 y 114 días de edad.

Equinos: se aisló *Campylobacter jejuni* en animales con y sin diarrea, pero se desconoce el papel que cumple esta especie en la transmisión de la enfermedad.

Aves: la naturaleza termófila de este agente hace que sobreviva bien en estas especies, encontrándose en aves de consumo y en aves silvestres, tanto enfermas como sanas. En pollos la prevalencia oscila entre el 25,2 y el 60% . En forma natural parece no haber transmisión vertical, pero el agente puede ser aislado de la superficie de la cáscara del huevo debido a contaminación fecal. Condiciones sanitarias ambientales y de manejo donde las aves son mantenidas pueden condicionar la carga de *Campylobacter*. Se observaron diferencias significativas en la prevalencia del agente en pollos criados en confinamiento (criaderos) y en libertad correspondiendo un 35 y 54% respectivamente.

En aves de vida silvestre se encontró una prevalencia del 35% en aves migratorias, 50% en palomas urbanas y 20 a 70% en gaviotas.

Animales de laboratorio: experimentalmente se pueden infectar hámsters, ratones y conejos. En conejos de 4 a 6 semanas de edad se produce una diarrea acuosa sin fiebre. El agente no se pudo aislar en heces de animales sanos.

Animales de zoológico: muestras de heces de primates mantenidos en zoológico revelaron una prevalencia de 19% en Brasil, 17,8% en Inglaterra y 9,3% en Estados Unidos. Si bien no representa un riesgo para la población general, pueden ser una fuente de infección importante para el personal que trabaja con ellos.

Otras especies: no se ha encontrado en animales poiquilotermos probablemente por la baja temperatura corporal. Se citan brotes naturales en visones.

TRANSMISION

El agente se transmite desde la fuente de infección hasta el hospedador por distintas rutas:

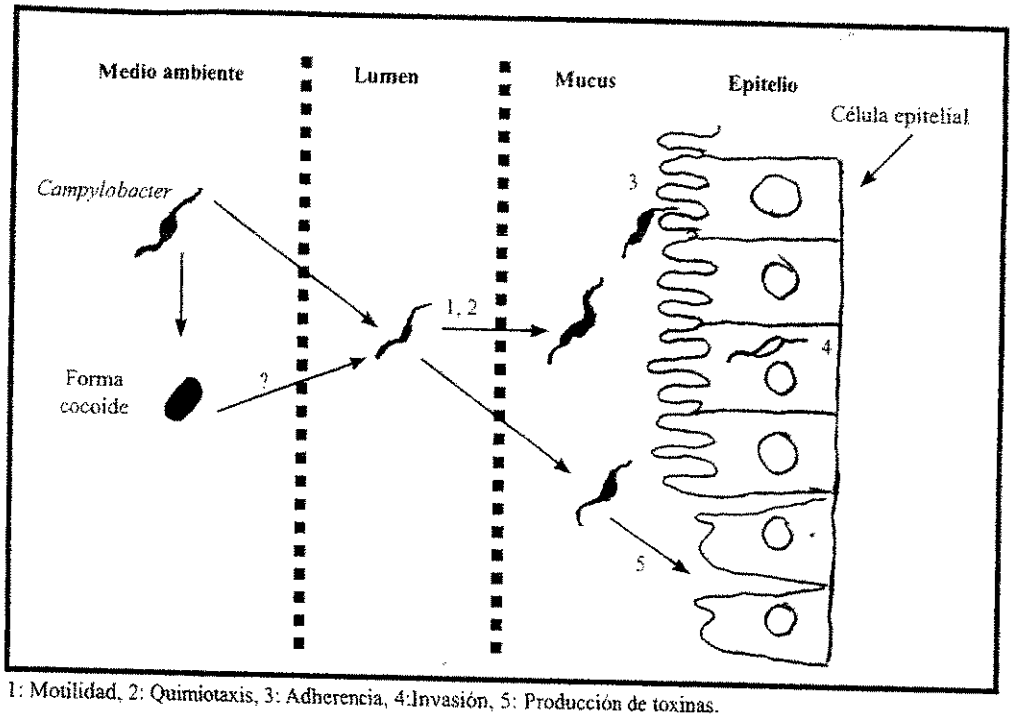
- **Por contacto directo:** con *animales domésticos o silvestres*. Una proporción de casos humanos se relaciona con el contacto con animales de compañía. La enfermedad se asocia a la presencia de cachorros (perros o gatos) con o sin diarrea. Se observó que el 27 al 68% del personal que trabaja con ganado o en la industria de la carne tiene niveles altos de anticuerpos.
  Con *personas (portadores sanos o enfermos)*: la transmisión persona-persona no es común y puede darse en niños pequeños por el estrecho contacto con sus mayores.
- **Por contacto indirecto:** a través de vehículos o vectores.
  Vehículos: alimentos. El hombre puede infectarse por manipulación y/o consumo de carne cruda o poco cocida. En países desarrollados, el principal vehículo es la carne de pollo. La refrigeración comercial permite la sobrevida del agente.
  El consumo de leche contaminada durante el ordeño o bien por un proceso infeccioso de la ubre está asociado a la aparición de brotes. Se han citado brotes por consumo de agua potable contaminada o de agua no potable.
  Vectores: *C. jejuni* se ha aislado de moscas domésticas sugiriendo que pueden ser vectores mecánicos en la transmisión de la enfermedad.

CLASIFICACION

La familia Campylobacteraceae pertenece a la clase Proteobacteria, división Gracillicutes. Mediante una variedad de técnicas moleculares (hibridación DNA-RNA, análisis de secuencia de RNA ribosomal 16S (rRNA) y análisis de inmunotipificación, se ha determinado que todas las especies denominadas *Campylobacter* y los taxones relacionados pertenecen al mismo grupo filogenético, al cual denominaron superfamilia VI de rRNA. Esta superfamilia comprende a la familia Campylobacteraceae con los géneros: *Campylobacter* (18 especies), *Arcobacter* (4 especies), *Sulfospirilum* (4 especies) y *Bacteroides ureolíticus*.

MORFOLOGIA Y CARACTERISTICAS GENERALES

La familia Campylobacteraceae está formada por bacilos gramnegativos curvos en forma de S o espiral. Miden de 0,2 a 0,9 µm x 0,5 a 5 µm de longitud. No forman esporas pero ante la exposición a ciertas condiciones desfavorables cambian su morfología celular de curvos o espiralados a formas cocoides, que contienen una menor cantidad de ácidos nucleicos y péptidos y pierden integridad celular. Entran en un estado de células viables no cultivables (VNC), como también se la conoce a la forma cocoide, porque pierden la capacidad para crecer en medios de cultivos pero hay evidencias de que pueden infectar a los animales.



1: Motilidad, 2: Quimiotaxis, 3: Adherencia, 4:Invasión, 5: Producción de toxinas.

Figura 85-1. Esquema de las diferentes fases de colonización del intestino (Vliet y col.)

Son móviles por flagelos únicos más largos que el soma bacteriano, que nacen de una concavidad crateriforme ubicados en disposición monótrica o anfitrica.

El metabolismo es de tipo respiratorio y son microaerófilos estrictos (5-10% O_2). Para reducir la toxicidad de oxígeno a los medios de cultivo se le adiciona sulfato ferroso, metabisulfito de sodio y piruvato de sodio (suplemento FBP) que previene la formación de peróxidos y radicales superóxidos que inhiben el crecimiento bacteriano.

Es un microorganismo sensible a los desinfectantes comunes (formalina 2%, Lugol 70%, 5 ppm de hipoclorito de sodio). Se destruyen a temperatura de pasteurización.

Son oxidasa positivos e incapaces de fermentar u oxidar los hidratos de carbono. Su crecimiento es relativamente lento y si bien todas las especies crecen a 37 °C, *C. jejuni* es termotolerante y crece mejor a 42-43 °C.

Los métodos de serotipificación de *Campylobacter jejuni* se basan en la tolerancia al calor y separan antígenos lábiles y estables, estandarizado como sistema de Lior y Penner respectivamente.

Los antígenos de *C. jejuni*, están expresados en el LPS (antígeno estable al calor). Por otra parte, la proteína flagelar de *C. jejuni* (antígeno H) es el otro componente antigénico termolábil. La distribución de los epitopes en el flagelo es compleja pues no todos están expuestos en la superficie y pueden reaccionar en forma cruzada.

C. jejuni produce enterotoxinas y citotoxinas. La enterotoxina, similar a la toxina LT de *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae*, se demuestra in vivo en el intestino de ratas e in vitro en cultivos celulares (células CHO). De las citotoxinas, la CDT (*cytolethal distending toxin*) en cultivos de células HeLa, y Caco-2, alargan las células lentamente hasta que mueren.

RESPUESTA INMUNE

La infección por *Campylobacter* se acompaña con el aumento de los títulos séricos de IgA, IgM e IgG. La IgA hace su pico alrededor del séptimo al décimo día, luego aparece la IgM y la IgG. Esta última alcanza altos títulos a la tercera a cuarta semana y persiste varias semanas. No se sabe si estos anticuerpos promueven la eliminación de la bacteria del organismo pero se reconoce que pueden determinar un periodo de excreción más corto e impedir las manifestaciones clínicas.

PATOGENESIS

C. jejuni es una bacteria enteropatógena que eventualmente puede causar septicemia e infecciones en otros órganos. La colonización en el intestino requiere de la habilidad del microorganismo para moverse dentro de la capa de moco que recubre el epitelio intestinal por medio del flagelo y el movimiento a manera de "sacacorchos" que realiza. El moco intestinal tiene componentes como la mucina, que ejercen quimiotaxis y junto con la movilidad son esenciales para la colonización. Un importante factor en la patogénesis es la adherencia y penetración al enterocito. Esta bacteria no tiene fimbrias, pero el flagelo y el LPS actúan como adhesinas. Las subpoblaciones bacterianas invaden las células intestinales y pueden producir daño de la mucosa e inflamación. La invasión está involucrada en el proceso desencadenante de la inflamación y es requerida para inducir citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 8. La toxina CDT está involucrada en la diarrea. Actúa en la fase G2 del ciclo celular bloqueando a la célula huésped. Produce disturbios en la maduración y sobrevida de las células de las criptas, causando erosión temporal de vellosidades y consecuentemente una pérdida de la capacidad de absorción intestinal. La enterotoxina produce una secreción acuosa con aumento del AMPc intracelular. Por lo expuesto, se sugiere que la diarrea causada por *C. jejuni* puede desencadenarse tanto por los mecanismos de invasión como por las toxinas, los que podrían actuar simultáneamente o no (fig. 85-1).

Tabla 85-1. Pruebas bioquímicas para la identificación de *Campylobacter* zoonóticos

Prueba	*C. jejuni*	*C. coli*	*C. lari*	*C. fetus*	*C. upsaliensis*
Oxidasa	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	d/–
Hipurato	+	–	–	–	–
Indoxil acetato	+	+	–	–	+
NAL* 30 µg	S	S	R	R	S
CEF 30 µg**	R	R	R	S	S
42 °C	+	+	+	–	+
25 °C	–	–	–	+	+

* Ácido nalidíxico; ** Cefalotina; R: resistente; S: sensible; +: positivo; –: negativo

ASPECTOS CLINICOS

Campylobacter jejuni produce en el hombre una enteritis que cursa con una ligera hipertermia, acompañada de malestar general, dolores musculares, cefaleas, ruidos hidroaéreos, náuseas y vómitos. La diarrea aparece comúnmente a las 24 horas posteriores a los primeros síntomas. Puede manifestarse con heces líquidas o bien con presencia de sangre y moco como una disentería. Se autolimita, remitiendo espontáneamente al octavo día. En ovinos y cerdos puede producir trastornos en la reproducción (abortos). En caninos y felinos puede presentarse una diarrea acuosa con moco y sangre. En bovinos jóvenes provoca una enteritis con descarga mucosanguinolenta. En aves de producción se describen formas entéricas y en adultos una forma hepatointestinal cuyas consecuencias son una disminución de peso y de la producción de huevos. No se encontró correlación entre el aislamiento de *Campylobacter* y la presencia de diarrea, por lo que se cree que éstos son integrantes de los microorganismos intestinales normales de los animales.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Al ser una zoonosis, las muestras que pueden remitirse al laboratorio son tanto de origen humano como animal. Si es materia fecal, los hisopados deben enviarse en medio de transporte de Cary y Blair o Stuart y refrigeradas. Deben procesarse en no más de 48-72 horas para lograr un aislamiento exitoso ya que son bacterias microaerófilas estrictas y el oxígeno atmosférico las perjudica. El aislamiento se realiza sembrándolas en medios selectivos, que contienen una mezcla antibiótica, sangre al 5-7% y el componente FBP para reducir la toxicidad del oxígeno. Los medios de cultivo más utilizados son el Skirrow, Blazer, Bützler, etc. Las placas se incuban en atmósfera microaerófila (5-10% de O_2). Para ello pueden utilizarse sobres comerciales o sustitución con mezcla de gases (N_2 85%, 10% CO_2, 5% O_2) a 42-43 °C por 48 horas. La identificación presuntiva puede realizarse observando la morfología de las colonias que son grisáceas o con un ligero tinte rosado, planas o ligeramente convexas, que tienden a difundir y confluir si el medio es fresco y conserva humedad. La coloración de Gram (negativas), revela la típica morfología de espiral, la movilidad en forma de tirabuzón o sacacorchos puede observarse en una preparación en fresco con microscopio de contraste de fase. Como característica bioquímica de familia son oxidasa positivos y no utilizan los hidratos de carbono, por lo que se puede sembrar un TSI para visualizar su comportamiento frente a la glucosa y lactosa.

Se puede realizar la identificación bioquímica y biotipificación con fines epidemiológicos. Las pruebas utilizadas para la identificación son: catalasa, hidrólisis del indoxil acetato, sensibilidad al ácido nalidíxico y cefalotina con discos de 30 µg, hidrólisis del hipurato, producción de ácido sulfhídrico y producción de DNAsa (tabla 85-1). Estas tres últimas pruebas son la base de biotipificación propuesta por Lior (tabla 85-2).

Pruebas serológicas

Están disponibles sistemas comerciales para la aglutinación mediada por anticuerpos que utilizan partículas de látex pegadas a inmunoglobulinas contra diferentes especies de *Campylobacter*. Estos sistemas sirven, principalmente, para un diagnóstico preliminar y presuntivo. La serotipificación de antígenos somáticos o termoestables (antígeno O) y la de antígenos termolábiles (antígeno H), es compleja por la gran variedad de serogrupos hallados pudiéndose reconocer más de 90 con el esquema de antígeno lábil o de Lior.

También existen técnicas de biología molecular para el diagnóstico e identificación definitiva de estas bacterias como son la técnica de PCR, las sondas de ácidos nucleicos, la digestión con diferentes enzimas de restricción (RFLP), la electroforesis con campo pulsado (PFGE), etc. Todas estas técnicas aunque son más precisas, son caras y requieren de un equipamiento especial en el laboratorio.

Tabla 85-2. Pruebas bioquímicas de *Campylobacter* termotolerantes para el esquema de biotipificación propuesto por Lior

Prueba	H_2S	Hipurato	DNAsa
	Campylobacter jejuni		
Biotipo I	–	+	–
Biotipo II	–	+	+
Biotipo III	+	+	–
Biotipo IV	+	+	+
	Campylobacter coli		
Biotipo I	–	–	–
Biotipo II	–	–	+
	Campylobacter lari		
Biotipo I	+	–	–
Biotipo II	+	–	+

Si las muestras son de alimentos (carne de pollo, de cerdo, etc.), se utilizan medios de preenriquecimiento para recuperar a la bacteria, enriquecimiento y luego los medios selectivos que se usan para las muestras de materia fecal.

TRATAMIENTO

La mayoría de los casos de enteritis por *Campylobacter* no requiere tratamiento ya que es de corta duración y se autolimita. Sin embargo, en casos graves o de pacientes inmunocomprometidos, los macrólidos (eritromicina) y las fluoroquinolonas son las drogas de elección. El incremento de la resistencia a estos fármacos que emergió en la última década se relaciona con el uso de estos antimicrobianos en los animales de producción de alimentos.

BIBLIOGRAFIA

Coker A, Isokpehi R, Thomas B, Amisu K, Obi L. Human Campylobacteriosis in developing countries. EID. 2003 8(3).

Giacoboni G, López C, Tellechea D, Agostini A. *Campylobacter jejuni* en una granja de pollos camperos. Revista Analecta Veterinaria 2002, 22 (2):42-47.

López C. Estado del conocimiento de la campylobacteriosis en la República Argentina: alcances y limitaciones. Tesis. Maestría en Salud Pública. Centros de Estudios Avanzados. UBA. Marzo, 2000.

López C, Agostini A, Giacoboni G, Comero F, Tellechea D, Trinidad JJ. Campylobacteriosis en una comunidad de baja condición socioeconómica del sur de la ciudad de Buenos Aires. Revista Científica y Técnica de la OIE. 2003 Vol 22 (3).

López C, Giacoboni G, Agostini A, Comero F, Tellechea D, Trinidad JJ. Thermotolerant Campylobacters in domestic animals in a defined population in Buenos Aires, Argentina.. Prev Vet Med. 2002, 55 : 193-200.

On SLW. Identification methods for *Campylobacters, Helicobacters* and related organisms. Clin Microbiol Rev. 1996; 9 (3):405-421

Padungton P, Kaneene J. *Campylobacter* spp in human, chickens, pigs and their antimicrobial resistance. J Vet. Med. Sci. 2003 vol 65 (2)

Vandamme PE, Goossens H. Taxonomy of campylobacter, arcobacter and helicobacter. Zbl Bakteriol. 1992, 276: 447-472

Van Vliet AHM, Ketley JM. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. J of Applied Microbiology. 2001, 90: 45S-56S.

Capítulo 86

BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Nestor Oscar Stanchi

INTRODUCCION

El laboratorio microbiológico representa un riesgo potencial de exposición a la infección del personal especializado y auxiliar al trabajar con material infeccioso. Por lo tanto, se deben administrar todas las medidas necesarias para que el ambiente institucional esté exento de microorganismos hasta el límite de lo posible. La responsabilidad recae en el director del laboratorio o su autoridad máxima, siendo los partícipes responsables de las distintas áreas a su cargo. Si bien muchos de los conceptos aquí expresados son aplicables a laboratorios de medicina humana, también son de importancia en medicina veterinaria, más aún teniendo en cuenta que en América Latina muchos de los laboratorios realizan diagnósticos tanto en humanos como en animales.

Toda actividad lleva un riesgo, pero su conocimiento anticipado puede prevenirlo o controlarlo. Los riesgos potenciales del laboratorio pueden referirse a: materiales infecciosos, químicos o radioactivos y a las instalaciones físicas. En última instancia los riesgos están bajo la influencia de interrelaciones, a menudo imprevisibles, de agentes, hospedadores y actividades.

Los objetivos de la bioseguridad consisten en proteger al laboratorista, a la comunidad y al medio ambiente de agentes potencialmente peligrosos.

Los factores aplicables al **agente** incluyen: virulencia, dosis infecciosa, vías de infección y toxigenicidad. En cuanto al **hospedador** las variables que influyen en el riesgo son: edad, sexo, raza, embarazo, presencia y nivel de anticuerpos o inmunidad celular y disponibilidad y uso de vacunas, compuestos terapéuticos específicos o medicación. Finalmente el **tipo de actividad** (diagnóstico, producción, investigación) puede afectar notablemente el riesgo del personal debido al tipo, la cantidad y la concentración de agentes manejados y manipulaciones utilizados en la tarea.

Según el riesgo relativo que entrañan los microorganismos infectantes se pueden clasificar en cuatro grupos de riesgo que se visualizan en la tabla 86-1.

Los laboratorios se clasifican según sus características de diseño, construcción y medios de contención en tres tipos: laboratorio básico, laboratorio de contención y laboratorio de contención máxima.

En la tabla 86-2 se relacionan los grupos de riesgo con los diferentes tipos de laboratorio. Como consecuencia de esta clasificación, el laboratorio básico comprende todos los laboratorios que trabajan con los grupos I y II.

NORMAS DE BIOSEGURIDAD

Los errores humanos y las prácticas incorrectas de laboratorio pueden contrarrestar la eficacia de las medidas y los aparatos que se utilicen para proteger al personal. Por esta razón, el elemento

Tabla 86-1. Grupos de riesgo en bioseguridad

GRUPO DE RIESGO I
Escaso riesgo individual y comunitario.
Microorganismos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades humanas o enfermedades de importancia veterinaria en los animales.

GRUPO DE RIESGO II
Riesgo individual moderado, riesgo comunitario limitado.
Agente patógeno que puede provocar enfermedades humanas o en los animales, pero que tiene un riesgo grave para el personal de laboratorio, la comunidad, el ganado o el medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede provocar una infección grave, pero se dispone de medidas de tratamiento y de prevención y el riesgo de propagación es limitado.

GRUPO DE RIESGO III
Riesgo individual elevado, riesgo comunitario escaso.
El agente patógeno suele provocar enfermedades humanas graves, pero de ordinario no se propaga de una persona infectada a otra.

GRUPO DE RIESGO IV
Elevado riesgo individual y comunitario.
Agente patógeno que suele provocar enfermedades graves en las personas o animales y que puede propagarse fácilmente de un individuo a otro directa o indirectamente.

Tabla 86-2. Grupos de riesgo en relación con el tipo de laboratorio

Grupo de riesgo		Clasificación del laboratorio	Ejemplo de laboratorio	Ejemplos de microorganismos
Individual	Comunitario			
I. Escaso	Escaso	Básico	Enseñanza básica	*Bacillus subtilis* *Escherichia coli*
II. Moderado	Limitado	Básico (con cámaras de bioseguridad o si es necesario, dispositivos apropiados de protección personal o contención física)	• Servicios primarios de salud • Hospital nivel primario • Consultorios médicos • Laboratorios de diagnóstico • Enseñanza universitaria • Laboratorio de salud pública	• *Salmonella typhi* • *Mycobacterium tuberculosis*
III. Elevado	Escaso		Laboratorios de diagnóstico especializado	*Brucella* sp *Histoplasma capsulatum*
IV. Elevado	Elevado		Laboratorios que trabajan con agentes patógenos peligrosos	Virus de la fiebre aftosa

clave para prevenir accidentes de laboratorio e infecciones adquiridas es un personal preocupado por la seguridad y bien informado sobre la manera de reconocer y combatir riesgos presentes en el laboratorio. En consecuencia es esencial la formación continua acerca de las medidas de seguridad, correspondientes a todos los niveles del personal involucrado. Dicha formación comprende el conocimiento de los peligros que puedan afectar y que entrañan riesgos de:

- **Inhalación:** (formación de aerosoles) siembra de placas, pipeteo, centrifugación, esterilización a la llama de asas de platino, apertura de recipientes de cultivo.
- **Ingesta:** manipulación de muestras, frotis y cultivos.
- **Eliminación de material infeccioso**

RIESGO DE LAS SUSTANCIAS QUIMICAS DE LABORATORIO

Muchas sustancias químicas de uso corriente en el laboratorio dan reacciones peligrosas cuando entran en contacto con otras, por ejemplo, durante el almacenamiento.

Las sustancias que figuran a la izquierda se guardan y manipularán de manera que no entren accidentalmente en contacto con las sustancias de la columna de la derecha.

EFECTOS TOXICOS DE LOS SOLVENTES

La inhalación excesiva de vapores de solventes puede tener efectos tóxicos. En algunos casos, éstos se limitan a trastornos sin repercusiones apreciables sobre la salud, pero pueden aparecer síntomas de incoordinación, embotamiento, etc. susceptibles de aumentar la propensión a los accidentes.

En otros casos pueden producirse consecuencias adversas e incluso lesiones graves en la sangre, los pulmones, el hígado, los riñones, el aparato gastrointestinal y otros órganos y tejidos. Los actuales estudios sobre las propiedades carcinogénicas de las sustancias químicas han revelado que muchos productos (solventes) utilizados en el laboratorio poseen dichas propiedades.

La mayor parte de los solventes orgánicos pueden producir también lesiones cutáneas en caso de contacto prolongado o repetido con la fase líquida. La lesión de la piel se debe a la acción desengrasante de los solventes, pero también es posible que haya efectos corrosivos y alérgicos.

ELIMINACION DE MATERIALES

La descontaminación y la eliminación de los desechos son operaciones de laboratorio íntimamente relacionadas, ya que la desinfección o la esterilización constituyen la primera fase de la eliminación. Todos los materiales y elementos del equipo han de eliminarse con el tiempo, sin embargo, en el trabajo cotidiano sólo hay que eliminar o destruir cierta proporción de aquéllos. El resto se aprovecha para volver a utilizarlo en el laboratorio, como ocurre con la cristalería, el instrumental y la ropa de trabajo. Por esta razón, el concepto de eliminación puede interpretarse en el sentido más amplio, en vez de hacerlo restrictivamente como proceso de destrucción.

Las principales cuestiones que hay que plantearse antes de eliminar cualquier objeto o material de un laboratorio en el que se trabaja con residuos o microorganismos potencialmente infecciosos son:

- ¿Se han desinfectado o esterilizado realmente los objetos o materiales por un procedimiento aprobado?
- Si no ha sido así ¿se han embalado por un procedimiento aprobado los objetos o materiales para su incubación inmediata sobre el terreno o su transferencia a otro laboratorio?
- ¿Entraña la eliminación de los objetos o materiales desinfectados o esterilizados algún otro peligro potencial, biológico o de otra clase, para los encargados de las operaciones de eliminación inmediata o para las personas que pudieran entrar en contacto con los objetos o materiales fuera del recinto del laboratorio?

ELIMINACION DE DESECHOS

Los métodos y las instalaciones para efectuar la evacuación comprenden desde los más sencillos hasta los más complejos.

Lo importante es acabar con la idea de que los desechos del laboratorio se pueden evacuar de la misma forma que los desechos de una casa. Por lo tanto, hay que establecer un sistema de identificación y separación de material contaminado (y de sus recipientes).

Puede hacerse la división por categorías:

1) **Desechos no contaminados que pueden eliminarse con la basura**. Debe evitarse su acumulación en tiempos relativamente largos, para prevenir que se alberguen microorganismos que luego puedan propagarse de un área a otra del laboratorio.
2) **Objetos aguzados y cortantes (agujas, jeringas, etc.)**. Las agujas hipodérmicas deben colocarse en recipientes con paredes que no puedan traspasarse fácilmente. Cuando éstos están llenos, se colocarán en otros recipientes para desechos contaminados y se incinerarán, incluso cuando la norma del laboratorio consista en esterilizarlos primero en el autoclave. Las jeringas desechables deben incinerarse después de introducirlas en el recipiente, incluso aunque hayan sido esterilizadas primero en autoclave.
3) **Material contaminado para tratamiento en autoclave y reutilización.** Este material se coloca en recipientes impermeables poco profundos que contengan una cantidad de desinfectante suficiente para recubrir el contenido. Los recipientes se colocan luego en el autoclave. No se efectúa ninguna limpieza previa; cualquier limpieza o reparación que se revele necesaria se hace después del paso por el autoclave.
4) **Material contaminado para eliminación.** Todos los cultivos y materiales contaminados suelen esterilizarse en autoclaves, previamente introducidos en recipientes impermeables. Antes de proceder a su eliminación después del tratamiento en autoclave puede colocarse el material en recipientes apropiados para el transporte al incinerador o a otro lugar de evacuación.

Lo mejor es poner los desechos en un saco de plástico que se introduce en una caja de cartón, con lo que puede incinerarse al mismo tiempo el contenido y el continente. Si se utilizan recipientes especialmente concebidos para el transporte, habrá que limpiarlos y desinfectarlos después de descargar el contenido contaminado y antes de devolverlos al laboratorio. Estos recipientes deben ser impermeables y estar provistos de tapas herméticas. La incineración constituye el método de elección para la eliminación definitiva de los desechos contaminados, inclusive los restos de animales de laboratorio. Utilizada con este fin, la incineración deber estar aprobada por las autoridades que se ocupan de la salud pública y de la contaminación del aire, así como por el funcionario encargado de la seguridad. Si no hay incineradores aprobados para ese fin, habrá que establecer métodos de eliminación definitiva en cooperación con las autoridades de salud pública.

En ciertas zonas existen empresas que recogen los residuos patógenos o potencialmente peligrosos, tanto de los laboratorios como de clínicas y otros establecimientos asistenciales; estos residuos serán luego incinerados.

PAUTAS COMPLEMENTARIAS DE LA BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

La experiencia ha demostrado que la inocuidad del trabajo de investigación con microorganismos peligrosos depende de las buenas prácticas de laboratorio, la disponibilidad y el uso de equipo de contención, el diseño y el funcionamiento del local.

Finalmente, las observaciones y recomendaciones se ofrecen a manera de consejo y se pretende ante todo estimular a los trabajadores, especialistas en seguridad y funcionarios de las diversas instituciones para que busquen nuevos y mejores métodos para el control de los riesgos biológicos.

Hábitos y prácticas de higiene personal

Muchas de las prácticas de higiene personal en el laboratorio están destinadas a prevenir lesiones o enfermedades directamente relacionadas con el trabajo. Las precauciones y prácticas recomendadas se basan en razones obvias; no obstante, en algunos casos la explicación detallada de las mismas permite analizar mejor su posibilidad de aplicación en el laboratorio.

Por consiguiente, en un laboratorio se podrá prohibir algo que apenas se desaprueba en otro y que se permite en un tercero. Sin embargo, la observación habitual de prácticas inocuas, aunque parezca innecesaria, proporciona un margen de seguridad cuando existe un peligro inadvertido.

Pautas, recomendaciones y observaciones: lavado de manos

Las manos nunca están libres de gérmenes; éstos pueden ser transitorios o residentes. Los primeros son recogidos por contacto con materiales contaminados y no sobreviven indefinidamente en las manos, pero sí lo suficiente para ser transportados directa o indirectamente a otro paciente.

Los microorganismos residentes que viven en la piel, en general no provocan infección, a menos que entren en contacto con zonas críticas (heridas abiertas).

Para efectuar un buen **lavado de manos** existen tres factores esenciales:

- Agua corriente
- Jabón
- Fricción

La fricción es necesaria para remover suciedad visible, piel en descamación y otras partículas que pueden albergar microorganismos patógenos. Es importante que el jabón haga espuma, de esta manera se quita la grasitud que protege las bacterias y por arrastre de agua corriente son retiradas de las manos. Se recomienda jabón común, por lo menos durante 15 segundos.

El jabón en pan se corta en partes pequeñas y se deja en un recipiente **seco**. Se toma con la mano aún seca una porción; se abre la canilla y se hace espuma con el agua.

Se desecha la porción de jabón utilizada en un recipiente de residuos accionado a pedal.

Otra forma adecuada es el uso de soluciones jabonosas con dosificador.

Con este procedimiento es suficiente para evitar o prevenir infecciones cruzadas.

Sólo algunas situaciones especiales justifican el lavado de manos con antisépticos, que garantizan mayor descontaminación de la piel.

Ropa y equipos protectores

Se emplean ropa y equipos especiales para proteger al personal de laboratorio en contacto con agentes infecciosos, tóxicos y corrosivos, calor excesivo, fuego y otros peligros. La ropa y el equipo apropiados pueden servir también para evitar la contaminación de los materiales del experimento. La clase de ropa y equipo y el grado de protección que se espera proporcionar con éstos en una actividad determinada dependen de la naturaleza de las investigaciones y de la gravedad del peligro que pueden acarrear.

Ciertos tipos de ropa de laboratorio y de equipo protector son más seguros, prácticos y cómodos que otros. La comodidad, sin embargo, no debe ser el factor más importante al seleccionar un artículo necesario para protección. La ropa de laboratorio puede servir para evitar la contaminación de la vista, del experimento y del medio ambiente.

El personal de laboratorio habrá de usar la ropa en la forma debida para que pueda beneficiarse de la protección que proporciona. Si no se toman las precauciones del caso, la ropa puede llevar la contaminación microbiológica fuera del laboratorio a otras áreas de trabajo, a las cafeterías o a la casa. La ropa de laboratorio de uso permanente se fabrica principalmente de algodón y poliéster o mezcla de los dos.

Los microorganismos permanecen viables en tejidos de algodón o de lana y pueden propagarse fácilmente a través de éstos, por esta razón es imperioso utilizar una prenda protectora como guardapolvo (también llamado gavacha) o delantal que no debe salir del laboratorio sin una desinfección cuidadosa.

Los guantes son prendas importantes del equipo de seguridad. Deben ser cómodos y suficientemente largos para evitar la exposición de la muñeca. Según el uso que se pretenda darles, los guantes deben ser de una composición y un modelo que proporcione agilidad, fuerza, baja permeabilidad, resistencia a la penetración de objetos puntiagudos y protección contra el calor y el frío. No se puede esperar que una sola clase de guante sea satisfactoria para todos los usos. Los guantes se pueden fabricar de tela, cuero, caucho natural (látex) y sintético (neopreno) y varias clases de plástico.

Limpieza del laboratorio

Compete al supervisor del laboratorio determinar con qué frecuencia se habrá de efectuar la limpieza, individual y colectiva, suministrar los planes respectivos y realizar inspecciones a menudo para cerciorarse de su cumplimiento.

Con este criterio se garantiza que los patrones del trabajo no sufrirán interrupciones al llegar un grupo extraño de limpieza, y que el equipo delicado de laboratorio deberá ser manejado por las personas que conocen mejor su funcionamiento.

Cuidado del piso

Si se evita barrer y limpiar el polvo en seco se disminuirá la formación de aerosoles ambientales no específicos. Se recomienda la limpieza con agua o con una aspiradora equipada con filtro HEPA en el tubo de escape. Si no hay derrames peligrosos visibles, la tarea de limpieza consistirá en aspirar primero para retirar las partículas gruesas y limpiar luego con un trapeador humedecido en una solución de descontaminante químico que contenga detergente.

Barrida en seco

Este no es un método muy recomendado, en caso que sea preciso se usarán compuestos especiales con escoba de empuje y trapeadores secos, debidamente tratados para evitar la formación de aerosoles de polvo.

Selección de una solución de limpieza

La selección de una mezcla de desinfectante y detergente para la limpieza habitual del laboratorio se basará en las exigencias del área que tenga la mayor posibilidad de contaminación con el más amplio espectro de microorganismos. En el comercio se encuentran muchas mezclas de detergente y fenol. Los fenoles son una de las muchas sustancias empleadas para destruir microorganismos indeseables, que comprenden compuestos de mercurio, amonio cuaternario y cloro, yodóforos, formaldehído, glutaraldehído y varias mezclas de alcohol con yodo o con formaldehído.

Lavado con agua con el método de los dos baldes

Desde el punto de vista de la seguridad, el lavado con agua de los pisos del laboratorio se puede efectuar en forma más conveniente y eficiente con el método de los dos baldes. La principal característica de este sistema consiste en aplicar al piso la solución limpia de detergente y desinfectante de un balde y en recoger en el otro la solución que se saca del trapeador al torcerlo.

Si la limpieza se afecta después de un derrame de material infeccioso, la solución usada para ese fin se esterilizará en el autoclave o se tratará con una solución de cloro. Se debe añadir cloro (blanqueador de uso doméstico) en proporción de 550 ppm y dejar en contacto por 15 minutos antes de arrojar la solución en la alcantarilla sanitaria.

Plan de emergencia

Los laboratorios que trabajan con agentes infecciosos deben contar con planes de emergencia para anticiparse al tipo de accidentes más probables dentro de las instalaciones. Es responsabilidad del superior del laboratorio:

- Valorar la probabilidad de accidentes y emergencias en las tareas operativas del laboratorio.
- Preparar un plan de emergencia.
- Instruir al personal en los procedimientos aplicables.
- Ensayar la aplicabilidad de dichos procedimientos y equipos.

Los componentes de un plan de emergencia son: establecer criterios para la evaluación inmediata del laboratorio en casos de accidentes o emergencias que puedan contaminar el área con agentes infecciosos o sustancias químicas tóxicas; instalar un sistema para comunicar accidentes o emergencias al superior y/o al personal de seguridad, desarrollar la capacidad de valoración de accidentes identificando el personal de recursos; disponer de la evaluación médica y debida vigilancia y tratamiento correcto del personal expuesto y desarrollar o identificar procedimientos y recursos para realizar, si es necesario, la descontaminación o la limpieza a fondo de las instalaciones.

Se hará todo esfuerzo razonable tendiente a cultivar un ambiente de trabajo seguro y sano para el personal y se pondrá especial énfasis en motivar al individuo para que acepte la responsabilidad de la propia salud.

En las tablas 86-3 a 86-14 se describen técnicas de usos de distintos materiales de laboratorio así como carteles a colocar en el mismo.

BIBLIOGRAFIA

Bioseguridad en el laboratorio. Acta bioquímica Clín Latin supp. 4, 1988.

CDC-NIH. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. U. S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. (p. 100).

Grinst N. Infections in British Clinical Laboratories 1980-81. J Clin Pathol. 1983, 36:121-126.

Organización Mundial de la Salud. Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. Ginebra, OMS, 1983.

Tabla 86-3. Técnicas de uso de pipetas y otros dispositivos de aspiración mecánica

1. Debe utilizarse **siempre** un dispositivo de aspiración mecánica.
2. El empleo de pipetas con tapón de algodón reducirá las posibilidades de contaminar el dispositivo de aspiración.
3. Nunca debe insuflarse aire en un líquido que contenga agentes infecciosos.
4. No debe mezclarse el material infeccioso aspirado e insuflado alternativamente a través de una pipeta.
5. No se debe expulsar a la fuerza el material infeccioso de una pipeta.
6. Para evitar los riesgos inherentes al goteo accidental de un cultivo infeccioso contenido en una pipeta, se recubrirá la superficie de trabajo con un paño empapado en desinfectante, que se esterilizará en autoclave una vez usado.
7. Conviene dar preferencia a las pipetas aforadas con una muesca superior y otra inferior, ya que no exigen la expulsión de la última gota.
8. Se recomienda verter los líquidos contra la pared interna del tubo o frasco o por debajo de la superficie del líquido contenido en el recipiente.
9. Las pipetas contaminadas deben sumergirse completamente en un desinfectante adecuado antes de autoclavarlas.
10. Debe colocarse una bandeja para las pipetas usadas dentro (no fuera) de la cámara de seguridad biológica.
11. No debe utilizarse para pipetear una jeringa provista de una aguja punzante hipodérmica. En vez de agujas se deben utilizar cánulas romas.

Tabla 86-4. Técnicas de separación del suero

1. Se debe emplear para este trabajo sólo personal capacitado.
2. Para evitar salpicaduras y aerosoles, hay que utilizar una buena técnica microbiológica. Los líquidos potencialmente infectados, en particular la sangre, se manipularán con pipetas en vez de verterlos. El pipeteo bucal debe proscribirse.
3. Una vez usadas, las pipetas se deben sumergir por completo en hipoclorito o en otro desinfectante adecuado, en el que habrán de permanecer al menos una noche antes de ser eliminadas o esterilizadas.
4. Los tubos de ensayo o centrífuga que se deseen eliminar y que contienen coágulos de sangre, etc., deben introducirse en recipientes impermeables que se taparán y se esterilizarán en autoclave y/o se incinerarán.
5. Conviene disponer de una solución de hipoclorito para limpiar las salpicaduras y derramamientos de sangre y suero.

Tabla 86-5. Técnicas de empleo de la centrífuga

1. La seguridad mecánica es condición previa de la seguridad microbiológica en lo referente al empleo de centrífugas en el laboratorio clínico.
2. Cuando se utilizan incorrectamente pueden desprenderse partículas que quedan suspendidas en el aire. Estas partículas se desplazan con demasiada rapidez para que sea posible capturarlas y retenerlas instalando la centrífuga en una cámara ordinaria de seguridad.
3. La centrífuga se debe utilizar según las instrucciones del fabricante.
4. El empleo de una buena técnica de centrifugación y de cestillos cerrados ofrece una protección suficiente contra los microorganismos y agentes de los grupos de riesgo III y IV.

Tabla 86-6. Técnica de centrifugación de microorganismos, agentes y material del grupo de riesgo para laboratorios básicos

1. Los cestillos de la centrífuga y sus soportes se deben emparejar por peso y equilibrar adecuadamente con los tubos en su sitio.
2. Para evitar que los soportes se desencajen con el consiguiente derramamiento del contenido de los tubos, se iniciará la rotación lentamente y se irá aumentando progresivamente la velocidad.
3. Los tubos de centrifugación y los recipientes de muestras utilizados en la centrífuga deberán tener gruesas paredes de vidrio o plástico y antes de utilizarlos se inspeccionarán para excluir posibles defectos.
4. El interior de las centrífugas se inspeccionará a diario para excluir cualquier manipulación defectuosa, perceptible por la presencia de colorantes o suciedad a nivel del rotor y limpiar siempre que sea necesario.
5. En los trabajos microbiológicos no conviene utilizar cabezas angulares, salvo si se trata de centrífugas ultrarrápidas. Con las cabezas angulares ordinarias puede desprenderse cierta cantidad de líquido, incluso si se utilizan tubos provistos de tapón, a causa de la geometría del aparato.
6. Las centrífugas deben ser colocadas a una altura determinada, para que todo el personal pueda ver sin dificultad el interior para colocar correctamente los soportes en el rotor.

Tabla 86-7. Técnicas para evitar la dispersión de material infeccioso

1. Las asas de platino deben terminar en un anillo completamente cerrado y la longitud del mango no debe pasar de 6 cm.
2. Cuando es de temer que el material infeccioso salpique al flamearlo en el Bunsen, se utiliza un microincinerador o asas desechables de plástico.
3. Las muestras y los cultivos desechados se evacuarán todos en recipientes impermeables.
4. Las zonas de trabajo se limpiarán con un desinfectante apropiado después de cada período de trabajo.
5. Las cámaras de flujo horizontal no son cámaras de seguridad microbiológicas y no deben utilizarse como tales.

Tabla 86-8. Técnicas de empleo de las cámaras de seguridad biológica

1. Habrá que explicar a todos los usuarios potenciales el modo de empleo y las limitaciones de estas cámaras.
2. La cámara no debe utilizarse nunca sin haber conectado el ventilador y haber comprobado que el indicador de flujo de aire se encuentra en la posición de seguridad.
3. En los modelos provistos de una mirilla de vidrio transparente, ésta deberá mantenerse cerrada mientras se esté utilizando la cámara.
4. No debe utilizarse dentro de la cámara un mechero de Bunsen, ya que el calor que produce podría desviar el flujo de aire y quemar los filtros. Puede permitirse el empleo de un microincinerador, aunque es preferible utilizar asas desechables de plástico.
5. Durante la utilización de la cámara deberán reducirse al mínimo los aparatos y materiales contenidos en ella.
6. Conviene tener en cuenta que la cámara no protege las manos (ni en general, al operador) de salpicaduras, roturas o deficiencias técnicas.
7. El ventilador de la cámara debe seguir funcionando al menos durante 15 minutos después de terminado el trabajo.

Tabla 86-9. Técnicas para evitar la inoculación de material infeccioso

1. La inoculación puede producirse como consecuencia de accidentes con agujas hipodérmicas, pipetas de Pasteur y vidrios rotos.
2. El número de accidentes causados por agujas hipodérmicas sólo puede reducirse:
   a) Adoptando mayores precauciones, y
   b) Utilizando menos las jeringas y agujas. En muchas técnicas pueden utilizarse pipetas en vez de jeringas y agujas.
3. La inoculación accidental con pipetas de Pasteur y vidrios rotos sólo puede evitarse poniendo más cuidado en el trabajo.

Tabla 86-10. Técnicas de empleo de homogeneizadores y agitadores

1. Los tapones y los recipientes o frascos deben ser de buena calidad, sin deformaciones ni fisuras. Los tapones deben ajustar bien y las juntas estar en buen estado.
2. En los agitadores y homogeneizadores pueden desprenderse, por falta de contacto entre la tapa y el recipiente, aerosoles que contengan partículas infecciosas. Durante el funcionamiento se produce un aumento de la presión en el recipiente.
3. Durante la utilización hay que recubrir los aparatos con una cubierta fuerte de plástico transparente, que se desinfectará una vez usada. Siempre que sea posible, estos aparatos con su cubierta de plástico se utilizarán dentro de una cámara de seguridad biológica.
4. Los aparatos sónicos de tipo sonicador se utilizarán sólo en el interior de cámaras de seguridad biológica y protección auditiva.

Tabla 86-11. Técnicas de empleo de trituradores de tejidos (Stopmaker)

1. Los trituradores deben sostenerse envueltos en una pieza de material absorbente y con la mano enguantada durante la trituración de los tejidos.
2. Sólo se utilizarán en el interior de una cámara de seguridad biológica.

Tabla 86-12. Técnicas para abrir ampollas que contengan material infeccioso liofilizado

Comience a abrir con precaución las ampollas de material liofilizado, pues como están cerradas al vacío, la entrada brusca de aire puede dispersar el contenido en la atmósfera. Por eso deben abrirse dentro de una cámara de seguridad.
Para abrir las ampollas se recomienda el siguiente procedimiento:

1. Descontaminar la parte exterior de las ampollas antes del uso.
2. Hacer con la lima una marca en el tubo.
3. Aplicar en esa marca una varilla de vidrio calentada al rojo para romper el vidrio.
4. Retirar con cuidado la parte superior y tratarla como si fuera material contaminado.
5. Reconstruir la suspensión añadiendo el líquido lentamente para evitar la formación de espuma.

Tabla 86-13. Técnicas de manejo, empleo y conservación de refrigeradores y congeladores

1. Los refrigeradores, congeladores y recipientes de nieve carbónica se deben inspeccionar, limpiar a fondo y deshelar periódicamente para eliminar todos los tubos, ampollas, etc. con un contenido peligroso que puedan haberse roto durante el almacenamiento. Durante la limpieza deben utilizarse guantes de goma.
2. Todos los materiales, en especial si son infecciosos o tóxicos, que se almacenen en refrigeradores o congeladores deben llevar etiquetas escritas con lápiz con el nombre científico del material, la fecha de almacenamiento y el nombre de la persona que lo ha almacenado.
3. *Nunca* deben guardarse soluciones inflamables en refrigeradores que presentan algún riesgo de explosión.

Tabla 86-14. Carteles a colocar en el laboratorio

* Los alimentos, los dulces, la goma de mascar y las bebidas se habrán de guardar y consumir sólo fuera del laboratorio.
* Estará prohibido fumar en el laboratorio. Se permitirá fumar sólo en áreas limpias, especialmente designadas para ello. Recordar que el fumar es perjudicial para la salud y puede favorecer infecciones microbianas.
* El pelo largo y la ropa suelta son peligrosos cuando hay una llama abierta o maquinaria en movimiento.
* Los anillos, los relojes de pulsera y otra clase de joyas y fantasías constituyen también un peligro durante el funcionamiento de cierta clase de máquinas.
* Los artículos de uso personal, por ejemplo, abrigos, paraguas, carteras, etc. no se guardarán en el laboratorio.
* Los libros y revistas que haya que devolver a la biblioteca de una institución se usarán sólo en áreas limpias.
* No usar pañuelos de tela en el laboratorio: se recomienda el uso de los pañuelos de papel.
* Lavarse las manos inmediatamente después de quitarse los guantes protectores. Se ha demostrado que puede haber contaminación microbiana o química aun cuando se usen guantes, por causa de pequeños orificios, abrasiones o rasgaduras inadvertidas, entrada en la parte de la muñeca o penetración de disolventes a través del material de los guantes.
* Lavarse las manos después de quitarse la ropa protectora sucia, antes de salir del área del laboratorio o de comer o fumar y durante el día según lo exija la naturaleza del trabajo. No se pueden usar joyas en el laboratorio porque impiden el buen lavado de las manos. Si se usan podrían contaminarse y transportar los microorganismos infecciosos a la casa.
* En algunos casos se aconseja el lavado con desinfectante o la inmersión en éste, siempre y cuando no cause asperezas, sequedad excesiva o sensibilidad de la piel.
* Cualquier persona que tenga una herida reciente, una abrasión o lesión de la piel o una herida abierta, inclusive la que resulta de la extracción de un diente, se abstendrá de trabajar con materiales biológicos peligrosos.

Capítulo 87

ENFERMEDADES DE ETIOLOGIA MICROBIANA EN ANIMALES PELIFEROS

Pablo Eduardo Martino

INTRODUCCION

Los animales peliferos de cria en cautividad como el visón (*Mustela vison*), la nutria (*Myocastor coypo*), el zorro gris y el plateado (*Alopex lagopus*, *Vulpex fulva*), el conejo (*Orictolagus cuniculus*), la chinchilla (*Chinchilla lanigera*) y el turón o fitch (*Mustela putorius*) representan desde hace décadas una industria multimillonaria en dólares.

Asimismo, la producción de pieles finas provenientes de criadero, ha contribuido a reducir la salvaje persecución contra la fauna silvestre. Las muy particulares características fisiológicas, reproductivas y patológicas de estos animales han conformado un capítulo de creciente importancia dentro de la medicina veterinaria. Aquí se han incluido, básicamente, consideraciones sobre los aspectos microbiológicos que determinan la patología infecciosa de los principales animales de peleteria criados en la actualidad.

Dado que las raciones se formulan con cereales y subproductos crudos de pescado, animales domésticos mayores y aves que llevan microbiota potencialmente peligrosa, se ha puesto de manifiesto que la calidad del alimento debe ser incuestionable.

VISON (*MUSTELA VISON*)

El "rey de los animales peleteros" es un mustélido carnívoro susceptible a un gran espectro de microorganismos patógenos provenientes del microbismo ambiental, del alimento suministrado y de otros animales domésticos y silvestres que circundan los criaderos.

Virosis

La enfermedad aleutiana o plasmacitosis viral, a virus lento, es la más devastadora entre los visones, causante de cuantiosas pérdidas económicas mundialmente (en la Argentina es la causa más importante de muerte).

Afecta a los animales de toda edad, tipo genético y sexo. Es una enfermedad persistente, insidiosa, de desenlace inexorablemente fatal entre 2 a 24 meses después de contraída. Se transmite por vía horizontal (por todas las secreciones de animales enfermos) y vía vertical (transplacentaria). El agente es un *parvovirus* (DNA) linfotropo, no defectivo para su replicación, el diámetro del virión es de 23-25 nm, de morfología icosaédrica, resistente al éter y cloroformo. El virus ha sido aislado en escasas oportunidades, existiendo desde cepas altamente virulentas como la cepa Utah 1 hasta aquellas de baja virulencia (cepa Pullman).

Por algún mecanismo todavía desconocido, el virus interfiere en las células inmunes lo que origina una gran producción de células plasmáticas y una notable hipergammaglobulinemia. El virus más los Ac, que no son neutralizantes de la infección, forman complejos (más complemento y neutrófilos) que circulan y se depositan en casi todos los órganos generando hemorragias por vasculitis y una glomerulonefritis fatal en adultos y neumonitis intersticial en pichones.

El distemper es una enfermedad altamente contagiosa y de carácter cosmopolita que puede ocasionar graves epizootias en pichones no vacunados (hasta 90% de mortandad). La etiología es un *paramixovirus* (RNA, género *Morbillivirus*, diámetro del virión 150-300 nm y simetría helicoidal), que afecta a otros cánidos como el perro (principal reservorio y transmisor) y zorros. Si bien es fácilmente destruido por el calor y los desinfectantes comunes, puede resistir en el medio ambiente por varias semanas (vida media: 2-3 horas a 37 °C). Existe un parentesco inmunológico con el virus del sarampión y el de la peste bovina. La multiplicación viral se localiza en células epiteliales de la conjuntiva, párpados, mucosa nasal, tráquea, bronquios y vejiga. La propagación del virus tiene lugar en el periodo agudo de la enfermedad, ya sea por contacto directo con la secreción nasal y ocular (por las millones de "gotitas" suspendidas en el aire eliminadas por la respiración) o bien en forma indirecta mediante objetos contaminados (guantes, jaulas, etc.).

La enteritis viral es una entidad infecciosa de los pichones con alta mortalidad, ocasionada por un *parvovirus* (DNA, 20 nm) considerado como una variante de aquel de la panleucopenia felina (del cual difiere en un solo sitio de restricción enzimática en el mapeo genómico) y además da inmunidad cruzada con el parvovirus de la gastroenteritis hemorrágica canina y del mapache finlandés. Es un virus muy estable y resistente en el medio ambiente, se mantiene infectante por años en condiciones propicias y las heces son la fuente de contagio.

El visón es susceptible, además, a otros agentes virales. La enfermedad de Aujeszky (virus *herpes* 1, DNA, 100 nm, simetría cúbica, envuelto), puede observarse como una infección cerebral, edema pulmonar y hemorragia gástrica en visones alimentados con vísceras de cerdos afectados (sobre todo pulmones). La sintomatología es escasa pero nunca se observa prurito.

La encefalitis transmisible del visón (TME) está ocasionada por un agente no convencional (prión) igual o similar al del scrapie de las ovejas. El contagio es, precisamente, por ingestión de carne de ovejas infectadas. La enfermedad (antes clasificada como a virus lento), es una encefalopatía espongiforme subaguda, diagnosticable por histopatología.

La rabia (por *rhabdovirus*, 210 nm, simetría helicoidal, cubierto), no es común en visones de criadero aunque sí en aquellos de vida silvestre.

El virus aviar de la influenza H10N4 ha sido aislado de visones durante brotes de neumonías por transmisión directa de pájaros. Estos virus son normalmente no patogénicos para los mamíferos pero en ocasiones cruzan la barrera de especie. La gastroenteritis catarral infecciosa ("*3-day-disease*") es otra enfermedad emergente en los visones de morbimortalidad baja, con hallazgos sistemáticos de *coronavirus*, cepas de *Escherichia coli* hemolíticas y *rotavirus* en la materia fecal.

Bacteriosis

El **botulismo** es siempre uno de los riesgos más altos en los criaderos por contaminación de carne y pescado crudo. La causa

es el *Clostridium botulinum* tipos C (el más frecuente), E y A, que en condiciones de anaerobiosis y de temperatura adecuada (22 y 37 °C), en alimentos no congelados y ricos en proteinas, forman una poderosisima exotoxina a la que es muy sensible el visón, aun en muy baja concentración, ocasionándole la muerte en pocas horas. Los animales afectados por la ingestión de la toxina preformada o por la que se puede formar en el ciego, manifiestan una parálisis e incoordinación muscular. El diagnóstico se realiza por comprobación de la toxina en el contenido estomacal e inoculación experimental en ratones.

La **neumonía hemorrágica** está producida por *Pseudomonas aeruginosa*, a partir de agua y alimentos contaminados. Ocasiona altas pérdidas en visones jóvenes (en general machos y muy bien alimentados). Del pulmón se aísla el germen en agar cetrimide, en pureza o asociado a *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas hydrophila* y *Ureaplasma* sp, agentes causantes también de neumonía. Es conveniente establecer la tipificación serológica por el esquema de Habs y la piociánica (producción de piocinas o bacteriocina extracelular) de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas.

Como regla general existen 3 o 4 serotipos relevantes (el 6, 7 y 9), siendo sus numerosos productos extracelulares (proteasas, elastasas, exotoxina, leucocidina, etc.) y productos de degradación mucho más tóxicos que los lipopolisacáridos de la pared celular que le confieren la patogenicidad.

Las visonas adultas son muy susceptibles a la tuberculosis (por *Mycobacterium tuberculosis bovis* y *avium*) mediante la ingestión de alimentos contaminados. Se observan cuadros crónicos generalizados y caquectizantes. Se han comprobado, además, brotes de carbunclo (*Bacillus anthracis*), brucelosis (*Brucella abortus bovis*) y tularemia (*Francisella tularensis*) por consumo accidental de bovinos y lagomorfos afectados. No son raras las infecciones entéricas por *Salmonella dublin* y *typhimurium*, por *Campylobacter jejuni* y *coli* y por *Staphylococcus aureus* (cepas enterotoxigénicas). La mortandad perinatal de los visones tiene como etiologías a *Staphylococcus aureus*, *E. coli* y *Proteus* spp y por otro lado, también, a las endotoxinas de los gérmenes gramnegativos presentes en la ración. Debemos destacar que se acepta como satisfactorio para su consumo aquel alimento con carga bacteriana de hasta 10^6 gérmenes totales por gramo. *E coli* es el agente más común en los brotes diarreicos y en los pichones 'pegoteados' ("sticky kits"), aunque su papel como causante primario permanece poco claro. Se aíslan cepas tanto hemolíticas, como no hemolíticas, y hay 17 serotipos al menos incriminados (por ej., O2, O6, O25 y O166). Algunos autores indican a los *astrovirus* como responsables, mediante la visualización al ME y técnicas de R-PCR.

NUTRIA O COIPO (*MYOCASTOR COYPUS*)

La nutria o coipo es un roedor semiacuático nativo de Sudamérica, que pertenece a la familia Capromydae. Se cría en cautividad en el país desde 1922, y luego esta práctica se exportó a muchos otros paises. Lamentablemente, la tradicional caza de estos animales en estado salvaje continúa diezmando las poblaciones autóctonas, debido a la gran aceptación de su carne y al valor de sus pieles para comercializar.

Contra todas las creencias, la nutria es sensible a muchos agentes infecciosos que amenazan su salud en cautividad.

Virosis

La virosis más común observada es la papilomatosis (*papillomavirus*, genoma DNA bicatenario, 50-55 nm, icosaédrico, desnudo), virus especifico de especie y muy contagioso, que da lugar a formaciones fibropapilomatosas, en cara y dorso de miembros. Afecta a animales jóvenes y hacinados, retardando el crecimiento.

Una condición de creciente importancia es la adenovirosis (*adenovirus*, DNA, 75 nm, icosaédrico) que ocasiona una grave hepatitis-nefritis, abortos y muerte en nutrias jóvenes y adultas. Al microscopio óptico puede diagnosticarse por revelación de cuerpos de inclusión intranucleares en hígado y riñón. Si bien la nutria es sensible a los virus de la rabia, seudorrabia y fiebre aftosa, rara vez se observan estas noxas espontáneamente.

Bacteriosis

Las septicemias bacterianas son muy comunes, sobre todo en animales con lesiones en piel por mordeduras, peleas, rasguños, etc. y los agentes más comunes aislados de los principales órganos son: *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Diplococcus septicus* y *pneumoniae*, y *Streptococcus equi* subsp *zooepidemicus*. De las lesiones infectadas de piel, lo más común es aislar *Streptococcus* y bacterias gramnegativas.

La *Yersinia pseudotuberculosis* serotipo I (el más común en nutrias de nuestro país) provoca una infección muy importante en animales recluidos (la yersiniosis o rodenciosis). A la necropsia se observan hepatitis, esplenitis y enteritis necróticas multifocales de donde se aísla el germen cultivando en agar sangre bovino al 7% y agar Mac Conkey. Dado que es una enfermedad muy común a otros roedores, probablemente sea contraída a partir de las heces de ratas y ratones que en general deambulan por los criaderos y contaminan los cereales. Otras enfermedades acarreadas por ratas portadoras serían la salmonelosis (*Salmonella typhimurium* y *enteritidis*), pasteurelosis (*P. multocida* y *hemolitica*), tularemia (*Francisella tularensis*), leptospirosis, Aujeszky y dermatomicosis.

Los cuadros de bronconeumonía por *Streptococcus equi* subsp *zooepidemicus* son muy comunes en los criaderos hacinados y con mala ventilación. A su vez, las gastroenteritis bacterianas (por *S. typhimurium* y *enteritidis*, *Yersinia enterocolitica* y *Clostridium perfringens* B), también son comunes en aquellas instalaciones con mala higiene y pobre renovación de agua. Estos cuadros fatales son rápidamente agravados por la presencia de altas cargas de *Coccidiae*, *Giardia* spp, *Borrelia hidrodysenteriae*, *Balantidium coli* y nematodos como *Strongyloides myopotami*.

Finalmente, en el país se han observado serios brotes de dermatofilosis (*Dermatophilus congolensis*, bacteria del orden Actinomycetales, de morfología filamentosa con zoosporas) que ocasionan dermatitis costrosas con serios daños a las pieles y se ven agravadas por infecciones piógenas secundarias.

ZORROS DE MUTACION (AZUL: *ALOPEX LAGOPUS*, PLATEADO: *VULPES VULPEX*)

La rabia es común en zorros salvajes pero no en animales en cautiverio, aunque se han descrito casos fatales en zorros, visones y nutrias de criadero, por consumo de carnes infectadas.

Los zorros jóvenes son particularmente sensibles al virus del distemper que puede pasar de una especie a otra (por ej., perro a zorro) aunque necesita varias semanas y meses para adaptarse y provocar brotes con síntomas clásicos. La encefalitis viral, producida por el mismo *adenovirus* DNA (*canine adenovirus* tipo 1, de 70-90 nm) que provoca la hepatitis canina, ataca a zorros jóvenes de alrededor de 10 meses, de los cuales se aísla el virus en cultivos celulares Vero y MDCK. Los zorros plateados son más susceptibles que los azules. La meningoencefalitis es fatal

y el hallazgo de cuerpos de inclusión intranucleares en los vasos meníngeos es patognomónico.

La enfermedad de Aujeszky puede infectar zorros por consumo de cerdos afectados. Manifiestan prurito, neumonitis intersticial e hiperemia estomacal fatales.

La parvovirosis es de incidencia aún desconocida en animales de criadero, aunque se describió un brote fatal en Finlandia por diarrea parvovirósica. El agente responsable es un *parvovirus*, más emparentado al de la leucopenia felina (FPV) y enteritis del visón que al canino (CPV-2). Esto se debe a que en la filogenia del orden Carnivora, los zorros están más estrechamente relacionados con las especies Felidae que con los lobos, los coyotes o los perros domésticos. Todos estos virus, además, poseen antígenos que dan reacciones cruzadas.

Un gran número de bacterias son frecuentemente adquiridas por el alimento crudo y el agua en los criaderos intensivos, ocasionando muertes aisladas o múltiples. *Bacillus anthracis*, *Pasteurella multocida*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella*, *Francisella tularensis*, *Streptococcus* hemolítico, *Klebsiella* y *E. coli* son algunas de ellas. *Campylobacter jejuni* y *coli* pueden colonizar la mucosa intestinal y manifestarse como causantes de diarrea y probablemente de la adenomatosis intestinal en los zorros azules. La importancia de estos agentes en los animales de peletería es, sin embargo, todavía debatida.

Por otro lado, los micoplasmas son aislados sistemáticamente e incriminados como causa de neumonía intersticial en zorros recién nacidos.

Corynebacterium sp, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *E. coli* hemolíticas y *Streptococcus equi* son las bacterias más comunes de aislar de abortos, neonatos muertos y hembras polares con trastornos reproductivos. Otros gérmenes comúnmente observados en secreciones vaginales y prepuciales son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* beta-hemolíticos y no hemolíticos, *Proteus vulgaris*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* sp y *Diplococcus*.

En los últimos años ha tenido gran repercusión el síndrome de insuficiencia cardiorrespiratoria, de alta mortandad y etiología aún oscura, pero que observa la presencia preponderante de cepas de *E. coli* en pulmón, corazón y exudados torácicos. Estas cepas, sin embargo, no son productoras de Verotoxinas, toxinas lábiles o resistentes al calor, y no expresan el gen *Aeae* mediante las pruebas de inmunoensayo in vitro y de PCR.

Asimismo, *E. coli* hemolítica asociada a *Pseudomonas aeruginosa*, genera brotes de neumonía fatal en animales jóvenes.

Los zorros (como los visones) son relativamente resistentes a las salmonelas, excepto durante la gestación (*Salmonella dublin* y *typhimurium*) y soportan dosajes 50.000 veces mayores de toxina C botulínica que el visón. El tipo E sería sumamente letal para el zorro y hay razones para creer que podrían afectarse bajo ciertas circunstancias por el tipo C a partir del pollo administrado en la ración.

Mycobacterium bovis, *Brucella abortus*, *Listeria monocytogenes* y *Clostridium perfringens* tipo C son potenciales patógenos si los zorros consumen carnes o vísceras infectadas. La infección por *Leptospira interrogans* sv *canicola* e *icterohaemorrhagiae* es, asimismo, de consideración.

TURON O FITCH (*MUSTELA PUTORIUS FURO*)

Este mustélido, muy semejante al hurón y al visón (existen crianzas simultáneas), es particularmente sensible al virus del distemper a toda edad, con alta mortalidad (hasta el 100%).

Si bien los turones son susceptibles experimentalmente, no han ocurrido brotes espontáneos de enfermedad aleutiana. En cambio sí son sensibles al *parvovirus* (similar al de la panleucopenia felina y enteritis viral del visón) que produce diarrea hemorrágica mortal en pichones. Cuando se incorporan animales del estado salvaje al cautiverio, la rabia siempre es una infección a considerar. La infección cruzada con virus *Influenza* puede ocurrir entre los turones y el personal del criadero. El botulismo y la neumonía hemorrágica por *Pseudomonas* son grandes riesgos para estos animales.

Los turones son relativamente resistentes a la infección por *Salmonella* pero muy sensibles a las cepas humana, aviar y bovina de tuberculosis. Pueden actuar, también, como reservorios de infección de leptospirosis y listeriosis.

CHINCHILLA (*CHINCHILLA LANIGERA*)

Las chinchillas son roedores histricomorfos provenientes de las alturas de Los Andes montañosos argentinos, chilenos y bolivianos. Detentan la piel más densa, cálida y fina de todas las especies peliferas, de ahí su gran valor comercial. La domesticación, desde el año 1894, y la reclusión en ambientes antinaturales, como son los criaderos, han logrado susceptibilizar a las chinchillas a enfermedades que no sufren regularmente en su hábitat natural.

Además, estos animales son tímidos y muy propensos al shock y la muerte aguda, sin observar sintomatología previa, ante cualquier factor adverso. Esto enmascara muchas veces los distintos cuadros infecciosos.

A pesar de ser sensible al virus de la rabia y de la fiebre aftosa, no manifiesta estas infecciones en su cría. Por otro lado, las enfermedades bacterianas sí son muy comunes, como por ejemplo las enteritis catarrales donde convergen varios agentes: *Salmonella typhimurium*, *E. coli* y *Proteus* spp. Las epizootias de diarrea y enfermedad de los edemas por cepas de *E. coli* hemolíticas son similares a las observadas en el cerdo. Estas enteritis en general son fatales y por lo común también se encuentran acompañadas de *Giardia chinchillae* y *lamblia* y coccidios.

Pseudomonas aeruginosa ocasiona lesiones en ojo y oído, neumonías graves, abortos y enteritis, mientras *Bordetella bronchiseptica* causa cuadros de bronconeumonía.

El comienzo de estas infecciones respiratorias y entéricas, está frecuentemente asociada con el estrés del transporte, cambios en las dietas o la manipulación incorrecta.

Listeria monocytogenes, además de una encefalitis fatal, provoca una gastroenteritis necrótica, al igual que *Yersinia pseudotuberculosis*. Ambos gérmenes son aislados en pureza a partir de los múltiples pequeños focos de necrosis que se observan en la superficie de los grandes órganos.

Los procesos de septicemia son muy comunes en la chinchilla por infección con *Pasteurella hemolitica*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Bordetella*, mientras que en ocasiones se observan casos de glomerulonefritis difusa por *Leptospira interrogans* serovar *pomona*.

CONEJO (*ORICTOLAGUS CUNICULI*)

Virosis

La mixomatosis viral (MV), ocasionada por un virus (*myxovirus*, 250 nm, cubierto, complejo) con relación antigénica estrecha con el virus del fibroma de Shope, es una enfermedad cosmopolita de los conejos domésticos o europeos. El virus tiene

como reservorios en la naturaleza al conejo silvestre americano *Sylvilagus* (*Cottontail rabbit*) y las liebres (*Lepus aeuropeus*), que actúan como portadores asintomáticos, aunque se han registrado casos fatales en estas últimas. El virus se transmite por contacto y por insectos picadores: mosquitos (*Aedes, Culex* y *Anopheles*), pulgas (*Spilopsyllus cuniculis*) y piojos y tiene hasta 5 grados distintos de virulencia. La mortandad puede llegar al 50-70% y la prevalencia mayor es en verano. Desarrolla tumores cutáneos mixomatosos (las células mixomatosas estrelladas con inclusiones intracitoplasmáticas son patognomónicas), conjuntivitis y procesos respiratorios con muerte a los 8-10 días. En el país, donde Rosenbusch la describió en 1919 por primera vez, es motivo frecuente de epizootias. El diagnóstico se realiza por aislamiento del virus en membrana corioalantoidea y en cultivo celular, y mediante pruebas serológicas veloces: ELISA e inmunodifusión.

La enfermedad viral hemorrágica del conejo doméstico (RHDV) está producida por un *calicivirus* (RNA, 28-36 nm, icosaédrico, desnudo y no cultivable). Por técnicas de ELISA y Western blot se han detectado proteínas estructurales mayores, la más importante de las cuales es la de 60 kD en la cápside, y cuya amplificación por técnicas de PCR permite su identificación y valoración epidemiológica. La infección es mortal para conejos mayores de 6 semanas que presentan un cuadro hemorragíparo hiperagudo diseminado. Las epizootias observadas en Europa y China desde 1984 han sido gravísimas, mientras nuestro país se mantiene libre de la infección. Los conejos silvestres como el *Volcano rabbit* y las liebres de cola negra (*Black Tailed jackrabbit*) se han manifestado refractarios a la infección viral en la naturaleza. En cambio, la liebre europea (*Lepus aeuropeus*) es afectada seriamente por otro *calicivirus* (EBHSV), que provoca el síndrome también hemorragíparo en esta especie, y que está estrechamente emparentado con el RHVD.

Se ha propuesto que el RHDV y el EBHSV son serotipos de un mismo serogrupo. De hecho, ambos están más cercanos filogenéticamente entre sí que con respecto a otros *calicivirus*, de ahí que pertenezcan al mismo género (*Lagovirus*) dentro de la clasificación moderna de la familia Caliciviridae. En 1996, se identificó una nueva cepa de RHDV, apatógena, más emparentada genotípicamente con el EBHSV que con el RHDV clásico.

Es conveniente valorar el estado inmunológico de los conejos en el criadero mediante la técnica de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) o inhibición de hemaglutinación (HAI), considerando a los serorreactores positivos como aquellos que observan un título mayor a 1/112. La estrecha relación antigénica entre RHDV y otros virus del serocomplejo produce reacciones cruzadas en algunas pruebas serológicas.

El aislamiento últimamente de *rotavirus* en animales de 5-6 semanas, *adenovirus* (con correlación antigénica con los del hombre), *coronavirus* y *parvovirus* de distintos casos de enteritis catarral, supone clarificar si se trata de etiología viral o saprofitismo. En cambio, infecciones virales otrora muy comunes, como la papilomatosis y la viruela, ya no son frecuentes.

Bacteriosis

El síndrome respiratorio (bronconeumonía y pleuropericarditis purulento-fibrinosa) asociado a otitis purulenta, abscesos subcutáneos, metritis y orquitis, tiene como agentes responsables a *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*.

La mayoría de los conejos son portadores de *Pasteurella multocida*, que es prácticamente la única especie hallada en estos animales. Existen cepas totalmente apatógenas que se caracterizan por dar colonias muy chicas y ser negativas a la prueba de ornitina-descarboxilasa (ODC-). En cambio, todas las cepas ODC positivas son patógenas en diversos grados, de tal manera que hay una gran variabilidad de patovares de *Pasteurella multocida*. Además, *P. multocida* se diferencia en 5 tipos capsulares (A, B, D, E, F) y hasta 16 tipos somáticos (1 a 16), y la combinación de ambos antígenos (K,O) permite la identificación de los serotipos con distinta actividad patógena (por ej., los serotipos 3:A y 12:A son muy prevalentes).

En condiciones de alta concentración de amoníaco, poco recambio de aire y 80% de humedad en los criaderos, las muertes son cuantiosas.

Por otro lado, en animales en engorde con problemas clínicos respiratorios se han hallado de manera consistente *Mycoplasma pulmonis*, RHDV y MV.

Lo mismo ocurre en el síndrome entérico diarreico o constipativo, donde en condiciones de estrés (cambio de alimento o destete), la motilidad intestinal se perturba con exacerbación de la flora saprófita (*E. coli, Clostridium spiroforme, C. perfringens* tipo A).

De los gazapos lactantes se aísla *E. coli* en detrimento de la microflora grampositiva (*Lactobacillus* y *Streptococcus faecalis*) y la anaerobia gramnegativa de tipo Bacterioidaceae de acción inhibitoria sobre aquel. Estas cepas son más patógenas y productoras de toxinas Shiga, a diferencia de las aisladas en adultos. Los serotipos de *E. coli* O103 y O15 son los prevalentes en nuestro país. Dado que no existen pruebas bioquímicas o serológicas confiables y específicas para diferenciar las variantes enteropatogénicas, toxigénicas o invasivas de las no enteropatogénicas, se recurre a la tipificación por factores de virulencia para caracterizarlas genotípicamente, como la presencia de citotoxina (codificada por un bacteriófago llamada toxina Shiga) y plásmido de 60 MDa (a-fimbria de adherencia, b-enterohemolisina y c-intimina, proteína codificada por el gen *eaeA*) todo mediante pruebas de biología molecular (por ej., PCR).

Con referencia a los problemas reproductivos, *Salmonella* spp, *Pasteurella multocida* y *Staphylococcus aureus* son los causantes aceptados de metritis y septicemias

La enteritis neonatal más común está causada por el *Staphylococcus aureus* (se contagian de las mastitis) que además es el responsable infeccioso de la difundida infección de la almohadilla plantar en adultos.

La enfermedad de Tyzzer (por *Bacillus piliformis*, gramnegativo, móvil, esporógeno) es común en conejos mayores de 6 semanas, donde ocasiona la muerte con lesiones micronecróticas en intestino delgado e hígado. El germen, difícil de aislar, se cultiva en saco vitelino. La listeriosis, que provoca abortos y muertes súbitas, y la tularemia son también potenciales riesgos en la cría de conejos. *Chlamydia psittaci* participa también de procesos neumónicos en el conejo, habiéndose descrito serios brotes. También existe una forma entérica, otra meningoencefálica y otra abortiva. Los cuerpos elementales se colorean con la tinción de Machiavello y la prueba serológica más usada es la microinmunofluorescencia.

MICOSIS Y TOXINAS DE HONGOS EN ANIMALES PELIFEROS

Los visones y turones aparentan ser resistentes a infecciones fúngicas externas a pesar de observarse algunos pocos casos por *Microsporum canis* a partir del contagio de gatos o perros. De la lesión en forma de anillo, puede aislarse el hongo en bordes de la herida y pelos.

Las dermatomicosis, en cambio, son comunes en zorros (*Trichophyton* spp), en chinchillas (*T. mentagrophytes* y *M. canis*) y en conejos (*T. mentagrophytes*), pudiendo las lesiones costrosas y alopécicas infectarse con bacterias. El zorro, y en especial el visón, son muy sensibles a las aflatoxinas producidas por *Aspergillus niger* y *A. flavus* (la B1 es la más común) que parasitan el cereal mal almacenado y generan hepatotoxicidad fetal, inmunosupresión y mortandad perinatal. Asimismo el conejo es sumamente sensible a la aflatoxicosis, tiene una DL_{50} muy baja: 0,3 ppm y se observan graves brotes frecuentemente.

En las nutrias las micosis son muy raras, a pesar de ser frecuente el aislamiento de *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans* del tracto respiratorio, aunque no ocasionan patogenicidad.

Las aspergilosis pulmonares en chinchillas jóvenes son fatales, así como la moniliasis sistémica (por *Candida tropicalis*) para el turón.

ENFERMEDADES DE ETIOLOGIA MICROBIANA EN ANIMALES DE ZOOLOGICO

A continuación se ofrece una reseña muy sucinta de la acción de microorganismos patógenos sobre estos animales, dada la imposibilidad de cubrir en detalle todos los aspectos concernientes.

REPTILES

Los integrantes de los principales órdenes: Cocodrilidos (cocodrilos, caimanes, gaviales), escamosos (ofidios y lagartos) y quelonios (tortugas), se ven afectados por la actividad patógena de agentes introducidos al medio ambiente de los animales. También, la misma flora normal del reptil, bajo condiciones de estrés por cautiverio (temperatura y humedad inadecuadas, corrales de escasa dimensión, dieta inapropiada) genera infecciones rebeldes. Es el caso de *Aeromonas hydrophilla, Proteus* spp y *Pseudomonas* spp, bacterias que se encuentran en la materia fecal de todos los reptiles y en el agua, y que dan cuadros mortales de estomatitis necróticas, neumonías y septicemias. Las tortugas son muy sensibles a las infecciones oculares y respiratorias por bacterias gramnegativas oportunistas como la *Salmonella enteritidis* (gran riesgo de zoonosis) y el *Mycobacterium chelonei*. Las serpientes y los cocodrilos alimentados con roedores y pollos están expuestos a yersiniosis y salmonelosis que originan neumonías y enteritis fatales.

La mala sujeción de los reptiles ocasiona microtraumas y escoriaciones en piel que son susceptibles de infección por gérmenes piógenos y dermatofitos. Los reptiles pueden infectarse con gran variedad de virus: *herpesvirus* (genoma DNA, 100-180 nm) que ocasiona la estomatitis necrótica en la tortuga y la necrosis hepática en las serpientes constrictoras (boas) y los cocodrilos. Existen asociaciones con *adenovirus* (DNA doble cadena, 70-80 nm) y *parvovirus* (DNA simple, 18-26 nm) que agravan el cuadro con infecciones gastrointestinales. El diagnóstico se basa en las lesiones histológicas, presencia de cuerpos de inclusión intranucleares, demostración al microscopio electrónico de partículas virales y presencia de efecto citopático en cultivo de células cardíacas de serpiente. Los *poxvirus* (DNA doble, 260-450 nm) producen dermatitis pustulosas variólicas en los caimanes. En serpientes vipéridas hay encefalitis desmielinizantes progresivas por *paramixovirus* (genoma RNA, 100-200 nm), hepatitis y duodenitis por *reovirus* (RNA doble, 50-70 nm) y mixofibroma precardial, rabdomiosarcoma y linfosarcoma por *oncornavirus* (RNA simple, 100 nm).

MAMIFEROS

Los primates no humanos (monos) sufren enfermedades fatales (todas ellas zoonóticas) como las hepatitis virales A y B, tuberculosis (*M. tuberculosis* y *bovis*), shigelosis (*S. dysentariae*), criptococosis, enfermedad de Marburgo (*filovirus* RNA), sarampión (*morbilivirus*), viruela (*ortomixovirus*), *herpes* simple (tipo 1), y *herpes simiae* "B".

En los rumiantes salvajes (ciervos, corzos, antílopes, bisonte, búfalo, yak, ñú y camello), pueden observarse serias epizootias de brucelosis, clostridiosis, peste bovina, fiebre catarral maligna y enfermedad de las mucosas.

En grandes felinos (tigre, onza, leopardo, lince, puma, yaguar, cerval) la panleucopenia felina es mortal. Los leones son sensibles al carbunco y la pasteurelosis, al igual que el elefante y el canguro.

La rabia no es rara en coyotes, chacales y lobos, mientras que la fiebre aftosa afecta al oso pardo y negro, la jirafa, el yak, el tapir y los camellos. El carbunco se observa también en hipopótamos, grandes felinos, hiena, elefante y rumiantes.

La yersiniosis (*Y. pseudotuberculosis*) es común entre los cérvidos, león, canguro, chimpancé, mapache y camello. También se observaron casos de tularemia en monos, ciervos y ardillas, lepra en chimpancé, blastomicosis (*Blastomyces dermatitidis*) en león de mar y león africano y nocardiosis en mamíferos marinos.

AVES

Son frecuentes los brotes de salmonelosis (*S. typhimurium*) en patos, gansos y gaviotas, con infecciones ováricas y enteritis, existiendo portadores sanos que actúan como reservorios. En aves, las acuáticas han presentado casos de botulismo (*C. botulinum* tipo A y E) y graves epiornitias en patos y faisanes por el tipo C. El *Mycobacterium avium* puede afectar cualquier especie aviar de zoológico (papagayos, sobre todo). Los patos son sensibles a infecciones por *Erysipelothrix rhusiopathiae* (septicemia hemorrágica mortal), *Borrelia anserina* (espiroquetosis) y *Yersinia pseudotuberculosis*. *Pasteurella multocida* causa brotes de alta mortandad en aves acuáticas.

La candidiasis (*Candida albicans*) bucal y esofágica y la clamidiosis (*Chlamydia psittaci*) afectan varias especies de aves psitácidas, palomas, patos y faisanes. Además, muchas virosis de las aves domésticas como la enfermedad de Newcastle y peste aviar (*paramixovirus* y *mixovirus*) generan verdaderas panzootias, variando la presentación de la enfermedad de acuerdo con el patotipo de virus actuante.

BIBLIOGRAFIA

Acha PN, Szyfres B. Zoonoses and Communicable Diseases Common to man and animals. 3rd edition. Pan Americam Health Organization, Washington, 2001.

Budd J. Distemper. In: Davis JW, LH Karstad & DO Trainer (eds.). Infectious Diseases of Wild Mammals. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1981.

Cooper JE, Jackson AF. Diseases of the Reptilia. London Academic Press. England. 1981.

Fowler ME. Zoo and Wildlife Animal Medicine. WB Saunders Company, Philadelphia, 1978.

Jorgensen G. Mink Production. Dansk Pelsdyravlerforening. Kövenhavn. 1984.

Martino P. Patologia degli animali da pelliccia. SUMMA (Italia) 1989; 4:280-282.

Martino P, Villar J. A survey on perinatal mortality in young minks. Veterinary Res. Comm. (England). 1990; 14:199-205.

Martino PE, Martino J, Villar J. A note on Diseases of minks. J Vet Med (ZentralBlatt fur Veterinarmedizin) (Germany). B 1991; 38:227-230.

Martino PE, Stanchi NO. La cría de animales peliferos y las zoonosis. World Animal Review/FAO 1993; 72,3:34-36.

Martino PE, Stanchi NO. Epizootic pneumonia in nutria. Journal of Veterinary Medicine B/Zentralblatt fur Veterinarmedizin. 1994; 41:561-566.

Martino PE, Stanchi NO. Causes of death in captive nutria (*Myocastor coypus*) in Argentina. Israel Journal of Veterinary Medicine. 1998; 53: 83-88.

Martino P, Samus S, Piscopo M, Risso M, Lacchini R. Randomized sanitary status of Argentinian rabbitry, World Rabbit Science. 2000; 8 (3): 145-147.

Wenzel V. Edelpelztiere veb. Deutscher Landwirtschaft Verlag. Berlin. 1984.

Capítulo 88

TRATAMIENTO BIOLOGICO DE EFLUENTES

Alejandro J. Mariñelarena

INTRODUCCION

Las concentraciones urbanas y la actividad industrial generan grandes cantidades de desechos. Por su naturaleza soluble o finamente particulada, muchos de estos residuos son vehiculizados mediante efluentes líquidos.

Invariablemente, estos efluentes son volcados en cuerpos de agua receptores (mares, ríos y lagos).

Los efluentes domésticos (baños, cocinas) y los de las industrias que utilizan insumos animales o vegetales en sus procesos productivos, contienen altas concentraciones de materia orgánica, que representa una fuente de energía química para las comunidades acuáticas heterótrofas.

Cuando un curso de agua recibe un aporte de este tipo, los organismos con capacidad de utilizar el nuevo recurso energético proliferan activamente alterando el equilibrio de la comunidad preexistente. La actividad metabólica modifica las condiciones fisicoquímicas del ambiente y se establece una comunidad diferente, que se adapta a las nuevas condiciones.

Aguas abajo del vuelco, se puede identificar una sucesión de condiciones fisicoquímicas y de comunidades representativas, hasta que los materiales orgánicos se mineralizan, sus elementos constitutivos son metabolizados y las condiciones originales se recuperan.

Este ciclo es conocido como la capacidad autodepuradora de los ambientes naturales.

Los sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales utilizan las comunidades naturales que intervienen en los procesos de mineralización, confinándolas en ambientes artificiales, diseñados con una estructura y tamaño adecuados para los residuos a tratar.

A partir de estos conceptos, la ingeniería sanitaria ha desarrollado un sinnúmero de sistemas que utilizan diversas comunidades naturales, para lograr procesos más eficientes y reducir el espacio utilizado en los tratamientos.

Los tratamientos biológicos se han practicado desde principios del siglo XX, especialmente para la depuración de aguas servidas domésticas, con el objetivo de eliminar los riesgos de diseminación de patógenos entéricos de transmisión hídrica y evitar la polución de los cuerpos de agua receptores.

Los sistemas de tratamiento se intercalan entre la fuente de generación de efluentes y el cuerpo de agua receptor, evitando el deterioro de este último.

METABOLISMO BACTERIANO

Los microorganismos pueden mineralizar cualquier compuesto orgánico natural con mayor o menor dificultad. Incluso muchos compuestos orgánicos sintéticos, elaborados industrialmente, son susceptibles de metabolismo microbiano.

La biodegradación puede utilizar vías metabólicas oxidativas o fermentativas.

En la respiración, los electrones liberados de los enlaces reducidos del carbono, son conducidos a través de una cadena respiratoria de flavoproteínas y citocromos hacia el oxígeno molecular (aceptor final), almacenándose la energía en ATP por fosforilación oxidativa. Los productos finales de la respiración son dióxido de carbono, agua y compuestos minerales.

Cuando la concentración orgánica de los efluentes es media o elevada, el tratamiento aeróbico se ve dificultado por la baja solubilidad del oxígeno en el agua. El sistema debe ser subsidiado energéticamente incorporando oxígeno por medios mecánicos, lo que incrementa los costos de operación.

El metabolismo anaeróbico es más lento e ineficiente. La mineralización de la materia orgánica se hace a través de una secuencia de hidrólisis y fermentaciones ácidas, cuyos productos son muy variados, producen olores desagradables y en algunos casos son tóxicos.

En determinadas condiciones de oxidorreducción y de presión parcial de hidrógeno, los ácidos grasos volátiles son fermentados a acetato, obteniéndose este compuesto como producto casi exclusivo de la fermentación ácida.

La etapa final es la fermentación metánica a partir de acetato e hidrógeno (acetoclástica), en que el carbono orgánico se libera como metano y dióxido de carbono, llegando así a una verdadera mineralización.

Los procesos anaerobios, si bien menos eficientes en cuanto a velocidad de reacción y al aprovechamiento de la energía por la célula, generan mucho menos cantidad de lodos y tienen menores costos operativos.

Por otro lado, son más complejos ya que intervienen grupos o consorcios de microorganismos en los que la ausencia o inactividad de alguno puede detener todo el proceso. El conocimiento de la bioquímica y de las condiciones ambientales óptimas para su funcionamiento, es imprescindible para su utilización eficiente.

TRATABILIDAD

Para definir si un residuo puede tratarse biológicamente con una eficiencia razonable, se deben realizar ensayos de tratabilidad en el laboratorio.

Un ensayo simple es la comparación entre la demanda química de oxígeno (DQO) y la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) del efluente.

El ensayo de DQO mide la cantidad de dicromato de potasio (oxidante fuerte) que se consume en reacción con una alícuota de la muestra. La demanda es la cantidad de oxidante consumido expresada en equivalentes de oxígeno.

El ensayo de DBO mide la oxidación microbiana del residuo en condiciones adecuadas de concentración de oxígeno y nutrientes esenciales. Se calcula por el consumo de oxígeno de la muestra (o una dilución) durante un lapso de 5 días a 20 °C.

Si la relación DQO:DBO es 1, significa que todo el carbono orgánico es oxidable biológicamente. Los tratamientos biológicos son efectivos para residuos con relación DQO:DBO menor de 3-4.

Existen otros ensayos de tratabilidad más complejos, en que se realiza una incubación semejante a la de DBO, pero se mide el consumo de oxígeno con respirómetros. Estos experimentos, además de demostrar el ataque bacteriano al residuo, permiten obtener datos valiosos de la cinética metabólica, para el diseño de los sistemas de tratamiento.

PRETRATAMIENTO DE EFLUENTES LIQUIDOS

Los efluentes líquidos son soluciones y/o suspensiones acuosas muy heterogéneas. Cuando su contenido de materiales biodegradables justifica un tratamiento biológico, el líquido crudo debe ser acondicionado por medio de procesos físicos y/o químicos (pretratamientos), antes de llegar a la etapa biológica propiamente dicha.

Los pretratamientos más comúnmente usados son desbaste (retención de elementos gruesos por medio de rejas), desarenado, desengrasado, coagulación, floculación, neutralización y sedimentación.

Todos estos procesos tienden a separar parte del contenido y acondicionar los efluentes, dejando el material soluble o muy finamente particulado en forma adecuada para el ataque biológico de los microorganismos.

La necesidad de uno o más pretratamientos se define de acuerdo a las características del líquido a tratar y para cada uno se diseñan estructuras apropiadas.

TRATAMIENTOS BIOLOGICOS

Los métodos de tratamientos pueden clasificarse en:

- *Compactos*: son aquellos en que se concentra el proceso biológico en un reactor del menor tamaño posible para optimizar el espacio y que requieren de un subsidio energético importante en forma de bombeo, agitación y aireación.
- *Extensivos o naturales*: son aquellos en que los procesos biológicos son realizados por poblaciones no concentradas, en un espacio mayor, sin restricción y con mucho menor subsidio energético.

Los tratamientos biológicos de líquidos residuales más comúnmente usados (convencionales), son los compactos entre los que se pueden mencionar los sistemas de biomasa dispersa (lodos activados) y los de biomasa fija (lechos percoladores). Los tratamientos extensivos más comunes son las lagunas de estabilización.

Métodos compactos

Estos sistemas requieren un pretratamiento eficiente ya que el tiempo de retención hidráulica en el reactor es muy corto y las partículas grandes no pueden ser metabolizadas.

Además de otros pretratamientos, es imprescindible una etapa de sedimentación para eliminar sólidos finos, al punto que se la considera parte del tratamiento (tratamiento primario).

Sedimentación primaria

Los sedimentadores primarios se diseñan con tiempos de retención de 90 a 120 min si se utilizan como único tratamiento y de 30 a 60 min, si a continuación se hace tratamiento biológico.

La sedimentación primaria permite eliminar entre 50 y 60% de los sólidos en suspensión y entre 25 y 40% de la DBO.

Existen diseños muy elaborados que permiten altas eficiencias en espacios muy reducidos.

Tratamientos con biomasa suspendida: lodos activados

Los primeros tratamientos datan de 1914. El líquido que sale del sedimentador primario ingresa al reactor (pileta de aireación) donde es aireado y agitado. Allí se desarrolla y selecciona una microbiota bacteriana aeróbica que utiliza la materia orgánica del efluente como nutriente y el oxígeno disuelto como aceptor de electrones.

El sistema de aireación (difusores de fondo o aireadores mecánicos superficiales), además de introducir oxígeno, asegura una mezcla completa de la biomasa con el efluente.

El líquido dentro del reactor se denomina licor mixto. El licor que sale del reactor pasa a un sedimentador secundario o clarificador donde la biomasa bacteriana suspendida, flocula y sedimenta, dejando un efluente claro.

La biomasa sedimentada es recirculada por bombas y mezclada con el líquido que ingresa al reactor. Así se obtiene un licor mixto con una concentración de bacterias muy superior a la que se podría esperar por la cinética de crecimiento celular, haciendo más eficiente el tratamiento. Cuando se alcanza la concentración adecuada de microorganismos, ésta se mantiene descartando cada día una fracción de licor mixto que contiene la cantidad de biomasa que se produce en el mismo lapso.

El caudal y contenido orgánico del efluente y el volumen del reactor definen las características de operación en sistemas de alta, media o baja carga.

En un reactor con funcionamiento estable, la comunidad bacteriana aerobia, está acompañada por protozoos (flagelados y ciliados) que consumen grandes cantidades de bacterias y por rotíferos que consumen partículas mayores (ciliados y aglomerados bacterianos).

Para el funcionamiento adecuado de un reactor de lodos activados, es muy importante que la biomasa producida forme un flóculo compacto y sedimente rápido en el clarificador.

Los mayores problemas de operación ocurren por mala sedimentación de la biomasa, que al no ir al fondo del clarificador no se recircula a la pileta de aireación. La alteración de los parámetros operativos conduce muchas veces al desarrollo de microorganismos filamentosos, que interfieren con la formación o la sedimentación del flóculo.

La comunidad que domina en el reactor, depende de una serie de variables como el caudal, el tiempo de retención, el tipo de residuo, la relación de contenido de C:N:P del residuo y la carga de operación.

Las variables de control del sistema son:

- La relación entre la cantidad de residuo y la biomasa (F/M, Food/Microorganisms).
- El caudal de reciclo que permite aumentar o disminuir la cantidad de biomasa en el reactor.
- El caudal de purga que regula la cantidad de biomasa en el sistema.

Los reactores de lodos activados son altamente sensibles a los pulsos tóxicos. Por su bajo tiempo de permanencia y alto grado de recirculación, el ingreso de un tóxico al sistema puede destruir la microbiota en su totalidad, requiriéndose luego varios días para que se reinstale la comunidad biológica y el sistema recupere su eficiencia.

Otros métodos de tratamiento con biomasa suspendida son:

Reactores en batch secuenciales (SBR)

Las etapas de tratamiento y clarificación que en un sistema de lodos activados se hacen en forma continua en distintos recipien-

tes, aquí se escalonan en el tiempo dentro de uno solo. El reactor se llena con el efluente, se airea y se agita durante la etapa de tratamiento, luego se deja reposar para sedimentar el lodo (biomasa), se retira el líquido tratado por una salida lateral, se purga parte del lodo por el fondo y luego se vuelve a cargar. Los sistemas constan de varios reactores que funcionan en forma paralela.

Lagunas aireadas

Son cavas limitadas por terraplenes y provistas con aireadores mecánicos con el objetivo de mezclar y airear el líquido a tratar. El criterio de diseño se centra en aportar el oxígeno necesario para la degradación bacteriana de la carga orgánica del efluente, como complemento del producido por fotosíntesis algal.

El sistema así logrado se asemeja a un tratamiento de lodos activados, con la diferencia que no hay recirculación de biomasa y la fracción que sale del depósito suspendida en el efluente, se pierde.

Las lagunas aireadas son seguidas por lagunas facultativas, donde se deposita y mineraliza la biomasa excedente de la anterior y luego por lagunas aeróbicas para el pulido final del efluente.

Zanjas de oxidación

Son canales cerrados, de forma oval, con un dispositivo de agitación y aireación superficial (paletas), que hace circular el líquido y le incorpora aire. Puede tener además incorporación de aire por burbujeo de fondo.

Tratamientos con biomasa fija: lechos percoladores

Las primeras experiencias se realizaron en 1893. El reactor consiste en un depósito cilíndrico relleno con un material de alta superficie específica que pueden ser piedras de 5 a 10 cm de diámetro o de una matriz plástica. El líquido se dispersa en la parte superior mediante un distribuidor giratorio. Separado en gotas, cae bañando la superficie del relleno, donde se desarrolla una compleja comunidad de bacterias, protozoos, hongos y algas, incluida en una masa gelatinosa de polisacáridos (biofilm o biocapa).

El aire dentro del reactor se renueva por corrientes convectivas o por ventilación forzada. El líquido en contacto con el aire, se oxigena por difusión. La biomasa recibe nutrientes y oxígeno por difusión desde el líquido.

La comunidad que coloniza el reactor inicialmente es delgada y aeróbica. A medida que la biocapa aumenta su espesor, se forman gradientes de nutrientes y oxígeno y en la base se crean condiciones de anaerobiosis. Cuando la biomasa llega a ser demasiado gruesa y la base no recibe nutrición adecuada, parte del film se desprende y es arrastrado por el agua, comenzando una nueva colonización en el espacio dejado. En el fondo del lecho hay un colector, desde donde el líquido pasa a un clarificador para separar la biomasa desprendida.

Como en el caso de los lodos activados, se puede dividir a los lechos percoladores en sistemas de alta y baja carga, de acuerdo a sus cargas hidráulicas y orgánicas de operación.

Los lechos percoladores (principalmente los de alta carga) se diseñan con un sistema de recirculación de líquidos a partir del clarificador. Su función es mantener un caudal mínimo en los momentos de poco aporte para evitar el secado del biofilm y diluir la carga orgánica en momentos de excesiva concentración.

Las variables de control del proceso son:

- El caudal de reciclo, que permite mantener un caudal mínimo y diluir concentraciones excesivas.
- La velocidad de giro, que permite distribuir la carga orgánica en sentido vertical.

Otra forma de proceso con biomasa fija son:

Contactores biológicos rotativos (RBC)

Son discos plásticos montados sobre un eje horizontal giratorio, sumergidos hasta la mitad dentro de una batea por donde circulan los efluentes. El eje gira lentamente. La biomasa adherida a la parte del disco que se sumerge absorbe contaminantes y cuando sale del líquido toma oxígeno de la atmósfera para oxidarlos.

Lodos primarios y secundarios

Los sistemas de tratamiento compactos generan lodos tanto en la sedimentación primaria (lodos crudos), como en la clarificación (lodos orgánicos o biosólidos). Los primeros contienen materia orgánica sin digerir, minerales, y pueden contener tóxicos adsorbidos o complejados en el precipitado. Los biosólidos están constituidos casi exclusivamente de biomasa bacteriana.

Ambos tipos de lodos son susceptibles de procesos de fermentación ácida, con producción de olores desagradables. Previo a su disposición final, deben ser estabilizados con cal, por digestión biológica (aerobia o anaerobia) o por algún proceso físico (deshidratado-secado o incinerado).

Durante la digestión biológica, los materiales orgánicos se mineralizan y el lodo se concentra. Una vez digerido, se dispone en playas de secado y, si no contiene elementos tóxicos, puede luego ser utilizado como fertilizante en parques y jardines. La digestión aerobia es más veloz y no produce olores, pero requiere de energía para aireación y mezcla y el volumen de lodo final es mayor. La digestión anaerobia es más lenta, pero produce menos lodo remanente que escurre y se seca mejor.

Los lodos con sustancias peligrosas deben ser dispuestos en rellenos de seguridad o concentrados por métodos mecánicos e incinerados. Si la incineración no destruye los tóxicos, las cenizas también deben depositarse en lugares autorizados.

Reactores anaerobios

A partir de 1980 aparece una nueva generación de reactores anaerobios, desarrollados en base a la capacidad de los microorganismos de crecer en macrocolonias (gránulos) o sobre soportes inertes.

El líquido circula en forma ascendente entre los gránulos o el soporte, a una velocidad controlada, de manera que contrarreste la velocidad de sedimentación de las partículas y el sistema no exporte la biomasa producida.

En los reactores UASB (*Up-flow Anaerobic Sludge Bed*) y EGSB (*Expanded Granular Sludge Bed*), se genera un lodo biológico floculento o granular, compuesto exclusivamente por microorganismos.

En los reactores de biomasa fija, la microbiota anaerobia desarrolla sobre un sustrato inerte que, de acuerdo al tamaño del grano, constituye un soporte fijo (permanece quieto) o un soporte fluidificable (se expande por la corriente).

Los reactores UASB y EGSB son utilizados cuando el efluente contiene materiales particulados y los de biomasa fija para procesos con sustratos orgánicos solubles.

Con estos tipos de reactores, se logran tratar cargas promedio de 20 kg DQO/m3.d en tiempos de retención hidráulica de 6-48 horas, contra tasas de 1-2 kg DQO/m3.d en 5-30 días, en las lagunas de estabilización anaeróbicas.

Métodos modernos

Los métodos de tratamiento biológico más utilizados, especialmente en los países desarrollados, son los compactos. A

mediados de la década de 1970 se comenzaron a evidenciar una serie de inconvenientes en el uso de estos métodos.

- Los altos costos energéticos de operación fueron seriamente cuestionados durante la crisis del petróleo de 1973.
- La construcción y operación de este tipo de plantas convencionales para poblaciones pequeñas o dispersas, deben ser subvencionadas por el estado, ya que no se pueden financiar con la tasa por servicio pagada por los beneficiarios.
- Estos sistemas no degradan muchos tóxicos, ni extraen metales pesados, los que permanecen en los lodos.
- Las grandes cantidades de lodos producidos, que requieren posterior tratamiento, encarecen la operación. Su disposición final, aun después de tratados, genera problemas de contaminación de acuíferos.
- Las legislaciones tendientes a abatir la eutrofización de los ambientes acuáticos naturales, comenzaron a exigir la incorporación de plantas de tratamiento terciario. Los métodos químicos disponibles implican alto costo operativo y producción de lodos ricos en nutrientes.

Todo ello generó un movimiento tendiente al desarrollo de nuevas metodologías de tratamiento, basadas en un conocimiento más profundo del funcionamiento de los sistemas naturales y en conceptos tales como la transformación de los residuos en productos utilizables (proteínas, fertilizantes), el reuso del agua y la generación de energías no convencionales.

Métodos naturales extensivos

La tendencia actual es a descentralizar los tratamientos y a tratar in situ los residuos de cada lugar. De acuerdo al tamaño de los efluentes se utilizan distintas modalidades. Para pequeños pueblos con red colectora se construyen lagunas de estabilización seguidas por humedales artificiales; para establecimientos aislados (campings, hoteles, escuelas) se instalan cámaras sépticas y humedales, y para una o varias viviendas unifamiliares se emplean cámaras sépticas y terrenos de infiltración.

Lagunas de estabilización

Las lagunas de estabilización son cavas realizadas en la tierra, limitadas por terraplenes. Las aguas residuales se vuelcan con un pretratamiento de desbaste. La relación entre el caudal de efluentes y el volumen del sistema define el tiempo de residencia hidráulico.

En la masa de agua se desarrolla una comunidad microbiana suspendida (planctónica) compuesta de bacterias, algas y protozoos. La relación entre la carga orgánica de los líquidos y el tamaño del sistema definirá si domina un metabolismo aerobio, alimentado de oxígeno por la fotosintesis algal o anaerobio, dominado por la fermentación bacteriana.

Las lagunas se clasifican en anaeróbicas, facultativas o aeróbicas.

Las lagunas anaeróbicas son profundas (3, 4 o más metros), y se utilizan para tratar efluentes con alta carga orgánica. En ellas domina un proceso metabólico de hidrólisis, fermentación (formación de ácidos grasos volátiles), completado por metanogénesis. Pueden desarrollar poblaciones de bacterias fotosintéticas anoxigénicas, que utilizan sulfuros y materia orgánica en su metabolismo.

Las lagunas facultativas (entre 1 y 2 metros) presentan un estrato superficial iluminado, donde domina la fotosíntesis algal, que produce oxígeno para el metabolismo oxidativo de las bacterias y un estrato profundo oscuro con metabolismo anaeróbico. Estas condiciones dependen de un delicado equilibrio entre la producción y el consumo de oxígeno.

Las lagunas aeróbicas son playas (menos de 1 metro), con dominancia de un metabolismo aeróbico fotosintético en toda su profundidad.

Más allá de las dimensiones, el metabolismo que presenten durante su funcionamiento dependerá de la carga orgánica que se aplique por unidad de área y de la temperatura del líquido.

Las fórmulas de diseño de sistemas de lagunas de estabilización incluyen variables como la cinética del metabolismo bacteriano fermentativo u oxidativo, la temperatura del líquido, el tiempo de residencia hidráulica y el tipo de mezcla, además de la carga y el caudal del efluente a tratar.

Es recomendable que estos sistemas incluyan varias lagunas en serie, comenzando con una o dos anaeróbicas si la carga del efluente es alta, seguidas por una o dos lagunas facultativas y finalmente una aeróbica que funciona como laguna de pulido del efluente final. Cuando los sistemas son muy grandes (efluentes de una ciudad) se recomienda construir varios trenes de lagunas paralelos, para darle flexibilidad a la operación y a las tareas de mantenimiento.

Tratamiento y disposición en el terreno

Estos métodos extensivos consisten en distribuir el líquido sobre o dentro del terreno. Las partículas del suelo natural actúan como filtro físico de los materiales suspendidos, y la microbiota metaboliza los compuestos orgánicos disueltos, liberando nutrientes que sirven como fertilizantes a la vegetación.

Para la aplicación de estas técnicas se debe considerar la permeabilidad del terreno, la profundidad de la capa freática y la calidad del efluente, para definir la cantidad aplicable por unidad de área y tiempo.

Se utilizan diferentes técnicas según las características del suelo y los objetivos secundarios del tratamiento.

Riego

Tiene como objetivo la producción vegetal asociada al tratamiento. Se utiliza en suelos con permeabilidad media y los efluentes se dosifican en las cantidades adecuadas para el crecimiento vegetal. Tiene el inconveniente de que el efluente debe rociarse (aspersión) por lo que los líquidos deben ser pretratados y desinfectados.

Infiltración rápida

Se utiliza en suelos muy drenados. Se aplica la mayor cantidad de líquido por unidad de área, aprovechando la capacidad filtrante del suelo para el tratamiento y el agua como fuente de recarga de acuíferos.

Escorrentía superficial

Se utiliza en suelos muy impermeables. Se riega en la parte más alta del terreno, se deja correr el líquido por la superficie y se recoge en la parte baja en una zanja perpendicular a la pendiente. El tratamiento lo hace la microbiota que crece sobre la vegetación terrestre que bañan los líquidos a su paso.

Infiltración in situ

Se utiliza para el tratamiento de instalaciones pequeñas (escuelas, hosterías, viviendas) en zonas rurales o suburbanas. Los líquidos pasan por una cámara séptica y luego se vuelcan en un terreno de infiltración, consistente en una red de caños perforados que se disponen en zanjas rellenas de material poroso. Los caños,

una vez ubicados y nivelados, son cubiertos con tierra. El sistema se alimenta por pulsos. Los líquidos son filtrados por el terreno y se incorporan ya purificados a los acuíferos subterráneos.

Humedales artificiales (Wetlands)

Los humedales son reconocidos como los ecosistemas acuáticos más productivos del planeta. Desde mediados de la década de 1950 se experimentaron para el tratamiento de algunos contaminantes específicos.

Los tratamientos en humedales construidos consisten en hacer circular el efluente por zanjas o cavas, donde se favorece el crecimiento de vegetación acuática flotante o arraigada, sumergida o emergente.

El proceso de mineralización lo realiza la microbiota de bacterias, algas y protozoos (flagelados y ciliados), que crece sobre los tallos, hojas y raíces de las plantas. La actividad bacteriana se ve favorecida por el metabolismo de los vegetales que oxigenan el agua con su fotosíntesis, exudan subproductos metabólicos, bombean oxígeno a las raíces y absorben parte de los nutrientes liberados por la actividad microbiana.

Estos métodos se han utilizado exitosamente en climas tropicales y subtropicales, que permiten un fácil y rápido crecimiento de los vegetales. Las regiones con inviernos helados requieren coberturas especiales y aclimatación del sistema de tratamiento, lo que los encarece.

Sistemas con plantas flotantes

Se utilizan lagunas o cavas donde crecen plantas acuáticas como camalotes (*Eichhornia crassipes*) o lentejas de agua (*Lemna* spp). Las plantas absorben la luz evitando el desarrollo de algas en el agua. Las bacterianas que mineralizan los residuos orgánicos crecen sobre las raíces de la vegetación, que cuelga en la masa de agua. Estos sistemas requieren cosechas periódicas por la gran productividad vegetal. La biomasa cosechada se puede utilizar para forraje, compostaje o producción de biogas.

Sistemas de flujo superficial

Se utilizan zanjas largas y angostas, sembradas con vegetación palustre (juncos, totoras), por donde circula el agua a un ritmo muy lento. Tienen buena capacidad para retener sólidos, degradar carbono orgánico y eliminar nitrógeno por procesos microbianos de nitrificación-desnitrificación. Se usan como pulido de efluentes de otros tratamientos. En zonas rurales adquieren valor estético ya que se convierten en sitios de atracción y nidación de aves silvestres.

Sistemas de flujo subsuperficial

También llamados sistemas radiculares o fitoterrestres. Consisten en cavas poco profundas (50 cm), rellenas con grava fina y sembradas con plantas acuáticas (juncos, carrizos o totoras). El líquido se distribuye en un extremo de la cubeta, fluye entre la grava sin aflorar en la superficie y sale por el otro extremo a través de un caño colector de fondo. Los contaminantes son degradados por la biomasa que se desarrolla sobre las partículas del relleno y las raíces de las plantas. Los elementos que se mineralizan nutren a las plantas y éstas bombean oxígeno a sus raíces favoreciendo el metabolismo bacteriano. Al no tener contacto con la atmósfera no se produce emisión de olores ni proliferación de mosquitos. Son muy eficientes en retención de sólidos y carbono orgánico. Se utilizan en asentamientos aislados (hoteles, campings, escuelas) sin acceso a redes cloacales.

BIBLIOGRAFIA

Degremont T. Manual técnico del agua. 4° Ed. Grafo S.A. Bilbao. 1979.

EPA. Constructed Wetlands Treatment of Municipal Wastewaters. Manual. Office of Research and Development. EPA/625/R-99/010. 2000.

EPA. Onsite Wastewater Treatment Systems Manual. Office of Water. Office of Research and Development. EPA/625/R-00/008. 2002.

Imhoff K. Manual de saneamiento de poblaciones. Versión española de la 22° edición alemana. Ed. Blume. Madrid. 1979.

Kadlek RH, Knight RL. Treatment Wetlands. CRC Press LLC. Boca Raton, FL. 1996.

Metcalf & Eddy, Inc. Wastewater engineering: treatment, disposal, reuse. McGraw-Hill, New York, N.Y. 1979.

Middlebrooks EJ. Design manual. Municipal wastewater stabilization ponds. EPA 625/1-83-015, U.S.EPA, Cincinnati, OHIO. 1983.

Mitsch WJ, Jorgensen SE. Ecological Engineering: an introduction to ecotechnology. Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Inc. New York, NY. 1989.

Romero Rojas JA. Tratamiento de aguas residuales por lagunas de estabilización. Alfaomega 3ª. Ed. México. pp. 281 1999.

Soubes M. Microbiología de la digestión anaerobia. En: "Tratamiento Anaerobio". Proc. del III Taller y Seminario Latinoamericano "Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales". Montevideo, Uruguay. 1994.

Steiner GR, Watson JT. General design, construction and operation guidelines: Constructed wetlands wastewater treatment systems for small users including individual residences. Second Ed. Tennessee Valley Authority. TVA/WM-93/10. Chattanooga, Tennessee. 1993.

Viñas M. Criterios de diseño y escalado de reactores anaerobios. En: "Tratamiento Anaerobio". Proc. del III Taller y Seminario Latinoamericano "Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales". Montevideo, Uruguay. 1994.

Capítulo 89

BIOFILMS (BIOPELICULAS): BIOCORROSION Y BIODETERIORO DE MATERIALES

Patricia Sandra Guiamet, Sandra Gabriela Gómez de Saravia

BIOCORROSION

Los procesos de biocorrosión y biofouling son reconocidos actualmente como la mayor fuente de problemas y fallas estructurales que afectan a una gran variedad de industrias. La actual preocupación es mejorar los métodos para controlar los depósitos biológicos preservando simultáneamente la inhibición de la corrosión inorgánica y evitando la formación de depósitos calcáreos.

Es de fundamental importancia el aporte de diferentes disciplinas tales como la microbiología, la biología, la ingeniería, la electroquímica y la metalurgia para avanzar en el conocimiento de la biocorrosión y el biofouling.

La biocorrosión y el biofouling de las superficies metálicas se deben a procesos biológicos y electroquímicos que ocurren mediante la participación de microorganismos que se adhieren a las superficies a través de la excreción de material polimérico extracelular (MPE) formando biopelículas. Estas películas biológicas modifican drásticamente las condiciones de la interfase metal/solución formando una barrera entre el metal y el medio líquido circundante. Es por ello, que se debe considerar que la corrosión microbiológica (biocorrosión) transcurre sobre una superficie modificada con características fisicoquímicas y biológicas particulares y que podríamos denominar biológicamente condicionada. Ignorar este hecho y pretender estudiar un proceso de biocorrosión con los mismos parámetros que en la corrosión inorgánica, puede conducir a un fracaso total en un tratamiento de prevención y control de estos procesos e incluso a un agravamiento del problema.

Las biopelículas pueden ser consideradas como una matriz gelatinosa de MPE con un contenido de agua del 95% de la masa aproximadamente, microorganismos de diferente naturaleza y detritos inorgánicos y orgánicos variados.

Las reacciones que se producen entre los metabolitos microbianos y la superficie metálica tienen lugar por debajo de la biopelícula o dentro de su estructura. El conocimiento del efecto de las mismas sobre la reacción de corrosión es para implementar medidas de prevención y control adecuadas en sistemas industriales. Una planta industrial contiene diversos ambientes donde la biocorrosión y el biofouling son un riesgo potencial.

Se ven afectados por problemas de biocorrosión los sistemas de intercambio calórico, tanques de almacenamiento de combustible, sistemas de tratamiento de agua y de efluentes, filtros, tuberías en general, etc.

El biofouling puede presentarse sobre embarcaciones, en sistemas de ósmosis inversa, diferentes medios porosos (por ej., reservorios de petróleo), sistemas de distribución de agua, las industrias alimenticias y farmacéutica, etc. Las condiciones de operación pueden ser variadas: flujo turbulento o aguas estancadas, superficies lisas o con grietas. Además de los materiales metálicos, se afectan los de hormigón, plásticos y otros.

Hasta la década de 1980 muchos tratamientos típicos de aguas se basaban en el uso de inhibidores de corrosión anódicos y catódicos, tales como el cromato y cinc, a veces combinados con fosfatos y polímeros para disminuir los efectos agresivos del agua concentrada. El biofouling era mantenido con el uso de cloro (efectivo a pH ácido) y a veces se lo reforzaba con pentaclorofenol o compuestos de amonio cuaternario.

Desde el comienzo de la década de 1990 se produjo un drástico cambio en el tratamiento de aguas industriales como consecuencia de una mayor presión por parte de las legislaciones vigentes sobre la preservación del medio ambiente.

El uso de cromatos ha sido prohibido y se utilizan valores de pH más altos (entre 7 y 9); se emplean fosfonatos orgánicos como inhibidores de corrosión asociados a policarboxilatos para controlar los depósitos inorgánicos.

Toda superficie metálica en contacto con un medio líquido industrial o natural experimenta una serie de cambios biológicos e inorgánicos que conducen al ensuciamiento y la corrosión, respectivamente. La secuencia de cambios biológicos se debe a la adherencia irreversible de diferentes tipos de microorganismos (bacterias, microalgas, hongos y protozoos) sobre el metal, a través de la producción de biofilms = biopelículas (fig. 89-1). Es preciso identificar los microorganismos que intervienen en el proceso de biocorrosión y enumerarlos. Los microorganismos participan en los procesos de biocorrosión a través de la eliminación de metabolitos y también pueden llegar a consumir inhibidores de corrosión.

La forma más frecuente de corrosión de los metales a través de la participación de microorganismos es la corrosión localizada (se manifiesta por un picado del metal). Se observa un punteado, estrías o áreas brillantes en el metal, conforme a la localización y tipo de depósitos.

Análisis del problema

- La temperatura apropiada para que se desarrolle el problema es de entre 25-50 °C (esto debe ser considerado con precaución en el caso de las líneas de inyección para la recuperación secundaria de petróleo donde son frecuentes especies termófilas de bacterias reductoras de sulfato -BRS-).
- Valores de pH: 4,5-9.
- Presencia de carbono, nitrógeno, fósforo y otros nutrientes esenciales.
- Niveles de iones específicos adecuados para el crecimiento microbiano: por ejemplo sulfatos que son importantes cuando se sospecha la presencia de BRS.
- Zonas con niveles de oxígeno variables, zonas anaeróbicas.
- Se puede encontrar biocorrosión en: a) depósitos de biofouling; b) debajo de depósitos de diversa naturaleza: blandos y/o mucilaginosos; c) tubérculos o excrecencias del metal que frecuentemente contienen bacterias vivas; d) hoyuelos y/o perforaciones en la superficie de diversas aleaciones como de cobre, aluminio, acero al carbono, acero inoxidable, generalmente distribuidos en forma

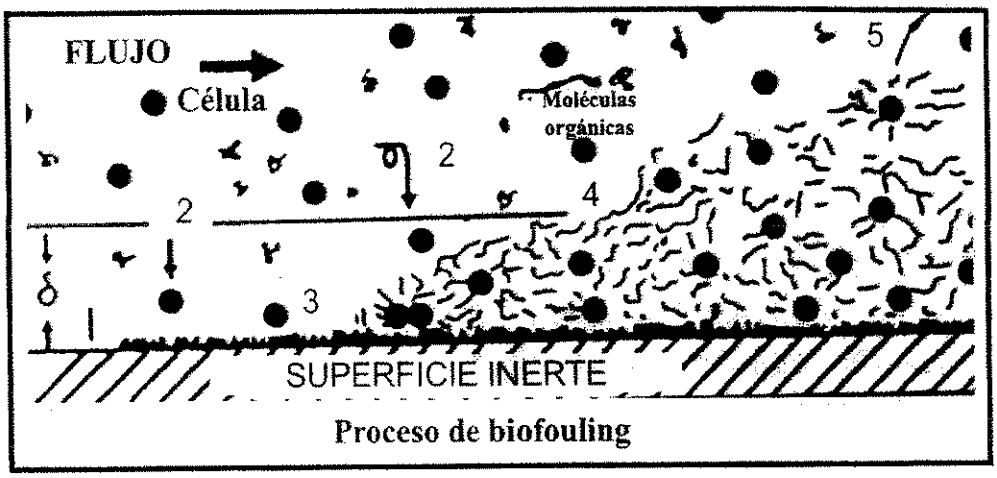


Figura 89-1. Esquema de la formación de biofilms en la interfase metálica (tomada de Characklis W.G. Fouling biofilm development: A process analysis, Biotech. Bioeng. 23, 1923-1960, 1981.). 1. Transporte y adsorción de moléculas orgánicas. 2. Transporte de células microbianas. 3. Adherencia de células microbianas. 4. Crecimiento dentro del biofilm. 5. Desprendimiento.

irregular; e) el aspecto de los depósitos puede indicar cuáles son los organismos participantes: i) fibrosos: hongos filamentosos, ii) negro (BRS), iii) amarillo: bacterias oxidantes del azufre (por ej., *Thiobacillus* sp), iv) naranja a castaño: bacterias del hierro (por ej., *Galionella* sp).

Es muy importante corroborar la presencia de microorganismos viables en la fase acuosa, y principalmente en los depósitos, a través de análisis microbiológicos.

En la industria termoeléctrica la importancia tecnológica de las biopelículas radica principalmente en las costosas pérdidas de energía causadas en los sistemas intercambiadores de calor por la disminución de la eficiencia en la transferencia calórica y en el incremento de la resistencia al flujo del líquido, así como los problemas de corrosión invariablemente asociados a la presencia de las biopelículas.

Uno de los principales factores que afecta directa e indirectamente la confiabilidad de una central eléctrica, es el pobre rendimiento de su sistema de refrigeración y principalmente de sus condensadores. El mismo se produce por un incremento de la resistencia a la transferencia de calor y por problemas de corrosión. El biofouling que desarrolla dentro de los sistemas de refrigeración de las centrales eléctricas es una de las causas principales que afecta negativamente su funcionamiento tanto en forma directa como indirecta. El tipo de biofouling desarrollado dentro de las áreas o sectores con altas velocidades de flujo se conoce como microfouling, y no llega a superar los 500 µm de espesor. En las áreas o sectores con bajas velocidades de flujo, el microfouling alcanza un desarrollo muy superior llegando a conformar lo que se denomina macrofouling.

En la industria del petróleo, se presentan severos problemas derivados de la presencia de las biopelículas tales como obturación de filtros, mal funcionamiento de manómetros, corrosión de metales y aleaciones utilizadas en la construcción de estructuras de almacenamiento y distribución del combustible, destrucción de cubiertas protectoras de dichos sistemas y finalmente una marcada alteración del producto con pérdidas económicas muy importantes.

La contaminación microbiana de combustibles derivados del petróleo constituye un serio problema en lo referente al mantenimiento de la calidad del producto y a la biocorrosión de metales y aleaciones utilizados en el proceso de extracción y distribución del mismo.

La biocorrosión de tanques integrales de aviones a retropropulsión, construidos en aleación de aluminio, y la destrucción de cubiertas protectoras de dichos sistemas son problemas frecuentes en la aviación comercial y militar desde el inicio de la década de 1960 debido al uso masivo de los aviones jet. Esta es una consecuencia de la contaminación microbiana de combustibles del tipo queroseno de aviación usado en sustitución de las aeronaftas empleadas en los motores a pistón.

La presencia de agua en el combustible en concentraciones mínimas, permite el crecimiento de los microorganismos capaces de utilizar como única fuente de carbono las cadenas hidrocarbonadas del combustible.

En los microecosistemas que se generan en la fase acuosa de los tanques de turbocombustibles, los aditivos de estos últimos o el agua presente proveen el nitrógeno y otros microelementos indispensables para el crecimiento de los microorganismos.

Dentro de la extensa literatura reunida existe coincidencia para señalar al hongo *Hormoconis resinae* (*H. resinae*) como la especie más frecuente e indicadora de biocorrosión juntamente con otros hongos marcadamente agresivos correspondientes a los géneros *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, y *Fusarium* sp.

La presencia de bacterias contaminantes también ha sido señalada en estos sistemas, en particular, diversas especies pertenecientes al género *Pseudomonas*.

Para poder entender los efectos que derivan de la actividad microbiana y el papel de las biopelículas en los procesos de corrosión y para poder implementar medidas de control y protección adecuadas, se realizan estudios de las biopelículas bacterianas y sus efectos sobre diversos metales y aleaciones, empleando la microscopia electrónica de barrido (MEB).

En las figuras 89-2 a 89-5 se observan biopelículas de variada constitución sobre diferentes metales utilizados en distintas industrias y el ataque por picado. Diversas metodologías microbiológicas, análisis de superficie y electroquímica también son necesarios para la interpretación de esta problemática.

Tratamiento del problema: mecanismos de control

1- Limpieza del sistema.
2- Control y mantenimiento de niveles bajos de microorganismos planctónicos (libres) y sésiles (formadores de biopelículas).
3- Control y mantenimiento de bajos niveles de sólidos en suspensión.



Figura 89-2. Microfotografía de MEB de una muestra de acero inoxidable AISI 430 inmersa 7 días en agua de mar natural. Se observa diatomea incluida en la biopelícula. Aumento 5000X.

4- Control de la formación de biopelículas.
5- Usos de biocidas oxidantes (cloro, ozono, bromo), solubles e insolubles, biodispersantes, biocidas selectivos (glutaraldehído apropiado para la industria del petróleo y las isotiazolinonas).

BIODETERIORO

El biodeterioro se puede definir como cualquier cambio indeseable en las propiedades de un material, causado por la actividad vital de los organismos. El término biodeterioro es usado por muchos autores como sinónimo de biocorrosión, pero éste es preferentemente empleado para indicar procesos electroquímicos de disolución de metales; sin embargo, ambos son iniciados o acelerados por microorganismos. El biodeterioro afecta a una amplia diversidad de materiales tales como: madera, piedra, cuero, metales, elementos de refinería y procesamiento de combustible, pinturas, lubricantes, etc.

En libros, documentos, fotografías y objetos de valor cultural, se encuentra como factor común la presencia de sustancias orgánicas susceptibles de ser metabolizadas por los microorganismos, las cuales pueden provocar transformaciones específicas a nivel molecular que ocasionan daños apreciables a nivel macroscópico.

El biodeterioro del patrimonio cultural es el daño físico o químico causado por diferentes organismos sobre objetos, monumentos o edificios que pertenecen al patrimonio cultural.

Los organismos que participan en los procesos de biodeterioro incluyen: bacterias, cianobacterias, algas y hongos que forman películas mucilaginosas (biopelículas) adheridas al sustrato al cual no sólo degradan sino que lo afectan estéticamente. También intervienen en el proceso de biodeterioro artrópodos, roedores, aves, líquenes, musgos y plantas vasculares.

El biodeterioro no puede ser considerado como un fenómeno aislado; siempre ocurre acompañado de otros procesos de deterioro físicos, químicos o fisicoquímicos, con los cuales está intimamente relacionado.

La importancia de las biopelículas en los procesos de biodeterioro radica en las modificaciones que se producen en los valores de pH, concentraciones iónicas y condiciones de oxidorreducción en la interfase entre el sustrato y el medio circundante.



Figura 89-3. Microfotografía de MEB de una muestra de cobre-níquel 70/30 inmersa 60 días en agua de mar natural. Se puede observar *Zoothamniun* sp. Aumento 1500X.

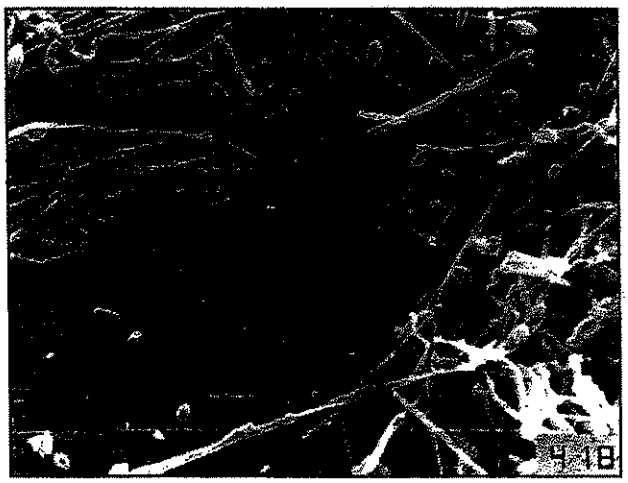


Figura 89-4. Microfotografía de MEB de una muestra de aleación de aluminio 2024 inmersa en un cultivo de *Trichosporon* sp a 60 días de incubación. Se observa el desarrollo del biofilm: hifas y elementos de reproducción asexuada. Aumento 1000X.

No hay que dejar de tener en cuenta en los estudios de biodeterioro la incidencia del desgaste atmosférico sobre los materiales expuestos al medio ambiente y la influencia de la polución natural y antropogénica que desempeñan un papel decisivo en el tipo de biodeterioro.

Existen tres tipos de biodeterioro: *estético*, la simple presencia de los organismos produce un aspecto desagradable del material; por ejemplo suciedad y pátinas de diferente coloración sobre la superficie de un edificio; *químico*, los hongos, por ejemplo, liberan ácidos orgánicos e inorgánicos que pueden desmineralizar sustratos rocosos; *físico*, por ejemplo penetración de rizoides de musgos en la piedra que provoca agujeros, y *fisicoquímico*, por ejemplo las plantas vasculares a través del crecimiento de sus raíces (*físico*) y por la acidez de las mismas y diversos exudados (*químico*).

A la hora de realizar una evaluación del estado de las áreas o piezas pertenecientes al patrimonio cultural, es importante hacer una inspección preliminar, para luego proceder a la toma de muestras, realizar los estudios biológicos y del sustrato correspondientes (pétreo o metálico, etc.) y tomar las medidas necesarias para proceder a una restauración y conservación adecuada. Es también sumamente importante en los estudios de biodeterioro evaluar

la calidad microbiológica del aire y el grado de contaminación ambiental de la zona en estudio. Factores ambientales tales como las temperaturas elevadas y la humedad relativa juegan un papel decisivo en el tipo de biodeterioro.

Los procesos de biodeterioro de materiales estructurales pueden ser de dos tipos: a) biogeoquímicos y b) biogeofísicos, según las características del daño producido al material estructural. Dentro de los primeros, la producción metabólica de ácidos orgánicos e inorgánicos conduce a una biolixiviación de los elementos constitutivos del sustrato. La producción de metabolitos ácidos es probablemente el mecanismo más estudiado de biodeterioro microbiológico de la roca. Dentro de los procesos biogeofísicos, se incluyen los cambios materiales y estructurales de la superficie de la roca que transcurren a través de la formación de diversos tipos de pátinas. Estos procesos sinergizan con los procesos de daño puramente físico debidos a los ciclos de formación de escarcha y deshielo y a la presión de cristalización de sales inorgánicas depositadas en la superficie.

Factores que propician el biodeterioro

- Humedad
- Temperatura
- Nutrientes
- pH
- Oxígeno
- Luz

Vías de entrada de los organismos

- Contaminación antropogénica
- Contaminación ambiental
- Falta de higiene
- Incorrecta manipulación del mueble o inmueble
- Problemas en el inmueble como grietas en techos y paredes. Ranuras entre paredes y pisos.
- Objetos contaminados ubicados junto a sanos

Pasos necesarios para el estudio del biodeterioro

- Caracterizar e identificar la plaga en cuestión (tipos de microorganismos y macroorganismos presentes)

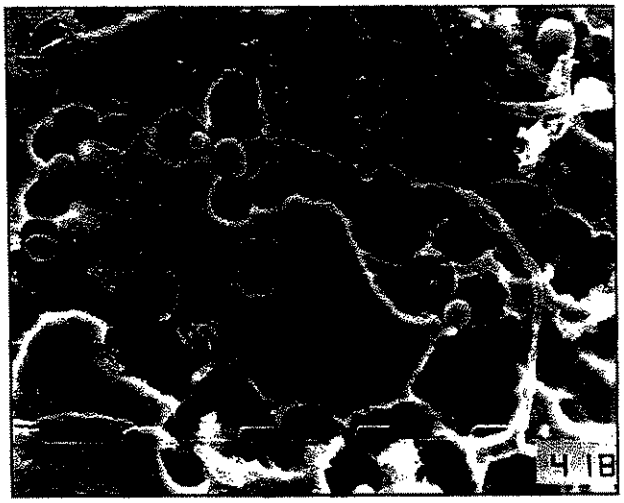


Figura 89-5. Microfotografía de MEB de una muestra de aleación de aluminio 2024 inmersa en un cultivo de *Trichosporon* sp a 60 días de incubación, luego de ser removido el biofilm. Se observa el ataque por picado. Aumento 2000X.

- Identificar las características del daño
- Seleccionar el método de control más eficiente
- Evaluar y llevar un seguimiento del estado de conservación de la obra

Alteraciones más frecuentes por acción del biodeterioro

Los organismos que mayormente inciden en el biodeterioro de las colecciones y monumentos son microorganismos, insectos, roedores, aves, murciélagos, algas, líquenes y plantas vasculares.

Las alteraciones más frecuentes por acción del biodeterioro pueden deberse a: i) manchas por el crecimiento de hongos en superficies de frescos; ii) decoloraciones por precipitación del sulfuro férrico por bacterias reductoras del azufre en metales; iii) lesiones por roedores; iv) eflorescencias por proliferación de bacterias en frescos de criptas; v) opacidad de vidrios ocasionada por la actividad de productos metabólicos de hongos; vi) pudrición de la madera por hongos descomponedores; vii) agujeros provocados por la penetración de rizoides de musgos en el sustrato; viii) acción mecánica a través del crecimiento de raíces de plantas vasculares; ix) acción química por acidez de las raíces de plantas vasculares y diversos exudados; x) secreción de ácidos por parte de los líquenes.

Aspecto superficial del sustrato

Una de las formas posibles de identificar el biodeterioro es mediante la inspección ocular (macroscópica) de la zona afectada.

Las siguientes modificaciones de la superficie del sustrato (metálico, rocoso, madera, etc.) podrían deberse a diferentes microorganismos:

- Depósitos blandos y mucilaginosos
- Ampollas que frecuentemente contienen células vivas
- Hoyuelos que pueden formarse sobre la superficie del material afectado por actividad metabólica de microorganismos

Es importante observar el aspecto de las biopelículas adheridas sobre los sustratos ya que pueden orientar acerca de cuáles son los organismos participantes, por ejemplo:

- Fibroso, manchas, decoloraciones: hongos filamentosos, hifas y esporas
- Negro: bacterias sulfato reductoras (BRS), etc.
- Pátinas: algas (fig. 89-6)
- Orificios, túneles, manchas, desgastes de superficies, restos de alas: insectos
- Materiales carcomidos, gránulos fecales puntiagudos, olor a orina: roedores
- Excretas y orina: murciélagos

De todas maneras, estos son sólo datos que a posteriori deben ser confirmados por los análisis microbiológicos/biológicos adecuados.

Aspectos microbiológicos

Se deben evaluar los microorganismos que se encuentran adheridos a la superficie formando las biopelículas y efectuar paralelamente un control microbiológico del aire. La búsqueda debe orientarse hacia una evaluación de microorganismos generales y/o específicos. Se pueden utilizar técnicas de detección y conteo de microorganismos que permitan calcular células totales, células vivas y células activas.



Figura 89-6. Pátinas verdosas sobre la parte inferior de una de las paredes laterales (orientación sudeste) de la Catedral de la Ciudad de La Plata.

Toma de muestras

Los muestreos deben realizarse en forma aséptica utilizando técnicas no destructivas. El muestreo se lleva a cabo con el auxilio de una lupa de mano, un bisturí u otro elemento, y una espátula. Cuando no se va a proceder a un cultivo posterior de los microorganismos, cada una de las muestras se coloca en frascos estériles con formol al 4% en agua destilada y se transportan al laboratorio.

En el caso de muestras para estudios microbiológicos (bacterias y hongos) se utilizan recipientes estériles. Para determinar bacterias y hongos, las muestras deben ser trasladadas al laboratorio lo más rápidamente posible (antes de las 24 horas de ser tomadas), donde se cultivan en medios adecuados.

Por otro lado, la revisión de cada una de las muestras comprende la descripción morfológica y los dibujos de cada una de las especies encontradas, utilizando el microscopio óptico. La información obtenida se analiza consultando claves de sistemática y bibliografía especializada.

Estos estudios se pueden completar con observaciones microscópicas en el microscopio electrónico de barrido (MEB).

Para caracterizar los productos derivados del deterioro del material estructural se utilizan, entre otros estudios, el análisis de superficie por dispersión de rayos X (EDAX) y la microsonda electrónica.

Prevención del biodeterioro

Los métodos empleados para prevenir el biodeterioro de materiales estructurales deben considerar la inhibición del crecimiento o de la actividad metabólica de los microorganismos y la modificación de las características del ambiente donde se desarrolla el proceso de deterioro.

Limpieza: es indispensable realizar una inspección previa, con el fin de determinar el tipo de material (mármol, piedra, bronce, etc.) y el grado de deterioro (tipo de suciedad, presencia de grietas y hendiduras, rugosidad superficial, etc.). Los diferentes procedimientos tienden a eliminar del sustrato todos los elementos adheridos, debiéndose respetar en estas operaciones el aspecto original. La limpieza es una tarea delicada porque es irreversible, resultando de gran importancia el estado de la superficie que se desea alcanzar y la forma operativa para aplicar los conocimientos y recursos disponibles. La selección del método de limpieza depende de la naturaleza del sustrato y de los factores relacionados con el tipo de impureza presente en la superficie. Existen distintos tipos de limpieza:

a) Mecánica: comprende cualquier método capaz de remover el material depositado sobre la superficie. Incluye cepillado, esferas limpiantes, etc. y se aplica para remover incrustaciones, pátinas y las bacterias asociadas a diferentes materiales. Esta debe estar acompañada de enjuagues con agua, más un agente biocida para eliminar de las superficies los microorganismos responsables del biodeterioro.
b) Química: se aplica, generalmente, luego de la limpieza mecánica. Los productos usados incluyen ácidos minerales, orgánicos y biocidas oxidantes y no oxidantes. En la selección del producto debe tenerse en cuenta la naturaleza del material y su estado de conservación; la extensión y densidad del crecimiento biológico, y la disponibilidad y costo del agente químico. Estos pueden ser empleados por aspersión, brocha, inyección o inmersión.

También se pueden emplear técnicas de limpieza con vapor de agua, agua caliente y detergentes; acción de llama o flameado; empleo de disolventes; chorreado con materiales abrasivos; método láser, etc.

BIBLIOGRAFIA

Characklis W.G. Fouling biofilm development: A process analysis. Biotech. Bioeng. 23, 1923-1960, 1981.

Gaylarde CC, Gaylarde PM. Improved non-destructive techniques for sampling and detection of pototrophic microorganisms on building surfaces. En: LATINCORR 98 NACE, International, Houston, Tx, 1998; 6 p.

Giudice C. Patrimonio cultural: limpieza, consolidación y pretratamiento con biocidas. I Jornadas Iberoamericanas sobre Biodeterioro del Patrimonio Cultural Iberoamericano. Prevención Restauración y Preservación. Cartagena de Indias, Colombia, 2003; 13 p.

Hueck HJ. The biodeterioration of materials as a part of hylobiology. Materials and organism 1965; 1: 5-34.

Martinez P, Castro J, Sánchez A. The biodeterioration property in Cuba. En: Recent Advances in Biodeterioration and Biodegradation. Ed. Garg KL, Garg N, Mukerji KG 1993; p. .379-397.

Videla HA, Guiamet PS, Gómez de Saravia SG. Biodeterioration of Mayan Archeological sites in the Yucatán peninsula, México. International Biodeterioration & Biodegradation 2000; 46: 335-341.

Videla HA, Guiamet PS, Gómez de Saravia SG. Biodeterioro de materiales en dos sitios arqueológicos de la civilización Maya. Revista del Museo de La Plata 2003; 44: 1-11.

Videla HA., Guiamet PS, Gómez de Saravia SG, Herrera LK, Arroyave C, Poire D G. Assessment of microbiological and atmospheric effects on Rock decay. Corrosion 2003; paper No. 3571, NACE, Houston, Tx.

Videla HA. Procesos de biodeterioro, Biocorrosión e intemperismo en el deterioro del patrimonio cultural. Similitudes y diferencias. I Jornadas Iberoamericanas sobre Biodeterioro del Patrimonio Cultural Iberoamericano. Prevención, Restauración y Preservación. Cartagena de Indias, Colombia, 2003; 16 p.

Warscheid T, Oetling M, Kumbrein WE. Physicochemical aspects of biodeterioration processes on rocks with special regard to organic pollutants. International Biodeterioration 1991; 28: 37-48.

Capítulo 90

INFORMATICA EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

Nestor Oscar Stanchi

INTRODUCCION

Dentro de las áreas accesorias de la microbiología, la informática constituye un campo relativamente nuevo. Desde la última edición de este libro han pasado más de 7 años y, sin embargo, a pesar de su avance en metodologías en donde puede constituir una gran ayuda, en los aspectos prácticos de la resolución de la microbiología clínica diaria, poco ha contribuido la informática en mejorar la performance de los laboratorios. Una muestra bacteriológica suele resolverse con pruebas que consisten en varios medios de cultivo, algunos estudios bioquímicos y serológicos, y un antibiograma que decidirá probablemente la terapéutica del caso clínico.

La informatización del laboratorio de bacteriología puede dividirse en dos partes. Una estrictamente de orden administrativo y la otra puramente microbiológica.

LA INFORMATIZACION ADMINISTRATIVA

En la Argentina existen varios programas diseñados especialmente para laboratorio. Básicamente todos permiten: a) ingresar datos del paciente (nombre, dirección, teléfono, edad y otros datos personales), b) ingresar datos del análisis solicitado, c) entregar un talón para el paciente donde puede calcular automáticamente la fecha en que estará el resultado de acuerdo a la complejidad del análisis, d) imprimir una planilla de trabajo (que es en la que anotaremos los resultados), e) ingresar los resultados en la computadora, f) imprimir los resultados para ser entregados al paciente, y g) calcular presupuestos, etc.

Algunos programas pueden, además, obtener los datos directamente de un equipo analizador. La mayoría de éstos están diseñados para laboratorios de medicina humana y, por lo tanto, también incluyen normalmente datos de la obra social, requisitos de la misma y pueden agregarse sistemas de contabilidad de ingreso de dinero al laboratorio, pago de sueldos, módulos de estadística, etc.

Los requerimientos de hardware de estos programas suelen ser bajos. Hay software que necesitan adaptar a cada laboratorio el tiempo que tarda el análisis en entregarse, el tipo de protocolo, qué análisis integran cada una de las planillas de trabajo, cuáles integran una "rutina", un informe, tipo de letra que incluyen, datos del laboratorio etc. Por otro lado, pocos de ellos trabajan en red, esto es, por ejemplo, en laboratorios instalados en una clínica, en donde varias computadoras están interconectadas y desde la terminal instalada en la sala de informes o en el quirófano, se visualizan inmediatamente los datos ingresados desde el laboratorio. Todos estos aspectos hacen que a pesar de existir una oferta relativamente importante en cuanto a programas que administran un laboratorio, a la hora de configurar el sistema para cada profesional, la mayor parte de ellos fallan en alguna característica.

Sucede a menudo que quien quiere informatizar un laboratorio, decide contactarse con un programador para hacer un programa "a medida". Esta práctica es totalmente desaconsejable: la mayor parte de las veces se logra un agotamiento de las partes (profesional de laboratorio y programador), en donde el desarrollo del mismo suele durar mucho tiempo y se obtienen programas realmente pobres en cuanto a su eficacia, no por ello más económicos que los comerciales. La única ventaja es la posibilidad de personalizarlos totalmente, sin embargo aun así, se pierden otras posibilidades que los programas comerciales ya traen, como por ejemplo los que presentan módulos estadísticos.

LA INFORMATICA EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

El diagnóstico microbiológico requiere normalmente de personal altamente capacitado y entrenado para su realización, a diferencia del diagnóstico químico en donde en un gran porcentaje de los casos son realizados por personal técnico o precesadores automáticos.

Esto quizá torna algo complejo pensar en una computadora capaz de desarrollar una metodología diagnóstica para una muestra clínica. Sin embargo, hay desarrollados importantes programas de computación que en conjunción con equipos reactivos muy completos como por ejemplo el API, MIDI, etc. permiten una muy acertada determinación, no sólo para el caso de las bacterias sino también en el reino Fungi (hongos), en algunos casos no sólo a nivel de especie sino también de subespecie.

Algunos sistemas ofrecen la capacidad de identificar patógenos específicos animales en más de 100 especies, aunque llegan a 1100 los que se pueden detectar por esta metodología. Básicamente la prueba incorpora un sistema químico que evalúa los productos metabólicos bacterianos. Los componentes químicos son colocados en una microplaca de 96 pocillos, conteniendo 95 tipos distintos de fuentes de carbono.

En medicina humana donde los cultivos de sangre (hemocultivos) son rutinarios se han incorporado avances importantes, principalmente en la detección temprana de aquellos positivos que por los métodos tradicionales duplican o incluso triplican el tiempo de diagnóstico.

También existen sistemas que permiten leer el halo de inhibición de un antibiótico en las pruebas de antibiogramas o detectar la presencia de un hemocultivo positivo informando el supuesto microorganismo involucrado de acuerdo al análisis de gases metabólicos.

Por otro lado, poseer informatizado el laboratorio permite aprovechar programas informativos/educativos en donde es posible encontrar datos sobre la metodología a seguir para identificar un microorganismo de taxonomía dudosa. Existen otros programas donde además es posible realizar distintos tipos de estudios, que analizan patrones proteicos en geles de poliacrilamida mono o bidireccionales, secuencia de ácidos nucleicos en geles de agar, por sólo nombrar algunos que de acuerdo con las distintas necesidades de los microbiólogos aceleran tareas de identificación que sin la ayuda de una computadora serían tediosas o aun imposibles de realizar.

Los analizadores de imágenes por software, si bien son muy importantes para el patólogo, son de poco uso en microbiología.

Lo mismo sucede con los sistemas altamente complejos como la citometría de flujo que permite la identificación de microorganismos aunque por el momento sólo a nivel experimental.

OTRAS UTILIDADES DE LAS COMPUTADORAS

Los programas de estadística suelen ser también de gran valor para analizar la casuística del laboratorio microbiológico, los porcentajes de reactivos positivos, la relación con la edad del paciente o signos o sintomatología clínica, la resistencia a betalactámicos u otros antibióticos, etc. Pero la gran ventaja que posee la computadora es la capacidad de interconectarse vía modem con otras computadoras en cualquier parte del mundo. La conexión a INTERNET (por vía telefónica o por cable –banda ancha–) hoy día es prácticamente indispensable si se quiere contar con la información de última data.

Internet 2 es una herramienta que multiplica enormemente la velocidad de transferencia de la información.

La comunicación con otros profesionales por medio del correo electrónico permite la remisión de resultados por esta vía de comunicación y realizar interconsultas.

La educación a distancia, y por ende la actualización profesional (educación continua) por medio de computadoras, principalmente mediante su conexión a Internet, complementará casi indefectiblemente a la gran mayoría de cursos, congresos y otras reuniones de carácter científico.

Aunque con menor importancia desde el punto de vista del laboratorio, la computadora permite editar textos, trabajar con planillas de cálculo, programas de diseño para presentaciones y un número importante de aplicaciones que desde el mismo laboratorio pueden ayudar a realizar más fácil la tarea.

Los grandes avances científicos y técnicos que vieron la luz durante el siglo XX facilitaron la divulgación del conocimiento a través del papel impreso. La aplicación de computadoras en el diseño de libros en las décadas de 1970 y 1980 contribuyó a bajar precios y aumentar las tiradas de libros comerciales. Además las bibliotecas han ido incorporando la informática a diversas tareas y procesos técnicos; esto comenzó en los Estados Unidos con el primer catálogo colectivo automatizado en torno a la Biblioteca del Congreso de Washington. Los catálogos colectivos permiten centralizar la información bibliográfica de dos o más bibliotecas en un catálogo central y facilitan el préstamo interbibliotecario.

Sumando a esto la incorporación en las bibliotecas de nuevos soportes como el CD-ROM y los DVD está cambiando la forma de concebir el saber. De esta manera los CD-ROM que físicamente son discos ópticos tienen la posibilidad de contener hasta 200 mil páginas de texto con sus correspondientes gráficos y explicaciones, y el DVD posee una capacidad de 17 gigabytes, o sea, 26 veces más que el CD-ROM.

La interconexión de computadoras conformando redes telemáticas (en especial Internet) constituye un avance sin precedentes en la historia. La telemática combina las redes de comunicación telefónica y satelital con las computadoras para facilitar la transmisión de información a distancia.

La Red Global (www, la cara más conocida de Internet) permite consultar catálogos de bibliotecas distantes, visitar museos y pinacotecas virtuales, comunicarse con otros usuarios por medio del correo electrónico, conversar directamente o mediante el uso del teclado (CHAT), participar de videoconferencias, formar parte de listas de correo o grupos de discusión, experimentar la denominada "realidad virtual", buscar cualquier información deseada a través de portales temáticos o buscadores: Yahoo®, Altavista®, Google®, etc. Además, la Web es sólo una parte de la Red de Redes: los Protocolos de Transferencia de Archivos (FTP): sistema que facilita el acceso gratuito a programas o archivos ubicados en servidores remotos; el Gopher (sólo texto): fue una de las primeras formas de comunicación previas al nacimiento de la www, y el Telnet: este protocolo permite la interconexión con supercomputadoras aún no conectadas a la Red Global.

No cabe duda que esta Red Global está cambiando nuestra forma de percibir el mundo y también nuestra manera de comprender. Es de esperar mayores avances en el campo del diagnóstico microbiológico en los años venideros.

El avance de la informática es indefectiblemente el área que en el futuro ayudará a realizar un mejor diagnóstico microbiológico, pero todavía falta algún tiempo para lograr avances prácticos y económicos que permitan remplazar la metodología tradicional.

MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS DE LABORATORIO

REACTIVOS DE LABORATORIO

Gueguén

Azul cotton (azul de algodón)	0,10 g
Sudan III	0,10 g
Tintura de yodo	20 gotas
Acido láctico	100 g

Líquido de Amman

(Lactofenol Azul de algodón)

Acido láctico	20 g
Cristales de fenol	20 g
Glicerina	40 ml
Azul de algodón	0,05 ml
Agua destilada	20 ml

Ablanda y tiñe de celeste azulado diferentes elementos fúngicos

Preparación:

1. Fundir los cristales de fenol en baño María (BM).
2. Agregar el ácido láctico, la glicerina y el agua.
3. Dejar reposar 24 horas y filtrar.
4. Luego agregar 0,05 g de azul de algodón (azul de Poirrier o metil blue).

PHOL

Solución de formol (4%), glicerol y azul de metileno (3%), produce resultados similares al anterior.

Patterson

Acetato de potasio solución al 2%	50 ml
Glicerina	20 ml
Alcohol etílico 95°	30 ml

Se observan los hongos por contraste y refringencia ya que el reactivo es incoloro.

Hidróxido de potasio

Al 20-40% en caliente o solo lactofenol diluido en frío se usan para ablandar y decolorar materiales queratínicos y/o esclerosados.

MEDIOS DE CULTIVO

Agar miel de Sabouraud

Para cultivo y aislamiento de mohos y levaduras

Peptona	20 g
Miel de abejas	80 g
Agar	20 g
Agua corriente csp	1000 ml

Agar Sabouraud glucosado

Para mohos y levaduras.

Peptona	10 g
Glucosa	40 g
Agar	20 g
Agua corriente csp	1000 ml

Czapeck-dox

Especial para estudios sistemáticos de *Aspergillus* y *Penicillium.*

NO_3Na	3 g
PO_4HK_2	1 g
ClK	0,5 g
$SO_4Mg.7\ H_2O$	0,5 g
$SO_4Fe.7\ H_2O$	0,01 g
Sacarosa	30 g
Agar	15 g
Agua destilada csp	1000 ml

Agar papa glucosado

Para cultivo de *Dermatophytos* y diferencial para algunas cepas *M. canis* de *M. audouinii* y *T. rubrum* de *T. mentagrophytes*

Solución I:

Papa rallada	100 g
Agua corriente	250 ml

Solución II:

PO_4H_2K	0,27 g
PO_4HNa_2	1,66 g
Glucosa	5 g
Agar	10 g
Agua destilada	250 ml

Agar papa glicerinada

Para cultivo y aislamiento de Actinomycetales aerobios.

Papa	200 g
Glicerina	20 g
PO_4H_2K	0,54 g
$PO_4HNa_2.12H_2O$	3,33 g
Agar	18 g
Agua corriente	1000 ml

Algunos de estos medios son selectivos para la mayoría de los hongos patógenos cuando se les agrega antibióticos antibacterianos como cloranfenicol, estreptomicina, penicilina, etc.

Medio de Sabouraud, cloranfenicol

Para aislamiento de hongos libres de bacterias acompañantes o asociadas (muestras de secreciones).

Peptona	10 g
Glucosa estéril	20 g
Cloranfenicol	250 mg
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

En todos los medios artesanales, primero se hierve la peptona en agua destilada hasta su disolución, se agregan los otros elementos y se homogeiniza a BM. Los antibióticos conviene agregarlos momentos antes de esterilizar, regular pH 5,6 + 0,1 y autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.

Medio de Sabouraud glucosado, cloranfenicol, cicloheximida y extracto de levaduras

Para aislamiento de hongos libres de bacterias acompañantes y microbiota fúngica ambiental.

Peptona	10 g
Glucosa estéril	20 g
Cloranfenicol	250 mg
Actidione	500 mg
Extracto de levadura	5 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

Este es un medio ideal para aislamiento de hongos patógenos de micosis superficiales y profundas; en este último caso también se debe agregar sangre o suero para enriquecerlo. Para su preparación se procede igual al anterior.

Caldo glucosado, cloranfenicol

Para aislamiento de hongos libres de bacterias acompañantes o asociadas (muestras de líquidos de punción: hemocultivos).

Peptona	10 g
Glucosa estéril	20 g
Cloranfenicol	250 mg
Agua destilada	1000 ml

Dermatofitos test (medio D.T.M.)

Agua destilada	1000 ml
Phytone (BBL)	10 g
Glucosa	20 g
Agar agar	20 g
Rojo fenol solución	40 ml
Acido clorhídrico 0,8 N	6 ml
Cicloheximida (Actidione)	0,5 g
Gentamicina sulfato	0,1 g
Cloranfenicol	0,1 g

Este es un medio selectivo que excluye las bacterias y una gran cantidad de hongos saprófitos por la presencia de cicloheximida (Actidione) en su composición.

Un indicador de pH (rojo fenol) permite reconocer en pocos días la aparición de una colonia de dermatofitos (reverso de la colonia rojo por viraje del indicador).

Para favorecer la esporulación:

Medio de Borelli

Medio natural para favorecer la esporulación y producción de pigmento de algunos hongos de interés médico y/o ambientales.

Harina	14 g
Leche en polvo	14 g
Miel	7 g
Agar	14 g
Agua destilada	1000 ml

Autoclave durante 10 minutos a 110 °C.

Agar glucosado de Sabouraud

Para favorecer la esporulación.

Neopeptona	2,5 g
Glucosa	5 g
Extracto de levadura	1,25 g
Cloruro de sodio	20 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Medio de granos de arroz

Para favorecer la esporulación de *Dermatophytos*; diferenciar *M. canis* de *M. distortum* e identificar *M. audouinii* y mohos ambientales.

Arroz blanco sin cáscara	8 g
Agua destilada	25 ml

Se dispone cierta cantidad en tubos de boca ancha o placas de Petri pequeñas y se lleva a autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Agar acetato ascosporos (levaduras)

Acetato de potasio	10 g
Extracto de levadura	2,5 g
Glucosa	1 g
Agar	30 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver, luego dispensar en tubos y autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.

Medio de Gorodkowa

(ascosporos de levaduras)

Glucosa	0,63 g
Cloruro de sodio	1,30 g
Extracto de carne	2,50 g
Agar	2,50 g
Agua destilada	250 ml

Todos los medios comerciales se disuelven en agua destilada, se funden a fuego lento u horno microondas a 20-30% de potencia. Dispensar volúmenes fijos en tubos y autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.

Solución hidroalcohólica de azul de metileno

Azul de metileno	0,3 g
Alcohol etílico 95°	30 ml
Agua destilada	100 ml

Gram

Colorante principal

Solución hidroalcohólica de violeta de genciana

Violeta de genciana	1 g
Acido fénico cristalizado	2 g
Alcohol etílico 95°	10 ml
Agua destilada	100 ml

Mordiente

Solución de Lugol

Yodo	1 g
Yoduro de potasio	2 g
Agua destilada	200 ml

Decolorante

Alcohol acetona

Alcohol etílico 95°	250 ml
Acetona	250 ml

Colorante de contraste

Solución madre de safranina

Safranina O	2,5 g
Alcohol etílico 95°	100 ml

Solución de safranina para uso inmediato
(dilución 1:5 o 1:10)

Solución madre de safranina	1 parte
Agua destilada	4 o 9 partes

Ziehl Neelsen

Colorante principal

Fucsina fenicada de Ziehl

Fucsina básica	0,3 g
Alcohol etílico 95°	10 ml
Fenol (cristales fundidos)	3 ml
Agua destilada	95 ml

Decolorante

Alcohol ácido

Acido clorhídrico concentrado	3 ml
Alcohol etílico 95°	97 ml

Colorante de contraste

Solución acuosa de azul de metileno

Azul de metileno	0,3 g
Agua destilada	100 ml

Fucsina de Kinyoun

Fucsina básica	4 g
Fenol	8 ml
Alcohol etílico 95°	20 ml
Agua destilada	100 ml

Procedimiento: cubrir totalmente con el colorante primario el extendido y calentar lentamente hasta emisión de vapor. Usando una fuente de calentamiento suave e intermitente, mantener durante 3 a 5 minutos la producción de vapores y luego dejar enfriar. Lavar brevemente con agua corriente y decolorar con la mezcla ácida hasta que no arrastre colorante. Lavar nuevamente con agua corriente y aplicar el contracolor durante 20 a 30 segundos. Lavar, secar y observar al microscopio.

Resultados: los microorganismos resistentes a la acción del ácido permanecerán teñidos en rosa. El fondo y los organismos no acidorresistentes se tiñen en azul, o sea el color del contracolorante.

Hiss

Solución hidroalcohólica de violeta de genciana

Solución alcohólica saturada de violeta de genciana	10 ml
Agua destilada	100 ml

Solución de lavado

Solución de sulfato de cobre al 20%

Moeller

Colorante principal

Fucsina fenicada de Ziehl

Mordiente

Solución de ácido crómico al 5%

Decolorantes

Solución de ácido sulfúrico al 5%
Alcohol

Colorante de contraste

Solución madre de azul de metileno

Azul de metileno	1 g
Alcohol etílico 95°	100 ml
Agua destilada	30 ml

Solución hidroalcohólica de azul de metileno

Solución madre de azul de metileno	10 ml
Agua destilada	90 ml

Gray

Colorante principal

Fucsina fenicada de Ziehl Neelsen

Mordiente (preparación diaria)

Alumbre potásico	5,0 ml
Acido tánico 20%	2,0 ml
Cloruro de mercurio	2,0 ml
Fucsina básica	0,4 ml

Casares Gil

Colorante principal

Fucsina fenicada de Ziehl

Mordiente

Acido tánico	10 g
Cloruro de aluminio hidratado	18 g
Cloruro de cinc	10 g
Fucsina básica	1,5 g
Alcohol 60°	40 ml

Solución madre de Giemsa

Colorante de Giemsa en polvo	0,5 g
Glicerina	33 ml

Disolver entre 55 y 60 °C durante 2 horas, luego añadir
Alcohol metílico absoluto (libre de acetona) 33 ml

Mezclar, sedimentar y conservar a temperatura ambiente.

Solución buffer fosfato ácido de sodio (0,067 M)

$NaH_2PO_4 . H_2O$	9,2 g
Agua destilada	1000 ml

Solución buffer fosfato disódico (0,067 M)

Na_2HPO_4	9,5 g
Agua destilada	1000 ml

Agua amortiguada (pH 7,2)

Solución buffer fosfato ácido de Na	39 ml
Solución buffer disódico	61 ml
Agua destilada	900 ml

Solución de trabajo de Giemsa (preparar antes de usar)

Solución madre de Giemsa	1 parte
Agua amortiguada	40 o 50 partes

Stamp

Solución madre de fucsina

Fucsina básica	10 g
Etanol 95%	100 ml

Solución de carbolfucsina

Solución madre de fucsina	10 ml
Fenol	5 ml
Agua destilada	100 ml

Solución madre de azul de metileno

Azul de metileno	1 g
Alcohol etílico 95°	100 ml
Agua destilada	30 ml

Solución hidroalcohólica de azul de metileno

Solución madre de azul de metileno	10 ml
Agua destilada	90 ml

Coloración de Dienes o PPLO

Colorante

Azul de metileno	2,5 g
Azur II	1,25 g
Maltosa	10 g
Carbonato de sodio	0,25 g
Agua destilada	100 ml

Auramina-rodamina

Colorante principal

Solución de auramina-rodamina

Auramina O	1,5 g
Rodamina B	0,75 g
Glicerina	75 ml
Fenol	10 ml
Agua destilada	50 ml

Mezclar bien las soluciones (en caliente y agitando enérgicamente durante 5 minutos), filtrar con lana de vidrio y guardar en frasco con tapón de vidrio bajo refrigeración (se conserva por varios meses).

Decolorante

Acido clorhídrico al 3% en alcohol etílico de 70°

Colorante de contraste

Permanganato de potasio al 0,5%

Naranja de acridina

Colorante

Naranja de acridina

Naranja de acridina en polvo	20 mg

Solución madre de buffer de

Acetato de sodio	290 ml

Solución madre de acetato de sodio

$CH_2COONa.3H_2O$ (2M)	100 ml
HCl (1M)	90 ml

Tinción de Kinyoun

Carbol-fucsina (colorante primario)

Fucsina básica	4 g
Etanol 95%	20 g
Fenol cristales	8 g
Agua destilada	100 ml

Mezcla alcohol-ácido

Acido clorhídrico concentrado	3 ml
Alcohol etílico 95°	97 ml

Azul de metileno (contracolor)

Azul de metileno	0,3 g
Agua destilada	100 ml

Procedimiento: cubrir con el colorante primario el extendido previamente fijado y dejarlo 2 minutos. Lavar con agua corriente, y decolorar con la mezcla ácido-alcohol hasta que no arrastre color del portaobjetos. Lavar nuevamente con agua corriente y aplicar el contracolor por 20-30 segundos. Lavar, sin restregar secar con papel, y observar al microscopio.

Resultados: los microorganismos acidorresistentes, se tiñen en rosa; el fondo y otros organismos quedan teñidos en azul. La única diferencia entre la coloración de Ziehl Neelsen y la de Kinyoun es la sustitución del fenol líquido, en la coloración primaria en caliente. Ambas son igualmente específicas y sensibles, siendo Kinyoun más rápida y fácil.

Kinyoun modificado (para microorganismos parcial o débiles acidorresistentes)

Las soluciones son iguales a las descritas anteriormente, excepto que se usa una solución más concentrada de azul de metileno (2,5%), pero disuelto en alcohol 95% en vez de agua destilada. Se tiñe con el colorante primario durante 3 minutos, sin calentar.

Se lava y se decolora con la mezcla alcohol-ácido por 5 a 10 segundos. Se lava nuevamente y se aplica el contracolor por 30 segundos. Lavar en agua y secar con papel. La interpretación de los resultados es igual a la tinción clásica.

MEDIOS DE TRANSPORTE

Medio de Stuart (modificado)

Glicerofosfato sódico	10 g
Tioglicolato sódico	0,5 g
Cisteína	0,5 g
Cloruro cálcico	0,1 g
Azul de metileno	0,001 g
Agar	10 g
Agua destilada	1000 ml
pH	7,4

Además de las características mencionadas, este medio evita la oxidación y destrucción enzimática de las bacterias patógenas presentes en la muestra. Como inconveniente, puede permitir el desarrollo de ciertas bacterias.

Medio modificado por Sachs

Cloruro de sodio	4,2 g
Dihidrofosfato de potasio (KH_2PO_4)	1 g
Ortofosfato de potasio (K_2HPO_4)	3,1 g
Rojo de fenol	0,003 g
Agua destilada	700 ml
Glicerina	300 ml
pH	7,2

Medio de Amies

Agar	4 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver el agar y en caliente añadir:

Cloruro de sodio	3 g
Cloruro de potasio	0,2 g
Tioglicolato de sodio	1 g
Fosfato disódico anhidro	1,15 g
(o fosfato disódico x 12 H_2O)	2,9 g
Fosfato monopotásico	0,2 g
Cloruro de calcio (sol. acuosa al 1%)	10 ml
Cloruro de magnesio x 6 H_2O (solución acuosa al 1%)	10 ml
Carbón neutro farmacéutico	10 g
pH	7,3

Medio de Cary y Blair

Fosfato disódico	1,1 g
Cloruro de sodio	5 g
Tioglicolato de sodio	1,5 g
Cloruro de calcio al 1%	9 ml
Agar	5 g
Agua destilada	991 ml
pH	8,4

Medio T.A.B.

Solución Ringer pH 7
Cisteína
SPS (poliatenol sulfonato de sodio)

MEDIOS DE CULTIVOS MAS USUALES EN BACTERIOLOGIA

MEDIO DE CHAPMAN (AGAR-MANITOL-SALADO)

Extracto de carne	1 g
Peptona	10 g
Manitol	10 g
Cloruro de sodio	75 g
Agar	15 g
Rojo de fenol	0,025 g
Agua destilada csp.	1000 ml

MEDIO 110 PARA *STAPHYLOCOCCUS*

Extracto de levadura	2,5 g
Triptona	10 g
Lactosa	2 g
Manitol	10 g
Cloruro de sodio	75 g
Fosfato dipotásico	5 g
Gelatina	30 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

MEDIO DE HUGH Y LEIFSON

(Medio OF: oxidación-fermentación):	
Peptona	2 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato dipotásico	0,3 g
Agar	2 g
Azul de bromotimol	0,08 g
Agua destilada	1000 ml

MEDIO BILIS-ESCULINA

Peptona	5 g
Extracto de carne	3 g
Bilis	40 g
Esculina	1 g
Citrato férrico	0,5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

MEDIO CALDO-CEREBRO-CORAZON

Cerebro de ternera desecado	12,5 g
Corazón de bovino desecado	5 g
Proteosa-peptona	10 g
Dextrosa	2 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato disódico	2,5 g
Agua destilada	1000 ml

GELATINA NUTRITIVA

Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Gelatina	120 g
Agua destilada	1000 ml

CALDO HIPURATO

Hipurato de sodio	10 g
Caldo de infusión	1000 ml

AGAR HIGADO (STAFSETH)

Infusión de hígado	500 ml
Peptona	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	20 g
Agua destilada csp.	500 ml

AGUA PEPTONADA PARA FERMENTACION DE HIDRATOS DE CARBONO

Peptona	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Agua destilada csp.	1000 ml

CALDO NUTRITIVO

Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Cloruro de sodio	5 g
Agua destilada csp.	1000 ml

AGAR NUTRITIVO

Extracto de carne	3 g
Peptona bacteriológica	5 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar en polvo	15 g
Agua destilada	1000 ml

AGAR *BRUCELLA*

Peptona	20 g
Dextrosa	1 g
Extracto de levadura	2 g
Bisulfito de sodio	0,1 g
Agar	15 g
Agua destilada csp.	1000 ml

MEDIO A LA FENILALANINA

Fenilalanina	2 g
Extracto de levadura	3 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato de sodio (Na_2HPO_4)	1 g
Agar	12 g
Agua destilada csp.	1000 ml

CALDO NITRATO

Extracto de carne	3 g
Peptona	3 g
Nitrato de potasio	1 g
Agua destilada	1000 ml

CALDO TRIPTOSA

Triptosa	20 g
Cloruro de sodio	5 g
Dextrosa	1 g
Hidrocloruro de tiamina	0,005 g
Agua destilada	1000 ml

CALDO TRIPTICASA SOYA

Bacto triptona	15 g
Peptona de soya	5 g
Cloruro de sodio	5 g
Agua destilada csp.	1000 ml

KING B

Proteosa peptona	20 g
Agar	15 g
Digestión pancreática de caseína	10 g
Digestión peptídica de tejido animal	10 g
Sulfato de magnesio + $7H_2O$	1,5 g
Fosfato de potasio anhidro	1,5 g

KING A

Peptona	20 g
Agar	15 g
Glucosa	10 g
Sulfato de potasio anhidro	10 g
Sulfato de magnesio	1,4 g
Agua destilada csp.	1000 ml

AGAR CETRIMIDE

Peptona	20 g
Cloruro de magnesio	1,4 g
Sulfato de potasio	10 g
Agar en polvo	15 g
Cetrimide	0,3 g
Agua destilada csp.	1000 ml

CALDO DE STUART (PARA DETERMINACION DE UREASA)

Fosfato monopotásico (H_2KPO_4)	9,1 g
Fosfato de sodio (Na_2HPO_4)	9,5 g
Extracto de levadura	0,1 g
Urea	20 g

Rojo de fenol	0,01 g
Agua destilada csp.	1000 ml

AGAR UREA DE CHRISTENSEN (PARA DETERMINACION DE UREASA)

Peptona	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato monopotásico	2 g
Glucosa	1 g
Rojo de fenol	0,012 g
Agar	15 g
Agua destilada csp.	1000 ml

MEDIO DE MULLER-HINTON

Infusión de carne	300 g
Hidrolizado ácido de caseina	17,5 g
Almidón	1,5 g
Agar	17 g
Agua destilada csp.	1000 ml

MEDIO T C B S

(Tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa-agar)

Tiosulfato de sodio	10 g
Citrato de sodio	10 g
Cloruro de sodio	3 g
Sacarosa	20 g
Bilis de buey	5 g
Digestión pancreática de caseina	5 g
Extracto de levadura	10 g
Citrato de hierro	1 g
Azul de timol	0,04 g
Azul de bromotimol	0,04 g
Agar	14 g
Agua destilada csp.	1000 ml

MEDIO DE McBRIDE MODIFICADO

Triptosa	10 g
Extracto de carne	3 g
Cloruro de sodio	5 g
Glicina anhidra	10 g
Cloruro de litio	5 g
Feniletanol	2,5 g
Agar	15 g
Agua destilada csp.	1000 ml

AGAR SS (*SALMONELLA-SHIGELLA*)

Extracto de carne	5 g
Peptona	5 g
Lactosa	10 g
Sales biliares	8,5 g
Citrato de sodio	10 g
Tiosulfato de sodio	8,5 g
Citrato férrico	1 g
Verde brillante	0,00033 g
Rojo neutro	0,025 g
Agar	15 g
Agua destilada csp.	1000 ml

AGAR ENDO

Peptona	10 g
Lactosa	10 g
Fosfato de potasio	3,5 g
Sulfato de sodio	2,5 g
Fucsina básica	0,4 g
Agar	10 g
Agua destilada csp.	1000 ml

CALDO MAC CONKEY

Peptona	20 g
Lactosa	10 g
Sales biliares	5 g
Púrpura de bromocresol	0,01 g
Agua destilada csp.	1000 ml

AGAR MAC CONKEY

Peptona	20 g
Lactosa	10 g
Sales biliares	5 g
Cloruro de sodio	5 g
Rojo neutro	0,075 g
Agar	12 g
Agua destilada csp.	1000 ml

MEDIO DE CLARK Y LUBS

Peptona	7 g
Glucosa	5 g
Fosfato de potasio (K_2HPO_4)	5 g
Agua destilada csp.	1000 ml

MEDIO DE TRANSPORTE DE STUART

Tioglicolato de sodio	1 g
Glicerofosfato de sodio	10 g
Cloruro de calcio	0,1 g
Agar	2 g
Solución acuosa de azul de metileno al 1%	2 ml
Agua destilada	1000 ml

AGAR CITRATO DE SIMONS

Sulfato de magnesio (MgS_4)	0,2 g
Monofosfato de amonio	1 g
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	2 g
Cloruro de sodio	5 g
Citrato de sodio	2 g
Azul de bromotimol (solución alcohólica al 1,5%)	0,08 g
Agar	15 a 20 g
Agua destilada csp.	1000 ml

CITRATO DE KOSER

Fosfato de sodio y amonio	1,5 g
Fosfato de potasio	1 g
Sulfato de magnesio	0,2 g
Citrato de sodio	2,5 g
Agua destilada csp.	1000 ml

CALDO V.L. (VIANDE ET LEVUREA)

Peptona tripsica	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Extracto de carne	2 g
Extracto de levadura	5 g
Clorhidrato de cisteína	0,3 g
Agua destilada csp.	1000 ml

REINFORSED CLOSTRIDIUM MEDIUM

Extracto de levadura	3 g
Extracto de carne	10 g
Peptona	10 g
Almidón soluble	1 g
Dextrosa	5 g
Clorhidrato de cisteína	0,5 g
Cloruro de sodio	5 g
Acetato de sodio anhidro	3 g
Agar	0,5 g
Agua destilada csp.	1000 ml

MEDIO DE KLIGLER

Extracto de carne	3 g
Proteosa peptona	15 g
Peptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
Lactosa	10 g
Dextrosa	1 g
Cloruro de sodio	5 g
Citrato férrico	0,3 g
Tiosulfato de sodio	0,3 g
Rojo de fenol	0,05 g
Agar	12 g
Agua destilada csp.	1000 ml

CALDO SELENITO

Peptona	5 g
Lactosa	4 g
Bioselenito de sodio	4 g
Fosfato de sodio	10 g
Agua destilada csp.	1000 ml

EMB (AGAR EOSINA AZUL DE METILENO)

Medio de Levine

Peptona	10 g
Lactosa	10 g
Fosfato dipotásico	2 g
Eosina	0,4 g
Azul de metileno	0,065 g
Agar	15 g
Agua destilada csp.	1000 ml

MEDIO BAM (BUENOS AIRES MODIFICADO)

Peptona	2 g
Urea	1 g
Lactosa	0,3 g
Indicador de Andrade	1,5 ml
Indicador azul de timol	0,3 ml
Agar	0,3 g
Agua destilada csp.	1000 ml

AGAR TRIPTOSA

Triptosa	20 g
Dextrosa	1 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	15 g
Hidrocloruro de tiamina	0,005 g
Agua destilada csp.	1000 ml

MEDIO PARA DNAsa

Triptosa	20 g
DNA	2 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	15 g
Agua destilada csp.	1000 ml

MEDIO DE BAIRD-PARKER

Triptona	10 g
Extracto de carne	5 g
Extracto de levadura	1 g
Glicina	12 g
Piruvato de sodio	10 g
Cloruro de litio	5 g
Agar	20 g
Agua destilada csp.	1000 ml

MEDIO PARA REACCION DE NITRATOS

Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Nitrato de potasio	1 g
Agar (para el agar nitrato)	12 g
Agua destilada csp.	1000 ml

CALDO DEXTROSADO

Extracto de carne	3 g
Triptosa	10 g
Dextrosa	5 g
Cloruro de sodio	5 g
Agua destilada csp.	1000 ml

MEDIO DE SKIRROW

Proteosa peptona	15 g
Digestión de hígado	2,5 g

Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	12 g
Agua destilada csp.	1000 ml
Vancomicina	20 µg/ml
Trimetoprima	10 µg/ml
Polimixina B	5 UI/ml
Actidione	100 µg/ml

CALDO TIOGLICOLATO

Triptosa	5 g
Dextrosa	5,5 g
Tioglicolato de sodio	0,5 g
Cloruro de sodio	2,5 g
L-cistina	0,5 g
Resarzurina	0,001 g
Agar	0,5 g
Agua destilada csp.	1000 ml

MEDIO DE LOWENSTEIN-JENSEN

Fosfato monopotásico anhidro (KH_2PO_4)	2,4 g
Sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,24 g
Citrato de magnesio	0,6 g
L-asparagina	3,6 g
Glicerina bidestilada	12,0 ml
Agua destilada	600 ml
Huevos enteros	1000 ml
Verde de malaquita al 2%, recién preparada	20 ml

MEDIO DE KORTHOFF

Peptona	0,8 g
Cloruro de sodio	1,4 g
Fosfato ácido de sodio $2H_2O$	0,88 g
Fosfato de potasio	0,24 g
Carbonato de sodio	0,02 g
Cloruro de calcio	0,04 g
Cloruro de potasio	0,04 g
Agua destilada csp.	1000 ml

MEDIO DE STUART

Asparagina	0,132 g
Cloruro de amonio	0,268 g
Cloruro de magnesio	0,406 g
Cloruro de sodio	1,80 g
Fosfato disódico	0,660 g
Fosfato monopotásico	0,087 g
Rojo de fenol	0,010 g
Agua destilada	1000 ml
Suero de conejo	8 a 10 %
Glicerina	5 ml

MEDIO DE FLETCHER

Peptona	0,3 g
Extracto de carne	0,2 g
Cloruro de sodio	0,5 g
Agar	1,5 g
Agua destilada	920 ml

MEDIO DE ELLINHAUSEN

Cloruro de amonio	2,5 g
Sulfato de cinc $7H_2O$	0,4 g
Cloruro de calcio $2H_2O$	1,0 g
Cloruro de magnesio $6H_2O$	1,0 g
Sulfato de hierro $7H_2O$	0,5 g
Sulfato de cobre $5H_2O$	0,3 g
Glicerol	10,0 ml
Tween 80	10,0 ml
Tiamina	0,5 g
Vitamina B_{12}	0,02 g
L-asparagina	3 g
Fosfato ácido de sodio	1 g
Fosfato ácido de potasio	0,3 g
Cloruro de sodio	1 g
Cloruro de amonio	1 ml de la solución stock
Tiamina	1 ml de la solución stock
Glicerol	1 ml de la solución stock
Agua destilada	997 ml
Fracción V de albúmina bovina	20 g
Vitamina B_{12}	2 ml de la solución stock

INDICE

A

Abbé, 3, 35
Acantosis 383
Acaros, 363
Acetato, 26
Acetona, 26
Acidez, 517
Acido, lipoteicoico, 182
micólico, 18
nalidixico, 170
nucleico, 136
p-aminobenzoico, 174
teicoico, 17, 18
Acinetobacter, 290, 331, 336, 340
Acquavirnavirus, 440
Actinobacillus, 267
pleuropneumoniae, 239
Actinomadura, 370
Actinomyces, 343
Actividad, bactericida, 163
bacteriostática, 163
del agua 63
Adenosintrifosfato, 25
Adenovirus, 375
Adhesinas, 196, 198, 199
Adsorción, 140
Aerobias, 63
Aerobios, 29
Aeromonas, 227, 232, 518
Aflatoxinas, 468
Agarosa, 153
Aglutinación, 92, 365
Aglutinación microscópica, 322
Agricultura, 225
Agrobacterium, 282
Agua
actividad, 63
Agua de triptona, 201
Ajelomyces, 476
Alevines, 441
Alfaherpesvirinae, 378
Alimentos, 197
Alopex, 541
Amensalismo, 513
Aminoglucósidos, 171
Amman líquido de, 480
Ampicilina, 187, 256
Anabolismo, 25
Anaerobios, 29, 63
facultativos, 179
Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control, 524
Anaplasma, 282
Anastomosis, 467
Anemia, infecciosa de los pollos, 388
infecciosa equina, 91, 455
Anestesia, 133
Anfibios, 230
Anfilofótrico, 19
Anfitrico, 19
Anfotericina, 174
Animales, convencionales, 122
de laboratorio, 121, 146
silvestres, 307
Antagonismo, 163, 513
Antibiótico, 163, 187
Anticuerpos, 88
Antígeno, H, 197, 198
K, 197, 198
O, 197, 198
protector, 295, 296
R, 195
Vi, 196
Antígenos, 198
fimbriales, 198
Antimetabolitos, 174
Antimicrobiano, 163
Antisepsia, 78
Antisépticos, 87
Apoinductor, 109
Apotecio, 474
Apresorios, 467
Archaea, 10, 11
Archaeobacterias, 7
Arteritis viral equina, 426, 427
Arterivirus, 429
Artritis, 255
vírica, 397, 398
Artroconidios, 467
Artrópodos, 363
Artrosporas, 467
Ascocarpo, 474
Ascoli-Valente, 297
Ascosporas, 474
Ascostroma, 474
Asepsia, 78
Asfarvirus, 390
Aspergilosis, 484
Aspergillus, 476
Atricos, 19
Autoclave, 33, 79, 81
Autoensamble, 142
Autotrofas, 29, 62
Aves, 441
Avibirnavirus, 440
Aw, 517
Azul de metileno, 42

B

Bacilo de Calmette-Guérin, 302
Bacilos, 23
ácido alcohol resistentes, 305
Bacillus, 20, 115, 294, 518
anthracis, 80
cereus, 524
punctatus, 227
Bacterias, 16, 17
cultivo, 62
fermentación, 62
fotosíntesis, 62
metabolismo, 62
respiración, 62
Bacteriófagos, 110, 137
Bacteroides, 344
fragilis, 165
Baird-Parker, 190
Balanza, 33
Baltimore, 5
Barreras naturales, 516, 520
Bartonella, 282, 363
Basidiosporas, 475
Bazo, 440
BCG, 302
Betaherpesvirinae, 378
Betalactamasas, 192
Bienestar animal
reducción, 122
remplazo, 122
refinamiento, 122
Biocida, 78
Biodegradación, 547
Bioseguridad, 533
Biosfera, 511
Bioterios, 121
Birnavirus, 440
Blastoconidios, 467
Blastosporas, 467
Boettcher célula, 42
Bolsa de Fabricio, 399, 440
Bordet Gengou, 330
Bordetella, 290
bronchiseptica, 328
Borna, 413
Bornaviridae, 421
Borrelia, 326
Botonosa fiebre, 364
Brevibacillus, 294
Bromuro de etidio, 153
Bronconeumonía, 328
Bruce efecto, 124
Brucella, 281
BSE, 505
Buenas Prácticas de Manufactura, 524
Bulbillos, 467
Bunsen, 33
Butirato, 26

C

Cabellera de medusa, 294
Caldo MR-VP, 201
Calicivirus, 443
Calor, 79
Calorías, 80, 81
Calostro, 200
Camélidos, 307
Campilobacteriosis, 525
Campo, oscuro, 35
pulsante, 154
Campylobacter, 290, 528
jejuni, 524
Candida, 476
Candidiasis, 484, 492
Candidina, 493
Canibalismo, 130
Caña de bambú, 294
Capnofilia, 331
Capnófilo, 62
Capnoicos, 29
Cápside, 136
Capsómeros, 136
Cápsula, 18, 182, 197
Carbunclo sintomático, 348
Cardiovirus, 420
Cariogamia, 473
Cary y Blair, 531
Caspofungina, 463
Catabolismo, 25
Catalasa, 192
Cefalosporinas, 187
Cefalotina, 257
Células, cultivo, primario, 146
secundario, 147
explante, 148
línea celular, 148
durables, 467
primitivas, 14
Centrífuga, 33
Cephalosporium, 165
Chapman, 190
Chikungunya, 400
Chinchilla, 541
Chlamydia, 144, 356
Chlamydophila, 356
felis 328
CHO, 530
Choque tóxico, 192
Cianobacterias, 511
Ciclo microbiano, 514
Ciervos, 307
Cilindro protoplasmático, 321
Ciprofloxacina, 170
Circovirus, 388
Cistidios, 467
Clamidiosis, 356
Clamidoartrosporas, 467
Clamidosporas, 467
Clasificación, 6
Cleistotecio, 474
Clindamicina, 172, 187
Clona, 103
Clonación, 155
Cloranfenicol, 173, 348
Clortetraciclina, 173
Clostridium, 20, 113, 295, 343, 347
botulinum, 110, 517, 524
tetani, 80
Clotrimazol, 174
Coagulasa, 191
Cobayo, 121, 127
Coccidioidomicosis, 484
Cocos, 22
Código genético, 106
Codón, 107
Cólera aviar, 268
Colibacilosis, 525
Coliformes, 518
Colonia bacteriana, 62
Colonias, 68
Coloración, 42
Coltivirus, 397
Collar de perlas, 294, 295
Combinaciones antibióticas, 163
Comensalismo, 513
Competencia, 513
Compuestos antimicrobianos, 516
Comunidad, 513
Concentración, bactericida mínima, 187
inhibitoria mínima, 187
Condensación, 80
Condroitín sulfatasa, 343
Conejo, 121, 129, 307, 541
Congeladoras, 33
Conidios, 471
Conjugación, 113, 188

Conjuntivitis, 336
Conservantes, 87
Contacto gametangial, 473
Copulación gametangial, 473, 474
Core, 136
Coronavirus, 429
Corynebacterium, 258
dyphtheriae, 319
Cósmidos, 158
Cotorra común, 356
Coxiella, 363
Creutzfeldt-Jakob enfermedad, 503
Criptococosis, 484
Crohn enfermedad de, 307
Cromosomas, 16, 17
Cryptococcus, 476
Cúbica, 137
Cultivo de células, 146
Curva de crecimiento, 63

D

Dalton, 9
Darwin, 10
DBO, 547
Decapsidación, 140
Degeneración espongiforme, 505
Deleción, 116
Demanda, bioquímica de oxígeno, 547
química de oxígeno, 547
Dengue, 447
Dermatofitos, 486
Dermatophylus, 370
Desinfección, 78
Desinfectantes, 87
Desoxirribonucleasa, 343
Diarrea, hemorrágica, 395
neonatal de los terneros, 399
viral bovina, 449
Dichelobacter, 344
Diplococos, 22
Distemper canino, 360
DNA recombinante, 118, 119
Dolosicoccus, 179
Dominio, 104
Doxiciclina, 173
DQO, 547
Duvenhage, 403

E

Ebola, 413
Ebullición, 82
Eclipse, 141, 142
Ecología, 511
microbiana, 516
Ectima contagioso ovino, 387
Efluentes tratamiento de, 547
Egreso, 142
Eikenella, 331
Elastasas, 236
Electroforesis, 91, 153
campo pulsante, 154
geles de poliacrilamida, 187
Electroforesis de campo pulsado, 187
Electroinmunodifusión, 91
Eliminación de desechos, 535
ELISA, 90, 150, 309, 322, 395, 440, 448,457
Elongación, 105, 108
EMB, 200
Embden-Meyerhof, 468
Embrión de pollo, 146, 440
Emericella, 476
Empalizada, 23
Encefalitis, 360
Encefalomielitis, aviar, 420
equina, 400
humana de Vilynisk, 420
murina de Theiler, 420
Encefalopatías espongiformes transmisibles, 503
Endocarditis, 256
Endonucleasas de restricción, 118
Endospora, 20
Endotoxina, 236
Enfermedad, de Aujeszky, 381
de Gumboro, 441
de las mucosas, 449
de Rubarth, 376
hemorrágica del conejo, 445
infecciosa bursal, 441
respiratoria aguda, 375
respiratoria crónica, 314
transmitidas por alimentos, 524
Ensamble, 141, 142
Ensayo, 32
Enteritis, 399
Enteroagregativas, 197
Enterobacter, 203, 206
Enterobacteriaceae, 195
Enterobacterias, 195
Enterococcus, 169, 186, 258
Enterohemorrágicas, 197
Enteroinvasivas, 197
Enteropatogénicas, 197
Enterotoxigénicas, 197
Enterotoxina, 192, 198, 229, 236, 530
citotónica, 229
Enthosporas, 467
Entomobirnavirus, 440
Envelope, 136
Envoltura, 136
Envueltos, 136
Enzimoinmunoensayos, 90
Epifluorescencia, 36
Episomas, 110
Epitopes, 88
Eritromicina, 257, 348
Erlenmeyer, 32
Erysipelothrix, 254
Esclerotes, 467
Escorrentía, 550
Escherichia, 197
coli, 104, 518, 524
Esferoplasto, 18, 318
Esfingomielinasa, 180
Espermatización, 473
Espirilos, 23
Espora, 20
Esporangio, 471
Esporulación, 21
Estafilococos, 23, 173
Esterilidad, 78
Esterilización, 78
controles, 81
Estomatitis vesicular, 403
Estreptobacilos, 23
Estreptocinasa, 182
Estreptococos, 23, 173, 179
Estreptomicina, 187
Estufa, 33
Eubacterium, 343
Eukarya, 8
Eumyceto, 465
Exantema, 363
Exantema vesicular del cerdo, 443
Exoenzimas, 236
Exonucleasa, 118
Exotoxinas, 192, 236
Expresión genética, 108

F

Facklamia, 179
Factor, edema, 295, 296
F, 110
letal, 295, 296
necrotizante citotóxico, 199
Fagos, 115
Fagosomas, 6
Fenómeno de zona, 88
Fenotipo, 103, 182
Feohifomicosis, 484
Fergusonia, 232
Fermentación, 26
homoláctica, 26
Feromona, 188
Fertilidad, 110
Fibras, 467
Fibrinolisina, 182, 192
Fibroblastos, 398, 441
Fibroma de Shope virus, 387
Fiebre, aftosa, 420, 457
amarilla, 447
efímera bovina, 403
recurrente, 326
Fiebres Manchadas, 363
Fijación, 140
del complemento, 93, 150
Filobasidiella, 476
Filoviridae, 413
Filtración, 83
sistemas, 86
Filtros
clasificación, 84
Fimbrias, 20, 197, 241
Flagelos, 197
Flavivirus, 447
Fleming, 190
Fluconazol, 174
Flujo laminar, 86
Fluoresceína, 89
Fluorescencia, 36
Fondo oscuro, 42
Formas-L, 18, 318
Formiato, 26
Fosfatasas, 343
Fosfolipasa, 236, 350
Fotoluminiscencia, 89
Fotosíntesis, 26
Fototrofas, 28
Fragmentos de restricción, 155
Frío, 83
Fucsina fenicada de Ziehl, 42
Fungi, 465
Funículos, 467
Fusobacterium, 343

G

Galactosidasa, 108
Gallina, 146
Gamaherpesvirinae, 378
Garrapatas, 363
Geles hidrófilos, 18
Gen, 103
Genes promotores, 108
Genoma, 113
Genotipo, 113
Gentamicina, 171, 187
Geobacillus, 294
Gérbil, 121, 132
Globicatella, 179
Glucanos, 465
Glucopéptidos, 168
Glucoproteínas, 137
Glucosa, 468
Gnotobiotes, 122
Golgi aparato de, 6, 425, 465
Gota pendiente, 41
Gram, 4
Gueguén, 480
Guillain-Barré, síndrome, 528
Gyrovirus, 388

H

Hábitat, 512
Haematopinus, 387
Haemophilus, 267
pleuropneumoniae, 239
Hafnia, 203, 209
Halococcus, 14
Halófilos, 30, 517
Hámster dorado, 121, 131
Haustorios, 467
HeLa, 199, 530
Helicasa, 105
Helicoidal, 137
Hemadsorción, 149
Hemaglutinación, 149
Hemaglutinina, 387
Hemina, 343
Hemolisina, 182, 192, 229, 343, 345
Hemólisis, 32, 180
Henle, 3
HEPA, 86
Hepatitis, 420
Hepatitis, infecciosa canina, 376
murina, 429
Herencia, 103
Hermafroditas, 474
Herpes virus felino, 328
Herpesviridae, 378
Herpesvirus, 137, 378
Heterotrofas, 29, 62
Hialuronidasa, 183, 192, 255
Hibridación, 151
Hidróxido de potasio, 480
Hifas, 467
Higiene personal, 535
Histoplasma, 476
Histoplasmosis, 484
Homotálicos, 474
Hongos
esporas, 471
reproducción, 471
Hooke, 3
Horno, 33
Huddleson, 281
Huevos embrionados, 146

I

Icosaédrica, 137
Identificación, 7
Ignavigranum, 179
Imidazoles, 174
Inclusiones, 16
Inductor, 108
Influenza, 409
Informática, 557
Ingesta, 534
Inhalación, 534
Inhibición de la hemadsorción, 149
Inmunoblotting, 150
Inmunodeficiencia humana, virus, 452
Inmunofluorescencia, 89, 150, 395
Inmunógenos, 88
Inmunohistoquímica, 89, 448
Inmunoperoxidasa, 89, 150, 395
Inmunotransferencia, 90
Inserción, 116
Instrumental, 33

Interferencia viral, 149
Iridovirus, 390
Irradiación, 523
Isométrica, 137
Itraconazol, 174
Ixodes, 326
Ixodidae, 363

J

Jansen Zacharías, 3, 35

K

Kennel cough, 328
Ketoconazol, 174
Kingella, 331
Kinyoun coloración de, 370
Kircher, 3
Klebsielleae, 203
Kliger, 229
Koch, 3, 4
Koch portaobjeto de, 41
Koch Robert, 301
Köhler, 4
Kolle, 33

L

Lactobacillus, 258, 518
Lactofenol, 480
Lagos-bat, 403
Lagovirus, 443
Lagunas aireadas, 549
Lancefield, 179
Lecitinasa, 343, 345
Leeuwenhoek Antony Van 3, 35
Legionella, 363
Lengua azul, 399
Lentes, 40
Leptospira, 320
Leptospirosis, 320
Letras chinas, 23
Leucemia bovina, 91
Leucopenia, 395
Levaduras, 3
Liberación, 142
Libres, de gérmenes o axénicos, 122
de patógenos específicos, 122
Ligasa, 118
Lignituber, 467
Lincomicina, 172
Linfoadenitis, 255
Linfocitos, 309
Linfogranuloma venéreo, 356
Lipasas, 192, 343
Lípido A, 18, 195, 240
Lipopolisacárido, 18, 195, 197, 200, 215, 240, 284, 322, 344, 530
Lipoproteína, 18
Líquido cefalorraquídeo, 365
Lisogenia, 110, 182
Lisosomas, 6, 7
Lister, 3, 18
Listerella, 258
Listeria, 258, 263-264
alimentos, 263-264
quesos, 264
yogurt, 264
Listeria monocytogenes, 518, 524
Litotrofas, 28
Litotrofia, 26
Lodos activados, 548
Lofótrico, 19
Lowenstein-Jensen, 310
LPS, 18, 195, 197, 200, 240, 344, 530
Lyme, enfermedad de, 327
Lyssavirus, 403

M

Mac Conkey, 201, 229
Macrófagos alveolares, 241
Macrólidos, 171
Maduración, 141, 142
Malassezia, 493
Manipulación de genes, 118
Mannheimia, 267, 360
Mayaro, 400
Medicamento, 78
Medio de transporte, 50
Meiosis, 473
Membrana, citoplasmática, 17, 466
corioalantoidea, 440
exterior, 18
nuclear, 6
Membranas sinoviales, 398, 399
Merión, 132
Merocigote, 113
Mesófilos, 521
Mesosoma, 16
Metabolismo bacteriano, 62
Metanobacteriales, 14
Metanogénesis, 26
Metapneumovirus, 413
Methanosarcina, 14
Metronidazol, 170
Micelio, 471
de fructificación, 466
vegetativo, 466
Micoplasmas, 313
Micosis, 484
superficiales, 484
Microaerófilas, 29, 62
Microbiota, 254
Micrococcus, 518
Microcultivo, 482
Microfibrillas, 465
Microorganismos anaerobios, 68
Microscopia electrónica, 152
Microscopio, 35
electrónico, 36
Microsporum, 476
Micheli, 4
Midddlebrook, 310
Milstein, 4
Miller-Fisher, síndrome, 528
Minociclina, 173
Miocarditis, 399
Miopristta, 356
Mitocondrias, 6
Mixomatosis, 386
Mixotrofas, 29
Mixovirus, 137
Mokola, 403
Monótrico, 19
Montañas Rocosas, fiebre de las, 364
Moraxella, 290, 331, 336, 340
Motilidad, 20
Mucopéptido, 17
Mureína, 17
Musca, 336
Mustela, 541
Mutación, 116
Mutaciones, espontáneas, 116
puntuales, 116
Mycobacterium, 300
avium, 307
tuberculosis, 173
Mycoplasmas, 7, 17, 314, 336
Myocastor, 541

N

Necrosis, hematopoyética de las truchas, 403
pancreática infecciosa, 441
Negri, 4
Neisseria, 331
Netilmicina, 171
Neufeld, reacción de, 205
Neumonía, 376
enzoótica porcina, 314
Neuraminidasa, 255, 343
Neurospora crassa, 466
Neurotoxina, 215
Neutralización, 93
Nidovirales, 425
Nistatina, 174
Nocardia, 370
Nocardiosis, 370
Nocardipsis, 370
Nomenclatura, 8
binomial, 8
Norfloxacina, 170
Norovirus, 443
Nucleasa, 192
Nucleocápside, 136
Nucleótido, 103
Nutria, 541
Nutrientes, 516,520

O

Objetivos, 40
Observación, en fresco, 41
microscópica, 40
Ochrobactrum, 282
Oerskovia, 370
Ojo rosado del ganado, 337
Oosporas, 474
Operón, 103, 108, 109
Orbivirus, 397
Orictolagus, 541
Ornithodorus moubata, 391
Orthomixovirus, 409
Orthoreovirus, 397
Osmófilos, 519
Oudin, 91
Outcherlony, 91
Oxido de etileno, 83
Oxitetraciclina, 173

P

Paenibacillus, 294, 299
PAGE, 199
Páncreas, 399
Pancreatitis, 399
Panleucopenia felina, 396
Pantoea, 203, 209
Panton Valentine, 192
Papilomaviridae, 382
Paramixovirus, 137
Paramyxoviridae, 413
Parasitismo, 513
Parásitos, 6
Paratuberculosis, 300, 307
Parecho, 420
Parvovirus, 136, 137, 395
Pasteur, 3
Pasteurella, 239, 267, 360
multocida, 330
Pasteurización, 82
Patterson, 480
PCR, 201, 256, 257, 310, 457
Pelos, 20
Penetración, 140
Penicilina, 165, 187, 190, 257
Penicillium, 165, 174
notatum, 24
Peplos, 136
Peptidoglucano, 17
Peptostreptococcus, 343
Peritecio, 474
Perítricos, 19, 197
Persistencia, 187
Peste, porcina africana, 390
porcina clásica, 447, 450
Pestivirus, 447
pH, 516
Picnidio, 471
Picornavirus, 420
Pichia, 476
Pierna negra, 349
Pili, 20, 197
Pilina, 20
Piocianina, 236
Piojos, 363
Pipetas, 32
Pirlimicina, 172
Pirógenos, 79
Pityrosporum, 493
Placa de Petri, 32
Placas, amiloideas, 503
de Peyer, 309
Plásmido, 110, 156, 187, 215, 218, 296
Plasmogamia, 473
Plasmolema, 466
Plesiomonas, 232
Pleuroneumonía, contagiosa bovina, 313
contagiosa caprina, 314
Pneumovirus, 413
Población, 512
bacteriana, 62
Poliartritis, 360
Polimerasa, 118
Polímeros, 465
Polimorfismo, 155
del DNA, 118, 119
en la longitud de los fragmentos de restricción, 310
Polio virus, 420
Poliomielitis, 420
Poliosidas, 195
Poliproteína, 433
Polisacárido, 18, 195
Pollos helicópteros, 399
Porinas, 195
Porphyromonas, 343
Portaobjetos, 32
Postulados de Koch, 297
Potencial de oxidorreducción, 516
Potencial redox, 519
Poxviridae, 136
Poxvirus, 386, 390
del canario, 387
PPD, 302
PPLO, 313
Precipitación, 91
Predación, 513
Preservativos, 87
Presión, negativa, 86
positiva, 86
Prevotella, 343
Primasa, 105
Primates, 307
Prión, 143
Priones, 504
Promotor, 103, 106
Propionibacterium, 343
Propipeta, 32
Protección, 93

Proteína, A, 191
M, 182
Proteínas de la membrana externa, 286
Proteus, 363, 365, 518
Protómeros, 136
Protoplastos, 18, 318
Proventrículo, 399
Provirus, 143
Pseudomonas, 173, 232, 235, 295, 518
Pseudomonas aeruginosa, 115, 340
Psicrófilos, 521
Psicrótropos, 521
Psitacosis, 356
Psychrobacter, 336, 340
Pteridium aquilinum, 383
Punto térmico letal, 79
Pyrroglutamil aminopeptidasa, 187

Q

Quellung, 205
Queratoconjuntivitis, 336
Quimiorganotrofismo, 186
Quimioterápicos, 163
Quinolonas, 170
Quitosano, 465

R

Rabdoviridae, 413
Rabia, 403
Radiación, 87
Radiaciones, infrarrojas, 87
ionizantes, 87
no ionizantes, 87
ultravioletas, 87
Rambach agar, 212
Ramnolípido, 236
Ranvier célula, 42
Rata, 121, 124
Ratón, 121, 122
Rayos, gamma, 87
X, 87
Reacción en cadena de la polimerasa, 151
Reactores anaerobios, 549
Recombinación del DNA, 117
Reducción decimal de tiempo, 79
Reoviridae, 397
Reovirus, 397
Replicación, 141
Replicón, 103
Replicones, 110
Represión por catabolitos, 109
Reptiles, 230
Resfriado común, 376
Retrovirus, 452
RFLP, 310
Rhipicephalus, 364
Rhizobiaceae, 282
Rhodococcus, 370
Ribosomas, 16, 106
Ribotipificación, 187
Ribozima, 107
Rickettsia, 144, 282, 363
Rickettsiosis, 363
Riesgo, 533
Rifampicina, 173
Rinitis, atrófica, 328
equina, 420
Rinoneumonitis-aborto, 380
Rinotraqueítis infecciosa bovina, 380
Rinovirus, 420
Ristella, 344
Rizoides, 467
Rizomorfos, 467
Roedores, 121
Ranivirus, 429
Ross River, 400
Rotavirus, 397
Rubivirus, 400
Runyon, 301

S

S- layer, 295
Sabin, 397
Sabouraud, 480
Saco vitelino, 398
Safranina, 42
Sales biliares, 195
Salmonella, 115, 196, 201, 210, 521, 524
Sangre, 343
Sapo, 230
Sapovirus, 443
Sarcinas, 23
Sarcoma/leucosis aviaria virus, 452
Scatomonas, 232
Scrapie, 503
Schroeter, 4
Secuencias de inserción, 111
Semliki, 400
Sepsis, 78
Septos, 466
Serotipificación, 201
Serratia, 203, 207
Seudomicelio, 466
Seudorrabia, 381, 458
Seudovirus, 143
Shigella, 201, 215, 232
Siedentopf, 4
Sindbis, 400
Síndrome, de Guillain-Barré, 528
de Miller-Fisher, 528
hemorrágico, 449
reproductivo y respiratorio porcino, 427
Sinergismo, 163, 513, 523
Síntesis proteica, 107
Sintetasa, 107
Sintrofismo, 513
Slime, 236
Solución fisiológica, 52
Somatogamia, 473
Southern blot, 154
Spallanzani, 3
Spoligotyping, 302
Sporosarcina, 20
Staphylococcus, 190, 494
aureus, 4, 519, 524
Sterne, 297
Streptobacillus moniliformis, 318
Streptococcus, 113, 172, 179, 186, 258
Streptomyces, 113, 370
mediterranei, 173
Stuart, 531
Sucesión, 513
Suero, 343
Sulfonamidas, 174
Superantígenos, 192
Superoxidodismutasa, 343
Svedberg, unidad, 7, 16

T

Tac DNA polimerasa, 118
Taxonomía, 6
Técnicas moleculares, 153
Teicoplanina, 168
Tenosinovitis vírica, 398
Terminación, 106, 108
Termófilos, 521
Termoplasmas, 520
Tetraciclinas, 173, 257, 348
Tetradas, 23
Thiobacillus thiooxidans, 516
Tiempo térmico letal, 79
Tifus, 363
Tindalización, 82
Tobramicina, 171
Togavirus, 137, 400
Tolerancia, 187
Toma de muestra, 49
Topoisomerasas, 105, 170
Torovirus, 429
Tos de las perreras, 328
Toxicidad, 121
Toxina, 295
CDT, 530
dermonecrótica, 328
eritrógena, 183
Toxinas, 241
termoestables, 199
termolábiles, 199
Tracoma, 356
Traducción, 107, 141
Transcripción, 106, 141
Transcriptasas reversas, 118
Transmisión horizontal, 398
Transposones, 110, 111, 187
Tratabilidad, 547
Trimetoprima, 174
Trimetroprima-sulfametoxazol, 187
Trípode, 33
TSI, 229
Tuberculosis, 300
Turón, 541
Tyndall, 3

U

Ultrapresión, 86
Ultrasonido, 86
Unidad de replicación, 103
Ureaplasma, 314

V

Vacunas recombinantes, 159
Vancomicina, 169
Vaporización, 80
Variedad, 8
Vectores de clonación, 118, 156
Veillonella, 343
Vellosidades intestinales, 399
VERO, 441
Vero células, 391
Verotoxigénicas, 197
Vesivirus, 443
Vestidos, 136
Vibrio, 222, 224
cholerae, 524
parahaemolyticus, 516, 524
Vibriones, 23
Violeta de genciana, 42
Viremia, 378
Viroides, 143
Viruela, 386
Virus
arteritis viral equina, 425, 426
arterivirus, 425
artritis, 397
asfarvirus, 390
birnavirus, 440
cultivo, 145
dengue, 447
deshidrogenasa láctica del ratón, 425
diarrea viral bovina, 449
encefalitis, 380
enfermedad, de Aujeszky, 381
de las mucosas, 449
fiebre, aftosa, 344
amarilla, 447
hemorrágica de los simios, 425
flavivirus, 447
herpes, 378
nidovirales, 425
papiloma, 382
peste, porcina africana, 390
porcina clásica, 447
reovirus, 397
rinoneumonitis, 380
rinotraqueítis infecciosa bovina, 380
seudorrabia, 381
síndrome reproductivo y respiratorio porcino, 427
tenosinovitis, 397
Virus, diagnóstico, 145
generalidades, 136
híbridos, 143
neutralización, 149, 448
Visón, 541
Vitamina K, 343
Vulpex, 541

W

Watson, 4
Weil, enfermedad de, 325
Weil-Felix, reacción, 365
Whitten efecto, 124

X

Xenopsylla, 363
Xerófilos, 517

Y

Yersinia, 218

Z

Zeiss Carl, 4, 35
Ziehl Neelsen, 305, 309
Zigospora, 474
Zorro, 307, 541
Zuckerckandl, 10